



УДК 612.111.014.464:615.014.41 <http://dx.doi.org/10.15407/dopovidi2016.02.101>

В. Д. Зинченко, К. Н. Головина, И. П. Горячая, Е. Л. Воловельская

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

E-mail: irynagor@gmail.com

## Индукция озоном адаптивного ответа эритроцитов барана на холодовой стресс

(Представлено академиком НАН Украины А. Н. Гольцевым)

Проведена оценка устойчивости эритроцитов барана, обработанных озонированным физиологическим раствором с концентрацией озона 0,16 мг/л, при хранении в течение 12 недель в гипотермических условиях при температуре 2–4 °С в различных средах: 0,9%-м растворе хлорида натрия, 7%-м растворе сахарозы, глюкозо-цитратном растворе Олсвера, 5%-м растворе маннита и 10%-м растворе декстрана. Показано, что обработанные озоном эритроциты в меньшей степени утрачивают осмотическую устойчивость после хранения по сравнению с не обработанными клетками. Обработанные озоном эритроциты в среде с 5%-м раствором маннита сохраняют способность к образованию розеток с лимфоцитами человека после 12 недель хранения. Результат объясняется влиянием озона на деформируемость мембран эритроцитов.

**Ключевые слова:** криобиология, гипотермия, оксидативный стресс, активные формы кислорода, озон.

Основная цель консервирования и длительного хранения эритроцитов в гипотермических условиях (2–4 °С) определяется высокой клинической потребностью в этих клетках и их продуктах. Однако в последние годы в связи с развивающимися клеточными технологиями возникло много фундаментальных и практических задач, которые включают в себя изоляцию клеток различных видов и манипуляции с ними. Сюда входят клеточная инженерия, генетические технологии, применение функционально способных или генетически модифицированных клеток для репаративной медицины, иммунологические исследования. Таким образом, возникают задачи длительного хранения как эритроцитов различных видов, так и других клеток.

В организме сохранение клеток обеспечивается естественными процессами их функционирования. Если клетка повреждается или стареет и погибает, то включаются естественные

© В. Д. Зинченко, К. Н. Головина, И. П. Горячая, Е. Л. Воловельская, 2016

механизмы ее репарации или замещения. К сожалению, если клетка извлечена из организма, изменившееся внешнее окружение приводит не только к ее повреждению, но и исключает процессы естественной репарации или удаления погибших клеток. Если изолированные клетки начинают повреждаться и погибать, то в отсутствие замещения клеток происходит снижение биологической активности всей системы и успех длительного хранения клеток вне организма и пригодность их для дальнейшего применения зависят от состава среды хранения и от способа их подготовки к хранению.

Эритроциты барана, хранящиеся в гипотермических условиях, используются для различных исследований, однако наиболее широкое применение они нашли в иммунологии для количественной оценки антителообразующих клеток при анализе иммунного статуса организма человека. Человеческие Т-клетки характеризуются способностью спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана [1]. Это свойство позволяет использовать эритроциты барана с диагностической целью.

Гипотермическое хранение эритроцитов барана для иммунологических исследований в настоящее время производится в среде Олсвера, эритроциты остаются пригодными к использованию в течение 8 недель [2]. Наша цель состояла в поиске способа увеличения срока гипотермического хранения эритроцитов барана. Идея работы заключалась, в том, чтобы использовать адаптивную реакцию на слабый стресс, вызванный перед закладкой клеток на хранение для повышения их устойчивости к действию других стресс-факторов, возникающих при хранении в гипотермических условиях. Известно, что в состоянии адаптивного ответа на стресс биологическая система во многих случаях приобретает устойчивость к другим видам стресса, иногда более длительным и сильным, чем первичный [3]. В настоящем исследовании эритроциты барана перед закладкой на хранение обрабатывали озоном в низкой дозе, вызывая в них слабый оксидативный стресс. Определяли изменения показателя осмотической хрупкости эритроцитов барана и способности их к розеткообразованию с лимфоцитами человека после хранения в различных средах в гипотермических условиях в течение 12 недель.

На показатели осмотической хрупкости эритроцитов влияет ряд факторов, среди которых важное место занимает деформируемость мембран [4]. С другой стороны, от деформируемости мембран зависит способность клеток к образованию межклеточных контактов и агрегатов [5]. Это дает основание предполагать существование корреляции между осмотической хрупкостью эритроцитов барана и их способностью к розеткообразованию.

