

DOI: 10.26693/jmbs02.03.194

УДК 612.117+612.018

Мізін В. В.<sup>1</sup>, Ляшенко В. П.<sup>1</sup>, Лукашов С. М.<sup>2</sup>

## ОНТОГЕНЕТИЧНІ ЗМІНИ ПОКАЗНИКІВ ОСМОТИЧНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ ТА РІВНЯ ДЕГІДРОЕПІАНДРОСТЕРОН-СУЛЬФАТУ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ

<sup>1</sup>Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, м. Дніпро

<sup>2</sup>Лікувально-діагностичний науково-консультативний центр «Головний біль», м. Дніпро

valeriyamv@gmail.com

Досліджували показники осмотичної резистентності еритроцитів та рівня дегідроепіандростерон-сульфату в сироватці крові щурів трьох вікових груп. Встановили, що з віком незворотно процеси гемолізу еритроцитів розпочинаються при вірогідно вищих рівнях концентрації гіпотонічного розчину NaCl. Осмотична стійкість еритроцитів вірогідно нижча в 1,5 рази у щурів молодого віку та в 1,43 рази у щурів зрілого віку відповідно до щурів ювенільного віку. У щурів-самців зрілого віку вірогідно вища швидкість проходження гемолізу порівняно з щурами ювенільного та молодого віку. Найвищий рівень дегідроепіандростерон-сульфату в сироватці крові у щурів ювенільного віку. Цей показник вірогідно знижується на 30% у щурів молодого віку, а вже у самців зрілого віку рівень ДГЕА-С знижується на 91%. Тобто, найнижчий рівень гормону у самців зрілого віку, а саме цей показник вірогідно нижчий в 8 та 11,5 разів відносно молодих та ювенільних щурів. Виявили негативний кореляційний зв'язок між показниками вікових змін осмотичної резистентності еритроцитів та рівнем дегідроепіандростерон-сульфату. Встановлений найбільший обернений кореляційний взаємозв'язок між рівнем гормону та віковими змінами показників незворотного гемолізу еритроцитів ( $r=-0,88$ ;  $p<0,05$ ) серед трьох вікових груп.

**Ключові слова:** осмотична резистентність еритроцитів, дегідроепіандростерон-сульфат, гемоліз, щури-самці, вікові групи.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дана робота є фрагментом НДР «Біохімічні механізми адаптації живих організмів за умов патогенезу» № державної реєстрації 0116U000025.

**Вступ.** В процесі онтогенезу відбуваються морфофункціональні зміни в усіх системах організму, особливо в регуляторних системах.

Вікова інволюція супроводжується прогресуючими змінами ефективності фізіологічних функцій та підвищенням чутливості до дії несприятливих чинників. При дослідженні вікових змін багато авторів приділяють увагу дослідженню стану еритроцитів та гуморальної системи регуляції [2, 12, 16]. Але на даний час з урахуванням літературних даних саме зміни осмотичної резистентності еритроцитів в процесі вікової інволюції є недостатньо дослідженими. Хоча, показник ОРЕ є одним з найдоступніших методів дослідження показників нормального функціонування організму в цілому [1, 8]. Також, дегідроепіандростерон-сульфат (ДГЕА-С) – анаболічний гормон, чутливий до вікових змін, тому багато науковців відносять його до гормонів молодості [3, 5, 15]. На нашу думку саме осмотична стійкість еритроцитів та рівень ДГЕА-С в сироватці крові можуть бути маркерами не тільки багатьох патологічних станів організму, а можливо маркерами метаболічних зсувів, які відбуваються в різні вікові періоди. Вікова періодизація ґрунтується на виділенні вікових особливостей, характерних для певного періоду життя анатомо-фізіологічних якостей, інтенсивності росту та поведінкових реакціях. За найбільш поширеною віковою класифікацією лабораторних щурів виділяють чотири періоди. В кожному періоді виділяють декілька вікових груп за більш ретельними критеріями. Встановлення чітких вікових груп є важливою умовою при онтогенетичних дослідженнях, оскільки одні й ті самі впливи (фізіологічні, патологічні, фармакологічні) у тварин різних вікових груп викликають не тільки кількісно але й якісно різні реакції [4, 16].

**Мета роботи.** Встановити взаємозв'язок між показниками осмотичної резистентності еритроцитів та рівнем дегідроепіандростерон-сульфату у сироватці крові щурів.

