

УДК: 577.043:615.387:612.014.464

**Изучение сохранности криоконсервированных эритроцитов после обработки озоном
І.А.Буряк, В.Д.Зинченко, Е.Л.Воловельская, Н.В.Репин, В.В.Рамазанов**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)
irina_m_82@mail.ru*

Исследовали влияние озона в дозах 0,05–0,4 мг/л на сохранность эритроцитов человека, криоконсервированных в среде, содержащей декстран, и их способность к агрегации в плазме. Показано, что при высоких дозах озона сохранность клеток снижается, и наблюдается большое количество кренированных эритроцитов. При оптимальных малых дозах озона сохранность эритроцитов повышается, при этом они имеют нормальную дискоидную форму и активно образуют «монетные» столбики в плазме, что свидетельствует о сохранении функциональных характеристик клеток.

Ключевые слова: *эритроциты, криоконсервирование, озон, сохранность, агрегация.*

Введение

Ранее было показано, что обработка эритроцитов малыми дозами озона способствует стабилизации мембран и повышению устойчивости клеток к осмотическому лизису при их экспозиции в гипертонических растворах NaCl (Белих, 2006). Работы ряда авторов указывают на то, что снижение уровня гемолиза связано с действием озона на мембраны эритроцитов. Так, в работе Gornicki и Gutsze (Gornicki, Gutsze, 2000) исследовали влияние разных доз озона на мембраны эритроцитов методом электронного парамагнитного резонанса и установили, что озон влияет на состояние мембранных липидов и тем самым может менять текучесть эритроцитарных мембран. Калер и др. (Калер и др., 1989), используя флуоресцентные зонды, встраиваемые в озонированные тени эритроцитов, показали, что озон уменьшает микровязкость пограничных липидов и увеличивает микровязкость основной массы липидов в бислое. Было также показано, что обработка эритроцитов низкими дозами озона увеличивает их устойчивость к литическому действию детергента – тритона X-100 (Калер и др., 1990). Положительное действие малых доз озона на стабильность клеточных мембран наблюдалось не только на эритроцитах, но также и на микроорганизмах (Мельникова и др., 1989). При обработке микроорганизмов низкими, сублетальными дозами озона была отмечена стимуляция эндогенного дыхания, прорастание спор и стимуляция последующих процессов роста и развития. Таким образом, анализ опубликованных данных дает основание полагать, что действие озона на свойства мембран имеет сходный характер для разных биологических систем.

Согласно существующим представлениям, криоповреждения биологических систем в первую очередь связаны с действием холода на мембранные структуры, и восстановление биологических объектов после криоконсервирования также во многом связано с восстановлением свойств мембран (Белоус, Бондаренко, 1982). В связи с этим, представляет интерес исследовать возможность использования действия малых доз озона на состояние клеточных мембран для повышения сохранности криоконсервированных клеток.

Цель данной работы – исследование влияния различных доз озона на сохранность мембран эритроцитов человека и их морфологию после криоконсервирования.

Методика

Эритроциты получали из донорской крови человека. Для этого их трижды отмывали от плазмы физиологическим раствором и центрифугировали в течение 15 минут при 800 g. Полученную эритромассу смешивали в объемном соотношении 1:1 с криозащитным раствором, содержащим глюкозу (2%), сахарозу (7%), NaCl (0,3%), ДМСО (5%) и декстран с молекулярной массой 10000 (20%) (Рамазанов та ін., 2006). После инкубирования в криозащитной среде при комнатной температуре (+22°C) в течение 40 минут образцы объемом 1 мл в пластиковых контейнерах замораживали погружением в жидкий азот. Замороженные образцы оттаивали на водяной бане при +4°C. Отмывку проводили, медленно приливая к оттаянным клеткам физиологический раствор в соотношении 1:10 при +37°C, после чего суспензию центрифугировали при описанных выше условиях и удаляли надосадок. Две последующие отмывки проводили озонированным физиологическим раствором с одной из следующих концентраций растворенного озона: 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40 мг/л.