**Материалы и методы.** Кровь барана, заготовленная на 3,8% цитрате натрия, была любезно предоставлена сотрудниками Харьковской зооветеринарной академии. Исследования на эритроцитах половозрелых самцов барана проводили в соответствии с “Общими принципами экспериментов на животных”, одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007 г.) и согласованными с положениями “Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985 г.). Кровь центрифугировали при 800 g в течение 10 мин, удаляли плазму и трижды отмывали путем центрифугирования в тех же условиях в 10-кратном объеме изотонического раствора NaCl, содержащего 0,01 М *трис*-буфера, pH 7,2.

Для получения лимфоцитов человека использовали донорскую кровь, предоставленную Харьковской областной станцией переливания крови со сроком хранения после забора не более 4 суток. Получение лимфоцитов и оценку их жизнеспособности для реакции розеткообразования проводили по методике [6].

Для хранения эритроцитов при 4 °С использовали среды, состав которых приведен в табл. 1.

Озон получали путем электросинтеза, пропуская газообразный кислород через озонатор барьерного типа [7]. Озонированный физиологический раствор (ОФР) получали барботированием физиологического раствора (150 мМ хлорида натрия) озono-кислородной смесью при температуре тающего льда.

Осадок эритромаcсы разделили на две части: одну часть дважды отмывали ОФР с содержанием озона 0,16 мг/л и ресуспендировали в равном объеме среды для хранения, другую — отмывали неозонированным физиологическим раствором и также ресуспендировали в равном объеме среды для хранения и использовали как контрольный образец. Во все суспензии добавляли антибиотик (цифран) в конечной концентрации 0,01 мг/мл. Подготовленные таким образом клетки хранили в холодильнике при температуре 2–4 °С. Осмотическую хрупкость эритроцитов определяли, помещая клетки в растворы хлорида натрия разной осмоляльности (от 0 до 150 мМ) и измеряя гемолиз [8]. Показателем осмотической хрупкости считается значение осмоляльности раствора хлорида натрия, в котором степень гемолиза составляет 50%. Чем ниже осмоляльность раствора, в котором гемолиз достигает значения 50%, тем клетки более осмотически устойчивы. Снимки образовавшихся розеток производили с помощью микроскопа “Axio Observer Z1” (“Carl Zeiss”, Германия).

Все исследования проводили в трех повторах. Определяли средние значения и стандартные погрешности. При сравнении выборок использовали *t*-критерий Стьюдента, различия считали достоверными при  $p < 0,05$ . На рисунках приведены средние величины и их стандартные отклонения.

**Результаты и их обсуждение.** Влияние длительности хранения эритроцитов в гипотермических условиях на их осмотическую устойчивость изучали, периодически измеряя показатель осмотической хрупкости в процессе хранения.

На рис. 1 в качестве примера приведены зависимости гемолиза эритроцитов в среде на основе маннита от концентрации NaCl в начале гипотермического хранения и после 12 недель хранения без обработки озоном и после обработки озоном. Как видно, график для эритроцитов после гипотермического хранения смещен в сторону высоких концентраций NaCl относительно графика для контрольных клеток, которые не подвергались хранению. Отсюда следует, что после хранения эритроциты становятся менее осмотически устойчивыми. Однако у клеток, обработанных озоном, осмотическая устойчивость снижается в меньшей степени — график для них смещен влево, в сторону низких концентраций NaCl, относительно графика не обработанных клеток.

Таблица 1. Среда для хранения эритроцитов

Название среды	Состав среды	pH среды
0,9%-й р-р NaCl	Хлорид натрия — 9 г/л, 10 мМ <i>трис</i> -буфер — до 1л	7,0–7,2
7%-й р-р сахарозы	Сахароза — 70 г/л, хлорид натрия — 3 г/л, вода дистиллированная — до 1л	6,9–7,0
Олсвера р-р	Глюкоза — 20,5 г/л, цитрат натрия — 8 г/л, лимонная кислота — 0,552 г/л, хлорид натрия — 4,2 г/л, вода дистиллированная — до 1л	7,3
5%-й р-р маннита	Маннит — 50 г/л, хлорид натрия — 0,9 г/л, вода дистиллированная — до 1 л	6,9–7,2
10%-й р-р декстрана	Декстран — 100 г/л, вода дистиллированная — до 1л	7,0–7,2

