

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

УДК 612.111.014.464: 615.014.41

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

ВЛИЯНИЕ ПРЕДОБРАБОТКИ ЭРИТРОЦИТОВ БАРАНА НИЗКИМИ ДОЗАМИ ОЗОНА НА ИХ ОСМОТИЧЕСКУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ЛИМФОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ГИПОТЕРМИЧЕСКОМ ХРАНЕНИИ

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

kngolovina@gmail.com

Работа выполнялась в рамках плановой темы отдела криобиофизики института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины «Дослідження дії оксидативного стресу на кріорезистентність клітин та реакції теплокровних тварин на холод», № гос. регистрации 0110U000405

Вступление. Эритроциты – наиболее широко используемые во всем мире компоненты крови для трансфузии. В настоящее время наиболее широко используется протокол хранения эритроцитов человека в гипотермических условиях (+2 – +4°C) в слегка гипертоническом растворе, чаще всего содержащем хлористый натрий, аденин, глюкозу и маннитол, осмоляльность 376 мОсм/л [8]. Однако, помимо хранения эритроцитов для трансфузии, существуют другие сферы применения эритроцитов разных видовых форм, хранящихся в гипотермических условиях. В зависимости от целей хранения и вида эритроцитов используются различные среды и способы подготовки клеток к хранению.

В иммунологии хранящиеся в гипотермических условиях нативные (не обработанные протеазой) эритроциты человека, стандартные по изосерологическим системам ABO, MNSs, Pp, Lewis, Kell, Dntty, Kidd, используются для диагностики изоиммунных антител к антигенам указанных систем, а также в качестве эритроцитарных контролей при выявлении соответствующих антигенов [4].

Эритроциты барана используются в различных исследованиях, но наиболее известно их применение для реакций розеткообразования с Т-лимфоцитами человека [10, 13]. Реакция розеткообразования используется обычно как маркер для Т-лимфоцитов человека. Эта методика широко используется для оценки нормального распределения Т-лимфоцитов и их участия в различных патологических состояниях, т.к. сведения об абсолютном и относительном числе

лимфоцитов являются интегральным показателем функционирования иммунной системы [5].

Несмотря на то, что в настоящее время все шире внедряются новые методы иммунологического контроля с применением моноклональных антител, метод розеткообразования используется во многих лабораториях благодаря его простоте и экспрессности.

Эритроциты барана для иммунологических исследований хранят в гипотермических условиях в среде Олсвера, клетки остаются пригодными к использованию в течение 8 недель [12].

Поскольку хранящиеся в гипотермических условиях эритроциты имеют весьма широкое применение, то проблема увеличения времени от момента забора до момента их использования не теряет своей актуальности, а для дальнейшего прогресса важно привлекать новые научные идеи и новые методические подходы.

В 1992 г в Германии был запатентован способ гипотермического хранения эритроцитов человека, в котором эритроциты перед закладкой на хранение обрабатывались озоном [9]. При этом в эритроцитах в процессе хранения снижалась скорость распада 2,3-дифосфолицерата по сравнению со скоростью этого процесса в эритроцитах, не прошедших такой обработки.

Ранее нами было показано, что в эритроцитах человека, обработанных озонированным физиологическим раствором с концентрацией озона 0,16 мг/л, при хранении в гипотермических условиях снижается скорость спонтанного гемолиза [1]. В настоящей работе физиологическая реакция эритроцитов на действие низких доз озона использована для повышения устойчивости эритроцитов барана к хранению в гипотермических условиях.

Целью исследования явилось продление сроков гипотермического хранения эритроцитов барана в состоянии, пригодном для их использования в иммунологических исследованиях.

Объект и методы исследования. Кровь барана, заготовленную на 3,8% цитрате натрия, нам любезно предоставляли сотрудники 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, 2007г.) и согласованными с положениями «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985г). Кровь центрифугировали при 800g в течение 10 мин, удаляли плазму и трижды отмывали путем центрифугирования в тех же условиях в 10-кратном объеме изотонического раствора NaCl, содержащего 0,01M трис-буфера, pH 7,2.

Для получения лимфоцитов человека использовали донорскую кровь, которую предоставляла Харьковская областная станция переливания крови со сроком хранения после забора не более 4 суток. Получение лимфоцитов и оценку их жизнеспособности для реакции розеткообразования проводили по методике [3].

