

## Озоновые методы в криобиологии

В.Д. Зинченко, И.А. Бельих, И.А. Мусина

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Известно, что во многих случаях действие низких температур на биологические системы может иметь нелетальный характер [4]. При этом биологические объекты могут выдерживать низкие температуры, хотя после действия холода возникают морфологические, биохимические, функциональные нарушения различной глубины. Нарушенные функции могут восстанавливаться со временем в ходе экспозиции в нормальных физиологических условиях.

Обнаружено, что некоторые вещества эффективно восстанавливают холодовые повреждения. К ним относятся неомицин, пептон,  $Mg^{2+}$  [4].

В последние годы появился ряд публикаций о стимулирующем действии малых доз озона на функционирование различных биологических систем [2, 7].

Представляет интерес исследовать возможности применения указанного свойства озона для интенсификации репарационных процессов в биологических системах после действия холода.

Данная идея послужила предпосылкой для выполнения настоящей работы. Однако особенности проявлений биологического действия озона и возможность их практического использования в криобиологических технологиях требуют детального изучения.

Целью данной работы явилось изучение влияния различных доз озона на степень устойчивости некоторых биологических систем и динамику восстановления нарушенных физиологических процессов после холодового воздействия.

Предметом исследования в данной работе были культуры микроорганизмов *E. coli* и *C. albicans*, эритроциты и гемоглобин донорской крови человека.

Исследовали влияние озона на динамику роста микроорганизмов, а также на динамику гемолиза эритроцитов в процессе хранения их при 4°C. При этом проводили сравнительный анализ для образцов, не подвергавшихся замораживанию, и замороженных до -196°C с последующим отогревом. Кроме того, исследовали влияние озона на соотношение лигандных форм гемоглобина в эритроцитах, хранящихся в гипотермических условиях при 4°C.

*Адрес для корреспонденции:* Зинченко В.Д., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-41, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Донорскую кровь получали на Харьковской областной станции переливания крови. Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования крови в течение 5-10 мин при 1500 – 2000 об./мин, далее клетки суспендировали в физиологическом растворе.

Замораживание эритроцитов проводили по методике Воротилина А.М. [3] с криопротектором “Пропандиосахароль”.

Чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку определяли спектрофотометрически на приборе СФ-4А (длина волны 543 нм) по выходу гемоглобина и выражали в процентах по отношению к общему количеству гемоглобина в клетках до эксперимента. Для определения 100% гемолиза эритроциты разрушали тритоном X-100 (0,1 %).

На рис. 1 представлены результаты изменения степени гемолиза эритроцитов в зависимости от времени их инкубации при 4°C в гипертонической среде (0,85 М NaCl).

Экспозиция эритроцитов в гипертонических средах является одним из способов моделирования ситуации, возникающей в замораживаемых суспензиях клеток при вымораживании основной массы воды [5].

В контрольных образцах, не содержащих озон, в течение некоторого времени после помещения эритроцитов в среду инкубирования величина гемолиза остается весьма малой, близкой к нулю и нарастает со временем слабо.

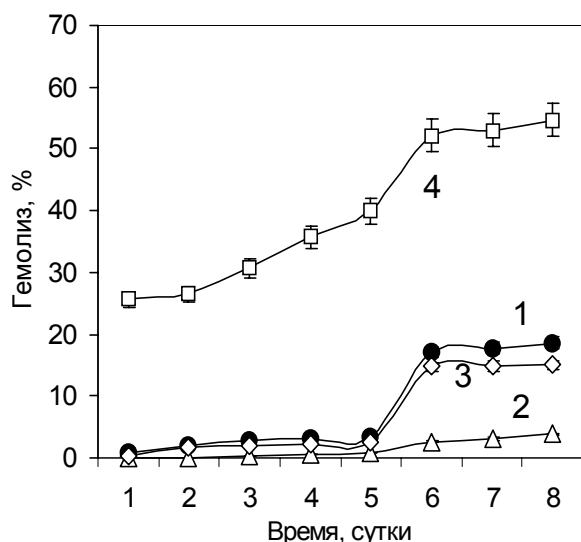
В гипертонической среде, содержащей 0,85 М NaCl, это время составляет около 3 суток.

Как видно из рис. 1, при дозе озона 0,32 мг/л динамика гемолиза эритроцитов не изменяется, при дозе 0,48 мг/л скорость гемолиза возрастает, а при дозе 0,16 мг/л гемолиз заметно замедляется по сравнению с контролем.

На рис.2 представлены результаты подобного эксперимента для замороженных-оттаянных эритроцитов.

Как и в эксперименте без замораживания, при добавлении некоторой оптимальной дозы озона (в данном случае – 0,16 мг/л) отмечается замедление гемолиза деконсервированных эритроцитов.

