

Действие алкилдиметиламмоний пропансульфонатов на гипертонический гемолиз эритроцитов

Н.В. ОРЛОВА, Н.М. ШПАКОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Alkyldimethylammonium Propanesulphonates on Erythrocyte Hypertonic Hemolysis

N.V. ORLOVA, N.M. SHPAKOVA

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Изучали влияние алкилдиметиламмоний пропансульфонатов с длиной алкильной цепи молекул 10 (C10) и 16 (C16) углеродных атомов на чувствительность эритроцитов к гипертоническому стрессу (4,0 М NaCl). Отмечалось, что C10 проявляет высокую антигемолитическую (АГ) активность в условиях гипертонического стресса эритроцитов при температуре как 37, так и 0°C. Величины АГ активности C16 зависят от температуры: при 37°C вещество защищает клетки от гипертонического гемолиза, а при 0°C не проявляет значительной АГ активности.

Ключевые слова: эритроцит, гипертонический стресс, алкилдиметиламмоний пропансульфонаты, эффективные концентрации, антигемолитическая активность.

Вивчали вплив алкілдиметиламоній пропансульфонатів з довжиною алкільного ланцюга молекули 10 (C10) і 16 (C16) вуглецевих атомів на чутливість еритроцитів до дії гіпертонічного стресу (4,0 М NaCl). Відзначалось, що C10 виявляє високу антигемолітичну активність в умовах гіпертонічного стресу еритроцитів при температурі як 37, так і 0°C. Величини антигемолітичної активності C16 залежать від температури: при 37°C речовина протектує клітини від гіпертонічного гемолізу, але не виявляє значної антигемолітичної активності при 0°C.

Ключові слова: еритроцит, гіпертонічний стрес, алкілдиметиламоній пропансульфонати, ефективні концентрації, антигемолітична активність.

The authors investigated the effect of alkyldimethylammonium propanesulfonates with the alkyl chain length of 10 (C10) and 16 (C16) carbon atoms on the erythrocytes susceptibility to the hypertonic stress (4.0 M NaCl). C10 was noted to manifest a high antihemolytic (AH) activity under erythrocyte hypertonic stress at both 37 and 0°C. The AH values of C16 activity depend on the temperature: at 37°C the substance protects the cells from hypertonic haemolysis, but at 0°C it does not show a significant AH activity.

Key-words: erythrocyte, hypertonic stress, alkyldimethylammonium propane sulfonates, effective concentrations, antihemolytic activity.

Гипертонический стресс эритроцитов моделирует состояние клеток при действии на них высококонцентрированных растворов солей, образующихся в результате кристаллизации воды при замораживании.

Одним из способов повышения устойчивости эритроцитов к гипертонической среде является применение различных амфифильных соединений [1]. Среди веществ, проявляющих АГ активность, встречаются представители катионных, анионных, неионных, цвиттерионных амфифильных соединений [4]. Показано [5], что в условиях гипертонического стресса эритроцитов эффективность АГ действия гомологов глюкопиранозида, относящихся к неионным амфифилам, зависит от длины гидрофобной части молекулы. Представляло интерес выяснить, будет ли проявляться подобная корреляция у представителей других классов амфифильных соединений, в частности цвитте-

Erythrocyte hypertonic stress modulates the state of cells under the effect of highly concentrated salines, formed as a result of water crystallization during freezing.

One of the ways to increase the erythrocyte stability to the hypertonic medium is the usage of various amphiphilic compounds [1]. Among the substances, manifesting an AH activity, there are the representatives of anionic, cationic, non-ionic, zwitterionic amphiphilic compounds [4]. In the paper [5] it is shown that under erythrocyte hypertonic stress the efficiency of AH influence of glucopyranoside homologues, referred to non-ionic amphiphiles, depends on the length of molecule hydrophobic part. It was of interest to investigate, if the correlation of such a kind can be manifested in representatives of various classes of amphiphilic compounds, in particular, of zwitterionic amphiphiles, alkyldimethylammonium propanesulfonates.

Адрес для корреспонденции: Орлова Н.В., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-01-35, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Orlova N.V., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7720135, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

рионных амфифилов – алкилдиметиламмоний пропансульфонатов.

Цель работы – изучение влияния гомологов диметиламмоний пропансульфоната натрия на чувствительность эритроцитов к гипертоническому стрессу.

