

МЕТОД ОДЕРЖАННЯ "РЕКОНСТРУЙОВАНИХ" ЕРИТРОЦИТІВ

Запорожець М.Ф., доктор біологічних наук, професор

Вінницький державний аграрний університет

Серед багатьох органел клітин органів і тканин особливою є лише одна, роль якої особливо важлива – це цитоплазматична мембрана, яка обгортає усю поверхню клітини. За допомогою цієї мембрани здійснюються зв'язки клітини з безпосередньо прилягаючої до неї частини позаклітинного середовища, тобто мікросередовища. Через цитоплазматичну мембрану протікає обмін сполук між клітиною і середовищем; за її допомогою здійснюється взаємодія між сусідніми клітинами (агрегація, клітинні контакти) а також із міжклітинною рідиною, а в інших випадках – із іншими біологічними рідинами (кров'ю, лімфою, ліквором, синовією).

До таких цитоплазматичних мембран відноситься і оболонка еритроцитів, яка є зв'язуючим ланцюгом між вмістимим клітини і плазмою крові. Функціонально вона відіграє надзвичайно важливу роль у метаболічних процесах крові і сприяє при цьому збереженню гомеостазу еритроциту в цілому.

Загальна поверхня еритроцитів крові у коня живою масою 500 кг становить 14000 м², у великої рогатої худоби такою ж масою – 16000 м², а у людини живою масою в середньому 70 кг – 3000 м². Враховуючи те, що мембранна оболонка еритроцитів в основному складається із ліпопріодного комплексу, до складу якого входять багаточисельні ензими і коензими і, беручи до уваги те, що еритроцитарна маса по об'єму складає 35-55% від усієї маси крові, без затруднень – можна легко уявити, яку величезну потенціальну ферментативну активність має мембранна поверхня еритроцитів в організмі людини і тварин (1,4,5) .

Загальновідомо, що в період інкубації еритроцитів у дистильованій воді проникаюча властивість їх мембран для молекул води непомірно зростає, що приводить до різкого набухання їх і, в кінцевому

підсумку, вони руйнуються, тобто наступає гемоліз. При цьому еритроцити втрачають гемоглобін і інші цитоплазматичні компоненти (в тому числі і електроліти), які виходять у зовнішнє гіпотонічне середовище. Це супроводжується деструктивними змінами мембранної оболонки, яка, згідно з крилатим виразом її першовідкривача Антонія ван Левенгука, перетворюється на "тіні" еритроцитів (2,6).

У подальшому виявилось, що "тіні" еритроцитів можна "навантажити" різнойменними солевими компонентами і вони після цього набувають як попередню, ніби натуральну об'ємну форму, так і властиву їм напівпроникливість. Такі препарати були названі "реконструйованими" еритроцитами (2).

В основу пропонованого способу покладений метод Уіттем і Ейджер, (2) але більш удосконалений, і це дало можливість одержувати відтворювані і вірогідно надійні результати досліджень (5).

Методика проста у виконанні і може бути з успіхом використана у виробничих і науково – дослідних лабораторіях, що надзвичайно актуально на сучасному етапі розвитку мембранології (3,7).

Необхідний посуд і прилади: скляні лабораторні і центрифужні пробірки, градуйовані піпетки ємкістю 1,2,5 і 10 мл, мірні циліндри на 50 і 100 мл, предметне скло, мікроскоп і лабораторна центрифуга.

Реактиви: гепарин і кристалічний хлорид натрію ("хч" або "чда").

Кров у людини чи тварин одержують загальноприйнятими методами. В якості антикоагулянта використовують 5%-вий розчин гепарину. Дослідження проводять із щойно одержаною кров'ю в цей же день.

Для одержання "реконструйованих" еритроцитів поступають таким чином. До 5 мл крові з інтактними еритроцитами вносять такий же об'єм дистильованої води. Вмістиме пробірки ретельно перемішують, внаслідок чого наступає повний гемоліз еритроцитів. Витримують ще хвилин 5-10. Потім до 10 мл гемолізату добавляють 0,085-0,09 г хлориду натрію і вмістиме пробірки перемішують скляною паличкою до повного розчинення солі, відстоюють ще 10-15 хвилин. Протягом вказаного терміну наступає "реконструкція" "тіней" еритроцитів, які поглинають NaCl у концентрації еквівалентній його вмісту у розчині зовнішнього середовища ємкості пробірки.

