МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

СУЧАСНІ ДОСЯГНЕННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ ТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ



MODERN ACHIEVEMENTS OF PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

ЗБІРНИК НАУКОВИХ ПРАЦЬ

ХАРКІВ
2016

ISSN 2519-2655
УДК 615.1
С 89

Редакційна колегія:
академік НАН України Черних В.П., проф. Гладух Є.В.,
проф. Стрельников Л.С., проф. Половко Н.П., доц. Манський О.А.,
доц. Калюжна О.С., доц. Шпичак О.С.

С 89 **Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології** : збірник наукових праць. – Х.: Вид-во НФаУ, 2016. – 764 с.
ISSN 2519-2655

Збірник містить матеріали V Науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю «Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології» (18 листопада 2016 р.).

Розглянуто теоретичні та практичні аспекти розробки, виробництва, контролю якості, стандартизації та реалізації лікарських засобів на сучасному етапі.

Для широкого кола магістрантів, аспірантів, докторантів, співробітників фармацевтичних та біотехнологічних підприємств, фармацевтичних фірм, викладачів вищих навчальних закладів.

Редколегія не завжди поділяє погляди авторів статей
Автори опублікованих матеріалів несуть повну відповідальність за підбір, точність наведених фактів, цитат, економіко-статистичних даних, власних імен та інших відомостей
Матеріали подаються мовою оригіналу

ISSN 2519-2655
УДК 615.1
©НФаУ, 2016

УДК 57.043:612.111.57.083.332

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ КРИОПОВРЕЖДЕНИЯ НА ЭРИТРОЦИТЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Мазур А.А., Шапкина О.А., Нипот Е.Е.
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
г. Харьков, Украина

Введение. Во время размораживания криоконсервированного биологического материала одним из основных повреждающих факторов выступает снижение осмоляльности среды, приводящее впоследствии к постгипертоническому лизису. При изучении факторов криоповреждения широко используют модельные эксперименты. В частности, действие постгипертонии на эритроциты (как один из факторов криоповреждения) моделируют перенесением клеток из гипертонической среды (среда дегидратации) в изотоническую (среда регидратации) при положительных температурах [1].

Цель исследования. Цель работы – сравнительный анализ чувствительности эритроцитов быка, барана и коня к действию постгипертонии при температурах 0 и 37 °С.

Методы исследования. В исследованиях использовали эритроциты, полученные из крови быка, барана и коня, заготовленной на гемоконсерванте «Глюгицир» («Биофарма», Украина). 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, 1986). Эритроциты выделяли по стандартной методике [1] и хранили в виде плотного осадка не более 4 ч при температуре 0 °С. Все среды были приготовлены на фосфатном буфере (0,01 моль/л), pH 7,4.

Постгипертонический лизис эритроцитов осуществляли путем перенесения клеток из среды дегидратации (1,0 – 2,5 моль/л NaCl) в среду регидратации (0,15 моль/л NaCl) при температурах 0 и 37°С. Временную зависимость постгипертонического лизиса эритроцитов получали путем варьирования продолжительности инкубирования клеток от 1 до 60 мин в среде дегидратации.

Уровень гемолиза эритроцитов измеряли спектрофотометрическим методом при длине волны 543 нм и рассчитывали в процентах по отношению к 100% гемолизу. За 100% было принято поглощение пробы, в которую был добавлен тритон X-100 («Merck», Германия) в концентрации 0,1%. Осмоляльность растворов веществ определяли криоскопическим методом с использованием осмометра «ОМКА-1Ц-01» (Украина).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы «Statistica 6.0» («StatSoft Inc.», США). Экспериментальные результаты представлены в виде среднеарифметического значения (M) ± среднеквадратическая ошибка среднего (m). Для проверки статистической

значимости различий исследуемых числовых показателей использовали t-критерий Стьюдента.

Основные результаты. При варьировании продолжительности инкубирования эритроцитов быка, барана и коня в среде, содержащей 1,75 моль/л NaCl, от 1 до 60 мин, установлено, что основные изменения уровня постгипертонического гемолиза клеток происходят в течение 20 мин. Это характерно для обоих температурных режимов (37 и 0 °С). Исходя из полученных результатов, в последующих экспериментах клетки инкубировали в среде дегидратации 20 мин.

Из результатов, представленных в табл. 1, видно, что во время инкубирования клеток при 37 °С эритроциты быка и коня характеризуются постепенным развитием постгипертонического лизиса в диапазоне концентраций NaCl 1,25 – 1,75 моль/л в среде дегидратации, а клетки барана – резким увеличением уровня постгипертонического гемолиза. При использовании в качестве среды дегидратации 1,75 моль/л NaCl уровень постгипертонического гемолиза эритроцитов коня и барана значительно выше (в 1,8 и 2 раза соответственно) по сравнению с аналогичным показателем для клеток быка. Таким образом, при 37 °С эритроциты быка наиболее устойчивы к действию постгипертонии.

