

## Влияние барбитуратов и лидокаина на устойчивость эритроцитов к гипертоническому гемолизу

UDC 57.043:612.111:615.214.22

N.V. PROKOPENKO, V.A. BONDARENKO

## Barbiturates and Lidocaine Effect on Erythrocyte Resistance to Hypertonic Hemolysis

Изучали динамику гемолиза эритроцитов при их переносе в гипертонический раствор (4,0 моль/л NaCl), в который были внесены барбитал, фенобарбитал, лидокаин при температурах 37 и 0°C. Установлено, что барбитураты и лидокаин увеличивают сохранность клеток в условиях гипертонии при 37 и 0°C. Защитный эффект более сильно выражен у фенобарбитала. При предварительной дегидратации клеток сохранность эритроцитов повышается после дегидратации в умеренно гипертонических средах. В этом случае барбитураты и лидокаин также повышают сохранность клеток.

**Ключевые слова:** гипертонический гемолиз, эритроциты, дегидратация, барбитал, фенобарбитал, лидокаин.

Вивчали динаміку гемолізу еритроцитів при їх перенесенні в гіпертонічний розчин (4,0 моль/л NaCl), до якого було внесено барбітал, фенобарбітал, лідокаїн при температурах 37 і 0°C. Встановлено, що барбітурати й лідокаїн збільшують цілісність клітин за умов гіпертонії при 37 і 0°C. Захисний ефект більш виражений у фенобарбіталі. При попередній дегідратації клітин цілісність еритроцитів підвищується після дегідратації в помірно гіпертонічних середовищах. У цьому випадку барбітурати й лідокаїн також підвищують цілісність клітин.

**Ключові слова:** гіпертонічний гемолиз, еритроцити, дегідратація, барбітал, фенобарбітал, лідокаїн.

Dynamics of erythrocyte hemolysis under transferring them into hypertonic solution (4.0 mol/l NaCl) with introduced barbital, phenobarbital and lidocaine at 37 and 0°C has been studied. Barbiturates and lidocaine were established to increase cell integrity under hypertony at 37 and 0°C. Protective effect is more manifested in phenobarbital. Under preliminary cell dehydration the erythrocyte integrity augments after dehydration in moderately hypertonic media. In that case barbiturates and lidocaine increase cell integrity as well.

**Key-words:** hypertonic hemolysis, erythrocytes, dehydration, barbital, phenobarbital, lidocaine.

Изменение тоничности среды, а также объема и формы клеток оказывает значительное влияние на состояние мембраны и цитоскелета [1]. При этом реакция клеток может быть двух типов: согласованное изменение структурно-функциональных характеристик цитоскелета и мембраны, приводящее к адаптации клеток к условиям среды, и несогласованные в пространстве и времени изменения характеристик клеточных структур, которые приводят к гибели клеток [16].

Среди различных вариантов лизиса клеток при изменении осмотических условий среды в криобиологическом плане представляет интерес гипертонический гемолиз эритроцитов (гипертонический шок). Согласно данным [4] подобное воздействие на клетки можно рассматривать как моделирующие процессы, вызывающие повреждение клеток при их замораживании, когда одним из его факторов выступает дегидратация клеток. При температуре выше 0°C устойчивость эритроцитов к переносу в гипертоническую среду зависит от их исходного состояния, параметров гипертонической среды (осмолярности, температуры, pH) и амплитуды

Change in medium tonicity, as well as cell volume and shape significantly affects membrane and cytoskeletal state [11]. At the same time cell response can be of two types: co-ordinated change in structural and functional characteristics of cytoskeleton and membrane, resulting in cell adaptation to medium conditions, and those in cell structure characteristics, uncoordinated in space and time, resulted in cell death [16].

Erythrocyte hypertonic hemolysis (hypertonic shock) is of interest in cryobiological aspect among different variants of cell lysis under changing medium osmotic conditions. According to the data [4] the similar effect on cells may be considered as modelling processes, caused cells damage under their freezing, when cell dehydration acts as one of its factors. At temperature higher than 0°C the erythrocyte resistance to transfer into hypertonic medium depends on their initial state, hypertonic medium parameters (osmolarity, temperature, pH) and amplitude of change of medium osmolarity when transferring into new osmotic conditions. The level of hypertonic hemolysis may significantly vary under erythrocyte treatment with

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38  
(057) 373-41-35, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:  
cryo@online.kharkov.ua

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

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

изменения осмолярности среды при переходе в новые осмотические условия. Уровень гипертонического гемолиза может значительно изменяться при обработке эритроцитов химическими веществами, способными модифицировать состояние мембраны и цитоскелета, среди которых важную роль играют амфифильные соединения, к которым относятся также анестетики. Действие анестетиков на развитие гипертонического гемолиза эритроцитов изучено недостаточно.

Цель данной работы – изучение влияния барбитуратов и лидокаина на уровень гемолиза эритроцитов при их переносе в гипертоническую среду (4,0 моль/л NaCl) при 37 и 0°C из растворов с физиологической тоничностью, а также из растворов с концентрацией в интервале 0,15-1,20 моль/л NaCl.

### Материалы и методы

Эритроциты получали из мужской консервированной донорской крови II группы. Эритромассу трижды отмывали центрифугированием при 1500 г 3 мин в 10-кратном объеме физиологического раствора (рН 7,4). Клетки хранили в виде плотного осадка и использовали в течение 2-х часов.

Перед гипертоническим воздействием клетки разводили в соотношении 1:1 раствором NaCl (0,15-1,1 моль/л) либо раствором сахарозы (0,3-1,1 моль/л). Предынкубацию проводили 10 мин при заданной температуре (0 или 37°C).

Для гипертонического воздействия эритроциты переносили в среду 4,0 моль/л NaCl (1 мл) в соотношении 1:10 при температуре предынкубации. Инкубацию проводили 10 мин. Предварительно в гипертоническую среду вносили фенобарбитал, барбитал и лидокаин в концентрациях 0,125-12,5 ммоль/л. Далее целые клетки осаждали центрифугированием при 1500 г в течение 3-х минут. Количество гемоглобина в супернатанте определяли спектрофотометрически на спектрофотометре СФ-4А с проточной кюветой при длине волны 543 нм. Выход гемоглобина из клеток рассчитывали в процентах по отношению к гемолизу эритроцитов (его принимали за 100%) после переноса предынкубированных эритроцитов в дистиллированную воду.