Материалы и методы

В работе были использованы цвиттерионные мицеллообразующие амфифильные соединения: 3-децилдиметиламмоний-1-пропансульфонат натрия (C10) и 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфонат натрия (C16) фирмы “Calbiochem”, а также реактивы отечественного производства квалификации “хч” и “чда”.

Эритроциты получали из крови II группы доноров-мужчин по общепринятой методике. Все используемые среды готовили на 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,4.

Гипертонический стресс эритроцитов осуществляли следующим образом. С помощью поршневого дозатора Gilson эритроциты переносили в раствор, содержащий 4,0 М NaCl (гематокрит 0,4%), при температуре 37 или 0°C. Перед внесением клеток в литическую среду добавляли амфифильное вещество. После завершения инкубирования (5 мин) клетки осаждали центрифугированием и спектрофотометрически определяли количество гемоглобина в супернатанте при длине волны 543 нм. Выход гемоглобина из клеток рассчитывали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу эритроцитов в присутствии тритона X-100 (0,1%). Значение максимальной АГ активности (AG_{max}) амфифильного соединения в серии опытов одного эксперимента представляет собой среднюю арифметическую величину значений максимальной АГ активности данного соединения, рассчитанных по формуле, приведенной в [4].

Результаты и обсуждение

На рисунке представлены зависимости гипертонического лизиса эритроцитов в 4,0 М NaCl от концентрации алкилдиметиламмоний пропансульфонатов в среде. Как видно, перенесение эритроцитов в высококонцентрированную солевую среду сопровождается гемолизом клеток, достигающим уровня 80-90%. Амфифильные соединения, представленные 3-алкилдиметиламмоний-1-пропансульфонатами, имеют четко выраженные гидрофобную и гидрофильную части. Цвиттерионность данных амфифильных соединений обусловлена положительным зарядом на четвертичном азоте и отрицательным зарядом сульфоновой группы: $R-N^+(CH_3)_2-(CH_2)_3-SO_3^-$.

Введение указанных цвиттерионных соединений в гипертоническую среду снижает повреждение

The aim of the work is to study the effect of homologues of sodium dimethylammonium propane-sulfonate on the erythrocytes susceptibility to a hypertonic stress.

Materials and methods

In the work were used zwitterionic micella-forming amphiphilic compounds: 3-decylmethylammonium-1-propanesulfonate of sodium (C10) and 3-cetyl-dimethylammonium-1-propanesulfonate of sodium (C16) (Calbiochem), and the reagents of the home production of “chemically pure” and “pure for analysis” grades.

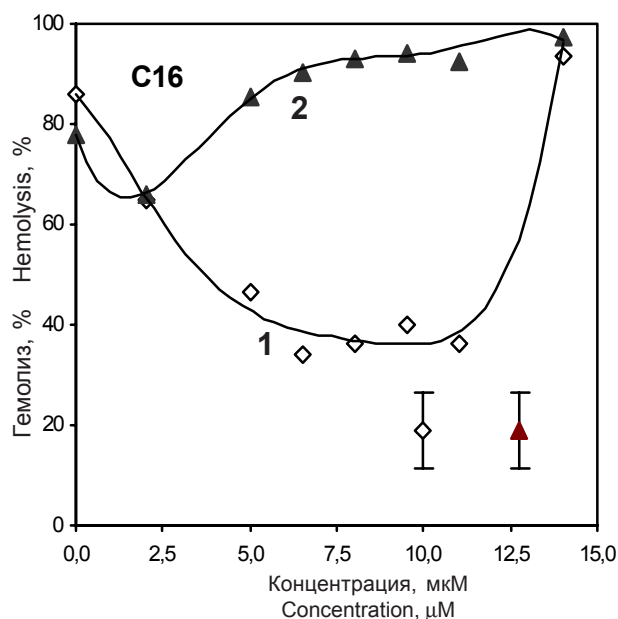
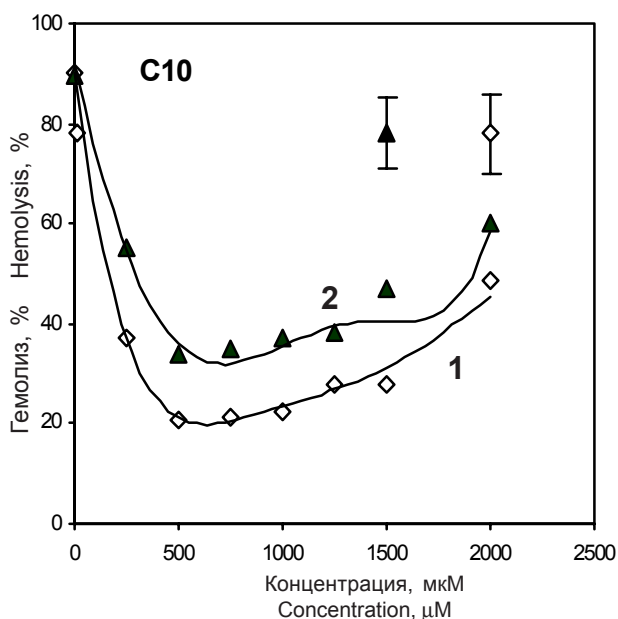
Erythrocytes were obtained from men donor blood (the II group) according to the traditional technique. All the used media were prepared, using 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4.

