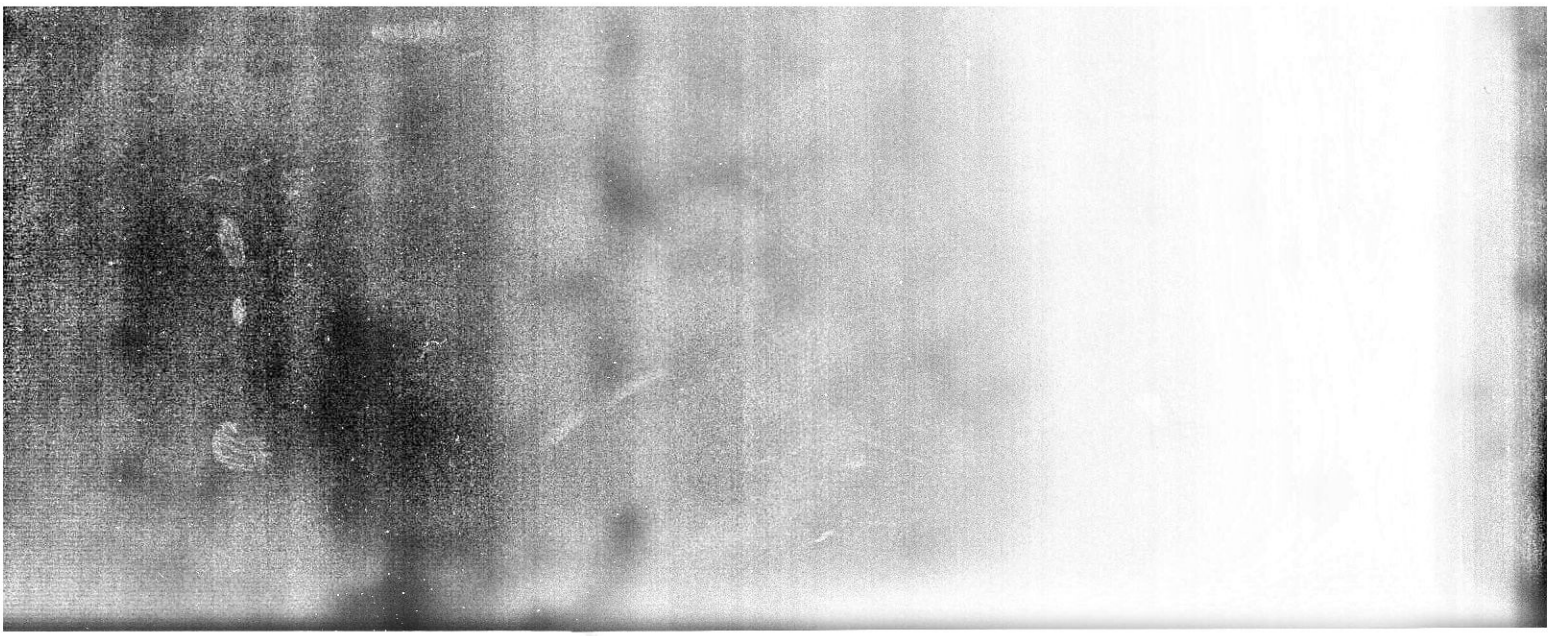
ВЫСОКИЕ ТЕХНОЛОГИИ, ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ФИЗИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

Том 1



Сборник трудов
Под редакцией А.П. Кудинова, Б.В. Крылова

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
2010



ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ им. И.П. ПАВЛОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

ИНСТИТУТ ОПТИКИ АТМОСФЕРЫ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

ООО "ИНСТИТУТ ПРИКЛАДНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
И ТЕХНОЛОГИЙ"

ВЫСОКИЕ ТЕХНОЛОГИИ, ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ФИЗИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

PhysioMedi

Том 1

СБОРНИК ТРУДОВ
ПЕРВОЙ МЕЖДУНАРОДНОЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
"ВЫСОКИЕ ТЕХНОЛОГИИ, ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
И ПРИКЛАДНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
В ФИЗИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ"

23–26.11.2010, Санкт-Петербург, Россия

Под редакцией А.П. Кудинова, Б.В. Крылова

Санкт-Петербург
Издательство Политехнического университета
2010

ББК 5:28
В 93

Рецензенты:
Член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук *Дворецкий Джан Петрович*
Доктор биологических наук, профессор *З.И. Крутецкая*

Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине. Т. 1 : сборник трудов Первой международной научно-практической конференции "Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине". 23–26 11.2010, Санкт-Петербург, Россия / под ред. А.П. Кудинова, Б.В. Крылова. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2010. – 253 с.

