

УДК 577.352.3

АНТИГЕМОЛИТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ХЛОРПРОМАЗИНА ПРИ ГИПЕРОСМОТИЧЕСКОМ И ХОЛОДОВОМ ШОКЕ ЭРИТРОЦИТОВ

© 1995 г. *Н.М. ШПАКОВА**, *Е.Р. ПАНТАЛЕР*, *В.А. БОНДАРЕНКО*

*Институт проблем криобиологии и криомедицины ИАН Украины,
310015 Харьков, ул. Переяславская, 23; факс: (0572)72-00-84*

Ключевые слова: эритроцит, гемолиз, гиперосмотический шок, холодовой шок, хлорпромазин.

Изучалось сочетанное действие предварительной дегидратации эритроцитов и катионного амфипатического соединения хлорпромазина на устойчивость клеток к последующему гиперосмотическому воздействию. Обнаружен протектирующий эффект хлорпромазина, зависящий от степени исходной дегидратации клеток и температуры. Были сопоставлены результаты, полученные при добавлении катионного амфипата на предварительных этапах эксперимента и непосредственно в процессе развития гиперосмотического лизиса, и сделан вывод о том, что полученный эффект не является результатом предобработки клеток хлорпромазином и, следовательно, не связан прямо с его влиянием на регуляторные системы клетки. Показано, что ранее выявленное протектирующее действие хлорпромазина в условиях холодового шока также реализуется непосредственно в момент стрессового воздействия — при изменении температуры среды.

Известно, что изменение осмотических и температурных условий среды является фактором, способным вызвать глубокие изменения структуры и функции клетки [1, 2]. В условиях как гиперосмотического (перенос клеток в высококонцентрированные растворы электролитов), так и холодового (охлаждение от 37 до 0° в гипертонических средах) шока эритроцитов происходит нарушение барьерной функции мембран, проявляющееся в утечке ионов в лизисе клеток [3, 4]. Однако чувствительность клеток к подобным стрессовым воздействиям можно направленным образом модифицировать. В частности, в результате предварительной частичной дегидратации устойчивость эритроцитов к гиперосмотическому шоку существенно повышается, причем интервал тоничности, в пределах которого клетки приобретают устойчивость, довольно узок [3]. Этот интервал может быть расширен в результате дополнительной модификации клеток, направленной на изменение характера ассоциации компонентов цитоскелета друг с другом, а также с мембраной, например, путем насыщения эритроцитов глюкозой [3]. Ранее полученные данные о способности фенотиазинов, в частности хлорпромазина, повышать устойчивость эритроцитов к гипотоническому лизису [5] и холодовому шоку [4] позволяют предположить, что данные соединения могли бы выступать в качестве дополнительных стабилизаторов мембран предварительно дегидратированных клеток в условиях гиперосмотического шока. Подобное предположение оправдано с учетом выраженной способности хлорпромазина модифицировать структурное состояние цитоскелета [6], а также оказывать влияние на процессы замыкания мембранных дефектов [7].

* Адресат для корреспонденции и запросов оттисков.

Исходя из вышеизложенного, целью данной работы явилось изучение влияния хлорпромазина на чувствительность предварительно дегидратированных эритроцитов к гиперосмотическому стрессу, развивающемуся при переносе клеток в среду, содержащую 4,0 М NaCl.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эритроциты получали из донорской крови II группы. После удаления плазмы эритромассу дважды отмывали физиологическим раствором (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатный буфер, pH 7,4) и хранили в виде плотного осадка не более 2 ч при 0° [3]. Все использованные в работе среды готовили на 0,01 моль/л фосфатном буфере, pH 7,4.

Гипертонический шок осуществляли следующим образом. По 50 мкл осадка эритроцитов переносили с помощью поршневого дозатора Gilson в 0,5 мл растворов NaCl или сахарозы при заданной температуре (0 или 37°), инкубировали 2 мин и из каждой пробы по 50 мкл переносили в 1,0 мл 4,0 М раствора NaCl при той же температуре на 5 мин. После этого целые клетки осаждали центрифугированием и спектрофотометрически на длине волны 543 нм определяли количество гемоглобина в супернатанте. Выход гемоглобина из клеток рассчитывали в процентах по отношению к 100%-ному гемолизу в присутствии тритона X-100 (0,1%).

