

**Можливі механізми антигемолітичної дії хлорпромазину****Possible Mechanisms of Chlorpromazine Antihemolytic Effect**

Досліджено можливі механізми антигемолітичної дії хлорпромазину: зміна площі поверхні мембран еритроцитів та витік іонів калію з клітин. Форму клітин в популяції, яку спрямовано змінювали введенням в суспензію певної кількості стоматоцитогенної речовини – катіонного амфіфілу (хлорпромазину), контролювали за допомогою світлового мікроскопа МБІ-15У з фотореєстрацією досліджуваного об'єкта. Показано, що при збільшенні концентрації хлорпромазину в суспензії еритроцитів з гематокритом 30% від 0,125 до 1,0 мМ форма клітин змінюється у напрямку: дискоцит→стоматоцит→сферостоматоцит→сфероцит. Паралельно визначали вихід іонів калію з клітин та розподіл еритроцитів за індексом сферичності. Встановлено, що при концентраціях хлорпромазину, які викликають захист від гіпотонічного гемолізу, витік калію відсутній або незначний. Тому цей фактор не може бути причиною захисної дії амфіфілів від гіпотонічного гемолізу. Отримані криві щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності адекватно характеризують ступінь сферичності клітин у популяції, а вбудовування амфіфільних молекул у мембрани еритроцитів при концентраціях, набагато менших, ніж літичні, приводить до сплюснення частини клітин, тобто до збільшення площі їх поверхні.

**Ключові слова:** еритроцити, хлорпромазин, індекс сферичності, витік калію.

Исследованы возможные механизмы антигемолитического действия хлорпромазина: изменение площади поверхности мембран эритроцитов и утечка калия из клеток. Форму клеток в популяции, которую изменяли введением в суспензию определенного количества стоматоцитогенного вещества – катионного амфифила (хлорпромазина), контролировали при помощи светового микроскопа МБИ-15У с фоторегистрацией исследуемого объекта. Показано, что при увеличении концентрации хлорпромазина в суспензии эритроцитов с гематокритом 30% от 0,125 до 1,0 мМ форма клеток изменяется в направлении: дискоцит→стоматоцит→сферостоматоцит→сфероцит. Параллельно определяли утечку ионов калия из клеток и распределение эритроцитов по индексу сферичности. Установлено, что при концентрациях хлорпромазина, которые защищают от гипотонического гемолиза, утечка калия отсутствует или незначительна. Поэтому этот фактор не может быть причиной защитного действия амфифилов от гипотонического гемолиза. Полученные кривые плотности распределения эритроцитов по индексу сферичности адекватно характеризуют степень сферичности клеток в популяции, а встраивание амфифильных молекул в мембраны эритроцитов в концентрациях, намного меньших литических, приводит к уплощению части клеток, т. е. к увеличению площади их поверхности.

**Ключевые слова:** эритроциты, хлорпромазин, индекс сферичности, утечка калия.

Possible mechanisms of chlorpromazine antihemolytic activity, i.e. changes in erythrocyte membrane surface area and cell potassium outflux, were studied. Cell shape, controlled with MBI-15U light microscope and recorded by a photcamera, was changed by introduction of certain amount of a stomacytogenic cationic amphiphilic substance, chlorpromazine, into the suspension. It was shown, that when increasing the chlorpromazine concentration in erythrocyte suspension with hematocrit of 30% from 0.125 mM up to 1.0 mM the cell shape was changed in the following direction: discocyte→stomatocyte→spherostomatocyte→spherocyte. Potassium ions outflux and erythrocyte distribution on sphericity index were simultaneously determined. The investigations revealed the absence or minor extent of potassium leakage when use the chlorpromazine concentrations, resulting in antihemolytic protection. Therefore, this factor can not be the reason of amphiphilic protection effect against hypotonic hemolysis. Obtained curves of erythrocyte sphericity index distribution density were shown to characterise adequately the spherical rate of cells in the population, and building-in of amphiphilic molecules into erythrocyte membranes in concentrations, being lower as a lytic ones, led to the flattening of part of the cells, i.e. to the rise of their surface area.

**Key-words:** erythrocytes, chlorpromazine, spherical index, potassium leakage.

Форма та здатність еритроцитів до деформації при проходженні крізь мікрокапіляри без руйнування має важливе значення для здійснення їх фізіологічної функції. Еритроцит у нормі (нормоцит) має форму двоввігнутого диска з високим

Erythrocyte shape and capability to deformation during non-destructive passing through microcapillaries is of importance for realising their physiological function. Erythrocyte in the norm (normocyte) is of concavo-concave disc shape with high values of

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини  
НАН України, м. Харків

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

\* Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:  
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.:+38 (057)  
373-31-88, факс: +38 (057) 373-30-84, електронна пошта:  
gordienko@gala.net

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya  
str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 3188, fax: +380 57  
373 3084, e-mail: gordienko@gala.net

значенням поверхнево-об'ємного відношення ( $S/V$ ), яке забезпечує не тільки максимально швидкий газообмін, але і підвищену здатність до деформації, обумовленої наявністю "вільної" площі за даного об'єму. Площа поверхні нормоцита майже на 40% перевищує площу поверхні сфери, об'єм якої дорівнює об'єму клітини [5]. З геометричних міркувань випливає, що клітини без руйнування мембрани можуть зазнавати тим більших деформацій, чим вище співвідношення площі поверхні та об'єму. Так, деформація сфероцита, який має мінімальне значення  $S/V$ , за постійного об'єму є можливою лише при збільшенні площі його поверхні, що потребує значно більшого прикладання сил, оскільки вільна енергія деформації ізотропного розтягу мембрани на декілька порядків перевищує вільну енергію згинання або зсуву в площині поверхні мембрани [1, 5, 12].

