



Ефективність амфіфільних сполук в умовах постгіпертонічного шоку еритроцитів кролика залежно від температурних умов

О. Є. Ніпот, Н. А. Єршова, Н. М. Шпакова, С. С. Єршов, О. О. Шапкіна

nipotel71@gmail.com

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,
вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61016, Україна

У роботі досліджено вплив температурних умов на рівень пошкодження еритроцитів кролика в умовах постгіпертонічного шоку та рівень їх захисту за допомогою амфіфільних сполук. Максимальне пошкодження клітин спостерігали за 0°C. За 20°C рівень гемолізу знижувався в 1,8 раза. Подальше підвищення температури досліду до 37°C не змінювало рівень пошкодження. Досліджувані амфіфільні сполуки за температури 0°C та 10°C доволі ефективно захищали еритроцити кролика від постгіпертонічного шоку. За цих умов рівень гемолітичного пошкодження зменшувався у 2–3 рази. За 20°C амфіфільні сполуки не впливали на рівень пошкодження клітин, а за 30°C і 37°C — збільшували його. Існування температурної залежності постгіпертонічного пошкодження показало залучення до процесу фосфоліпідної компоненти мембрани еритроцита. За нижчої температури спостерігають більшу впорядкованість ліпідів, її підвищення супроводжується розупорядкуванням та зростанням плинності, а отже, і еластичності мембрани. Як наслідок, пошкодження еритроцита в умовах постгіпертонічного шоку менше за температури 20–37°C. Додавання амфіфільних сполук за 0 та 10°C діє подібно до підвищення температури — розупорядковує бішар, підвищує еластичність мембрани та зменшує пошкодження під час перенесення з гіпертонічного розчину в ізотонічний. За понад 20°C внесення амфіфільних сполук призводить не тільки до розупорядкування, а й до формування змішаних міцел, які складаються з фосфоліпідів та молекул амфіфільної речовини. Це порушує бішар, надає йому нестабільності і призводить до посилення пошкодження еритроцитів.

Ключові слова: еритроцити кролика, амфіфільні сполуки, постгіпертонічний шок, температура

На сьогодні кріоконсервація — добре відомий засіб зберігання живих клітин і тканин, яку застосовують у багатьох галузях біології та медицини [2]. Успішне зберігання біологічного матеріалу значною мірою залежить від здатності контролювати та змінювати стан клітин, що мінімізує або пом'якшує ушкодження, пов'язані з низькими температурами і процесами переходів між нормотермічним та низькотемпературним режимами. Теоретичні підходи до вивчення кріоконсервації призвели до появи моделей, які дають можливість вивчати зміни клітин під час охолодження та нагрівання [4, 15].

Головним наслідком пошкодження під час відтавання суспензії клітин є лізис, спричинений надлишковим збільшенням об'єму після впливу високої концентрації солі та подальшого розведення до ізотонічних умов. Для вивчення цього процесу існує модель постгіпертонічного шоку [4, 12]. Клітини спочатку інкубують у високосольових розчинах, а потім переміщують

в ізотонічні умови. Теоретичні основи постгіпертонічного шоку базуються на надмірному вході іонів натрію з концентрованого розчину, який утворюється внаслідок виморожування води під час охолодження. Втрата води клітиною провокує процес, за якого сольові містки між фіксованими зарядами на білках цитоплазми розриваються та зв'язуються з внутрішньоклітинними іонами, тим самим спричиняючи додатковий приплив із позаклітинного середовища. Після розморожування білки вивільняють іони у відповідь на розведення цитоплазми. Їх підвищений вміст притягує достатньо води, щоб перевищити межі еластичності мембрани, що призводить до пошкодження мембрани [12].

Деякі речовини, здатні змінювати плинність мембрани, можуть захистити клітини від факторів, які впливають на них під час кріоконсервування. Відомо, що амфіфільні речовини знижують рівень ушкодження еритроцитів свавців за гіпертонічного шоку та кріо-

гемолізу, що моделюють вплив високих концентрацій солей, які утворюються при виморожуванні води, та різке охолодження клітин відповідно [7, 13]. В умовах постгіпертонічного шоку деякі амфіфільні сполуки захищають еритроцити за 0°C, але неефективні за фізіологічної температури [3]. З огляду на ці дані, було доцільно дослідити детальніше температурну залежність захисного ефекту амфіфільних речовин на еритроцити в умовах постгіпертонічного шоку.