Для проведения холодового шока по 50 мкл осадка эритроцитов переносили в 0,5 мл растворов NaCl различной тоничности на 10 мин при 37°, а затем из каждой пробы по 50 мкл переносили в 1,0 мл растворов той же тоничности, находящихся при 0°, на 10 мин.

Кинетику гипертоического гемолиза регистрировали спектрофотометрически по уменьшению оптической плотности суспензии эритроцитов на длине волны 720 нм в кювете с постоянным перемешиванием, учитывая, что оптическая плотность пропорциональна количеству целых клеток в суспензии [8].

Модификацию эритроцитов хлорпромазином (ХПМ), если в тексте дополнительно не оговаривается, осуществляли путем инкубирования клеток с ХПМ ($6,6 \cdot 10^{-5}$ М) в физиологической среде при 37° в течение 30 мин [4]. Надосадок удаляли и модифицированные клетки подвергали действию гипертоического или холодового шока, причем все среды содержали ХПМ в той же концентрации. Концентрация стокового раствора хлорпромазина составляла $3,5 \cdot 10^{-3}$ М, pH 6,8.

Подсчет клеток проводили в камере Горяева.

В работе были использованы: хлорпромазин фирмы «Calbiochem» (США), реактивы отечественного производства квалификации х.ч. и ч.д.а.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Было изучено влияние ХПМ, температуры и степени предварительной дегидратации эритроцитов на чувствительность клеток к гиперосмотическому шоку при переносе в 4,0 М NaCl. Дегидратация клеток осуществлялась в растворах хлорида натрия (0,125–1,00 М) или сахарозы (0,27–1,20 М). Как видно из данных, представленных на рис. 1 и 2, зависимость уровня лизиса эритроцитов в 4,0 М NaCl от степени предварительной дегидратации как в солевых, так и в неэлектролитных средах (пунктирные линии на рис. 1 и 2 соответственно) представляет собой немоутоную кривую с минимумом в области 0,4–0,5 М для электролитных и 0,5 М для неэлектролитных сред. Степень выраженности указанного минимума зависит от температуры среды. Если при 0° уровень минимального гемолиза составляет 12–18%, то при 37° – около 40%.

Наши результаты хорошо согласуются с ранее полученными данными работы [3], авторы которой связывают появление максимальной устойчивости эритроцитов, дегидратированных в определенных условиях, с объемными изменениями клеток, сопровождающимися модификацией комплекса цитоскелет–мембрана. В частности, на вовлечение в контроль чувствительности клеток к гиперосмотическому шоку изменения характера ассоциации–диссоциации белка полосы 3 с цитоскелетом указывают данные, полученные в работе [9]. На характер взаимодействия периферических белков с мембраной могут оказать влияние катионные амфипаты, к которым относится хлорпромазин (ХПМ), легко проникающий во внутренний монослой мембраны и распределяющийся на границе раздела цитоскелет–мембрана [10, 11].

Данные о влиянии ХПМ на чувствительность к гиперосмотическому шоку (4,0 М NaCl) предварительно дегидратированных эритроцитов представлены сплошными кривыми на рис. 1 и 2. Модификацию клеток ХПМ осуществляли

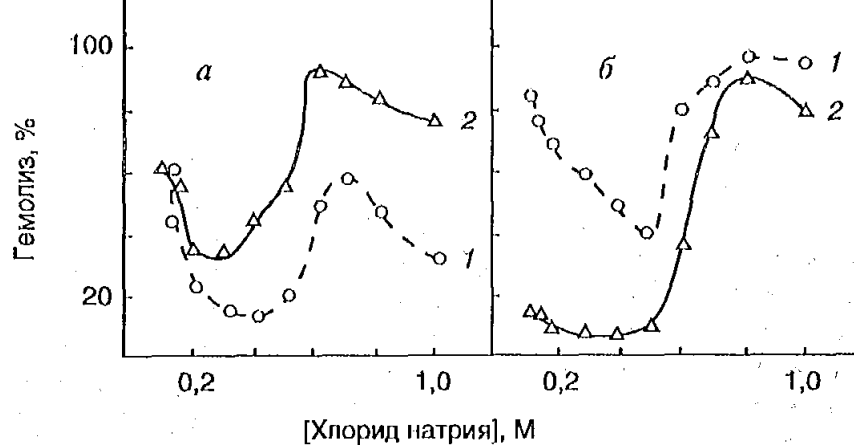


Рис. 1. Влияние ХПМ на уровень гемолиза эритроцитов при переносе в 4,0 М NaCl после предварительной инкубации в солевых дегидратирующих средах; температура: 0 (а) и 37° (б); 1 – контроль, 2 – ХПМ, $6,6 \cdot 10^{-5}$ М