Данные статистически обрабатывали методом Стьюдента-Фишера.

### Результаты и обсуждение

Уровень лизиса эритроцитов при гипертоническом шоке изменяется в зависимости от их исходного состояния, параметров среды инкубации, а также при включении в мембрану эритроцитов химических веществ, модифицирующих состояние мембраны и цитоскелета [3].

chemical substances, capable to modify membrane and cytoskeletal state, among which the amphiphil compounds and referred to them anaesthetics are of importance. Anaesthetics effect on developing erythrocyte hypertonic hemolysis has been poorly studied.

This research was targeted to study barbiturates and lidocaine effect on erythrocyte hemolysis level when transferring them into hypertonic medium (4.0 mol/l NaCl) at 37 and 0°C out of the solutions with physiological tonicity, as well as from those with concentration within 0.15-1.20 mol/l NaCl range.

### Material and methods

Erythrocytes were procured from preserved male donor blood of II group. Erythromass was thrice washed out by centrifugation at 1500 g for 3 min with 3-fold volume of physiological solution (pH 7.4). Cells were stored as a dense sediment and used within 2 hours.

Prior to hypertonic effect the cells were diluted in 1:1 ratio with NaCl solution (0.15-1.1 mol/l) or with sucrose one (0.3-1.1 mol/l). Preliminary incubation was performed within 10 min at a fixed temperature (0 or 37°C).

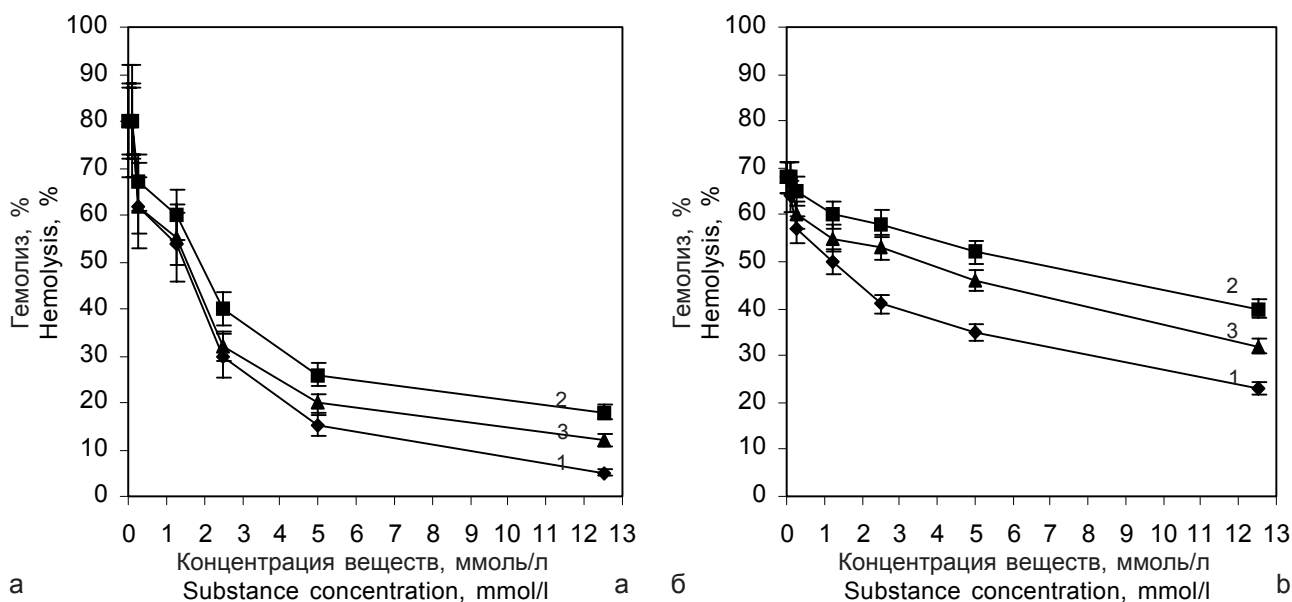
For hypertonic effect erythrocytes were transferred into 4.0 mol/l NaCl (1ml) medium in 1:1 ratio under preliminary incubation temperature. Incubation was done within 10 min. Phenobarbital, barbital and lidocaine in 0.125-12.5 mmol/l concentrations were preliminarily introduced into hypertonic medium. Then the integral cells were precipitated with centrifugation at 1500 g for 3 min. Hemoglobin amount in a supernatant was spectrophotometrically determined using CP-4A flow-cell spectrophotometer at 543 nm wavelength. Hemoglobin release out of cells was calculated in percentage in respect of erythrocyte hemolysis (as suned as 100%) after transferring preliminarily incubated erythrocytes into distilled water.

Data were statistically processed with Student-Fisher method.

### Results and discussion

Level of erythrocytes lysis under hypertonic shock changes depending on their initial level, parameters of incubation medium, as well as under inclusion of chemical substances, modifying membrane and cytoskeletal state into erythrocyte membranes [3].

Data on dependency of erythrocytes hemolysis level under their transfer into 4.0 from 0.15mol/l NaCl at 0 and 37°C, on phenobarbital, barbital and lidocaine concentration are given in Fig. 1. Including anaesthetics into hypertonic medium reduces cell hemolysis extent with increasing their concentration. At the same time temperature significantly affects the anaesthetics antihemolytic activity. Under the same concentration the anaesthetics reduce hemolysis level more efficiently



**Рис. 1.** Уровень гипертонического гемолиза эритроцитов при переносе из 0,15 в 4,0 моль/л NaCl при температуре 37 (а) и 0°C (б) при различных концентрациях фенобарбитала (1); барбитала (2); лидокаина (3) в среде 4,0 моль/л NaCl.

**Fig. 1.** Level of erythrocyte hypertonic hemolysis during removal of 0.15 into 4.0 mol/l NaCl at 37 (a) and 0°C (b) under different concentrations of phenobarbital (1); barbital (2); lidocaine (3) in 4.0 mol/l NaCl medium.