**Матеріали і методи дослідження.** Експерименти були проведені на нелінійних безпородних білих щурах самцях. За віком щури були розподілені на 3 групи: I група – ювенільного віку статевозрілого періоду; II група – молодого віку репродуктивного періоду; III група – зрілого віку репродуктивного періоду. У тварин які надійшли в експеримент проводили карантин за всіма правилами зоогієни. Щури утримувались у стандартних умовах для лабораторних тварин: у світлому приміщенні з постійною температурою 20 – 25 °С та вологістю 40 – 45%. У питній воді щурів не обмежували.

Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013).

Забір крові для дослідження осмотичної резистентності еритроцитів проводили шляхом декапітації. Осмотичну резистентність еритроцитів визначали за стандартною методикою у модифікації Л. І. Ідельсона.

Кількісне визначення ступеню гемолізу еритроцитів здійснювали у забуферених розчинах хлориду натрію. Для приготування основного розчину брали 27,31 г двузаміщеного фосфату натрію ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 4,86 г однозаміщеного фосфату натрію ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 180 г хлориду натрію ( $\text{NaCl}$ ) та 2 л дистильованої води. З цього розчину готували робочі розчини хлориду натрію таких концентрацій: 0,1; 0,2; 0,3; 0,35; 0,4; 0,45; 0,5; 0,55; 0,6; 0,65; 0,7; 0,75; 0,85; 1,0.

Дані розчини розливали в 14 стерильних пробірок. В кожну пробірку додавали по 0,02 перемішаної гепаринизованої крові, збовтували. Та залишали відстоюватися при кімнатній температурі 30 хв, потім знову збовтували. Після цього центрифугували в центрифугі К-24 при 2000 об/хв протягом 5 хв. З кожної пробірки зливали надосадову рідину і вимірювали на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 500 – 560 нм (зелений світлофільтр) в кюветі з товщиною шару 10 мм проти холостої проби. В якості холостої проби використовували надосадову рідину в пробірці з концентрацією розчину хлориду натрію 1%.

За 100% гемоліз ми приймали гемоліз в пробірці, що містить 0,1% розчин хлориду натрію. Обчислювали відсоток гемолізу в кожній пробірці, порівнюючи величини екстинкції надосадової рідини з екстинкцією, прийнятою за 100% за формулою:

$$\% \text{гемолізу} = \frac{E_x \times 100}{E_1}$$

де:  $E_1$  – екстинкція надосадової рідини в пробірці з 0,1% розчином хлориду натрію;  $E_x$  – екстинкція досліджуваної проби; 100 – відсоток гемолізу в пробірці з 0,1% розчином хлориду натрію.

Визначення рівня дегідроепіандростерон-сульфату проводилися електро-хемілюмінісцентним методом на аналізаторі Elecsys 2010 від компанії Roche (виробник Швейцарія). Загальна тривалість аналізу: 18 хвилин. Перша інкубація: 15 мкл зразка інкубується з ДГЕА-С–специфічним біотинілізованим антитілом формуючи імунокомплекси, кількість яких залежить від концентрації аналіту у зразку. Друга інкубація: після додавання мікрочастинок, покритих стрептавідином, утворений комплекс зв'язується з твердою фазою за допомогою взаємодії біотину і стрептавідину.

Реакційна суміш аспірується в вимірювальну комірку, де мікрочастинки осідають на поверхню електрода в результаті магнітної взаємодії. Потім за допомогою ProCell / ProCell M видаляються не пов'язані речовини. Далі прикладена до електроду напруга викликає хемілюмінесцентну емісію, яка вимірюється фотопомножувачем. Результати визначаються за допомогою 2х-точкової калібрувальної кривої, отриманої для даного інструменту і референсної калібрувальної кривої, дані якої повідомлені в штрих-кодів набору реагентів.

Статистичну обробку результатів у тварин усіх груп проводили за допомогою програми Origin 6.0 Professional методом парних порівнянь та кореляційного аналізу. Розраховували середню арифметичну та її помилку для кожної експериментальної групи. Достовірність визначали за t-критерієм Стюдента. Зміни рахувалися вірогідними при рівні значимості  $p < 0,05$ .

#### Результати дослідження та їх обговорення.

Показником стабільності еритроцитарної клітини є осмотична резистентність еритроцитів. Механізм осмотичного гемолізу полягає в проникненні води до клітин еритроцитів, в результаті чого збільшується їх об'єм. Під час цього процесу відбувається розширення пор мембрани, через які виходить гемоглобін. Виходу гемоглобіну з еритроцитів передуює збільшення проникності мембран для іонів калію. Ми проаналізували показники ОРЕ щурів різного виду (рис. 1) бачимо, що у самців-щурів ювенільного віку статевозрілого періоду показник осмотичної резистентності складав  $0,37 \pm 0,02$  % розчину  $\text{NaCl}$ , тобто значення показника знаходилось в межах норми. Незворотній гемоліз 80 % наступав при концентраціях гіпотонічного сольового розчину –  $0,23 \pm 0,02$  %.

