Eastern European Scientific Journal

(ISSN 2199-7977)

Journal



Kommunikations- und

Verlagsgesellschaft mbH

www.auris-verlag.de

DOI 10.12851/EESJ201604

IMPRESSUM:

Copyright:
©2014 AURIS Kommunikations- und Verlagsgesellschaft mbH
Düsseldorf - Germany

Internet:
http://www.auris-verlag.de

E-Mail:
M.Moneth@auris-verlag.de

Verlagsredaktion:
Khvataeva N. D.Ph. chief editor
Zaharishcheva M. D.Ph. prof., editor
Plekhanov Theodor I. ScD, prof., editor
Lobach Elena A. PhD, assosiate prof., editor
Brenner D. D.Ph. editor
Muhina A. D.Ph. editor
Blinov I. D.Sc. editor
Moneth T. M.Ph. designer/breadboard
Moneth M. M.Ph. breadboard

Layout:
Moneth M.

Umschlaggestaltung:
Moneth M.

Coverbild:
AURIS Kommunikations- und Verlagsgesellschaft mbH

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.
Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form, auch nicht für Zwecke der Unterrichtsgestaltung – mit Ausnahme der in §§ 53, 54 URG genannten Sonderfälle -, reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet oder verbreitet werden.

DOI 10.12851/EESJ201604

DOI 10.12851/EESJ201604C01ART01

Ekaterina A. Semionova,
postgraduate student;

Nataliya A. Iershova,
PhD, scientist;

Nataliaya V. Orlova,
PhD, senior scientist;

Nataliya M. Shpakova,
ScD (Doctor in Biology), senior scientist,
Institute Problems of Cryobiology and
Cryomedicine of NAS Ukraine

Hypotonic Lysis of Mammalian Erythrocytes in Chlorpromazine Presence

Key words: *hypotonic lysis, mammalian erythrocytes, chlorpromazine*

Annotation: *When studying hypotonic sensitivity of bovine, equine, canine and human erythrocytes the human and canine erythrocytes have been shown to be more sensitive to the effect of hypotonic media. Chlorpromazine manifests a high antihemolytic activity under conditions of hypotonic lysis of mammalian erythrocytes. Maximal efficiency of chlorpromazine has been demonstrated for the bovine cells and minimal one was done for canine erythrocytes.*

Современный этап развития биологической науки и медицины характеризуется повышенным интересом к исследованию общих закономерностей повреждения клеток в экстремальных условиях с целью поиска способов повышения их устойчивости к действию неблагоприятных факторов.

В настоящее время гипотонический лизис эритроцитов человека является объектом исследования, поскольку используется в качестве теста на сохранность барьерной функции эритроцитарных мембран при действии различных экстремальных факторов, а также с целью диагностики функциональных расстройств системы кровообращения (6,16). Кроме того, гипотонический лизис и его модификации используют в процессе нагружения эритроцитов различными лекарственными веществами (7, 23). Поэтому изучение причин, закономерностей и механизма гипотонического лизиса эритроцитов является важным как с точки зрения фундаментальных, так и прикладных исследований.

Для выяснения механизмов устойчивости эритроцитов человека к действию стрессовых факторов широко используется подход, связанный с направленной модификацией различных структурных и функциональных компонентов клетки. Эти изменения не являются узкоспецифичными и могут охватывать клетку в целом, т.е. приводить к нарушению ее нативности в той или иной степени. В связи с этим для исследования осмотической чувствительности клеток целесообразно использовать нативные эритроциты разных видов млекопитающих, которые отличаются по составу цитоплазмы, способности к деформации, активности транспортных путей, фосфолипидному и белковому составу мембраны (2, 4, 5, 12).

В настоящее время использование амфифильных веществ расширяется как в биологических, так и медицинских исследованиях (20, 22). Применение различных амфифильных соединений в микромолярных концентрациях дает возможность корректировать чувствительность эритроцитов к действию различных стрессовых факторов, в частности к гипертоническому шоку, холодовому стрессу и яд-индуцированному лизису (9, 14, 17, 18). Защитное действие этих соединений обусловлено их способностью встраиваться в мембрану и модифицировать ее (8). Таким образом, антигемолитическая активность амфифильных соединений может определяться, с одной стороны, их физико-химическими свойствами, а с другой – составом и состоянием эритроцитарных мембран. Исходя из вышеизложенного, в работе использовали хлорпромазин, который относится к катионным амфифильным веществам с целью коррекции гипотонического лизиса эритроцитов разных видов млекопитающих.

