

Влияние амфифильных соединений на чувствительность частично обезвоженных эритроцитов к гипертоническому стрессу

Н.В. ОРЛОВА, Н.М. ШПАКОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Amphiphilic Compounds on the Susceptibility of Partially Dehydrated Erythrocytes to Hypertonic Stress

ORLOVA N.V., SHPAKOVA N.M.

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

Изучали влияние различных амфифильных соединений на чувствительность частично обезвоженных эритроцитов к гипертоническому стрессу (4,0 М NaCl, температура 37°C). Обнаружили высокую антигемолитическую активность представителей катионных, анионных, неионных, цвиттерионных амфифильных соединений при перенесении клеток из 0,45 и 0,7 М NaCl в среду, содержащую 4,0 М NaCl. Величины антигемолитической активности зависели как от особенностей исследуемых соединений, так и от исходного состояния клеток, подвергшихся стрессовому воздействию.

Ключевые слова: эритроциты, амфифильные соединения, гипертонический стресс, антигемолитическая активность.

Вивчали вплив різних амфифільних сполук на чутливість частково зневоднених еритроцитів до гіпертонічного стресу (4,0 М NaCl, температура 37°C). Виявили високу антигемолітичну активність представників катіонних, аніонних, неіонних, цвітерійонних амфифільних сполук при перенесенні клітин із 0,45 і 0,7 М NaCl у середовище, яке містить 4,0 М NaCl. Величини антигемолітичної активності залежали як від особливостей досліджуваних сполук, так і від вихідного стану клітин, які зазнають стресового впливу.

Ключові слова: еритроцити, амфифільні сполуки, гіпертонічний стрес, антигемолітична активність.

We have studied the effect of various amphiphilic compounds on the susceptibility of partially dehydrated erythrocytes to a hypertonic stress (4.0M NaCl, 37°C). There has been found a high antihaemolytic activity of the representatives of cationic, anionic, nonionic, zwitterionic amphiphilic compounds when removing the cells out of 0.45 and 0.7 M NaCl into the medium, containing 4.0 M NaCl. The values of antihaemolytic activity depended both on the peculiarities of the compounds studied, and on the initial state of cells, subjected to a stress effect.

Key words: erythrocytes, amphiphilic compounds, hypertonic stress, antihaemolytic activity.

Одним из основных факторов, определяющих повреждение клеток при замораживании, является действие высококонцентрированных растворов солей, образующихся во внеклеточной среде в результате вымораживания воды. Помещение клеток в среду, содержащую 4,0 М NaCl, широко используется в эксперименте, моделирующем действие этого фактора на клетки.

В настоящее время существуют два способа снижения уровня гипертонического гемолиза эритроцитов: первый – связан с модификацией клеток на этапах, предшествующих стрессовому воздействию, второй – с защитой клеток в момент действия стрессового фактора. Примером первого способа может служить предварительное частичное обезвоживание эритроцитов, позволяющее существенно повысить их устойчивость к последующему гипертоническому стрессу [4], второго – присутствие в литической среде в момент внесения эритроцитов амфифильных соединений, обладающих антигемолитической активностью [5].

One of the major factors determining the cell damage during freezing is the effect of highly concentrated salines, formed in an extracellular medium as a result of a water freezing-out. Cell introduction into the medium, containing 4.0 M NaCl is widely used in the experiment, modeling the effect of this factor on cells.

There are two ways to reduce the level of erythrocytes hypertonic haemolysis. The first one is related to cell modification at the stages prior to a stress effect. The second method is connected to the cell protection at the moment of a stress factor effect. Preliminary partial erythrocytes dehydration, allowing a significant increase of their stability to the following hypertonic stress [4] is an example of the first way, and the one of the second method is the presence in a lytic medium of amphiphilic compounds, possessing antihaemolytic activity at the moment of erythrocytes introduction [5].