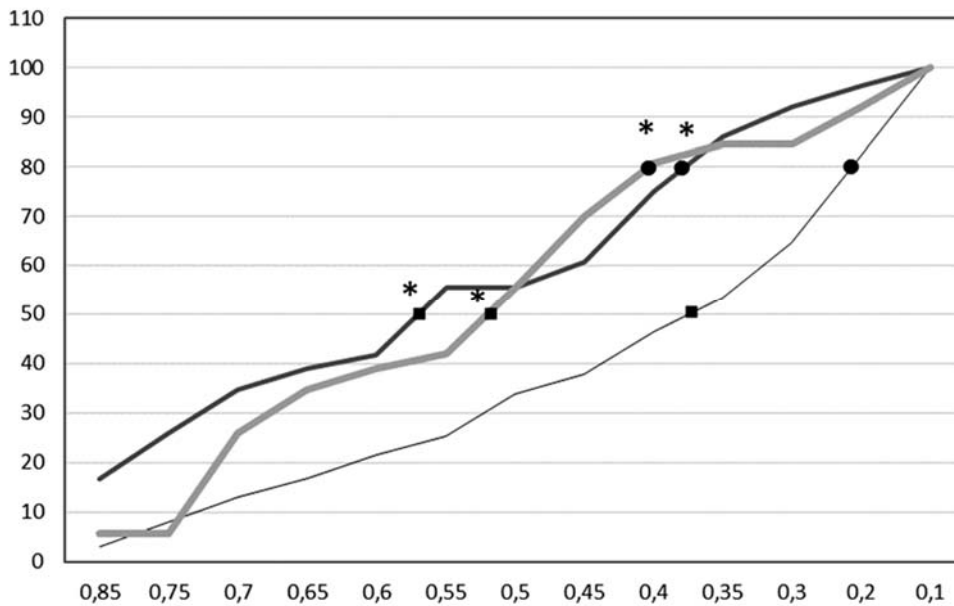


Рис. 1. Показники осмотичної резистентності еритроцитів (ОРЕ) щурів різного віку

**Примітки:** по осі абсцис наведено концентрацію основного розчину NaCl (%), по осі ординат – відсоток гемолізу. Тонка чорною лінією позначені результати щурів ювенільного віку; широка темно-сіра лінія – щури молодого віку; широка світло-сіра лінія – щури зрілого віку. ■ – 50 % гемоліз еритроцитів; ● – 80 % гемоліз еритроцитів.

\* - вірогідність відносно показників ОРЕ щурів ювенільного віку, при  $p < 0,05$

За **рисунок 1** бачимо, що значення показника осмотичної резистентності щурів молодого віку репродуктивного періоду дорівнювало  $0,56 \pm 0,03$  %, що вірогідно вище відносно щурів ювенільного віку статевозрілого періоду та виходить за межі норми. Гемоліз 80 %, що є незворотнім процесом наступав при концентрації розчину NaCl –  $0,38 \pm 0,01$  %, такі дані вірогідно вищі порівняно з самцями ювенільного віку.

У щурів зрілого віку показник осмотичної резистентності вірогідно вищий відносно щурів ювенільного віку та дорівнює  $0,53 \pm 0,01$  % розчину NaCl. Дане значення показника ОРЕ перевищує межі норми. Незворотній гемоліз розпочинався при концентрації гіпотонічного розчину  $0,4 \pm 0,02$  %.

Опираючись на отримані дані можна зробити висновки, що незважаючи на хвилеподібність показників осмотичної резистентності бачимо, що осмотична стійкість мембран еритроїдної клітини вірогідно знижується в 1,5 рази у щурів молодого віку та в 1,43 рази у щурів зрілого віку порівняно з щурами ювенільного віку. Незворотні процеси гемолізу еритроцитів розпочинаються при вірогідно вищих рівнях концентрації гіпотонічного розчину NaCl порівняно з щурами ювенільного віку, так у щурів молодого віку цей показник вищий в 1,65 рази, а у щурів зрілого віку в 1,74 рази.

