

(TG-404) яичный альбумин, полученный в Институте монокристаллов НАН Украины.

Показано, что ДМФА и этиленгликоль, имеющие больший в сравнении с глицерином коэффициент проницаемости через мембраны клеток, проявляют высокую криозащитную активность в отношении СС и не оказывают на них существенного цитотоксического действия, что позволяет рассматривать эти вещества как перспективные криопротекторы для низкотемпературного хранения СС. Выявлено, что замена желтка куриных яиц в составе среды на яичный альбумин не снижает жизнеспособность СС в процессе криоконсервирования. Лучшие результаты после замораживания-оттаивания СС получены при сочетании в криозащитной среде 1 М ДМФА с 1%-м яичным альбумином. Установлен факт взаимодействия флуоресцентно меченого яичного альбумина с искусственными липидными мембранами.

membranes have been shown to manifest a high cryoprotective activity in respect of CS and do not cause a significant cytotoxic effect on them, that enables to consider these substances as perspective cryoprotectants for low temperature storage of CS. It was revealed that the substitution of chicken egg yolk as the part of the medium to egg albumin did not reduce viability of CS during cryopreservation. The best results after CS freeze-thawing were obtained when combining 1M DMFA with 1% egg albumin in cryoprotective medium. The fact of interaction of fluorescent-labeled egg albumin with artificial lipid membranes was established.

Изменение спектральных характеристик белков плазмы донорской крови под влиянием озона

Е.В. СОМОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Changes in Spectral Characteristics of Donor Blood Plasm Proteins under Ozone Effect

E.V. SOMOVA

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Изучение молекулярных механизмов действия озона на компоненты крови представляет интерес в связи с развитием методов озонотерапии.

Цель работы – изучение влияния малых доз озона на спектральные характеристики белков плазмы донорской крови и функциональное состояние сывороточного альбумина человека (САЧ).

Плазму крови выделяли центрифугированием (800 g, 10 мин) из цельной крови здоровых доноров. Содержание белка и нуклеотидов измеряли спектрофотометрически по поглощению в УФ-области (А.П.Демченко, 1981). Общее содержание САЧ в плазме измеряли по поглощению при длине волны 640 нм с использованием стандартного набора реактивов “Альбумин-Агат” с бромкрезоловым зеленым (Россия), индекс токсичности САЧ ($T = (ОКА/ЭКА) - 1$) – набора “Зонд” (“Серум-Альфа”, Россия). Концентрацию озона оценивали спектрофотометрическим методом на приборе Specord UV VIS (Германия) по поглощению света на полосе Хартли. Озонированный физиологический раствор (ОФР) получали на установке с генератором озона барьерного типа, сконструированной в ИПКиК НАН Украины. Физиологический раствор (0,89% NaCl, pH 7,2) во флаконе объемом 200 мл барботировали озон-кислородной смесью, концентрация растворенного озона в ОФР 3,8 мг/л. Растворение озона и дальнейшее хранение ОФР для замедления процесса распада озона проводили в термостате со льдом. Плазму смешивали с ОФР непосредственно после озонирования.

Спектры флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian). Триптофановую флуоресценцию белков плазмы возбуждали светом с

Studying molecular mechanisms of ozone effect on blood components is of interest because of ozone therapy methods development.

The work was aimed to investigate the effect of low ozone doses on spectral characteristics of donor blood plasm proteins and functional state of human serum albumin (HSA).

Blood plasm was isolated by centrifuging (800 g, 10 min) from healthy donor whole blood. Protein and nucleotide content was measured spectrophotometrically by absorption in UV-area (A.P. Demchenko, 1981). HSA total content in plasm was measured by absorption at 640 nm wavelength using the “Albumin-Agat” standard kit of reagents with bromocresol green (Russia), HSA toxicity index ($T = (OCA/ECA) - 1$) was done with “Zond” kit (“Serum-Alpha”, Russia). Ozone concentration was evaluated spectrophotometrically with Specord UV VIS device (Germany) by light absorption on Hartley band. Ozonized physiological solution (OPS) was obtained using the device with barrier-type ozone generator, designed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine. Physiological solution (0.89% NaCl; pH 7.2) in 200 ml flask was bubbled by ozone-oxygen mixture, concentration of dissolved ozone in OPS made 3.8 mg/l. Ozone dissolution and further OPS storage for inhibiting the ozone decay process was carried-out in thermostat with ice. Plasm was mixed with OPS right after ozonizing.

Fluorescence spectra were estimated with Cary Eclipse (Varian) Spectrofluorimeter. Tryptophan fluorescence of plasm proteins was light-excited at 296 nm. Absorption spectra were recorded with Perkin Elmer (USA) spectrophotometer.

длиной волны 296 нм. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Perkin Elmer (США).

