

Действие трифторперазина на гемолиз эритроцитов в гипертонических растворах электролитов

Н.М. ШПАКОВА, О.Н. ДУНАЕВСКАЯ, О.П. СЫНЧИКОВА, В.А. БОНДАРЕНКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Trifluoperazine Effect on Erythrocyte Hemolysis in Electrolyte Hypertonic Solutions

SHPAKOVA N.M., DUNAIEVSKAYA O.N., SYNCHKOVA O.P., BONDARENKO V.A.
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy
of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Проявление антигемолитической активности трифторперазина (ТФП) при гипертоническом гемолизе эритроцитов зависит от температуры и состояния клеток. Как снижение температуры до 0°C, так и предварительная инкубация клеток в присутствии 0,7 М NaCl приводят к падению антигемолитической активности ТФП при перенесении их в 4,0 М NaCl. Сочетанное действие низкой температуры и предварительной дегидратации клеток сопровождается обращением эффекта амфипата и дополнительным лизисом клеток в 4,0 М NaCl. Обработка клеток нейраминидазой и протеолитическими ферментами не влияет на проявление антигемолитической активности ТФП при гипертоническом гемолизе эритроцитов при 37°C, а предварительная дегидратация таких клеток приводит к ее снижению. Модификация мембранных гликопротеинов в результате обработки протеолитическими ферментами сопровождается повышением антигемолитической активности ТФП при 0°C. Полученные результаты обсуждаются с точки зрения процессов, лежащих в основе формирования и стабилизации трансмембранных дефектов.

Проява антигемолітичної активності трифторперазину (ТФП) при гіпертонічному гемолізі еритроцитів залежить від температури та стану клітин. Як зниження температури до 0°C, так і попередня інкубація клітин у присутності 0,7 М NaCl призводять до падіння антигемолітичної активності ТФП при перенесенні еритроцитів у 4,0 М NaCl. Поєднана дія низької температури та попередньої дегідратації клітин супроводжується оберненням ефекту амфипата та додатковим лізисом клітин у 4,0 М NaCl. Обробка клітин нейрамінідазою та протеолітичними ферментами не впливає на прояв антигемолітичної активності ТФП при гіпертонічному гемолізі еритроцитів при 37°C, а попередня дегідратація цих клітин призводить до її зниження. Модифікація мембранных глікопротеїнів внаслідок обробки клітин протеолітичними ферментами супроводжується підвищенням антигемолітичної активності ТФП при 0°C. Отримані результати обговорюються з точки зору процесів, що лежать в основі формування та стабілізації трансмембранных дефектів.

Manifestation of antihemolytic activity of trifluoperazine (TFP) during hypertonic hemolysis of erythrocytes depends on temperature and state of cells. Both the reduction of temperature down to 0°C and preliminary incubation of cells in presence of 0.7 M NaCl result in decrease of antihemolytic activity of trifluoperazine at the removal of cells into 4.0 M NaCl. Combined action of low temperature and preliminary dehydration are accompanied by inversion of the effect of the amphiphile and supplementary lysis of cells in 4.0 M NaCl. Cell treatment by neuraminidase and proteolytic enzymes does not affect the manifestation of antihemolytic activity of trifluoperazine during hypertonic hemolysis of erythrocytes at 37°C, the preliminary dehydration of such kind of cells results in its decrease. Modification of membrane glycoproteins as a result of treatment by proteolytic enzymes is accompanied by increase in antihemolytic activity of trifluoperazine at 0°C. The results obtained are discussed from the point of view of processes underlying the formation and stabilization of transmembrane defects.

Моделирование условий замораживания в экспериментах по осмотическому воздействию на клетки в зоне положительных температур позволило установить, что чувствительность эритроцитов к высоким концентрациям солей можно изменять [3]. Такие положительно заряженные амфипатические соединения, как хлорпромазин и ТФП, защищают клетки от повреждения в условиях гиперосмотического стресса [1, 4]. Катионные фенотиазины способны протектировать клетки от повреждений также при холодовом стрессе и гипотоническом шоке и снижать вирус-индуцированный гемолиз эритроцитов [4, 9, 16].

Антигемолитическую активность амфифильных соединений связывают с их способностью оказывать влияние на состояние липидного бислоя [9]. Механизм действия амфипатических

Modeling of freezing conditions in experiments on the osmotic effect on cells in positive temperature zone allowed to find out, that erythrocyte sensitivity to the high salt concentrations could be changed [3]. Such positively charged amphiphatic compounds as chlorpromazine and TFP protect cells against damage under hyperosmotic stress conditions [1, 4]. Cation phenothiazines are capable to protect cells against damages under cold stress and hypotonic shock and to decrease a virus-induced hemolysis of erythrocytes [4, 9, 16].

One connects antihemolytic activity of amphiphilic compounds with their capability to affect the state of lipid bilayer [9]. Action mechanism of amphiphatic compounds has still remained unclear, in particular, the contribution of membrane proteins to the realisation of their antihemolytic activity. The aim of

соединений до сих пор во многом остается не выясненным, в частности, вклад мембранных белков в реализацию их антигемолитической активности. Цель работы - исследование влияния катионного амфипатического соединения ТФП на развитие гипертонического гемолиза (4,0 М NaCl) эритроцитов, белковый компонент которых модифицирован протеолитическими ферментами и нейраминидазой.

Эритроциты получали из донорской крови II группы. После удаления плазмы эритроциты дважды отмывали физиологическим раствором (0,15 М NaCl, 0,01 М фосфатный буфер, pH 7,4) и хранили в виде плотного осадка не более 2 ч при 0°C. Все используемые в работе среды готовили на 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,4.

Гипертонический шок осуществляли следующим образом. По 50 мкл осадка эритроцитов переносили в 0,5 мл раствора NaCl (0,15 или 0,7 М) при заданной температуре (0 или 37°C) и инкубировали 2 мин (этап предварительной инкубации). Затем из каждой пробы по 50 мкл переносили в 1 мл 4,0 М NaCl при той же температуре на 5 мин (этап собственно гипертонического шока). Целые клетки осаждали центрифугированием и спектрофотометрически при длине волны 543 нм определяли количество гемоглобина в супернатанте. Выход гемоглобина из клеток рассчитывали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу в присутствии тритона X-100 (0,1%).

При добавлении клеток ТФП находился в гипертонической среде (4,0 М NaCl). Концентрация стокового раствора ТФП составляла $3 \cdot 10^{-3}$ М.