The aim of the work is to study a combined effect of preliminary partial dehydration and amphiphilic

Адрес для корреспонденции: Орлова Н.В., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7720135, факс: +38 (057) 7720084, 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

Цель работы – изучить совместное влияние предварительного частичного обезвоживания и присутствующих в литической среде амфифильных соединений на чувствительность эритроцитов к гипертоническому стрессу.

Материалы и методы

Эритроциты получали из донорской крови II группы по общепринятой методике. Все среды готовили на 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,4. В работе использовали представителей катионных, неионных, цвиттерионных, анионных классов мицеллообразующих амфифильных соединений, проявляющих высокую антигемолитическую активность при гипертоническом стрессе эритроцитов [3]: хлорпромазин (ХП), додецил- β , D-мальтозид (ДМ), 3-цеилдиметиламмоний 1-пропансульфонат натрия (Z16) фирмы “Calbiochem”; децилсульфат натрия (C10) фирмы “Синтезпав” соответственно.

Гипертонический шок проводили следующим образом. С помощью поршневого дозатора Gilson по 50 мкл осадка эритроцитов переносили в 0,5 мл раствора NaCl (0,15; 0,45; 0,7 М) и инкубировали 2 мин при температуре 37°C (этап предварительной инкубации). Выбор сред предварительной инкубации обусловлен тем, что 0,45 М NaCl является зоной оптимальной устойчивости эритроцитов к последующему перенесению в 4,0 М NaCl [4]. Клетки, исходно проинкубированные в 0,7 М NaCl, характеризуются метастабильным состоянием и повреждаются при перенесении в 4,0 М NaCl на уровне контроля (0,15→4,0 М NaCl) [4].

Затем из каждой пробы предварительной инкубации по 50 мкл суспензии эритроцитов переносили в 1 мл 4,0 М NaCl, содержащей амфифильное вещество (этап собственно гипертонического стресса), температура 37°C. После этого клетки осаждали центрифугированием и при длине волны 543 нм спектрофотометрически определяли количество гемоглобина в супернатанте. Выход гемоглобина из клеток рассчитывали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу клеток в присутствии тритона X-100 (0,1%).

За эффективную концентрацию амфифильного вещества в серии опытов одного эксперимента было принято среднее арифметическое концентраций данного вещества, соответствующих минимальному значению гемолиза эритроцитов.

Значение максимальной антигемолитической активности амфифильного соединения представляет собой среднюю арифметическую величину из значений максимальной антигемолитической активности данного соединения, рассчитанных по формуле:

compounds being in a lytic medium, on the erythrocytes susceptibility to a hypertonic stress.

Materials and methods

Erythrocytes were obtained from donor blood (the II group) according to the generally accepted technique. All the media were prepared using 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4. In the work we have used the representatives of cationic, non-ionic, zwitterionic, anionic classes of micella-forming amphiphilic compounds, manifesting a high antihaemolytic activity during a hypertonic stress of erythrocytes [3], such as chlorpromazine (CIP), dodecyl- β , D-maltoside (DM), 3-cetyltrimethylammonium-1-propanesulfonate (Z-16) produced by “Calbiochem”; sodium decyl sulfate (C10) by “Sintezpav”, correspondingly.

Hypertonic shock was accomplished as follows. Using Gilson’s pipette 50 ml of erythrocytes sediment were transferred into 0.5 ml of NaCl solution (0.15;0.45;0.7 M) and incubated within 2 min under the temperature of 37°C (stage of preliminary incubation). The choice of the media for preliminary incubation is stipulated by the fact that 0.45 M NaCl is the zone for optimum erythrocytes stability for the following transfer into 4.0 M NaCl [4]. The cells, incubated initially under 0.7 M NaCl are characterised with a metastable state and are damaged during their transfer into 4.0 M NaCl at the control level (0.15-4.0 M NaCl) [4].

