

UDC 616.831-005

CHARACTER of CROSS-CORRELATION INTERCOMMUNICATIONS of INDEXES of CEREBRAL HEMODYNAMICS of CHILDREN With CHILD'S CEREBRAL PARALYSIS 8-12 YEARS

Golovchenko I.V., Gajdaj N.I.

Summary. It is established that at children with a children's cerebral paralysis of change of separate indicators of cerebral haemodynamics which have arisen locally in a certain site of a brain, conduct to changes of the general condition of blood circulation of a brain that it is not observed at children of control group.

Key words: arteries, veins, cerebral haemodynamics.

Стаття надійшла 26.10.2010 р.

УДК 573.356.612.111

Н. В. Орлова

РОЛЬ ТЕМПЕРАТУРЫ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ СРЕДЫ В АНТИГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АМФИФИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

Данная работа является фрагментом научной темы «Исследование устойчивости эритроцитов к действию осмотического и температурного шока и замораживания», номер гос. регистрации 0109U000276.

Вступление. Гипертонический стресс эритроцитов моделирует состояние клеток при действии на них высококонцентрированных растворов солей, образующихся в результате вымораживания воды в условиях криоконсервирования биологических объектов.

Известно, что при перенесении эритроцитов человека в раствор, содержащий 4,0 М NaCl, при 37 °С наблюдается их гемолиз на уровне 80-90% [6]. Присутствие амфифильных соединений в литической среде приводит к снижению уровня гипертонического гемолиза эритроцитов [6]. В то же время, предварительное инкубирование клеток в растворе, содержащем 0,45 М NaCl, позволяет значительно снизить повреждение эритроцитов в 4,0 М NaCl [5].

Следует отметить, что инкубирование в 0,7 М NaCl формирует метастабильное состояние эритроцитов, проявляющееся в высоком уровне гемолиза в 4,0 М NaCl [30]. В этих условиях амфифильные соединения также способны проявлять антигемолитическую активность [3]. Известно, что в условиях гипертонического стресса эритроцитов антигемолитическая активность амфифильных соединений меньше при 0 °С, чем

при 37°С [4]. В указанных экспериментальных условиях и предварительную инкубацию, и собственно гипертонический лизис эритроцитов осуществляли при одной и той же температуре - 37 или 0 °С. Остается неясным низкая температура среды предварительной инкубации клеток или литической среды играет основную роль в снижении антигемолитической активности амфифильных веществ. Для того чтобы ответить на этот вопрос представляло интерес исследовать антигемолитическую активность амфифильных соединений в условиях гипертонического стресса эритроцитов при изменении температуры одной из сред инкубации.

Цель исследования – изучить эффективность амфифильных соединений в условиях гипертонического стресса (4,0 М NaCl при 37 °С) эритроцитов, перенесенных из сред предварительной инкубации, имеющих температуру 0 °С.

Объект и методы исследования. В работе были использованы представители катионных, неионных, цвиттерионных и анионных классов мицеллообразующих амфифильных соединений: хлорпромазин гидрохлорид (ХП), додецил- β ,D-мальтозид (ДМ), 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфонат натрия (Z16) (фирма «Calbiochem») и децилсульфат натрия (C10) (фирма «Синтезпав»), соответственно. Эритроциты получали из крови II-ой группы доноров-мужчин по

общепринятой методике. Все используемые среды готовили на 0,01 М фосфатном буфере, рН 7,4.

Гипертонический стресс эритроцитов осуществляли следующим образом. С помощью поршневого дозатора (Gilson) эритроциты переносили в среду, содержащую 0,15 или 0,7 М NaCl, при 0 °С и инкубировали 2 мин, затем переносили в раствор, содержащий 4,0 М NaCl, при температуре 37 °С на 5 мин (гематокрит 0,4%). Амфифильное вещество добавляли в литическую среду перед внесением клеток. Количество гемоглобина в супернатанте определяли спектрофотометрически при длине волны 543 нм. Выход гемоглобина из клеток рассчитывали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу эритроцитов в присутствии тритона X-100 (0,1%).

Эффективную концентрацию амфифильного вещества рассчитывали как среднее арифметическое концентраций данного вещества, соответствующих минимальному значению гемолиза эритроцитов в серии опытов одного эксперимента. Значение максимальной антигемолитической активности (АГ_{max}) амфифильного соединения представляет собой среднюю арифметическую величину из значений максимальной антигемолитической активности данного соединения, рассчитанных по формуле:

$$АГ_{max} = \frac{к - а}{к} \times 100\% ,$$

где

к - величина гемолиза эритроцитов в данных экспериментальных условиях в отсутствие амфифильного вещества;

а - минимальная величина гемолиза эритроцитов в присутствии амфифильного вещества.