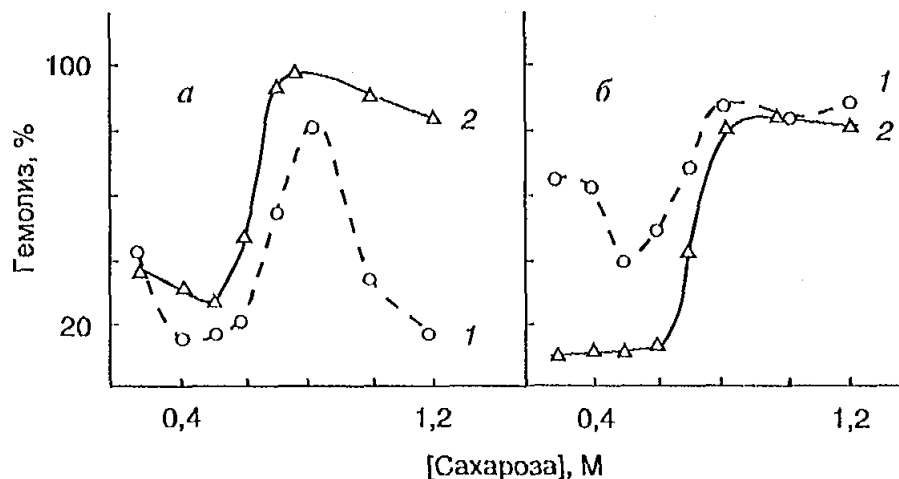


Рис. 2. Влияние ХПМ на уровень гемолиза эритроцитов при переносе в 4,0 М NaCl после предварительной инкубации в сахарозных дегидратирующих средах; температура: 0 (а) и 37° (б); 1 – контроль, 2 – ХПМ, $6,6 \cdot 10^{-5}$ М

способом, описанным в разделе «Методы исследования». Видно, что при температуре 37° ХПМ в концентрации $6,6 \cdot 10^{-5}$ М оказывает выраженное протектирующее действие на клетки, помещаемые в 4,0 М NaCl (рис. 1,б и 2,б). Влияние ХПМ на уровень гипертонического гемолиза эритроцитов не зависит от того, в какой среде находились клетки перед помещением в 4,0 М NaCl – в сахарозной или солевой. В то же время возможность последующего блокирования гипертонического гемолиза ХПМ определяется осмолярностью среды преинкубации. Протектирующий эффект ХПМ выражен лишь в случае преинкубации клеток в средах с осмотическим давлением, не превышающим некоторой граничной величины, лежащей в интервале 950–1100 мосмоль/л (что соответствует концентрации 0,7 М сахарозы и 0,6 М NaCl).

Следует отметить, что снижение температуры эксперимента сопровождается обращением эффекта ХПМ. Действительно, при 0° в присутствии ХПМ в вышеуказанной концентрации наблюдается возрастание чувствительности эритроцитов к гиперосмотическому шоку (рис. 1,а и 2,а). При охлаждении и повышении осмолярности среды в мембране происходит фазовое разделение липидов и формируются микродомены с различной текучестью [12, 13]. Сродство ХПМ к липидам в жидкокристаллическом состоянии значительно выше, чем к липидам, находящимся в состоянии геля [14]. По-видимому, дестабилизация мембраны и повышение чувствительности клеток к гиперосмотическому стрессу в 4,0 М NaCl при 0° в присутствии ХПМ могут быть