Сохранность эритроцитов определяли по выходу гемоглобина из клеток (Wagner et al., 2000). Для этого отбирали аликвоты объемом 100 мкл после первого разбавления суспензии деконсервированных клеток отмывочным раствором и после двукратного центрифугирования клеток

с физиологическим раствором по описанной выше схеме. Каждую аликвоту вносили в пробирку, содержащую 2 мл дистиллированной воды, центрифугировали и измеряли пропускание света (T) в супернатантах. Измерения проводили на спектрофотометре СФ-4А на длине волны 543 нм.

Сохранность клеток (x) в каждом образце рассчитывали по следующей формуле:

$$x = \frac{\lg T_2}{\lg T_1} \times 100\%, \quad (1)$$

где x – значение сохранности эритроцитов, T_1 – пропускание света гемолизатом клеток, отобранных после первого разбавления суспензии деконсервированных клеток отмывочным раствором, T_2 – пропускание света гемолизатом клеток, отмытых двукратным центрифугированием с физиологическим раствором.

Сохранность эритроцитов в образцах, обработанных озоном, сравнивали с сохранностью контрольных эритроцитов, трижды отмытых физиологическим раствором, не содержащим озон.

Озонирование физиологического раствора проводили путем его барботирования озон-кислородной смесью при CO . Концентрацию озона (C) в растворе определяли по величине экстинкции на длине волны 255 нм (полоса Хартли) (Лунин и др., 1998):

$$C_{\text{мг/л}} = 3,4 \ln \frac{I_0}{I} \quad (2)$$

где I_0 – интенсивность падающего света, I – интенсивность прошедшего света, коэффициент 3,4 вычислен для кюветы с длиной оптического пути 20 мм (Лунин, 1998; Перетягин, Карелин, 1998).

Требуемую концентрацию озона для введения в суспензии эритроцитов получали, разбавляя физиологическим раствором исходный озонированный раствор.

Нами также была проведена морфологическая оценка способности эритроцитов образовывать «монетные» столбики в плазме (Chien, 1975). Морфологическое состояние криоконсервированных эритроцитов, отмытых озонированным физиологическим раствором с концентрациями озона 0,2 мг/л и 8,7 мг/л, а также клеток, не обработанных озоном, оценивали с помощью оптического микроскопа МБР-3, снабженного цифровой видеокамерой Panasonic WW-CP 470.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили по данным, полученным на эритроцитах от 6 доноров, используя t -критерий Стьюдента (Чарыков, 1984). При этом нами было установлено, что при аккуратном проведении серии экспериментов на эритроцитах одного и того же донора среднеквадратичное отклонение среднего не превышает 2%.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлена зависимость сохранности криоконсервированных эритроцитов от концентрации озона в среде отмывания.

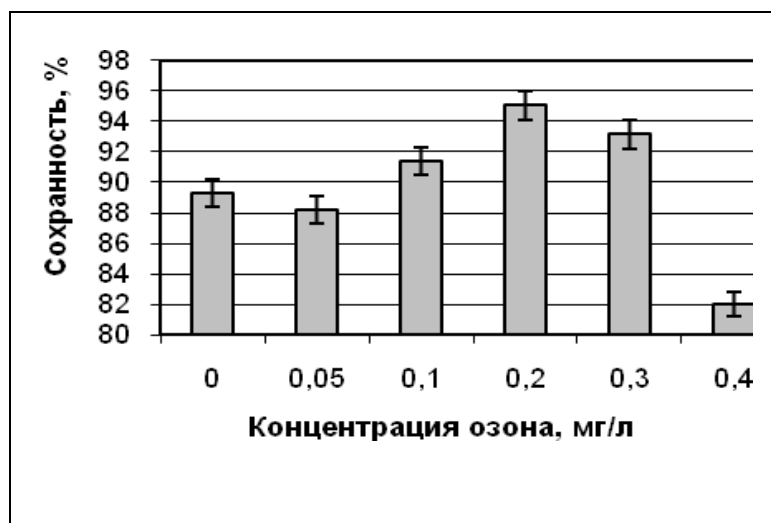


Рис. 1. Зависимость сохранности криоконсервированных эритроцитов, отмытых от криопротектора озонированным физиологическим раствором, от концентрации озона в отмывочной среде

