НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

Єршов Сергій Сергійович

УДК: 57.043:591.111.1

ОСМОТИЧНА ТА ТЕМПЕРАТУРНА ЧУТЛИВІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ССАВЦІВ

03.00.19 – кріобіологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

ХАРКІВ - 2009

Дисертацією є рукопис
Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Бондаренко Валерій Антонович,
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, завідувач відділу кріофізіології клітини,
м. Харків

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Розанов Леонід Федорович,
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, головний науковий співробітник відділу низькотемпературного консервування,
м. Харків

доктор біологічних наук, професор
Перський Євген Ефроїмович,
Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, завідувач кафедри біохімії,
м. Харків

Захист відбудеться "15" червня 2009 р. о "13[30]" годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23

Автореферат розіслано "10" листопада 2009 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
академік НАН України,
доктор медичних наук, професор А. М. Гольцев

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність роботи. На протязі тривалого часу в кріобіології актуальною проблемою є дослідження механізмів ушкодження і захисту клітин при їх охолодженні і заморожуванні. Отримано достатньо експериментальних даних щодо цього питання [Meryman H.T., 1971; Green F.A. et al., 1977; Дегтярев А.В. и др., 1988; Бондаренко В.А., 1992; Белоус А.М. и др., 1994; Гордиенко Е.А. и др., 1997; Pegg D.E., 2007], однак деякі механізми кріопошкодження залишаються недостатньо з'ясованими. Перш за все, це стосується механізмів стійкості клітин до дії зниження температури і підвищеної осмолярності середовища, які є основними фізико-хімічними факторами пошкодження клітин при кріоконсервуванні. Відомо, що зміна вихідних параметрів середовища інкубації клітин (наприклад, еритроцитів людини) може призводити до підвищення або зниження їх стійкості до наступної дії стресових факторів, таких як інкубація в середовищах високої осмолярності (гіпертонічний шок – ГШ) або різька зміна температурних умов середовища (гіпертонічний кріогемоліз – ГК) [Белоус А.М. и др., 1985; Рамазанов В.В. и др., 1996]. Наприклад, попередня часткова дегідратація еритроцитів людини, яка відбувається при фізіологічній температурі, призводить до появи чутливості клітин до наступного охолодження до 0 °С [Поздняков В.В. и др., 1989]. В той же час попередня часткова дегідратація при 0 °С значно підвищує стійкість еритроцитів людини до ГК [Бондаренко В.А., 1992]. Відомо, що стійкість клітин до дії пошкоджуючих факторів кріоконсервування можна змінити, не тільки варіюючи параметри середовища, але і модифікуючи клітини різними речовинами. Так, насичення клітин глюкозою, виснаження клітин з АТФ, зміна транспорту іонів через мембрану іонофорами, обробка інгібіторами катіонного і аніонного транспорту, модифікаторами білків цитоскелета і мембрани (діамід, фенілгідразин та ін.) впливають на стійкість еритроцитів до ГШ і ГК [Allen D.W. et al., 1976; Бондаренко Т.П., 1981; Мельникова О.В. и др., 1991; Лупилова Н.О., 1999; Орлова Н.В., 2001; Шпакова Н.М. и др., 2008].

Існує можливість підвищити стійкість еритроцитів до зміни осмотичних і температурних умов середовища безпосередньо в момент дії стресу при наявності в середовищі речовин, що впливають на процеси замикання мембранних дефектів, зокрема амфіфілів [Шпакова Н.М. и др., 1995, 2008, 2009]. Однією з таких амфіфільних сполук є хлорпромазин, додавання якого до гіпертонічного електролітного середовища дозволяє знизити рівень лізису еритроцитів людини при ГШ і ГК [Шпакова Н.М. и др., 1995; Орлова Н.В., 2001].

Таким чином, рівень ушкодження клітин може визначатися їх станом як перед дією, так безпосередньо в момент дії стресових факторів.

Достатня кількість робіт присвячена вивченню явищ ГК і ГШ еритроцитів людини [Meryman H.T., 1971; Minetti M. et al., 1984; Takahashi T. et al., 1986; Дегтярев А.В. и др., 1988; Бондаренко Т.П. и др., 1991; Шпакова Н.М. и др., 1992; Гордиенко Е.А. и др., 1996; Рамазанов В.В. и др., 1996; Kinnunen P.K. et al., 2000; Lang F. et al., 2006; Матвиенко Е.А. и др., 2008], однак даних щодо чутливості еритроцитів різних видів ссавців до ГШ і ГК, а також впливу на них факторів середовища, здатних змінювати чутливість до ГШ і ГК, занадто мало і вони розрізнені [Rapatz G. et al., 1971; Watson P.F. et al., 1987; Betticher D.C. et al., 1989]. Крім того, модифікації різноманітних структурних та функціональних компонентів клітини, що застосовуються для з'ясування механізмів зміни стійкості еритроцитів людини

до дії стресових факторів, призводять в тій чи іншій мірі до пошкодження нативного стану клітини. Даний підхід дає не зовсім адекватні відповіді, тому що маємо справу з первісно «дефектною» клітиною з порушеним балансом між структурними компонентами, тому доцільно було дослідити клітини одного типу (еритроцити), що відрізняються за ліпідним, білковим складом, іонтранспортними системами, інтенсивністю водного транспорту [Rich G.T. et al., 1967; Gold J.C. et al., 1990; Tsai S.T. et al., 1991; Miseta A. et al., 1993; Benga Gh. et al., 1995; Matei H. et al., 2000; Ivanov I.T. et al., 2007], належать різним видам ссавців, але при цьому є нативними.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана відповідно до наукового напрямку роботи відділу кріофізіології клітини ІПКіК НАН України за темами: "Механізми зміни осмотичної і температурної чутливості клітин при дії модифікаторів цитоскелет-мембранного комплексу, амфіфільних сполук і кріопротекторів" (шифр 2.2.6.15, № держ. реєстрації 0104U006437) та "Дослідження стійкості еритроцитів до дії осмотичного і температурного шоку і заморожування" (шифр 2.2.6.45, № держ. реєстрації 0109U000276), де автор виконував самостійні розділи, отримані результати були включені в звіти відділу.

Мета і задачі дослідження

Мета роботи – вивчити особливості прояву гіпертонічного гемолізу і гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів ссавців (бика, собаки, коня, кролика і людини), а також вплив хлорпромазину на чутливість еритроцитів до гіпертонічного шоку і кріогемолізу.

Задачі дослідження.

1) Провести порівняльне вивчення впливу різних концентрацій NaCl на розвиток гемолізу еритроцитів бика, коня, собаки, кролика і людини, а також впливу температурних і часових режимів на розвиток гіпертонічного гемолізу еритроцитів ссавців.
2) Вивчити вплив різних концентрації NaCl (0,2÷2,0 моль/л), температурних і часових режимів на розвиток гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів бика, коня, собаки, людини і кролика.
3) Дослідити вплив різної тривалості інкубації еритроцитів бика, коня, собаки, людини і кролика при 37 °С на зміну об'єму еритроцитів ссавців і розвиток гіпертонічного кріогемолізу в 1,20 моль/л NaCl або 0,86 моль/л сахарозі.
4) Дослідити вихід іонів калію з еритроцитів ссавців в залежності від складу, осмолярності, температури середовища і тривалості інкубації.
5) Дослідити вплив різних концентрацій хлорпромазину на чутливість еритроцитів бика, коня, собаки, людини і кролика до гіпертонічного шоку (4,0 моль/л NaCl) і гіпертонічного кріогемолізу (1,2 моль/л NaCl).

Об'єкт дослідження. Гіпертонічний гемоліз, гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів.

Предмет дослідження. Осмотична і температурна чутливість еритроцитів різних видів ссавців (людини, коня, бика, собаки, кролика).

Методи дослідження. Спектрофотометричний метод, метод світлової мікроскопії, метод потенціометричної іонселективної іонометрії, мікрогематокритний метод.

Наукова новизна одержаних результатів. Виявлено, що при 37 °С в середовищі, яке містить NaCl в концентрації 4,0 моль/л, максимальний рівень гемолізу спостерігається для еритроцитів людини і бика, мінімальний – еритроцитів собаки і кролика. Встановлено, що при температурі інкубації 0 °С чутливість еритроцитів тварин до ГШ значно нижча, ніж при

37 °С. Показано, що чутливість еритроцитів ссавців до ГШ не пов'язана з домінуючим внутрішньоклітинним катіоном і ступенем виходу іонів K^+ з еритроцитів.

Виявлено однакову спрямованість морфологічних змін еритроцитів різних видів ссавців при підвищенні тонічності електролітного середовища.

Вперше показано, що для досягнення максимального рівня ГК еритроцитів різних видів ссавців необхідна інкубація клітин у середовищах з різним осмотичним тиском. Встановлено верхні та нижні межі змін температури гіпертонічного середовища, які необхідні для прояву ГК еритроцитів різних видів ссавців. Виявлено різну видову залежність рівня ГК еритроцитів ссавців від тривалості інкубації на етапі, що передує охолодженню в електролітних середовищах, і однакову – в неелектролітних.

Встановлено концентрації NaCl і температури середовища інкубації клітин, при яких спостерігається зміна ходу часової залежності ГК еритроцитів ссавців.