ISBN 978-5-7422-2799-1

В первом томе сборника трудов "Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине", составленного из материалов Первой международной научно-практической конференции "Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине", приводятся результаты исследований по широкому спектру научно-исследовательских и технологических работ в области биологии, физиологии, медицины, фармакологии и здравоохранения, обсуждаются механизмы управления развитием и интенсификацией работ по внедрению высоких технологий в медицинской диагностике, в лечении, профилактике заболеваний, технологий оздоровления и увеличения продолжительности жизни человека. Рассматриваются вопросы подготовки специалистов высшей квалификации в рассматриваемых областях науки, практики и преподавания.

Расширенный и комплексный научный анализ позволяют оценить состояние и перспективы работ в области фундаментальных и прикладных исследований, высоких технологий и высокотехнологической промышленности в физиологии, медицине, фармакологии и здравоохранении. Это подтверждается многолетней международной практикой ведущих академий наук, научных и учебных заведений, известных высокотехнологических корпораций и клиник мира. Более подробную информацию можно найти на сайтах: http://physiomedi.com, http://htfi.ru, http://htfi.org.

Сборник трудов предназначен для должностных лиц, ученых, преподавателей, докторантов, аспирантов, студентов, предпринимателей, для широкого круга читателей, может быть использован в качестве дополнительного учебного пособия в высших и средних специальных учебных заведениях.

© Кудинов А.П., Крылов В.Б.
научное редактирование, 2010
© СПбГПУ, 2010

ISBN 978-5-7422-2799-1

Шпакова Н.М., Писаренко Н.А, Орлова Н.В., Ершов С.С., Нипот Е.Е., Александрова Д.И.

ВЛИЯНИЕ АМФИФИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ГИПЕРТОНИЧЕСКИЙ ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФЕНИЛГИДРАЗИНОМ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина

Shpakova N.M., Pisarenko N.A., Orlova N.V., Ershov S.S., Nipot E.E., Aleksandrova D.I.

INFLUENCE OF AMPHIPHILIC COMPOUNDS ON HYPERTONIC HEMOLYSIS OF ERYTHROCYTES MODIFIED BY PHENYLHIDRAZINE

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Исследование общих закономерностей поведения клеток в стрессовых условиях с целью выяснения механизмов действия неблагоприятных факторов проводится на протяжении длительного времени и на различных объектах. Реакция эритроцитов человека на изменение осмотических и температурных условий среды достаточно хорошо изучена в отличие от Эритроцитов животных [1, 2]. Известно, что характер ответа клетки на стрессовое воздействие во многом зависит от состояния ее цитоскелет-мембранного комплекса [3], который можно модифицировать фенилгидразином. Ранее выявленный защитный эффект амфифильных соединений в условиях гиперосмотического стресса эритроцитов человека реализуется на уровне эритроцитарной мембраны [4].

Цель работы - изучить влияние фенилгидразина на чувствительность эритроцитов человека, лошади, быка и кролика к гипертоническому стрессу (4,0 моль/л NaCl) и на антигемолитическую активность амфифильных соединений, относящихся к различным классам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эритроциты получали из крови человека и животных (консервант «Глюгицир»).

Клетки подвергали гипертоническому стрессу путем перенесения в раствор, содержащий 4,0 моль/л NaCl (гематокрит 0,4 %), на 5 мин при температуре 37°С. Содержание вышедшего в супернатант гемоглобина определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 543 нм.

Модификацию цитоскелета эритроцитов свежеприготовленным раствором фенилгидразина (Sigma) в конечной концентрации 1 ммоль/л осуществляли по методу [5].