Из рисунка видно, что действие озона на эритроциты является дозозависимым, причем существуют некоторые оптимальные дозы озона, способствующие повышению сохранности эритроцитов после криоконсервирования. Максимальная сохранность эритроцитов наблюдается после отмывки озонированным физиологическим раствором с концентрациями озона 0,20 и 0,30 мг/л и составляет 95,0% и 93,2% соответственно, тогда как сохранность клеток в контрольных образцах составляет 89,3%. При концентрациях озона выше или ниже, чем 0,2–0,3 мг/л отмечено снижение сохранности эритроцитов.

На микрофотографиях (рис. 2) можно наблюдать характерные структуры, образованные эритроцитами в плазме, – «монетные» столбики, причем видно, что после обработки суспензий эритроцитов раствором с концентрацией озона 0,2 мг/л характер образования столбиков не отличается от контроля.

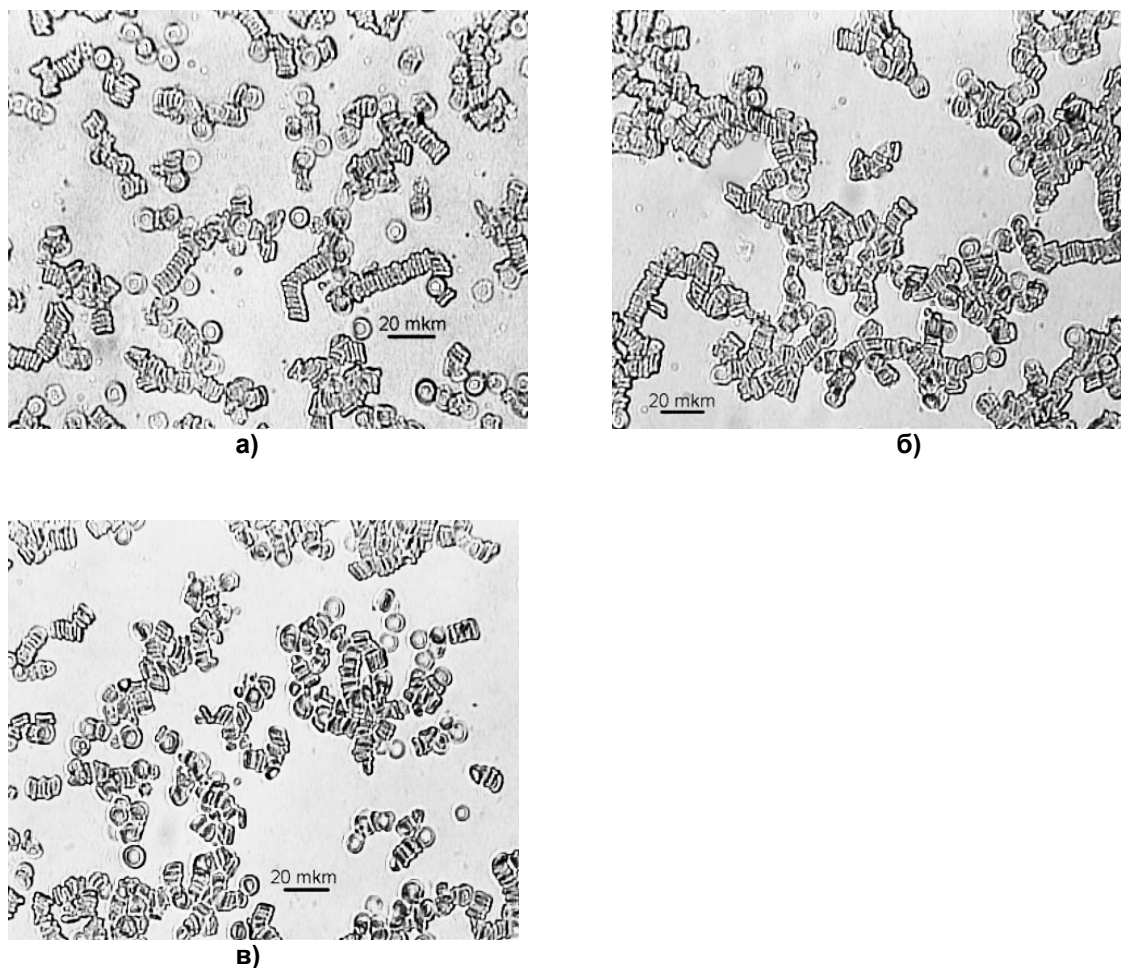


Рис. 2. Микрофотографии эритроцитов в плазме крови: а) эритроциты, отмывые физиологическим раствором после замораживания-оттаивания; б) эритроциты, отмывые озонированным физиологическим раствором с концентрацией озона 0,2 мг/л после замораживания-оттаивания; в) эритроциты, отмывые озонированным физиологическим раствором с концентрацией озона 8,7 мг/л после замораживания-оттаивания

Показанные на рис. 2в эритроциты, обработанные низкой дозой озона, имеют нормальную дискоидную форму, и отмечается увеличение склонности эритроцитов к образованию столбиков, что следует из характера упорядоченности клеток в столбиках. Во многих случаях при обработке эритроцитов низкой дозой озона количество кренированных клеток, видимых в поле зрения, было даже несколько меньше, чем в контрольных, не обработанных озоном образцах.