Вперше показано кореляцію між виходом іонів K^+ з еритроцитів бика і кролика на етапі попередньої інкубації при 37 °С і рівнем ушкодження клітин при наступному охолодженні до 0 °С у всьому концентраційному діапазоні NaCl (0,15 ÷ 2,00 моль/л), а для еритроцитів людини і коня – лише в діапазоні 0,6 ÷ 1,2 та 0,6 ÷ 1,4 моль/л NaCl відповідно.

Одержано нові дані про зменшення об`єму еритроцитів ссавців при перенесенні в 1,20 моль/л NaCl або 0,86 моль/л сахарозу. При тривалій інкубації (до 120 хв) виявлено додаткове зниження об'єму (ще на 5-10%) еритроцитів всіх ссавців у NaCl, тоді як у сахарозі спостерігається збільшення об'єму еритроцитів бика і кролика, зменшення об'єму клітин людини і собаки та відсутність змін об'єму еритроцитів коня.

Вперше показано високу антигемолітичну активність хлорпромазину в умовах ГШ еритроцитів тварин, яка при 37 °С вище, ніж при 0 °С. Виявлено високу ефективність хлорпромазину в умовах ГК еритроцитів тварин, при цьому ефективні концентрації для еритроцитів різних видів ссавців неоднакові.

Практичне значення одержаних результатів. Одержані в роботі результати можуть бути використані при розробці середовищ кріоконсервування еритроцитів тварин, застосовані як основа для розробки нових підходів корекції осмотичної і температурної чутливості еритроцитів ссавців. Результати роботи можуть бути рекомендовані для використання у навчальному процесі учбових закладів по підготовці спеціалістів у різних галузях біології, зокрема кріобіології, мембранології.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним дослідженням здобувача. Автором самостійно сформульована мета і визначені задачі роботи, проведені експерименти, статистично оброблені результати, здійснено аналіз експериментальних даних, проведено пошук і аналіз наукової літератури, сформульовані висновки, що витікають з експериментальних даних. Роботи, що опубліковані в співавторстві з к.б.н. Шпаковою Н.М. і к.б.н. Орловою Н.В. та іншими співробітниками відділу кріофізіології клітини, відображують спільне планування і обговорення результатів. У опублікованих із співавторами працях особистий внесок здобувача полягає:

- у роботах [1-5, 7, 9-14, 22] у дослідженні концентраційних і температурних залежностей рівня ГШ і ГК еритроцитів ссавців;
- у роботах [4, 15] у мікрогематокритному дослідженні зміни об'єму еритроцитів;
- у роботах [11, 13, 19] у підготовці зразків для ЕПР спектрометрії;
- у роботах [6, 20, 21] у мікроскопічному дослідженні та фотографічній фіксації морфології еритроцитів;

- у роботах [7] у потенціометричному іонселективному дослідженні вивільнення іонів калію з еритроцитів;
- у роботах [12] у вивченні впливу інгібіторів іонтранспортних систем (уабаїну і фуросеміду) на рівень ГШ;
- у роботах [17] у дослідженні впливу обробки еритроцитів фенілгідразином та температури 49 °С на рівень ГК;
- у роботах [6,8,16,18] у дослідженні впливу катіонних і аніонних амфіфільних сполук на ГШ і ГК еритроцитів ссавців;

Апробація результатів дисертації. Результати роботи були представлені на Установчому з'їзді українського товариства клітинної біології (Львів, 2004); конференції молодих вчених «Холод в биологии и медицине» (Харків, 2004, 2006); 9-й Міжнародній конференції молодих вчених «Біологія – наука XXI века», (Пущино, 2005); I, III – V Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2005, 2007-2009); Міжнародній науковій конференції «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» VII З'їзд БСТФіБ (Мінськ 2006); IX Українському біохімічному з'їзді (Харків, 2006); IV з'їзді Українського біофізичного товариства (Донецьк, 2006); II з'їзді Українського товариства клітинної біології (Київ, 2007); конференції «Новые технологии в экспериментальной биологии и медицине» (Ростов-на-Дону, 2007); I Міжнародній конференції «Состояние воды в биологических и модельных системах» (Твер, 2007); конференції «Криоконсервация как способ сохранения биологического разнообразия» (Пущино, 2008).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 22 роботи, з них 7 – у наукових фахових журналах, 15 – у збірниках матеріалів конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 187 сторінках друкованого тексту і складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів власних досліджень і їх обговорення (3 розділи, що включають 6 підрозділів), аналізу й узагальнення результатів власних досліджень, висновків, списку використаної літератури, який містить 217 джерел (23 сторінки). Роботу проілюстровано 26 рисунками та 5 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження. Об'єктом дослідження були еритроцити зі свіжої або свіжоконсервованої донорської крові 5 видів ссавців: людина (Homo sapiens), собака (Canus familiaris), кінь (Equus caballus), бик (Bos taurus), кролик (Oryctolagus cuniculus). Кров дорослих чоловіків II групи була надана Харківською обласною станцією переливання крові, кров бика, собаки, коня та кролика – дослідним господарством Харківської державної зооветеринарної академії. Стать усіх експериментальних тварин – чоловіча. Після видалення плазми еритромасу тричі відмивали шляхом центрифугування (центрифуга ОПн-3У4.2, 3000 об/хв, 3 хв, $R_{ротора}$=90 мм) у 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатний буфер, pH 7,4) і зберігали у вигляді щільного осаду не більше двох годин при 0 °С. Лейкоцитарну плівку видаляли аспірацією.

При дослідженні ГШ 500 мкл осаду еритроцитів переносили в 5 мл фізіологічного розчину. З кожної проби по 50 мкл суспензії еритроцитів переносили в 1,0 мл розчину NaCl (з концентрацією 1,0÷4,0 моль/л) при температурі в інтервалі 0 ÷ 37 °С та інкубували протягом 10 хв (або від 1 до 120 хв при вивченні залежності від часу інкубації). Кінцевий

гематокрит суспензії складав 0,4 %.

При дослідженні ГК еритроцитів ссавців по 100 мкл суспензії еритроцитів з кожної проби переносили в 1,0 мл розчину NaCl (0,15 ÷ 2,00 моль/л) або сахарози (0,86 моль/л) та інкубували при температурі 37 °С 10 хв (або 1 ÷ 120 хв при вивченні впливу часу інкубації). Для наступного охолодження до 0 °С 100 мкл суспензії еритроцитів переносили в 1,0 мл розчину NaCl або сахарози відповідної концентрації та інкубували 10 хв (або 1-120 хв при вивченні впливу часу інкубації). При вивченні температурної залежності ГК еритроцитів змінювали температуру (в інтервалі 0 ÷ 37 °С), з якої починали охолоджувати або до якої охолоджували, залежно від умов експерименту.

Вміст гемоглобіну, що вийшов у супернатант, визначали спектрофотометричним методом на СФ-4А з проточною кюветою при довжині хвилі 543 нм. За 100 % приймали поглинання проби, в яку додавали детергент тритон Х-100 у концентрації 0,1 %.

Вивільнення іонів K^+ з еритроцитів визначали за допомогою іонселективного калієвого електрода ЕЛІС-121К та порівняльного електрода ЕВЛ-1М3.1, який заповнений насиченим при 20 °С розчином KCl, із застосуванням електролітичного ключа, заповненого розчином 1 моль/л Li_2SO_4, на універсальному іонометрі ЭВ-74. Вимірювання K^+ проводили в супернатанті суспензії еритроцитів (гематокрит 8%).

Відносний об'єм еритроцитів визначали мікрогематокритним методом. Суспензію еритроцитів з гематокритом 20% інкубували протягом певного часу (від 1 до 120 хв) при 37 °С, далі стандартний гематокритний капіляр заповнювали суспензією на 7/8 висоти. Капіляри центрифугували 5 хв у мікрогематокритній центрифузі МГЦ-8.

Хлорпромазин додавали у гіпертонічне середовище до внесення в нього еритроцитів: при ГК – в середовище, що мало температуру 0 °С; при ГШ – в середовище з температурою 0 або 37 °С. За ефективну концентрацію хлорпромазину в серії дослідів одного експерименту приймали середнє арифметичне значення концентрації хлорпромазину, яке відповідає мінімальному значенню гемолізу еритроцитів. Максимальна антигемолітична активність ($АГ_{макс}$) хлорпромазину в серії дослідів одного експерименту є середньою арифметичною величиною максимальної антигемолітичної активності хлорпромазину, яку розраховували за формулою: $АГ_{макс} = \frac{к - а}{к} \times 100\ \%$, де **к** – величина гемолізу еритроцитів у даних експериментальних умовах у відсутності хлорпромазину; **а** – мінімальна величина гемолізу еритроцитів у присутності хлорпромазину.

Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою тестів ANOVA та критерію Вілкоксона-Манна-Уітні. Кількість повторень у серії експерименту – не менше 6 у двох паралельних пробах. Експериментальні дані наведені (на графіках, в таблиці) як середнє арифметичне ± стандартне відхилення. Розходження між групами вважали статистично вірогідним при $P_U<0,05$.