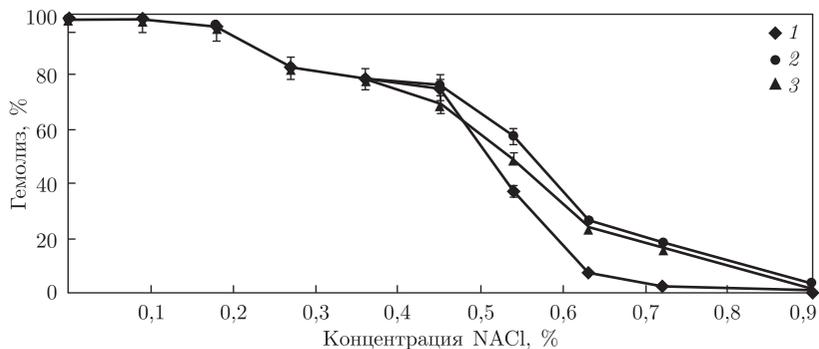


Рис. 1. Значения гемолиза эритроцитов барана при помещении их в раствор NaCl различной концентрации после хранения в среде с маннитом: 1 — сразу после внесения эритроцитов в среду с маннитом (контроль); 2 — через 12 недель хранения без обработки озоном; 3 — через 12 недель хранения после обработки ОФР с концентрацией озона 0,16 мг/л

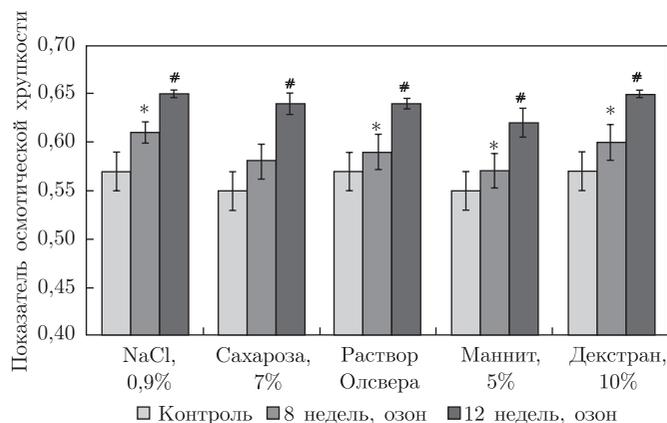


Рис. 2. Значения показателя осмотической хрупкости эритроцитов барана в различных средах до закладки на гипотермическое хранение (контроль) и после хранения обработанных озоном клеток в течение 8 и 12 недель.

\* —  $p \leq 0,05$  по сравнению с контролем; # —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем

Значения показателя осмотической хрупкости для эритроцитов во всех исследованных средах при хранении клеток в гипотермических условиях в течение 12 недель приведены на рис. 2. Как следует из рисунка, показатель осмотической хрупкости возрастает с увеличением срока хранения эритроцитов, что означает снижение их осмотической устойчивости. Однако в клетках, обработанных озоном, это возрастание выражено в меньшей степени. Наиболее устойчивыми в плане изменения осмотической хрупкости оказались клетки в среде с маннитом.

Результаты исследования розеткообразования эритроцитов барана после их хранения в других средах показали, что после 12 недель хранения способность к розеткообразованию утратили эритроциты из среды Олсвера и из сахарозной среды, для которых характерно количество прикрепляющихся клеток меньше трех. Эритроциты, хранившиеся в среде с декстраном, розеток не образовывали. Полноценные розетки получали только с озонированными эритроцитами, хранившимися 12 недель в среде с маннитом.

На рис. 3 представлен снимок розетки эритроцитов барана с лимфоцитарной клеткой человека после хранения их в среде с маннитом в течение 12 недель.

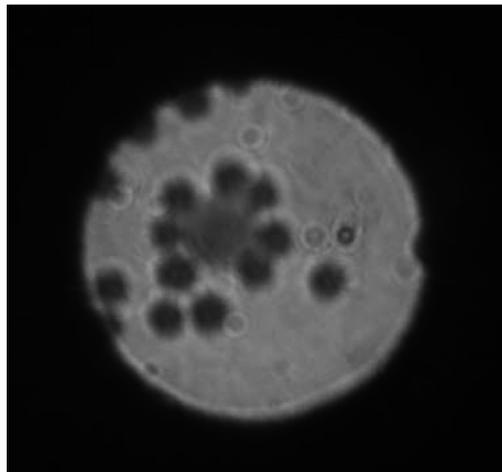


Рис. 3. Розетка с эритроцитами барана, хранившимися в среде на основе маннита 12 недель

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что обработка клеток озоном способствует повышению осмотической устойчивости эритроцитов барана при гипотермическом хранении, такие клетки сохраняют способность к розеткообразованию с лимфоцитами человека после 12 недель хранения в гипотермических условиях.