Erythrocyte hypertonic stress was accomplished as follows. Using Gilson’s pipette the erythrocytes were transferred into solution, which has 4.0 M NaCl (hematocrit 0.4 %), at both 37°C and 0°C temperature. Amphiphilic substance was added into lytic medium before cells’ adding. After finishing of incubation (5 min) the cells were sedimented by centrifuging and haemoglobin content in supernatant at the wave length of 543 nm was determined spectrophotometrically. Haemoglobin release out of the cells was determined in percentage to 100% erythrocytes haemolysis in the presence of triton X-100 (0.1 %). The maximum AH activity (AH_{max}) value of amphiphilic compounds in the series of trials of one experiment is an arithmetic mean of the maximum AH activity values of the compound, calculated by the formula, presented in the paper [4].

Results and discussion

In Figure there are shown the dependencies of erythrocytes hypertonic lysis in 4.0 M NaCl on the concentration of alkyl dimethylammonium propane-sulfonates in the medium. Proceeding from this, the transferring of erythrocytes into highly concentrated salines is provided by cell haemolysis, achieving the 80-90% level. Amphiphilic compounds, which are 3-alkyldemethylammonium-1-propanesulfonates, have clearly expressed hydrophobic and hydrophilic parts. Zwitterionic state of the given amphiphilic compounds is determined by positive charge on the quaternary nitrogen and on negative charge of sulfonic group: $R-N^+(CH_3)_2-(CH_2)_3-SO_3^-$.

Adding of the mentioned above zwitterionic compounds into the hypertonic medium decreases erythrocyte damage (Figure). Both for C10 and C16 there is observed the particular concentration dependence of substances effect on the erythrocytes haemolysis level. Thus during an increase of amphiphile concentration takes place a gradual decrease of the cells damage level (the left branch of



Влияние алкиламмоний пропансульфонатов натрия на гипертонический гемолиз эритроцитов (4,0 M NaCl) при температуре 37 (1) и 0°C (2).

Alkyldimethylammonium propanesulfonates sodium effect on the erythrocyte hypertonic haemolysis (4.0 M NaCl) at 37 (1) and 0°C (2).

эритроцитов (рисунок). Как для C10, так и C16 наблюдается характерная концентрационная зависимость влияния вещества на уровень гемолиза эритроцитов. Так, по мере увеличения концентрации амфифила происходит постепенное снижение уровня повреждения клеток (левая ветвь кривой). При достижении определенных концентраций уровень гемолиза не изменяется (плато кривой). Затем отмечается повышение уровня повреждения клеток (правая ветвь кривой). Для короткоцепочечного гомолога C10 участок плато кривой зависимости гипертонического гемолиза клеток от концентрации вещества более протяженный (шире диапазон концентраций вещества), чем для длинноцепочечного соединения C16. Если эффект C10 выражен примерно в одинаковой степени при 37°C и при 0°C, то проявление АГ активности C16 зависит от температуры. Так, в присутствии C16 при температуре 37°C наблюдается снижение уровня гипертонического гемолиза эритроцитов примерно на 50%, а при 0°C этот показатель незначителен (15%).

Для сравнения эффективности действия C10 и C16 использовали понятия эффективной концентрации и максимальной АГ активности вещества (таблица).