Матеріали і методи

Для дослідження використовували еритроцити, отримані з крові кролика. Роботу з тваринами проводили відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах» (V Національний конгрес з біоетики, Київ, 2013) та «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986). Після видалення плазми еритромасу двічі відмивали центрифугуванням за 1000 г протягом 3 хв. у 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (NaCl 0,15 моль/л; Na-фосфатний буфер 0,01 моль/л, pH 7,4). Постгіпертонічний шок здійснювали перенесенням еритроцитів

з 2,0 моль/л NaCl в 0,15 моль/л NaCl за 0°C, 10, 20, 30 і 37°C. Амфіфільні речовини трифторперазин (150 мкмоль/л), хлорпромазин (400 мкмоль/л), децилсульфат натрію (600 мкмоль/л), децил- β ,D-глюкопіранозид (800 мкмоль/л) додавали в 0,15 моль/л NaCl перед внесенням клітин. Для кожної амфіфільної речовини обирали концентрацію, найбільш ефективну в умовах постгіпертонічного шоку за 0°C. Вміст гемоглобіну в супернатанті визначали спектрофотометрично. Для всіх зразків проводили обчислення середнього арифметичного значення і значення середньоквадратичної помилки ($M \pm m$). Статистичну обробку отриманих експериментальних результатів проводили за допомогою програми *Statistica 6.0* (StatSoft Inc., США).

Результати й обговорення

Дані щодо впливу температури та амфіфільних сполук на постгіпертонічний гемоліз наведені на рис. 1–4. Видно, що в контролі максимальне пошкодження клітин спостерігається за 0°C; за 10°C і 20°C пошкодження еритроцитів кролика знижується в 1,4 та 1,8 раза відповідно. Подальше підвищення температури досліджу до 37°C не змінювало рівень пошкодження.

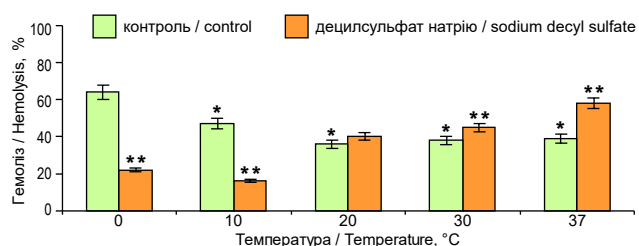


Рис. 1. Рівень постгіпертонічного гемолізу контрольних еритроцитів та еритроцитів у присутності децилсульфату натрію залежно від температури досліджу

Fig. 1. The level of posthypertonic hemolysis of control erythrocytes and erythrocytes in the presence of sodium decyl sulfate depending on the temperature of the experiment

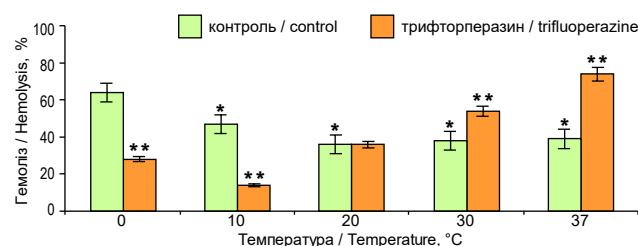


Рис. 2. Рівень постгіпертонічного гемолізу контрольних еритроцитів та еритроцитів у присутності трифторперазину залежно від температури досліджу

Fig. 2. The level of posthypertonic hemolysis of control erythrocytes and erythrocytes in the presence of trifluoroperazine depending on the temperature of the experiment

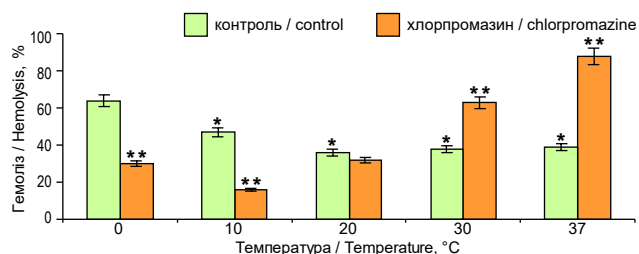


Рис. 3. Рівень постгіпертонічного гемолізу контрольних еритроцитів та еритроцитів у присутності хлорпромазину залежно від температури досліджу

Fig. 3. The level of posthypertonic hemolysis of control erythrocytes and erythrocytes in the presence of chlorpromazine depending on the temperature of the experiment

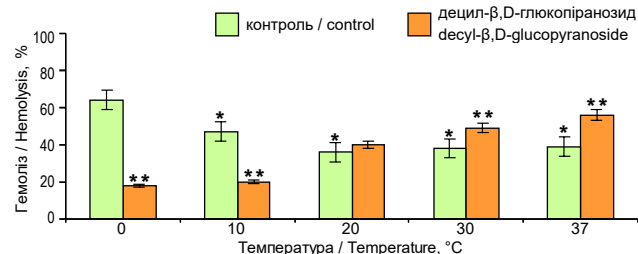


Рис. 4. Рівень постгіпертонічного гемолізу контрольних еритроцитів та еритроцитів у присутності децил- β ,D-глюкопіранозиду залежно від температури досліджу