Позитивно заряджені амфифільні молекули хлорпромазину (ХП) проникають в мембрану і зв'язуються в ній з цитоплазматичним моношаром ліпідів внаслідок великого вмісту в ньому негативно заряджених ліпідів [14, 15] і, отже, зменшують різницю площ зовнішнього і внутрішнього моношарів ( $S_{out}-S_{in}$ ). Відомо, що різниця цих площ становить для дискоцита 0,41, сфероцита – 0,42, стоматоцита – 0,39  $\mu\text{m}^2$  [5]. Згідно з розрахунками [12], для трансформування дискоцита у стоматоцит шляхом зміни різниці площ моношарів мембрани необхідно включити в цитоплазматичний моношар  $4 \times 10^4$  амфифільні молекули середніх розмірів (з площею в мембрані 0,5  $\text{nm}^2$ ). Відомо, що амфифільні речовини при низьких концентраціях захищають еритроцити від гіпотонічного, гіпертонічного або механічно викликаного лізису [7, 9, 15]. Великі концентрації як стоматоцитогенних, так і ехіноцитогенних амфифілів призводять до сферифікації та лізису еритроцитів. Механізм антигемолітичної дії амфифілів дотепер не зовсім з'ясований. Вважають, що при вбудовуванні амфифільної речовини в ліпідний бішар площа поверхні мембрани збільшується. Тому клітина набуває більшого об'єму перед лізисом [15, 18]. Показано, що при вбудовуванні амфифільних молекул у клітинну мембрану відбувається трансбішаровий перерозподіл ліпідів. Швидко проникнення в мембрану молекул ХП супроводжується перерозподілом амінофосфоліпідів із внутрішнього моношару в зовнішній і рухом холінових похідних ліпідів у протилежному напрямку [16-18]. Інші автори вважають, що можливим захисним механізмом є підвищений витік калію з клітин при вбудовуванні амфифільних молекул у мембрану [15].

В роботах [2, 3, 10, 13] нами запропоновано метод визначення щільності розподілу еритроцитів

surface-volume ratio ( $S/V$ ), providing not only the maximally rapid gas exchange, but an increased capability to deformation, stipulated by the presence of "free" area of this volume. Surface area of normocyte exceeds almost by 40% that of sphere, which volume is equal to a cell one [5]. According to the geometry, the higher is ratio of surface area and volume, the more deformation can be undergone by cells without membrane destruction. Thus, the deformation of spherocyte with minimum  $S/V$  value with the constant volume is possible only if increasing its surface area, that requires much greater force applying since a free energy of deformation of membrane isotropic extension exceeds in a certain extent a free energy of bending or shift in a membrane surface area [1, 5, 12].

Positively charged amphiphilic molecules of chlorpromazine (CP) penetrate into membrane and bind in it with lipid cytoplasmic monolayer as a result of high composition of negatively charged lipids in it [14, 15] and reduce the difference of areas of external and internal monolayers ( $S_{out}-S_{in}$ ). Difference of these areas for discocyte is known to be 0.41, 0.42 for spherocyte, 0.39  $\mu\text{m}^2$  for stomatocyte [5]. According to the calculations [12] in order to transform discocyte into stomatocyte via changing the difference of membrane monolayers areas it is necessary to include into cytoplasmic monolayer  $4 \times 10^4$  amphiphil molecules of average size (with 0.5  $\text{nm}^2$  area in membrane). Amphiphilic substances under low concentrations are known to protect erythrocytes against hypotonic, hypertonic or mechanically induced lysis [7, 9, 15]. High concentrations of both stomatocytogenic and ekinocytogenic amphiphils result in erythrocyte spherification and lysis. Mechanism of antihemolytic effect of amphiphils has not been completely elucidated yet. One considers that during amphiphilic substance building into a lipid bilayer the membrane surface area augments. Therefore cell gains higher volume prior to lysis [15, 18]. During amphiphilic molecules building into a cell membrane a transbilayer redistribution of lipids is shown to occur. Rapid penetration of CP molecules into a membrane is accompanied with redistribution of aminophospholipids from internal monolayer into external one and an opposite movement of choline lipid derivatives [16, 18]. Other authors consider an increased potassium leakage from cells during amphiphilic molecules building into membranes to be a possible protective mechanism [15].

In the papers [2, 3, 10, 13] we have proposed the method for determination of erythrocyte distribution density by sphericity index, i.e. by the characteristics, uniformly associated to an erythrocyte surface-volume ratio. Sphericity index is determined as the ratio of erythrocyte and sphere volumes with equal surface

за індексом сферичності, тобто за характеристикою, однозначно пов'язаною з поверхнево-об'ємним відношенням еритроцита. Індекс сферичності визначається як співвідношення об'єму еритроцита та об'єму сфери з рівною площею поверхні ( $V_{\text{сф}}/V_{\text{ер}}$ ). Для сфероцита цей параметр становить одиницю, а для нормоцитів (двоввігнутих дисків) набуває значень, більших за одиницю. За нашими даними [3,13] середнє значення індексу сферичності еритроцитів здорових дорослих донорів становить 1,48. Запропонований метод дозволяє визначити не тільки середню величину, але й увесь спектр цього параметра в популяції еритроцитів.

Мета роботи – вивчення можливих наслідків вбудовування катіонного амфіфілу ХП в мембрани еритроцитів: зміна поверхнево-об'ємного відношення еритроцитів та витік з них іонів калію.

### Матеріали і методи

Дослідження проводили на еритроцитах донорської крові, консервованій на розчині "Глюгіцир". Фізіологічний розчин і гіпотонічні розчини непроникаючої речовини являли собою розчини хлористого натрію.

Спрямованій зміні форми еритроцитів досягали додаванням у суспензію клітин (гематокрит 30%) катіонної амфіфільної речовини – ХП ((2-Chloro-10[3-dimethylaminopropyl]phenothiazine)hydrochloride (Sigma)) у кінцевій концентрації 0,125-1,0 мМ. Розчин ХП із початковою концентрацією 10 мМ готували на фізіологічному розчині.

Форму еритроцитів контролювали за допомогою світлового мікроскопа МБІ-15У, оснащеного фотоприставкою для реєстрації досліджуваних зразків [17].

Концентрацію іонів калію в позаклітинному середовищі вимірювали потенціометричним методом з використанням високоспецифічного калієвого електрода, виготовленого на основі пластифікованої мембрани, що містить валіноміцин. Електрод калібрували безпосередньо перед експериментом [4].

Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності визначали за методом, описаним в роботах [2, 10].

### Результати і обговорення

Була підібрана максимальна концентрація ХП, при якій більшість клітин у суспензії перетворювалась у сфероцити або сферостоматоцити з невеликим залишковим поглибленням без гемолізу. При гематокриті  $\approx 30\%$  така концентрація складала 1 мМ ( $1,8 \times 10^8$  молекул ХП на еритроцит). Мінімальна досліджувана концентрація ХП, при якій форма еритроцитів помітно не змінювалась,

area ( $V_{\text{sph}}/V_{\text{er}}$ ). For spherocyte this parameter makes 1, but for normocytes (concavo-concave disks) it gains the values, higher than 1. According to our data [3, 13] an average value of sphericity index for erythrocytes of healthy adult donors makes 1.48. The method proposed enables to determine not only an average value but the whole spectrum of this parameter in erythrocyte population.