Удобным тестом для изучения степени воздействия озона на живые системы могут быть показатели роста микроорганизмов, которые легко можно выразить численно. Нами было установлено, что при добавлении определенных оптималь-



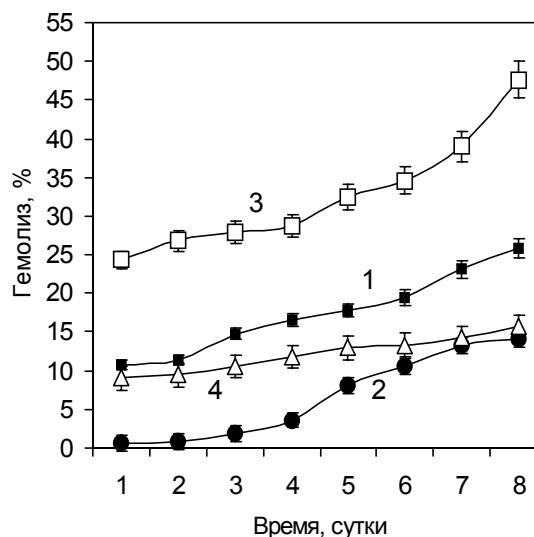
**Рис. 1.** Зависимости степени гемолиза эритроцитов от времени их инкубации при 4°C в среде с концентрацией хлористого натрия: 0,85 М в присутствии разных доз озона. Дозы введенного озона в мг/л: 1 – контроль (без озона); 2 – 0,16 мг/л; 3 – 0,32 мг/л; 4 – 0,48 мг/л.

ных доз озона в ростовую среду микроорганизмов *E. coli* при 22°C ускоряется их рост и увеличивается число клеток при выходе на стационарную фазу роста. При концентрации бактериальных клеток  $1 \times 10^7$  кл/мл оптимальные дозы озона составляли 0,12–0,35 мг/л [6].

Эти результаты послужили нам предпосылкой для изучения влияния озона на микроорганизмы после замораживания-оттаивания. Для исследования были выбраны дрожжеподобные грибы *S. albicans*. В экспериментах использовали два режима замораживания клеток: одноступенчатое и двухступенчатое замораживание. Одноступенчатое замораживание осуществляли погружением образца суспензии микроорганизмов объемом 2 мл в жидкий азот. При двухступенчатом замораживании образец охлаждали от 20°C до –45°C со скоростью 2°C/мин, далее образец погружали в жидкий азот. Отогрев образцов проводили на водяной бане при 37°C. Дозированные количества озона добавляли в суспензию клеток перед замораживанием, используя озон, растворенный в известной концентрации в физиологическом растворе. [1].

Результаты исследования грибов *S. albicans* после замораживания-оттаивания показаны в таблице.

Как видно из таблицы, эффект стимулирующего действия озона неодинаков для разных скоростей замораживания. При замораживании грибов в присутствии озона в концентрации 0,16 – 0,64 мг/л наблюдается более высокая их выживаемость после быстрого замораживания. При повышении концентрации озона до 0,8 мг/л жизнеспособность достоверно не отличается от показаний в контроле.



**Рис. 2.** Зависимости степени гемолиза эритроцитов от времени инкубации в среде “Пропандиосахароль” при температуре 4°C: 1 – без замораживания и без добавления озона; 2 – без замораживания, в присутствии озона в дозе 0,16 мг/л; 3 – после замораживания-оттаивания без добавления озона; 4 – после замораживания-оттаивания с добавлением озона к оттаянной суспензии в дозе 0,16 мг/л.

В образцах замороженных медленно, более высокую жизнеспособность наблюдали при концентрации озона 0,16 – 0,48 мг/л. При повышении концентрации озона до 0,64 – 0,8 мг/л жизнеспособность грибов была достоверно ниже, чем в контрольных образцах.

Этот результат согласуется с теми представлениями, что озон в высоких дозах вызывает угнетение роста микроорганизмов, причем наблюдается синергизм двух факторов повреждающего действия на микроорганизмы: фактора высоких доз озона и фактора замораживания-оттаивания. Эффект стимуляции роста грибов

Жизнеспособность дрожжеподобных грибов *S. albicans* после замораживания в средах, содержащих озон (озон добавляли в ростовую среду перед замораживанием)

Доза озона, мг/л	Содержание жизнеспособных клеток	
	Режим замораживания	
	Одноступенчатый	Двухступенчатый
0 (контроль)	47,8±2,9	35,3±3,1
0,16	61,7±2,9	56,7±3,4
0,32	66,9±4,2	50,2±5,0
0,48	65,5±4,7	33,9±3,5
0,64	61,2±3,1	15,1±1,2
0,80	42,5±5,7	3,4±1,8

*C. albicans* после замораживания-оттаивания наблюдается именно при малых дозах озона, причем величина дозы, вызывающей стимуляцию роста, близка к той, которая оказывает подобный эффект на рост бактерий *E. coli* в нормальных физиологических условиях в эксперименте, описанном выше.