Значение максимальной антигемолитической активности амфифильного соединения рассчитывали по формуле [4]

$$AG = \frac{\Gamma - \Gamma_{амф}}{\Gamma} \times 100\%$$

где Γ - величина гемолиза эритроцитов в данных экспериментальных условиях при отсутствии амфифильного вещества; $\Gamma_{амф}$ - минимальная величина гемолиза эритроцитов при наличии амфифильного вещества.

Модификацию клеток (гематокрит 20 %) папаином, трипсином и проназой проводили по методам [12,13]. Эритроциты инкубировали с папаином (1 мг/мл) в физиологическом растворе при 37°C в течение 60 мин. Клетки отмывали однократно средой, содержащей 0,15 М NaCl, 0,1%-й сывороточный альбумин человека, 30 мг/мл фенолметилсульфонил фторида, 0,01 М фосфатный буфер, pH 7,4, затем дважды холодным физиологическим раствором.

При обработке эритроцитов трипсином (0,1 мг/мл) и проназой (0,1 мг/мл) клетки инкубировали в среде, содержащей 75 мМ KCl, 50 мМ Na₂SO₄, 40 мМ сахарозы, 10 мМ HEPES, pH 7,4, в течение

work was to investigate the effect of cation amphiphilic compound TFP on the development of hypertonic hemolysis (4.0 M NaCl) of erythrocytes, which protein component is modified by proteolytic enzymes and neuraminidase.

Erythrocytes were obtained from a donor blood of the IInd group. After plasma removal the erythrocyte mass was twice washed-out with physiological solution (0.15 M NaCl, 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4) and stored as a dense sediment not longer than 2 hours at 0°C. All the media used in the work were prepared at 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4.

Hypertonic stress was realised in the following way. Erythrocyte sediment was transferred by 50 μ l in 0.5 ml of NaCl solution (0.15 or 0.7 M) at a fixed temperature (0 or 37°C) and incubated for 2 min (preliminary incubation stage). Afterwards 50 μ l of each sample we transferred into 1 ml of 4.0 M NaCl at the same temperature for 5 min (stage of proper hypertonic stress). Integral cells were precipitated by centrifuging and haemoglobin amount in a supernatant was spectrophotometrically determined at a wavelength of 543 nm. Haemoglobin release from cells was calculated in percents in respect to 100% hemolysis at the presence of triton X-100 (0.1%).

When adding cells the TFP was in hypertonic medium (4.0 N NaCl). Concentration of TFP stock solution made $3 \cdot 10^{-3}$ M. The value of maximum antihemolytic activity of amphiphilic compounds was calculated by the formula [4]

$$AH = \frac{H - H_{amp}}{H} \times 100\%$$

where H is the value of erythrocyte hemolysis under these experimental conditions at the absence of amphiphilic substance; H_{amp} is the minimum erythrocyte hemolysis value at the amphiphilic substance presence.

Cell modification (20% hematocrit) by papain, trypsin and pronase was performed according to the methods [12, 13]. Erythrocytes were incubated with papain (1mg/ml) in physiological solution at 37°C during 60 min. Cells were washed out by single medium, containing 0.15 M NaCl, 0.1% human serum albumin, 30 mg/ml of phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.01 M of phosphate buffer, pH 7.4, and then twice by cold physiological solution.

When treating erythrocytes by trypsin (0.1 mg/ml) and pronase (0.1 mg/ml) the cells were incubated in the medium with 75 mM of KCl, 50 mM of Na₂SO₄, 40 mM of sucrose, 10 mM of HEPES, pH 7.4 during 60 min at 37°C. After trypsin treating the cells were washed with physiological solution, containing 0.1 mg/ml of soya inhibitor trypsin, and after pronase treatment with physiological solution with 1 mM of phenylmethylsulfonyl fluoride. Then the samples were washed out twice with a cold physiological solution.

60 мин при 37°C. После обработки трипсином клетки отмывали физиологическим раствором, содержащим 0,1 мг/мл соевого ингибитора трипсина, а после обработки проназой – физиологическим раствором, содержащим 1 мМ фенилметилсульфонил фторида. Затем пробы отмывали дважды холодным физиологическим раствором.

Эритроциты (40 %-й гематокрит) обрабатывали нейраминидазой по методу [17]. Клетки инкубировали с ферментом в среде, содержащей 0,15 М NaCl, 1 мг/мл глюкозы, при 37°C в течение 60 мин при постоянном перемешивании. После инкубирования эритроциты трижды отмывали холодным физиологическим раствором. Модифицированные клетки хранили при 0 °С не более 30 мин.

В работе были использованы: проназа, трипсин фирмы Calbiochem, папаин фирмы Merck, фенилметилсульфонил фторид фирмы Serva, реактивы отечественного производства квалификации “х.ч.” и “ч.д.а.”

Эритроциты человека обладают высокой чувствительностью к изменениям осмотических условий среды. Предварительная частичная дегидратация клеток существенно снижает уровень их повреждения в высококонцентрированных солевых средах [3]. Как видно из рис.1, зависимость гипертонического гемолиза эритроцитов от концентрации NaCl в среде предварительной инкубации имеет перевернутую колоколообразную форму с минимумом в области концентрации NaCl 0,45 М. Изменение содержания NaCl в среде предварительной инкубации как в сторону снижения, так и повышения приводит к росту чувствительности клеток к гипертоническому воздействию. Гемолиз достигает

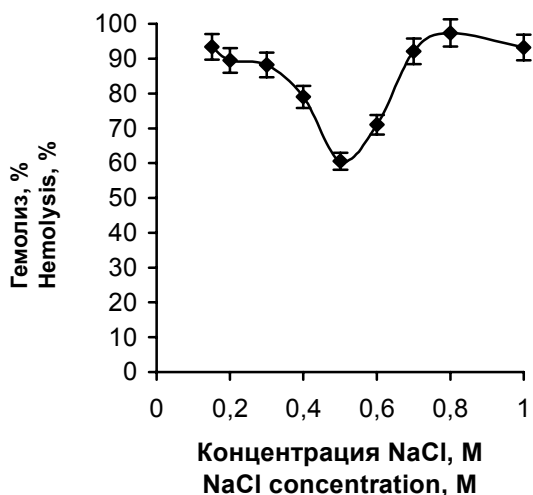


Рис.1. Уровень гемолиза эритроцитов при перенесении в 4,0 М NaCl после предварительной дегидратации в солевых средах (температура 37°C)

Fig.1. Level of erythrocyte hemolysis when transferring into 4.0 М NaCl after preliminary dehydration in saline media (temperature of 37°C)

Erythrocytes (40% hematocrit) were neuraminidase-treated according to the method [17]. Cells were incubated with the enzyme in the medium with 0.15 М of NaCl, 1 mg/ml of glucose, at 37°C for 60 min during constant mixing. After incubation the erythrocytes were three times washed out with a cold physiological solution. Modified cells were stored at 0°C not longer than 30 min.