Fig. 4. The level of posthypertonic hemolysis of control erythrocytes and erythrocytes in the presence of decyl- β ,D-glucopyranoside depending on the temperature of the experiment

Примітка. * — відмінності вірогідні порівняно з рівнем гемолізу клітин за 0°C, $P < 0,05$;

** — порівняно з рівнем гемолізу клітин у відсутності амфіфільної сполуки за тієї ж температури, $P < 0,05$.

Note. * — differences are significant compared to the level of cell hemolysis at 0°C,

$P < 0,05$; ** — compared to the level of cell hemolysis in the absence of amphiphilic compound at the same temperature, $P < 0,05$.

Обчислене зниження рівня гемолізу для контрольних клітин за підвищення температури досліду від 0 до 10°C становить 1,4 раза, від 10 до 20°C — 1,3 раза. Подальше підвищення температури не призводить до зниження пошкодження. Загальний рівень зниження гемолізу клітин за підвищення температури від 0 до 37°C становить близько 1,8 раза (рис. 1–4, зелені стовпчики).

Досліджувані амфіфільні сполуки за температури 0°C та 10°C доволі ефективно захищають еритроцити кролика від постгіпертонічного шоку. Зниження гемолітичного пошкодження за 0°C становить: децилсульфат натрію — у 2,9 раза, трифторперазин — у 2,3 раза, хлорпромазин — у 2,1 раза, децил- β ,D-глюкопіранозид — у 3,6 раза; за 10°C: децилсульфат натрію — у 2,9 раза, трифторперазин — у 3,4 раза, хлорпромазин — у 2,9 раза, децил- β ,D-глюкопіранозид — у 2,6 раза. За 20°C амфіфільні сполуки не впливають на рівень гемолізу, а за 30°C і 37°C — збільшують рівень пошкодження клітин (рис. 1–4, помаранчеві стовпчики).

Отже, ми бачимо, що температурні умови визначають як базовий рівень пошкодження клітин в умовах постгіпертонічного шоку, так і рівень захисту еритроцитів за допомогою амфіфільних сполук.

Існування температурної залежності постгіпертонічного пошкодження демонструє залучення до процесу фосфоліпідної компоненти мембрани еритроцита. Температура модулює плинність мембран, поділ фаз та організацію ліпідних доменів [8]. Плинність мембрани охоплює кілька параметрів — таких, як структура, склад і розташування мембранних ліпідів, і з фізико-хімічної точки зору є еластомеханічною властивістю. Різноманітність типів ліпідів у мембрані еритроцита створює певний баланс, який визначає структурні особливості біомембран. Зміна температури впливає на процеси, пов'язані з рухом молекул усередині ліпідного подвійного шару та регуляцією активності інших молекул, в тому числі з мембранозв'язаними білками [11]. На відміну від штучних ліпідних везикул, у біологічних мембранах відсутні стрімкі фазові переходи, порядок ліпідів змінюється лінійно з температурою. Для нижчої температури характерна більша впорядкованість ліпідів, підвищення температури супроводжується зменшенням впорядкованості та зростанням плинності, а отже, й еластичності мембрани [8, 10]. Помірне зростання плинності може забезпечити більшу стійкість до розтягування і, як наслідок, пошкодження еритроцита в умовах постгіпертонічного шоку зменшується. Це може пояснити зниження пошкодження еритроцитів за підвищення температури постгіпертонічного шоку (рис. 1–4, зелені стовпчики).

Відомо, що латеральна організація мембран у живих клітинах проявляється невеликими гетерогенними та високодинамічними доменами [5, 8]. За зміни температури змінюється склад і розмір цих доменів. За підвищення температури у зовнішньому моношарі зменшується кількість доменів, збагачених сфінгомієліном, та зростає кількість збагачених фосфатидил-

холіном [5]. Перерозподіл фосфоліпідів може впливати на плинність мембрани, здатність витримувати розтягнення і змінювати критичний гемолітичний об'єм. Це також може відігравати певну роль у температурній чутливості еритроцитів до постгіпертонічного шоку.