Целью работы было исследование эффективности хлорпромазина для повышения устойчивости эритроцитов млекопитающих (человека, лошади, быка и собаки), подвергнутых действию гипотонического лизиса.

Материалы и методы исследования.

Для исследования использовали эритроциты, полученные из крови человека, быка, лошади и собаки, заготовленной на гемоконсерванте «Глюгицир». Эксперименты проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных» одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с положениями «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985). Эритроциты выделяли по стандартной методике (19).

После удаления плазмы эритромассу трижды отмывали путем центрифугирования (центрифуга ОПн-ЗУ4.2, 3000 об/мин, 3 мин) в 10-кратном объеме физиологического раствора (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатный буфер, pH 7,4). Лейкоцитарную пленку и супернатант удаляли аспирацией. Эритроциты хранили в виде плотного осадка не более четырех часов при температуре 0ºС. Все используемые в работе среды готовили на 0,01 моль/л фосфатном буфере, pH 7,4

Исходную суспензию эритроцитов получали в результате добавления осадка клеток к физиологическому раствору в отношении 1 : 10

Гипотонический лизис эритроцитов осуществляли внесением аликвоты исходной суспензии клеток (50 мкл) в 1,0 мл раствора NaCl (40–120 ммоль/л) при температуре

37°C на 5 мин. Конечный гематокрит – 0,4%.

Хлорпромазин добавляли в гипотоническую среду (температура 37ºС) перед внесением в нее клеток (16). Для эксперимента была выбрана концентрация NaCl, при которой уровень гипотонического гемолиза клеток составлял около 70%.

Содержание вышедшего в супернатант гемоглобина определяли спектрофотометрическим способом на спектрофотометре СФ-4А с проточной кюветой при длине волны 543 нм и выражали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу эритроцитов. За 100 % принимали поглощение пробы, в которую добавляли тритон Х-100 в концентрации 0,1 %.

Из зависимостей гипотонического лизиса эритроцитов млекопитающих от концентрации хлорпромазина (ХПР) в среде определяли размеры плато концентраций и значения эффективных концентраций; рассчитывали величины максимальной антигемолитической активности ($АГ_{макс}$) амфифильного вещества.

Значение максимальной антигемолитической активности ХПР рассчитывали по формуле:

$$АГ_{макс} = \frac{к - a}{к} \times 100\ \%,$$

где $к$ – величина гемолиза эритроцитов при отсутствии ХПР; a – минимальная величина гемолиза эритроцитов при наличии ХПР.

В работе были использованы хлорпромазин («Calbiochem», США**)**,) и реактивы отечественного производства квалификации «хч» и «чда».

Статистическую обработку полученных числовых данных проводили с помощью программы «Statistica» (версия 6.0). Экспериментальные данные представлены как медиана и интерквартильный интервал (Q1–Q3). Для проверки статистической значимости различий исследуемых числовых показателей использовали критерии Манна-Уитни. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение.

На рис. 1 представлены зависимости гипотонического гемолиза эритроцитов млекопитающих от концентрации NaCl в среде при температуре 37°C. В целом, характер зависимостей сходен для всех эритроцитов, однако имеются и некоторые видовые различия. Сначала при понижении концентрации NaCl наблюдается постепенное увеличение гемолиза клеток, сменяемое последующей фазой резкого возрастания их гемолитического повреждения. При концентрации хлорида натрия 40 ммоль/л регистрируется 100% уровень гемолиза эритроцитов человека, быка и лошади.

Но, несмотря на внешнее сходство формы зависимостей, заметны видовые различия (рис. 1). Основная масса эритроцитов человека и быка гемолизирует в интервале концентраций 70-50 и 80-60 ммоль/л NaCl соответственно. Клетки лошади и собаки повреждаются в более широком концентрационном дипазоне: 60-85 и 70-40 ммоль/л NaCl соответственно. Полученные данные свидетельствует о том, что эритроциты человека и быка более чувствительны к изменению концентрации NaCl, что, по-видимому, обусловлено их высокой синхронностью гипотонического повреждения по сравнению с клетками лошади и собаки.