Результати дослідження і їх обговорення

Гіпертонічний шок еритроцитів різних видів ссавців. Доцільним було виявити, чи особливості, які були встановлені при вивченні температурно-осмотичної чутливості еритроцитів людини [Гордиенко Е.А. и др., 1996], притаманні еритроцитам інших видів ссавців, або вони видоспецифічні. Для цього було досліджено рівень гемолізу еритроцитів ссавців (собака, кінь, бик, кролик, людина) у гіпертонічних середовищах з різними концентраціями NaCl при 37 °С (рис.1). У широкому діапазоні нефізіологічних

концентрацій NaCl еритроцити всіх експериментальних тварин мають низький рівень гемолізу (1 – 7 %). Концентрація NaCl у середовищі, при перевищенні якої спостерігається високий рівень гемолізу, складає 2,25; 2,50; 2,75; 2,75 и 3,25 моль/л для еритроцитів бика, коня, собаки, людини і кролика відповідно.

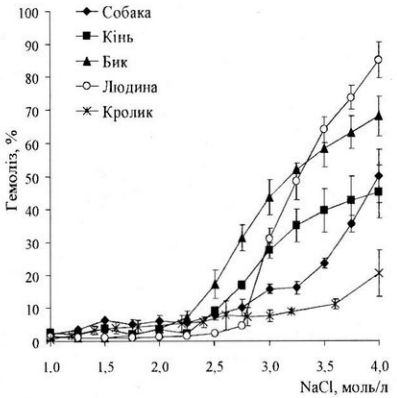


Рис. 1. Залежність рівня гемолізу еритроцитів ссавців від концентрації NaCl у середовищі при температурі 37 °С (час інкубації 10 хв).

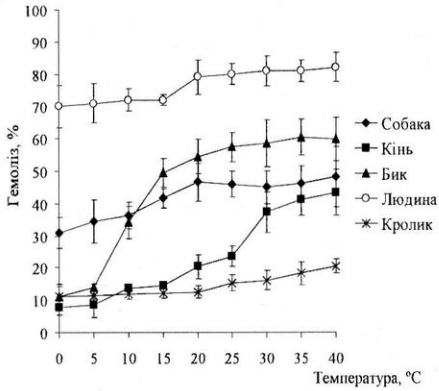


Рис. 2. Температурна залежність рівня ГШ еритроцитів ссавців у середовищі, що містить 4,0 моль/л NaCl (час інкубації 10 хв).

При підвищенні концентрації NaCl у зовнішньоклітинному середовищі до 4,0 моль/л рівень гемолізу еритроцитів ссавців наступний: 20% для клітин кролика, 45% – коня, 50% – собаки, 68% – бика, 85% – людини. Ці дані корелюють зі значеннями вагового співвідношення холестерину (Хл) до фосфоліпідів (Фл) [Garnier M. et al., 1984] та величинами коефіцієнту дифузійної проникності мембрани еритроцитів досліджуваних ссавців для води (r = - 0,957 і r = - 0,831 відповідно).

При температурі 0 °С рівень ГШ еритроцитів експериментальних ссавців нижче, ніж при 37 °С (рис. 2). При цьому для еритроцитів бика і коня рівень ГШ знизився приблизно в 5,0 разів, а для інших ссавців – в 1,2 – 1,8.

Зниження рівня ГШ еритроцитів дослідних ссавців при низькій температурі, імовірно, пов'язано з тим, що при 0 °С ускладнюється формування трансмембранних пор, які проникні для молекул гемоглобіну, через температурозалежне обмеження дифузії компонентів мембрани та підвищення щільності пакування ліпідів у латеральній площині [Гулевский А.К. и др., 1988; Белоус А.М., Грищенко В.И., 1994].

Гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів різних видів ссавців. ГК еритроцитів коня і собаки починає розвиватися при охолодженні від 37 до 0 °С у розчині NaCl з концентрацією вище 0,4 моль/л, а еритроцитів людини, бика і кролика – вище 0,6 моль/л (рис. 3). У середовищах з концентрацією NaCl 0,6 – 2,0 моль/л розвивається ГК еритроцитів бика і кролика тим вищий, чим більша концентрація солі. Рівень ГК еритроцитів людини і собаки зростає при збільшенні концентрації NaCl до 1,2 моль/л, а коня – до 1,4 моль/л; після чого рівень ГК знижується. У еритроцитів собаки зниження рівня гемолізу менш виражено.

Чутливості еритроцитів ссавців до ГК в середовищі, яке містить 1,2 моль/л NaCl, наступна: кролик – 26%, бик – 40%, людина – 80%, кінь – 80%, собака – 90%. Для еритроцитів бика

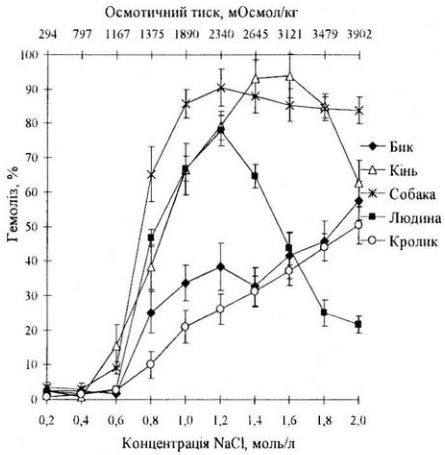


Рис. 3. Вплив різних концентрації NaCl на рівень гемолізу еритроцитів ссавців при їх охолодженні від 37 до 0 °С.

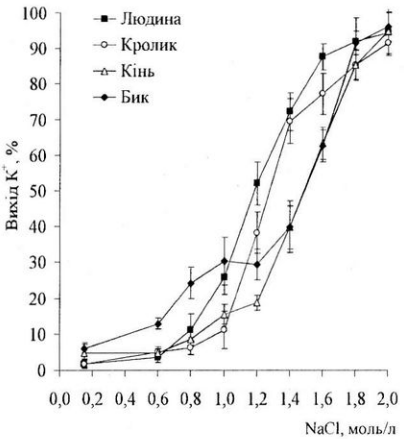


Рис. 4. Залежність виходу іонів K^+ з еритроцитів ссавців від концентрації NaCl у середовищі при 37 °С.

характерний значний вміст сфінгомієліну, еритроцитів кролика – високе значення вагового співвідношення Хл/Фл, крім того, мембрани еритроцитів обох видів ссавців збагачені фосфатидилетаноламіном. Відомо [Yawata Y. et al., 2003], що вищевказані особливості складу еритроцитарних мембран обумовлюють зниження їх текучості. Виходячи з того, що сенсибілізуючий вплив гіпертонічних розчинів до наступного охолодження еритроцитів пов'язаний з латеральним розподіленням ліпідів [Гордиенко Е.А. и др., 1996], можна вважати, що низька чутливість еритроцитів бика і кролика до ГК обумовлена низькою латеральною рухомістю компонентів їх мембран.

Вважають [Шпакова Н.М., Бондаренко В.А., 1992], що в гіпертонічних середовищах витік іонів K^+ з клітин відбувається у результаті утворення мембранних мікродефектів, які формуються або активуються під впливом підвищеної осмолярності середовища. Певно, на етапі охолодження еритроцитів відбувається зростання цих мікродефектів та, як наслідок, вихід молекул гемоглобіну.

Нами було оцінено вихід іонів K^+ з еритроцитів людини і тварин за допомогою метода іонселективної потенціометрії. Виявлено, що вихід іонів K^+ з еритроцитів зростає при збільшенні концентрації солі в середовищі і досягає практично максимального значення в розчині, що містить 2,0 моль/л NaCl (рис. 4).

Виявлено залежність між виходом іонів K^+ з еритроцитів на етапі попередньої інкубації при 37 °С і рівнем ушкодження клітин під час наступного охолодження до 0 °С: для еритроцитів бика і кролика у всьому концентраційному діапазоні (0,15 ÷ 2,00 моль/л NaCl), тоді як для еритроцитів людини і коня – в діапазоні 0,6 ÷ 1,2 і 0,6 ÷ 1,4 моль/л NaCl відповідно.

Збільшення тривалості інкубації від 1 до 120 хв у середовищі, що містить 1,2 моль/л NaCl, при 37 °С призводить до зниження рівня ГК еритроцитів собаки, людини, коня при

охолодженні до 0 °С, тоді як рівень гемолізу еритроцитів бика і кролика підвищується (рис. 5 А). В середовищі, яке містить 0,86 моль/л сахарозу, збільшення тривалості інкубації при 37 °С призводить до підвищення рівня ГК клітин усіх ссавців (рис. 5 Б).

Значення гемолізу еритроцитів людини і собаки після 20 хв інкубації в розчинах 1,2 моль/л NaCl і 0,86 моль/л сахарози однакові, при цьому осмотичний тиск цих розчинів відрізняється і дорівнює 2400 і 1000 мОсмоль/кг відповідно. Цей факт свідчить про те, що осмолярність середовища не є єдиним фактором, що визначає чутливість еритроцитів людини і собаки до ГК. У випадку еритроцитів бика, кролика і коня осмолярність середовища відіграє більш значну роль, тому що в розчині сахарози рівень гемолізу значно нижче, ніж у NaCl.