Для хранения эритроцитов в гипотермических условиях использовали среды, состав которых представлен в **табл.**

Озон получали путем электросинтеза, пропуская газообразный кислород через озонатор барьерного типа [2]. Озонированный физиологический раствор (ОФР) получали барботированием физиологического раствора (150 мМ хлорида натрия) озono-кислородной смесью при температуре тающего льда.

Осадок эритроцитарной массы делили на 2 части. Одну часть дважды отмывали ОФР с содержанием озона 0,16 мг/л и ресуспендировали в равном объеме среды для хранения. Другую часть подготовленного осадка эритроцитов отмывали не озонированным 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)°C. Осмотическую хрупкость эритроцитов определяли, помещая клетки в растворы хлорида натрия с разной тоничностью (от 0 до 150 мМ) и измеряя гемолиз [6]. 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. Образование розеток наблюдали при помощи микроскопа Olympus IX 70 (США).

Данные на рисунках и таблицах приведены как среднее значение ± стандартное отклонение. Данные усредняли по результатам не менее 3 экспериментов. При сравнении выборок использовали t-критерий Стьюдента. Уровень статистической значимости принят как $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение. Ниже представлены результаты исследования уровня

Таблица

Среды для хранения эритроцитов

№ п/п	Название среды	Состав среды	pH среды
1	0,9%-й р-р NaCl	хлорид натрия – 9 г/л 10 мМ трис буфер – до 1л	7,0-7,2
2	7%-й р-р сахарозы	сахароза – 70 г/л хлорид натрия – 3 г/л вода дистиллированная – до 1л	6,9-7,0
3	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
4	5%-й р-р маннита	маннит 50 г/л хлорид натрия – 0,9 г/л вода дистиллированная – до 1л	6,9-7,2
5	10%-й р-р декстрана	декстран – 100 г/л вода дистиллированная – до 1л	7,0-7,2

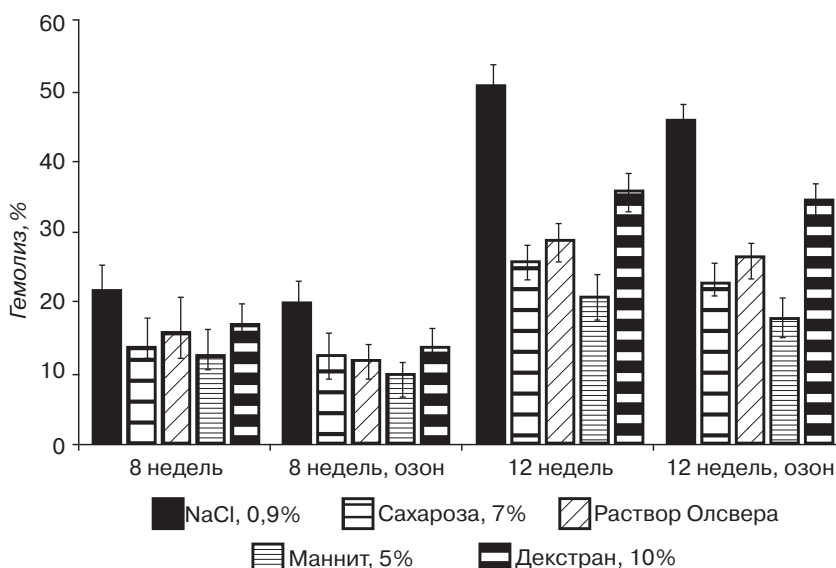


Рис. 1. Значения гемолиза эритроцитов барана в разных средах без обработки клеток озоном и обработанных ОФР с концентрацией озона 0,16 мг/л после хранения в гипотермических условиях в течение 8 и 12 недель. Значения гемолиза всех исследованных образцов в начале срока хранения находилось в пределах 1±0,1%.

гемолиза и показателей осмотической хрупкости эритроцитов в процессе их гипотермического хранения.

На **рис. 1** представлены значения гемолиза эритроцитов барана в разных средах без обработки клеток озоном и обработанных ОФР с концентрацией озона 0,16 мг/л после хранения в гипотермических условиях в течение 8 и 12 недель.