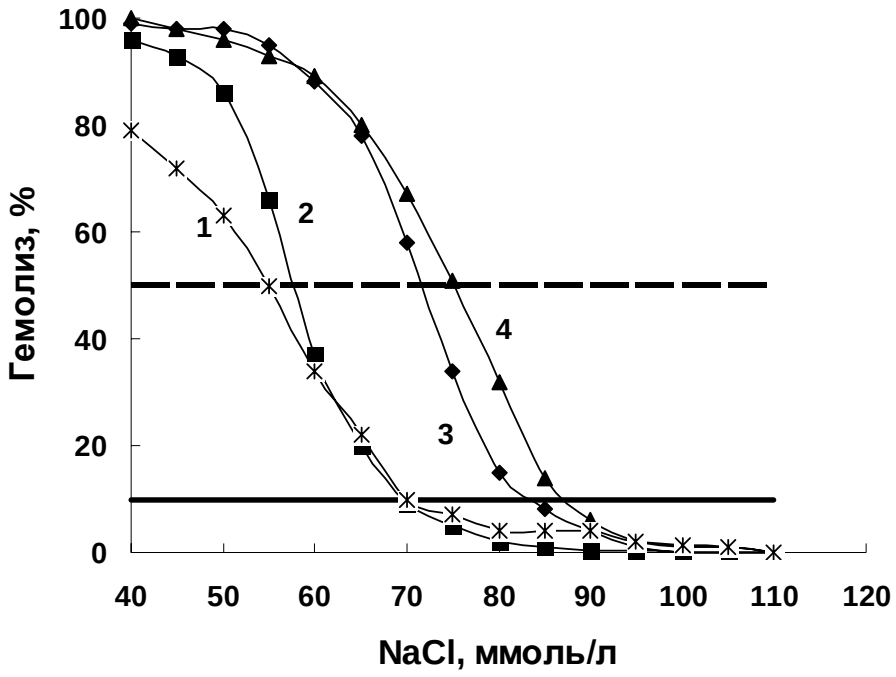

Рис. 1. Гипотонический гемолиз эритроцитов собаки (1), человека (2), быка (3) и лошади (4) при температуре 37°С

—— –– 10% уровень гемолиза; – – – – 50% уровень гемолиза.

Для количественной оценки гипотонической чувствительности эритроцитов разных видов млекопитающих использовали два параметра: пороговая концентрация NaCl и индекс осмотической хрупкости, которые определяли из полученных зависимостей (рис. 1).

Начало развития гемолитического процесса определяют показателем пороговой концентрации NaCl, при которой уровень гемолиза достигает приблизительно 10%. Полученные результаты представлены на рис. 2. Видно, что эритроциты быка и лошади начинают лизировать при более высокой концентрации соли, чем клетки человека и собаки. Таким образом, на начальном этапе развития гипотонического повреждения эритроциты человека и собаки демонстрируют большую устойчивость в отличие от клеток быка и лошади.