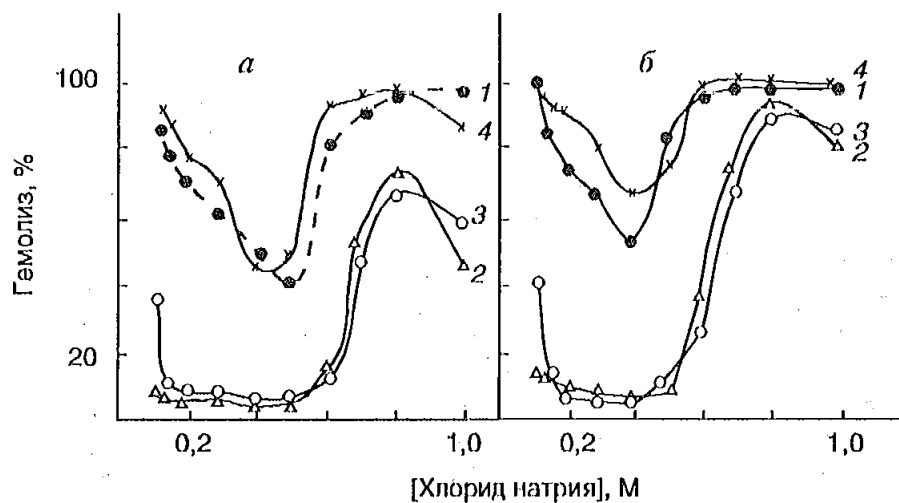


Рис. 3. Влияние ХПМ ($6,6 \cdot 10^{-5}$ М) на уровень гемолиза эритроцитов при переносе в 4,0 М NaCl после предварительной дегидратации в солевых средах при добавлении ХПМ на разных этапах эксперимента; температура 37° ; а, 1 – контроль; наличие ХПМ в среде: 2 – на III этапе, 3 – на II и III этапах, 4 – на II этапе; б, 1–4 – те же, что в (а), но переносу эритроцитов в дегидратирующие среды предшествовала 30-минутная обработка клеток ХПМ в физиологическом растворе (на I этапе)

обусловлены вытеснением амфипата в области с более высокой текучестью и накоплением его в значительных локальных концентрациях [15].

Подобная выраженная зависимость наблюдаемых эффектов ХПМ от локальных концентраций, которые могут достигаться при его распределении в области мембраны с высоким сродством, заставила нас пересмотреть постановку эксперимента для того, чтобы оценить действие этого соединения на различных этапах гипертонического воздействия на клетки.

Обычно ХПМ присутствовал в среде в одной и той же концентрации на всех этапах эксперимента, т.е. на этапе инкубации клеток с амфипатом в физиологической среде (этап I), на этапе предварительной дегидратации (этап II) и на этапе собственно гипертонического воздействия при переносе клеток в 4,0 М NaCl (этап III). На каждом из этапов перенос эритроцитов в другую среду, содержащую ХПМ в одной и той же концентрации, сопровождается разведением клеток и, следовательно, увеличивается количество молекул амфипата, приходящиеся на одну клетку. Последнее равносильно появлению концентрационного градиента ХПМ на границе среда–клетка, являющегося движущей силой для дополнительного включения амфипата в мембрану в момент каждого последующего переноса клеток. Предполагая, что в таком случае протектирующий эффект может быть обусловлен именно наличием такого «свободного» пула ХПМ, в отличие от уже распределившегося ранее между средой и клеткой и связавшегося со специфическими мишенями в ней, мы провели серию экспериментов, в которых ХПМ присутствовал на разных этапах гипертонического воздействия в различных комбинациях. Данные исследования проводились при 37° ; так как выраженный защитный эффект ХПМ наблюдался именно при этой температуре (рис. 1 и 2).

Результаты экспериментов, в которых предварительная дегидратация эритроцитов осуществлялась в солевых средах, представлены на рис. 3. Кривая 1 (пунктирная) на рис. 3,а является контролем, т.е. в данном случае на всех этапах среды не содержали ХПМ. Видно, что последовательная обработка клеток ХПМ в физиологической среде как на этапе предварительной дегидратации (рис. 3,б кривая 4), так и на каждом из указанных этапов в отдельности (кривая 1 на рис. 3,б и кривая 4 на рис. 3,а) не снижает чувствительности клеток к гиперосмотическому стрессу по сравнению с