In the work we have used: pronase, trypsin (Calbiochem), papain (Merck), phenylmethylsulfonyl fluoride (Serva), reagents of home production of a “chemically pure” and “pure for analysis” grade.

Human erythrocytes possess a high sensitivity to the changes in osmotic conditions of medium. Preliminary partial cell dehydration considerably decreases the level of their damage in highly-concentrated saline media [3]. The Figure 1 shows that the dependence of hypertonic hemolysis of erythrocytes on NaCl concentration in the medium of preliminary incubation has a turned-up bell-shaped form with the minimum in the area of 0.45 М NaCl concentration. Both NaCl decrease in the medium of preliminary incubation and an increase result in a growth of hypertonic effect-sensitive cells. Hemolysis reaches the maximum values when transferring into the medium, containing 4.0 М NaCl, cells, preliminarily incubated in 0.15 and 0.70 М NaCl. Therefore in the experiments we used the preincubated in 0.70 М NaCl erythrocytes, which initial state could be determined as a metastable one.

TFP, cation amphiphatic compound, protects cells against the damage when transferring into 4.0 М NaCl [2]. As a result of study of concentration dependencies of TFP protective effect on erythrocytes during their transfer into 4.0 М NaCl at different temperatures we determined the optimal concentrations. They made $3 \cdot 10^{-5}$ and 10^{-5} М at 37 and 0°C correspondingly. The Fig. 2 shows the data of TFP antihemolytic activity under hypertonic stress effect (4.0 М NaCl) on the control cells and those, preliminarily dehydrated at the presence of 0.70 М NaCl. In spite of the fact, that cells, being transferred into 4.0 М NaCl from 0.15 and 0.70 М NaCl at 37°C (Fig. 1.) lyse in an equal extent degree (~90%), TFP antihemolytic activity makes 90 and 50% respectively. Probably, the redistribution of membrane components under 0.70 М NaCl effect occurs, as a result of which there is the change in the character of substance redistribution in a membrane, that is accompanied by a decrease in TFP antihemolytic activity (Fig. 2.).

Temperature reduction down to 0°C results in a sharp decrease of TFP antihemolytic activity in respect of the similar values at 37°C (Fig. 2.). Antihemolytic effect of phenothiazine under hypertonic stress effect on erythrocytes, preincubated at the presence of 0.15 М NaCl reduces more than in 4 times. Amphiphile substance activate the hemolysis of preliminarily dehydrated erythrocytes when transferring them to 4.0 М NaCl. The observed sensibilising effect of amphiphate

максимальных значений при перенесении в раствор, содержащий 4,0 М NaCl, клеток, предварительно инкубированных в 0,15 и 0,70 М NaCl. Поэтому в экспериментах использовали предынкубированные в 0,70 М NaCl эритроциты, исходное состояние которых можно определить как метастабильное.

ТФП – катионное амфипатическое соединение – протектирует клетки от повреждения при перенесении в 4,0 М NaCl [2]. В результате исследования концентрационных зависимостей защитного действия ТФП на эритроциты при их перенесении в 4,0 М NaCl при разных температурах нами определены оптимальные концентрации. Они составляют $3 \cdot 10^{-5}$ и 10^{-5} М при 37 и 0°C соответственно. На рис.2 представлены данные антигемолитической активности ТФП при действии гипертонического стресса (4,0 М NaCl) на контрольные клетки и клетки, предварительно дегидратированные в присутствии 0,70 М NaCl. Несмотря на то, что клетки, перенесенные в 4,0 М NaCl из 0,15 и 0,70 М NaCl при 37 °С (рис.1), лизируют в одинаковой степени (~90 %), при этом антигемолитическая активность ТФП различна и составляет 90 и 50% соответственно. Возможно, под влиянием 0,70 М NaCl происходит перераспределение мембранных компонентов, в результате чего изменяется характер распределения вещества в мембране, что и сопровождается снижением антигемолитической активности ТФП (рис.2).

Снижение температуры до 0°C приводит к падению антигемолитической активности ТФП по отношению к аналогичным величинам при 37°C (рис.2). Антигемолитический эффект фенотиазина при действии гипертонического стресса на эритроциты, предынкубированные в присутствии 0,15 М NaCl, снижается более чем в 4 раза. Амфифильное соединение активирует гемолиз предварительно дегидратированных эритроцитов при их перенесении в 4,0 М NaCl. Наблюдаемое сенсibiliзирующее действие амфипата на клетки, вероятно, обусловлено как метастабильностью эритроцитов, возникающей в процессе инкубации в присутствии 0,7 М NaCl, так и модификацией эритроцитарной мембраны под действием низкой температуры.

Защитный эффект катионных амфипатов реализуется непосредственно в момент стрессового воздействия на клетки, т.е. при перенесении эритроцитов в 4,0 М NaCl [2,4]. Вероятно, степень протекции эритроцитов амфипатическими соединениями определяется скоростью встраивания их молекул в мембрану. Скорость может зависеть и от поверхностного заряда клетки. Чтобы выяснить, влияет ли поверхностный заряд клеточной мембраны на проявление антигемолитической активности положительно заряженного ТФП, гликокаликс удаляли с помощью нейраминидазы. Полученные данные (рис.3) показывают, что

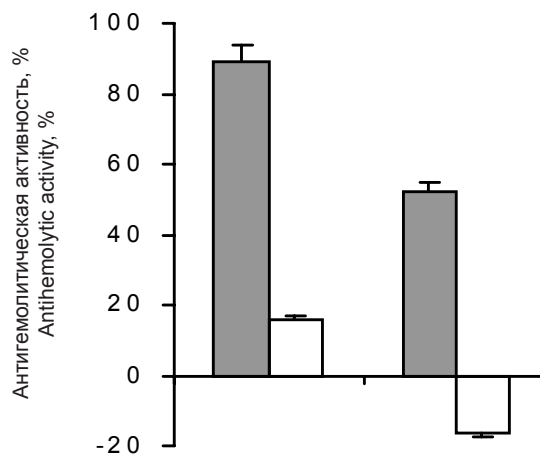


Рис.2. Антигемолитическая активность ТФП при перенесении клеток в 4,0 М NaCl после предварительной инкубации в 0,15 (1) и 0,7 М NaCl (2)

■ - 37°C, □ - 0°C

Fig.2. TFP antihemolytic activity when transferring cells into 4.0 M NaCl after preliminary incubation in 0.15 (1) and 0.7 M NaCl (2)

■ - 37°C, □ - 0°C

on cells is probably stipulated both by the erythrocyte metastability, occurred during the incubation at the presence of 0.70 М NaCl and by modifying the erythrocyte membrane under low temperature effect.