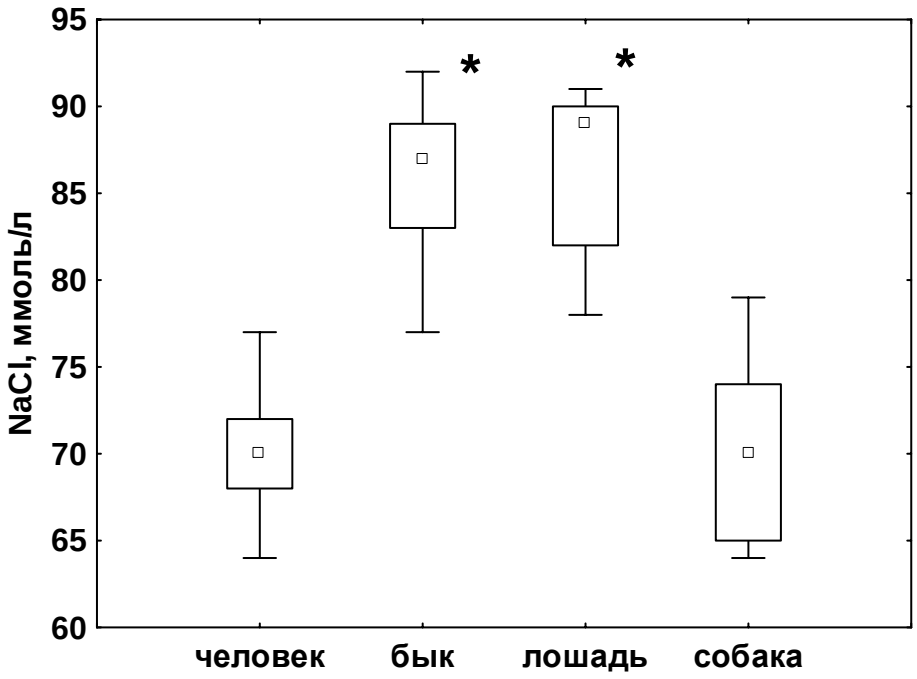

Рис. 2. Пороговые концентрации хлорида натрия при гипотоническом лизисе эритроцитов млекопитающих, температура 37°С.

* – статистически значимые различия по сравнению с результатами, полученными для эритроцитов человека ($p < 0,05$), количество наблюдений в каждой группе – 5

Здесь и далее: □ – медиана, □ – интерквартильный интервал (Q1 – Q3), I -- максимальное-минимальное значение.

Для оценки чувствительности клеток млекопитающих к гипотоническим средам используется показатель индекса осмотической хрупкости, который представляет собой концентрацию соли, необходимую для развития 50%-ного уровня гемолиза эритроцитов (рис. 3).

Из рис. 3 видно, что по указанному показателю наиболее чувствительны к гипотоническому лизису эритроциты быка и лошади, для которых индекс осмотической хрупкости составляет 72 и 75 ммоль/л NaCl соответственно, наименее чувствительны – клетки собаки (55 ммоль/л NaCl).

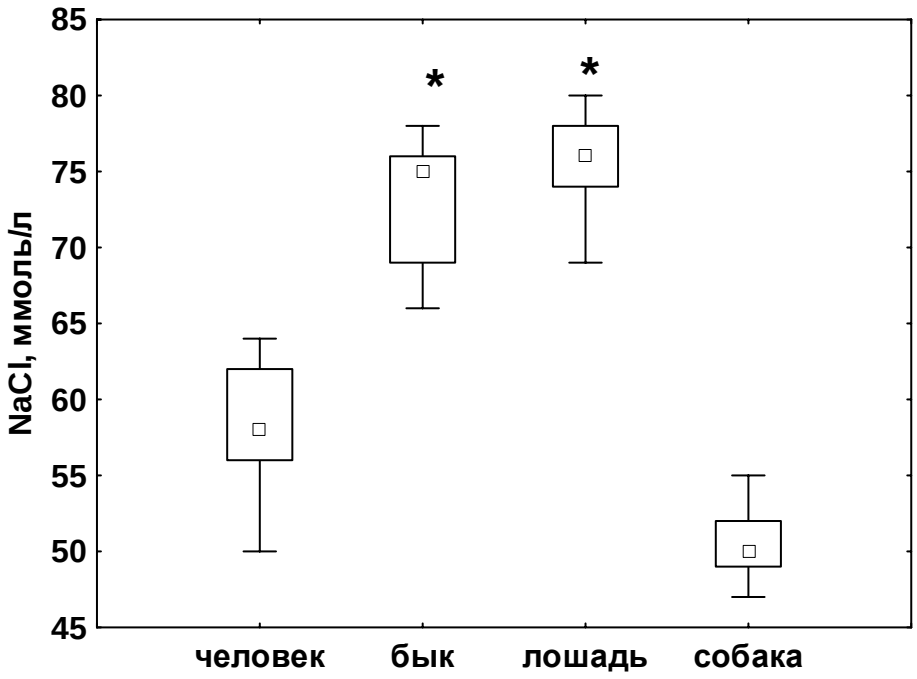

Рис. 3. Значения индекса осмотической хрупкости эритроцитов млекопитающих при гипотоническом лизисе, температура 37 С.

* – статистически значимые различия по сравнению с результатами, полученными для эритроцитов человека ($p < 0,05$), количество наблюдений в каждой группе – 5.

По индексу осмотической хрупкости эритроциты можно расположить в такой последовательности: бык = лошадь > человек > собака. Различия в величинах индекса осмотической хрупкости, выявленные для эритроцитов животных, по сравнению с клетками человека являются статистически значимыми ($p<0,05$).

Исходя из данных, представленных на рис. 3 можно сделать вывод о том, что максимальной устойчивостью к действию гипотонического стресса обладают эритроциты собаки, минимальной - клетки быка и лошади.