На рис. 1 представлены данные о зависимости уровня гемолиза эритроцитов при их переносе в 4,0 из 0,15 моль/л NaCl при 0 и 37°C от концентрации фенобарбитала, барбитала и лидокаина. Включение в гипертоническую среду анестетиков уменьшает степень гемолиза клеток по мере увеличения их концентрации. При этом выраженное влияние на антигемолитическое действие анестетиков оказывает температура. При одинаковых концентрациях анестетики более эффективно снижают уровень гемолиза при 37°C (рис. 1, а) и менее при 0°C (рис. 1, б). Как при 37, так и 0°C наибольшее ингибирующее действие на развитие гипертонического гемолиза оказывает фенобарбитал (рис. 1, кривая 1) и наименьшее – барбитал (рис. 1, кривая 2).

Наблюдаемые различия действия анестетиков на гипертонический гемолиз можно объяснить с учетом таких параметров, как коэффициент распределения вещества в мембране, молекулярный объем вещества и объем, занимаемый веществом при его максимальном включении в мембрану. Согласно [15] наиболее высокие значения указанных параметров характерны для фенобарбитала, более низкие – для барбитала. Это означает, что фенобарбитал при его включении в мембрану значительно увеличивает латеральное давление в ней, снижает вероятность формирования гемолитической поры [9]. Более высокий уровень гемолиза при 0°C можно объяснить преимущественным включением анестетиков в участки мембраны в жидкокристаллическом состоянии, а не в состоянии геля, что способно увеличить их локальную концент-

at 37°C (Fig. 1, a) and less at 0°C (Fig. 1, b). Both at 37 and 0°C the highest inhibiting effect on hypertonic hemolysis development is caused by phenobarbital (Fig. 1, curve 1) and the lowest one is done by barbital (Fig. 1, curve 2).

The observed differences of anaesthetics effect on hypertonic hemolysis can be explained taking into account such parameters as the distribution coefficient of substances in membrane, molecular volume of substance and that, taken by substance at its maximum inclusion into membrane. According to the paper [15] the highest values of mentioned parameters are typical for phenobarbital and with lower ones for barbital. This means that phenobarbital being included into membrane significantly augments a lateral pressure in it and reduces probability for hemolytic pore formation [9]. Higher hemolysis level at 0°C may be explained by a preferential inclusion of anaesthetics into membrane sites in a liquid-crystal state, but not in gel, that can augment their local concentration in these sites up to hemolytic level [9].

The forces, increasing pore sizes up to the value, enabling a hemoglobin release are predominated under its formation at 37°C with simultaneous contribution of high lipid fluidity to pore closing at the same temperature [9]. For forming the pore, comparable with hemoglobin molecule at 0°C a high energy is required, but an even formed pore is more stable. These differences determine uneven character of effect barbiturates and lidocaine on erythrocyte hypertonic shock level at 37 and 0°C.

Erythrocyte dehydration in the media with 0.4-0.5 mol/l NaCl concentration contributes to cell integrity increase

рацию в этих участках до гемолитического уровня [9].

При температуре 37°C в процессе формирования поры преобладают силы, увеличивающие ее размеры до величины, позволяющей выход гемоглобина, и одновременно при этой же температуре высокая текучесть липидов способствует замыканию поры [9]. При 0°C для формирования поры, соразмеримой с молекулой гемоглобина, требуется большая энергия, однако уже сформированная пора более стабильна. Эти различия определяют неодинаковый характер влияния барбитуратов и лидокаина на уровень гипертонического шока эритроцитов при 37 и 0°C.

Дегидратация эритроцитов в средах с концентрацией 0,4-0,5 моль/л NaCl способствует повышению сохранности клеток при их последующем переносе в 4,0 моль/л NaCl [5, 6]. На рис. 2 представлены данные об уровне гемолиза эритроцитов при переносе клеток в 4,0 моль/л NaCl после дегидратации в растворах NaCl (0,15-1,2 моль/л) и сахарозы (0,3-1,1 моль/л) при температуре 37°C. Видно, что уровень гипертонического гемолиза эритроцитов зависит от состава и осмолярности исходной среды, в которой происходила дегидратация клеток. При инкубации эритроцитов в среде, содержащей NaCl, минимальный гемолиз при переносе клеток в 4,0 моль/л NaCl отмечается после предварительной дегидратации в 0,4-0,5 моль/л NaCl (рис. 2, а). При увеличении или уменьшении концентрации NaCl в среде предынкубации растёт

during following transfer into 4.0 mol/l NaCl [5, 6]. Data on erythrocyte hemolysis level under cell transfer into 4.0 mol/l NaCl after dehydration in NaCl (0.15-1.2 mol/l) and sucrose (0.3-1.1 mol/l) solutions at 37°C are summarised in Fig.2. Level of erythrocyte hypertonic hemolysis is seen to be dependent on composition and osmolarity of initial medium, where cell dehydration occurred. Under erythrocyte incubation in NaCl-containing medium the minimum hemolysis during cell transfer into 4.0 mol/l NaCl is noted after preliminary dehydration in 0.4-0.5 mol/l NaCl (Fig. 2, a). With NaCl concentration increase or reduction in preliminary incubation medium the hemolysis level augments as well (Fig. 2, a, curve 1). Barbiturates and lidocaine reduce hypertonic hemolysis level after erythrocyte dehydration in NaCl solutions in all used concentration series. At the same time it should be firstly noted that the dependency curves of hypertonic hemolysis level on NaCl initial concentration (Fig. 2, a curves 2-4) are similar, that testifies to a leading role of efficient distribution of substances into membrane in the mechanism of anaesthetics protective effect, but slight one in chemical properties of substances themselves, that may be manifested in differences between dependency curves of hemolysis level on tonicity of preliminary incubation medium. Secondly, anaesthetics action is more manifested within the range of moderate (0.15-0.45 mol/l NaCl) and less within higher hypertony (0.45-1.2 mol/l NaCl) (Fig. 2, a). This means that the anaesthetics protect more efficiently the erythrocytes, not achieving minimum