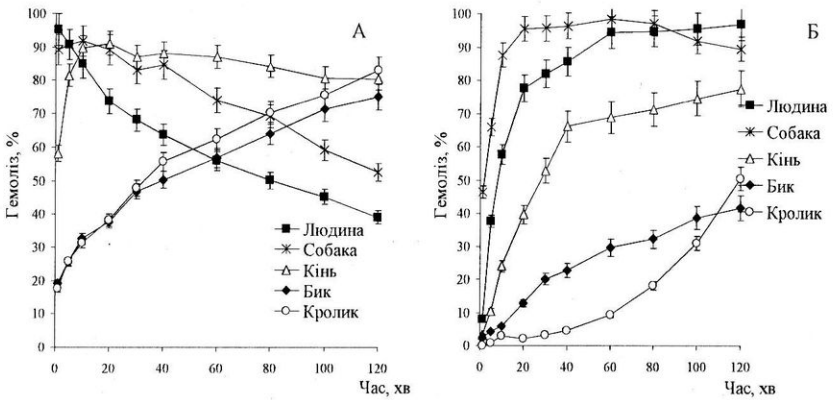


Рис. 5. Вплив часу інкубації при 37 °С на рівень гемолізу еритроцитів ссавців при охолодженні до 0 °С в різних середовищах: 1,2 моль/л NaCl (А), 0,86 моль/л сахароза (Б).

Доцільно було вивчити зміну в часі катіонної проникності мембрани еритроцитів різних видів ссавців при їх інкубації в 1,20 моль/л NaCl і 0,86 моль/л сахарозі при 37 °С (рис. 6) з метою порівняння з розвитком гемолітичного процесу при наступному охолодженні клітин до 0 °С (рис. 5). Одержані нами дані відносно проникності еритроцитів людини для іонів K^+ співпадають із результатами [Daw A. et al., 1973; Шпакова Н.М. и др., 1992]. Нами показано, що еритроцити коня і кролика подібно клітинам людини більш інтенсивно вивільняють іони K^+ в початковій фазі інкубації (1 ÷ 40 хв) у розчині 1,20 моль/л NaCl, а не в середовищі, що містить 0,86 моль/л сахарозу. Еритроцити бика (імовірніше за все, як клітини, що містять в якості домінуючого внутрішньоклітинного катіона Na^+, на відміну від еритроцитів вищезазначених тварин) демонструють іншу динаміку виходу іонів K^+ в обох середовищах і більш інтенсивне вивільнення з еритроцитів іонів K^+ на початкових етапах інкубації в сахарозному середовищі.

При порівнянні рис. 5 и 6 встановлено, що не існує універсальної для всіх ссавців залежності між вивільненням іонів K^+ на етапі попередньої інкубації при 37 °С в гіпертонічних середовищах, які містять NaCl або сахарозу, і рівнем гемолізу при наступному охолодженні клітин до 0 °С.

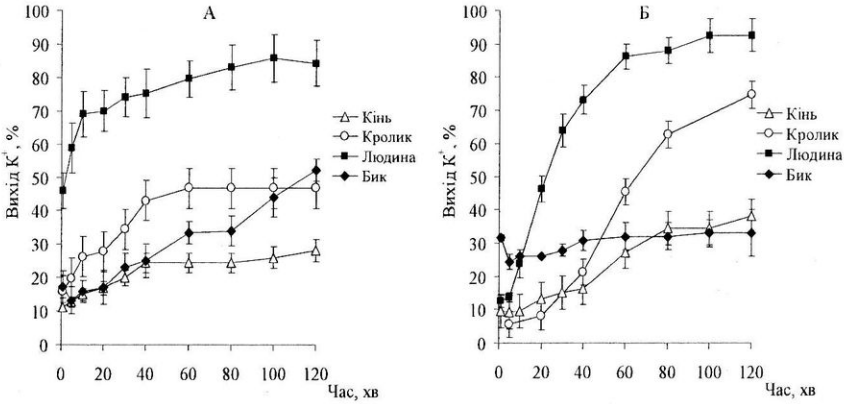


Рис. 6. Зміна в часі виходу іонів K^+ з еритроцитів ссавців при 37 °С у середовищах, які містять 1,20 моль/л NaCl (А) або 0,86 моль/л сахарозу (Б).

Для оцінки об'єму еритроцитів було проведено вимірювання гематокриту, який визначається як відносний об'єм клітин у гіпертонічних середовищах, що містять 1,20 моль/л NaCl або 0,86 моль/л сахарозу при 37 °С (рис. 7). Об'єм еритроцитів людини змінюється при тривалій інкубації в гіпертонічних середовищах при 37 °С, з цим може бути пов'язана зміна стійкості клітин до наступного охолодження [Шпакова Н. М. и др., 1992]. Припускається, що тривала інкубація при 37 °С в гіпертонічних розчинах NaCl призводить до входу зовнішньоклітинного Na^+ в еритроцити, що супроводжується меншим стисненням клітин й зняттям навантаження з мембрани та, як наслідок, зменшенням рівня ГК. Однак при тривалій інкубації при 37 °С в 1,2 моль/л NaCl об'єм клітин всіх експериментальних тварин зменшується (рис. 7), тоді як рівень ГК еритроцитів бика і кролика підвищується, а решти тварин – знижується (рис. 5 А). При неоднаковій зміні об'єму еритроцитів тварин в умовах тривалої інкубації в гіпертонічному розчині сахарози (рис. 7 Б) рівень ГК еритроцитів усіх тварин зростає (рис. 5 Б). Можна зробити висновок, що зміна об'єму еритроцитів протягом тривалої інкубації в гіпертонічних середовищах при 37 °С не визначає рівень гемолізу при наступному охолодженні клітин до 0 °С.

Після дослідження впливу тривалості інкубації, а також якісного та кількісного складу середовища на розвиток ГК еритроцитів ссавців було доцільно визначити роль температурного фактора в прояві ГК. Досліди виконували в двох варіантах: варіювали температуру 1-го етапу ГК в діапазоні 5 ÷ 37 °С при постійній температурі 2-го етапу (0 °С) (рис. 8 А) або змінювали температуру 2-го етапу (5 ÷ 37 °С) при незмінній температурі 1-го етапу (37 °С) (рис. 8 Б). Для еритроцитів собаки, як і для клітин людини, встановлено, що гемолітична дія високих концентрацій NaCl (1,2 моль/л) проявляється лише в умовах охолодження клітин до 0 °С від температури вище 10 °С, коня – 15 °С, бика і кролика – 25 °С (рис. 8 А) Нижня температурна межа для розвитку ГК при охолодженні від 37 °С складає для еритроцитів бика і кролика 10 °С, коня, собаки і людини – 15 °С (рис. 8 Б).

Проаналізувавши отримані температурні залежності для еритроцитів 5 видів ссавців (рис. 8), можна зробити висновок, що для прояву ГК необхідна зміна температури середовища на 15-27 градусів та обов'язкове охолодження клітин в температурному

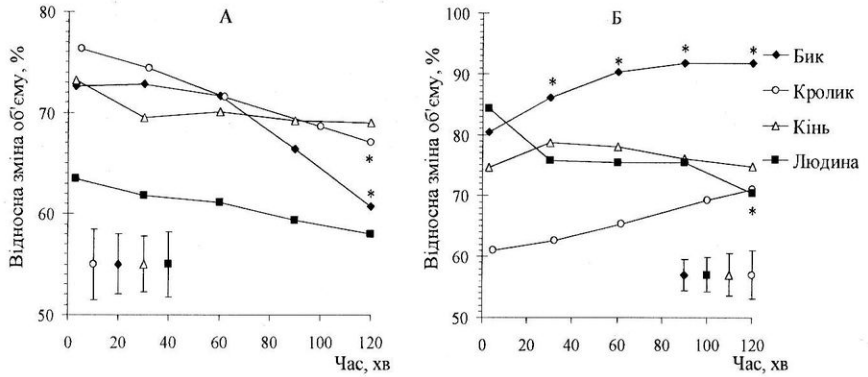


Рис. 7. Залежність об'єму еритроцитів ссавців (визначена мікрогематокритним методом) від тривалості інкубації в 1,20 моль/л NaCl (А) і 0,86 моль/л сахарозі (Б) при температурі 37 °С. За 100% приймали об'єм еритроцитів у фізіологічному розчині.

Примітки: * - відмінності вірогідні відносно рівня гемолізу в першій часовій точці при $P_U<0,05$.

інтервалі 20 – 15 °С.

При порівнянні температурних залежностей виходу іонів K^+ і рівня ГК в 1,2 моль/л NaCl еритроцитів людини (рис. 8 і 9) виявлено, що як вихід іонів K^+, так і гемолітичне пошкодження, різко зростають в діапазоні температур 10-15 °С і їх подальша зміна є синхронною. Таким чином, спостерігається деякий температурний перехід, після якого інтенсифікується втрата клітинами іонів K^+ і при наступному охолодженні до 0 °С – вивільнення гемоглобіну. Окрім еритроцитів людини такий перехід не виявлено ні у одного з досліджених ссавців. У еритроцитів кролика, як і у людини, вивільнення іонів K^+ відбувається синхронно зі зростанням рівня гемолізу, але рівень виходу K^+ більший рівня гемолізу. Для еритроцитів коня характерне (рис. 9) незначне збільшення виходу K^+ (на ~ 10 %) при суттєвому збільшенні рівня гемолізу з підвищенням температури першого етапу ГК. У випадку еритроцитів бика рівень виходу K^+ достовірно не змінюється при підвищенні температури, тоді як рівень гемолізу, як і у всіх досліджених ссавців, зростає при підвищенні температури першого етапу ГК. Еритроцити кролика і бика при сумірному або навіть більшому рівні виходу іонів K^+, в порівнянні з клітинами людини і коня, демонструють початок ГК при охолодженні від 30 °С, тоді як еритроцити людини і коня – вже від 15 і 20 °С відповідно. Імовірно, це обумовлено як особливостями ліпідного складу мембран еритроцитів бика і кролика (велике значення співвідношення Хл/Фл у кролика [Garnier M. et al., 1984] і значний вміст сфінгомієліну в еритроцитах бика [Crowell K.M. et al., 1989; Gold J.C. et al., 1990] в порівнянні з мембранами еритроцитів інших ссавців), так і незначним вмістом внутрішньоклітинного K^+ в еритроцитах бика [Bogner P. et al., 2002], оскільки для них домінуючим внутрішньоклітинним катіоном є Na^+.