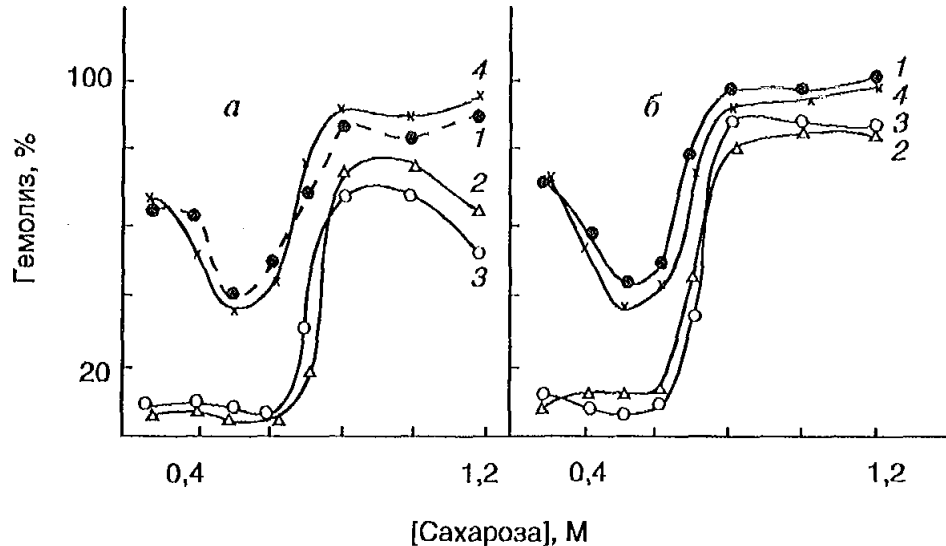


Рис. 4. Влияние ХПМ ($6,6 \cdot 10^{-5}$ М) на уровень гемолиза эритроцитов при переносе в 4,0 М NaCl после предварительной дегидратации в сахарозных средах при добавлении ХПМ на разных этапах эксперимента. Обозначения те же, что на рис. 3

контролем. Обязательным условием блокирования гемолиза при гипертоническом шоке является присутствие ХПМ на последнем (III) этапе, т.е. в лизирующей среде (4,0 М NaCl), причем наличие ХПМ на более ранних стадиях не оказывает существенного влияния на сохранность клеток при действии гипертонического стресса (все кривые, обозначенные цифрами 2 и 3 на рис. 3). Подобная картина характерна и для клеток, которые были предварительно дегидратированы в сахарозных средах (рис. 4). Следовательно, реакция эритроцитов на гипертоническое воздействие в присутствии ХПМ не зависит от качественного состава среды на этапе дегидратации.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что протектирующее действие ХПМ обусловлено наличием в лизирующей среде «свободного» пула ХПМ, а не эффектом предобработки клеток в физиологической среде, и оно не связано с влиянием ХПМ на состояние клеточной мембраны на стадии предварительной дегидратации.

Об этом свидетельствуют также представленные на рис. 5 концентрационные зависимости влияния ХПМ на уровень гемолиза эритроцитов в 4,0 М NaCl, полученные в широком интервале концентраций клеток в суспензии (10^7 – 10^8 кл/мл). Как видно из рис. 5, выраженной зависимости защитного эффекта ХПМ от количества клеток в области концентраций амфиата, соответствующей нарастанию эффекта ХПМ, не наблюдается. Лишь при дальнейшем повышении концентрации ХПМ сам индуцирует лизис эритроцитов теперь уже зависимым от концентрации клеток образом (рис. 5, правые ветви кривых).

Для того чтобы определить временные границы, в пределах которых ХПМ еще может оказать влияние на ход развития гемолитического процесса, мы исследовали кинетику гипертонического гемолиза в его присутствии. ХПМ (45–50 мкМ) добавляли в кювету спектрофотометра с лизирующим гипертоническим раствором (4,0 М NaCl) до и после помещения в нее эритроцитов. Как видно из представленных на рис. 6 данных, для осуществления протектирующего эффекта ХПМ должен присутствовать в среде уже в момент начала лизиса (кривая 2) и не способен оказать защитного эффекта, будучи добавленным даже всего через 20–30 с после «запуска» гемолитического процесса (кривая 3).