Полученные нами результаты подтверждают, что в состоянии адаптивной реакции эритроцитов на слабый оксидативный стресс в них запускаются механизмы, приводящие к повышению устойчивости клеток к действию другого стресс-фактора. Этот факт согласуется с существующими представлениями о неспецифическом характере адаптивной реакции живой системы на слабый стресс, что проявляется на разных уровнях организации живой системы — на уровне целого организма, ткани, отдельной клетки [9].

Применение озона использовалось ранее при хранении клеток в гипотермических условиях. В работе [10] с использованием эритроцитов человека, хранившихся в гипотермических условиях от 15 до 35 суток и обработанных смесью  $O_3/O_2$ , было показано, что синтез 2,3-ДФГ ускоряется на 10–30% в клетках, прошедших предобработку озоном по сравнению с клетками, хранившимися без такой предобработки.

Авторами работы [11] исследовалось влияние озона на изменение вязкости суспензии эритроцитов человека, хранившихся в гипотермических условиях в течение 3 недель. В контрольных образцах суспензии клеток, не обработанных озоном, вязкость возрастала в течение 3 недель хранения с 0,0366 до 0,0470 сП. После обработки клеток озоно-кислородной смесью с концентрацией озона от 30 до 80 мг/л в течение 10 мин вязкость в начальный момент возрастала, однако после хранения клеток в течение 3 недель снижалась до значений, близких к ее значению в контрольном образце в начале срока хранения.

Изменение вязкости, как и осмотической устойчивости, эритроцитов под действием озона может быть объяснено изменением эластичности (или деформируемости) мембран. Как показали Шиндлер с соавт. [12], латеральная подвижность мембранных белков возрастает в 2,5 раза, когда концентрация 2,3-ДФГ меняется от 0 до 12,5 мМ. С учетом того, что после обработки озоном истощение эритроцитов по 2,3-ДФГ в хранящихся клетках замедляется [10], различия в изменении подвижности мембран по данным работы [12] и изменение осмотической устойчивости по результатам нашего исследования могут быть следствием разного уровня 2,3-ДФГ в обработанных и не обработанных озоном клетках.

Таким образом, полученные нами результаты вместе с известными данными других исследователей показывают, что индукцию слабого оксидативного стресса в эритроцитах перед холодowymi воздействиями при закладке их на хранение можно использовать как инструмент повышения эффективности сохранения функциональных характеристик клеток. Дальнейшее развитие данного подхода в криобиологии, по нашему мнению, может быть полезным при разработке протоколов хранения биологического материала.

## Цитированная литература

1. Wybran J., Carr M. C., Fudenberg H. H. The human rosette-forming cell as a marker of a population of thymus-derived cells // J. Clin. Invest. – 1972. – **51**, No 10. – P. 2537–2543.
2. Schjerning-Thiesen K. Experiments on the stability of sheep erythrocytes stored in Alsever's solution // Act. Phat. Microbiol. Scand. – 1953. – **32**, No 1. – P. 198–203.
3. Alexieva V., Ivanov S., Sergiev I., Karanov E. Interaction between stress // Bulg. J. Plant Physiol. – 2003. – Spec. Iss. – P. 1–17.
4. Nakashimab K., Beutler E. Erythrocyte cellular and membrane deformability in hereditary spherocytosis // Blood. – 1979. – **53**, No 3. – P. 481–485.
5. de Oliveira S., Saldanha C. An overview about erythrocyte membrane // Clin. Hemorheol. Microcirc. – 2010. – **44**, No 1. – P. 63–74.
6. Клаус Дж. Лимфоциты: методы. – Москва: Мир, 1990. – 395 с.
7. Зинченко В. Д., Голота В. И., Сухомлин Е. А. и др. Лабораторное оборудование для применения озоновых технологий в биологии и медицине // Пробл. криобиологии. – 2006. – **16**, № 2. – С. 68–72.
8. Dacie J. V., Lewis S. M., Gordon S. E. C. Practical Hematology. – 6th ed. – New York: Churchill Livingstone, 1984. – 453 p.
9. Шкорбатов Г. Л. Основные черты адаптаций биологических систем // Журн. общ. биологии. – 1971. – **32**, № 2. – С 131–142.
10. Hoffmann A., Viebahn R. The influence of ozone on 2, 3-diphosphoglycerate synthesis in red blood cell concentrates // Proc. of the 15th Ozone World Congr. London, 11–15 Sept. 2001, Medical Therapy Conference, Speedprint MacMedia Ltd, Ealing. – London, UK, 2001. – P. 10–25.
11. Baieth H. E. S. A., Elashmawi I. S. Influence of ozone on the rheological and electrical properties of stored human blood // J. Biomed. Res. – 2012. – **26**, No 3. – P. 185–192.
12. Schindler M., Koppel D. E., Sheetz M. P. Modulation of membrane protein lateral mobility by polyphosphates and polyamines // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1980. – **77**. – P. 1457–1461.