Враховуючи різний вплив температури на вихід іонів K^+ з еритроцитів різних видів ссавців (при інкубації в розчині 1,2 моль/л NaCl) і при цьому односпрямованість змін рівня ГК при підвищенні температури першого етапу, можна зробити висновок, що втрата бар'єрної функції мембрани для K^+, мабуть, є необхідною, але не є достатньою умовою для розвитку ГК.

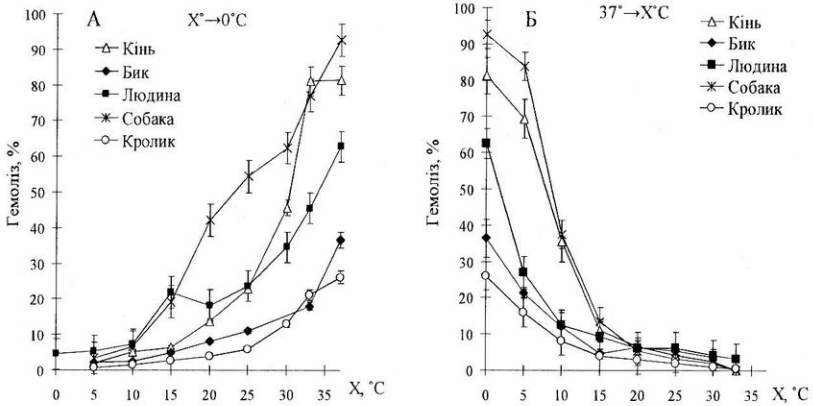


Рис. 8. Вплив температури на рівень ГК еритроцитів ссавців (1,2 моль/л NaCl):

А) X °C – температура, від якої еритроцити охолоджували до 0 °C;

Б) X °C – температура, до якої еритроцити охолоджували від 37 °C.

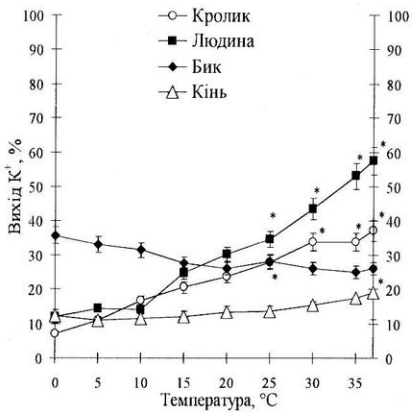


Рис. 9. Вихід іонів K^+ з еритроцитів ссавців при різних температурах середовища, яке містить 1,2 моль/л NaCl, після 10 хв інкубації.

У роботі [Takahashi T. et al., 1983] показано протилежний вплив різних концентрацій NaCl на рівень ГК еритроцитів людини при тривалій інкубації клітин при 37 °C: при тонічності середовища 1800–3000 мОсмол/кг спостерігається з часом зниження рівня кріогемолізу, а при осмолярності середовища нижче 1800 мОсмол/кг – збільшення. Доцільним було одержати подібні залежності для еритроцитів тварин. З рис. 10 видно, що при концентрації NaCl менше 1,2 моль/л для еритроцитів коня, менше 2,0 моль/л для еритроцитів бика і менше 3,0 моль/л для еритроцитів кролика рівень ГК зростав при збільшенні тривалості інкубації при 37 °C, а при більших концентраціях – знижувався.

ГК еритроцитів ссавців залежить не тільки від осмотичного тиску (рис. 3 і 10), але і від температури середовища (рис. 8), тому наступні експерименти проводили наступним чином: еритроцити ссавців після тривалої інкубації при різних температурах у середовищі, що містить 1,2 моль/л NaCl (або 2,2 моль/л для еритроцитів бика), охолоджували до 0 °C.

Як видно з рис. 11, після охолодження до 0 °C при збільшені часу інкубації клітин при 33 або 37 °C спостерігається зниження ГК еритроцитів людини. Інкубування клітин у діапазоні температур 15-28 °C призводить до зміни в зворотньому напрямку залежності ГК

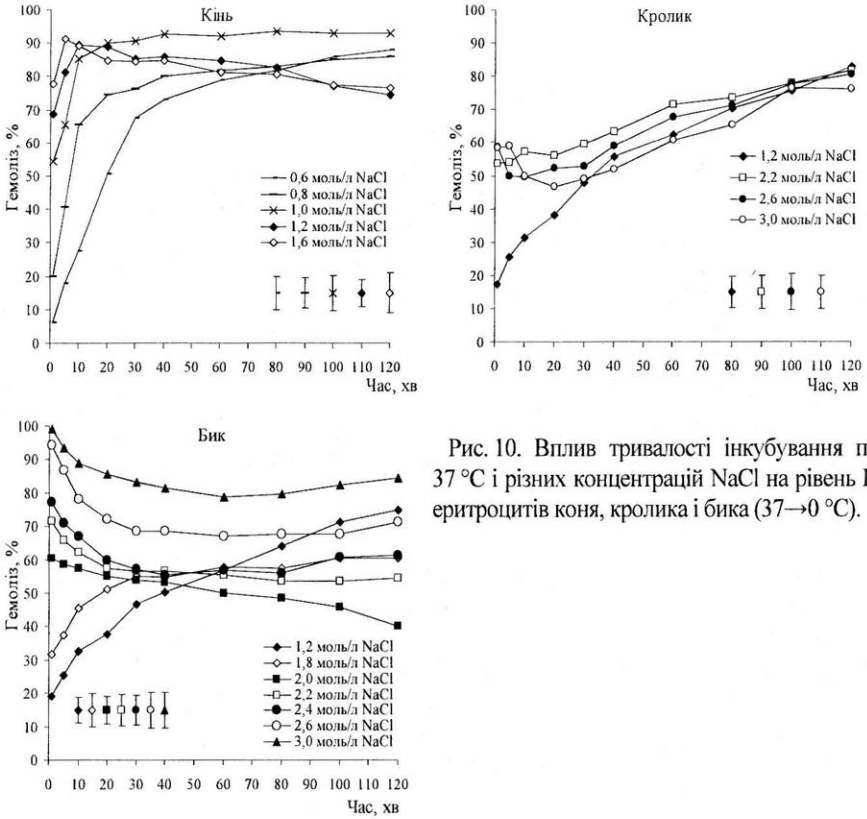


Рис. 10. Вплив тривалості інкубування при 37 °С і різних концентрацій NaCl на рівень ГК еритроцитів коня, кролика і бика (37→0 °С).

еритроцитів людини від часу інкубування. Зокрема, якщо клітини охолоджувати від 15 до 0 °С в середовищі, що містить 1,2 моль/л NaCl, спостерігається виражене збільшення рівня пошкодження клітин у часі. При температурі 37 °С характер залежності ГК від часу інкубування еритроцитів собаки схожий з отриманим для клітин людини (рис. 11). Слід відзначити, що в такому ж температурному діапазоні (15 − 28 °С), як і для еритроцитів людини, напрямок залежності ГК клітин собаки від часу інкубування змінюється на зворотній. У той же час при 15 °С динаміка зростання ГК еритроцитів собаки нижча, ніж людини. Подібні особливості залежності ГК від часу інкубування при різних температурах відмічені й для еритроцитів коня (рис. 11). Для одержання типової залежності ГК, яка спостерігається для клітин людини, собаки, коня у середовищі, що містить 1,2 моль/л NaCl, у випадку еритроцитів бика, які характеризуються більшою стійкістю до гіпертонічного впливу, було обране середовище з більш високою концентрацією NaCl. З рис. 11 видно, що при охолодженні еритроцитів бика від 37 до 0 °С в середовищі, що містить 2,2 моль/л NaCl, спостерігається зменшення значень ГК клітин з наступним виходом кривої на плато. У тому випадку, коли клітини бика охолоджували до 0 °С від 25 °С і нижче, характер залежності рівня гемолізу від часу інкубації змінюється на протилежний.