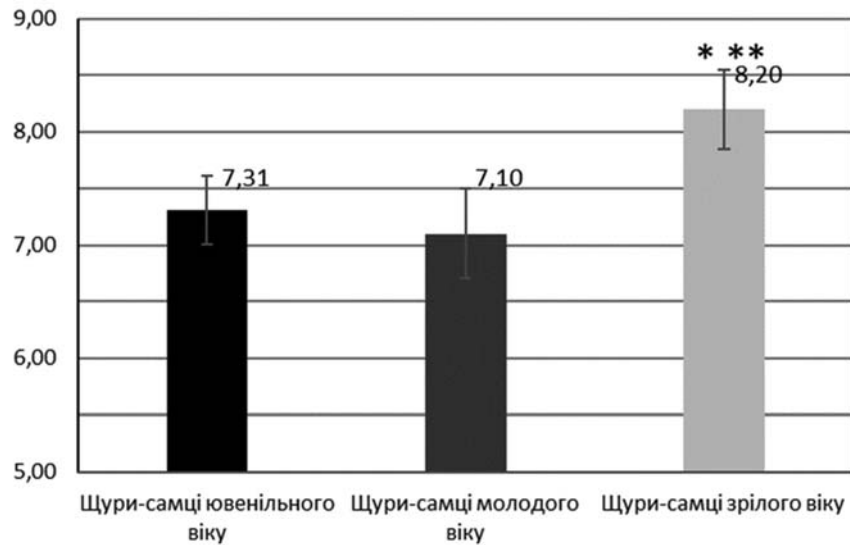
Важливою складовою в якісній оцінці функціонального стану мембран еритроїдної клітини є

швидкість проходження гемолізу. Для визначення змін в швидкості гемолізу ми досліджували кут нахилу кривої, або кут апроксимації, який дозволяє судити про швидкість гемолізу. Таким чином, чим більше показник кута апроксимації, тим вища швидкість гемолізу.

Проаналізувавши швидкість гемолізу еритроцитів щурів бачимо, що у щурів ювенільного віку статевозрілого періоду кут апроксимації швидкості гемолізу еритроцитів дорівнював  $7,31 \pm 0,3$ . Згідно з **рисунок 2**, самцям молодого віку репродуктивного періоду притаманне значення кута апроксимації швидкості гемолізу –  $7,10 \pm 0,4$ . Тобто, у щурів молодого віку швидкість гемолізу лише на 3% нижча за швидкість гемолізу еритроцитів самців-щурів ювенільного віку.

Швидкість гемолізу у щурів зрілого віку репродуктивного періоду вірогідно вища на 12 % порівняно з щурами ювенільного віку та на 15 % порівняно з самцями молодого віку, про що свідчать дані, представлені на **рисунок 2**. Значення кута апроксимації гемолізу еритроцитів щурів-самців зрілого віку –  $8,2 \pm 0,35$ .

Порівнявши значення кутів апроксимації швидкості гемолізу еритроцитів у трьох вікових групах бачимо, що у щурів-самців зрілого віку репродуктивного періоду вірогідно вища швидкість проходження гемолізу порівняно з щурами ювенільного та молодого віку. Швидкість гемолізу еритроцитів у



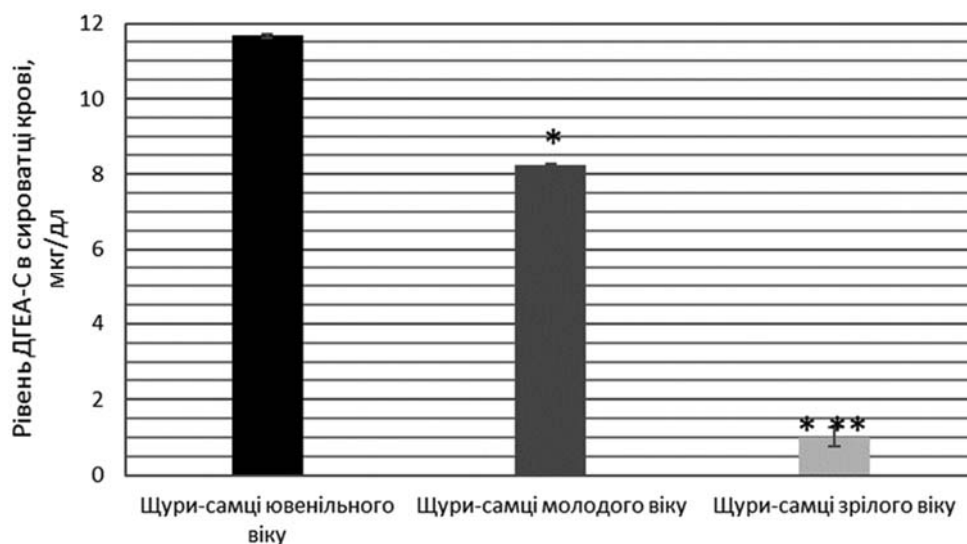
**Рис. 2.** Значення кутів апроксимації швидкості гемолізу еритроцитів щурів різного віку