Как было показано нами ранее, ХПМ защищает эритроциты при холодном гипертоническом шоке [4]. В указанной работе клетки, модифицирован-

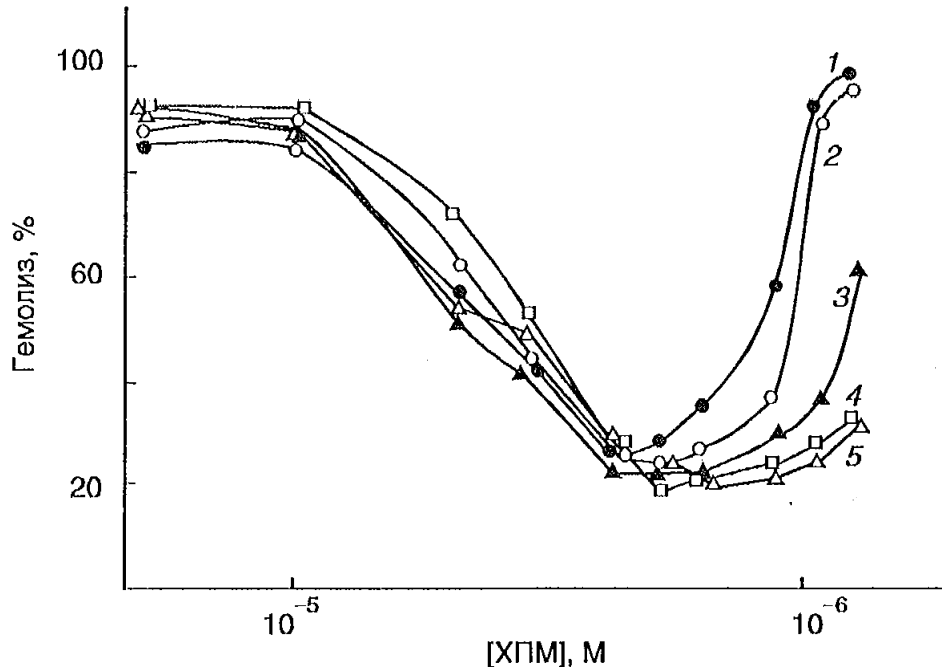


Рис. 5. Зависимость уровня гипертонического гемолиза эритроцитов при переносе в 4,0 М NaCl от содержания ХПМ в среде и концентрации клеток: 1 – 10^7 , 2 – $2,5 \cdot 10^7$, 3 – $5 \cdot 10^7$, 4 – $7,5 \cdot 10^7$, 5 – 10^8 клеток в 1 мл; температура 20°

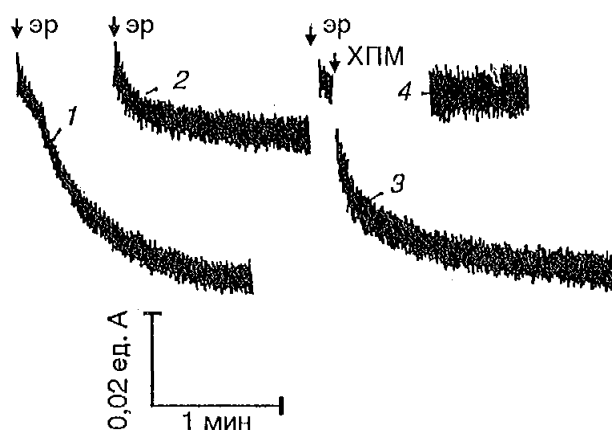


Рис. 6. Изменение во времени оптической плотности суспензии при лизисе эритроцитов в 4,0 М NaCl: лизис клеток в отсутствие ХПМ (1), добавление ХПМ до (2) и после (3) начала лизиса, 4 – сигнал оптической плотности для клеток в физиологическом растворе. А – оптическая плотность; температура 25° . Клетки переносили в 4,0 М NaCl из физиологического раствора

ные ХПМ в концентрации $6,6 \cdot 10^{-5}$ М, переносили в гипертонические среды, содержащие амфипат в той же концентрации, а затем охлаждали от 37 до 0° . Мы внесли изменения в условия эксперимента по аналогии с описанной выше постановкой эксперимента в случае гипертонического шока в 4,0 М NaCl в присутствии ХПМ. Амфипат добавляли на разных этапах холодового шока в различных комбинациях: на этапе инкубации клеток в физиологической среде, в гипертоническую среду при 37° и в среду той же тоничности при 0° . Как видно из рис. 7, для реализации протектирующего эффекта ХПМ достаточно присутствие данного соединения на конечном этапе эксперимента, т.е. непосредственно при изменении температуры от 37 до 0° . При этом характер зависимости уровня гемолиза от тоничности среды не отличается от наблюдаемого в случае предварительной модификации клеток ХПМ (рис. 7). Таким образом, защитное действие ХПМ реализуется на этапе собственно температурного шока ($37-0^\circ$).