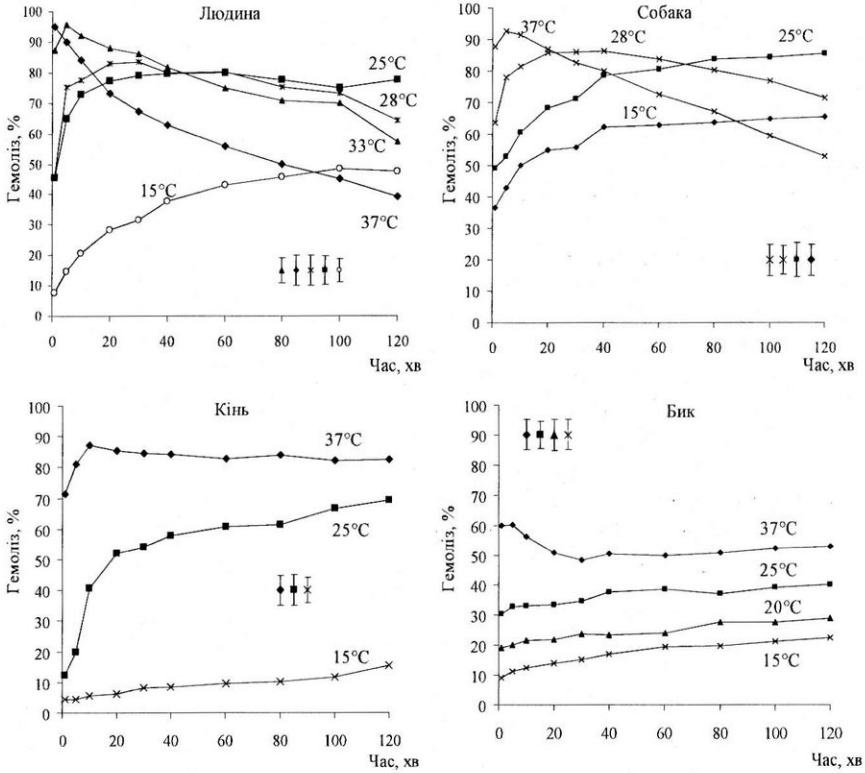


Рис. 11. Вплив тривалості інкубування еритроцитів ссавців при різних температурах, від яких клітини охолоджували до 0 °С, на гіпертонічний кріогемоліз (людина, собака, кінь - 1,2 моль/л, бик - 2,2 моль/л NaCl).

Таким чином, зміна характеру залежності ГК еритроцитів досліджених ссавців від часу інкубування може відбуватися не лише при зміні осмолярності, але й температури середовища. При певній комбінації концентрації NaCl і температури середовища (для кожного виду ссавців своєї) можна досягти для всіх тварин універсального виду залежності ГК від часу інкубування клітин перед охолодженням.

Ефективність хлорпромазину при гіпертонічному шоці і гіпертонічному кріогемолізі еритроцитів ссавців. В умовах ГШ еритроцити пошкоджуються в результаті дії гіперконцентрованого розчину солі, в умовах ГК зміна температури є фактором, що відповідає за руйнування клітин. У першому і другому випадку пошкодження клітин пов'язують з формуванням в їх плазматичних мембранах макроскопічних пор [Белоус А.М. и др., 1985]. Відомо, що амфіфільні сполуки проявляють модифікуючу дію на структуру плазматичної мембрани та протектують клітини [Schreier S. et al., 2000; Цымбал Л.В. и др., 2005]. Найбільш вивченим амфіфілом в плані впливу на еритроцитарну мембрану людини є хлорпромазин [Liber M.R. et al., 1984; Hagerstrand H. et al., 1991; Chen J.Y. et al., 2003].

Було досліджено вплив різних концентрацій хлорпромазину (ХПР) на чутливість еритроцитів тварин до ГШ (4,0 моль/л NaCl; 37 і 0 °С) і ГК (1,2 моль/л NaCl). ХПР знаходився в середовищі в момент дії стресового фактору на еритроцити.

Певні концентрації ХПР знижують рівень ушкодження еритроцитів усіх експериментальних тварин. Величина, на яку знижується рівень гемолізу, залежить від концентрації ХПР, виду ссавця та типу стресового фактора. Для порівняння протектуючої дії ХПР при ГШ і ГК еритроцитів різних видів тварин ми використовували поняття антигемолітичної активності та ефективної концентрації речовини.

З даних табл. 1 видно, що ХПР має високу антигемолітичну активність в умовах ГШ при 37 °С для еритроцитів усіх досліджених ссавців (на рівні 76-86 %), за винятком клітин кролика (19%). Слід відзначити, що при різних значеннях ефективних концентрацій ХПР величина максимальної антигемолітичної активності речовини для еритроцитів всіх досліджених ссавців приблизно однакова (за винятком кролика).

Таблиця 1

Значення ефективної концентрації і величин максимальної антигемолітичної активності ХПР в умовах гіпертонічного шоку (4,0 моль/л NaCl; 37 і 0 °С) та гіпертонічного кріогемолізу (1,2 моль/л NaCl; 37→0 °С) еритроцитів ссавців.

n=6

	Концентрації ХПР, при яких спостерігається мінімальний рівень гемолізу, мкмоль/л		
	ГШ, 37 °С	ГШ, 0 °С	ГК
Людина	60±5÷140±6	20±7÷40±6	100±6÷140±10
Собака	35±15÷180±28	20±0÷35±8	53±22÷110±20
Кінь	43±13÷133±29	8±4÷30±5	173±18÷308±9
Бик	70±10÷143±6	10±5÷27±3	20±0÷290±10
Кролик	48±8÷95±10	13±3÷30±3	50±10÷240±20

	Ефективні концентрації ХПР, мкмоль/л			$АГ_{макс}$, %		
	ГШ, 37 °С	ГШ, 0 °С	ГК	ГШ, 37 °С	ГШ, 0 °С	ГК
Людина	124 ±8	20 ±1	120 ±20	77* ±2	60 ±6	70#±3
Собака	110 ±5	27 ±1	82 ±21	80* ±9	38 ±2	44 ±9
Кінь	90 ±5	20 ±5	240 ±7	86 ±8	38 ±4	76#±2
Бик	70 ±5	20 ±5	155 ±5	76* ±7	20 ±9	70#±4
Кролик	70 ±5	20 ±5	145 ±10	19 ±9	49 ±2	70# ±3

Примітка: ГШ 37 °С – гіпертонічний шок при 37 °С в 4,0 моль/л NaCl;
ГШ 0 °С – гіпертонічний шок при 0 °С в 4,0 моль/л NaCl;
ГК – гіпертонічний кріогемоліз в 1,2 моль/л NaCl;
*, # – значення вірогідно не відрізняються при $P_U<0,05$.

Таким чином, не дивлячись на різний рівень початкового гіпертонічного пошкодження еритроцитів при 37 °С і неоднакові значення мінімального гемолізу в присутності ХПР, ефективність амфіфілу практично однакова для клітин усіх ссавців, за винятком кролика.

В умовах ГШ еритроцитів ссавців при температурі середовища 0 °С значення максимальної антигемолітичної активності ХПР нижче, ніж при фізіологічній температурі,

та знаходяться в діапазоні 20-63 %. Однак і в цьому випадку еритроцити кролика є винятком з загальної закономірності: антигемолітична активність ХПР при 0 °С зростає в порівнянні з 37 °С. Рівень антигемолітичної активності ХПР для еритроцитів людини, коня, бика і кролика при ГК складає 70-76 % і тільки у собаки дещо нижчий – 44%. Слід відзначити, що для еритроцитів людини ефективні концентрації ХПР при ГК (1,2 моль/л NaCl) і при ГШ (4,0 моль/л NaCl, 37 °С) мають однакові значення. Крім цього, для еритроцитів людини значення максимальної антигемолітичної активності ХПР подібні при різних стресах і температурах середовища. Для еритроцитів інших досліджених ссавців такої особливості не виявлено.

Слід відзначити, що значення ефективних концентрацій і максимальної антигемолітичної активності хлорпромазину при ГК (1,2 моль/л NaCl) для еритроцитів ссавців не корелює з показниками, які отримані в умовах ГШ (4,0 моль/л NaCl, 0 °С) (табл. 1). Цей факт свідчить про відмінність природи пошкоджуючого фактора і різний стан еритроциту (цитоскелет - мембранного комплексу, цитозолю, гемоглобіну і т.п.) в цих умовах.

З табл. 1 видно, що в умовах ГШ еритроцитів максимальна антигемолітична активність амфіфільних сполук нижча при температурі 0 °С, ніж при 37 °С. Якщо можливий механізм антигемолітичної дії ХПР в умовах ГШ еритроцитів пов'язаний з мембранним "розупорядкуванням", то будь-який вплив на мембрану, що стабілізує її структуру, буде призводити до зниження антигемолітичної активності ХПР. Зменшення антигемолітичної активности хлорпромазину при зниженні температури до 0 °С обумовлено тим, що низька температура є фактором, "ущільнюючим" структуру мембрани внаслідок "низькотемпературної усадки ліпідів", коли молекули зближуються в латеральній площині мембрани, і також змінюється агрегатний стан мембранного цитоскелета [Белоус А.М., Бондаренко В.А., 1982].

Дія ХПР може мати комплексний характер, викликаючи зміну структурного стану як ліпідних, так і білкових компонентів мембрани [Орлова Н.В., 2001], модифікуючи білок - ліпідні взаємодії [Minetti M. et al., 1984; Chen S. et al., 2006]. Вважають [Шпакова Н.М. и др., 1995], що ХПР може спричиняти антигемолітичну дію на клітини безпосередньо впливаючи на процес замикання мембранних пор, або опосередковано, змінюючи взаємодію цитоскелета з мембраною. Питання про місця вбудовування молекул ХПР в площині мембрани залишається не до кінця вивченим. В залежності від числа і різноманіття місць дії ХПР на мембрану змінюється і ефективність його дії. Можливо з цим пов'язані відмінності в ефективних концентраціях та величинах максимальної антигемолитичної активності ХПР в умовах різних видів стресу для еритроцитів ссавців.