Research was aimed to study the possible consequences of cation CP amphiphil building into erythrocyte membranes: change in a surface-volume ratio of erythrocytes and potassium ion outflux out of them.

### Materials and methods

Research was performed in donor blood erythrocytes, preserved with "Glygicir" solution. Physiological solution and non-penetrative substance hypotonic ones were those of sodium chloride.

Directed changes in erythrocyte shape were achieved by adding into cell suspension (30% hematocrit) of cation amphiphilic substance CP {(2-Chloro-10[3-dimethylaminopropyl]phenothiazine)hydrochloride (Sigma)} under 0.125-1.0 M final concentration. CP solution of 10 mM initial concentration was prepared with physiological solution.

Erythrocyte shape was controlled using MBI-15U light microscope, equipped with a photodevice for studied samples recording [17].

Potassium ion concentration in extracellular medium was measured with potentiometric method by using high-specific potassium electrode, made on the base of plasticised valinomycin-containing membrane. Electrode was directly calibrated before the experiment [4].

Density of erythrocyte distribution by sphericity index was determined using the method, described in the papers [2, 10].

### Results and discussion

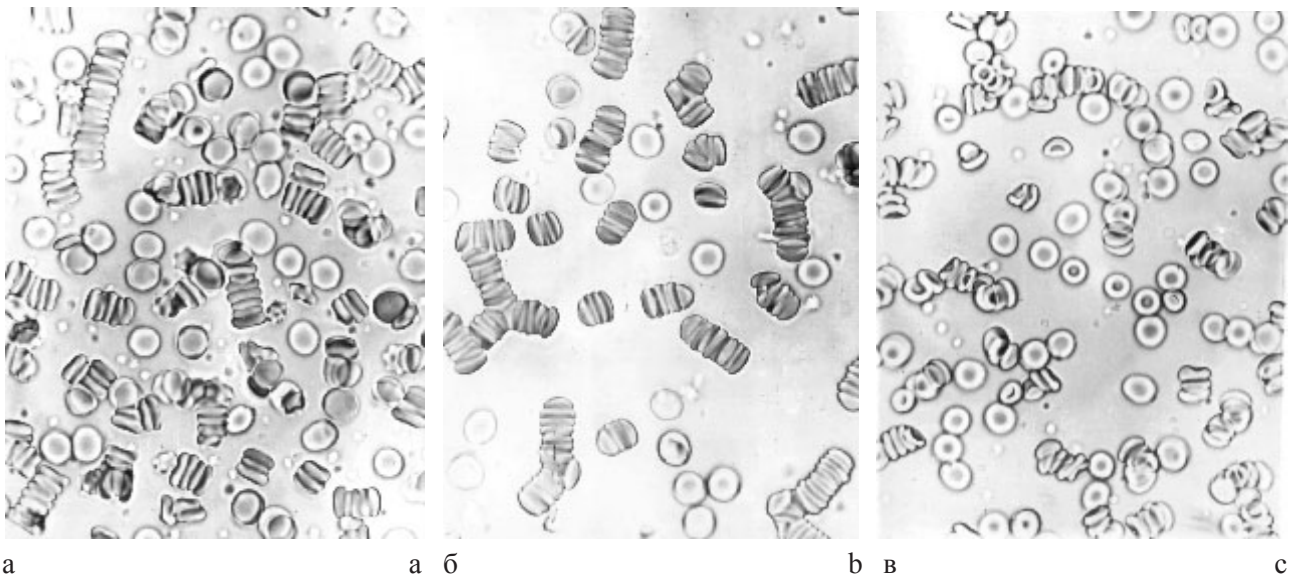
There was selected an optimal CP concentration, when the majority of cells in suspension was transformed into spherocytes or spherostomatocytes with small residual cavity without hemolysis. Under hematocrit  $\approx 30\%$  this concentration made 1 мМ ( $1.8 \times 10^8$  of CP molecule per erythrocyte). Minimum studied CP concentration where erythrocyte shape did not visibly change was 0.125 мМ, that made  $2.3 \cdot 10^7$  of CP molecule per erythrocyte. This value is close to that, calculated by Seeman [19] for different lipid-soluble and amphiphilic solutions under 50% protection against hypotonic hemolysis (maximum protection against hemolysis was observed under twice higher concentration) [15]. Intermediate erythrocyte shapes and the density of their distribution according to sphericity index were also studied under 0.25; 0.5 and 0.75 мМ CP concentrations.



0,125 мМ, що складає  $2,3 \times 10^7$  молекул ХП на еритроцит. Ця величина близька до розрахованої Seeman [19] для різних ліпідорозчинних і амфільних речовин при 50%-му захисті від гіпотонічного гемолізу (максимальний захист від гемолізу спостерігається при вдвічі більшій концентрації) [15]. Проміжні форми еритроцитів і щільність їх розподілу за індексом сферичності досліджували також при концентраціях ХП 0,25; 0,5 і 0,75 мМ.

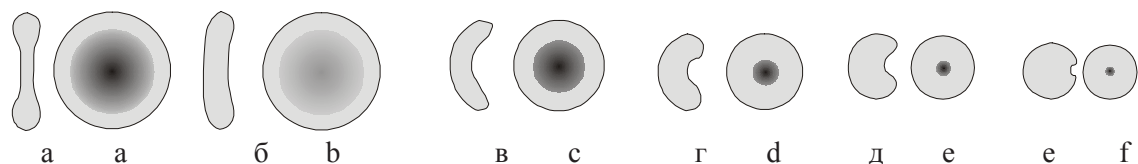
При концентрації ХП 0,125 мМ форма більшості еритроцитів практично не змінюється, однак спостерігаються поодинокі еритроцити з однією згладженою лункою (початкова стадія переходу до форми стоматоцита), а також поодинокі стоматоцити-I (рис.1, б; 2, б, в). При збільшенні концентрації ХП до 0,25 мМ кількість стоматоцитів-I збільшується і з'являються стоматоцити-II (рис.1, в; 2, в, г). Зміна складу популяції відбивається на щільності розподілу еритроцитів за індексом

Under 0.125 mM CP concentration the shape of majority of erythrocytes does not practically change, but single erythrocytes with one smoothed cavity (initial stage of transfer towards stomatocyte shape), as well as single stomatocytes-I (Fig. 1, b; Fig. 2. b; c) are observed. With augmentation of CP concentration up to 0.25 mM the amount of stomatocytes-I increases and the stomatocytes-II appear (Fig. 1. c; 2. c; d). Change in population composition affects the erythrocyte distribution density by sphericity index. Densities of erythrocyte distribution of donor 5 in the control and under low CP concentrations are given in the Fig. 3 a. Under 0.125 mM concentration a distinct shift of additional distribution peak (erythrocyte fraction with low sphericity index) towards higher sphericity indices is observed. Center of main fraction almost does not shift, but a part of erythrocytes is found to gain a higher sphericity index. This is testified by the appearance of small fraction with the maximum at 2.5 sphericity index and a certain shift of a right



**Рис. 1.** Форма еритроцитів людини в нативному стані (а) і після введення в суспензію ХП у кінцевій концентрації 0,125 мМ (б) і 0,25 мМ (в);  $\times 200$ .