Изучаемые эритроциты млекопитающих можно расположить согласно увеличению их размеров в ряд: лошадь, бык, собака, человек (10). Наблюдается определенное соответствие между гипотонической чувствительностью клеток и их размерами: мелкие клетки (лошадь, бык) более чувствительны к повреждающему действию гипотонических сред. Это согласуется с данными, представленными в работе (17).

В кровеносном русле эритроциты находятся в физиологических условиях, в частности в среде, осмоляльность которой равна примерно 300 мосмоль/кг. При помещении в среды с более низкой осмоляльностью эритроциты подвергаются разрушению, т.е. гемолизируют. Сначала в результате избыточного поступления воды в эритроциты происходит их набухание, при этом растягивание мембраны обуславливает рост мембранного натяжения. При критическом уровне натяжения в мембране образуются дефекты или поры, проницаемые не только для низкомолекулярных веществ, но и молекул гемоглобина.

При изучении гипотонического лизиса эритроцитов человека была показана антигемолитическая активность амфифильных соединений, в частности ХПР (8). Для оценки влияния ХПР на гипотонический лизис эритроцитов разных видов млекопитающих клетки переносили в гипотоническую среду, содержащую амфифил в концентрации от 10 до 200 мкмоль/л (рис. 4). Из представленных данных видно, что зависимости гипотонического лизиса эритроцитов от концентраций в среде ХПР имеют сходные черты для клеток всех исследуемых млекопитающих. Все зависимости имеют нисходящий участок, плато концентраций и восходящий участок. Наличие таких участков демонстрирует двойственное влияние амфифильных соединений на клеточные мембраны: в одних концентрациях они защищают эритроциты от разрушения, а в других, более высоких, проявляют детергентные свойства. Протектирующие концентрации ХПР, при которых наблюдается минимальный уровень гемолиза в одной и той же гипотонической среде, образуют участок плато зависимости. При этом, уровень плато и его размер (диапазон протектирующих концентраций) характеризуются видоспецифичностью. Так, в отличие от клеток человека, лошади и собаки, для эритроцитов быка характерно достаточно узкое плато, которое смещено в сторону более низких концентраций ХПР. Следует отметить, что уровень минимального гемолиза эритроцитов быка примерно в 3-4 раза ниже аналогичных показателей, полученных для клеток других млекопитающих.

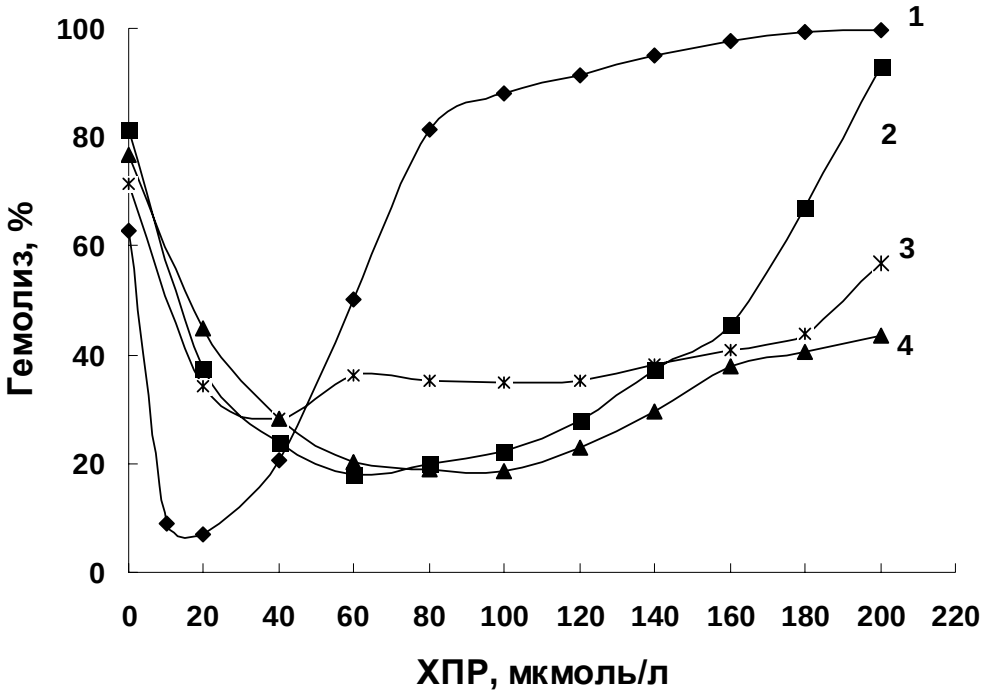

Рис. 4. Влияние хлорпромазина на гипотонический гемолиз эритроцитов собаки (1), человека (2), быка (3) и лошади (4) при 37°С.