Исследовали эритроциты 6 доноров в 2-х параллельных пробах. Результаты анализировали с помощью критерия Mann-Whitney и ANOVA.

Результаты исследований и их обсуждение. Было изучено влияние амфифильных соединений, относящихся к различным классам, на гипертонический гемолиз эритроцитов человека. Эритроциты инкубировали при 0 °С в физиологическом растворе, а затем переносили в среду, содержащую 4,0 М NaCl и амфифильное вещество при 37 °С. Из полученных зависимостей уровней гипертонического гемолиза клеток от концентраций амфифильных соединений были рассчитаны величины максимальной антигемолитической активности и значения эффективных концентраций веществ. Указанные величины представлены в табл.1. Для сравнения приведены ранее полученные данные эффективности амфифильных соединений [4] в условиях гипертонического стресса эритроцитов при 0 °С.

Из представленных в табл.1 данных видно, что в условиях гипертонического стресса эритроцитов при изотермическом режиме (0→0 °С) амфифильные соединения проявляют антигемолитическую активность на уровне 15-63%. Из-

менение температуры литической среды (37 °С) позволяет существенно повысить эффективность всех амфифильных соединений примерно на 30%. Следует отметить, что в обоих случаях вещества можно расположить в ряду по возрастанию значений их антигемолитической активности: Z16<ДМ<С10<ХП. В такой же последовательности возрастают и значения эффективных концентраций амфифильных соединений.

Таблица 1

Значения эффективных концентраций и максимальной антигемолитической активности (АГ_{max}) амфифильных веществ при перенесении эритроцитов из 0,15 М NaCl (0 °С) в 4,0 М NaCl при 37 °С (0→37 °С) или при 0 °С (0→0 °С), (M±m)

Вещество	Эфф. конц., мкМ (0→0 °С)	Эфф. конц., мкМ (0→37 °С)	АГ _{max} , % (0→0 °С)	АГ _{max} , % (0→37 °С)
Z16	2	6	15 ±2	52 ±6
ДМ	3	6	30 ±4	64 ±6
С10	10	60	48 ±6	75 ±7
ХП	20	130	63 ±8	93 ±10

Примечание: эффективная концентрация в табл. соответствует середине диапазона эффективных концентраций веществ.

В работе [3] показано, что неионный ДМ и катионный ХП не способны снижать повреждение эритроцитов, перенесенных из 0,7 М в 4,0 М NaCl при 0 °С. Для анионного С10 и цвиттерионного Z16 отмечено незначительное (примерно 10%) снижение гипертонического гемолиза эритроцитов. Представляло интерес исследовать, как отразится повышение температуры литической среды (37 °С) на проявление антигемолитической активности амфифильных веществ в условиях гипертонического гемолиза эритроцитов, предварительно обезвоженных в 0,7 М NaCl при 0 °С (табл. 2).

Как видно из представленных данных, физиологическая температура литической среды позволяет амфифильным соединениям проявлять высокую антигемолитическую активность несмотря на то, что клетки были предварительно обезвожены в 0,7 М NaCl при 0 °С. В указанных условиях значения антигемолитической активности неионного ДМ, анионного С10 и катионного ХП находятся примерно на одном уровне, а эффективность цвиттерионного Z16 несколько ниже. Следует отметить, что в данном случае (табл.2) величина антигемолитической активности неионного ДМ заметно выше, чем в аналогичном температурном режиме (0→37 °С) для клеток, перенесенных из 0,15 в 4,0 М NaCl (табл.1).

Таким образом, при гипертоническом стрессе эритроцитов эффект амфифильных соединений определяется температурой литической среды.

В условиях гипертонического стресса происходит нарушение, в первую очередь, барьерной

Таблица 2
Значения эффективных концентраций и максимальной антигемолитической активности (AG_{max}) амфифильных соединений при перенесении эритроцитов из 0,7 М NaCl (0 °С) в 4,0 М NaCl (37 °С), (M±m)

Вещество	Эфф.конц., мкМ (0→37°С)	AGmax, %, (0→37°С)
Z16	5	52 ±6
ДМ	6	82* ±8
С10	50	87* ±8
ХП	90	97* ±8

Примечание: эффективная концентрация в табл. соответствует середине диапазона эффективных концентраций веществ; * - различия между величинами недостоверны при $P < 0,05$.

