

К вопросу о механизме антигемолитического действия хлорпромазина при изменении осмотических и температурных параметров среды

Н.М. ШПАКОВА, Н.В. ОРЛОВА, Л.В. ЦЫМБАЛ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

To the Question About Mechanism of Chlorpromazine Antihemolytic Effect When Changing Osmotic and Temperature Medium Parameters

N.M. SHPAKOVA, N.V. ORLOVA, L.V. TSYMBAL

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

Гипертонический стресс и гипертонический криогемолиз эритроцитов млекопитающих позволяют исследовать влияние на клетки основных факторов криоповреждения: концентрирование солей и охлаждение. При изменении осмотических и температурных условий среды наблюдается значительное повреждение эритроцитов разных видов млекопитающих.

Цель работы – исследовать влияние хлорпромазина на гипертонический гемолиз (4,0 М NaCl) и гипертонический криогемолиз (1,2 М NaCl, 37→0°C) эритроцитов человека, а также оценить барьерные свойства и структурно-динамическое состояние эритроцитарных мембран.

Содержание гемоглобина определяли спектрофотометрически при длине волны 543 нм. Морфологический анализ эритроцитов осуществляли методом световой микроскопии. Количество ионов калия определяли методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии. Динамическую структуру мембраны эритроцита изучали методом ЭПР спектроскопии с использованием 16 доксилстеариновой кислоты (16-ДС). Перераспределение фосфатидилсерина оценивали по связыванию аннексина V с эритроцитарной мембраной методом проточной цитофлуориметрии.

Показано, что хлорпромазин (120 мкМ) значительно снижает уровень повреждения эритроцитов в условиях как гипертонического шока, так и гипертонического криогемолиза, его антигемолитическая активность составляет 90 и 70% соответственно. В указанных условиях хлорпромазин, предотвращая выход гемоглобина, не оказывает влияния на утечку ионов калия из клеток. Молекулы хлорпромазина, встраиваясь в эритроцитарную мембрану, вызывают изменение формы клетки по типу дискоцит-стоматоцит, при этом экспонирования фосфатидилсерина на внешней стороне мембраны не выявлено.

Методом ЭПР спектроскопии с использованием мембранного зонда 16 ДС показаны концентрационно-зависимые изменения структурно-функционального состояния эритроцитарной мембраны в присутствии хлорпромазина. Полученные данные свидетельствуют о существовании транзитных небислойных фаз в момент массового встраивания молекул хлорпромазина в мембрану эритроцита, что, по-видимому, и лежит в основе антигемолитического действия амфифильного соединения в условиях резкого изменения осмотических и температурных параметров среды.

Hypertonic stress and hypertonic cryohemolysis of mammalian erythrocytes enable to investigate the effect of principal cryodamage factors such as salt concentrating and cooling. When changing the osmotic and temperature medium conditions there is observed a significant damage of erythrocytes of different mammalian species.

The research was targeted to investigate the chlorpromazine effect on human erythrocyte hypertonic hemolysis (4.0 M NaCl) and hypertonic cryohemolysis (1.2 M NaCl, 37→0°C), as well as to estimate the barrier properties and structural and dynamic state of erythrocyte membrane.

Hemoglobin content was spectrophotometrically determined at 543 nm wavelength. Erythrocyte morphology was analyzed with light microscopy. Number of potassium ions was determined with atomic absorption spectrophotometry. Dynamic structure of erythrocyte membrane was studied with EPR spectroscopy with 16-doxylstearic acid (16-DS). Phosphatidyl serine redistribution was cytofluorimetrically assessed by annexin V binding with erythrocyte membrane.

Chlorpromazine (120 μM) was shown as significantly reducing the level of erythrocyte damage under both hypertonic stress and hypertonic cryohemolysis conditions, its anti-hemolytic activity was 90 and 70%, correspondingly. Under the mentioned conditions chlorpromazine by preventing hemoglobin release does not affect the potassium ion leakage out of cells. Chlorpromazine molecules, when building into erythrocyte membrane, change the cell shape by discoocyte-stomatocyte type, herewith no phosphatidyl serine exposing on an outer membrane side has been revealed.

Concentration-dependent changes in structural and functional state of erythrocyte membrane in chlorpromazine presence were demonstrated with EPR-spectroscopy using 16-DS membrane probe. The data obtained testify to the existence of transient non-bilayer phases at the moment of mass building of chlorpromazine molecules into erythrocyte membrane, that is apparently the base for antihemolytic effect of amphiphil compound under conditions of a sharp change in osmotic and temperature medium parameters.