Afterwards 50 ml of erythrocytes suspension were transferred from each sample of preliminary incubation into 1 ml 4.0 M NaCl, containing amphiphilic compound (the stage of hypertonic stress itself), 37°C temperature. Then the cells were sedimented by centrifuging and at the wave length of 543 nm haemoglobin content in supernatant was determined spectrophotometrically. Haemoglobin release out of the cells was determined in percentage to 100% cell haemolysis in the presence of triton X-100 (0.1%).

An arithmetic mean of the compound concentrations, corresponding to the minimum value of erythrocytes haemolysis was taken as an effective concentration of amphiphilic compound in the series of trials of one experiment.

The value of maximum antihaemolytic activity of amphiphilic compound is an arithmetic mean of the values of maximum antihaemolytic activity of the compound, calculated by the formula:

$$AH_{max} = \frac{k-a}{k} \times 100\%,$$

where k – the value of erythrocytes haemolysis in the absence of amphiphilic compound;

a – the minimum value of erythrocytes haemolysis in the presence of amphiphilic compound.

$$AG_{max} = \frac{k-a}{k} \times 100\%,$$

где k – величина гемолиза эритроцитов при отсутствии амфифильного вещества;
 a – минимальная величина гемолиза эритроцитов в присутствии амфифильного вещества.

Результаты и обсуждение

Для всех исследуемых амфифильных соединений были сняты концентрационные зависимости гемолиза эритроцитов в среде, содержащей 4,0 М NaCl, при различном исходном состоянии клеток (рис. 1). Видно, что все вещества снижают уровень гипертонического повреждения как контрольных эритроцитов, так и клеток, исходно проинкубированных в 0,45 и 0,7 М NaCl. В представленных кривых концентрационной зависимости гипертонического гемолиза эритроцитов можно выделить две фазы. При увеличении концентрации амфифила происходит постепенное снижение уровня повреждения клеток, которое затем сменяется его повышением.

Как и следовало ожидать, исходный уровень гемолиза эритроцитов, перенесенных из среды, содержащей 0,45 М NaCl, в 4,0 М NaCl, значительно ниже (40-50 %), чем гипертоническое повреждение клеток, предварительно находившихся в физиологическом растворе или в среде, содержащей 0,7 М NaCl (80-90 %). Из рис. 1 видно, что наименьший уровень гипертонического гемолиза эритроцитов наблюдается при совместном использовании предварительной инкубации клеток в 0,45 М NaCl и амфифильного вещества. Такая закономерность отмечена для всех исследуемых соединений.

Несмотря на то что исходный уровень гипертонического повреждения как контрольных, так и предварительно проинкубированных в 0,7 М NaCl эритроцитов примерно одинаков (около 80%), амфифильные соединения снижают уровень гемолиза контрольных клеток в большей степени, чем предварительно модифицированных эритроцитов (рис.1).

Таким образом, при температуре 37°C все исследуемые амфифильные соединения снижают уровень гипертонического гемолиза эритроцитов, при этом эффективность их определяется исходным состоянием клеток и повышается с использованием сред предварительной инкубации в ряду: 0,7; 0,15; 0,45 М NaCl.

Следует отметить, что амфифильное соединение находится в среде, содержащей 4,0 М NaCl, перед внесением частично обезвоженных клеток, т. е. вещество проявляет антигемолитическую активность непосредственно в момент воздействия

Results and discussion

For all the amphiphilic compounds studied there were recorded the concentration dependencies of erythrocytes haemolysis in the medium, containing 4.0 M NaCl at various initial state of cells (Fig. 1). As it is seen, all the substances reduce the level of hypertonic damage in both control erythrocytes and the cells initially incubated under 0.45 and 0.7 M NaCl. In the curves