При концентрациях ХПР в среде, превышающих значения протектирующего диапазона, развивается гемолиз эритроцитов, индуцированный ХПР (восходящий участок зависимости). Этот участок гемолитической зависимости выражен для эритроцитов млекопитающих в разной степени. Тот факт, что он слабо выражен для

эритроцитов лошади и собаки, свидетельствует о том, что плазматические мембраны этих клеток способны выдерживать встраивание достаточно большого количества молекул ХПР без разрушения.

Для того чтобы оценить эффективность действия ХПР в условиях гипотонического лизиса эритроцитов млекопитающих используют понятия эффективной концентрации, которая соответствует середине плато концентраций хлорпромазина, и максимальной антигемолитической активности, которую выражают как процент снижения гемолиза клеток в присутствии ХПР по отношению к гемолизу в пробе, не содержащей амфифил. Результаты представлены на рис. 5.

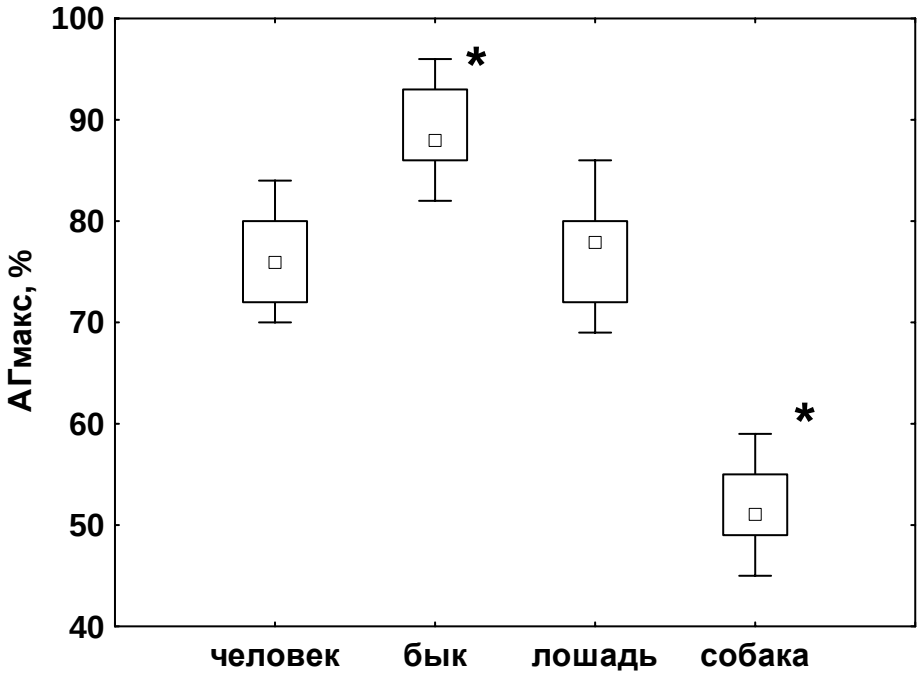

Рис. 5. Величины максимальной антигемолитической активности хлорпромазина в условиях гипотонического лизиса эритроцитов млекопитающих (температура 37°С). Для эритроцитов человека, быка, лошади и собаки эффективные концентрации хлорпромазина составляли 80, 20, 90 и 100 мкмоль/л соответственно.

* – статистически значимые различия по сравнению с результатами, полученными для эритроцитов человека ($p < 0,05$), количество наблюдений в каждой группе – 7).

Из представленных данных видно, что в условиях гипотонического лизиса эритроцитов млекопитающих ХПР проявляет высокую антигемолитическую активность. Различия в значениях максимальной антигемолитической активности ХПР, полученных для клеток быка и собаки, статистически значимы по сравнению с аналогичной величиной ХПР, установленной для эритроцитов человека. В указанных условиях максимальная эффективность ХПР показана для клеток быка и минимальная для эритроцитов собаки.