Значение гемолиза свежеприготовленных образцов эритроцитов во всех исследованных средах было в пределах $1 \pm 0,1\%$, обработка клеток ОФР не вызвала изменений этого показателя в начале срока хранения.

Отличия появлялись и нарастали с течением времени хранения. На **рис. 1** можно видеть, что после хранения уровень гемолиза в обработанных озоном эритроцитах ниже по сравнению с его значением для не обработанных клеток во всех исследованных средах. Наиболее низкое значение гемолиза наблюдалось в среде с маннитом как без обработки, так и после обработки озоном. Численные значения гемолиза эритроцитов достаточно высокие по сравнению с теми,

которые приняты, например, при хранении эритроцитов человека в гипотермических условиях для трансфузии (менее 0,8% по существующим стандартам Европы и менее 1% по стандартам США [7]).

Однако для реакций розеткообразования ограничения по гемолизу не столь строгие, важно чтобы в общей массе эритроцитов было достаточное количество клеток с сохранившимися рецепторами и мембраной, обладающих необходимой лабильностью для образования розеток. Поэтому параллельно с измерением гемолиза нами проводились измерения показателей осмотической хрупкости эритроцитов. Считается, что осмотическая хрупкость эритроцитов наряду с другими факторами зависит от эластичности (или деформируемости) их мембран [11].

На **рис. 2** представлены 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.

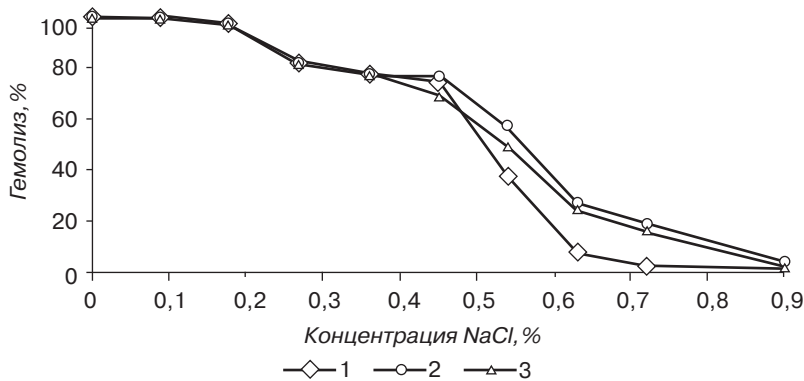


Рис. 2. Значения гемолиза эритроцитов барана в среде с маннитом при помещении их в раствор NaCl различной концентрации: 1 – сразу после внесения эритроцитов в среду с маннитом (контроль); 2 – через 12 недель хранения без обработки озоном; 3 – через 12 недель хранения после обработки ОФР с концентрацией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

Как видно, график для эритроцитов после гипотермического хранения смещен в сторону высоких концентраций NaCl относительно графика для контрольных клеток, откуда следует, что после хранения их осмотическая хрупкость снижается, т.е. 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.

Значения показателей осмотической хрупкости для эритроцитов во всех исследованных средах при хранении клеток в гипотермических условиях в течение времени до 12 недель представлены на **рис. 3**.

Показатели осмотической хрупкости возрастают с увеличением срока хранения, что означает снижение их осмотической устойчивости. Однако, в клетках, обработанных озоном, это возрастание наблюдается 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 утрачивали эритроциты из сред Олсвера и из сахарозной среды, для которых характерно количество прикрепляющихся клеток меньше трех. Эритроциты, хранившиеся в среде с декстраном, розе-

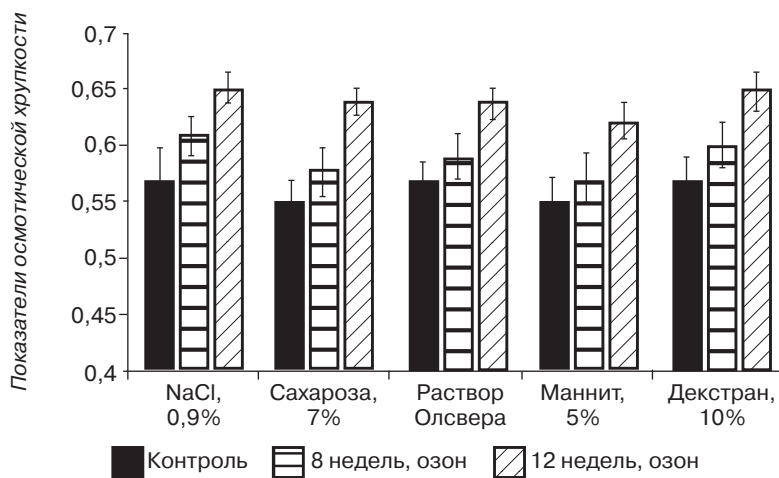


Рис. 3. Значения показателя осмотической хрупкости эритроцитов барана в различных средах до закладки на гипотермическое хранение и после хранения обработанных озоном клеток в течение 8 и 12 недель.