**Примітки:** по осі ординат – числове значення кута апроксимації швидкості гемолізу еритроцитів. Чорним кольором позначені значення показників щурів ювенільного віку; темно-сірим – щурів молодого віку; світло-сірим – щурів зрілого віку. \* – вірогідність відносно щурів ювенільного віку, при  $p < 0,05$ ; \*\* – вірогідність відносно щурів молодого віку, при  $p < 0,05$

щурів ювенільного та молодого віку не має вірогідних відмінностей.

Чутливим до вікових змін є анаболічний гормон, який відносять до гормонів молодості – дегідроепіандростерон-сульфату (ДГЕА-С). З усіх стероїдних гормонів ДГЕА-С циркулює в периферійній крові в найбільших концентраціях. Рівень ДГЕА-С є зручним показником онтогенетичних змін організму.

В результаті проведених досліджень було встановлено, що у щурів-самців ювенільного віку статевозрілого періоду рівень дегідроепіандростерон-сульфату дорівнював  $11,67 \pm 0,04$  мкг/дл. Рівень анаболічного гормону ДГЕА-С який є попередником статевих гормонів вірогідно нижчий у щурів молодого віку репродуктивного періоду порівняно з щурами ювенільного віку та складав  $8,25 \pm 0,02$  мкг/дл, що представлено на **рисунок 3**.



**Рис. 3.** Показники рівня дегідроепіандростерон-сульфату в сироватці крові щурів різного віку

**Примітки:** по осі ординат – значення рівня ДГЕА-С в сироватці крові, мкг/дл. Чорним кольором позначені значення показників щурів ювенільного віку; темно-сірим – щурів молодого віку; світло-сірим – щурів зрілого віку. \* - вірогідність відносно щурів ювенільного віку статевозрілого періоду, при  $p < 0,05$ ; \*\* - вірогідність відносно щурів молодого віку репродуктивного періоду, при  $p < 0,05$

У щурів зрілого віку репродуктивного періоду рівень дегідроепіандростерон-сульфату вірогідно нижчий на 91 % та 87% відносно щурів ювенільного та молодого віку відповідно. Згідно з **рисунком 3** рівень ДГЕА-С самців зрілого віку дорівнював  $1,01 \pm 0,24$  мкг/дл.

Проаналізувавши отримані результати трьох різних вікових груп бачимо, що найвищий рівень ДГЕА-С в сироватці крові у щурів ювенільного віку, у щурів молодого віку цей показник вірогідно знижується на 30%, а вже у самців зрілого віку знижується на 91%. Тобто, у самців зрілого віку репродуктивного періоду цей показник вірогідно нижчий в 8 та 11,5 разів відносно молодих та ювенільних щурів.

Аналіз зв'язків між дослідженими показниками різних вікових груп виявив, що у щурів з віком присутній сильний негативний кореляційний зв'язок між рівнем ДГЕА-С та незворотнім гемолізом ( $r = -0,88$ ;  $p < 0,05$ ). Також, спостерігалась сильна негативна кореляція між вмістом ДГЕА-С в сироватці крові щурів трьох вікових груп та швидкістю гемолізу ( $r = -0,81$ ;  $p < 0,05$ ). Помірний негативний кореляційний зв'язок встановлений між рівнем ДГЕА-С та ОРЕ ( $r = -0,64$ ;  $p < 0,05$ ). Дослідивши рівень кореляції між усіма показниками осмотичної резистентності еритроцитів та рівнем ДГЕА-С трьох вікових груп встановили, що найбільш кореляційним є взаємозв'язок між ДГЕА-С та показником незворотного гемолізу. З віком всі показники осмотичної резистентності еритроцитів вірогідно підвищуються, а рівень дегідроепіандростерон-сульфату в сироватці крові щурів навпаки знижується.