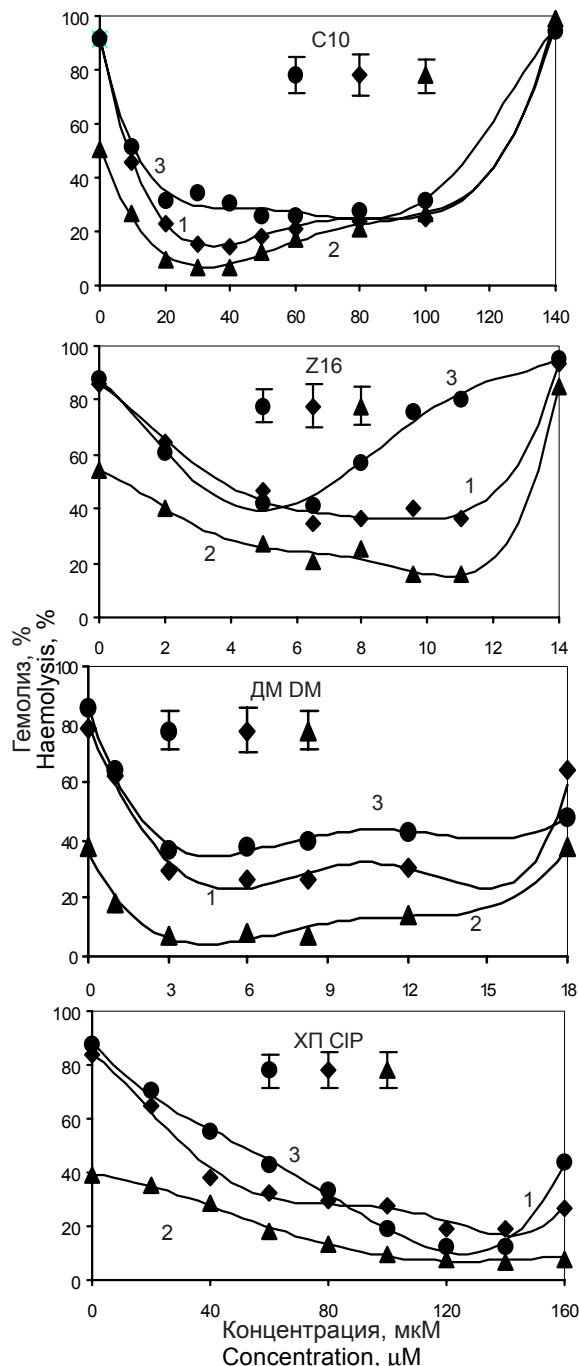


Рис. 1. Влияние предварительной инкубации в средах, содержащих NaCl: (1– 0,15; 2– 0,45; 3– 0,7 М), на уровень гемолиза эритроцитов в 4,0 М NaCl в присутствии амфифильных соединений (температура 37°C).

Fig. 1. Effect of preliminary incubation in the media, containing NaCl: (1 – 0.15; 2 – 0.45; 3 – 0.7M) on the level of erythrocytes haemolysis under 4.0 M NaCl in the presence of amphiphilic compounds (37°C temperature).

на клетки стрессового фактора.

Чтобы сравнить протектирующее действие исследуемых соединений и устранить вклад предварительной обработки клеток в изменение уровня гипертонического гемолиза эритроцитов, мы использовали понятие максимальной антигемолитической активности вещества.

Как видно из рис.2, величины максимальной антигемолитической активности всех веществ достаточно высоки и находятся в диапазоне 50-90%. При этом анионный C10 и катионный ХП проявляют более высокую антигемолитическую активность по сравнению с неионным ДМ и цвиттерионным Z16. Для метастабильных клеток, т.е. тех, которые инкубировали в 0,7 М NaCl, величины максимальной антигемолитической активности всех веществ несколько ниже (примерно на 10–20%). Значения эффективных концентраций исследуемых соединений находятся в диапазоне 4-133 мкМ, т.е. могут отличаться на два порядка. Так, наименьшие эффективные концентрации веществ отмечены для неионного ДМ и цвиттерионного соединения Z16, а наибольшие – для катионного амфифила ХП.

Ранее была выявлена антигемолитическая активность катионных и неионных амфифильных веществ при гипертоническом стрессе предварительно обезвоженных эритроцитов [5,6]. В работе мы показали, что такой способностью обладают представители всех классов мицеллообразующих амфифильных соединений.