В работе были использованы трифторперазин (ТФП), додецил-β,D-мальтозид (ДМ) фирмы Calbiochem, додецилсульфат натрия (С12) производства фирмы СинтезПАВ в эффективных концентрациях, полученных при гипертоническом гемолизе эритроцитов млекопитающих. Значение максимальной антигемолитической активности ($АГ_{макс}$) амфифильного соединения рассчитывали по формуле:

$$АГ_{макс} = \frac{к - а}{к} \times 100\ \%\ (2.1),$$

где к – величина гемолиза эритроцитов в отсутствии амфифильного вещества;
а – минимальная величина гемолиза эритроцитов в присутствии амфифильного вещества.

Структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов в присутствии амфифильных веществ исследовали методом ЭПР спиновых зондов [6] с помощью спин-меченых жирных кислот: амида пальмитиновой кислоты (АПК), 5-доксилстеариновой кислоты (5–ДС) и 16-доксилстеариновой кислоты (16–ДС) (Sigma). Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре ER-100D "Bruker" при комнатной температуре (18–20 °С). В качестве параметра микровязкости мембран эритроцитов использовали частоту (ν_+) вращательной подвижности зондов АПК, 16-ДС и ширину (ΔH_o) центральной компоненты спектра зонда 5–ДС.

Экспериментальные результаты представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего. Статистическую оценку данных проводили по критериям Mann-Whitney и ANOVA. Различия между группами считали статистически достоверными при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис.1 представлены результаты по влиянию фенилгидразина на уровень гемолиза эритроцитов млекопитающих в растворе, содержащем 4,0 моль/л NaCl. Величины гипертонического гемолиза нативных клеток млекопитающих значительно различаются. Максимальной гипертонической устойчивостью обладают эритроциты кролика. Для них характерна высокая водная проницаемость [7], которая обеспечивает быстрый отток воды из эритроцитов при помещении их в гипертоническую среду, что, по-видимому, уменьшает осмотическую нагрузку на клетки и, как следствие, повреждающее действие гипертонического раствора.

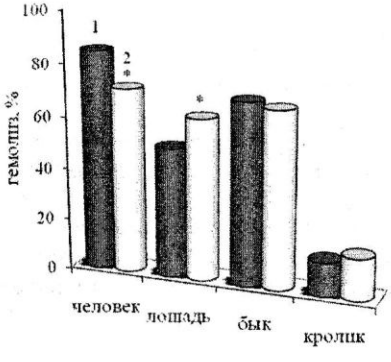


Рис. 1. Уровень гемолиза нативных (1) и модифицированных фенилгидразином (2) эритроцитов млекопитающих в условиях гипертонического стресса (4,0 моль/л NaCl) при температуре 37 °С.
* – достоверно по сравнению с необработанными фенилгидразином эритроцитами, $P<0,05$

Кроме того, наблюдается отрицательная корреляция между уровнями гипертонического гемолиза эритроцитов млекопитающих и величинами отношения холестерина к фосфолипидам в их мембранах [8]. В частности, высокое содержание холестерина в эритроцитарных мембранах кролика [8] затрудняет латеральное разделение липидов в гипертонических условиях, что может препятствовать образованию трансмембранных дефектов и, следовательно, приводить к повышению устойчивости эритроцитов.

При обработке клеток фенилгидразином их чувствительность к действию гипертонического стресса зависит от видовой принадлежности клеток (рис.1). Так, в отличие от эритроцитов человека, быка и кролика, гипертоническая чувствительность эритроцитов лошади, модифицированных фенилгидразином, повышается. Эритроциты лошади лишены белка полосы 4.2 [9], который ответственен за связь цитоскелета с интегральными белками и обеспечивает стабильность и гибкость мембран. В свою очередь, фенилгидразин действует, прежде всего, на цитоскелетный комплекс мембраны, вызывая деградацию спектрина и изменяя взаимодействие цитоскелета с мембраной. По-видимому, действие модификатора на эритроцитарные мембраны, дефицитные по белку 4.2, обуславливает снижение гипертонической устойчивости эритроцитов лошади.