Было показано, что малые дозы озона изменяют оптические характеристики белков плазмы крови и связывающую способность САЧ. При этом эффект действия озона является дозозависимым, а ответная реакция белков плазмы имеет нелинейный характер. После добавления к плазме ОФР в концентрациях 0,2-0,4 мг/л наблюдается снижение триптофановой флуоресценции белков плазмы, которое коррелирует со снижением поглощения белковых хромофоров в УФ-области. Положения же спектров флуоресценции и поглощения белков плазмы изменяются незначительно (0,5 нм). При концентрациях озона более 0,4 мг/л фиксируется волнообразный рост указанных параметров, которые, однако, не достигают первоначальных величин. Наблюдаемые изменения сходны с изменениями прямого рэлеевского рассеяния образцов под углом 90° и светорассеяния, измеренного на спаде спектров поглощения (400 нм), а также с изменениями уровня общего белка, САЧ и нуклеотидов плазмы. При содержании озона в плазме 0,2-0,4 мг/л индекс токсичности САЧ, отражающий степень его нагруженности токсичными лигандами (Г.Е. Добрецов, 1998), возрастает до $0,32 \pm 0,07$ и при дальнейшем повышении дозы колеблется в пределах 0,14-0,32. Однако индекс токсичности также обнаруживает нелинейность изменений в зависимости от примененной дозы озона.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при добавлении к плазме ОФР происходят дозозависимые конформационные изменения белков, в том числе САЧ, которые отражаются на его функциональных свойствах (способности связывать токсические лиганды).

Low ozone doses were shown to change optical characteristics of blood plasm proteins and HSA binding ability. At the same time ozone effect is dose-dependent and response of plasm proteins is of non-linear character. After adding OPS under 0.2-0.4 mg/l concentrations into plasm a decrease in tryptophan fluorescence of plasm proteins, correlating with the reduction of protein chromophore absorption in UV-range, is observed. But the positions of fluorescence spectra and plasm protein absorption slightly change (0.5 nm). At ozone concentrations more than 0.4 mg/l a wave-like growth in the mentioned parameters, although not getting the initial values, is recorded. Changes in a direct Rayleigh scattering of samples under 90° and light scattering, measured at the absorption spectra fall (400 nm), as well as those in total proteins level, HSA and plasm nucleotides are similar to the observed ones. At 0.2-0.4 mg/l ozone content in plasm the HSA toxicity index, reflecting the degree of its loading by toxic ligands (G.E. Dobretsov, 1998) increases up to 0.32 ± 0.07 and during following dose increase varies within 0.14-0.32 limits. However toxicity index also reveals the non-linearity of changes depending on the applied ozone dose.

The data obtained testify to the fact, that when adding OPS into plasm the dose-dependent conformational protein changes, including HSA, affecting its functional properties (ability to bind toxic ligands).

Динамика гиперосмотического лизиса эритроцитов человека в присутствии озона

И.А.БЕЛЫХ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Dynamics of Human Erythrocyte Hyperosmotic Lysis in Ozone Presence

I.A. BELYKH

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Гемолиз эритроцитов из донорской крови человека исследовали в присутствии озона в растворах: NaCl 0,15-4 моль/л при 4°C без замораживания и 0,15 моль/л после замораживания-оттаивания в криозащитных средах "Пропандиосахароль" и Glycerolyte 57 Solution (Baxter).

Чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку определяли по выходу гемоглобина в раствор и выражали в процентах по отношению к количеству гемоглобина в исходной суспензии клеток. Для определения 100%-го гемолиза эритроциты разрушали тритоном X-100 (0,1%). Озон получали электролизом из газообразного кислорода. Концентрацию озона измеряли спектрофотометрически по поглощению света на полосе Хартли (255 нм) на спектрофотометре SPECORD UV VIS.

В контрольных образцах, не содержащих озон, после помещения эритроцитов в среду инкубирования с концентрацией NaCl 0,15-2 моль/л (при 4°C) величина гемолиза некоторое время остается близкой к нулю и

There was investigated erythrocyte hemolysis from human donor blood in ozone presence in following solutions: 0.15-4 mol/l NaCl at 4°C without freezing and 0.15 mol/l NaCl after freeze-thawing in "Propan-diosakharol" and Glycerolyte 57 Solution (Baxter) cryoprotective media.

Erythrocyte sensitivity to hypertonic shock was determined by hemoglobin release and expressed in percents in respect of hemoglobin amount in initial cell suspension. To determine 100% erythrocyte hemolysis erythrocytes were destroyed with Triton X-100 (0.1%). Ozone was obtained by electrosynthesis from gaseous oxygen. Ozone concentration was spectrophotometrically measured by light consumption on Hartley band (255 nm) with SPECORD UV VIS spectrophotometer.

In ozone-free control samples after placing erythrocytes in incubation medium with 0.15-2 mol/l NaCl concentration (at 4°C) the hemolysis value remains for some time close to zero and hemolysis slightly increases in time. In the media, containing 0.15, 0.25 and 0.85 mol/l NaCl this time makes 3