НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА
UNIVERSITY OF NAPLES "FEDERICO II"
IĞDIR UNIVERSITY
ONDOKUZ MAYIS UNIVERSITY
SELCUK UNIVERSITY

VI Міжнародна науково-практична конференція «БІОТЕХНОЛОГІЯ: ЗВЕРШЕННЯ ТА НАДІЇ», присвячена до 120-річчя НУБіП України

14-16 листопада 2017

м. Київ

Єршова Н.А., Ніпот О.Є., Шапкіна О.О., Єршов С.С., Орлова Н.В., Шпакова Н.М.

ВПЛИВ ФЕНІЛГІДРАЗИНУ НА АНТИГЕМОЛІТИЧНУ АКТИВНІСТЬ ДОДЕЦИЛ-β,D-МАЛЬТОЗИДА В УМОВАХ ГІПЕРТОНІЧНОГО СТРЕСУ ЕРИТРОЦИТІВ ССАВЦІВ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,
Україна, м. Харків, вул. Переяславська 23, 61015
ershbas@gmail.com

Гіпертонічний стрес (ГС) - це модель, за допомогою якої вивчають вплив одного з основних чинників ушкодження клітин при заморожуванні, а саме – висококонцентрованих розчинів солей, що утворюються в результаті кристалізації води. Стійкість клітин до дії ГС обумовлена станом цитоскелет-мембранного комплексу, саме тому використання модифікаторів цитоскелету і мембрани дозволяє вивчити реакцію еритроцитів до зміни осмотичних умов середовища. Використаний у роботі фенілгідразин призводить до деградації цитоскелет-мембранних білків, перш за все, спектрина (Arduini A. et al., 1989, Ijaz F. et al. 2017), а додецил-β, D-мальтозид (клас неіонних амфіфільних сполук) має суттєвий модифікуючий вплив на клітинну мембрану (Hagerstrand H. et al., 1991, Шпакова Н.М., 2014).

Об'єктами дослідження служили еритроцити людини, коня і бика. Для здійснення ГС клітини переносили в розчин, що містить 4,0 моль/л NaCl, на 5 хвилин при температурі 37 або 0 °С. Амфіфільну сполуку додавали в гіпертонічне середовище перед внесенням у нього клітин. Модифікацію цитоскелету еритроцитів здійснювали в умовах постійного перемішування в фізіологічному розчині (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатний буфер, pH 7,4), що містить фенілгідразин в концентрації 1 ммоль/л, при температурі 37°С протягом 10 хвилин. Кількість гемоглобіну, що вийшов в супернатант, визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 543 нм. За 100% приймали поглинання проби, в яку додавали детергент тритон Х-100 в концентрації 0,1 %.

Показано, що в гіпертонічних умовах початковий рівень пошкодження еритроцитів досліджуваних видів ссавців значною мірою відрізняється. Так, рівень лізису еритроцитів людини в 4,0 моль/л NaCl при 37°С становить 90 %, клітин бика – 80 %, коня – 60 %. При зниженні температури середовища до 0°С стійкість еритроцитів людини, бика і коня до ГС істотно зростає: рівень лізису еритроцитів людини в 4,0 моль/л NaCl при 0°С становить 57 %, клітин коня – 15 %, еритроцитів бика - 7 %. Це, ймовірно, обумовлено більш щільною упаковкою мембранних ліпідів при низькій температурі, в результаті чого процеси ініціації дефектів і подальшого їх розвитку в клітинній мембрані утруднені.

Модифікація еритроцитів людини і бика фенілгідразином в умовах ГС при 37°С призводить до зниження чутливості даних клітин до ГС, тоді як для клітин коня спостерігається протилежний ефект, що, ймовірно, пов'язано з відмінностями в білковому і фосфоліпідному складі досліджуваних еритроцитів (Florin-Christenses J. et al., 2001., Matei H. et al., 2000., Virtanen JA et al., 1998).

Модифікація еритроцитів ссавців фенілгідразином в умовах ГС при температурі 0°С призводить до підвищення рівня ушкодження еритроцитів всіх досліджуваних видів ссавців, що може бути пов'язано з односпрямованою дією на клітину низької температури і фенілгідразину, а саме, підвищенням щільності упаковки мембранних ліпідів, зниженням плинності мембрани, а також зміною стану цитоскелета (Білоус А.М. та ін., 1994, Ogiso T. et al., 1989, Ijaz F. et al. 2017).

