



УКРАЇНА

(19) UA (11) 37514 (13) U

(51) МПК (2006)

G01N 33/49

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ЗНИЖЕННЯ ГІПЕРТОНІЧНОГО ГЕМОЛІЗУ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ

1

2

(21) u200809235

(22) 15.07.2008

(24) 25.11.2008

(46) 25.11.2008, Бюл.№ 22, 2008 р.

(72) ШПАКОВА НАТАЛІЯ МИХАЙЛІВНА, UA, ОР-
ЛОВА НАТАЛІЯ ВІКТОРІВНА, UA, БОНДАРЕНКО
ВАЛЕРІЙ АНТОНОВИЧ, UA(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІО-
МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ, UA

(57) Спосіб зниження гіпертонічного гемолізу еритроцитів людини, що включає введення еритроцитів і антигемолітичної речовини в гіпертонічний розчин, що містить 4,0 M NaCl, і інкубацію протягом 10 хв., який відрізняється тим, що як антигемолітичну речовину використовують речовину амфіфільної природи, яку вносять до гіпертонічного розчину перед додаванням до нього еритроцитів.

Корисна модель належить до галузі кріобіології і кріомедицини і може бути використана для корекції стану клітин в умовах гіпертонічного шоку та моделювання умов заморожування біологічних об'єктів.

Відомий спосіб зниження гіпертонічного гемолізу еритроцитів людини, який полягає в тому, що проводять попередню інкубацію еритроцитів із геміном протягом 10хв, потім пробу двічі центрифугують з метою видалення геміну, після чого еритроцити переносять у гіпертонічне середовище [1].

Основним недоліком даного способу є його тривалість, що обумовлена 10хв інкубацією еритроцитів із геміном і подальшим центрифугуванням. Крім того, до недоліків даного способу слід віднести утворення під дією геміну незворотніх внутрішньобілкових і міжбілкових зв'язків в еритроцитах.

Відомий спосіб зниження гіпертонічного гемолізу еритроцитів людини, який включає введення у гіпертонічний розчин двовалентних катіонів (Ca^{2+} , Zn^{2+}) і подальше додавання еритроцитів [2].

Недоліком вказаного способу є утворення малорозчинних сполук двовалентних катіонів із компонентами буфера, що може супроводжуватися зміною фізико-хімічних характеристик розчину.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб зниження гіпертонічного гемолізу еритроцитів за допомогою глюкози [3]. Згідно зі способом, глюкозу в концентрації 200мМ додають до суспензії еритроцитів, і суміш інкубують протягом 2 годин при температурі 25°C. Після цього еритроцити, які навантажені глюкозою, переносять у гіпертонічний розчин, що містить 4,0M NaCl, при температурі 37 або 0°C і інкубують протягом 10хв.

Основним недоліком цього способу є його складність, що обумовлена необхідністю тривалої (протягом 2 годин) інкубації еритроцитів із глюкозою при температурі 25°C [4]. Окрім цього, порівняно високі концентрації глюкози (200мМ) призводять до зміни осмотичного тиску розчинів.

Задачею корисної моделі є створення такого способу зниження гіпертонічного гемолізу еритроцитів людини, в якому би, шляхом заміни антигемолітичної речовини, забезпечувалася можливість спростити спосіб, а також запобігти зміні осмоларності середовища.

Поставлено задача вирішується тим, що в способі зниження гіпертонічного гемолізу еритроцитів людини, що включає додавання еритроцитів і антигемолітичної речовини до гіпертонічного розчину, що містить 4,0M NaCl, і інкубацію протягом 10хв, згідно з корисною моделлю, як антигемолітичну речовину використовують речовину амфіфільної природи, яку вносять до гіпертонічного розчину перед додаванням до нього еритроцитів.

Амфіфільні речовини - це хімічні сполуки, молекули яких мають гідрофільну і гідрофобну частини. Вони (згідно загальноприйнятої класифікації) є представниками 4 класів: катіонні (хлорпромазин), аніонні (децилсульфат натрію), нейонні (додецил- β ,D-мальтозид) і цвіттеріонні (3-децилдиметиламмоній-1-пропансульфонат натрію). Баланс гідрофільності-гідрофобності молекул визначає їх здатність вбудовуватися, розподілятися в мембрані і викликати тим самим трансформацію клітин за типом дискоцит-стоматоцит або дискоцит-ехіноцит, а також запобігати збільшенню мембранних мікродефектів до розміру гемолітичної пори.