Анализ эффектов ХПМ на клетки показывает, что действие этого соединения может носить комплексный характер, вызывая изменения структурно-

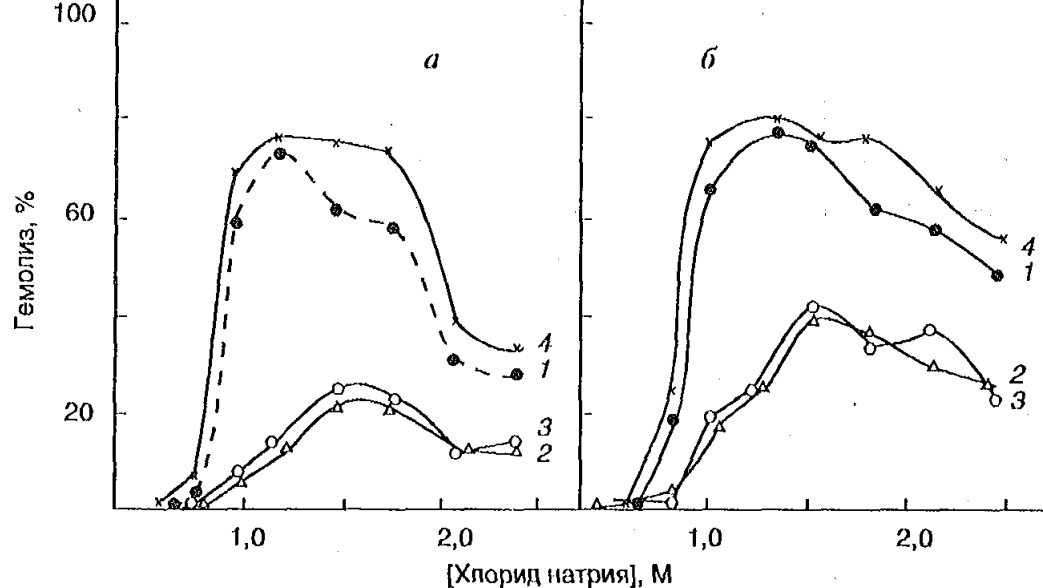


Рис. 7. Влияние ХПМ ($6,6 \cdot 10^{-5}$ М) на уровень гемолиза эритроцитов при холодном шоке ($37-0^{\circ}$) в гипертонических растворах NaCl при добавлении ХПМ на разных этапах эксперимента. Обозначения те же, что на рис. 3

го состояния как липидных, так и белковых компонентов мембраны [16, 17]. ХПМ модифицирует также белок-липидные взаимодействия [18]. Протектирующий эффект ХПМ в условиях гиперосмотического и холодного шока при переносе эритроцитов в 4,0 М NaCl при 37° может быть обусловлен его способностью ослаблять связь между мембранными липидами и белками цитоскелета и/или его влиянием на подвижность мембранных липидов и погруженных в липидный матрикс белков, т.е. действием на факторы, оказывающие влияние на формирование и время жизни трансмембранных дефектов [7, 19]. В обоих случаях время жизни дефектов, возникающих в мембране при стрессовом воздействии, будет уменьшаться либо вследствие уменьшения стабилизирующего влияния белков цитоскелета на образовавшийся дефект, либо в результате его быстрой «репарации».