**Fig. 1.** Shape of human erythrocytes in native state (a) and after CP introduction into suspension in final concentrations of 0.125 mM (b) and 0.25 mM (c);  $\times 200$ .

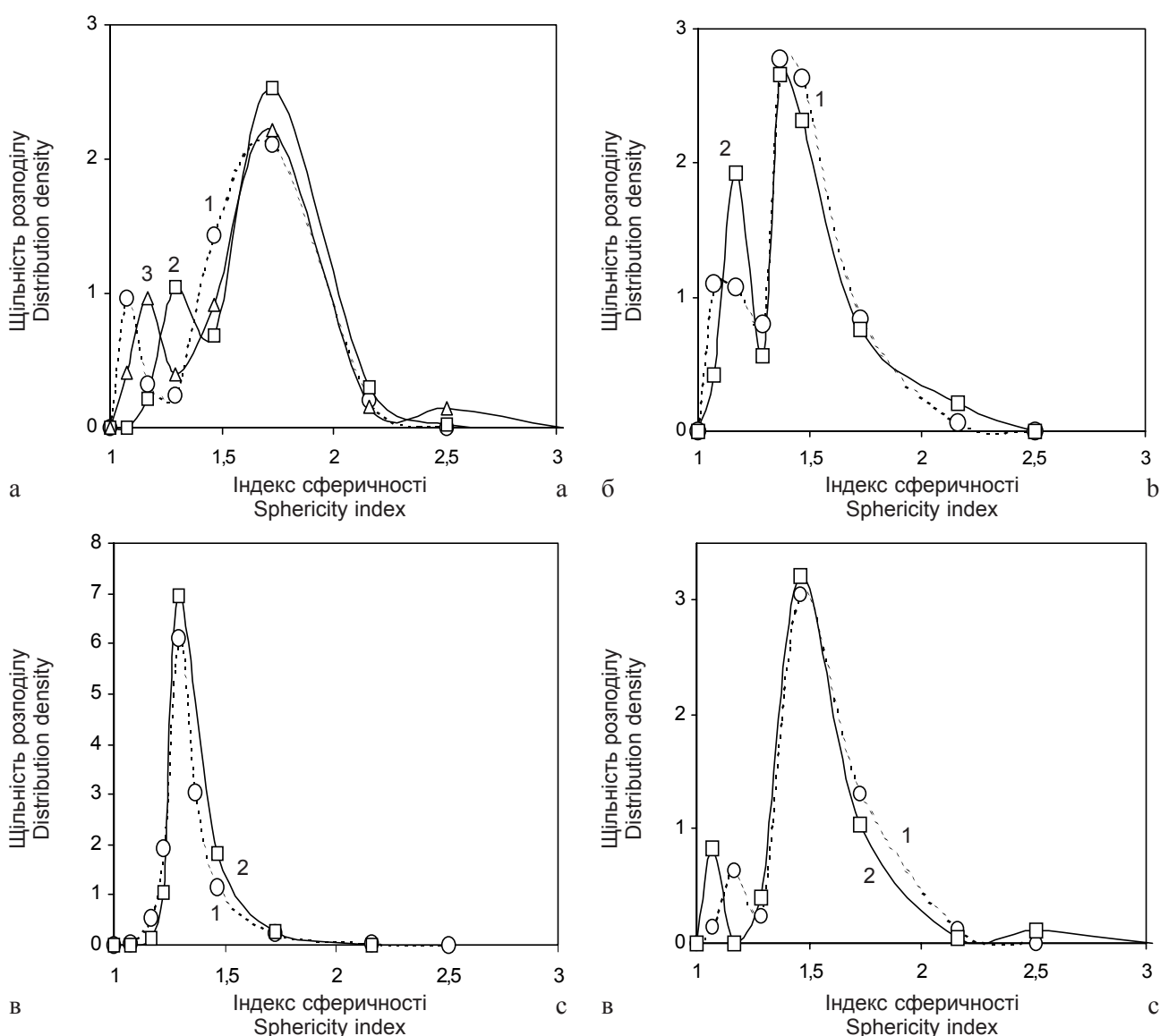


**Рис. 2.** Схематичне зображення трансформації еритроцитів: а – нормоцит діаметром 7-8 мкм; б – дискоцит зі згладженою однією лункою без зміни діаметру; в – стоматоцит-I  $\cong 6$  мкм; г – стоматоцит-II  $\cong 5$  мкм; д – стоматоцит-III  $\cong 4$  мкм; е – сферостоматоцит  $\cong 3,2-3,4$  мкм. Стоматоцити-I, II і III – куполоподібні клітини з різною глибиною та формою центральної лунки.

**Fig. 2.** Schematic view of erythrocyte transformation: a – normocyte of 7-8  $\mu\text{m}$  diameter; б – discocyte with one smoothed well with no change in diameter; в – stomatocyte-I  $\cong 6$   $\mu\text{m}$ ; г – stomatocyte-II  $\cong 5$   $\mu\text{m}$ ; д – stomatocyte-III  $\cong 4$   $\mu\text{m}$ ; е – spherostomatocyte  $\cong 3.2-3.4$   $\mu\text{m}$ . Stomatocytes-I, II and III are the dome-like structures with various depth and shape of central well.