Protective effect of cation amphiphates is realised directly at the moment of stress effect on cells, i.e. when transferring erythrocytes in 4.0 М NaCl [2, 4]. The protection degree of erythrocytes by amphiphatic compounds is probably determined by the building rate of their molecules into a membrane. The rate can depend on the cell surface charge as well. In order to find out whether a surface charge of cell membrane affects the manifestation of antihemolytic activity of a positively charged TFP, glycolyx was removed by means of neuraminidase. The data obtained (Fig. 3) demonstrate, that the cell treatment with neuraminidase does not change both the level of erythrocyte hypertonic hemolysis and the degree of TFP antihemolytic activity for the control cells (0.15 М NaCl). Lysis of glycolyx deprived dehydrated cells remains at the level of erythrocyte hemolysis, having a surface charge, however TFP antihemolytic activity decreases by 40%. Thus, for manifestation of TFP antihemolytic activity when transferring the erythrocytes, characterising by a metastable state, into 4.0 М NaCl, a surface charge is of considerable value.

Cation amphiphates are characterised by a two-phase effect on cells. In small concentrations they possess an antihemolytic activity, in particular at the erythrocyte hypertonic hemolysis [14], but when using under high concentrations they cause a sensibilizing effect on cells in isotonic medium and induce their lysis [6, 14]. One considers, that during the phenothiazines-induced hemolysis, there is the

обработка клеток нейраминидазой не изменяет ни уровень гипертонического гемолиза эритроцитов, ни степень антигемолитической активности ТФП для контрольных клеток (0,15 М NaCl). Лизис дегидратированных клеток, лишенных гликокаликса, остается на уровне гемолиза эритроцитов, обладающих поверхностным зарядом, однако антигемолитическая активность ТФП снижается на 40 %. Таким образом, для проявления антигемолитической активности ТФП при перенесении в 4,0 М NaCl эритроцитов, характеризующихся метастабильным состоянием, существенное значение имеет поверхностный заряд клетки.

Катионные амфипаты характеризуются двухфазным влиянием на клетки. В небольших концентрациях они обладают антигемолитической активностью, в частности при гипотоническом гемолизе эритроцитов [14], а при использовании в высоких концентрациях оказывают сенсibiliзирующее действие на клетки в изотонической среде и индуцируют их лизис [6, 14]. Полагают, что в процесс гемолиза, индуцированного фенолазидами, вовлечены липидные места связывания, в то время как тип мест связывания, представленный белками, участвует в формировании антигемолитической активности вещества [11]. Исходя из этого, мы модифицировали белковые компоненты мембраны протеолитическими ферментами.

На рис.4 представлены данные о влиянии ТФП и протеолитических ферментов (проназы, трипсина и папаина) на клетки, перенесенные в 4,0 М NaCl при 37°C. В результате обработки эритроцитов протеолитическими ферментами их устойчивость к действию высококонцентрированных солевых растворов незначительно повышается, а предварительная дегидратация клеток нивелирует указанный эффект ферментативной обработки эритроцитов. Степень антигемолитической активности ТФП при перенесении в 4,0 М NaCl контрольных эритроцитов (0,15 М NaCl) не зависит от состояния белковой компоненты мембраны. Однако, если клетки после протеолитической обработки находились в 0,70 М NaCl, а затем подвергались действию 4,0 М NaCl, отмечалось падение антигемолитической активности ТФП на 25-45 %. В этом случае состояние мембранных белков важно для проявления защитного эффекта амфипатического соединения при действии на клетки осмотического стресса.

При 0 °С в результате ферментативной обработки наблюдаются возрастание устойчивости клеток к повреждающему действию 4,0 М NaCl и снижение эффективности ТФП (рис.5).

При анализе полученных результатов следует отметить, что ключевую роль в механизме лизиса клеток играют процессы, связанные с формированием и эволюцией трансмембранных дефектов до размера гемолитической поры [22]. Можно предположить, что в мембране клеток,

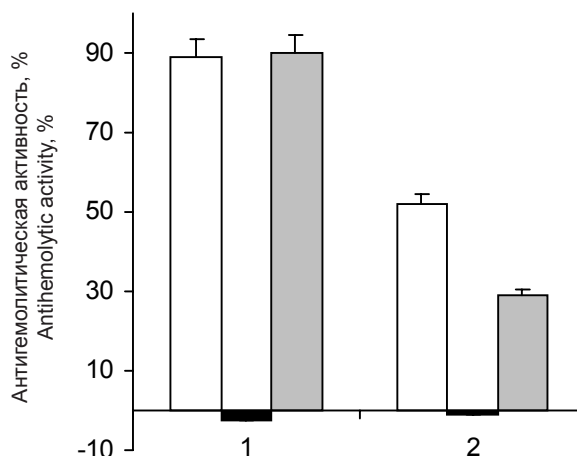


Рис.3. Влияние обработки клеток нейраминидазой на проявление антигемолитической активности ТФП (3×10^{-5} М) при перенесении эритроцитов в 4,0 М NaCl после предварительной инкубации в 0,15 (1) и 0,7 М (2) NaCl (температура 37°C)

□ – ТФП, ■ – нейраминидаза,
 ■ – нейраминидаза + ТФП

Fig.3. Effect of cell treatment with neuraminidase on the appearance of TFP antihemolytic activity (3×10^{-5} M) when transferring erythrocytes into 4.0 M NaCl after preliminary incubation in 0.15 (1) and 0.7 M NaCl (2) (temperature of 37°C)

□ – TFP, ■ – neuraminidase,
 ■ – neuraminidase + TFP

involvement of lipid sites of binding, whereas the type of binding sites, presented by proteins, participates in the formation of the substance antihemolytic activity [11]. Hence, we modified the membrane protein components by proteolytic enzymes.