ВИСНОВКИ

Проблема кріоконсервування еритроцитів залишається актуальною до цього часу і потребує нових практичних і теоретичних підходів для її розв'язання. У дисертаційній роботі наведено теоретичне, експериментальне узагальнення й нове рішення наукового завдання, спрямованого на вивчення основних факторів ушкодження еритроцитів при заморожуванні. Проведені в дисертаційній роботі дослідження акцентують увагу на особливостях розвитку осмотичної і температурної чутливості еритроцитів різних видів ссавців. Встановлено залежності пошкодження еритроцитів ссавців при гіпертонічному шоці

і гіпертонічному кріогемолізі від концентраційних, температурних і часових параметрів та оцінено вплив хлорпромазину на чутливість еритроцитів до зміни осмотичних і температурних умов середовища.

1. При 37 °С рівень гіпертонічного гемолізу еритроцитів у середовищі, що містить 4,0 моль/л NaCl, складає 20 % для клітин кролика, 45% – коня, 50% – собаки, 68% – бика, 85% – людини, що корелює з загальновідомими значеннями вагового співвідношення холестерину до фосфоліпідів і коефіцієнта водної дифузійної проникності еритроцитарних мембран цих ссавців.

2. Встановлено відмінності в чутливості еритроцитів різних видів ссавців до гіпертонічного кріогемолізу. У еритроцитів бика і кролика виявлено зростання рівня гіпертонічного кріогемолізу по мірі збільшення концентрації NaCl у середовищі до 2,0 моль/л. Еритроцитам людини, коня і собаки притаманний максимальний рівень гіпертонічного кріогемолізу в середовищах, які містять 1,2-1,4 моль/л NaCl, з наступним зниженням рівня пошкодження.

3. Виявлено відмінності температурних діапазонів розвитку гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів ссавців: нижня температурна межа при охолодженні від 37 °С складає 10 °С для еритроцитів бика і кролика, 15 °С для клітин коня, собаки і людини; а верхня температурна межа при охолодженні до 0 °С - 15 °С для еритроцитів людини і собаки, 20 °С для еритроцитів коня, 25 °С бика і кролика.

4. Залежність між вивільненням іонів K^+ еритроцитами, зміною їх клітинного об'єму при тривалій інкубації в розчинах 1,20 моль/л NaCl або 0,86 моль/л сахарози при 37 °С і динамікою гіпертонічного кріогемолізу не є універсальною для еритроцитів всіх досліджуваних ссавців.

5. Виявлена залежність між збільшенням виходу іонів K^+ на етапі попередньої інкубації клітин при 37 °С і підвищенням рівня гемолізу при подальшому охолодженні до 0 °С: для еритроцитів бика і кролика у всьому концентраційному діапазоні (0,15 ÷ 2,00 моль/л NaCl), тоді як для еритроцитів людини і коня в діапазоні 0,6 ÷ 1,2 та 0,6 ÷ 1,4 моль/л NaCl відповідно.

6. Універсальний характер залежності гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів різних видів ссавців від часу реалізується при варіюванні значень осмолярності і температури середовища. Зниження рівня гіпертонічного кріогемолізу з часом спостерігається для еритроцитів людини і собаки в 1,2 моль/л NaCl при 28 °С, коня – в 1,2 моль/л NaCl при 37 °С, бика – в 2,2 моль/л NaCl при 37 °С, кролика – в 3,0 моль/л NaCl при 37 °С.

7. Виявлена висока антигемолітична активність хлорпромазину в умовах гіпертонічного гемолізу еритроцитів коня, бика, собаки, людини (80%) і в умовах гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів людини, коня, бика і кролика (70%), при цьому діапазони ефективних концентрацій хлорпромазину для тварин різних видів відрізняються.

За матеріалами дисертації опубліковано наступні роботи:

1. Ершов С. С. Чувствительность эритроцитов млекопитающих к изменению температурных и осмотических условий среды / С. С. Ершов, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Пробл. криобиологии. – 2004. – № 3. – С. 51-57.

2. Єршов С. С. Порівняльний аналіз гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів різних видів тварин при зміні осмотичних і температурних умов середовища / С. С. Єршов, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Біологія тварин. – 2006. – Т. 8, № 1–2. – С. 123-129.

3. Шпакова Н. М. Гипертонический криогемолиз эритроцитов млекопитающих / Н. М. Шпакова, С. С. Ершов // Пробл. криобиологии. – 2006. – Т. 16, № 3. – С. 286-291.

4. Шпакова Н. М. Реакция эритроцитов человека, быка и кроля на изменение осмотических и температурных параметров среды / Н. М. Шпакова, С. С. Ершов, Н. В. Орлова // Вісник проблем біології і медицини. – 2007. – № 4. – С. 81-85.

5. Ершов С. С. Гипертонический криогемолиз эритроцитов млекопитающих в средах с различним катионным составом / С. С. Ершов, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Пробл. криобиологии. – 2007. – Т. 17, № 3. – С. 243-250.

6. Вплив катіонних та аніонних амфіфільних сполук на гіпертонічний кріогемоліз еритроцитів ссавців / С. С. Єршов, Н. А. Писаренко, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Фізіологічний журнал. – 2007. – Т. 53, № 6. – С. 78 - 84.

7. Шпакова Н. М. До питання про можливу кореляцію між виходом іонів K^+ і розвитком гемолітичного пошкодження еритроцитів ссавців в умовах гіпертонічного кріогемолізу / Н. М. Шпакова, С. С. Єршов, О. Є. Ніпот // Біологія тварин. – 2008. – Т. 10, № 1-2. – С.164-170.

8. Єршов С. С. Вплив хлорпромазину на чутливість еритроцитів ссавців до гіпертонічного шоку / С. С. Єршов, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Матеріали Установчого з'їзду Українського товариства клітинної біології, 25-28 квіт. 2004 р. : тези доповід. - Львів, 2004. – С. 63.

9. Єршов С. С. Порівняльне вивчення чутливості еритроцитів ссавців до холодового шоку / С. С. Єршов // Молодь і поступ біології : І міжнар. конф. студентів та аспірантів, 11–14 квіт. 2005 р. : тези доповід. – Львів, 2005. – С. 225 - 226.

10. Ершов С. С. Сравнительный анализ чувствительности эритроцитов млекопитающих к изменению осмотических условий среды / С. С. Ершов, Е. Е. Нипот, В. Н. Зуева // Биология-наука XXI века: IX междунар. Пущинская школа-конференция молодых ученых., 18-22 апр. 2005 г.: тезисы докл. – Пущино, 2005. – С. 161-162.

11. Связь явления холодового шока со структурными переходами в мембране эритроцитов собаки / С. С. Ершов, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова, Л. В. Цымбал // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : междунар. науч. конф. VII сьезд БООФиБ, 21-23 июня 2006 г. : тезисы докл. – Минск, 2006. – Т. 1. – С. 241 – 243.

12. Ершов С. С. Участие ионтранспортных систем в развитии чувствительности эритроцитов млекопитающих к холодовому шоку / С. С. Ершов, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // IX український біохімічний з'їзд, 24-27 жовт. 2006 р. : тези доповід. - Харків, 2006. – Т. 2. – С. 54.

13. Особенности динамической структуры цитоплазмы эритроцитов различных видов животных / С. С. Ершов, Л. В. Цымбал, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // IV з'їзд українського біофізичного товариства, 19-21 груд. 2006 р.: тези доповід. – Донецьк, – С. 49 – 50.

14. Ершов С. С. К вопросу о гипертоническом криогемолизе эритроцитов млекопитающих / С. С. Ершов // Проблемы криобиологии, Харьков, 2006. – Т. 16, № 4, – С. 441.

15. Єршов С. С. Залежність об'єму еритроцитів ссавців від часу інкубації та складу гіпертонічного середовища / С. С. Єршов // Молодь та поступ біології: ІІІ міжнар. наук. конф. студентів та аспірантів, 23-27 квіт. 2007 р. : тези доповід. – Львів, 2007. – С. 467-468.

16. Влияние додецил-β,D-мальтозида и хлорпромазина на гипертонический стресс эритроцитов лошади и кроля / Н. А. Писаренко, С. С. Ершов, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Новые технологи в экспериментальной биологии и медицине : конф., 10-12 окт. 2007 г. : тезисы докл. – Ростов-на-Дону, 2007. – С. 32.

17. Єршов С. С. Вплив попередньої інкубації при температурі 49 °С та обробки фенілгідразіном на рівень гіпертонічного шоку та гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів

ссавців / С. С. Єршов, Н. М. Шпакова // ІІ з'їзд українського товариства клітинної біології, 23-26 жовт. 2007 р. : тези доповід. – Київ, 2007. – С. 62.

18. Писаренко Н. А. Антигемолітична активність додецил-β,D-мальтозиду в умовах гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів бика / Н. А. Писаренко, С. С. Єршов, Н. В. Орлова // Матеріали ІІ з'їзду українського товариства клітинної біології, 23-26 жовт. 2007 р. : тези доповід. - Київ, 2007. – С. 81.