При концентрации озона в отмывочном растворе 8,7 мг/л и более наблюдается большое количество кренированных клеток – стоматоцитов и эхиноцитов, а способность эритроцитов к образованию столбиков снижается, и можно наблюдать мелкие, неупорядоченные скопления клеток. Эффект высокой концентрации озона согласуется с известными результатами о дозовом характере

его действия на биологические системы. Эти результаты свидетельствуют о том, что превышение некоторой пороговой дозы озона вызывает деструкцию биополимеров (Белих, 2006) и нарушение структурной организации мембран (Матус, 1990). В итоге, на клеточном уровне эффекты больших доз озона проявляются в существенных изменениях морфологических характеристик.

Нормальные эритроциты, как известно, представляют собой двояковогнутые диски и не могут образовать агрегаты без изменения своей формы. Считается, что форма эритроцитов при образовании межклеточных контактов изменяется таким образом, что поверхности соседних клеток располагаются параллельно друг другу (Chien, 1975). Контакты обеспечиваются белками плазмы (фибриноген, сывороточные глобулины), которые адсорбируются на поверхностях соседних клеток и образуют мостики между ними. При этом важную роль в механизме образования «монетных» столбиков играет именно деформабельность эритроцитов.

Способность эритроцитов более активно образовывать столбики после обработки малыми дозами озона указывает, по нашему мнению, на возрастание деформабельности клеточных мембран.

Выводы

Полученные результаты указывают на то, что:

- максимальная сохранность кріоконсервованих еритроцитів спостерігається після обробки їх озоном в дозах 0,2–0,3 мг/л;
- обробка еритроцитів малими дозами озона підвищує їх схильність до утворення столбиків, що вказує на підвищення деформабельності еритроцитів, і сприяє, по-видимому, меншому їх пошкодженню при отмывке от криопротекторов после низкотемпературного консервирования.