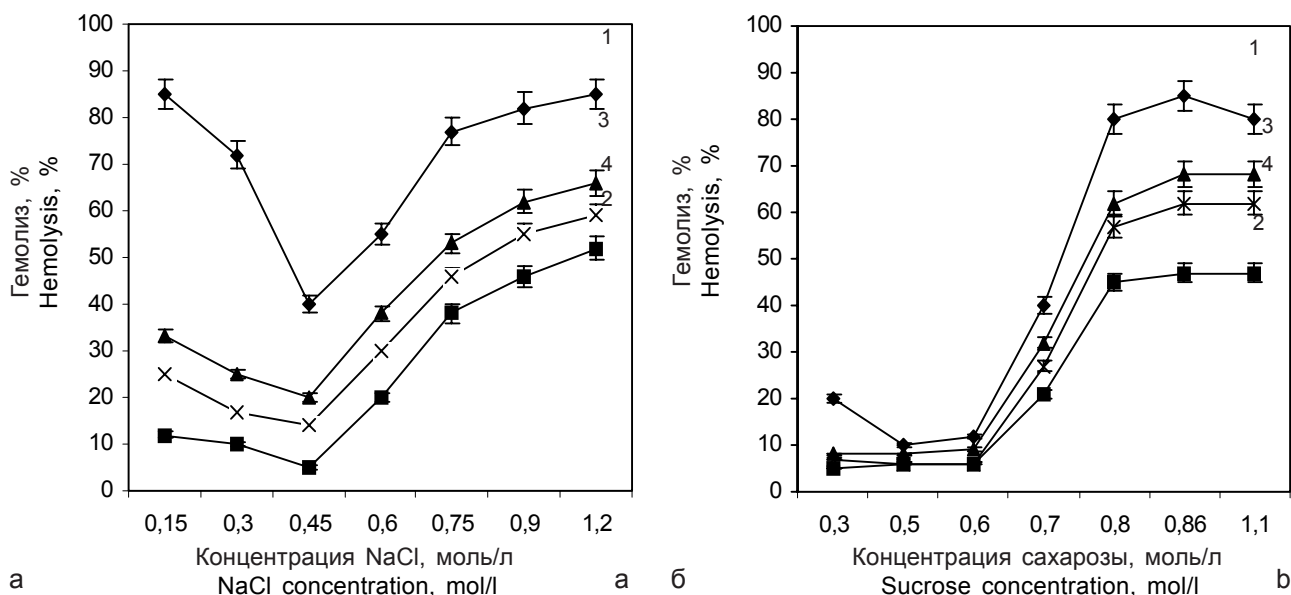


Рис. 2. Уровень гипертонического гемолиза при переносе в 4,0 моль/л NaCl эритроцитов, предынкубированных в растворах NaCl (а) и сахарозы (б) (температура 37°C), при эффективной концентрации вещества 5 ммоль/л: 1 – контроль; 2 – фенобарбитал; 3 – барбитал; 4 – лидокаин.

Fig. 2. Hypertonic hemolysis level of erythrocytes, preliminarily incubated in NaCl (a) and sucrose (b) solutions (at 37°C), when transferring into 4.0 mol/l NaCl, under 5 mmol/l substance efficient concentration: 1 – control; 2 – phenobarbital; 3 – barbital; 4 – lidocaine.



уровень гемолиза (рис. 2, а, кривая 1). Барбитураты и лидокаин снижают уровень гипертонического гемолиза после дегидратации эритроцитов в растворах NaCl во всем используемом ряду концентраций. При этом следует отметить, во-первых, кривые зависимости уровня гипертонического гемолиза от исходной концентрации NaCl (рис. 2, а, кривые 2-4) носят сходный характер, что свидетельствует о ведущей роли в механизме защитного действия анестетиков эффективности распределения веществ в мембрану и в меньшей мере химических свойств самих веществ, что способно проявиться в различиях кривых зависимости уровня гемолиза от тоничности среды предынкубации. Во-вторых, действие анестетиков больше проявляется в области умеренной (0,15-0,45 моль/л NaCl) и меньше – в области более высокой гипертонии (0,45-1,2 моль/л NaCl) (рис. 2, а). Это означает, что анестетики эффективнее защищают эритроциты, не достигшие минимального объема, и менее эффективно – клетки, достигшие минимального объема на этапе предынкубации в солевой среде (0,45-1,2 моль/л NaCl). Максимальная сохранность наблюдается при использовании фенобарбитала для эритроцитов, предынкубированных клеток в средах, содержащих 0,15-0,45 моль/л NaCl. При повышении концентрации NaCl в исходной среде защитное действие фенобарбитала сохраняется, однако уровень гемолиза при переносе клеток в 4,0 моль/л NaCl возрастает по мере увеличения концентрации NaCl на этапе предынкубации (рис. 2, а, кривая 2). Барбитал и лидокаин также оказывают защитное действие на эритроциты, но в этом случае уровень гемолиза выше, чем при использовании фенобарбитала (рис. 2, а, кривые 3, 4).

Полученные данные позволяют высказать предположение, что защитное действие анестетиков, наблюдаемое при развитии гипертонического гемолиза эритроцитов, неспецифическое и отражает их высокую способность включаться в мембрану. В то же время анестетики могут оказывать специфическое и избирательное действие на ферменты и транспортные системы клеток [15]. В частности, барбитал и фенобарбитал способны ингибировать Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-АТФазу, а лидокаин является активатором Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-АТФазы [15]. Так как графики зависимости уровня гипертонического гемолиза от концентрации NaCl в среде предынкубации (рис. 2, а) сходны для барбитуратов и лидокаина, это позволяет говорить об общем мембранном механизме их действия, а наблюдаемые различия связаны с количественными параметрами включения веществ в мембрану.

После дегидратации эритроцитов в сахарозной среде минимальный уровень гемолиза наблюдается при концентрации сахарозы в исходной среде

volume and in less extend the cells, getting maximum volume at the stage of preliminary incubation in salt medium (0.45-1.2 mol/l NaCl). Maximum integrity is observed when using phenobarbital for erythrocytes, preliminarily incubated cells in 0.15-0.45 NaCl mol/l containing media. Phenobarbital protective action is kept when increasing NaCl concentration in initial medium, but under cell transfer into 4.0 mol/l NaCl the hemolysis level augments with increasing NaCl concentration at preliminary incubation stage (Fig. 2, a, curve 2). Barbitol and lidocaine protect erythrocytes as well, but in this case hemolysis level is higher, than when using phenobarbital (Fig. 2, a, curves 3, 4).