Амфіфільні сполуки є мембранотропними речовинами і їхня інтеркаляція у ліпідний бішар мембрани змінює такі характеристики клітини, як упорядкованість, об'єм, площа поверхні [1, 16, 17]. Після вбудовування амфіфілу невпорядкована фаза ліпідного бішару розширюється. Отже, можливо, що додавання амфіфільних сполук за 0 та 10°C діє подібно до підвищення температури, розупорядковує бішар, підвищує еластичність мембрани та зменшує пошкодження під час перенесення з гіпертонічного розчину до ізотонічного. Крім того, у багатьох роботах показано збільшення площі поверхні модельних мембран, а також збільшення діаметру еритроцита за вбудовування амфіфільної речовини [1, 16]. Більша площа поверхні створює спроможність досягнути більшого об'єму під час перенесення в ізотонічні умови й уникнути пошкодження внаслідок перевищення критичного гемолітичного об'єму. За температури понад 20°C плинність мембрани значно підвищується [11]. Крім того, зв'язування амфіфілів з поверхнею клітини збільшується внаслідок підсилення гідрофобних взаємодій [6]. Виявлено, що фенотіазини збільшують кількість доменів у модельних мембранах за кімнатної температури, зменшують їхню площу і помітно збільшують загальну довжину кордону домена. Передбачається, що зміна організації доменів, найімовірніше, виникає внаслідок селективного накопичення фенотіазинів у міжфазних ділянках між рідинно-впорядкованими та рідинно-невпорядкованими доменами [17]. За таких умов внесення амфіфільних сполук призводить не тільки до розупорядкування, а й до формування змішаних міцел, які складаються з фосфоліпідів і молекул амфіфільної речовини. Це порушує бішар, надає йому нестабільності і призводить до посилення пошкодження еритроцитів в умовах постгіпертонічного шоку за температури понад 20°C в присутності амфіфільних речовин.

Висновки

Як рівень пошкодження еритроцитів кролика в умовах постгіпертонічного шоку, так і рівень захисту клітин за допомогою амфіфільних сполук залежать від температури навколишнього середовища. При цьому дія амфіфільних сполук змінюється від ефективного захисту до посилення пошкодження. За результатами досліджень впливу температури на постгіпертонічний гемоліз, можна зробити висновок, що для зменшення відсотка пошкоджених клітин переводити їх з гіпертонічних у фізіологічні умови доцільно за температури 20–37°C. Натомість використання амфіфільних сполук як захисних речовин в умовах постгіпертонічного шоку є ефективним за температур 0–10°C.

Перспективи подальших досліджень

Подальші дослідження передбачають залучення еритроцитів інших ссавців, які мають відмінності за фосфоліпідним складом мембрани. Це дозволить детальніше вивчити дію амфифільних сполук на мембрани еритроцитів ссавців під час постгіпертонічного шоку і, можливо, передбачати захисну дію сполук цього класу.

1. Alves I, Staneva G, Tessier C, Salgado GF, Nuss P. The interaction of antipsychotic drugs with lipids and subsequent lipid reorganization investigated using biophysical methods. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2011; 1808 (8): 2009–2018. DOI: 10.1016/j.bbamem.2011.02.021.
2. Bojic S, Murray A, Bentley BL, Spindler R, Pawlik P, Cordeiro JL, Bauer R, de Magalhães JP. Winter is coming: the future of cryopreservation. *BMC Biol.* 2021; 19 (1): 56. DOI: 10.1186/s12915-021-00976-8.
3. Chabanenko OO, Yerzhova NA, Orlova NV, Shpakova NM. Effect of sodium decyl sulfate and chlorpromazine on posthypertonic shock of mammalian red blood cells. *Biol. Tvarin.* 2019; 21 (4): 84–90. DOI: 10.15407/animbiol21.04.084. (in Ukrainian)
4. Chabanenko O, Yerzhova N, Shpakova N. Adequacy of posthypertonic shock model to real cryopreservation conditions during deglycerolization of erythrocytes. Proc. 57th ann. meet. "CRYO-2020", 21–23 July 2020, USA. *Cryobiol.* 2020; 97: 276. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2020.10.106.
5. Conrard L, Stommen A, Cloos AS, Steinkühler J, Dimova R, Pollet H, Tyteca D. Spatial relationship and functional relevance of three lipid domain populations at the erythrocyte surface. *Cell. Physiol. Biochem.* 2018; 51 (4): 1544–1565. DOI: 10.1159/000495645.
6. Durell SR, Ben-Naim A. Temperature dependence of hydrophobic and hydrophilic forces and interactions. *J. Phys. Chem.* 2021; 125 (48): 13137–13146. DOI: 10.1021/acs.jpcc.1c07802.
7. Ershova NA, Shpakova NM, Orlova NV, Ershov SS. Amphiphiles as tools for studying hypertonic cryohemolysis of mammalian erythrocytes. *Biol. Tvarin.* 2014; 16 (2): 48–56. (in Ukrainian)