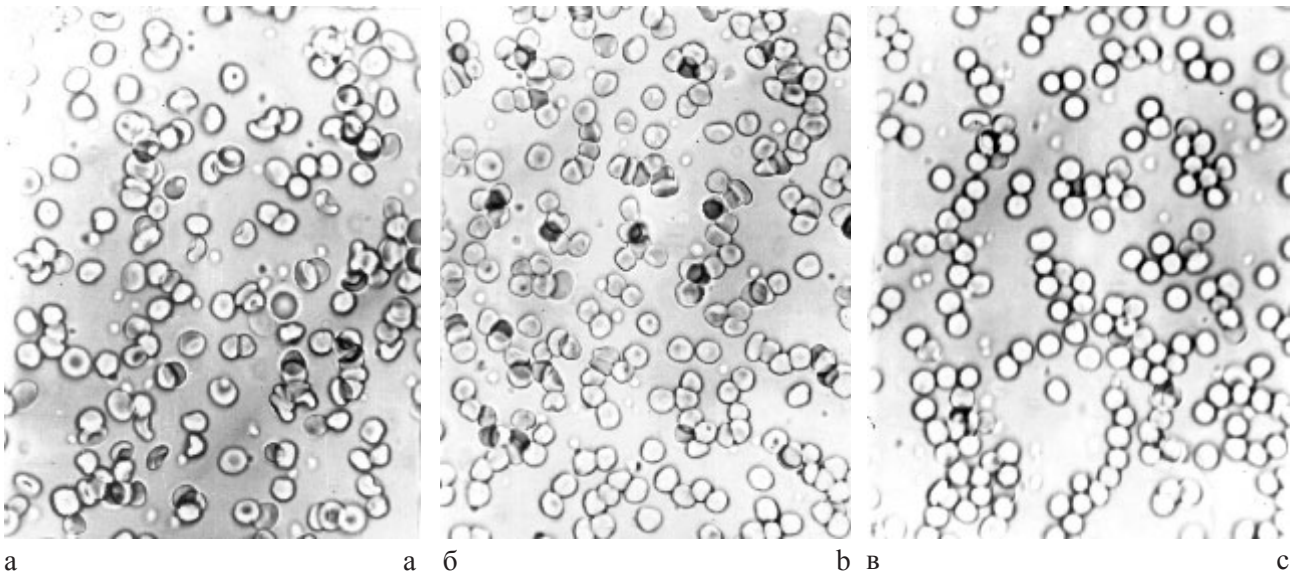
сферичності. На рис. 3, а представлені щільності розподілу еритроцитів донора 5 у контролі та при низьких концентраціях ХП. При концентрації 0,125мМ спостерігається чіткий зсув додаткового піка розподілу (фракції еритроцитів з низьким індексом сферичності) у бік більших індексів сферичності. Центр основної фракції практично не зміщується, проте видно, що частина еритроцитів основної фракції також набуває більшого індексу сферичності. Про це свідчать поява невеликої фракції з максимумом при індексі сферичності 2,5 та певний зсув правого крила основної фракції (рис. 3, а, крива 3). При збільшенні концентрації ХП до 0,25 мМ пік фракції з малими значеннями індексу сферичності зміщується ще більше у бік вищих індексів сферичності, зникає додаткова фракція з великими значеннями

wing of main fraction (Fig. 3, a, curve 3). With augmentation of CP concentration up to 0.25 mM the fraction peak with low values of sphericity index shifts even more towards higher sphericity indices, an additional fraction with high sphericity indices, completing main fraction, disappears. This is testified by a certain increase in the main distribution peak (Fig. 3, a, curve 2). Erythrocyte fraction peak with low sphericity indices in donor 4 population shifts also to the right (3, b). In case of donor 2 with normal distribution by sphericity index in a native state (Fig. 3, c) a shift of left and right curve wings towards higher sphericity indices with preserving distribution center is noted. For donor 6 the introduction of low CP doses results in a shift of fraction peak with low sphericity indices to the left, but a small fraction of flattened cells appears as well (Fig. 3, d).



**Рис. 3.** Щільність розподілу еритроцитів різних донорів(а – 5, б – 4, в – 2, г – 6) за індексом сферичності в нативному стані (1) і після введення в суспензію ХП у кінцевій концентрації 0,25 мМ (2), 0,125 мМ (3).

**Fig. 3.** Density of erythrocyte distribution of different donors (a – 5, b – 4, c – 2, d – 6) according to sphericity index in a native state (1) and after CP introduction into suspension under final concentrations of 0.25 mM (2), 0.125 mM (3).



**Рис. 4.** Форма еритроцитів при введенні в суспензію ХП у кінцевій концентрації 0,5 мМ (а); 0,75 мМ (б); 1,0 мМ (в);  $\times 200$ .

**Fig. 4.** Erythrocyte shape during CP introduction into suspension under final concentrations of 0.5 mM (a); 0.75 mM (b); 1.0 mM (c);  $\times 200$ .

індексу сферичності, яка поповнює основну фракцію. Про це свідчить деяке підвищення основного піка розподілу (рис. 3, а, крива 2). Пік фракції еритроцитів з малими індексами сферичності в популяції донора 4 також зміщується вправо (рис. 3, б). У випадку донора 2, що в нативному стані має нормальний розподіл за індексом сферичності (рис. 3, в), спостерігається зсув лівого та правого крил кривої у бік більших індексів сферичності зі збереженням центра розподілу. Для донора 6 введення малих концентрацій ХП приводить до зсуву піка фракції з малими індексами сферичності вліво, але з'являється також невелика фракція сплюснених клітин (рис. 3, г).

Отримані результати свідчать про те, що реакція клітин на введення невеликих концентрацій амфифільної речовини залежить від стану клітини і може призводити до протилежних ефектів. Проте можна стверджувати, що вбудовування амфифільних молекул у мембрани еритроцитів при концентраціях, набагато менших за літичні, викликає, як правило, сплюснення частини клітин, тобто збільшення площі поверхні. Очевидно, кількість амфифільних молекул у мембрані, яка обумовлює збільшення площі поверхні без збільшення об'єму клітини за рахунок інших нас-

The results obtained testify to the fact, that cell response to low-concentrated amphiphilic substance introduction depends on cells state and can be of counter-effect. However, we can state that the building of amphiphilic molecules into erythrocyte membranes under much lower concentrations than lytic ones generally results in flattening of a part of cells, i.e. an increase in surface area. Obviously, the amount of amphiphil molecules in membrane, stipulating the augmentation of surface area without increase in cell volume due to other consequences of such a membrane rearrangement depends on cell state. This result conforms to the known data about the dependency of the effect slight influences on initial state of biological object [4, 11].