ток не образовывали. Полноценные розетки получали только с озонированными эритроцитами, хранившимися 12 недель маннитом.

На **рис. 4** представлен снимок розетки эритроцитов барана с лимфоцитом человека после хранения их в среде с маннитом в течение 12 недель.

Таким образом, наблюдается корреляция между показателями осмотической хрупкости эритроцитов барана и способностью их образовывать розетки с лимфоцитами человека. Обработка клеток озоном способствует повышению осмотической устойчивости эритроцитов при гипотермическом хранении. Наблюдаемый эффект, по нашему мнению, связан с влиянием озона на мембраны эритроцитов.

Ранее в работе Шиндлера с соавт. [11], латеральная подвижность мембранных белков возрастает в 2,5 раза, когда концентрация 2,3-ДФГ меняется от 0 до 12,5 мМ/л. Как показано в работе [9], после обработки озоном истощение эритроцитов по 2,3-ДФГ в хранящихся клетках замедляется. Этот факт дает основание говорить о том, что различия в изменении подвижности мембран по результатам работы [11] и изменение осмотической устойчивости по результатам нашей работы могут быть следствием разного уровня 2,3-ДФГ в обработанных и не обработанных озоном клетках.

Выводы. Показано, что эритроциты барана, обработанные озонированным физиологическим раствором с концентрацией озона 0,16 мг/л перед закладкой на хранение в гипотермических условиях (+2...+4°C), в меньшей степени теряют свою осмотическую устойчивость в процессе хранения по сравнению с эритроцитами, не прошедшими такую обработку.

Обработанные озоном эритроциты барана в среде на основе 5% маннита сохраняют способность к розеткообразованию с лимфоцитами человека после

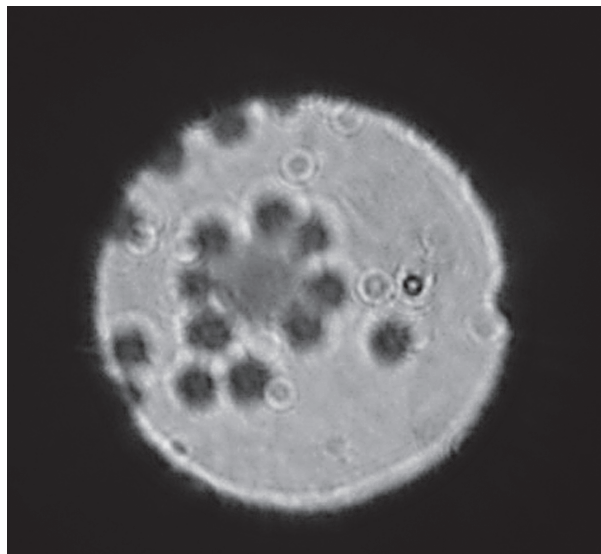


Рис. 4. Розетка с эритроцитами барана, хранившимися в среде №4 (5% р-р маннита) 12 недель.

12 недель хранения в гипотермических условиях. Полученные результаты могут быть использованы в разработке технологий хранения биологических объектов в гипотермических условиях.

Перспективы дальнейших исследований. Анализ полученных нами результатов вместе с известными данными других исследователей показывает, что индукция слабого оксидативного стресса в эритроцитах перед холодowymi воздействиями при закладке их на хранение может быть использована, как инструмент повышения эффективности сохранения функциональных характеристик клеток при хранении их в гипотермических условиях.