Хлорпромазин в силу своей амфифильной природы способен встраиваться в эритроцитарную. мембрану, причем благодаря положительному заряду вещества его молекулы распределяются во внутреннем монослое липидного бислоя (9). Защитный эффект ХПР при гипотоническом лизисе эритроцитов человека связывают с увеличением

площади поверхности эритроцитарной мембраны в результате встраивания в нее вещества (15). Это является основой для увеличения критического гемолитического объема клетки, при достижении которого происходит разрыв эритроцитарной мембраны и выход молекул гемоглобина из клетки.

С другой стороны, согласно результатам работ Hagerstrand и соавт. (8) по изучению эффективности амфифильных веществ в условиях гипотонического лизиса эритроцитов человека, в основе проявления антигемолитической активности амфифилов, по-видимому, лежит их способность при встраивании эритроцитарную мембрану пертурбировать (разупорядочивать) ее, что препятствует развитию гемолитической поры.

Тот факт, что протектирующий эффект ХПР был показан при действии на клетки различных стрессовых факторов, таких как гипертонический шок и гипертонический криогемолиз, при которых не наблюдается набухание клеток (9, 13), позволяет отдать предпочтение второму более универсальному механизму антигемолитического действия амфифильных соединений.

Основываясь на результатах, полученных при изучении гипотонического лизиса эритроцитов млекопитающих (рис. 1-3), можно было предположить, что эффективность ХПР будет выше для эритроцитов тех млекопитающих, которые характеризуются высокой устойчивостью к действию гипотонических сред, т.е. для клеток собаки и человека. Однако полученные результаты выявили наибольшую эффективность ХПР для «гипотонически неустойчивых» клеток быка и наименьшую для «гипотонически устойчивых» клеток собаки.

С использованием модельных экспериментов установлено, что распределение амфифильных веществ зависит от вида фосфолипида (3), его состояния, степени насыщенности жирнокислотных цепей и взаимодействиями между головными группами фосфолипидов (1, 11). Следовательно, возможен гетерогенный характер распределения молекул амфифильных веществ как в трансмембранной, так и в латеральной плоскости плазматической мембраны эритроцитов. Кроме того, анализ плазматических мембран эритроцитов разных видов млекопитающих показал качественно-количественными различия по белково-липидному составу (5, 12, 21).

Тот факт, что эффективность ХПР зависит от видовой принадлежности эритроцитов, а клеточные мембраны характеризуются гетерогенностью, ставит вопрос об особенностях распределения молекул веществ в природной мембране на основе их сродства к определенным фосфолипидам. Это определяет перспективу дальнейших исследований.

Reference:

1. *Agasoster AV, Holmsen H. Chlorpromazine associates with phosphatidylserines to cause an increase in the lipid's own interfacial molecular area--role of the fatty acyl composition: Biophys Chem, 2001, 91, № 1; 37–47.*
2. *Benga G. Comparative studies of water permeability of red blood cells from humans and over 30 animal species: an overview of 20 years of collaboration with Philip Kuchel: Eur Biophys J, 2013, 42, № 1; 33–46.*