Для всех исследуемых веществ характерна общность в проявлении их антигемолитического действия. Так, все амфифильные соединения

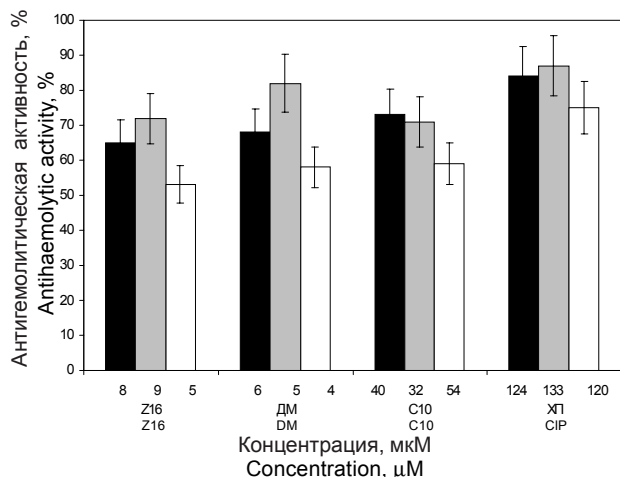


Рис. 2. Значение максимальной антигемолитической активности амфифильных соединений при перенесении эритроцитов в 4,0 М NaCl из сред предварительной инкубации: ■ - 0,15 М NaCl; ■ - 0,45 М NaCl; □ - 0,7 М NaCl.

Fig. 2. The value of maximum antihaemolytic activity of amphiphilic compounds when transferring erythrocytes into 4.0 М NaCl out of the media of preliminary incubation: ■ - 0,15 М NaCl; ■ - 0,45 М NaCl; □ - 0,7 М NaCl.

presented for the concentration dependence of erythrocytes hypertonic haemolysis we can note two phases. When increasing an amphiphile concentration the gradual reduction of the level of cell damage occurs, which changes then with its increase.

As it should be expected, the initial level of erythrocytes haemolysis, transferred out of the medium, containing 0.45 М NaCl into 4.0 М NaCl was significantly lower (40-50%) than hypertonic damage of the cells, being preliminarily either in a physiological solution or in the medium containing 0.7 М NaCl (80-90%). Fig. 1 shows that the lowest level of erythrocytes hypertonic haemolysis is observed during the combined usage of preliminary cell incubation under 0.45 NaCl and amphiphilic compound. Such a regularity is noted for all the compounds studied.

In spite of the fact that an initial level of hypertonic damage both in the control erythrocytes and the ones preliminarily incubated under 0.7М NaCl is nearly the same (about 80%), amphiphilic compounds reduce the level of the control cells haemolysis much more stronger, than of preliminarily modified erythrocytes (Fig. 1).

Thus, under the temperature of 37°C all the amphiphilic compounds studied reduce the level of the erythrocytes' haemolysis, in this case their efficiency is determined by the initial state of cells and increases when using the media of preliminary incubation in the row: 0.7; 0.45; 0.15 М NaCl.

It should be noted that an amphiphilic compound is in the medium, containing 4.0 М NaCl before the introduction of partially dehydrated cells, i.e. the substance manifests an antihaemolytic activity directly at the moment of a stress factor effect on cells.

To compare a protective effect of the compounds studied and remove the effect of preliminary cell treatment in the change of the level of erythrocytes hypertonic haemolysis, we applied the notion of the maximum antihaemolytic activity of the substance.

As the Fig. 2 shows the values of the maximum antihaemolytic activity of all the substances are quite high and being within the range of 50-90%. In this case anionic C10 and cationic CIP manifest a higher antihaemolytic activity comparing to non-ionic DM and zwitterionic Z16. For metastable cells, i.e. those incubated under 0.7 М NaCl the values of the maximum antihaemolytic activity of all the substances are a little bit lower (about by 10-20%). The values of efficient concentrations of the compounds studied are within the range of 4-133 μM, i.e. can differ by of 10². Thus the lowest effective concentrations of the compounds studied are noted for non-ionic DM and zwitterionic compound Z16, and for cationic amphiphile CIP the highest ones.