Эффективные концентрации исследуемых амфипатических соединений – это концентрации, при которых гипертонический гемолиз эритроцитов минимален, а АГ активность этих веществ – максимальна. Эффективные концентрации C10 и C16 отличаются на два порядка (таблица). При этом короткоцепочечный гомолог, имеющий более

curve). Under particular concentrations achievement the level of haemolysis does not change (curve plateau). Afterwards there was observed the increase of the cells damage level (the right branch of curve). For short-chain homologue C10 the dependence curve plateau site of cells' hyperthonic haemolysis on the concentration of the substance is more extended (wider range of substance concentrations), than for a long-chain compound C16. If the C10 effect is expressed probably in the same degree at both 37°C and 0°C, then the manifesting of C16 AH activity depends on the temperature. Thus in the C16 presence at temperature 37°C there is observed the decrease of the level of erythrocytes hypetonc haemolysis approximately by 50%, and at 0°C this index is not significant (by 15%).

For the comparison of the effectiveness of C16 and C10 influence we have used the notions of effective concentration and maximum AH activity of the substance (Table).

Effective concentrations of investigated amphipathic compounds are those, at which the hypertonic haemolysis of erythrocytes is minimum, and the AH activity of these substances is maximum. Effective concentrations of C10 and C16 differ by of two orders (Table). Under these conditions, short-chain homologue of higher concentration manifests higher AH activity, comparing with the long-chain compound. It is observed both at 37 and 0°C. Comparing to C16, C10 is seen to be able to protect to a considerable extend the cells from hypertonic damage at 0°C as well. Thus the difference in the length of hydrophobic alkyl chain of sodium alkyldimethylammonium propanesulfonate

высокую эффективную концентрацию, проявляет и более высокую АГ активность по сравнению с длинноцепочечным соединением. Это наблюдается как при 37, так и при 0°C. Видно, что C10 в отличие от C16 способен значительно протектировать клетки от гипертонического повреждения и при температуре 0°C. Таким образом, различие в длине гидрофобной алкильной цепи гомологов алкилдиметиламмоний пропансульфоната натрия является существенным моментом в проявлении этими соединениями АГ действия на клетки в условиях гипертонического стресса.

Амфифильные соединения, встраиваясь в эритроцитарную мембрану, приводят к изменению формы клетки [3,6]. Встраивание и распределение амфифильных молекул в эритроцитарной мембране обусловлено их дифильными свойствами. Определенное соотношение гидрофобности и гидрофильности в пределах молекулы позволяет ей проникать в мембрану и занимать энергетически выгодное положение. Характер трансформации эритроцитов под действием амфифильных соединений свидетельствует о локализации их молекул в эритроцитарной мембране [10]. Тот факт, что цвиттерионные соединения вызывают изменение формы клеток по типу дискоцит – эхиноцит [3,6], указывает, что молекулы данных соединений распределяются во внешнем слое эритроцитарной мембраны, вызывая, согласно “гипотезе сопряженного бислоя”, преимущественное расширение внешнего монослоя по отношению к внутреннему [10].

Исходя из того, что коэффициент распределения гомологов амфифильных соединений в системе буфер/липид прямо пропорционален степени гидрофобности их молекул [2,9], логично полагать, что меньшие значения эффективных концентраций длинноцепочечного аналога C16 по сравнению с короткоцепочечным C10 при гипертоническом стрессе эритроцитов (таблица) обусловлены различиями коэффициентов распределения молекул данных соединений между внеклеточной средой и эритроцитарной мембраной. При исследовании эффективности разнообразных амфифильных соединений в условиях гипотонического повреждения эритроцитов Hagerstrand Н. с соавторами [6] отмечали, что АГ активность связана со свойством амфифильных молекул пертурбировать структуру эритроцитарной мембраны. Это свойство проявляется в их способности увели-

Значения эффективных концентраций и АГ_{макс} амфифильных соединений в условиях гипертонического стресса эритроцитов при температуре 0 и 37°C

Values of effective concentrations and АН_{макс} activity of amphiphilic compounds in conditions of erythrocytes hypertonic stress both at temperature 0 and 37°C

Вещество Substance	Эффективная концентрация, мкМ Effective concentration, μM		АГ _{макс} , % АН _{макс} , %	
	0°C	37°C	0°C	37°C
C10	500	778	63 ± 6	79 ± 3
C16	2	8	15 ± 1	65 ± 4

homologues is the essential moment in the manifestation by these compounds of АН effect on cells under hypertonic stress.