функции плазматической мембраны для ионов, затем формируются макроскопические поры, через которые крупные молекулы гемоглобина выходят из клетки [1].

Исследуемые амфифильные соединения способны предотвращать формирование макроскопических пор в плазматической мембране клетки. При этом температура является дополнительным фактором, способным влиять на состояние трансмембранных пор [7]. Физиологическая температура способствует замыканию мембранных пор, а низкая – их стабилизации.

Предварительное инкубирование эритроцитов в среде 0,7 М NaCl при 0 °С приводит к формированию метастабильного состояния клеток и выходу из них катионов калия [1]. Перенесение таких метастабильных эритроцитов в среду 4,0 М NaCl, при 0 °С стабилизирует уже существующие микродефекты и способствует эволюции их в макропоры, не позволяя веществам проявлять антигемолитическую активность [3].

Действие амфифильных соединений на клетке проявляется на уровне плазматических мембран. Встраиваясь в эритроцитарную мембрану, амфифильные вещества изменяют форму клеток. Молекулы ХП преимущественно распределяются во внутреннем монослое липидного бислоя мембраны, трансформируя эритроцит из дискоцита в стоматоцит [8]. Молекулы других исследуемых веществ (Z16, ДМ, С10), которые распределяются во внешнем монослое, являются эхиноцитогенными [2]. В низких концентрациях амфифильные вещества протектируют клетки от разных видов стресса [6, 9], в то время как в высоких концентрациях амфифильные соединения вызывают отщепление везикул от плазматических мембран [10, 11] и проявляют детергентные свойства [12].

Авторы работы [9] полагают, что в основе антигемолитической активности амфифильных веществ лежит их способность временно разупорядочивать мембрану. Если это предположение верно, то чем лабильнее мембрана, тем выше будут значения антигемолитической активности

веществ. Если учесть, что при 37 °С мембрана более лабильна, чем при 0 °С [1], то результаты, полученные в данной работе, свидетельствуют в пользу этого предположения. Действительно, повышение температуры литической среды (37 °С) позволяет амфифильным веществам эффективнее защищать от гипертонического гемолиза не только метастабильные клетки, но и эритроциты, перенесенные из 0,15 М NaCl. Несмотря на общий характер защитного действия амфифильных соединений, относящихся к разным классам, следует отметить, что эффективность каждого из веществ (значения антигемолитической активности и эффективных концентраций) определяется физико-химическими особенностями их молекул.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что эффективность амфифильных соединений, относящихся к различным классам, выше при физиологической температуре литической среды, чем при 0 °С в условиях гипертонического стресса (4,0 М NaCl) эритроцитов человека, перенесенных из сред предварительной инкубации (0,15 и 0,7 М NaCl), имеющих температуру 0 С.

Перспективы дальнейших исследований. Планируется исследовать влияние других амфифильных соединений на осмотическую и температурную чувствительность эритроцитов человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А. М. Кробиология / А. М. Белоус, В. И. Грищенко. – Киев : Наук. думка, 1994. – 432 с.
2. Кулешова Л. Г. Антигемолитическая и трансформирующая активность амфифильных соединений / Л. Г. Кулешова, Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Пробл. кробиологии. – 2001. – № 1. – С. 9-15.
3. Орлова Н. В. Влияние амфифильных соединений на чувствительность частично обезвоженных эритроцитов к гипертоническому стрессу / Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Проблемы кробиологии. – 2003. – № 1. – С. 59-64.
4. Орлова Н. В. Влияние температуры на проявление антигемолитической активности амфифильных соединений в условиях гипертонического стресса эритроцитов / Н. В. Орлова, Н. М. Шпакова // Актуальные проблемы медицины и биологии. – 2004. – № 1. – С. 181-184.
5. Поздняков В. В. Взаимосвязь между исходными осмотическими условиями среды и чувствительностью эритроцитов к гипертоническому стрессу в 4.0 М NaCl / В. В. Поздняков, В. А. Бондаренко // Кробиология. – 1989. – № 1. – С. 47-49.
6. Шпакова Н. М. Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодомом шоке эритроцитов / Н. М. Шпакова, Е. П. Панталер, В. А. Бондаренко // Биохимия. – 1995. – Т. 60, № 10. – С. 1624-1631.
7. Agner G. Effect of temperature on the formation and inactivation of syringomycin E pores in human red blood cells and bimolecular lipid membranes / G. Agner, Y.A. Kaulin, L.V. Schagina [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2000. – Vol. 1466, № 1-2. – P. 79-86.
8. Ahyayaucha H. Changes in erythrocyte morphology induced by imipramine and chlorpromazine / H. Ahyayaucha, M. Gallego, O. Casis [et al.] // J. Physiol. Biochem. – 2006. – Vol. 62, № 3. – P. 199-205.
9. Hagerstrand H. Amphiphile-induced antihemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation / H. Hagerstrand, B. Isomaa // Chem. - Biol. Inter. – 1991. – Vol. 79. – P. 335-347.