Список литературы

- Белих І.А. Дія озону на біополімери та озонові методи в кріобіології. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Х., 2006. – 21с.
- Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурное изменение биологических мембран при охлаждении. – Киев: Наук. думка, 1982. – 256с.
- Калер Г.В., Мельникова А.М., Матус В.К., Конев С.В. Взаимодействие озона с мембранами эритроцитов // Биологические мембраны. – 1989. – Т.6, №11. – С. 1164–1169.
- Калер Г.В., Рачковский Л.И., Матус В.К., Конев С.В. Влияние озона на устойчивость эритроцитов к действию детергентов // Биологические мембраны. – 1990. – Т.7, №1. – С. 41–46.
- Лунин В.В., Попович М.П., Ткаченко С.Н. Физическая химия озона. – М.: Издательство Московского университета, 1998. – 474с.
- Матус В.К. Молекулярно-мембранные механизмы действия озона на клетки микроорганизмов. Автореф. дис. ... доктора биол. наук. – 1990. – 49с.
- Мельникова А.М., Калер Г.В., Бабич Г.В. и др. Разнонаправленное действие низких и высоких доз озона на репродуктивную способность и активность дыхания дрожжевых клеток *Candida utilis* // Журнал общей биологии. – 1989. – Т.1., №6. – С. 815–818.
- Рамазанов В.В., Олійник О.О., Меліхова С.В. та ін. / Спосіб кріоконсервування еритроцитів / Патент України №13845, МПК⁷ А 01N1/02. Публ. 17.04.2006. Бюл. №4.
- Перетягин С.П., Карелин В.И. К методике определения концентрации озона в газовой фазе // Тез. докл. III Всероссийской научно-практической конференции «Озон и методы эфферентной терапии в медицине». – Н. Новгород, 1998. – С. 162–164.
- Чарыков А.К. Математическая обработка результатов химического анализа. – Ленинград: Химия, 1984. – 168с.
- Gornicki A., Gutsze A. In vitro effects of ozone on human erythrocyte membranes: An EPR study // Acta Biochimica Polonica. – 2000. – Vol.47, №4. – P. 963–971.
- Chien S. Biophysical behavior of red cells in suspensions // In: The Red Cells. Vol.II. – Academic Press, 1975. – P. 1031–1134.
- Wagner C.T., Burnett M.B., Livesey S.A., Connor J. Red blood stabilization reduces the effect of cell density on recovery following cryopreservation // Cryobiology. – 2000. – Vol.41. – P. 178–194.

Вивчення збереженості кріоконсервованих еритроцитів після обробки озоном

І.А.Буряк, В.Д.Зинченко, Е.Л.Воловельська, Н.В.Репін, В.В.Рамазанов

Досліджували вплив озону в дозах 0,05–0,4 мг/л на збереженість еритроцитів людини, кріоконсервованих в середовищі, що містило декстран, ДМСО, сахарозу, глюкозу, хлористий натрій. При оптимальних дозах озону (0,2–0,3 мг/л) збереженість еритроцитів збільшується до

95,0% проти 89,3% у зразках, не оброблених озоном. Морфологічні дослідження показали, що клітини при цьому мають нормальну дискоїдну форму і активно утворюють «монетні» стовпчики в плазмі. При високих дозах озону (0,4 мг/л і більше) збереженість клітин знижується, і збільшується кількість кренованих еритроцитів.

Ключові слова: *еритроцити, кріоконсервування, озон, збереженість, агрегація.*

Investigation of cryopreserved erythrocyte survival after ozone treatment
I.A.Buriak, V.D.Zinchenko, E.L.Volovelskaya, N.V.Repin, V.V.Ramazanov

Effect of ozone in doses of 0,05–0,4 mg/l on survival of human erythrocytes, cryopreserved in the medium, which contained dextrane, dimethylsulphoxide, sucrose, glucose, sodium chloride, was studied. Under optimal ozone doses (0,2–0,3 mg/l) erythrocyte survival increases up to 95,0% compared to 89,3% in non-ozonized samples. Morphological investigations have shown that such cells are of normal discoid shape and they actively form rouleaux in plasma. Under high ozone doses (0,4 mg/l and higher) erythrocyte survival decreases and amount of crenated cells rises.

Key words: *erythrocytes, cryopreservation, ozone, survival, aggregation.*

Представлено В.А.Тиманюком
Рекомендовано до друку В.А.Бондаренком