The Fig. 4 shows the data about the effect of TFP and proteolytic enzymes (pronase, trypsin, papain) on cells, transferred in 4.0 M NaCl at 37°C. As a result of erythrocyte treatment with proteolytic enzymes their resistance to the effect of highly concentrated saline solutions slightly increases, and a preliminary cell dehydration eliminates the mentioned effect of an enzyme treatment of erythrocytes. The degree of TFP antihemolytic activity when transferring the control erythrocytes (0.15 M NaCl) into 4.0 M NaCl does not depend on the state of the membrane protein component. However, if cells after proteolytic treatment were in 0.7 M NaCl and then subjected to the effect of 4.0 M NaCl, a sharp decrease in TFP antihemolytic activity by 25-45% was noted. In this case the state of membrane proteins is significant for the manifestation of protective effect of amphiphatic compound under osmotic stress effect on cells.

At 0°C as a result of enzyme treatment there was observed an increase in cell resistance to a damaging effect of 4.0 M NaCl and a decrease in TFP efficiency (Fig. 5).

When analysing the obtained results, it should be noted, that the processes, related to the formation and

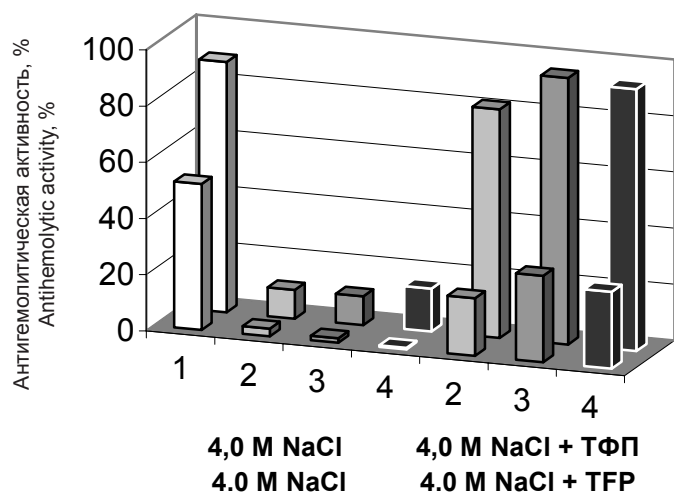


Рис.4. Влияние протеолитической обработки клеток на проявление антигемолитической активности ТФП (3×10^{-5} М) при их перенесении в 4,0 М NaCl после предварительной инкубации в 0,7 (ближний ряд) и 0,15 М NaCl (дальний ряд) (температура 37°C)

□ – контроль, ■ – проназа, ■ – трипсин, ■ – папаин

Fig.4. Effect of proteolytic treatment of cells on the appearance of TFP antihemolytic activity (3×10^{-5} M) when transferring them into 4.0 M NaCl at 37°C temperature after preliminary incubation in 0.7 (foreground) and 0.15 M NaCl (background)

□ – control, ■ – pronase, ■ – trypsin, ■ – papain

предынкубированных в средах с различным содержанием NaCl, происходят изменения, которые в дальнейшем при перенесении в 4,0 М NaCl детерминируют как начальную фазу процесса формирования поры, так и ее дальнейшую эволюцию (см. рис.1).

Температура в значительной степени определяет эволюцию трансмембранных дефектов, образовавшихся под действием высоких концентраций соли. Так, при низкой температуре эти дефекты достаточно устойчивы, в то время как высокая температура может приводить к их замыканию [18]. В модельных экспериментах показано, что катионные амфипатические соединения, которые защищают клетки от повреждения при резком изменении осмотических условий среды [1, 9], могут оказывать влияние на процессы замыкания мембранных дефектов [15]. Так, ТФП и температура 37°C действуют однонаправленно и уменьшают время жизни трансмембранной поры, в результате чего наблюдается выраженный защитный эффект вещества при перенесении клеток в высококонцентрированные солевые среды (см. рис.2). Учитывая, что образующаяся в мембране пора стабилизируется электростатически, взаимодействие катионного ТФП с отрицательно заряженными группами, выстилающими поверхность поры, может уменьшать размер пор и приводить к репарации мембраны. При 0°C уже сформировавшаяся мембранная пора характеризуется низкой способностью к замыканию.

evolution of transmembrane defects up to the size of hemolytic pore, play the dominant role in cell lysis mechanism [22]. We can suppose, that in cell membrane, preincubated in the media with different NaCl content, the changes, determining at the following transfer into 4.0 M NaCl both an initial phase of pore formation process and its further evolution (see Fig.1), occur.

Temperature in a considerable extent determines the evolution of transmembrane defects, formed under high salt concentration effect. So, under low temperature these defects are considerably resistant meanwhile a high temperature can result in their locking [18]. In the modelled experiments it was shown, that the cation amphiphate compounds, protecting cells against damage, at a sharp change in medium osmotic conditions [1, 9] could affect the processes of membrane defect locking [15]. So, TFP and 37°C temperature affect in unilateral way and reduce the life time of transmembrane pore, as a result the manifested protective effect of a substance, when transferring cells into the highly concentrated saline media, is observed (see Fig.2). Taking into account the fact, that a pore, forming in a membrane, is

stabilised in electrostatic way, the interaction of cation TFP with a negatively charged groups, which cover the pore surface, can reduce the pore size and result in the membrane reparation. At 0°C the already formed membrane pore is characterised by a low capability to locking. Probably, due to this cause at 0°C TFP can not stop the process of hypertonic damage of erythrocytes. Both low temperature and an increased tonicity of the medium are capable to induce the phase transitions of membrane phospholipids [8, 20], that can itself serve as a premise for the membrane defect presence. At the same time, the concentrating of amphiphatic molecules in liquid-crystalline sites of membrane, which part is determined by the temperature, can result in the appearance of pores, permeable not only for cations but for hemoglobin too [10].