Amphiphile compounds, being built-in into erythrocyte membrane, result in the change in a cell shape [3,6]. The building-in and distribution of amphiphilic molecules in erythrocyte membrane is determined by their diphile properties. A certain ratio of hydrophobic and hydrophilic nature within molecule permits the penetration into membrane and taking the energetically advantageous position. The character of transformation of erythrocytes under the effect of amphiphilic compounds testifies to the localization of their molecules into an erythrocyte membrane [10]. The fact that zwitterionic compounds provoke the changes in a shape of cells according to the discocyte–echinocyte type [3,6], testifies to the fact that molecules of the mentioned above compounds are distributed in outer layer of erythrocyte membrane, provoking according to the “conjugated bilayer hypothesis”, primary expansion of outer monolayer in respect of inner one [10].

Proceeding from the fact that the distribution coefficient of amphiphilic compound homologues in the buffer/lipid system is in a proportion to the level of their molecule hydrophobicity [2,9], it is logical to suppose, that the lower values of effective concentrations of the C16 long-chain analogue in comparison with the C10 short-chain one under hypertonic stress of erythrocytes (Table) are determined by the differences in the distribution coefficients for molecules of these compounds between extracellular medium and erythrocyte membrane. When investigating various amphiphilic compounds efficiency under hypotonic damage of erythrocytes, Hagerstrand Н. with co-authors [6] noted that АН activity was related to the properties of amphiphilic molecules to perturbate the structure of erythrocyte membrane. This property is

чивать скорость трансбислойного перераспределения мембранных липидов [8], приводить к образованию микровезикул [7]. По-видимому, выявленная достаточно высокая антигемолитическая активность короткоцепочечного цвиттериона при разной температуре свидетельствует о способности его молекул нарушать структуру эритроцитарной мембраны, состояние которой определяется температурой эксперимента (37 или 0°C). Молекулы C10 примерно в одинаковой мере изменяют структуру мембраны при физиологической температуре и при 0°C. Если для гомологов глюкопиранозида с длиной алкильной цепи 6, 8 и 10 углеродных атомов наблюдалось повышение АГ активности амфифилов по мере увеличения гидрофобности молекул как при 0, так и при 37°C [5], то для исследуемых цвиттерионных соединений выявлена иная закономерность. Можно предположить, что особенности структуры эритроцитарной мембраны при низкой температуре накладывают стерические ограничения на встраивание молекул C16, имеющим длинную алкильную цепь, в результате чего наблюдается существенное снижение уровня АГ активности при 0°C.

Выводы

Полученные результаты свидетельствуют о том, что физико-химические свойства исследуемого цвиттерионного соединения с длиной гидрофобной части молекулы 10 углеродных атомов позволяют проявлять ему высокую АГ активность в условиях гипертонического стресса эритроцитов как при температуре 37, так и 0°C. Увеличение гидрофобной части до 16 углеродных атомов при неизменной полярной области молекулы C16 приводит к снижению эффективности вещества при 37°C и практически отсутствию его АГ активности при 0°C. Таким образом, существует оптимальное соотношение гидрофильной и гидрофобной частей молекулы цвиттерионного амфифильного вещества, необходимое для проявления значительной АГ активности при разных температурах.

Литература

1. Дунаевская О.И., Шпакова Н.М. Защитный эффект трифторперазина при гиперосмотическом шоке эритроцитов // Укр. биохим. журн.– 1997.– N2.– С. 30-34.
2. Зимон А.Д., Лещенко Н.Ф. Коллоидная химия.– М., 1999.– 320 с.
3. Кулешова Л.Г., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Антигемолитическая и трансформирующая активность амфифильных соединений // Пробл. криобиологии.– 2001.– №1.– С. 9-15.

manifested in their ability to increase the rate of transbilayer re-distribution of membrane lipids [8], and to lead to the microvesicle formation [7]. Maybe the revealed quite a high AH activity of short-chain zwitterion at various temperatures testifies to the capability of its molecules to excite the structure of erythrocyte membrane, the state of which is determined by the experimental temperature (37 and 0°C). C10 molecules may likely excite a membrane at the same extent both under physiological temperature and at 0°C. If for the homologues of glucopyranoside with the alkyl chain length of 6, 8 and 10 carbon atoms there was observed a decrease of AH activity of amphiphiles with an increase of hydrophobicity of molecules both at 0 and 37°C [5], then for the investigated zwitterionic compounds another regularity was found. It may be supposed, that the peculiarities of the erythrocyte membrane structure at low temperature cause steric limitations for the building-in of C16 molecules, having a long alkyl chain, that results in a significant decrease of the AH activity level at 0°C.