Для переконання у вірогідності проведеного гемолізу і настання "реконструкції" "тіней" еритроцитів в обох випадках на предметне скло роздільно вносять по одній краплині гемолізатів з подальшою їх мікроскопією. У першому випадку (еритроцити гемолізовані дистильованою водою) у полі зору знаходять "тіні" (мембранні оболонки еритроцитів або цитоплазматичні мембрани їх), які мають різнойменну конфігурацію і абсолютно не схожу на попередню об'ємну форму еритроцитів і що дуже характерно – це різке зменшення попередньої природної поверхні еритроцитів. У другому полі зору (одержані "реконструйовані" еритроцити, мембранна оболонка яких поглинула NaCl) відзначають набування "тінями" натуральної форми, близької по об'єму до природної величини інтактних еритроцитів, але з певною помітною різницею при співставленні з нормою.

Необхідно вказати, що "реконструкцію" "тіней" еритроцитів краще проводити хлоридом натрію у концентрації від 0,85% до 1%. Однак в окремих випадках, що залежить від поставленої мети досліджень, можна використовувати і більш високі концентрації NaCl. Але при цьому необхідно брати до уваги (враховувати) фактор імгібірування або активування деяких ферментів (під час їх дослідження) гемолізату крові або її плазми хлоридом натрію, а також утворення хелатних сполук. Для в'яснення цього моменту відібрані проби крові з інтактними еритроцитами (гемолізат або плазма крові) насичують NaCl від 0,1 до 3% з певним інтервалом, наприклад, 0,5%. Визначають рівні активності досліджуваного ферменту. Для порівняння контролем слугує величина активності цього ж ензиму але без внесення NaCl: цільна кров, її плазма або гемолізат крові. Але не слід випускати з поля зору того, що при дослідженнях рівнів активності ферментів з інтактними еритроцитами або гемолізату з "реконструйованими" еритроцитами всі робочі розчини необхідно готувати з добавками хлориду натрію, еквівалентного його концентрації у фізіологічному розчині, тобто 0,85%.

У період проведення досліджень з мембранними оболонками "реконструйованих" еритроцитів виникає необхідність виділити їх із гемолізату. При цьому поступають таким чином. До певного об'єму

гемолізату в центрифужних пробірках вносять розчин NaCl (у співвідношеннях 1:5 і більше), концентрація якого еквівалентна проводимій реконструкції. Розчин змішують і центрифугують при 3000-4000g протягом 20-30 хвилин. При таких параметрах цитоплазматичні мембрани еритроцитів осідають на дно пробірки. Надосадкову рідину обережно зливають, заповнюючи об'єм пробірки новою порцією фізрозчину. Так роблять до тих пір поки надосадкова рідина не стане абсолютно прозорою, тобто не менше 7 разів.

До осаду відмитих мембранних оболонок еритроцитів добавляють ізотонічний розчин хлористого натрію, доводять його об'єм рівноцінний об'єму крові, взятої для проведення гемолізу. Осад ретельно перемішують скляною паличкою, одержують суспензію клітинних оболонок еритроцитів. Якраз їх і використовують в аналітичній роботі згідно з існуючими методиками.

На завершення варто вказати, що реконструкцію "тіней" еритроцитів можна також проводити хлоридами калію чи літію, а також магнієвою сіллю аденозинтрифосфорної кислоти (Mg АТФ).

ЛІТЕРАТУРА:

1. Гандельсман А.П., Евгеньева Л.Н. Кровь. – В кн.: Физиология человека. М.: Физкультура и спорт, 1975. – С. 214-221.
2. Иост Х. Молекулярные основы строения клетки. – В кн.: Физиология клетки. М.: Мир, 1975. – С. 11-54.
3. Кудрявцев А.А., Кудрявцева Л.А. Методы и техника исследования крови. – В кн.: Клиническая гематология. М.: Колос, 1974. – С. 5-64.
4. Косицкий Г.И. Физиология системы крови. – В кн.: Физиология человека. М.: Медицина, 1985. – С. 209-291.
5. Проссер Л. Дыхательные функции крови. В кн.: Сравнительная физиология животных. М.: Мир, 1977. – Т. 2. – С. 5-83.
6. Солдатенков П.Ф. Кровь и кровообращение. – В кн.: Физиология с.-х. животных. Л.: Наука, 1978. – С. 308-361.
7. Хочачка П., Сомеро Д. Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир, 1977. – 398 с.