## References

1. Wybran J., Carr M. C., Fudenberg H. H. J. Clin. Invest., 1972, **51**, No 10: 2537–2543.
2. Schjerning-Thiesen K. Act. Phat. Microbiol. Scand., 1953, **32**, No 1: 198–203.
3. Alexieva V., Ivanov S., Sergiev I., Karanov E. Bulg. J. Plant Physiol., 2003, Spec. Iss.: 1–17.
4. Nakashimab K., Beutler E. Blood., 1979, **53**, No 3: 481–485.
5. de Oliveira S., Saldanha C. Clin. Hemorheol. Microcirc., 2010, **44**, No 1: 63–74.
6. Klaus Dj. Lymphocytes: Methods, Moscow, Mir, 1990 (in Russian).
7. Zinchenko V. D., Golota V. I., Suchomlin E. A. et al. Probl. Cryobiol., 2006, **16**, No 2: 68–72 (in Russian).
8. Dacie J. V., Lewis S. M., Gordon S. E. C. Practical Hematology, 6th ed., New York: Churchill Livingstone, 1984.
9. Shkorbatov H. L. Zh. obshchey biologii, 1971, **32**, No 2: 131–142 (in Russian).
10. Hoffmann A., Viebahn R. Medical Therapy Conference, Speedprint Macmedia Ltd, Ealing, London, UK, 2001: 10–25.
11. Baieth H. E. S. A., Elashmawi I. S. J. Biomed. Res., 2012, **26**, No 3: 185–192.
12. Schindler M., Koppel D. E., Sheetz M. P. Proc. Natl. Acad. Sci., 1980, **77**: 1457–1461.

Поступило в редакцию 15.07.2015

В. Д. Зінченко, К. М. Головіна, І. П. Горяча, Є. Л. Воловельська

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків

E-mail: irynagor@gmail.com

### Індукція озоном адаптивної відповіді еритроцитів барана на холодовий стрес

*Проведено оцінку стійкості еритроцитів барана, оброблених озонованим фізіологічним розчином з концентрацією озону 0,16 мг/л, при зберіганні протягом 12 тижнів за гіпотермічних умов при температурі 2–4 °С у різних середовищах: 0,9%-му розчині хлориду натрію, 7%-му розчині сахарози, глюкозо-цитратному розчині Олсвера, 5%-му розчині маніту і 10%-му розчині декстрану. Показано, що оброблені озоном еритроцити меншою мірою втрачають осмотичну стійкість після зберігання порівняно з не обробленими клітинами. Оброблені озоном еритроцити в середовищі з 5%-м розчином маніту зберігають здатність до утворення розеток з лімфоцитами людини після 12 тижнів зберігання. Результат пояснюється впливом озону на деформованість мембран еритроцитів.*

**Ключові слова:** кріобіологія, гіпотермія, оксидативний стрес, активні форми кисню, озон.

V. D. Zinchenko, K. N. Golovina, I. P. Goriacha, E. L. Volovelskaya

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkiv

E-mail: irynagor@gmail.com

### Ozone-induced adaptive response of ram erythrocytes to cold stress

*Ram's erythrocytes were treated by ozonized physiological solution with ozone concentration of 0.16 mg/l and stored for 12 weeks under hypothermal conditions at +2–+4 °C in various media: 0.9% sodium chloride solution, 7% sucrose solution, glucose-citrate Alsever's solution, 5% mannite solution, and 10% dextran solution. Ozone-treated erythrocytes lose the osmotic resistance to a less extent after the storage as compared with non-treated cells. Ozone-treated erythrocytes in the medium with 5% mannite solution preserves the ability to form the rosettes with human lymphocytes after 12 weeks of the storage. The result is explained by the ozone effect on the deformability of erythrocyte membranes.*

**Keywords:** cryobiology, hypothermia, oxidative stress, reactive oxygen species, ozone.