Conclusions

Obtained results testify to the fact that physical and chemical characteristics of the investigated zwitterionic compound with the length of molecule hydrophobic part 10 carbon atoms allow to manifest a high AH activity under erythrocytes' hypertonic stress both at 37 and 0°C. The increase of hydrophobic part up to 16 carbon atoms with unchanged polar region of C16 molecule results in a decrease of the substance efficiency at 37°C and practical absence of its AH activity at 0°C. Thus there is an optimal ratio of molecule hydrophobic and hydrophilic parts of zwitterionic amphiphilic substance, which is necessary for the manifestation of considerable AH activity at different temperatures.

References

1. Dunaevskaya O.I., Shpakova N.M. Trifluorperazine protective effect at hyperosmotic erythrocyte shock // Ukr. Biokhim. Zhurn.– 1997.– N2.– P. 30-34.
2. Zimon A.D., Leschenko N.F. Colloid chemistry. – Moscow, 1999.– 320 p.
3. Kuleshova L.G., Orlova N.G., Shpakova N.M. Antihemolytic and Transforming Activity of Amphiphilic compounds // Problems of Cryobiology.– 2001.– N1.– P. 9-15.
4. Orlova N.V., Shpakova N.M. Effect of Amphiphilic Compounds on the Susceptibility of Partially Dehydrated Erythrocytes to Hypertonic Stress // Problems of Cryobiology.– 2003.– N1.– P. 59-64.
5. Synchykova O.P. Glucopyranosides effect on human erythrocyte resistance to hyperosmotic stress // Problems of Cryobiology. – 1999.– № 3.– P. 77-79.
6. Hagerstrand H., Isomaa B. Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // Chem. Biol. Inter.– 1991.– Vol. 79.– P. 335-347.

4. Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Влияние амфифильных соединений на чувствительность частично обезвоженных эритроцитов к гипертоническому стрессу // Пробл. криобиологии.– 2003.– N1. С. 59-64.
5. Сынчикова О.П. Влияние глюкопиранозидов на устойчивость эритроцитов человека к гиперосмотическому стрессу // Пробл. криобиологии.– 1999.– №3.– С. 77-79.
6. Hagerstrand H., Isomaa B. Amphiphile-induced antihemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // Chem. Biol. Inter.– 1991.– Vol. 79.– P. 335-347.
7. Hagerstrand H., Isomaa B. Lipid and protein composition of exovesicles released from human erythrocytes following treatment with amphiphiles // Biochim. Biophys. Acta.– 1994.– Vol. 1190.– P. 409-415.
8. Pantaler E., Kamp D., Haest C.W. Acceleration of phospholipid flip-flop in erythrocyte membrane by detergents differing in polar head group and alkyl chain length // Biochim. Biophys. Acta.– 2000.– Vol. 1509, N1-2.– P. 397-408.
9. Schreier S., Malheiros S.V.P., Paula E. Surface active drugs: self-associated and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects // Biochim. Biophys. Acta.– 2000.– Vol. 1508, N1.– P. 210-234.
10. Sheetz M.B., Singer S.J. On the mechanism of ATP-induced shape changes in human erythrocytes. I. Cytoplasmatic influence over cell surface components // J. Cell Biol.– 1977.– Vol. 73.– P. 638-646.
7. Hagerstrand H., Isomaa B. Lipid and protein composition of exovesicles released from human erythrocytes following treatment with amphiphiles // Biochim. Biophys. Acta.– 1994.– Vol. 1190.– P. 409-415.
8. Pantaler E., Kamp D., Haest C.W. Acceleration of phospholipid flip-flop in erythrocyte membrane by detergents differing in polar head group and alkyl chain length // Biochim. Biophys. Acta.– 2000.– Vol. 1509, N1-2.– P. 397-408.
9. Schreier S., Malheiros S.V.P., Paula E. Surface active drugs: self-associated and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects // Biochim. Biophys. Acta.– 2000.– Vol. 1508, N1.– P. 210-234.
10. Sheetz M.B., Singer S.J. On the mechanism of ATP-induced shape changes in human erythrocytes. I. Cytoplasmatic influence over cell surface components // J. Cell Biol.– 1977.– Vol. 73.– P. 638-646.

Accepted in 04.08.2003

Поступила 04.08.2003