Отримані результати в ході досліджу вказують на наявність онтогенетичних змін стійкості мембран еритроцитів та гуморальної системи. Щури молодого та зрілого віку порівняно з щурами ювенільного віку менш стійкі до осмотичного тиску. Осмотичний тиск створений високою концентрацією білків всередині еритроцитів, компенсується малою концентрацією низькомолекулярних речовин. Тому осмотичний тиск в еритроцитах трохи вищий, ніж у плазмі. Еритроцитарна мембрана пропускає низькомолекулярні речовини з різною проникністю. Внаслідок цього при пригніченні активного транспорту іонів знижується їх трансмембранний концентраційний градієнт [4]. Внутрішньоклітинний вміст білків, який при цьому залишається постійним, перестає компенсуватися, і осмотичний тиск у еритроцита зростає. У результаті чого вода потрапляє до клітини та призводить до гемолізу [2, 9]. Також, згідно з деякими роботами такі дані можуть бути пов'язані із зменшення пластичності мембрани, накопичення іонів  $Ca^{2+}$  та переважання кулястих

форм еритроцитів, які завершують життєвий цикл. Гемоліз може відбуватися внаслідок збільшення в'язкості ліпідного бішару мембрани еритроцитів та підвищення вмісту скелетних білків, що є визначальним для зниження здатності еритроцитів до деформації та стійкості до гіпотонічних розчинів [1, 12].

Наші дослідження показали, що з віком у щурів відбувається зниження вмісту ДГЕА-С в сироватці крові. Можливо, це пов'язано із зменшенням синтезу анаболічних гормонів, а натомість підвищенням катаболічних процесів в організмі щурів. Як відомо всі стероїдні гормони синтезуються з холестеролу, напевно пригнічується ланка синтезу ДГЕА-С, натомість активується синтез прогестерону з якого в подальшому синтезуються катаболічні гормони [5, 7]. Холестерол є біохімічним попередником не тільки стероїдних гормонів, а й жовчних кислот, ліпопротеїнів та вітаміну D. Тобто, дисбаланс в процесі перетворення холестеролу, може призвести до недостатнього біосинтезу анаболічних гормонів та порушенням в еритроцитарній мембрані [6, 13].

Отримані результати, а саме підвищення показників осмотичної резистентності еритроцитів та зниження рівня дегідроепіандростерон-сульфату у сироватці крові щурів, також встановлений між ними негативний кореляційний зв'язок можуть свідчити про наявність можливих змін в ланках обміну кальцію. Оскільки зниження рівня ДГЕА-С призводить до превалювання катаболізму, погіршенню всмоктування  $Ca^{2+}$  в кишківнику, репаративно-регенеративних процесах в кістках, накопиченню іонів кальцію в клітинних мембранах та порушенню роботи кальцієвих каналів [13, 16]. В свою чергу порушення обміну кальцію в організмі призводить до порушення синтезу стероїдних гормонів, клітинних мембран та вітаміну D з холестеролу. Тому, вікові зміни хоча б однієї ланки регуляції організму можуть призвести до порушення роботи всієї регуляторної системи, переважанню катаболічних процесів в організмі, зниженню адаптаційних можливостей та передчасному старінню [11, 14, 15].

#### Висновки

1. У щурів-самців з віком осмотична стійкість мембран еритроцитів вірогідно знижується. Показник осмотичної резистентності еритроцитів порівняно з самцями ювенільного віку у щурів молодого віку вірогідно вищий в 1,5 рази, а у щурів зрілого віку в 1,43 рази. Найвища швидкість гемолізу спостерігалась у щурів зрілого віку.
2. Найвищий рівень ДГЕА-С характерний для щурів ювенільного віку. У щурів молодого віку вміст гормону у сироватці крові зменшився на 30%, а у самців зрілого віку на 91%.

3. Встановлені негативні кореляційні зв'язки між показниками OPE та вмістом ДГЕА-С у сироватці крові щурів різного віку. З віком у щурів зростають значення OPE та зменшується рівень ДГЕА-С в сироватці крові, що вказує на вірогідний обернений взаємозв'язок.

**Перспективи подальших досліджень.** Дослідження змін показників осмотичної резистентності еритроцитів та рівня ДГЕА-С у сироватці крові щурів різних вікових груп та статі. Встановлення можливих взаємозв'язків між даними показниками в процесі вікової інволюції щурів.