Литература

1. Зинченко В.Д. Индукция эффектов перекрестной адаптации при помощи оксидативного стресса для повышения эффективности криоконсервирования биологических объектов / В.Д. Зинченко, И.А. Белых, И.А. Буряк [и др.] // Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины. Монография под ред. Академика НАНУ А.Н.Гольцева. Харьков. 2012. – С. 271-294.
2. Зинченко В.Д., Лабораторное оборудование для применения озоновых технологий в биологии и медицине / В.Д. Зинченко, В.И. Голота, Е.А. Сухомлин [и др.] // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т.16, № 2. – С. 68-72.
3. Клаус Дж. Лимфоциты : методы / Дж. Клаус. – М. : Мир, 1990. – 395 с.
4. Пат. 2049466 Российская Федерация, МПК А61К31/18. Состав для сохранения нативных стандартных эритроцитов / Сахаров Р.С.; Пискунова Т.М.; Донсков С.И.; заявитель Всероссийский гематологический научный центр АМН. – № 5061121/14; заявл. 09.06.1992; опубл. 10.12.1995.
5. Bernard A. Phenomenon of human T-cells rosetting with sheep erythrocytes analyzed with monoclonal antibodies / A. Bernard, C. Gelin, B. Raynal [et al.] // J. Exp. Med. – 1982. – Vol. 155, № 5. – P.1317-1333.
6. Dacie J.V. Practical Hematology, 6th edn. / J.V. Dacie, S.M. Lewis, S.E.C. Gordon. – New York : Churchill Livingstone, 1984. – 453 p.
7. Hess J.R. Storage of red blood cells: new approaches / J.R. Hess, T.J. Greenwalt // Transfus. Med. Rev. – 2002. – Vol. 16. – P. 283-295.
8. Hess J.R. An update on solutions for red cell storage / J.R. Hess // Vox Sang. – 2006. – Vol. 91. – P. 13-19.
9. Pat. 10140872, DE A1 МПК А61К33/40. Refunctionalizing stored red blood cells, useful for transfusion, by treatment with ozone to restore proper ability to release bound oxygen / Hoffmann A., Viebahn-Hdnslers R. №DE2001140872; Date of application 17.01.1992; Date of publication 7.10.1995.
10. Lay W.H. Binding of sheep red blood cells to a large population of human lymphocytes / W.H. Lay, N.F. Mendes, C. Bianco, V. Nussenzweig // Nature (Lond.). – 1971. – Vol. 230, № 5295. – P. 531-532.
11. Schindler M. Modulation of membrane protein lateral mobility by polyphosphates and polyamines / M. Schindler, D.E. Koppel, M.P. Sheetz // Proc. Nat. Acad. Sci. – 1980. – Vol. 77. – P. 1457-1461.
12. Schjerning-Thiesen K. Experiments on the stability of sheep erythrocytes stored in Alsever's solution / K. Schjerning-Thiesen // Act. Phat. Microbiol. Scand. – 1953. – Vol. 32, №1. – P. 198-203.
13. Wybran J. The human rosette-forming cell as a marker of a population of thymus-derived cells / J. Wybran, M.C. Carr, H.H. Fudenberg // J. Clin. Invest. – 1972. – Vol. 51, №10. – P. 2537-2543.

УДК 612.111.014.464:615.014.41

ВПЛИВ ПЕРЕД ОБРОБКИ ЕРИТРОЦИТІВ БАРАНА НИЗЬКИМИ ДОЗАМИ ОЗОНУ НА ЇХ ОСМОТИЧНУ РЕЗИСТЕНТНІСТЬ І ВЗАЄМОДІЮ З ЛІМФОЦИТАМИ ЛЮДИНИ ПРИ ГІПОТЕРМІЧНОМУ ЗБЕРІГАННІ

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

Резюме. Досліджений вплив попередньої обробки еритроцитів барана на зміни осмотичної ламкості і здатність до утворення розеток з лімфоцитами людини після зберігання в гіпотермічних умовах (+2...+4)°С в різних середовищах: 1) 0,9% хлорид натрію; 2) 7% розчин сахарози; 3) глюкозо-цитратний розчин Олсвера; 4) 5% розчин маніту; 5) 10% розчин декстрану. Оброблені озonom еритроцити в середовищі (4) 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.