The data obtained enable to suggest that a protective effect of anaesthetics, observed under erythrocyte hypertonic hemolysis development is non-specific and reflects their high ability to be included into membrane. At the same time the anaesthetics may cause a specific and selective effect on enzymes and cell transport systems [15]. In particular, barbitol and phenobarbital are able to inhibit Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase but lidocaine is Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activator [15]. As the graphs of hypertonic hemolysis level dependency on NaCl concentration in preliminary incubation medium of (Fig. 2, a) are similar for barbiturates and lidocaine, this enables suggesting about the common membrane mechanism of their effect and the observed differences are related to the inclusion into membrane of qualitative parameters of substances.

After erythrocyte dehydration in sucrose medium the minimum level of hemolysis is observed under 0.3-0.6 mol/ sucrose concentration in initial medium. This concerns both anaesthetics-treated and normal cells (Fig. 2, b). With further sucrose concentration increase in the initial medium the erythrocyte hemolysis level under their transfer into 4.0 mol/l NaCl augments and is kept at the level of 80-85% for 0.8-1.1 mol/l sucrose-contained media (Fig. 2, b, curve 1). Introduction into hypertonic medium of barbiturates and lidocaine increases erythrocyte integrity. The same as for NaCl-contained medium, the cell integrity is mostly contributed in sucrose one by phenobarbital (Fig. 2, b, curve 2) and less by barbitol and lidocaine (Fig. 2, b, curves 3 and 4, correspondingly).

In sucrose medium a low sensitivity to transfer into 4.0 mol/l NaCl is typical for cells, not achieving minimum volume both in the norm and under anaesthetic treatment. In sucrose medium the area of maximum cell resistance (0.45 mol/l NaCl in saline solution) is extended and comprises 0.3-0.6 mol/l sucrose range. This extension can be associated to K<sup>+</sup> and water ion release out of erythrocytes in non-electrolyte medium, that results in erythrocyte volume decrease and consequently volume shift amplitude under following transfer into 4.0 mol/l NaCl: the factor, determining cell damage extent [4, 5].

0,3-0,6 моль/л. Это относится как к обработанным анестетиками, так и к нормальным клеткам (рис. 2, б). При дальнейшем повышении концентрации сахарозы в исходной среде уровень гемолиза эритроцитов при их переносе в 4,0 моль/л NaCl возрастает и сохраняется на уровне 80-85% для сред, содержащих 0,8-1,1 моль/л сахарозы (рис. 2, б, кривая 1). Внесение в гипертоническую среду барбитуратов и лидокаина повышает сохранность эритроцитов. Как и в среде, содержащей NaCl, в сахарозной среде сохранности клеток в наибольшей степени способствует фенобарбитал (рис. 2, б, кривая 2) и в меньшей степени – барбитал и лидокаин (рис. 2, б, кривые 3 и 4 соответственно).

В сахарозной среде низкая чувствительность к переносу в 4,0 моль/л NaCl характерна для клеток, не достигших минимального объема как в норме, так и при обработке анестетиками. В сахарозной среде область максимальной устойчивости клеток (0,45 моль/л NaCl в солевой среде) расширяется и охватывает интервал 0,3-0,6 моль/л сахарозы. Такое расширение можно связать с выходом ионов  $K^+$  и воды из эритроцитов в неэлектролитной среде, что приводит к уменьшению объема эритроцитов и соответственно амплитуды объемного сдвига при последующем переносе в 4,0 моль/л NaCl – фактора, определяющего степень повреждения клеток [4, 5].

На рис. 3 представлены данные, отражающие уровень гемолиза эритроцитов при переносе в 4,0 моль/л NaCl после дегидратации в растворах NaCl (рис. 3, а) и сахарозы (рис. 3, б) при 0°C. Снижение температуры практически не влияет на чувствительность эритроцитов к переносу в 4,0 моль/л после предынкубации в сахарозной среде (0,3-1,1 моль/л) (рис. 3, б). В то же время после предынкубации в солевой среде отмечается снижение чувствительности контрольных клеток во всем исследуемом интервале концентраций NaCl (0,15-1,2 моль/л). Одновременно наблюдаются повышение чувствительности обработанных анестетиками клеток после предынкубации в присутствии 0,15-0,3 моль/л NaCl и снижение ее в гипертонических средах (0,3-1,2 моль/л NaCl) (рис. 3, а). Как в солевой, так и в сахарозной среде более высокую эффективность проявляет фенобарбитал (рис. 3, кривая 2) и более низкую – барбитал (рис. 3, кривая 3). Особенности изменения зависимости уровня гемолиза при переносе в 4,0 моль/л NaCl от концентрации NaCl в среде предынкубации при 0°C (рис. 3, а) можно объяснить, если принять, что низкая температура ограничивает процессы инициации мембранных дефектов на этапе предынкубации в гипертонической среде (0,6-1,2 моль/л NaCl). Это повышает устойчивость клеток к последующему переносу в 4,0 моль/л NaCl. В то же время низкая температура

Fig. 3 shows the data, reflecting erythrocyte hemolysis level under transfer into 4.0 mol/l NaCl after dehydration in NaCl solutions (Fig. 3, a) and sucrose (Fig. 3, b) at 0°C. Temperature decrease does not practically affect erythrocyte sensitivity to transfer into 4.0 mol/l after preliminary incubation in sucrose medium (0.3-1.1 mol/l) (Fig. 3, b). At the same time after preliminary incubation in saline medium a decrease in sensitivity of control cells in all studied NaCl concentration range (0.15-1.2 mol/l) is noted. Simultaneously, the augmentation of sensitivity in anaesthetics-treated cells after preliminary incubation at 0.15-0.3 mol/l NaCl presence and its decrease in hypertonic media (0.3-1.2 mol/l NaCl) (Fig. 3, a) are observed. Both in saline and sucrose media phenobarbital manifests higher efficiency (Fig. 3, curve 2) and barbital does lower ones (Fig. 3, curve 3). Peculiarities of change in hemolysis level dependency on NaCl concentration in preliminary incubation medium at 0°C under transfer into 4.0 mol/l NaCl (Fig. 3, a) may be explained if admitting the fact that low temperature limits the processes of membrane defect initiation at preliminary incubation stage in hypertonic medium (0.6-1.2 mol/l NaCl), that increases cell resistance to following transfer into 4.0 ml/l NaCl. At the same time low temperature impairs the conformity of changes in membrane and cytoskeletal structure directly within the volume shift phase under cell transfer from 0.15-0.3 into 4.0 mol/l NaCl, that may result in enhancing of cell damages.