## References

1. Bereznyakova AI, Zhemela OD. Zdatnist do deformatsiyi membran eritrotsitiv u schuriv riznogo viku pri gipoksiyi. *Fiziologichnyi zhurnal*. 2013; 59 (3): 72-7. [Ukrainian].
2. Zhemela OD. Fraktsiyinyi sklad i mikrovyazkisni vlastivosti lipidnogo matriksu membrani eritrotsitiv u zrilih ta starih schuriv v umovah gemichnoyi gipoksiyi. *Aktualni problemi transportnoyi meditsini: navkolishne seredovishe; profesiynе zdorov'ya; patologiya*. 2013; 2 (2). 80-4. [Ukrainian].
3. Semenova OG, Rakitskaya VV, Pivina SG. Vliyanie degidroepiandrosteron-sulfata na povedencheskie proyavleniya stressa u nizko- i vyisokotrezvozhnyih kryis. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal imeni IM Sechenova*. 2012; 1: 862-70. [Russian].
4. Kozak MV. Vozrastnyie izmeneniya osmoticheskoy rezistentnosti eritrotsitov. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta imeni NI Lobachevskogo*. 2010; 1: 648-52. [Russian].
5. Goncharov NP, Katsiya GV. Degidroepiandrosteron: biosintez, metabolizm, biologicheskoe deystvie i klinicheskoe primeneniye (analiticheskii obzor). *Andrologiya i genitalnaya hirurgiya*. 2015; 16 (1): 13-22. [Russian].
6. Semenova OG, Rakitskaya VV, Vershinina EA. Izbiratelnoe vliyanie degidroepiandrosteron-sulfata na trevozhnost, vyzvannuyu kortikoliberinom. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal imeni IM Sechenova*. 2010; 96 (10): 988-97. [Russian].
7. Nesterov YuV, Teplyiy DD. Morfofiziologicheskii pokazateli eritrotsitov pri oksidativnom stresse na raznyih etapah ontogeneza [digital resource]. *YuFU «Zhivyye i biokosnyie sistemyi»*. 2015; 11. [Russian]. Available from: <http://www.jbks.ru/archive/issue-11/article-5>.
8. Goncharov NP, Katsiya GV. Neyrosteroid degidroepiandrosteron i funktsii mozga. *Fiziologiya cheloveka*. 2013; 39 (6): 120-8. [Russian].
9. Savlunov AI, Samosonov VM, Kamilov RF, Shakirova ED. Sostoyanie ustoychivosti eritrotsitov kak zveno adaptatsii organizma. *Bashkinskiy gosudarstvennyiy meditsinskiy universitet*. 2011. s. 13-8. [Russian].
10. Bali A, Gupta S., Singh N., Jaggi A Singh. Implicating the role of plasma membrane localized calcium channels and exchangers in stress-induced deleterious effects. *European Journal of Pharmacology*. 2013; 714 (1-3): 229-38. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.06.010.
11. Flores-Soto E, Reys-Garcia J, Carbajal-Garcia A, Campuzano-González E, Perusquia M, Sommer B. Sex steroids effects on guinea pig airway smooth muscle tone and intracellular Ca<sup>2+</sup> basal levels. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2017; 439: 444-56. doi: 10.1016/j.mce.2016.10.004
12. Foller M, Huber SM, Lang F. Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB Life*. 2010; 60 (10): 661-8. doi: 10.1002/iub.106.
13. Hiroshi Miyazaki, Takitani Kimitaka, Koh Maki, Inoue Akiko, Tamai Hiroshi. Dehydroepiandrosterone alters vitamin E status and prevents lipid peroxidation in vitamin E-deficient rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2016; 58 (3): 223-31. doi: 10.3164/jcbrn.15-133.
14. Suwanjang W, Holmstrom KM, Chetsawang B., Abramov AY. Glucocorticoids reduce intracellular calcium concentration and protects neurons against glutamate toxicity. *Cell Calcium*. 2013; 53 (4): 256-63. doi: 10.1016/j.ceca.2012.12.006.
15. Timmermans W, Xiong H, Hoogenraad CC, Krugers HJ. Stress and excitatory synapses: From health to disease. *Neuroscience*. 2013; 248: 626-36. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.05.043.
16. Wiebke Arlt. Dehydroepiandrosterone and ageing. *Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004; 18 (3): 363-80. doi: 10.1016/j.beem.2004.02.006.