**Таблиця 1.** Відсотковий склад популяції еритроцитів у різних діапазонах індексів сферичності в залежності від концентрації ХП у суспензії

**Table 1.** Percentage composition of erythrocyte population within different ranges of sphericity indices depending on CP concentration in suspension

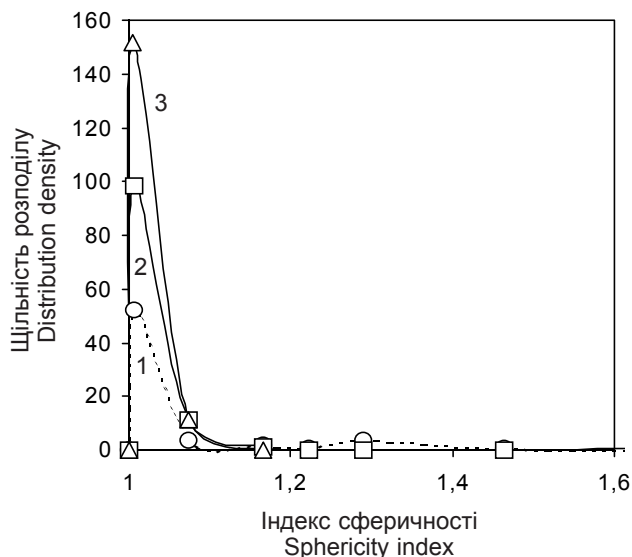
Концентрація ХП, мМ CP concentration, mM	0 (контроль) (control)	0,125	0,25	0,5	0,75	1,0
	Частка клітин, % Cell share, %					
Діапазон індексів сферичності Sphericity index range						
1,0-1,07	2	1	1	43	82	97
1,07-1,3	9	11	15	38	9,5	2
1,3-1,7	64	56	61	19	8,5	1
1,7-2,5	25	32	23	—	—	—

лідків такої перебудови мембрани, залежить від стану клітини. Цей результат узгоджується з відомими даними про залежність ефекту малих впливів від початкового стану біологічного об'єкта [4, 11].

При збільшенні концентрації ХП в середовищі до 0,5-1,0 мМ реакція клітин стає односпрямованою. Популяції складаються зі стоматоцитів-ІІ,ІІІ, сферостоматоцитів і сфероцитів (див. рис. 2, г-е; 4, а-в). При концентрації 0,5 мМ 43% клітин є сфероцитами і сферостоматоцитами та мають індекс сферичності, близький до одиниці (1,0-1,07). Відсоток таких клітин зростає при збільшенні концентрації ХП. При концентрації 0,75 мМ він складає 82%, а при максимальній сублітичній концентрації 1,0 мМ 97% клітин стають сфероцитами. Отримані криві щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності (рис. 5) і розраховані по них частки клітин у різних інтервалах індексів сферичності (табл. 1) добре узгоджуються з мікроскопічною картиною відповідних популяцій (див. рис. 4, а-в).

Одним з наслідків убудовування амфифільних сполук у мембрани еритроцитів є витік калію з клітин. Хоча деякі автори не виявили збільшення концентрації калію в позаклітинному середовищі при введенні ХП [9], дослідження [15] показало, що вбудовування амфифільних речовин у мембрани впливає на активну та пасивну складову потоків калію й інших іонів, зокрема фосфатів, навіть при малих стабілізуючих концентраціях. Автори цієї роботи вважають найбільш прийнятним поясненням такого ефекту те, що амфифільні молекули впливають на динаміку ліпідного бішару шляхом зменшення порядку або упакування вуглеводневих ланцюгів ліпідів у бішарі і таким чином збільшують пасивну проникність бішару для малих іонів. На користь такого пояснення свідчить те, що більшість амфифілів зменшують температуру переходу ліпідних бішарів [15].

Результати дослідження вмісту іонів калію в позаклітинному середовищі після додавання до суспензії еритроцитів ХП з кінцевою концентрацією 0,125-1,0 мМ подано в табл. 2. При найменшій концентрації (0,125 мМ) у трьох з п'яти досліджених донорів концентрація позаклітинного калію залишилася на рівні контролю, у двох донорів вона збільшилася до рівня виходу лише 1-2% внутрішньоклітинного ка-



**Рис. 5.** Щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності при введенні в суспензію ХП у кінцевій концентрації 0,5 мМ (1); 0,75 мМ (2); 1,0 мМ (3).

**Fig. 5.** Densities of erythrocyte distribution according to sphericity index during CP introduction into suspension under final concentrations of 0.5 mM (1); 0.75 mM (2); 1.0 mM (3).

When augmenting CP concentration in the medium up to 0.5-1.0 mM the cell response became mono-directional. Populations consist of stomatocytes-II, III, spherostomatocytes and spherocytes (see Fig. 2, d-f). Under 0.5 mM concentration 43% of cells are spherocytes and spherostomatocytes and have sphericity index, close to 1 (1.0-1.7). Percentage of these cells increases with augmenting CP concentrations. Under 0.75 mM concentration it makes 82%, but under 1.0 mM maximum sublytic concentration

**Таблиця 2.** Концентрація іонів калію в позаклітинному середовищі при введенні в суспензію еритроцитів ХП  
**Table 2.** Concentration of potassium ions in extracellular medium during CP introduction into erythrocyte suspension

Концентрація ХП, мМ CP concentration, мМ	Концентрація позаклітинного калію, мМ Extracellular potassium concentration, мМ					
	0 (контроль) (control)	0,125	0,25	0,5	0,75	1,0
Донор Donor						
3	5,78	5,78	5,78	7,8	8,14	18,7
4	5,6	5,6	7,5	10,1	12,5	20,0
4a	3,8	5,73	5,73	7,7	7,9	18,5
5	4,3	5,7	5,7	7,5	8,0	17,5
6	3,9	5,0	5,0	6,8	7,5	12,5
Середні значення Median values	4,68±0,9	5,34±0,8	5,94±0,9	7,98±1,2	8,77±0,7	17,5±2,0



лію. Зростання концентрації ХП до 0,25 мМ викликає тенденцію до збільшення витоку іонів калію, проте результат є неоднозначним. У донора 3 концентрація позаклітинного калію залишилася на контрольному рівні, у донорів 4 і 6, в яких концентрація позаклітинного калію при концентрації ХП 0,125 мМ не змінилася, спостерігається підвищення концентрації позаклітинного калію. У донорів 4 і 5 концентрація позаклітинного калію не змінилася в порівнянні зі зразками, що містять 0,125 мМ ХП.