В криобиологии наряду с глубоким замораживанием используются технологии гипотермического хранения биологических объектов, причем в процессе такого хранения возникают и нарастают повреждения биологического материала. Например, широкое практическое применение имеет гипотермическое хранение эритроцитов донорской крови.

Нами было проведено исследование влияния малых доз озона на состояние гемоглобина в эритроцитах донорской крови человека после их хранения в гипотермических условиях в течение 9 суток.

В оптических спектрах поглощения (рис. 3) гемоглобина, полученного из таких эритроцитов, регистрируется широкая полоса в диапазоне длин волн 526-588 нм без четко выраженных пиков поглощения, характерных для окси- или дезоксиформы.

Скорее всего, данная полоса является суперпозицией спектров поглощения разных лигандных форм гемоглобина. После добавления озона в дозах от 0,09 до 1,10 мг/л к эритроцитам в спектре появляются две полосы поглощения, характерные для гемоглобина в оксиформе. Однако при достижении дозы 1,02 мг/л в спектрах снова регистрируется один пик, что, по нашему мнению, связано с ингибирующим действием озона в больших дозах на функциональное состояние гемоглобина в эритроцитах.

Исследования термоденатурационных процессов в растворах гемоглобина показали, что добавление озона в используемых нами дозах не приводит к существенным изменениям в ходе термоденатурации гемоглобина.

Таким образом, полученные результаты показывают, что стимулирующее действие озона на оксигенацию гемоглобина носит четкий дозозависимый характер, и наблюдаемые эффекты действия озона, по-видимому, не связаны с сильными конформационными изменениями гемоглобина.

## Выводы

На примере микроорганизмов экспериментально показано, что под влиянием определенных малых доз озона динамика восстановления биологических функций после замораживания-оттаивания ускоряется. Установлен факт повыше-

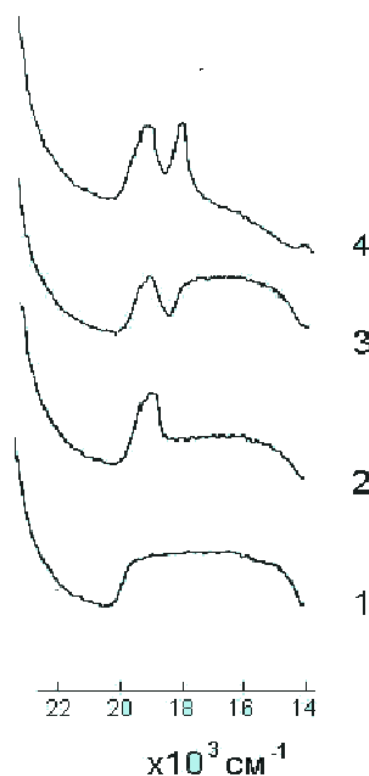


Рис. 3. Спектры поглощения гемоглобина донорской крови человека до (1) и после обработки озоном в дозах 0,09 мг/л (2), 0,17 мг/л (3), 0,26 мг/л (4).

ния под действием озона устойчивости эритроцитов к гемолизу после замораживания-оттаивания. Показано, что в эритроцитах после гипотермического хранения обработка клеток озоном приводит к увеличению относительного содержания окси-гемоглобина.

Все эффекты действия озона носят дозозависимый характер. Обнаруженные эффекты могут найти практическое применение при разработке протоколов криоконсервирования.

## Литература

1. Белых И.А., Зинченко В.Д., Высеканцев И.П. Стимулирующее действие малых доз озона на рост микроорганизмов // Проблемы криобиологии. – №4. – 2004. – С.41-45.
2. Бояринов Г.А., Соколов В.В. Озонированное искусственное кровообращение. – Н. Новгород: Изд-во „Покровка”, 1999. – 317 с.
3. Воротилин А.М. Криоконсервирование эритроцитов человека под защитой криопротекторов на основе низкомолекулярных диолов: Дис. ...доктора биологических наук. – Харьков, 1987. – 250с.
4. Криоконсервирование клеточных суспензий / Под общ. ред. А.А. Цуцаевой. – Киев: Наук. думка, 1983. – 240 с.
5. Панталер О.Р. Дослідження стійкості дегідратованих еритроцитів до дії осмотичного та механічного стресу. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Харків. – 1995. – 24 с.

6. *Патент № 8660, Україна, МПК<sup>7</sup> С12N1/38. № 200500928. Спосіб підвищення проліферативної активності мікроорганізмів / Грищенко В.І., Висеканцев І.П., Зінченко В.Д., Бєлих І.А., Мусіна І.А. Заявл. 02.02.2005, Публ. 15.08.2005. Бюл. №8.*
7. *Vocci V. Oxygen-ozone therapy. A critical evaluation by Velio Vocci.– Dordrecht Hardbound (The Netherlands): Kluwer Academic Publishers, 2000.– 468 p.*