УДК 612.117+612.018

### ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОСМОТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ И УРОВНЯ ДЕГИДРОЭПИАНДРОСТЕРОН-СУЛЬФАТА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС

**Мизин В. В., Ляшенко В. П., Лукашов С. Н.**

**Резюме.** Исследовали показатели осмотической резистентности эритроцитов и уровень дегидроэпиандростерон-сульфата в сыворотке крови крыс трех возрастных групп. Установили, что с возрастом необратимые процессы гемолиза эритроцитов начинаются при достоверно более высоких уровнях концентрации гипотонического раствора NaCl. Осмотическая устойчивость эритроцитов достоверно ниже в 1,5 раза у

крыс молодого возраста и в 1,43 раза у крыс зрелого возраста относительно крыс ювенильного возраста. У крыс-самцов зрелого возраста достоверно выше скорость прохождения гемолиза по сравнению с крысами ювенильного и молодого возраста. Самый высокий уровень дегидроэпиандростерон-сульфата в сыворотке крови у крыс ювенильного возраста. Этот показатель достоверно снижается на 30% у крыс молодого возраста, а уже у самцов зрелого возраста уровень ДГЭА-С снижается на 91%. То есть самый низкий уровень гормона у самцов зрелого возраста, а именно этот показатель достоверно ниже в 8 и 11,5 раз относительно молодых и ювенильных крыс. Обнаружили негативную корреляционную связь между показателями осмотической резистентности эритроцитов и уровнем дегидроэпиандростерон-сульфата. Установлена самая сильная обратная корреляционная связь между уровнем гормона и возрастными изменениями показателями необратимого гемолиза эритроцитов ( $r=-0,88$ ;  $p<0,05$ ) среди трех возрастных групп.

**Ключевые слова:** осмотическая резистентность эритроцитов, дегидроэпиандростерон-сульфат, гемолиз, крысы-самцы, возрастные группы.

UDC 612.117+612.018

### Ontogenetic Changes in Osmatic Resistance of Erythrocytes Indicators and in Level of Dehydroepiandrosterone-Sulfate in the Serum of Rats' Blood

*Mizin V. V., Lyashenko V. P., Lukashov S. M.*

**Abstract.** The erythrocyte membrane and the humoral regulation system are the most sensitive to various adverse factors impact. The osmotic resistance of red blood cells and the level of dehydroepiandrosterone sulfate can be used as a marker of many pathological conditions and metabolic shifts that occur in different age periods. The aim of the paper is to establish the interconnection between the indices of erythrocytes osmotic resistance and the level of dehydroepiandrosterone sulfate in the serum of rats' blood.

Experiments were carried out on non-linear, nonbreeding white male rats. They were divided into 3 groups: I group – the juvenile age of the sexually mature period; II group – the young age of the reproductive period; III group – the mature age of the reproductive period. The osmotic resistance of erythrocytes was determined by the standard method of L.I. Idelsohn, and the DHEA-S level was determined by the electro-chemiluminescent method on the Roche Elecsys 2010 analyzer.

We analyzed the osmotic resistance of erythrocytes in rats of different ages and found out those indicators were within the normal range ( $0,37 \pm 0,02\%$ ) among the rats of the juvenile age. Among young rats the ORE index significantly increases 1,5 times and among rats of the mature age it is 1,43 times more than among the rats of the juvenile age. Also in comparison with rats of the juvenile age irreversible processes of hemolysis of red blood cells exist at higher concentrations of a hypotonic solution in two other groups. The highest rate of hemolysis of erythrocytes is among rats of mature age. In this group, the rate is significantly higher by 12% and 15% compared with juvenile and young rats, respectively. Sensitive to age-related changes in anabolic hormone is dehydroepiandrosterone sulfate. In males of juvenile age the hormone level was  $11,67 \pm 0,04$  mg/dl. In other age groups the decrease of the level of DHEA-S in the rats blood serum was observed. The lowest level of hormone was observed in males of mature age. Therefore, the hormone level in this group is significantly lower by 91% relative to juvenile rats and 87% lower in comparison with young males. Based on the results of the ORE and the DHEA-S level, a correlation analysis was performed. Moderate and strong inverse correlations between the age-related changes of the studied indicators were established. The strongest negative correlation was established between the level of DHEA-S and the index of irreversible hemolysis of erythrocytes. The correlation coefficient between the level of the hormone and the rate of hemolysis in this group was  $r = -0,88$ .

The obtained results may indicate the presence of ontogenetic changes in the osmotic resistance of membranes and the level of DHEA-S. The highest value of the ORE index and the hemolysis rate of erythrocytes are characteristic for males of mature age. This may indicate the decrease in osmotic resistance with age. The level of DHEA-S in groups of rats of the juvenile age is the highest among the three age groups studied, and in males it is 91% lower. Between the indices of osmotic resistance of erythrocytes and the level of dehydroepiandrosterone sulfate, reliable inverse correlation links are established.

**Key words:** osmotic resistance of erythrocytes, dehydroepiandrosterone sulfate, hemolysis, male rats, age groups.

Стаття надійшла 10.07.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування