



УКРАЇНА

(19) UA (11) 38944 (13) U

(51) МПК (2009)

A01N 1/00

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

(54) СПОСІБ ЗНИЖЕННЯ ХОЛОДОВОГО ШОКУ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ

1

2

(21) u200810779

(22) 01.09.2008

(24) 26.01.2009

(46) 26.01.2009, Бюл.№ 2, 2009 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 холодового шоку еритроцитів людини, що включає інкубацію еритроцитів у гіпертонічному розчині при 37 °С протягом 10 хв. і інкубацію при 0 °С у присутності антигемолітичної речовини протягом 10 хв., який **відрізняється** тим, що після інкубації в гіпертонічному розчині при 37 °С еритроцити переносять в охолоджений до 0 °С гіпертонічний розчин, в який заздалегідь вносять антигемолітичну речовину, причому як антигемолітичну речовину використовують речовину амфіфільної природи.

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

У гіпертонічному середовищі еритроцити людини чутливі до охолодження від 37 до 0°С. Для того, щоб знизити холодовий шок еритроцитів людини, використовують різні антигемолітичні речовини.

Відомий спосіб зниження холодового шоку еритроцитів людини, який полягає в тому, що еритроцити людини обробляють глутаровим альдегідом, а потім інкубують у гіпертонічному середовищі при 37°С, після чого охолоджують до 0°С [1].

Недоліками вказаного способу є тривала інкубація еритроцитів із антигемолітичною речовиною і утворення під її впливом ковалентних зшивань в еритроцитах.

Відомий спосіб зниження холодового шоку еритроцитів людини, який полягає в тому, що проводять попередню інкубацію еритроцитів із геміном протягом 10хв., потім пробу двічі центрифугують з метою видалення геміну і еритроцити переносять у гіпертонічне середовище, де інкубують при 37°С, а потім охолоджують до 0°С [2]. Основним недоліком даного способу є його тривалість, обумовлена 10хв інкубацією еритроцитів із геміном і подальшим двократним центрифугуванням. Крім того, до недоліків даного способу слід віднести утворення під дією геміну внутрішньобілкових і міжбілкових зшивань в еритроцитах.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб зниження холодового шоку еритроцитів людини за допомогою діаміду [3]. Згідно зі способом суспензію еритроцитів (гематокрит 4%) інкубують у фізіологічному розчині (рН 8,0) із антигемолітичною речовиною - діамідом (5-20мМ) при температурі 37°С протягом 45хв. в умовах постійного перемішування, після чого клітини тричі відмивають від діаміду фізіологічним розчином (рН 7,4). Потім еритроцити, що були оброблені діамідом, інкубують у гіпертонічному розчині, що містить 1,0 М NaCl, при 37°С протягом 10хв., охолоджують до 0°С і інкубують протягом 10хв.

До основного недоліку цього способу слід віднести його складність, обумовлену необхідністю тривалої (протягом 45хв.) інкубації еритроцитів із діамідом при температурі 37°С [4]. Окрім цього, під дією діаміду утворюються внутрішньобілкові і міжбілкові зшивання в еритроцитарних мембранах внаслідок утворення дисульфідних зв'язків. До того ж при використанні високих концентрацій діаміду можливо утворення подібних зв'язків між внутрішньоклітинними молекулами гемоглобіну [5].

Задачею корисної моделі є створення такого способу зниження холодового шоку еритроцитів людини, в якому би, шляхом заміни антигемолітичної речовини, забезпечувалася можливість спростити спосіб, а також запобігти утворенню необоротних внутрішньобілкових і міжбілкових зшивань в еритроцитах.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі зниження холодового шоку еритроцитів

(13) U

(11) 38944

(19) UA

людини, що включає інкубацію еритроцитів у гіпертонічному розчині при 37°C протягом 10хв. і інкубацію при 0°C у присутності антигемолітичної речовини протягом 10хв., згідно з корисною моделлю, після інкубації в гіпертонічному розчині при 37°C еритроцити переносять в охолоджений до 0°C гіпертонічний розчин, в який заздалегідь вносять антигемолітичну речовину, причому як антигемолітичну речовину використовують речовину амфіфільної природи.

Молекули амфіфільних сполук мають гідрофільну і гидрофобну частини. Ці амфіфільні речовини (згідно загальноприйнятої класифікації) є представниками 2 класів: катіонні (хлорпромазин, трифторперазин) і аніонні (децилсульфат натрію). Баланс гідрофільності-гідрофобності молекул визначає їх здатність вбудовуватися і розподілятися в мембрані, викликати трансформацію клітин за типом дискоцит-стоматоцит або дискоцит-з-хіноцит і запобігати появі трансмембранної гемолітичної пори. Амфіфільні речовини знижують рівень холодового шоку при використанні в мікромолярних концентраціях, що нижче в порівнянні з концентрацією діаміду, яка використовується в прототипі, на 2-3 порядки.