Antihaemolytic activity of cationic and non-ionic

дополнительно увеличивают антигемолитический эффект предварительной инкубации клеток в 0,45 М NaCl, и все вещества способны защищать от гипертонического гемолиза клетки, находящиеся в метастабильном состоянии.

Метастабильные клетки, в отличие от контрольных, характеризуются повышенной чувствительностью к различным стрессовым воздействиям. Так, эритроциты, находившиеся в среде, содержащей 0,7 М NaCl, начинают значительно лизировать (80-90%) в растворе 2,0 М NaCl, тогда как контрольные клетки – только в растворе 3,0 М NaCl [2]. Известно также, что экспонированные в 0,7 М NaCl эритроциты становятся чувствительными к охлаждению до околонулевых температур. Исходная инкубация эритроцитов в среде, содержащей 0,7 М NaCl, приводит к нарушению барьерной функции мембраны для катионов, о чем свидетельствует выход ионов калия из клетки [1]. Нарушение проницаемости мембраны для катионов калия является этапом, облегчающим формирование мембранной макроскопической поры при последующем перенесении клеток в гипертоническую среду. Следовательно, исследуемые амфифильные соединения способны протектировать от гипертонического гемолиза эритроциты, имеющие различное исходное состояние, что свидетельствует об их способности предотвращать “эволюцию” мембранного дефекта на различной стадии его развития.

Выводы

Антигемолитический эффект амфифилов проявляется непосредственно в момент действия стрессового фактора, а не обусловлен предварительной модификацией мембраны. По-видимому, в момент внесения эритроцитов в литическую среду амфифильные соединения способны встраиваться в мембрану и инициировать в ней процессы, направленные на предотвращение ее разрушения. На основании данных, свидетельствующих о способности амфифилов приводить к появлению в мембране небислойных фаз [7], увеличивать скорость трансбислойного движения мембранных липидов [8], можно предположить, что эти процессы связаны с некоторой мембранной пертурбацией. Вероятно, в момент действия стрессового фактора мембрана под влиянием амфифильных веществ становится более лабильной, что позволяет ей лучше адаптироваться к неблагоприятным условиям среды.

Литература

1. Бондаренко Т.П. Роль липидов в повреждении мембраны митохондрий и эритроцитов при охлаждении: Дис... канд.

amphiphilic compounds under hypertonic stress of preliminarily dehydrated erythrocytes [5, 6] has been revealed earlier. In the present study we have shown that the representatives of all the classes of micella-forming amphiphilic compounds possess such a capability.

For all the substances under study the similarity in the manifestation of their antihaemolytic effect is characteristic. Thus, all the amphiphilic compounds increase additionally an antihaemolytic effect of cell preliminary incubation under 0.45 М NaCl, and all the substances are capable of protecting against the cell hypertonic haemolysis, being at a metastable state.

It is known that metastable cells in contrast to the control ones are characterised with an increased susceptibility to various stress effects. Thus, erythrocytes being in the medium with 0.7 М NaCl start their significant lysis (80-90%) in 2.0 М NaCl solution, while the control cells do the same only in 3.0 М NaCl solution [2].

It is also known that erythrocytes exposed under 0.7 М NaCl become more sensitive to cooling down to above zero temperatures. Erythrocytes initial incubation in the medium containing 0.7М NaCl, results in the impairment of the membrane barrier function for cations, and release of potassium ions out of cells testifies to the fact [1]. Impairment of the membrane permeability for potassium cations is the stage making easier the formation of membrane macroscopic pore at the following cell transfer into a hypertonic medium. Therefore, amphiphilic compounds studied are capable of protecting against hypertonic haemolysis the erythrocytes with various initial state that testifies to their capability to prevent “evolution” of the membrane defect at different stages of its development.