Так как амфифильные соединения снижают уровень гемолиза эритроцитов млекопитающих в условиях различных видов стресса [1, 10], были использованы вещества, являющиеся представителями разных классов: катионный ТФП, анионный С12 и неионный ДМ при гипертоническом стрессе эритроцитов человека, быка и лошади. Эритроциты кролика не представлены из-за низкого уровня гипертонического гемолиза. Как видно из табл.1, все амфифилы проявляют достаточно высокую антигемолитическую активность при гипертоническом стрессе нативных эритроцитов млекопитающих. Отрицательно заряженный С12 более эффективен для эритроцитов человека по сравнению с клетками животных. Для эритроцитов всех млекопитающих максимальной антигемолитической активностью характеризуется катионный ТФП.

Таблица 1

Значения максимальной антигемолитической активности ($АГ_{макс}$) и эффективных концентраций ($С_{АГмакс}$) амфифильных соединений при гипертоническом стрессе эритроцитов млекопитающих в среде, содержащей 4,0 моль/л NaCl, при температуре 37 °С

Вещество	Человек		Лошадь		Бык	
	$С_{АГмакс}$, мкмоль/л	$АГ_{макс}$, %	$С_{АГмакс}$, мкмоль/л	$АГ_{макс}$, %	$С_{АГмакс}$, мкмоль/л	$АГ_{макс}$, %
ДМ	8 ± 1	72 ± 4	14 ± 3	72 ± 5	9 ± 1	70 ± 4
С12	25 ± 3	73 ± 5	50 ± 7	42 ± 5	20 ± 2	38 ± 7
ТФП	55 ± 6	93 ± 7	50 ± 3	84 ± 5	40 ± 5	84 ± 6

Высокоэффективный ТФП вызывает изменение формы эритроцитов млекопитающих по типу дискоцит-стоматоцит, в то время как неионный ДМ

и анионный С12 – дискоцит-эхиноцит [2]. Согласно гипотезе сопряженных монослоев [11], стоматоцитоз свидетельствует о преимущественном распределении амфифильного вещества во внутреннем монослое мембраны, в то время как эхиноцитоз – во внешнем. Таким образом, амфифильным молекулам ТФП энергетически выгодно пересечь гидрофобное ядро бислоя и распределиться во внутреннем монослое за счет электростатического взаимодействия с отрицательно заряженными молекулами фосфатидилсерина.

Исходя из этого, представляло интерес изучить влияние этих веществ на структурно-динамическое состояние мембраны (на примере эритроцитов человека) методом ЭПР спектроскопии спиновых зондов. Для исследования параметра микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов в трансмембранном направлении использовали набор зондов. Зонд АПК применяют для изучения состояния полярной поверхности мембраны; зонды 5–ДС и 16–ДС дают информацию о структуре анизотропной зоны мембраны (на расстоянии около 10 Å от поверхности) и более гидрофобной области (удаленной от поверхности мембраны на расстояние около 20 Å) соответственно.

Таблица 2

Параметры вращательной подвижности зондов АПК и 16–ДС (ν_+), зонда 5–ДС (ΔH_0) в мембране эритроцитов человека, обработанных амфифильными веществами (* – достоверно по сравнению с контролем, P<0,05

Вещество	АПК	5–ДС	16–ДС
	$\nu_+ \cdot 10^{-8}$, c^{-1}	ΔH_0, G	$\nu_+ \cdot 10^{-8}$, c^{-1}
контроль	7,92 ± 0,24	3,51 ± 0,15	4,98 ± 0,22
ДМ	5,66* ± 0,25	3,77 ± 0,17	4,18* ± 0,25
С12	6,76* ± 0,21	3,38 ± 0,20	4,52* ± 0,19
ТФП	6,12* ± 0,28	3,60 ± 0,18	5,42* ± 0,18

Исследование влияния амфифилов на липидный бислой мембран с использованием зонда АПК показало, что все вещества увеличивают микровязкость водно-липидной поверхности мембраны (табл. 2). По данным, полученным с использованием зонда 5–ДС, достоверных изменений в анизотропной зоне обнаружено не было. В гидрофобной зоне мембраны (зонд 16-ДС) увеличение микровязкости отмечено под действием ДМ и С12; а ТФП, напротив, приводит к слабому разрыхлению структуры микроокружения зонда (табл. 2).