8. Färber N, Westerhausen C. Broad lipid phase transitions in mammalian cell membranes measured by Laurdan fluorescence spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2022; 1864 (1): 183794. DOI: 10.1016/j.bbamem.2021.183794.
9. Habibi S, Lee HY, Moncada-Hernandez H, Gooding J, Minerick AR. Impacts of low concentration surfactant on red blood cell dielectrophoretic responses. *Biomicrofluidics.* 2019; 13 (5): 054101. DOI: 10.1063/1.5113735.
10. Jaferzadeh K, Sim M, Kim N, Moon I. Quantitative analysis of three-dimensional morphology and membrane dynamics of red blood cells during temperature elevation. *Sci. Rep.* 2019; 9: 14062. DOI: 10.1038/s41598-019-50640-z.
11. Klais-Luna MC, Manrique-Moreno M. Infrared spectroscopic study of multi-component lipid systems: A closer approximation to biological membrane fluidity. *Membranes.* 2022; 12 (5): 534. DOI: 10.3390/membranes12050534.
12. Muldrew K. The salting-in hypothesis of post-hypertonic lysis. *Cryobiol.* 2008; 57 (3): 251–256. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2008.09.007.
13. Orlova NV, Shpakova NM. Mechanism of protective effect of amphiphilic compounds during hypertonic hemolysis of erythrocytes. *Fiziol. Zh.* 2006; 52 (5): 55–61. PMID: 17176840. (in Ukrainian)
14. Riske KA, Domingues CC, Casadei BR, Mattei B, Carità AC, Lira RB, Preté PSC, de Paula E. Biophysical approaches in the study of biomembrane solubilization: quantitative assessment and the role of lateral inhomogeneity. *Biophys. Rev.* 2017; 9 (5): 649–667. DOI: 10.1007/s12551-017-0310-6.
15. Shpakova NM, Orlova NV. About the mechanism of mammalian erythrocytes osmotic stability. *Probl. Cryobiol. Cryomed.* 2020; 30 (4): 331–342. DOI: 10.15407/cryo30.04.331.
16. Steinkopf S, Schelderup AK, Gjerde HL, Pfeiffer J, Thoresen S, Gjerde AU, Holmsen H. The psychotropic drug olanzapine (Zyprexa®) increases the area of acid glycerophospholipid monolayers. *Biophys. Chem.* 2008; 134 (1–2): 39–46. DOI: 10.1016/j.bpc.2008.01.003.
17. Wesolowska O, Michalak K, Hendrich AB. Direct visualization of phase separation induced by phenothiazine-type antipsychotic drugs in model lipid membranes. *Mol. Membrane Biol.* 2011; 28 (2): 103–114. DOI: 10.3109/09687688.2010.533706.

Efficiency of amphiphilic compounds in rabbit erythrocytes posthypertonic shock depending on temperature conditions

O. E. Nipot, N. A. Ershova, N. M. Shpakova, S. S. Ershov, O. O. Shapkina
nipotel71@gmail.com

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine NAS of Ukraine,
23 Pereyaslavska str., Kharkiv, 61016, Ukraine

The influence of temperature conditions on the level of damage of rabbit erythrocytes under posthypertonic shock and the level of their protection by amphiphilic compounds was investigated. We observed the maximum cell damage at 0°C. When the temperature increased to 20°C, the level of hemolysis decreased by 1.8 times. Further increase in temperature up to 37°C did not lead to a decrease in damage. The investigated amphiphilic compounds at 0°C and 10°C effectively protected rabbit erythrocytes from posthypertonic shock. Reduction of hemolytic damage was 2–3 times. At 20°C amphiphilic compounds did not affect the level of cell damage, and at 30°C and 37°C they increased it. The existence of temperature dependence of posthypertonic damage showed the involvement of the phospholipid component of the erythrocyte membrane in the process. Lower temperature is characterized by greater orderliness of lipids, its increase is accompanied by disorder and increased fluidity, and hence elasticity of the membrane. As a result, erythrocyte damage in posthypertonic shock is less at the temperature of 20–37°C. The addition of amphiphilic compounds at 0 and 10°C acts similarly to increasing the temperature, disorganizes the bilayer, increases the elasticity of the membrane and reduces damage during the transfer from hypertonic to isotonic solution. Above 20°C, the introduction of amphiphilic compounds leads not only to disorder, but also to the formation of mixed micelles consisting of phospholipids and amphiphilic molecules. This disrupts the bilayer, gives it instability and leads to increased damage of erythrocytes.

Key words: rabbit erythrocytes, amphiphilic compounds, posthypertonic shock, temperature