Таблица 1

Значения постгипертонического лизиса эритроцитов млекопитающих при различных концентрациях хлорида натрия в среде дегидратации (37 °С)

Концентрация NaCl, моль/л	Гемолиз, %		
	эритроциты быка	эритроциты барана	эритроциты коня
1	2,7 ± 0,3	1,9 ± 0,3	14,0 ± 1,0 *
1,25	4,3 ± 0,6	3,9 ± 0,5	34,3 ± 2,3 *
1,5	13,6 ± 1,9	29,8 ± 1,8 *	54,0 ± 0,2 *
1,75	38,5 ± 3,3	78,1 ± 2,3 *	72,9 ± 2,3 *
2	69,4 ± 3,3	92,0 ± 0,8 *	93,8 ± 2,2 *
2,25	81,8 ± 2,0	91,8 ± 4,2 *	94,1 ± 0,9 *
2,5	88,7 ± 2,7	92,9 ± 1,8	95,2 ± 1,8

* – статистически значимые различия по сравнению с клетками быка, $p < 0,05$

Как видно из предоставленных данных (см. табл. 2), при температуре 0 °С эритроциты барана и коня характеризуются резким увеличением уровня постгипертонического гемолиза в диапазоне концентраций NaCl 1,25 – 1,75 моль/л в среде дегидратации, а эритроциты быка – постепенным развитием в указанном интервале. При использовании 1,75 моль/л NaCl в качестве среды дегидратации эритроциты млекопитающих по мере роста постгипертонического гемолиза можно расположить в ряду: баран < бык < конь. Следовательно, наиболее устойчивыми к действию постгипертонии при 0 °С являются эритроциты барана.

Таблица 2

Значения постгипертонического лизиса эритроцитов млекопитающих при различных концентрациях хлорида натрия в среде дегидратации (0°С)

Концентрация NaCl, моль/л	Гемолиз, %		
	эритроциты быка	эритроциты барана	эритроциты коня
1	3,9 ± 0,5	2,2 ± 0,6	8,9 ± 3,2 *
1,25	13,6 ± 1,0 *	3,9 ± 0,6	19,6 ± 1,0 *
1,5	43,9 ± 4,5 *	18,7 ± 0,7	34,2 ± 1,3 *
1,75	62,0 ± 1,6 *	51,2 ± 0,7	71,4 ± 1,4 *
2	78,0 ± 3,3 *	86,3 ± 1,8	94,6 ± 2,2 *
2,25	85,8 ± 2,9	91,6 ± 4,1	96,3 ± 0,5
2,5	90,9 ± 2,8	93,2 ± 2,0	96,2 ± 0,1

* – статистически значимые различия по сравнению с клетками барана, $p < 0,05$

Как видно из данных, предоставленных в табл. 1 и 2, при концентрациях NaCl, превышающих 2,0 моль/л, уровень постгипертонического гемолиза эритроцитов быка, коня и барана достигает значения 90% при обоих температурных режимах.

Следует отметить, что для эритроцитов коня значения постгипертонического лизиса выше, и они в меньшей степени зависят от температуры, чем клетки быка и барана (см табл. 1 и 2). Известно, что эритроциты коня отличаются отсутствием в цитоскелете белка полосы 4.2, а также параметрами организации спектриновой сети [4]. Это оказывает влияние на механические свойства мембраны и может служить причиной повышенной чувствительности эритроцитов коня к растяжению во время резкого снижения осмоляльности среды.

Постгипертонические повреждения эритроцитов быка и барана зависят от температуры. Это позволяет предположить, что ответственность за постгипертоническое повреждение несёт фосфолипидная часть мембраны, которая чувствительна к температурному воздействию. Поскольку особенности фосфолипидного состава мембран эритроцитов быка и барана [2, 3] не позволяют объяснить столь значительную разницу в температурной чувствительности этих клеток к действию постгипертонии, можно предположить, что ведущую роль в формировании повреждений играет организация мембраны, а именно чередование белок-липидных кластеров в мембранах этих клеток.

Выводы. Таким образом, обнаруженные различия в уровне постгипертонического повреждения эритроцитов быка, барана и коня позволяют предположить участие нескольких критериев в развитии чувствительности клеток этих млекопитающих к действию постгипертонии. Кроме фосфолипидного состава мембраны, организации цитоскелет-мембранного комплекса, определенную роль могут играть геометрические характеристики эритроцитов разных видов млекопитающих [2, 5].

Список литературы

1. Особенности проявления постгипертонического лизиса эритроцитов некоторых млекопитающих / Е. А. Семионова, Н. А. Ершова, С. С. Ершов [и др.] // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, № 1. – С. 73-83.

2. Шпакова Н.М. Температурна та осмотична стійкість еритроцитів різних видів ссавців: Автореф. дис. ... д-ра біол.наук. – Харків, 2014. – 44 с.

3. Al-Qarawi A.A. Lipid concentrations in erythrocyte membranes in normal, starved, dehyrated and rehydratedcamels (Camelus dromedarius), and in normalsheep (Ovis aries) and goats (Capra hircus) / A.A. Al-Qarawi, H.M. Mousa // Eur. J. Arid Environ. – 2004. –Vol. 59, № 4.– P. 675–683.

4. Guerra-Shinohara E. M. The erythrocyte cytoskeleton protein 4.2 is not demonstrable in several mammalian species / E. M. Guerra-Shinohara, O. C. Barretto // Braz. J. Med. Biol. Res. –1999. –Vol. 32, № 6. – P. 683-687.

5. Lang F. Erythrocytes: Physiology and Pathophysiology / Lang F., Föller M. – London: Imperial College Press, 2012. – 443 p.