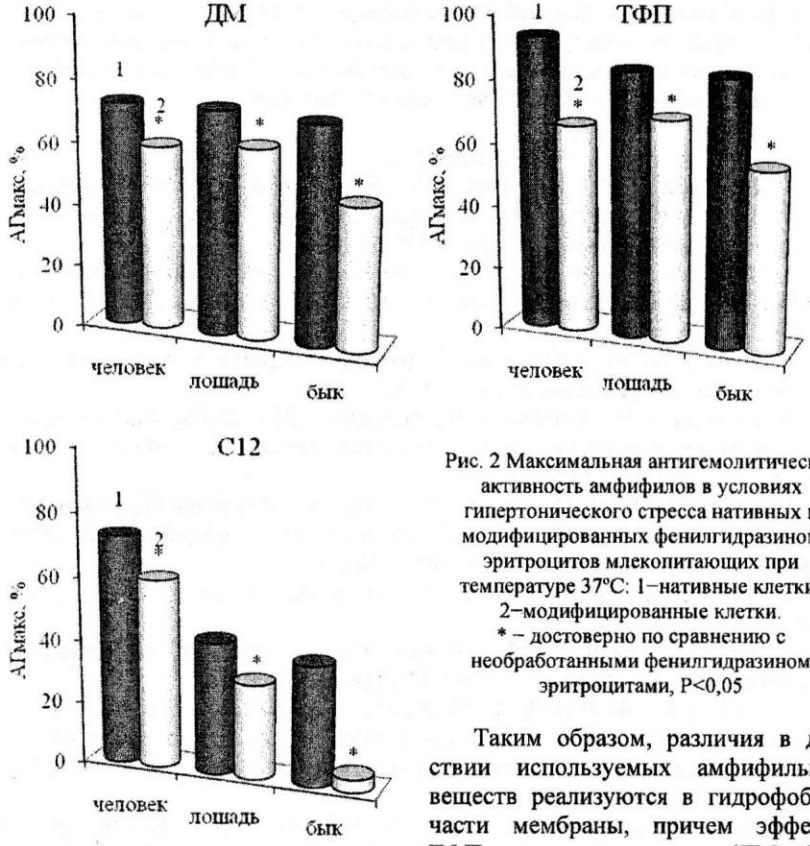


Рис. 2 Максимальная антигемолитическая активность амфифилов в условиях гипертонического стресса нативных и модифицированных фенилгидразином эритроцитов млекопитающих при температуре 37°С: 1–нативные клетки; 2–модифицированные клетки. * – достоверно по сравнению с необработанными фенилгидразином эритроцитами, $P<0,05$

Таким образом, различия в действии используемых амфифильных веществ реализуются в гидрофобной части мембраны, причем эффекты ТФП и других веществ (ДМ, С12) противоположны. Возможно, разрыхляющее действие ТФП на эритроцитарную мембрану обуславливает более высокую эффективность этого вещества в условиях стресса эритроцитов.

В условиях гипертонического стресса модифицированных фенилгидразином эритроцитов млекопитающих наблюдается снижение антигемолитической активности всех амфифильных соединений (рис.2).

Полагают [2], что в основе механизма антигемолитического действия амфифильных соединений лежит их способность встраиваться в эритроцитарную мембрану и реорганизовывать ее, предотвращая формирование трансмембранных гемолитических пор.

Наблюдаемое снижение эффективности амфифильных соединений, относящихся к разным классам, при гиперосмотическом стрессе эритроцитов, обработанных фенилгидразином, обусловлено повышением жесткости эри-

троцитарной мембраны под действием модификатора [12]. Указанный факт свидетельствует в пользу как предполагаемого механизма антигемолитической активности амфифильных соединений в условиях осмотического стресса, так и неспецифического характера их действия.

Литература

1. Шпакова Н.М., Панталер Е.Р., Бондаренко В.А. 1995. Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодовом шоке эритроцитов. *Биохимия*. 60 (10), 1624–1631.

2. Hagerstrand H., Isomaa B. 1991. Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation. *Chem.–Biol. Inter*. 79 (3), 335–347.