Conclusions

Antihaemolytic effect of amphiphiles is manifested at the moment of a stress factor effect, but has not been stipulated by the preliminary membrane modification. Obviously, at the moment of erythrocytes introduction into a lytic medium amphiphilic compounds are capable to build-in the membrane and initiate in it the processes directed to its damage prevention. Basing on the data testifying to the capability of amphiphiles to cause the appearance of nonbilayer phases [7], increase the rate of transmembrane movement of membrane lipids [8] in the membrane, it may be supposed, that these processes are related to a certain membrane perturbation. Probably, at the moment of a stress factor effect the membrane under the effect of amphiphile compounds becomes more labile, that allows its better adapting to unfavorable factors of the medium.

биол. наук.– Харьков, 1981.– 151 с.

2. Дунаевская О.И., Шпакова Н.М., Бондаренко В.А. Гиперосмотический стресс эритроцитов и антигемолитическая активность трифторперазина // Пробл. криобиологии.– 1997.– №4.– С. 28-33.
3. Кулешова Л.Г., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Антигемолитическая и трансформирующая активность амфифильных соединений // Пробл. криобиологии.– 2001.– №1.– С. 9-15.
4. Поздняков В.В., Бондаренко В.А. Взаимосвязь между исходными осмотическими условиями среды и чувствительностью эритроцитов к гипертоническому стрессу в 4.0 М NaCl // Криобиология.– 1989.– №1.– С. 47-49.
5. 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.
6. Шпакова Н.М., Панталер Е.Р., Орлова Н.В. Влияние додецил-β, D-мальтозида на устойчивость предварительно дегидратированных эритроцитов к гиперосмотическому и холодовому шоку // Пробл. криобиологии.– 1999.– №3.– С. 10-16.
7. Hope M.J., Cullis P. R. The role of nonbilayer lipid structures in the fusion of human erythrocytes induced by lipid fusogens // Biochim. Biophys. Acta.– 1981.– 640.– P. 82-90.
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.– 1509, N 1-2.– P. 397-408.

Поступила 10.12.2002

References

1. Bondarenko T.P. Role of lipids in the impairment of membrane mitochondria and erythrocytes when cooling: Thesis for candidate's degree obtaining (biology).– Kharkov, 1981.– 151 p.
2. Dunayevskaya O.I., Shpakova N.M., Bondarenko V.A. Hyperosmotic stress of red cells and the antihemolytic activity of trifluoperazine // Problems of cryobiology.– 1997.– N4.– P. 28-33.
3. Kuleshova L.G., Orlova N.V., Shpakova N.M. Antihemolytic and transforming activity of amphiphilic compounds // Problems of Cryobiology.– 2001.– N1.– P. 9-15.
4. Pozdnyakov V.V., Bondarenko V.A. Interrelation between the initial osmotic conditions of the medium and erythrocytes susceptibility to a hypertonic stress under 4.0M NaCl // Cryobiology.– 1989.– 1.– P. 47-49.
5. Shpakova N.M., Pantaler E.R., Bondarenko V.A. Antihemolytic effect of chlorpromazine under hyperosmotic and cold shock of erythrocytes // Biokhimiya.– 1995.– 60, N10.– P. 1624-1631.
6. Shpakova N.M., Pantaler E.R., Orlova N.V. The effect of dodecyl-β, D-maltoside on the resistance of preliminarily dehydrated erythrocytes to hyperosmotic and cold shock // Problems of Cryobiology.– 1999.– N3.– P. 82-90.
7. Hope M.J., Cullis P. R. The role of nonbilayer lipid structures in the fusion of human erythrocytes induced by lipid fusogens // Biochim. Biophys. Acta.– 1981.– 640.– P. 82-90.
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.– 1509, N1-2.– P. 397-408.

Accepted in 10.12.2002