When transferring erythrocytes into hypertonic medium the defects in lipid membrane bilayer occur and cytoskeletal structure is damaged [16]. Certain composition domains are formed when changing medium temperature [7], that increases membrane instability in the whole. At the same time within the defect formation the osmolarity of incubation medium affects the hemolytic pore formation, but medium temperature does the rate of its size increase and membrane repairment [4].

Anaesthetics may affect both initiation and formation processes and those of membrane pore closing. Maximum erythrocyte resistance to a change in medium osmolarity is manifested at 0°C, when cell state stabilisation occurs under their partial dehydration in the media, containing 0.45-0.6 mol/l NaCl and 0.3-0.6 mol/l sucrose (Fig. 3). At the same time barbiturates and lidocaine contribute to formation of erythrocyte stable state.

Change in cell volume due to a loss of intracellular water results in concentrating cytoplasmic content [1], ion redistribution between cell and extracellular medium, change in pH cytoplasm [4] etc. Concentration of cytoplasmic proteins significantly changes their functions, that may be explained by the theory of macromolecular crowding [8, 13]. Change in  $K^+/Cl^-$

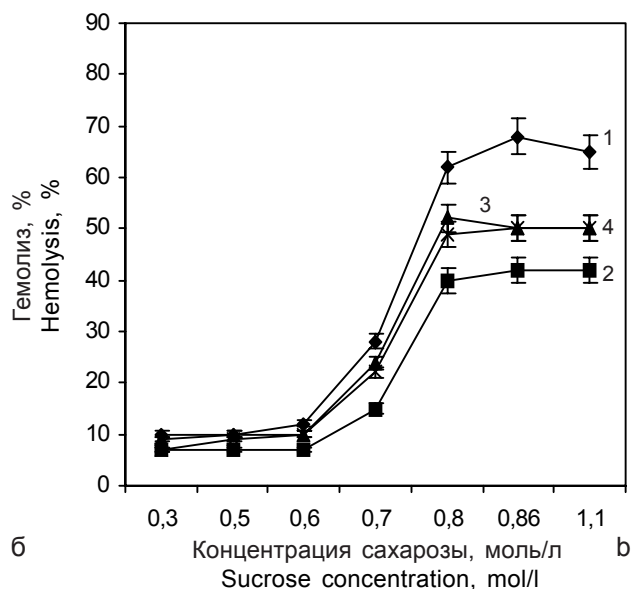
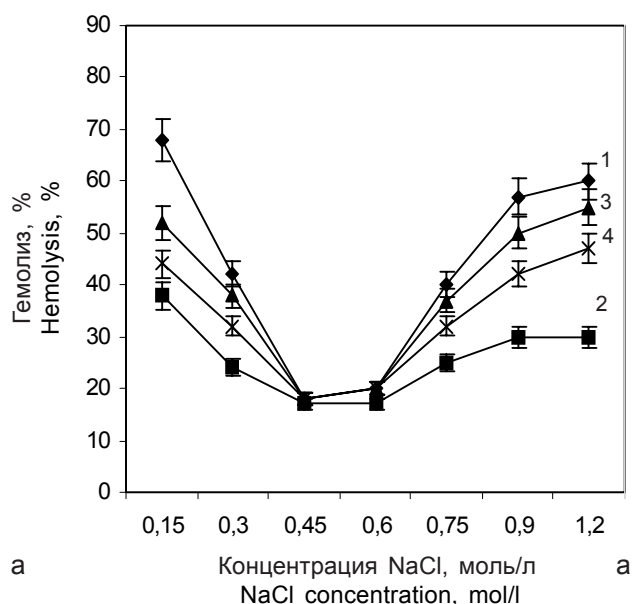
нарушает согласованность процессов изменений структуры мембраны и цитоскелета непосредственно в фазе объемного сдвига при переносе клеток из 0,15-0,3 в 4,0 моль/л NaCl, что способно привести к росту повреждения клеток.

При переносе эритроцитов в гипертоническую среду появляются дефекты в липидном бислое мембраны и нарушается структура цитоскелета [16]. При изменении температуры среды формируются отдельные композиционные домены [7], что повышает нестабильность мембраны в целом. При этом в процессе формирования дефектов осмолярность среды инкубации влияет на образование гемолитической поры, а температура среды – на скорость увеличения ее размера и репарации мембраны [4].

Анестетики могут оказывать влияние на процессы как инициации и формирования, так и на процессы замыкания мембранной поры. Максимальная устойчивость эритроцитов к изменению осмолярности среды проявляется при 0°C, когда происходит стабилизация состояния клеток при их частичной дегидратации в средах, содержащих 0,45-0,6 моль/л NaCl и 0,3-0,6 моль/л сахарозы (рис. 3). При этом барбитураты и лидокаин способствуют формированию стабильного состояния эритроцитов.

Изменения объема клеток вследствие потери внутриклеточной воды приводят к концентрированию цитоплазматического содержимого [1], перераспределению ионов между клеткой и внеклеточной средой, изменению pH цитоплазмы [4] и т.д. Концентрирование цитоплазматических белков значительно изменяет их функции, что может быть объяснено с помощью теории макромолекулярного кроудинга [8, 13]. При обезвоживании в эритроцитах происходит также изменение активности  $K^+/Cl^-$  симпорта и  $Na^+/H^+$  обмена. В то же время односторонний транспорт ионов  $K^+$  и  $Cl^-$ ,  $Na^+-K^+-2Cl^-$  – котранспорт и  $Na^+/H^+$  обмен выступают как факторы регуляции клеточного объема при изменении осмотических параметров среды. Постепенное защелачивание цитоплазмы приводит к активации  $Cl^-/HCO_3^-$ -обмена [8].

В гипертонических условиях изменяется взаимодействие компонентов мембраны и цитоскелета [14]. В частности, концентрирование цитоплазматического содержимого нарушает взаимодействие между белком полосы 4.1 и мембраны [12]. Олигомеризация спектрина в условиях дегидратации повышает устойчивость цитоскелета к механическому сдвигу, при этом в условиях сжатия клеток цитоскелет может открепляться от мембраны [10]. Таким образом могут формироваться зоны потенциальной нестабильности. Взаимодействие между мембраной и цитоскелетом также зависит от характера распределения липидов в



**Рис. 3.** Уровень гипертонического гемолиза эритроцитов при переносе в 4,0 моль/л NaCl, предынкубированных в растворах NaCl (а) и сахарозы (б) (температура 0°C), при эффективной концентрации вещества 5 ммоль/л: 1 – контроль; 2 – фенобарбитал; 3 – барбитал; 4 – лидокаин.