A decrease in a surface charge of erythrocytes as a result of cell treatment with neuraminidase causes no effect on the manifestation of antihemolytic activity of TFP positive charge (see Fig. 3). In addition, it has been demonstrated [19], that the erythrocyte capability to transform under both cation and anion amphiphatic compounds does not depend on the glycocalix state. Basing on the mentioned above we can suppose that glycocalix is not involved in the mechanism, responsible for amphiphate building into a cell membrane and does not affect the manifestation of TFP antihemolytic activity under hypertonic stress of erythrocytes. However, under hypertonic stress of erythrocytes there was revealed the dependence of

Вероятно, по этой причине при 0°C ТФП не может остановить процесс гипертонического повреждения эритроцитов. Как низкая температура, так и повышенная тоничность среды способны индуцировать фазовые переходы мембранных фосфолипидов [8, 20], что само по себе может служить предпосылкой дефектности мембраны. В то же время концентрирование амфипатических молекул в жидкокристаллических участках мембраны, доля которых определяется температурой, может приводить к появлению пор, пронизываемых не только для катионов, но и для гемоглобина [10].

Уменьшение поверхностного заряда эритроцитов в результате обработки клеток нейраминидазой не оказывает влияния на проявление антигемолитической активности положительно заряженного ТФП (см. рис.3). Кроме того, показано [19], что способность эритроцитов трансформироваться под действием как катионных, так и анионных амфипатических соединений не зависит от состояния гликокаликса. Исходя из вышеизложенного, можно полагать, что гликокаликс не вовлекается в механизм, ответственный за встраивание амфипата в клеточную мембрану и не влияет на

проявление антигемолитической активности ТФП в условиях гипертонического стресса эритроцитов. Однако при гипотоническом шоке эритроцитов выявлена зависимость антигемолитической активности хлорпромазина (вещества, являющегося катионным производным фенотиазина, как и ТФП) от состояния гликокаликса мембраны, что проявляется в снижении защитного эффекта вещества при ферментативной обработке клеток [5].

В результате обработки клеток протеолитическими ферментами существенно возрастает устойчивость эритроцитов к действию 4,0 М NaCl при 0°C и фактически не изменяется при 37°C (рис.4 и 5). Таким образом, если текучесть липидного бислоя достаточно высока (37°C), модификация мембранных гликопротеинов не оказывает влияния на процессы, связанные со стабилизацией трансмембранных пор в условиях гипертонического шока.

В целом после обработки клеток разными протеолитическими ферментами (трипсин, проназа, папаин) реакции эритроцитов на перенесение в гипертоническую среду, а также на действие ТФП весьма схожи (рис. 4, 5), хотя применяемые ферменты различаются по характеру своего действия на эритроцитарные белки [7, 17]. Поэтому можно говорить, что особенности гипертонической чувствительности эритроцитов с модифицированными белковыми компонентами обусловлены неспецифическим действием протеолитических ферментов на клетки.

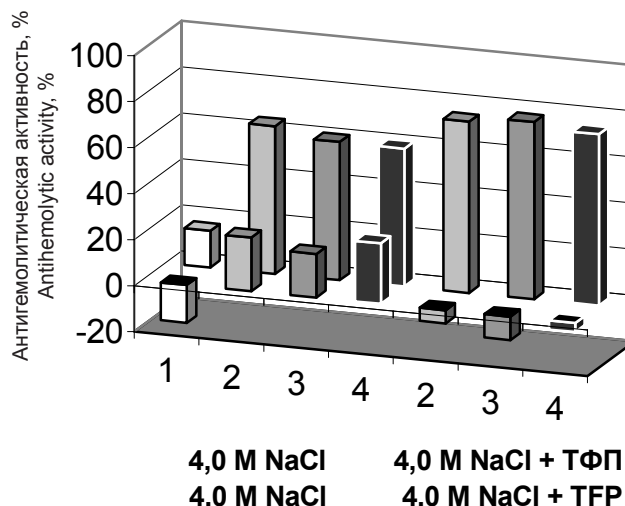


Рис.5. Влияние протеолитической обработки клеток на проявление антигемолитической активности ТФП (3×10^{-5} М) при их перенесении в 4,0 М NaCl после предварительной инкубации в 0,7 (ближний ряд) и 0,15 М NaCl (дальний ряд) (температура 0°C)

□ – контроль, □ – проназа, □ – трипсин, □ – папаин

Fig.5. Effect of proteolytic treatment of cells on the appearance of TFP antihemolytic activity (3×10^{-5} M) when transferring them into 4.0 M NaCl at 0°C temperature after preliminary incubation in 0.7 (foreground) and 0.15 M NaCl (background)

□ – control, □ – pronase, □ – trypsin, □ – papain

antihemolytic activity of chlorpromazine (the substance, being a cation derivative of phenothiazine, as TFP) on the state of membrane glycocalix, that is manifested in a reduction of the substance protective effect as a result of cell enzyme treatment [5].

As a result of cell treatment with proteolytic enzymes there is a considerable increase in erythrocyte resistance to the effect of 4.0 M NaCl at 0°C and no factual changes at 37°C (Fig. 4 and 5). Thus, if the lipid bilayer fluidity is quite high (37°C), the modification of membrane glycoproteins does not affect the processes, related to the transmembrane pore stabilisation under hypertonic stress conditions.

On the whole, after cell treating with different proteolytic enzymes (trypsin, pronase, papain) the erythrocytes responses on the transfer into hypertonic medium as well as on TFP effect are quite similar (Fig. 4, 5), though the applied enzymes differ by the character of their effect on erythrocyte proteins [7, 17]. Therefore we can suppose that the peculiarities of erythrocyte hypertonic sensitivity with modified protein components are stipulated by a non-specific effect of proteolytic enzymes on cells.

It has been demonstrated [25], that erythrocyte hemolysis, developing under high pressure effect, increases after cell treatment with trypsin and neuraminidase, meanwhile under hypertonic stress [5] and hypertonic effect (Fig.3, 4) an enzymatic cell treatment is not accompanied with an increase

Было показано [25], что гемолиз эритроцитов, который развивается под действием высокого давления, увеличивается после обработки клеток трипсином и нейраминидазой, в то время как при гипотоническом шоке [5] и гипертоническом воздействии (рис.3,4) ферментативная обработка клеток не сопровождается повышением уровня лизиса эритроцитов. Таким образом, процесс формирования трансмембранных дефектов при резком изменении осмолярности среды в меньшей степени зависит от состояния мембранных белков эритроцитов, чем при гипербарическом стрессе.