3. *Białkowska K, Bobrowska-Hägerstrand M, Hägerstrand H. Expansion of phosphatidylcholine and phosphatidylserine/phosphatidylcholine monolayers by differently charged amphiphiles: Z Naturforsch. C, 2001, 56, № 9−10; 826-830.*
4. *Bogner P, Sipos K, Ludany A et al. Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes: Eur Biophys J, 2002, 31, № 2; 145–152.*
5. *Florin-Christensen J, Suarez CE, Florin-Christensen M. et al. A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes: Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98, № 14; 7736–7741.*
6. *Gordienko EA, Gordienko YE, Gordienko OI. The physico-mathematical theory of human erythrocyte hypotonic hemolysis phenomenon: Cryo Letters, 2003, 24, № 4;:229-244.*
7. *Godfrin Y, Horand F, Franco R et al. International seminar on the red blood cells as vehicles for drugs: Expert Opin Biol Ther, 2012, 12, № 1; 127-133.*
8. *Hagerstrand H, Isomaa B. Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation: Chem-Biol Inter, 1991, 79, № 3; 335–347.*
9. *Iershov SS, Pysarenko NA, Orlova NV, Shpakova NM. Effect of cationic and anionic amphiphilic compounds on hypertonic cryohemolysis of mammalian red blood cells: Fiziol Zh,. 2007, 53, № 6; 78–84.*
10. *Komarova NK, Sviridova TG, Stepovik LV, Hayrullina AB. Physico-chemical properties of red blood cells of humans and animals in normal and some endogenous and exogenous effects on the body: a teaching aid for the students of the Faculty of Veterinary Medicine and Biotechnology. Orenburg, Orenburg State Agrarian University, 2003; 20.*
11. *Martins PT, Velazquez-Campoy A, Vaz WL et al. Kinetics and thermodynamics of chlorpromazine interaction with lipid bilayers: effect of charge and cholesterol: J Am Chem Soc, 2012, 134, № 9; 4184–4195.*
12. *Matei H, Frentescu L, Benga Gh. Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species: J Cell Mol Med, 2000, 4, № 4;270–276.*
13. *Orlova NV, Shpakova NM. Mechanism of protective effect of amphiphilic compounds during hypertonic hemolysis of erythrocytes: Fiziol Zh, 2006, 52, № 5; 55-61.*
14. *Rudenko SV, Nipot EE. Protection by chlorpromazine, albumin and bivalent cations against haemolysis induced by melittin [Ala-14] melittin and whole bee venon: Biochem J, 1996, 317, Pt. 3; 747–754.*
15. *Seeman P. The membrane actions of anesthetics and tranquilizers: Pharmacol Rev, 1972, 24; 583-655.*
16. *Shpakova NM. Temperature and osmotic sensitivity of red blood cells of different mammalian species: Animal Biology, 2010, 12, № 1; 382–391.*
17. *Shpakova NM. Temperature and osmotic resistance of erythrocytes of different mammalian species. Abstract of thesis submitted in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Biological Science. Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine, 2014; 44.*
18. *Shpakova NM, Iershova NA, Orlova NV et al. Application of alkyl sulfates and heat treated erythrocytes in hypertonic cryohemolysis: Biotechologia Acta, 2015, 8, № 3; 126-136.*
19. *Shpakova NM, Pantaler ER, Bondarenko VA. Antihemolytic effect of chlorpromazine on erythrocytes in hyperosmotic and cold shock: Biokhimiya, 1995, 60, № 10; 1624–1631.*

20. *Sostaric JZ, Miyoshi N, Riesz P et al. n-Alkyl glucopyranosides completely inhibit ultrasound-induced cytolysi:. Free Radic Biol Med, 2005, 39, № 12; 1539–1548.*
21. *Wessels JMC, Veerkamp JH. Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes III. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species: Biochim Biophys Acta, 1973, 291, № 1; 190–196.*
22. *Yamaguchi T., Kuranoshita K., Harano T., Kimoto E. Effects of drugs, salts, and phospholipid vesicles on hemoglobin release from hydrostatic pressure-treated human erythrocyte: J Biochem, 1993, 113, № 4; 513–518.*
23. *Yew NS, Dufour E, Przybylska M et al: Erythrocytes encapsulated with phenylalanine hydroxylase exhibit improved pharmacokinetics and lowered plasma phenylalanine levels in normal mice: Mol Genet Metab, 2013, 109, № 4; 339–344.*

DOI 10.12851/EESJ201604C01ART02

Uktam E. Khujanazarov,
ScD, associate professor;

Imangali H. Islomov,
senior lecturer,
Tashkent State Pedagogical University

Ecological Conditions of Almond-tree (Amygdalus) Formation of Chirakchi District in Kashkadarya Region

Key words: *plant, ecology, formation, amygdalus.*

Annotation: *The estimation of the almond-tree (amygdalus) transformation of Chirakchi district is considered in the article. As a result it was appeared the real danger of the reduction of the large number of plant species of medicinal and useful forage crops. The disappearance of any biological species brings its loss while any wild species of the plants play the enormous role in creation of the agricultural cultures.*

Растительные ресурсы Узбекистана, с его богатой дикорастущей и культурной флорой до последнего времени были слабо изучены. Проводившиеся геоботаническое исследование основное внимание центрировали на изучении дикой флоры и растительности, и ставили задачей установление закономерностей в распределении растительности, в зависимости от экологических факторов, игнорируя, или учитывая вскользь роль человека в эволюции растительности.

В результате возникла реальная опасность уменьшения большого числа растительных видов лекарственных и полезных кормовых культур. Исчезновение любого биологического вида приводит к его потерям, в то время как всякий дикорастущий вид растений играет огромную роль в создании сельскохозяйственных