При використанні амфіфільних речовин не потрібний етап попередньої інкубації еритроцитів із антигемолітичною речовиною з подальшим 3-кратним центрифугуванням, що спрощує спосіб і скорочує час його здійснення приблизно в 5 разів. Окрім цього використання амфіфільних речовин запобігає утворенню внутрішньо- і міжкліткових зшивань в еритроцитах.

Спосіб здійснюють таким чином.

Амфіфільну речовину, приготовану на фізіологічному розчині, додають у кількості 10мкл до 1мл гіпертонічного розчину, що містить 1,2 М NaCl і має температуру 0°C. Еритроцити, тричі відмиті фізіологічним розчином, додають до гіпертонічного середовища (1,2 М NaCl) із температурою 37°C і інкубують протягом 10хв. Потім аликвоту (50мкл) з вказаного розчину переносять у гіпертонічне середовище, що містить 1,2 М NaCl, амфіфільну речовину і має температуру 0°C (кінцевий гематокрит 0,4%). Після 10хв. інкубації при 0°C проби центри-

фугують і визначають рівень гемолізу, який свідчить про рівень пошкодження клітин при холодовому шоці еритроцитів.

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.

Еритроцити (50мкл) додавали до 1мл гіпертонічного розчину, що містить 1,2 М NaCl, і інкубували при 37°C протягом 10хв. Потім аликвоту (50мкл) переносили на 10хв. в охолоджений до 0°C гіпертонічний розчин, в який заздалегідь вносили амфіфільну речовину хлорпромазин із розрахунку 10мкл до 1мл розчину (кінцевий гематокрит 0,4%). Кінцева концентрація хлорпромазину в гіпертонічному розчині складала 120мкМ. Контролем були еритроцити, перенесені на 10хв. у розчин 1,2 NaCl при 37°C, а потім на 10хв. у гіпертонічне середовище, що не мало хлорпромазину, при 0°C. Після центрифугування кількість гемоглобіну в надосаді 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%).

Рівень холодового шоку еритроцитів людини складав 85%, у присутності хлорпромазину - 30%.

Приклад 2.

Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що як антигемолітичну речовину використовували трифторперазин у кінцевій концентрації 60мкМ.

Приклад 3.

Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що як антигемолітичну речовину використовували децилсульфат натрію у кінцевій концентрації 47мкМ.

Результати, отримані при здійсненні способу згідно з прикладами 1-3, наведені в Таблиці. З даних Таблиці видно, що у присутності амфіфільних речовин рівень холодового шоку знижується у порівнянні з контролем в 2,1-8,5 рази.

Таблиця

Рівень холодового шоку еритроцитів людини в гіпертонічному середовищі

Речовина	Концентрація, мкМ	Гемоліз, %	А/Б
контроль	0	85±7	-
хлорпромазин	120	30±5	2,8
трифторперазин	60	10±4	8,5
децилсульфат натрію	47	40±7	2,1
контроль (за прототипом)	0	51	-
діамід (за прототипом)	5000	23	2,2

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

Джерела інформації:

1. Minetti M, Ceccarini M, Di Stasi A.M.M. Role of membrane thermotropic properties on hypotonic hemolysis and hypertonic cryohemolysis of human

red blood cells // J. Cell. Biochem.- 1984. - 25, №2. - P.61-72.

2. Рамазанов В. В., Бондаренко В. А. Действие гемина и ДИДС на холодной и гипертонический шок эритроцитов // Пробл. криобиологии. - 1996. - №2. - С.13-17.

3. Green F. A., Jung C. Y., Cuppoletti J., Owens N. Hypertonic cryohemolysis and cytoskeletal system// Biochim. Biophys. Acta. - 1981. - 648, №2. - P.225-230.

4. Haest C, Kamp D., Plasa G., Deuticke B. Intra- and intermolecular cross-linking of membrane proteins in intact erythrocytes and ghosts by SH-

oxidizing agents// Biochim. Biophys. Acta. - 1977. - 469. - P.226-230.

5. Maeda N., Kon K., Imaizumi K., Sekiya M., Shiga T. Alteration of rheological properties of human erythrocytes by crosslinking of membrane proteins //Biochim Biophys Acta. - 1983. - 735, №1. - P.104-12.