

## Влияние диамида на проявление антигемолитической активности амфифильных соединений при гипертоническом гемолизе эритроцитов

Н.В. Орлова, Л.В. Цымбал, Н.М. Шпакова

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

Известно, что амфифильные соединения защищают эритроциты от повреждения при гипертоническом стрессе и постгипертоническом криогемолизе [1]. Полагают, что их действие реализуется, в первую очередь, на уровне мембраны. Следовательно, проявление антигемолитического (АГ) эффекта амфифилов может определяться структурно-динамическим состоянием эритроцитарной мембраны [2].

Цель данной работы – исследовать особенности проявления антигемолитического эффекта представителей различных классов амфифильных соединений в условиях гипертонического гемолиза эритроцитов, обработанных диамидом.

В работе были использованы катионный хлорпромазин гидрохлорид (ХП), неионный додецил-1, D-мальтозид (ДМ), цвиттерионный-3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфонат натрия (Z16) (фирма “Calbiochem”) и анионный додецил-сульфат натрия (С12) (фирма “Синтезпав”) соответственно. Эритроциты человека (гематокрит 0,4%) подвергали действию гипертонического раствора (4,0 М NaCl) при 37°C, причем амфифил добавляли в среду до внесения клеток. Количество гемоглобина определяли спектрофотометрически ( $\lambda=543$  нм). Обработку эритроцитов диамидом проводили по методу [3]. Выход ионов калия из эритроцитов определяли методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии. Спектры ЭПР регистрировали при температуре 37°C на спектрометре “Bruker” со стандартной термоприставкой.

По полученным концентрационным зависимостям были определены величины эффективных концентраций и значения максимальной антигемолитической активности ( $AG_{max}$ ). Все исследуемые амфифильные соединения предотвращали выход гемоглобина из клеток в условиях стресса, причем максимальной АГ активностью обладал катионный ХП. Известно, что формированию гемолитических пор предшествует нарушение ионной проницаемости эритроцитарных мембран. В частности, в гипертонической среде (4,0 М NaCl) потеря ионов калия клетками составляет примерно 90 %. Изучение влияния амфифилов на проницае-

мость мембран эритроцитов для  $K^+$  показало, что нарушение барьерной функции мембраны, вызванное 4,0 М NaCl, наблюдается и в присутствии веществ.

Обработка эритроцитов сульфгидрильным реагентом диамидом в концентрации 5 и 10 мМ не изменяла чувствительности клеток к гипертонической среде. Амфифильные соединения проявляли значительную АГ активность в этих условиях, хотя для эритроцитов, обработанных 10 мМ диамидом, наблюдалось некоторое снижение эффективности всех исследуемых веществ, которое в большей степени было выражено для заряженных амфифилов (ХП, С12).

Мы исследовали структурно-динамическое состояние мембраны эритроцитов, модифицированных диамидом (10 мМ), с помощью спин-меченых амида пальмитиновой кислоты (АПК) и 16-доксилстеариновой кислоты (16-ДС), позволяющих оценить состояние мембраны в ее полярных и неполярных областях.

Установлено, что диамид в концентрации 10 мМ влияет на процессы диффузии зонда в мембрану и изменяет ее гидрофобную емкость для спин-меченых жирных кислот. Окисление мембранных белков диамидом приводит к изменению вязкости полярной поверхности и гидрофобной зоны мембраны. Исследование доступности к мембране эритроцитов парамагнитных ионов феррицианида показало, что окисление мембранных белков вызывает изменение параметров динамической структуры мембраны. Наблюдаемая модификация спектров ЭПР спиновых зондов свидетельствует об изменении как анизотропии вращения, так и вязкости микроокружения липидных зондов.

Можно предположить, что одной из причин отмеченного снижения АГ активности амфифилов в условиях гипертонического стресса эритроцитов, обработанных диамидом, является взаимодействие веществ с пертурбированной мембраной, имеющей дефекты упаковки ее компонентов.

### Литература

1. Шпакова Н.М., Панталер Е.Р., Бондаренко В.А. Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодовом шоке эритроцитов // Биохимия.– 1995.– Т. 60, №10.– С. 1624-1631.

*Адрес для корреспонденции:* Орлова Н.В., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-41-35, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

2. Цымбал Л.В., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Модификация хлорпромазином структурно-функционального состояния мембран эритроцитов // Биологические мембраны.— 2005.— Т. 22, №4.— С. 327-335.
3. Haest C., Kamp D., Plasa G., Deuticke B. Intra- and intermolecular cross-linking of membrane proteins in intact erythrocytes and ghosts by SH-oxidizing agents // Biochim. Biophys. Acta.— 1977.— Vol. 469.— P. 226-230.