Подальше збільшення концентрації ХП в суспензії приводить до стабільного росту концентрації позаклітинного калію в зразках крові всіх досліджених донорів. При концентрації ХП 0,5 мМ концентрація позаклітинного калію відповідає виходу 4,4% внутрішньоклітинного калію, 0,75 мМ – 5,5%, 1 мМ – 17%.

### Висновки

Таким чином, проведене дослідження показало, що криві щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності адекватно відображають склад популяції еритроцитів за поверхнево-об'ємним відношенням. Вбудовування молекул ХП в мембрани еритроцитів спочатку викликає сплюснення деякої частки клітин, тобто збільшення площі їх поверхні. Той факт, що сплюснюються більш сферифіковані клітини в популяції, вказує на можливість збільшення резистентності популяції еритроцитів в цілому до гіпотонічного гемолізу за рахунок цього ефекту.

Збільшення концентрації ХП в суспензії еритроцитів приводить до зменшення індексу сферичності та збільшення витоку калію з клітин. Проте при концентраціях ХП, які захищають від гіпотонічного гемолізу, витік калію відсутній або незначний. Тому цей фактор не може бути причиною захисної дії амфіфілів від гіпотонічного гемолізу. Істотний витік калію спостерігається тільки при концентраціях ХП, що викликають значну зміну форми клітин до сферостоматоцитів і сфероцитів, що, очевидно, пов'язано з порушенням асиметрії розподілу концентрації іонів між клітинами та оточуючим їх середовищем і виникаючим внаслідок цього збільшенням об'єму клітин під дією онкотичного тиску внутрішньоклітинного гемоглобіну, який у нормі компенсується саме за рахунок асиметричного розподілу іонів [8].

### Література

1. Гордиенко Е.А., Пушкаръ Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – Киев: Наук. думка, 1994. – 143 с.

97% of cells become spherocytes. The obtained curves of erythrocyte distribution density by sphericity index (Fig. 5) and calculated by them cell parts in various intervals of sphericity indices (Table 1) conform well with microscopic picture of corresponding populations (see Fig. 4, a-c).

One of the consequences of amphiphilic compounds building into erythrocyte membrane is potassium leakage out of cells. Although some authors did not reveal a rise of potassium concentration in extracellular medium during CP introduction [9], the research [15] demonstrated that the building of amphiphilic substances into membrane affected the active and passive components of potassium and other ions fluxes, especially phosphates, even under low stabilising concentrations. Authors of this papers believe that the most proper explanation of this effect is the fact, that amphiphilic molecules affect the lipid bilayer dynamics by reducing the order or packing of lipid hydrocarbon chains in bilayer and thereby augmenting a passive permeability of bilayer for small ions. The fact that the majority of amphiphils reduces the transition temperature of lipid bilayers testifies to this explanation favour [15].

Research results of potassium ion content in extracellular medium after adding into erythrocyte suspension of CP with 0.125-1.0 мМ final concentration are given in the Table 2. At the least concentration (0.125 мМ) in three of five studied donors the concentration of extracellular potassium kept at the control level, for two ones it increased up to the yield level of only 1-2% intracellular potassium. An increase in CP concentration up to 0.25 мМ gives rise for the tendency to potassium ion leakage augmentation, but the result is not uniform. In donor 3 the concentration of extracellular potassium was kept at the control level, in donors 4 and 6, where the concentration of extracellular potassium under 0.125 мМ CP was unchanged, an increase in one of extracellular potassium was observed. In donors 4 and 5 the concentration of extracellular potassium was unchanged if comparing with the samples, comprising 0.125 мМ CP.

Further increase in CP concentration in suspension results in a stable growth of extracellular potassium concentration in blood samples in all studied donors. Under 0.5 мМ CP concentration it corresponds to the outflux of 4.4% intracellular potassium, under 0.75 мМ it was 5.5% and 17% for 1 мМ.

### Conclusions

Thus, the performed research demonstrated that the density curves of erythrocyte distribution by sphericity index reflected adequately the composition of erythrocyte population according to the surface-volume ratio. CP molecule building into the erythro-



2. Гордієнко Є. О., Гордієнко О. І., Коваленко І. Ф. та ін. Фізико-математичний аналіз та експериментальне визначення щільності розподілу еритроцитів донорської і пуповинної крові людини за індексом сферичності // Вісн. Харків. ун-ту. Біофіз. вісник.– 2000.– №488, вип. 6.– С. 75-78.
3. Гордієнко О.І., Гордієнко Є.О., Алексєєва Л.І., Коваленко І.Ф. Оцінка стану популяції еритроцитів людини по їх розподілу за індексом сферичності // Доповіді НАНУ.– 2002.– №10.– С. 172-177.
4. Гордиенко О.И. Барьерно-транспортная функция мембран эритроцитов при комбинированном воздействии низких температур и ультразвуковых колебаний: Дис. ... канд. биол. наук.– Харьков.– 1983.– 136 с.
5. Ивэнс И., Скейлак Р. Механика и термодинамика биологических мембран.– М.: Мир, 1982.– 304 с.
6. Кулешова Л.Г. Трансформация эритроцитов человека в растворах неэлектролитов ряда Н-спиртов. 1. Морфологический аспект взаимодействия // Пробл. криобиологии.– 1999.– №1.– С. 9-13.
7. Кулешова Л.Г., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Антигемолитическая и трансформирующая активность амфифильных соединений // Пробл. криобиологии.– 2001.– №1.– С. 8-14.
8. Лайтфут Э. Явления переноса в живых системах.– М.: Мир, 1977.– 520 с.
9. Орлова Н. В. Влияние амфифильных соединений на осмотическую и температурную чувствительность эритроцитов: Дис. ... канд. биол. наук.– Харьков. 2001.– 140 с.
10. Пат. 47910А (Україна) МПК<sup>7</sup> G01N33/49. Спосіб визначення щільності ймовірності розподілу еритроцитів за індексом сферичності / Є.О. Гордієнко, О.І. Гордієнко, Ю.Є. Гордієнко, І.Ф. Коваленко, Л.І. Алексєєва. Заявл. 26.10.2001, Опубл. 15.07.2002.– Бюл. №7.
11. Стусь Л.К., Лоевский М.М., Липина О.В. и др. Функциональная неравнозначность эритроцитов донорской крови в связи с их различной кислотной резистентностью // Гематол. и трансфузиол.– 1988.– №2.– С. 49-52.
12. Черницкий Е.А., Воробей А.Б. Структура и функция эритроцитарных мембран.– Минск: Наука и техника, 1981.– 243 с.
13. Gordienko O.I., Gordienko Yu.E, Makedonska V.O. Estimation of erythrocyte population state by spherical index distribution // Bioelectrochemistry.– 2004.– Vol. 62, N2.– P. 119-122.
14. Heerklotz H., Seeling J. Titration calorimetry of surfactant membrane partitioning and membrane solubilization // Biochim. Biophys. Acta.–2000.– Vol. 1508, N1-2.– P. 69-85.
15. Isomaa B., Hagerstrand H., Paatero G., Engblom A.C. Permeability alterations and antihemolysis induced by amphiphiles in human erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1986.– Vol. 860, N3.– P. 510-524.
16. LeMaire M., Champeil P., Moller J.V. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents // Biochim. Biophys. Acta.– 2000.– Vol. 1508, N1-2.– P. 86-111.
17. Rosso J., Zachowski A., Devaux P.F. Influence of chlorpromazine on the transverse mobility of phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes // Biochim. Biophys. Acta.– 1988.– Vol. 942, N2.– P. 271-279.
18. Schneider E., Haest C.W., Plasa G., Deuticke B. Bacterial cytotoxins, amphotericin B and local anesthetics enhance transbilayer mobility of phospholipids in membrane. Consequences for phospholipid asymmetry // Biochim. Biophys. Acta.– 1986.– Vol. 855, N3.– P. 325-336.
19. Seeman P. The membrane action of anesthetics and tranquilizers // Pharmacol. Rev.– 1972.– Vol. 24, N4.– P. 583-655.