**Fig. 3.** Hypertonic hemolysis level of erythrocytes, preliminarily incubated in NaCl (a) and sucrose (b) solutions (at 0°C), when transferring into 4.0 mol/l NaCl, under 5 mmol/l efficient substance concentration: 1 – control; 2 – phenobarbital; 3 – barbital; 4 – lidocaine.

symport and  $Na^+/H^+$  exchange occurs in erythrocytes under dehydration as well. At the same time a monodirectional transport of  $K^+$  and  $Cl^-$  ions,  $Na^+-K^+-2Cl^-$  co-transport and  $Na^+/H^+$  exchange act as regulative factors of cell volume under change in medium osmotic parameters. A gradual cytoplasm alkalisation results in  $Cl^-/HCO_3^-$ -exchange activation [8].

Interactions between membrane and cytoskeletal components change under hypertony [14]. In particular,

плоскости мембраны, плотности упаковки и фазового состояния липидов. Дегидратация и изменение температуры среды способны привести к изменениям во взаимодействии белков и липидов и возрастанию нестабильности цитоскелет-мембранного комплекса [11].

Взаимодействуя с мембраной эритроцитов, барбитураты и лидокаин оказывают защитное действие [15]. Встраиваясь в липидную фазу, барбитураты и лидокаин повышают текучесть мембраны и увеличивают внутримембранное давление, что способствует более быстрой репарации мембранных дефектов и препятствует увеличению трансмембранных пор до критического размера [15]. Кроме того, барбитураты и лидокаин оказывают существенное влияние на транспорт ионов через мембрану [2] и на объемные изменения клеток.

Если характер влияния анестетиков на гипотонический гемолиз изучен достаточно, то систематические данные о влиянии этого класса веществ на гипертонический гемолиз практически отсутствуют. Соответственно остается неясным механизм защитного действия анестетиков при переносе эритроцитов в гипертонические среды. Можно предположить, что этот механизм связан с влиянием анестетиков на состояние как липидов, так и белков. Площадь мембраны при включении в нее анестетиков примерно в 10 раз больше площади, занимаемой анестетиками при их включении в мембрану [15]. Подобная особенность связана с влиянием анестетиков на белки, что приводит к изменению их пространственной структуры и площади мембраны [15]. Эффекты анестетиков не проявляются при действии на клетки высокого гидростатического давления, что объясняется появлением ограничений на конформационные изменения белков под влиянием анестетиков при действии высокого давления [15]. Если учитывать, что белки играют важную роль в стабилизации гемолитической поры, то можно предположить: конформационные изменения белков, индуцируемые анестетиками, снижают их способность стабилизировать мембранную пору [9, 11].

### Выводы

Полученные данные свидетельствуют, что барбитал, фенобарбитал и лидокаин оказывают защитное действие на мембрану эритроцитов в условиях гипертонического шока, вызванного переносом клеток в высококонцентрированные растворы NaCl, и при этом эффект анестетиков зависит от их концентрации, осмолярности и состава исходной среды, в которой инкубируются клетки перед переносом в гипертонические условия, а также от температуры.

concentration of cytoplasmic content impairs interactions between band 4.1 proteins and membrane [12]. Spectrin oligomerization under dehydration increases cytoskeletal resistance to mechanical shift, at the same time cytoskeleton may be detached from membrane under cell shrinking [10]. Thus, the area of potential unstability may be formed. Interaction between membrane and cytoskeleton depend also on a character of lipid distribution in membrane plane, package density and lipid phase state. Dehydration and change in medium temperature are capable to alter protein and lipid interactions and augment unstability in cytoskeletal-membrane complex [11].

Barbiturates and lidocaine cause a protective effect when interacting with erythrocyte membrane [15]. When building into lipid phase barbiturates and lidocaine increase membrane fluidity and augment intramembrane pressure, that contributes to more rapid repairing of membrane defects and prevents transmembrane pore augmentation up to critical size [15]. In addition, barbiturates and lidocaine significantly affect ion transport through membrane [2] and cell volume changes.

If the character of anaesthetic effect on hypotonic hemolysis has been quite well studied, the summarised data about the influence of this substance class on hypertonic hemolysis are almost absent. Mechanism of anaesthetics protective effect under erythrocyte transfer into hypertonic media has remained unclear, as well. This mechanism may be assumed as associating to anaesthetic effect on both lipid and protein state. Membrane area when including anaesthetic inclusion in it is 10-times higher than that occupied by anaesthetics under their in membrane [15]. The same peculiarity is associated to anaesthetic effect on proteins, resulting in a change of their spatial structure and membrane area [15]. Anaesthetic effects are not manifested under high hydrostatic pressure on cells, that is explained by appearance of certain limitations for conformational changes of proteins during anaesthetic influence under high pressure [15]. If taking into consideration the fact that proteins play an important role in hemolytic pore stabilisation, the conformational changes in proteins, induced by anaesthetics may be assumed as reducing their ability to stabilise membrane pore [9, 11].

### Conclusions

The data obtained testify to the fact, that barbital, phenobarbital and lidocaine protect erythrocyte membrane under hypotonic shock, caused by cell transfer into high-concentrated NaCl solution and herewith the anaesthetic effect depends on their concentration, osmolarity and initial medium composition, where the cells are incubated prior to the transfer into hypertonic conditions, and temperature as well.