Антигемолитическая активность ТФП, вероятно, связана со способностью катионных амфипатических соединений оказывать влияние на мембранные поры, в результате чего будет сокращаться их время жизни. Действие вещества на пору может реализоваться как в результате непосредственного влияния на нее, так и опосредованно через изменение состояния липидов и белков, погруженных в липидный матрикс [21]. Исходя из того, что в результате протеолиза мембранных гликопротеинов антигемолитическая активность ТФП при гипертоническом шоке эритроцитов при 37°C не изменяется либо несколько снижается в случае предварительно дегидратированных клеток, мы полагаем, что механизмы, лежащие в основе защитного действия ТФП, связаны, в первую очередь, с его влиянием на липидный бислой. Показано, что катионные амфипатические соединения вызывают изменение организации мембранных фосфолипидов [23], а также их освобождение из мембран эритроцитов человека [6]. Распределение амфипатов в мембране может сопровождаться образованием небислойных структур [24], что, вероятно, и позволяет клетке противостоять осмотическому стрессу.

Литература

1. Дунаевская О.Н., Панталер Е.Р., Шпакова Н.М., Бондаренко В.А. Некоторые возможности повышения устойчивости эритроцитов к холодовому и гиперосмотическому воздействию при использовании катионных амфипатов // Пробл. криобиологии.– 1995.– №1.– С. 21-27.
2. Дунаевская О.Н., Шпакова Н.М. Защитный эффект трифторперазина при гиперосмотическом шоке эритроцитов // Укр. биохим. журн.– 1997.– 69, №4.– С. 30-34.
3. Поздняков В.В. Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному шоку: Автореф. дис... канд. биол. наук.– Харьков, 1989.– 16 с.
4. Шпакова Н.М., Панталер Е.Р., Бондаренко В.А. Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодовом шоке эритроцитов // Биохимия.– 1995.– 60, №10.– С. 1624-1631.
5. Born G.V.R., Housley G.M. Effects of modification of the membranes of intact erythrocytes on the antihemolytic action of chlorpromazine // Br. J. Pharmac.– 1983.– 79, №2.– P. 481-487.
6. Brito M.A., Malheiros S.V., Meirelles N.C., Brites D. Effect of bilirubin on toxicity induced by trifluoperazine, dibucaine and praziquantel to erythrocytes // Life Sci.– 2001.– 69, N 8.– P. 863-877.

in the level of erythrocyte lysis. Thus, the process of transmembrane defect formation at a sharp change in the medium osmolarity depends in a lesser extent on the state of erythrocyte membrane proteins, than under hyperbaric stress.

TFP antihemolytic activity is probably related to the capability of cation amphiphatic compounds to affect membrane pores, as a result there will be the reduction of their life time. The substance effect on a pore can be realised both as a result of a direct effect on it, or intermediately via a change in the state of lipids and proteins, immersed into a lipid matrix [21]. Based on the fact that as a result of proteolysis of membrane glycoproteins the TFP antihemolytic activity under hypertonic stress of erythrocytes at 37°C does not change or slightly decreases in the case of preliminarily dehydrated cells, we think, that the mechanisms, being the base of the TFP protective effect, are related to its effect on lipid bilayer. It has been demonstrated, that the cation amphiphatic compounds cause the change in the membrane phospholipids organisation [23], as well as their release from human erythrocyte membranes [6]. Redistribution of amphiphates in a membrane can be accompanied by the non-bilayer structures formation [24], that apparently allows a cell to resist an osmotic stress.

References

1. Dunaevskaya O.N., Pantaler E.R., Shpakova N.M., Bondarenko V.A. Some possibilities of increasing the erythrocyte resistance to cold and hyperosmotic effects when using cation amphipates // Problems of Cryobiology.– 1995.– N1.– P. 21-27
2. Dunaevskaya O.N., Shpakova N.M. Protective effect of trifluoperazine at hyperosmotic stress of erythrocytes // Ukrainskij biokhimicheskij zhurnal.– 1997.– 69, N4.– P. 30-34.
3. Pozdnyakov V.V. Effect of medium composition and osmolarity on erythrocyte resistance to osmotic and temperature stress. The abstract for PhD (biology), Kharkov, 1989.- 16 p.
4. Shpakova N.M., Pantaler E.R., Bondarenko V.A. Antihemolytic effect of chlorpromazine at hyperosmotic and cold stress of erythrocytes // Biochemistry.– 1995.– 60, N10.– P. 1624-1631.
5. Born G.V.R., Housley G.M. Effects of modification of the membranes of intact erythrocytes on the antihemolytic action of chlorpromazine // Br. J. Pharmac.– 1983.– 79, N2.– P.481-487.
6. Brito M.A., Malheiros S.V., Meirelles N.C., Brites D. Effect of bilirubin on toxicity induced by trifluoperazine, dibucaine and praziquantel to erythrocytes // Life Sci.– 2001.– 69, N8.– P.863-877.
7. Cousin J.-L., Motais R. Inhibition of anion transport in the red blood cell by anionic amphiphilic compounds. I. Determination of the flufenamate-binding site by proteolytic dissection of the band 3 protein // Biochim. Biophys. Acta.– 1982.– 687, N2.– P. 147-155.
8. D'Avila N.M. A spin label study of erythrocytes membranes during simulation of freezing // J. Membrane Biol.– 1981.– 60, N2.– P. 155-163.
9. Hagerstrand H., Isomaa B. Amphiphile-induced antihemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // Chem.- Biol. Interactions.– 1991.– 79.– P. 335-347.
10. Hanpft R., Mohr K. Influence of cationic amphiphilic drugs on the phase - transition temperature of phospholipids with different polar headgroups // Biochim. Biophys. Acta.– 1985.– 814, N1.– P. 156-163.