УДК 612.111.014.464:615.014.41

ВЛИЯНИЕ ПРЕДОБРАБОТКИ ЭРИТРОЦИТОВ БАРАНА НИЗКИМИ ДОЗАМИ ОЗОНА НА ИХ ГЕМОЛИЗ И ОСМОТИЧЕСКУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ПРИ ГИПОТЕРМИЧЕСКОМ ХРАНЕНИИ

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

Резюме. Исследовано влияние предобработки эритроцитов барана озонem на изменение осмотической хрупкости и способность к образованию розеток с лимфоцитами человека после хранения в гипотермических условиях (+2 – +4)°С в различных средах: 1) 0,9% хлорида натрия; 2) 7% раствор сахарозы; 3) глюкозо-цитратный раствор Олсвера; 4) 5% раствор маннита; 5) 10% раствор декстрана. Обработанные озонem эритроциты в среде (4) сохраняют способность к образованию розеток с лимфоцитами человека после 12 недель хранения. Результат объясняется влиянием озона на деформируемость мембран эритроцитов.

Ключевые слова: кріобіологія, гіпотермія, оксидативний стресс, активні форми кисню, озон.

UDC 612.111.014.464:615.014.41

Effect of Low-Dose Ozone Pretreatment of Sheep Red Blood Cells on their Osmotic Resistance and Interaction with Human Lymphocytes during Hypothermic Storage

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

Abstract. Sheep red blood cells are commonly used in various studies, including immune assays as a rosette-forming reactions of human T-lymphocytes. This technique is widely used to assess the normal distribution of T-lymphocytes and their involvement in various pathological conditions. Thus information about the absolute and relative number of lymphocytes is an integral indicator of the immune system. For immunological studies sheep red blood cells were stored in Alsever's solution under hypothermic conditions. Cells were applicable for 8 weeks. Rosette method is used in many laboratories because of its simplicity and rapidity. However the problem of increasing the time from sampling until use cell does not lose its relevance. The research was aimed to extend the terms of sheep red blood cells hypothermic storage of in the state suitable for use in immunological studies.

The idea of the work is based on the physiological responses of red blood cells after low doses ozone action. Ozonation of physiological solution was carried out by bubbling with a mixture of ozone and oxygen at the temperature of melting ice. Red blood cells were diluted with ozonated physiological solution (0.16 mgO₃/l) and stored for 12 weeks under hypothermic conditions at 2-4°C in different media: 1) 0.9% sodium chloride; 2) 7% sucrose solution; 3) glucose-citrate Alsever's solution; 4) 5% mannitol; 5) 10% dextran. After 12 weeks of storage the hemolysis level osmotic resistance were studied spectrophotometrically. The capability of red blood cells to form rosettes with human lymphocytes was defined as well. The hemolysis level of freshly prepared red blood cell samples in all the studied media ranged within 1±0.1%, the cell treatment with ozonated physiological solution caused no changes in this index in early storage term. The increases in hemolysis level was observed after prolonged storage term. After storage the hemolysis level in the ozone-treated red blood cells was lower as compared to its value for untreated cells in all the studied media. The lowest hemolysis value was observed in the medium with mannitol both without/with ozone treatment. The red blood cell osmotic fragility was determined by placing cells into the sodium chloride solutions of different osmolality (from 0 to 150 mM) and by measuring hemolysis. After storing the osmotic fragility of red blood cells reduced, *i. e.* they became less osmotically resistant. However the decreasing of osmotic resistance in the ozone-treated cells is less decreased compared to the untreated cells. The highest osmotic resistance was observed for the cells stored in the mannitol-containing medium. The red blood cells stored in the mannitol-containing medium after ozone treatment were still the capable to form rosettes with human lymphocytes after 12 weeks of storage. There is a correlation between the indices of the osmotic fragility of the sheep red blood cells and their ability to form rosettes with human lymphocytes after hypothermic storage conditions.

To explain this effects we have compared our results with the previously obtained data of other authors. It have been reported that during storage of red blood cells the rate of decay 2,3- diphosphoglycerate was lower in comparison with untreated cells. It is also known that the lateral mobility of membrane proteins correlates with the content of 2,3-DPG in the red blood cells. The higher of 2,3-DPG level the greater the lateral mobility. From this we can conclude that a increasing of the osmotic resistance of the ozone-treated red blood cells under hypothermic storage is due to the ozone effect on membrane lability. The results of our study can be used in order to develop new storage technology of biological objects under hypothermic conditions.

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

Рецензент – проф. Міщенко І.В.

Стаття надійшла 21.07.2015 р.