(13) U

(11) 37514

(19) UA

Використання амфифільних речовин не вимагає етапу попередньої інкубації еритроцитів, внаслідок чого спрощується і скорочується час його здійснення. Амфифільні речовини знижують рівень гіпертонічного гемолізу при використанні в мікромолярних концентраціях, що нижче в порівнянні з концентрацією глюкози, яку використовували в прототипі, на 3-5 порядки. Це дозволяє уникнути зміни осмолярності середовища.

Спосіб здійснюють таким чином.

Амфифільну речовину, що приготована на фізіологічному розчині, додають у кількості 10мкл до 1мл гіпертонічного розчину, що містить 4,0М NaCl. Еритроцити, тричі відмиті фізіологічним розчином, додають до вказаного гіпертонічного середовища (кінцевий гематокрит 0,4%) при температурі 37°C. Після 10хв інкубації проби центрифугують і визначають рівень гемолізу спектрофотометрично при довжині хвилі 543нм.

Приклад 1.

Еритроцити донорської крові тричі відмивали фізіологічним розчином (150мМ NaCl, 5мМ фосфатний буфер, рН 7,4) від плазми і формених елементів шляхом центрифугування при $g = 1500$ протягом 3хв і зберігали у вигляді осаду при 0°C не більш 2 годин. Вихідну суспензію еритроцитів готували додаванням 100мкл осаду еритроцитів до 1мл фізіологічного розчину.

Як амфифільну речовину використовували хлорпромазин, приготований на фізіологічному розчині, 10мкл якого додавали до 1мл гіпертонічного середовища, що містить 4,0М NaCl. Концентрація хлорпромазину в гіпертонічному середовищі складала 124мкМ. Суспензію еритроцитів (50мкМ) додавали до 1мл гіпертонічного середовища, що містить хлорпромазин (кінцевий гематокрит 0,4%). Контролем служили еритроцити, які перенесені у розчин 4,0М NaCl, що не містить хлорпромазин. Після 10хв інкубації при 37°C проби центрифугували: Кількість гемоглобіну в надосадку визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 543нм і виражали у відсотках по відношенню до 100% гемолізу еритроцитів у присутності детергента тритона X-100 (кінцева концентрація 0,1%).

Приклад 2.

Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1 за винятком того, що як амфифільну речовину використовували децилсульфат натрію в кінцевій концентрації 40мкМ.

Приклад 3.

Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1 за винятком того, що як амфифільну речовину використовували 3-децилдиметиламмоній-1-пропансульфоат натрію в кінцевій концентрації 778мкМ.

Приклад 4.

Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1 за винятком того, що як амфифільну речовину використовували додецил- β ,D-мальтозид у кінцевій концентрації 6мкМ.

Результати, що були отримані при здійсненні способу згідно прикладам 1-4, відображені в таблиці. З даних, представлених у таблиці, видно, що в присутності амфифільних речовин рівень гемолізу еритроцитів людини в розчині, що містить 4,0М NaCl, зменшується в 3-17 разів, що говорить про значне зниження гіпертонічного гемолізу еритроцитів людини під впливом амфифільних речовин.

Таблиця

Значення гемолізу еритроцитів людини в розчині, що містить 4,0М NaCl, при температурі 37°C у присутності амфифільних речовин (n = 10)

Речовина	Концентрація, мкМ	Гемоліз, %	А/Б
контроль	—	86 $\pm$ 7	—
хлорпромазин	124	5 $\pm$ 2	17,2
децилсульфат натрію	40	14 $\pm$ 3	6,1
3-децилдиметиламмоній-1-пропансульфонат натрію	778	18 $\pm$ 5	4,8
додецил- β ,D-мальтозид	6	28 $\pm$ 6	3,1

Примітка: А - гемоліз контрольних еритроцитів, Б - гемоліз еритроцитів у присутності амфифільної речовини

Джерела інформації:

1. Рамазанов В.В., Бондаренко В.А. Действие гемина и ДИДС на холодовой и гипертонический шок эритроцитов// Пробл. криобиологии. - 1996. - №2. - С.13-17.
2. Орлова Н.В., Шпакрва Н.М. Действие двухвалентных катионов на чувствительность эритроцитов к гиперосмотическому стрессу и холодовому шоку// Дробл. криобиологии. - 1998. - №1. - С.30-35.
3. Мельникова О.В., Бондаренко Т.П. Модифицирующее действие глюкозы на чувствительность эритроцитов к температурному и осмотическому стрессу// Физико-химические процессы в криобиологических системах. Сб. научн. трудов. - Харьков, 1991. - С.68-78.
4. Naftalin R.J., Smith P.M., Roselaar S.E. Evidence for nonuniform distribution of D-glucose within human red cells during net exit and counterflow// Biochem.Biophys.Acta. - 1985. - 820, №2. - P.235.