Надійшла 17.01.2006

cyte membranes causes primarily the flattening of a certain part of cell, i.e. augmentation of their surface area. This fact, that more spherical cells in population are flattened indicates the possibility for augmenting erythrocyte population resistance at the whole to hypotonic hemolysis due to this effect.

An increase in CP concentration in erythrocyte suspension results in a reduction of sphericity index and augmentation of potassium leakage out of cell. However under CP concentrations, protecting against hypotonic hemolysis the potassium leakage is absent or slight. Therefore this factor can not be the reason of protective effect of amphiphils against hypotonic hemolysis. Significant potassium leakage is observed only under CP concentrations, causing considerable change in cell shape up to spherostomatocytes and spherocytes, that is obviously associated to a disorder in asymmetry of ion concentration distribution between cells and environment, and a resulting increase in cell volume under oncotic pressure of intracellular hemoglobin, which is normally compensated due to asymmetric ion distribution [8].

## References

1. Gordienko E.A., Pushkar N.S. Physical grounds for low temperature preservation of cell suspensions.– Kiev: Naukova Dumka, 1994.– 143 p.
2. Gordienko E.A., Gordienko O.I., Kovalenko I.F. et al. Physical and mathematical analysis and experimental determination of distribution density of human donor and cord blood erythrocytes according to sphericity index // Visn. Kharkiv. Univer. Biophysical Bulletin.– 2000.– N488, Issue 6.– P. 75-78.
3. Gordienko E.A., Gordienko O.I., Alekseyeva L.I., Kovalenko I.F. Estimation of human erythrocyte population state by their distribution according to sphericity index // Dopovidi NANU.– 2002.– N10.– P. 172-177.
4. Gordienko O.I. Barrier-transport function of erythrocyte membrane under combined effect of low temperatures and ultrasound oscillation: Thesis of candidate of biological sciences.– Kharkov, 1983.– 136 p.
5. Evans I., Skalak R. Mechanics and thermodynamics of biological membranes.– Moscow: Mir, 1982.– 304 p.
6. Kuleshova L.G. Transformation of human erythrocytes in the solutions of non-electrolytes of H-alcohol series. Part 1. Morphological aspect of interaction // Problems of Cryobiology.– 1999.– N1.– P. 9-13.
7. Kuleshova L.G., Orlova N.G., Shpakova N.M. Antihemolytic and transforming activity of amphiphilic compounds // Problems of Cryobiology.– 2001.– N1.– P. 8-14.
8. Lightfoot E. Transport phenomena in living systems.– Moscow: Mir, 1997.– 520 p.
9. Orlova N.V. Effect of amphiphilic compounds on osmotic and temperature sensitivity of erythrocytes: Thesis of candidate of biological sciences.– Kharkov, 2001.– 140 p.
10. Patent 47910A (Ukraine) IPC7 G01N33/49. Way to determine the density of statistical significance of erythrocyte distribution according to sphericity index / E.A. Gordienko, O.I. Gordienko, Yu. E. Gordienko, I.F. Kovalenko, L.I. Alekseyeva. Filed 26.10.2001, Published 15.07.2002.– Bull. N7.
11. Stus L.K., Loevsky M.M., Lipina O.V. et al. Functional inequivalence of donor blood erythrocytes due to their different acid resistance // Gematol. i transfuziol.– 1988.– N2.– P. 49-52.

12. *Chernitsky E.A., Vorobey A.B.* Structure and function of erythrocyte membranes.– Minsk: Nauka i tekhnika, 1981.– 243 p.
13. *Gordienko O.I., Gordienko Yu.E., Makedonska V.O.* Estimation of erythrocyte population state by spherical index distribution // *Bioelectrochemistry.*– 2004.– Vol. 62, N2.– P. 119-122.
14. *Heerklotz H., Seeling J.* Titration calorimetry of surfactant membrane partitioning and membrane solubilization // *Biochim. Biophys. Acta.*–2000.– Vol. 1508, N1-2.– P. 69-85.
15. *Isomaa B., Hagerstrand H., Paatero G., Engblom A.C.* Permeability alterations and antihaemolysis induced by amphiphiles in human erythrocytes // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1986.– Vol. 860, N3.– P. 510-524.
16. *LeMaire M., Champeil P., Moller J.V.* Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents // *Biochim. Biophys. Acta.*– 2000.– Vol. 1508, N1-2.– P. 86-111.
17. *Rosso J., Zachowski A., Devaux P.F.* Influence of chlorpromazine on the transverse mobility of phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1988.– Vol. 942, N2.– P. 271-279.
18. *Schneider E., Haest C.W., Plasa G., Deuticke B.* Bacterial cytotoxins, amphotericin B and local anesthetics enhance transbilayer mobility of phospholipids in membrane. Consequences for phospholipid asymmetry // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1986.– Vol. 855, N3.– P. 325-336.
19. *Seeman P.* The membrane action of anesthetics and tranquilizers // *Pharmacol. Rev.*– 1972.– Vol. 24, N4.– P. 583-655.

*Accepted in 17.01.2006*