3. Белоус А. М. 1990. Роль белков цитоскелета в холодовой стабильности клеток. *Криобиология*. № 3, 3–12.

4. Цымбал Л.В., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. 2005. Модификация хлорпромазином структурно-функционального состояния мембран эритроцитов. *Биол. мембраны*. 22 (4), 327–335.

5. Arduini A., Storto S., Belfiglio M., Scurti R., Mancinelli G., Federici G. 1989. Mechanism of spectrin degradation induced by phenylhydrazine in intact human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*. 979 (1), 1–6.

6. Лихтенштейн Г.И. 1974. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. М.: Наука. 256 с.

7. Benga G. , Borza T. 1995. Diffusional water permeability of mammalian red blood cells. *Comp. Biochem. Physiol*. 112B (4), 653–659.

8. Garnier M, de Preville G, Pilardeau P, Boudia D. 1984. Relationship between the intra-erythrocyte sodium composition and the membrane lipoprotein composition among different mammal species. Comp. Biochem. Physiol. 77A (2), 315–317.

9. Baskurt O.K., Farley R.A., Meiselman H.J. 1997. Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human, and rat: a comparative study. *Am. J. Physiol*. 273 (6, Pt 2), H2604–H2612.

10. Шпакова Н.М. 2009. Возможный механизм коррекции осмотической и температурной чувствительности эритроцитов человека с помощью алкил-β,D-глюкопиранозидов. *Проблемы криобиологии*. 19 (4), 449–460.

11. Seeman P. 1972. The membrane action of anesthetics and tranquilizers. *Pharmacol. Rev*. 24 (4), 583–655.

12. Fukushima Y, Kon H. 1990. On the mechanism of loss of deformability in human erythrocytes due to Heinz body formation: a flow EPR study. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 102 (2), 205-218.

2.50 Тихонова Е.В., Жанымханова П.Ж., Смагулов А.М., Итжанова Х.И., Поляков В.В., Адекенов С.М.
СУБЛИМАЦИОННАЯ СУШКА СУБСТАНЦИИ ЛИПОСОМАЛЬНОГО ОКСИМА ПИНОСТРОБИНА 229
Tikhonova E.V., Zhanymkhanova P.G., Smagulov A.M., Itzhanova Kh. I., Polyakov V.V., Adekenov S.M.
SUBLIMATE DRYING OF SUBSTANCE OF LIPOSOMAL PINOSTROBINE OXIME
2.51 Федосеева Л.А., Дымшиц Г.М., Маркель А.Л.
ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВОЙ СИСТЕМЫ В ПОЧКАХ И СЕРДЦЕ МОЛОДЫХ И ЗРЕЛЫХ КРЫС ГИПЕРТЕНЗИВНОЙ ЛИНИИ НИСАГ 232
Fedoseeva L.A., Dymshits G.M., Markel A.L.
RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM GENE EXPRESSION IN THE KYDNEY AND IN THE HEART OF THE YOUNG AND ADULT HYPERTENSIVE ISIAH RATS
2.52 Шкуратова Н.А., Марченко Н.В.
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛИСТОВЫХ ЭКСПЛАНТОВ ЛОТОСА ОРЕХОНОСНОГО (NELUMBO NUCIFERA) ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕРВИЧНОГО КАЛЛУСА . 233
Shkuratova N.A., Marchenko N.V.
USE SHEET EXSPLANT NELUMBO NUCIFERA FOR RECEPTION PRIMARY OF KALLUS
2.53 Шпакова Н.М., Писаренко Н.А, Орлова Н.В., Ершов С.С., Нипот Е.Е., Александрова Д.И.
ВЛИЯНИЕ АМФИФИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ГИПЕРТОНИЧЕСКИЙ ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФЕНИЛГИДРАЗИНОМ 235
Shpakova N.M., Pisarenko N.A., Orlova N.V., Ershov S.S., Nipot E.E., Aleksandrova D.I.
INFLUENCE OF AMPHIPHILIC COMPOUNDS ON HYPERTONIC HEMOLYSIS OF ERYTHROCYTES MODIFIED BY PHENYLHIDRAZINE