Корисна модель належить до галузі кріобіології і кріомедицини і може бути використана при низькотемпературному консервуванні біологічних об'єктів.

Відомий спосіб визначення температурних умов інкубування еритроцитів людини і тварин з ПЕО-1500, згідно з яким еритроцити інкубують з ПЕО-1500 при різних температурах, потім здійснюють їх деструкцію шляхом заморожування клітинної суспензії до -196 °С і наступного відігріву при 42 °С, далі вимірюють рівень гемолізу [1].

Основним недоліком даного способу є те, що деструкцію еритроцитів здійснюють шляхом заморожування-відігріву, що робить спосіб складним, тривалим і таким, що потребує значних матеріальних витрат, пов'язаних із застосуванням рідкого азоту і спеціального обладнання.

Задачею корисної моделі є створення такого способу визначення температурних умов інкубування еритроцитів з ПЕО-1500, в якому би, шляхом заміни методу деструкції клітин, забезпечувалася можливість спростити спосіб і скоротити час його здійснення, а також знизити матеріальні витрати.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі визначення температурних умов інкубування еритроцитів з ПЕО-1500, який включає інкубування еритроцитів з ПЕО-1500 при досліджуваних температурах, їх деструкцію при відповідних температурах і визначення рівня гемолізу, згідно з корисною моделлю, деструкцію клітин здійснюють шляхом інкубування еритроцитів у розчині, що містить 4,0 М NaCl.

Вибір 4,0 М NaCl обумовлений рядом причин. По-перше, при використанні гіпертонічного розчину, концентрація NaCl у якому нижче за 4,0 М (3,0-3,5 М), падає точність способу за рахунок зростання помилки визначення гемолізу. По-друге, розчин з концентрацією NaCl вище за 4,0 М (4,5-5,0 М) близький до насичених, і тому при температурах, що є близькими до 0 °С, спостерігається випадіння солі в осад у результаті перенасиченості розчину.

Проведення деструкції в 4,0 М NaCl дозволяє спростити спосіб і скоротити час його здійснення, оскільки процедура інкубування еритроцитів у розчині NaCl не є складною і займає лише 5 хв., в той час як у прототипі -20 хв. Крім того, такий метод деструкції не потребує спеціального обладнання і матеріалів, що знижує матеріальні витрати.

Спосіб здійснюють таким чином.

Еритроцити, тричі відмиті фізіологічним розчином, змішують з розчинами ПЕО-1500, приготовленими на фізіологічному розчині, pH 7,4, інкубують при температурах 37 і 0 °С протягом 2 хв., потім при відповідних температурах переносять у розчин, що містить 4,0 М NaCl. Кінцевий гематокрит складає 0,4 %. Після 5 хв. інкубації проби центрифугують і визначають рівень гемолізу спектрофотометрично при довжині хвилі 543 нм.

Приклад

Еритроцити людини тричі відмивали фізіологічним розчином (150 мМ NaCl, 5 мМ фосфатний буфер, pH 7,4) від плазми і формених елементів шляхом центрифугування при 1500 g протягом 3 хв. і зберігали у вигляді осаду при 0 °С протягом 2 годин. До 50 мкл осаду еритроцитів додавали 0,5 мл розчину ПЕО-1500 (кінцева концентрація 15 %). Інкубування суспензії здійснювали при 37 і 0 °С протягом 2 хв. Потім 50 мкл цієї суспензії при відповідних температурах 37 і 0 °С додавали до 1 мл розчину, що містив 4,0 М NaCl. Кінцевий гематокрит складав 0,4 %. Після 5 хв. інкубації при 37 і 0 °С проби центрифугували. Далі методом спектрофотометрії при довжині хвилі 543 нм визначали гемоліз за кількістю гемоглобіну в надосадку, який виражали у відсотках по відношенню до 100 % гемолізу еритроцитів у присутності детергенту тритона Х-100 (кінцева концентрація 0,1 %).

Аналогічно здійснювали спосіб для еритроцитів бика.

Одержані результати наведені в Таблиці. З даних таблиці видно, що при 0 °С рівень гемолізу еритроцитів людини і бика у розчині, що містить 4,0 М NaCl, є менший, ніж при температурі 37 °С. Це свідчить про те, що оптимальною температурою інкубування еритроцитів з ПЕО-1500 є температура 0 °С.

Для перевірки результатів, що були отримані пропонованим способом, визначали температурні умови інкубування еритроцитів людини і бика з ПВО-1500 за прототипом [1].

З даних, наведених у Таблиці, видно, що результати, отримані при перенесенні еритроцитів у розчин 4,0 М NaCl, відповідають даним, що були отриманні при заморожуванні - відігріві клітин. Це свідчить про те, що пропонований спосіб, як і прототип, дозволяє однозначно оцінювати ефективність температур інкубування еритроцитів з ПЕО-1500, але при цьому він є більш простим, потребує в 4 рази менше часу і дозволяє значно знизити матеріальні витрати.

Таблиця

Рівень гемолізу (%) еритроцитів людини і бика після деструкції (n=10)

	Заявлений спосіб		За прототипом	
	37 °С	0 °С	22 °С	0 °С
Еритроцити людини	36±6	26±5	11,8±3,8	3,0±0,3
Еритроцити бика	60±7	9±3	8,2±2,6	2,0±0,2

Джерела інформації:

1. Денисова О. М., Жегунов Г. Ф., Бабійчук Л. О. Кріоконсервування еритроцитів тварин під захистом поліетиленоксиду // Біологія тварин. - 2004. - Т. 6, № 1-2 – С. 104-110.