19. Влияние хлорида натрия на динамическую структуру водно-белковой матрицы цитоплазмы эритроцитов быка / Л. В. Цымбал, Н. М. Шпакова, С. С. Ершов, Н. В. Орлова // Состояние воды в биологических и модельных системах : I междунар. конф., 20-21 дек. 2007 г.: тезисы докл. – Тверь, 2007. – С. 40-44.

20. Єршов С. С. Вплив амфіфілів різних класів на морфологію еритроцитів ссавців / С. С. Єршов, Н. А. Писаренко, Н. М. Шпакова // Молодь та поступ біології : IV міжнар. наук. конф. студентів і аспірантів, 7-10 квіт. 2008 р. : тези подовід. – Львів, 2008. – С. 28-29.

21. Єршов С. С. Морфологія еритроцитів людини та тварин у фізіологічних умовах та при збільшенні тонічності середовища / С. С. Єршов, Д. І. Александрова, О. Є. Ніпот // Молодь та поступ біології: IV міжнар. наук. конф. студентів і аспірантів, 7-10 квіт. 2008 р.: тези доповід. – Львів, 2008. – С. 27-28.

22. Єршов С. Чутливість еритроцитів ссавців до дії різних видів стресу / С. Єршов, Д. Александрова, К. Семіонова // Молодь та поступ біології : V міжнар. наук. конф. студентів і аспірантів, 12-15 трав. 2009 р. : тези доповід. – Львів, 2009. – С. 73.

Анотація

Єршов С.С. «Осмотична та температурна чутливість еритроцитів ссавців». - Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за фахом 03.00.19. – кріобіологія. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2009.

Досліджували розвиток гіпертонічного шоку та гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів ссавців у залежності від змін осмотичних та температурних умов середовища, а також у присутності амфіфільної сполуки – хлорпромазину.

У роботі було використано еритроцити людини, бика, собаки, коня та кролика.

Виявлено, що в середовищі, що містить NaCl в концентрації 4,0 моль/л, при 37 °С максимальний рівень гемолізу спостерігається для еритроцитів людини і бика, мінімальний – еритроцитів собаки і кролика. Встановлено, що при температурі інкубації 0 °С чутливість еритроцитів тварин до гіпертонічного шоку значно нижча, ніж при 37 °С. Показано, що чутливість еритроцитів ссавців до гіпертонічного шоку не пов'язана з домінуючим внутрішньоклітинним катіоном і ступенем виходу іонів K^+ з еритроцитів.

Встановлено, що чутливість еритроцитів різних видів ссавців до гіпертонічного кріогемолізу різна. Визначено температурні діапазони розвитку гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів ссавців. Зазначено, що вихід іонів K^+ з еритроцитів та зміна їх клітинного об'єму при тривалій інкубації в електролітному та неелектролітному середовищах не є визначальними параметрами по відношенню до особливостей динаміки гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів всіх досліджуваних ссавців. Виявлена висока антигемолітична активність хлорпромазину в умовах гіпертонічного гемолізу і гіпертонічного кріогемолізу по відношенню до досліджуваних клітин. Показано, що універсальний характер залежності

гіпертонічного кріогемолізу еритроцитів різних видів ссавців від часу реалізується при варіюванні значень осмолярності і температури середовища.

Ключові слова: еритроцити ссавців (людина, бик, собака, кінь та кролик), гіпертонічний шок, гіпертонічний кріогемоліз, хлорпромазин, антигемолітична активність.

Аннотация

Ершов С.С. «Осмотическая и температурная чувствительность эритроцитов млекопитающих». – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.19. – криобиология. - Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 2009.

В представленной работе проведено исследование гипертонического стресса и гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих в зависимости от тоничности и температуры среды.

Цель данной работы – сравнительное изучение особенностей осмотической и температурной чувствительности эритроцитов млекопитающих (быка, собаки, лошади и человека); изучение особенностей проявления гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих при изменении времени, температуры и осмолярности среды инкубации клеток, а также влияния хлорпромазина на гипертонический криогемолиз и гипертонический шок исследуемых клеток.

Объектом исследования были эритроциты человека, быка, лошади, собаки и кролика.

Установлено, что чувствительность эритроцитов млекопитающих к изменению температурно-осмотических факторов среды характеризуется видоспецифичностью. Как при повышении концентрации NaCl в изотермических условиях, так и при изменении температуры инкубации клеток животных в 4,0 моль/л NaCl минимальной чувствительностью обладают эритроциты кролика, а максимальной – эритроциты быка. Гипертоническая чувствительность эритроцитов человека существенно зависит от тоничности среды и слабо зависит от температуры, в отличие от эритроцитов лошади и быка, чувствительность которых к гипертоническому шоку существенно зависит от температуры. В условиях гипертонического криогемолиза как при повышении концентрации NaCl в среде, так и при изменении температуры инкубации клеток на первой и второй его стадии минимальной чувствительностью обладают эритроциты быка и кролика, а максимальной – эритроциты собаки.

В работе оценен выход калия из эритроцитов человека и животных при их инкубации в электролитной (NaCl) и неэлектролитной (сахароза) средах. Показано, что выход ионов K^+ из эритроцитов увеличивается при повышении концентрации соли в среде и достигает практически максимального значения в растворе, который содержит 2,0 моль/л NaCl. Выявлена зависимость между выходом ионов K^+ из эритроцитов на этапе предварительной инкубации эритроцитов при 37 °С и уровнем повреждения эритроцитов во время последующего охлаждения до 0 °С, однако она не является универсальной для всех исследуемых млекопитающих. Полученные в работе результаты свидетельствуют об отсутствии корреляции между внутриклеточным содержанием ионов калия и чувствительностью эритроцитов к ГК. Показано, что влияние температуры и тоничности среды на уровень ГК не зависит от степени утраты мембраной эритроцитов млекопитающих

барьерных свойств для ионов K^+, а, скорее всего, определяется изменением состояния цитоскелет-мембранного комплекса.

Установлены температурные интервалы, в которых развивается гипертонический криогемолиз эритроцитов различных видов млекопитающих. Показан универсальный характер зависимости гипертонического криогемолиза эритроцитов разных видов млекопитающих от времени, который реализуется при варьировании значений осмолярности и температуры среды инкубации.

Показано, что в условиях гипертонического криогемолиза и гипертонического шока эритроцитов млекопитающих хлорпромазин проявляет высокую антигемолитическую активность. При этом диапазон эффективных концентраций и максимальная антигемолитическая активность амфифильного соединения различны для эритроцитов разных видов млекопитающих.

Ключевые слова: эритроциты млекопитающих (человека, бык, собака, лошадь и кролик), гипертонический шок, гипертонический криогемолиз, хлорпромазин, антигемолитическая активность.

Annotation

Ershov S.S. "Osmotic and temperature sensitivity of mammalian erythrocytes". – Manuscript.

Dissertation for the candidate of biological science degree (PhD equivalent) in specialty 03.00.19. – Cryobiology. – Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2009.

There was studied the development of hypertonic shock and hypertonic cryohemolysis of mammalian erythrocytes depending on the changes in osmotic and temperature conditions of an environment, as well as in the presence of amphiphilic compound, chlorpromazine.

Human, bovine, canine, equine and rabbit erythrocytes were used in the research.

It has been revealed that in 4,0 mol/l NaCl containing medium at 37 °C the maximum level of hemolysis was found for human and bovine erythrocytes and the minimum one for those of dog and rabbit. It has been established that at incubation temperature of 0 °C the sensitivity of animal erythrocytes to hypertonic shock is significantly lower if compared with 37 °C. The sensitivity of mammalian erythrocytes to hypertonic shock has been shown to be not related to dominating intracellular cation and the yield rate of K^+ ions out of erythrocytes.

The sensitivity of erythrocytes of different mammalian species to hypertonic cryohemolysis has been found to be different. The temperature ranges of the development of hypertonic cryohemolysis of mammals have been determined. It has been noted that yield of K^+ ions out of erythrocytes and change of their cellular volume during lasting incubation in electrolyte and non-electrolyte media is not decisive in respect to the peculiarities of the dynamics of hypertonic cryohemolysis of the erythrocytes of all the studied mammals. High antihemolytic activity of chlorpromazine under hypertonic shock and hypertonic cryohemolysis in respect to the investigated cells has been revealed. It has been shown that the generality of dependence of erythrocyte hypertonic cryohemolysis of different mammalian species on time is realized when varying the values of environmental osmolarity and temperature.

Key words: mammalian erythrocytes (human, bovine, canine, equine and rabbit), hypertonic shock, hypertonic cryohemolysis, chlorpromazine, antihemolytic activity.

Відповідальний за випуск д.б.н, проф. Г. О. Бабійчук

Формат 60х90/16. Ум. друк. арк. 0,9. Тир. 100 прим. Зам. № 296-09.
Підписано до друку 10.11.09. Папір офсетний. Друк різографія.

Надруковано з макету замовника СПД ФО Бровін О.В.
м. Харків, майдан Свободи, 7. Т. (057) 758-01-08, (8066) 822-71-30
Свідоцтво про внесення суб'єкта до Державного реєстру
видавців та виготовників видавничої продукції серія ДК № 3587 від 23.09.09 р

СТИЛЬ-ИЗДАТ
ТИПОГРАФИЯ