7. *Cousin J.-L., Motais R.* Inhibition of anion transport in the red blood cell by anionic amphiphilic compounds. I. Determination of the flufenamate-binding site by proteolytic dissection of the band 3 protein // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1982.— 687, N2.— P. 147-155.
8. *D'Avila N.M.* A spin label study of erythrocytes membranes during simulation of freezing // *J. Membrane Biol.*— 1981.— 60, N2.— P. 155-163.
9. *Hagerstrand H., Isomaa B.* Amphiphile-induced antihemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // *Chem.- Biol. Interactions.*—1991.— 79.— P. 335-347.
10. *Hanpft R., Mohr K.* Influence of cationic amphiphilic drugs on the phase-transition temperature of phospholipids with different polar headgroups // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1985.— 814, N1.— P. 156-163.
11. *Horie T., Sugiyama Y., Awazu S., Hanano M.* The correlation between drug binding to the human erythrocyte and its hemolytic activity // *J. Pharm. Dyn.*— 1981.— 4, N2.— P. 116-122.
12. *Hsu L., Morrison M.* The interaction of human erythrocyte Band 3 with cytoskeletal components // *Arch. Biochem. Biophys.*— 1983.— 227, N1.— P. 31-38.
13. *Jennings M.L., Adams M.F.* Modification by papain of the structure and function of band 3, the erythrocyte anion transport protein // *Biochemistry.*— 1981.— 20, N25.— P. 7118-7123.
14. *Izomaa B., Hagerstrand H., Paatero G., Engblom A. C.* Permeability alterations and antihemolysis induced by amphiphiles in human erythrocytes // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1986.— 860, N3.— P. 510-524.
15. *Lieber M.R., Steck T.L.J.* Dynamics of the holes in human erythrocyte membrane ghosts // *Biol. Chem.*— 1982.— 257, N19.— P. 11660-11666.
16. *MacDonald R.I.* Trifluoperazine inhibits Sendai virus-induced hemolysis // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1986.— 856, N2.— P.337-348.
17. *Maeda N., Sieke M., Nakajima T. et al.* Contribution of glycoproteins to fibrinogen-induced aggregation of erythrocytes // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1990.— 1022, N1.— P. 72-78.
18. *Mishra K.P., Singh B.B.* Temperature effects on resealing of electrically hemolysed rabbit erythrocytes // *Indian J. Exp. Biol.*— 1987.— 24, N12.— P. 737-742.
19. *Nwafor A., Coakley W.T.* Drug-induced shape change in erythrocytes correlates with membrane potential change and is independent of glycocalyx charge // *Biochem. Pharm.*— 1985.— 34, N18.— P. 3329-3336.
20. *Oku N., Nojima S., Inoue K.* Selective release of non-electrolytes from liposomes upon perturbation of bilayers by temperature change or polyene antibiotics // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1980.— 595, N2.— P. 277-291.
21. *Ruggiero A.C., Meirelles N.C.* Effects of trifluoperazine on the conformation and dynamics of membrane proteins in human erythrocytes // *Mol. Genet. Metab.*— 1998.— 64, N2.— P. 148-151.
22. *Sato Y., Yamakose H., Suzuki Y.* Participation of band 3 protein in hypotonic hemolysis of human erythrocytes // *Biol. Pharm. Bull.*— 1993.— 16, N2.— P. 506-512.
23. *Schrier S.L., Zachowski A., Devaux P.F.* Mechanisms of amphiphilic-induced stomatocytosis in human erythrocytes // *Blood.*— 1992.— 79, N3.— P. 782-786.
24. *Schrier S., Malheiros S.V.P., Paula E.* Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2000.— 1508, N1-2.— P. 210-234.
25. *Yamaguchi T., Matsumoto M., Kimoto E.* Effects of drugs, salts and phospholipid vesicles on hemoglobin release from hydrostatic pressure-treated human erythrocytes // *J. Biochem.*— 1993.— 114, N4.— P. 576-581.
11. *Horie T., Sugiyama Y., Awazu S., Hanano M.* The correlation between drug binding to the human erythrocyte and its hemolytic activity // *J. Pharm. Dyn.*— 1981.— 4, N2.— P.116-122.
12. *Hsu L., Morrison M.* The interaction of human erythrocyte Band 3 with cytoskeletal components // *Arch. Biochem. Biophys.*— 1983.— 227, N1.— P. 31-38.
13. *Jennings M.L., Adams M.F.* Modification by papain of the structure and function of band 3, the erythrocyte anion transport protein // *Biochemistry.*— 1981.— 20, N25.— P. 7118-7123.
14. *Izomaa B., Hagerstrand H., Paatero G., Engblom A. C.* Permeability alterations and antihemolysis induced by amphiphiles in human erythrocytes // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1986.— 860, N3.— P. 510-524.
15. *Lieber M.R., Steck T.L.J.* Dynamics of the holes in human erythrocyte membrane ghosts // *Biol. Chem.*— 1982.— 257, N19.— P. 11660-11666.
16. *MacDonald R.I.* Trifluoperazine inhibits Sendai virus-induced hemolysis // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1986.— 856, N2.— P.337-348.
17. *Maeda N., Sieke M., Nakajima T. et al.* Contribution of glycoproteins to fibrinogen-induced aggregation of erythrocytes // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1990.— 1022, N1.— P. 72-78.
18. *Mishra K.P., Singh B.B.* Temperature effects on resealing of electrically hemolysed rabbit erythrocytes // *Indian J. Exp. Biol.*— 1987.— 24, N12.— P. 737-742.
19. *Nwafor A., Coakley W.T.* Drug-induced shape change in erythrocytes correlates with membrane potential change and is independent of glycocalyx charge // *Biochem. Pharm.*— 1985.— 34, N18.— P. 3329-3336.
20. *Oku N., Nojima S., Inoue K.* Selective release of non-electrolytes from liposomes upon perturbation of bilayers by temperature change or polyene antibiotics // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1980.— 595, N2.— P. 277-291.
21. *Ruggiero A.C., Meirelles N.C.* Effects of trifluoperazine on the conformation and dynamics of membrane proteins in human erythrocytes // *Mol. Genet. Metab.*— 1998.— 64, N2.— P. 148-151.
22. *Sato Y., Yamakose H., Suzuki Y.* Participation of band 3 protein in hypotonic hemolysis of human erythrocytes // *Biol. Pharm. Bull.*— 1993.— 16, N2.— P. 506-512.
23. *Schrier S.L., Zachowski A., Devaux P.F.* Mechanisms of amphiphilic-induced stomatocytosis in human erythrocytes // *Blood.*— 1992.— 79, N3.— P. 782-786.
24. *Schrier S., Malheiros S.V.P., Paula E.* Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2000.— 1508, N1-2.— P. 210-234.
25. *Yamaguchi T., Matsumoto M., Kimoto E.* Effects of drugs, salts and phospholipid vesicles on hemoglobin release from hydrostatic pressure-treated human erythrocytes // *J. Biochem.*— 1993.— 114, N4.— P. 576-581.

Accepted in 16.04.2002

Поступила 16.04.2002