## Литература

1. *Бондаренко В.А., Бондаренко Т.П., Руденко С.В.* Эффекты дегидратации в контроле холодной и осмотической чувствительности клеток // Пробл. криобиологии.– 1992.– №4.– С. 14-24.
2. *Бондаренко Н.В., Рамазанов В.В., Бондаренко В.А.* Вплив барбітуратів на обмін хлориду і сульфату в еритроцитах крові людини // Вісник проблем біології і медицини.– 2002.– Вип. 9-10.– С. 3-7.
3. *Орлова Н.В.* Влияние амфифильных соединений на осмотическую и температурную чувствительность эритроцитов: Дис... канд. биол. наук.– Харьков, 2001.– 140 с.
4. *Поздняков В.В.* Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному гемолизу: Дис... канд. биол. наук.– Харьков, 1988.– 122 с.
5. *Поздняков В.В., Бондаренко В.А.* Взаимосвязь между исходными осмотическими условиями среды и чувствительностью эритроцитов к гиперосмотическому стрессу в 4,0 М NaCl // Криобиология.– 1989.– №1.– С. 47-49.
6. *Baumann M., Grebe R.* Characteristics of the osmotically induced membrane rupture // Mol. Membr. Biol.– 1998.– Vol. 15, N4.– P. 193-201.
7. *Holopainen J., Subramanian M., Kinnunen P.K.J.* Sphingomyelinase induces lipid microdomain formation in a fluid phosphatidylcholine/sphingomyelin membrane // Biochemistry.– 1998.– Vol. 37, N50.– P. 17562-17570.
8. *Lang F., Busch G.L., Ritter M. et al.* Functional significance of cell volume regulatory mechanisms // Physiol. Reviews. – 1998.– Vol. 78, N1.– P. 247– 306.
9. *Lieber M.R., Lange G., Weinstein R. S., Steck T.L.* Interaction of chlorpromazine with the human erythrocyte membrane // J. Biol. Chem.– 1984.– Vol. 259, N14.– P. 9225-9235.
10. *Liu S.C., Palek J.* Hemoglobin enhances the self-association of spectrin heterodimers in human erythrocytes // J. Biol. Chem.– 1984.– Vol. 259, N15.– P. 11556-11562.
11. *Minetti M., Ceccarini M., Di Stasi A.M., et al.* Spectrin involvement in a 40 degrees C structural transition of the red blood cell membrane // J. Cell Biochem.– 1986.– Vol. 30, N4.– P. 361-370.
12. *Nigg E.A., Bron C., Girardet M., Cherry R.J.* Band 3-glycophorin A association in erythrocyte membranes demonstrated by combining protein diffusion measurements with antibody-induced cross-linking // Biochemistry.– 1980.– Vol. 19, N9.– P. 1887-1893.
13. *Parsegian V.A., Pand R.P., Rau D.C.* Osmotic stress, crowding, preferential hydration, and binding: A comparison of perspectives // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 2000.– Vol. 97, N8.– P. 3987-3992.
14. *Ralston G.B.* The self-association of human spectrin at high concentration // Biophys. Chem.– 1992.– Vol. 44, N2.– P. 175- 187.
15. *Seeman P.* The membrane action of anesthetics and tranquilizers // Pharmacological Reviews.– 1972.– Vol. 24, N 4.– P. 583-660.
16. *Williams R.J., Takahashi T.* Erythrocyte metastability-microscopic observations of thermal shock hemolysis // Cryo-Letters.– 1984.– Vol. 5, N2.– P. 111-117.

Поступила 20.07.2006

## References

1. *Bondarenko V.A.* Dehydration effects in controlling the cold and osmotic sensitivity of cells // Problems of Cryobiology.– 1992.– N4.– P. 14-24.
2. *Bondarenko N.V., Ramazanov V.V., Bondarenko V.A.* Barbiturate effect on chloride and sulphate exchange in human blood erythrocytes // Visnyk problem biologii i medytyny.– 2002.– Issue 9-10.– P. 3-7.
3. *Orlova N.V.* Effect of amphiphil compounds on osmotic and temperature sensitivity of erythrocytes: Thesis of candidate of biol. sciences.– Kharkov, 2001.– 140 p.
4. *Pozdnyakov V.V.* Effect of medium composition and osmolarity on erythrocyte resistance to osmotic and temperature hemolysis: Thesis of candidate of biol. sciences.– Kharkov, 1988.– 122 p.
5. *Pozdnyakov V.V., Bondarenko V.A.* Relationship between initial osmotic conditions of medium and erythrocyte sensitivity to hyperosmotic stress in 4.0 M NaCl // Kriobiologiya.– 1989.– N1.– P. 47-49.
6. *Baumann M., Grebe R.* Characteristics of the osmotically induced membrane rupture // Mol. Membr. Biol.– 1998.– Vol. 15, N4.– P. 193-201.
7. *Holopainen J., Subramanian M., Kinnunen P.K.J.* Sphingomyelinase induces lipid microdomain formation in a fluid phosphatidylcholine/sphingomyelin membrane // Biochemistry.– 1998.– Vol. 37, N50.– P. 17562-17570.
8. *Lang F., Busch G.L., Ritter M. et al.* Functional significance of cell volume regulatory mechanisms // Physiol. Reviews. – 1998.– Vol. 78, N1.– P. 247– 306.
9. *Lieber M.R., Lange G., Weinstein R. S., Steck T.L.* Interaction of chlorpromazine with the human erythrocyte membrane // J. Biol. Chem.– 1984.– Vol. 259, N14.– P. 9225-9235.
10. *Liu S.C., Palek J.* Hemoglobin enhances the self-association of spectrin heterodimers in human erythrocytes // J. Biol. Chem.– 1984.– Vol. 259, N15.– P. 11556-11562.
11. *Minetti M., Ceccarini M., Di Stasi A.M., et al.* Spectrin involvement in a 40 degrees C structural transition of the red blood cell membrane // J. Cell Biochem.– 1986.– Vol. 30, N4.– P. 361-370.
12. *Nigg E.A., Bron C., Girardet M., Cherry R.J.* Band 3-glycophorin A association in erythrocyte membranes demonstrated by combining protein diffusion measurements with antibody-induced cross-linking // Biochemistry.– 1980.– Vol. 19, N9.– P. 1887-1893.
13. *Parsegian V.A., Pand R.P., Rau D.C.* Osmotic stress, crowding, preferential hydration, and binding: A comparison of perspectives // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 2000.– Vol. 97, N8.– P. 3987-3992.
14. *Ralston G.B.* The self-association of human spectrin at high concentration // Biophys. Chem.– 1992.– Vol. 44, N2.– P. 175- 187.
15. *Seeman P.* The membrane action of anesthetics and tranquilizers // Pharmacological Reviews.– 1972.– Vol. 24, N 4.– P. 583-660.
16. *Williams R.J., Takahashi T.* Erythrocyte metastability-microscopic observations of thermal shock hemolysis // Cryo-Letters.– 1984.– Vol. 5, N2.– P. 111-117.

Accepted in 20.07.2006