Как при гиперосмотическом (4,0 М NaCl), так и при холодном шоке ХПМ защищает эритроциты непосредственно в момент стрессового воздействия, т.е. во время переходной фазы, связанной с реагированием клеток на резкое изменение условий окружающей среды. Этот факт, а также слабая зависимость эффективной протектирующей концентрации ХПМ от концентрации клеток свидетельствуют в пользу того, что для протектирования клеток необходим «свободный» пул ХПМ, не успевший сильно связаться с обычными сайтами на мембране и способный быстро перераспределяться, влияя на судьбу рождающихся в мембране дефектов. Возможно, в данном случае важна величина концентрационного градиента ХПМ на мембране, и эффект проявляется раньше установления сорбционного равновесия. Наблюдаемый эффект может быть связан со взаимодействием противоположно направленных потоков: осмотическим потоком воды из клетки и потоком ХПМ, индуцирующим в момент его добавления перераспределение липидов наружного монослоя во внутренний, и наоборот, как было показано в работах [20, 21].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М., Бондаренко В.А. (1982) *Структурные изменения биологических мембран при охлаждении*, Наукова думка, Киев.
2. Takahashi, T., and Williams, R.J. (1983) *Cryobiology*, 20, 507–520.
3. Поздняков В.В. (1989) *Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному шоку*. Автореф. дисс. канд. биол. наук, Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, Харьков.

4. Шнакова Н.М., Бондаренко В.А. (1991) *Биохимия*, 56, 2125-2130.
5. Bereza, U., Brewer, G., and Mizukami, I. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, 692, 305-314.
6. Minetti, M., and Di Stasi, A.M.M. (1987) *Biochemistry*, 26, 8133-8138.
7. Lieber, M.R., and Steck, T.L. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257, 11660-11679.
8. Дегтярев А.В. (1988) *Исследование особенностей холодового шока фосфолипидных везикул и эритроцитов*. Дисс. канд. биол. наук, Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, Харьков.
9. Рамазанов В.В., Бондаренко В.А., Руденко С.В. (1994) *Криобиология*, №2, 11-16.
10. Frenzel, J., Arnold, K., and Nuhn, P. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, 507, 185-198.
11. Jinbu, Y., Sato, S., Nakao, T., Nakao, M., Tsukita, S., Tsukita, Sh., and Ishikawa, H. (1984) *Biochim. Biophys. Acta*, 773, 237-246.
12. Oki, N., Nojima, S., and Inoue, K. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, 595, 277-291.
13. D'Avila, N.M. (1981) *J. Memb. Biol.*, 60, 155-163.
14. Kaminoh, Y., Kamaya, H., Ueda, I. (1989) *Biochim. Biophys. Acta*, 987, 63-68.
15. Hanpft, R., and Mohr, K. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, 814, 156-162.
16. Luxnat, M., and Gella, H.-J. (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, 856, 274-283.
17. Svetina, S., Vrholec, S., Gros, M., and Zeks, B. (1992) *Acta Pharm.*, 42, 25-35.
18. Minetti, M., Ceccarini, M., and Di Stasi, A.M.M. (1984) *J. Cell. Biochem.*, 25, 61-72.
19. Lieber, M.R., Lange, Y., Weinstein, R.S., and Steck, T.L. (1984) *J. Biol. Chem.*, 259, 9225-9234.
20. Schrier, S.L., Chiu, T.-Y., Yee, M., Sizer, R., and Lubin, B. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, 79, 782-786.
21. Rosso, J., Zachowski, A., and Devaux, R.F. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, 942, 271-280.

Поступила в редакцию

21.03.95

После доработки

20.06.95

ANTIHAEMOLYTIC EFFECT OF CHLORPROMAZINE ON HYPEROSMOTIC AND COLD SHOCK OF ERYTHROCYTES

N.M. SHPAKOVA, E.R. PANTALER, V.A. BONDARENKO

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences
of the Ukraine, 310015 Kharkov, Pereyaslavskaya ul., 23, the Ukraine; fax: (0572)72-00-84*

Key words: erythrocyte, hemolysis, hyperosmotic shock, cold shock, chlorpromazine.

The combined effect of preliminary dehydration of erythrocytes and the cationic amphipatic compound, chlorpromazine, on the stability of cells to subsequent hyperosmotic effect, has been studied. A protective effect of chlorpromazine depending on the degree of initial cell dehydration and temperature was found. The results obtained by an addition of the cationic amphipate at preliminary stages of the experiment and directly in the process of development of hyperosmotic lysis have been compared. A conclusion was drawn that the observed effect is not due to preliminary treatment of cells with chlorpromazine and is therefore unrelated to its influence on the regulatory systems of the cell. It has been shown also that under cold shock conditions the earlier established protective effect of chlorpromazine is also directly realized at the moment of stress exposure, i.e., with a change in temperature.