У даній роботі також використовували амфіфільну неіонну сполуку - додецил-β, D-мальтозід (ДМ). Були отримані концентраційні залежності гіпертонічного гемолізу еритроцитів ссавців у присутності ДМ і розрахована антигемолітична активність речовини в умовах ГС еритроцитів при температурі 37 і 0°С. Показано, що ДМ проявляє високу захисну дію в умовах ГС еритроцитів ссавців. Антигемолітична активність ДМ для клітин людини, коня і бика досягає 70 %.

При 0°С антигемолітична активність ДМ істотно знижується для еритроцитів всіх досліджуваних видів ссавців. Винятком є клітини бика, для яких при 0°С початковий рівень гемолізу клітин дуже низький (близько 6%), отже, оцінити антигемолітичну активність ДМ для них не є можливим.

Обробка клітин людини, коня і бика фенілгідразином призводить до зниження захисної дії ДМ в умовах ГС як при 37°С, так і при 0°С. Це, ймовірно, пов'язано з тим, що окислення мембранних білків фенілгідразином обмежує їх рухливість, що надає мембрані жорсткість. В таких умовах амфіфільним сполукам складніше вбудуватися і пертурбувати плазматичну мембрану.

Таким чином, антигемолітична активність ДМ знижується як при низькій температурі, так і після модифікації еритроцитів ссавців фенілгідразином. В обох випадках зменшується плинність еритроцитарних мембран (Білоус А.М. та ін., 1994, Fukushima Y. et al., 1990), що, ймовірно, і призводить до зменшення здатності ДМ проявляти свою захисну дію за допомогою пертурбації структури мембрани.

Іванова Т. В., Іванченко К. В.

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ГЕНЕРУВАННЯ НОВИХ ФОРМ РЕКОМБІНАНТНИХ ПРЕПАРАТІВ

Національний університет біоресурсів і природокористування України
ivanchenkokatya2015@gmail.com

В останні десятиріччя у фармацевтичній галузі стрімко розвиваються біотехнології. За їх допомогою створюються принципово нові лікарські засоби, що більш ефективно та вибірково діють на патологічні процеси. Застосування біотехнологічних препаратів можна порівняти з революцією у лікуванні при таких важких хронічних захворюваннях, як цукровий діабет, ревматоїдний артрит, онкологічні захворювання, анемії. Сьогодні неможливо уявити сучасну медицину без таких біотехнологічних препаратів, як рекомбінантні інсуліни та їх аналоги, еритропоетини, пегільовані інтерферони, низькомолекулярні гепарини,рекомбінантнийтромбопоетин,гранулоцитарніколоніє-стимулюючі фактори, рекомбінантні антигемофільні фактори.

Біотехнології в медицині займають особливе місце. Ніякі найдосконаліші процеси хімічного синтезу не в змозі зрівнятися з шедеврами, створеними живою природою. Завдяки науковим біорозробкам і їх практичному впровадженню стало можливим отримувати не просто якісні продукти, а продукти, повністю ідентичні тим, які виробляє сам організм.

Біотехнологічне виробництво засноване на видатних досягненнях генної інженерії, селекційної генетики, клітинної інженерії. Фантастичні перспективи сьогодні перетворюються в реальність. Стало можливим отримувати людські білки з культур бактеріальних клітин, в які методами генної інженерії введені гени людини.

Створено генно-інженерні штами кишкової палички, дріжджів, що культивуються клітинами ссавців та комах й використовуються для одержання інсуліну, інтерферону людини і противірусних вакцин.

Гени з різних організмів можна штучно об'єднати й отримати нові рекомбінантні молекули ДНК, які можуть служити виключно цінним інструментом у генетичних дослідженнях, а також широко використовуватися із практичною метою.

Розвиток методів виділення генів, об'єднання їх у нових сполученнях (гібридизація молекул ДНК), введення потім у клітини хазяїна та їх клонування (накопичення) стало важливим біохімічним досягненням, яке відкрило нову еру в молекулярній біології. Перспективи використання рекомбінантних ДНК сприяли виникненню нового напрямку в науці - генної інженерії.

Саме генно-інженерні технології зробили справжню революцію в клінічному застосуванні людських білкових препаратів. Продукти біологічного синтезу дуже широко представлені в економічно розвинених країнах світу - США, Японії, Швейцарії, Німеччині.