10. Hagerstrand H. Lipid and protein composition of exovesicles released from human erythrocytes following treatment with amphiphiles / H. Hagerstrand, B. Isomaa // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1994. - Vol. 1190. - P. 409-415.
11. Kralj-Iglic V. Amphiphile-induced tubular budding of the bilayer membrane / V. Kralj-Iglic, H. Hagerstrand, P. Veranic [et al.] // *Eur. Biophys. J.* - 2005. - Vol. 34, № 8. - P. 1066-1070.
12. Rodi P.M. Detergent solubilization of bovine erythrocytes. Comparison between the insoluble material and the intact membrane / P. M. Rodi, M. S. Cabeza, A. M. Gennaro // *Bio-phys. Chem.* - 2006. - Vol. 122, № 2 - P. 114-122.

УДК 573.356.612.111**РОЛЬ ТЕМПЕРАТУРЫ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ СРЕДЫ В АНТИГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АМФИФИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ****Орлова Н.В.**

Резюме. Изучали антигемолитическую активность амфифильных соединений в условиях гипертонического стресса (4,0 М NaCl) эритроцитов человека при температуре литической среды 37 °С и сравнивали с полученными ранее результатами при 0 °С. Эритроциты переносили из среды, содержащей 0,15 или 0,7 М NaCl, при 0 °С в среду, содержащую 4,0 М NaCl, при 37 °С. Величины антигемолитической активности амфифильных веществ зависят от температуры литической среды. В условиях гипертонического стресса эритроцитов значения максимальной антигемолитической активности амфифильных соединений выше при температуре литической среды 37 °С, чем при 0 °С.

Ключевые слова: гипертонический стресс, эритроциты, амфифильные соединения, антигемолитическая активность, температура литической среды.

УДК 573.356.612.111**РОЛЬ ТЕМПЕРАТУРИ ГИПЕРТОНИЧНОГО СЕРЕДОВИЩА В АНТИГЕМОЛІТИЧНІЙ АКТИВНОСТІ АМФІФІЛЬНИХ СПОЛУК****Орлова Н.В.**

Резюме. Вивчали антигемолітичну активність амфифільних сполук в умовах гіпертонічного стресу (4,0 М NaCl) еритроцитів людини при температурі літичного середовища 37 °С і порівнювали з результатами при 0 °С, які були отримані раніше. Еритроцити були перенесені із середовища, що містить 0,15 або 0,7 М NaCl при 0 °С у середовище, що містить 4,0 М NaCl при 37 °С. Величини антигемолітичної активності амфифільних сполук залежать від температури літичного середовища. В умовах гіпертонічного стресу еритроцитів значення максимальної антигемолітичної активності амфифільних сполук є більш вищими при температурі літичного середовища 37 °С, ніж при 0 °С.

Ключові слова: гіпертонічний стрес, еритроцити, амфифільні сполуки, антигемолітична активність, температура літичного середовища.

UDC 573.356.612.111**ROLE of HYPERTONIC MEDIUM TEMPERATURE in ANTIHAEMOLYTIC ACTIVITY of AMPHIPHILIC COMPOUNDS****Orlova N.V.**

Summary. Comparative analysis of antihemolytic activity of amphiphilic compounds under hypertonic stress conditions of human erythrocytes at temperature of lytic medium 0 and 37 °C was carried-out. Erythrocytes were transferred from medium 0.15 or 0.7 M NaCl at 0 °C to medium 4.0 M NaCl at 37 °C. The values of antihemolytic activity of amphiphilic compounds depend on temperature of lytic medium. The values of maximum antihemolytic activity of amphiphilic compounds are upper at temperature of lytic medium at 37 °C than ones at 0 °C under hypertonic stress conditions of erythrocytes.

Key words: hypertonic stress, erythrocytes, amphiphilic compounds, antihemolytic activity, temperature of lytic medium.

Стаття надійшла 25.10.2010 р.