Summary

CHARACTER OF NEUROTRANSMITTER RESPONSE PRODUCED BY ANIMALS TO DOMESTIC XENOBIOTICS
Nakonechnaya S.A.

Key words: biogenetical amines, neuromediators, xenobiotics.

This paper highlights some aspects of metabolism of biogenetical amines and their predecessors in subacute experiment on white rats in 1/100 DL_{50} in case of influence AF 9-12 and AFS 9-6 KM and also the system of secondary neuromediators. It was established that structural metabolic injury of mediator regulation in cellular units resulted from effects produced by the neonols. AF 9-12 caused more severe influence on intracellular metabolism. The results of research of PAV influence on membranes and membranous processes enabled to draw a conclusion about membranotoxical character caused by oxyethilirolized derivative of phenols.

УДК 57.043: 577.352.4:547.42/43

Рамазанов В.В., Бондаренко В.А.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТА И 2,3-ДИФОСФОГЛИЦЕРАТА В ЭРИТРОЦИТАХ ДОНОРСКОЙ КРОВИ ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков).

Ранее было показано, что среды, содержащие непроникающий и проникающий защитные компоненты при замораживании-отогреве образцов эритроцитов, обеспечивают устойчивость клеток к действию гипертонического и осмотического (постгипертонического) стрессов. Кроме того, эритроциты, замороженные в комбинированных средах с непроникающим и проникающим криопротекторами, незначительно отличаются по осмотическим и морфологическим характеристикам от интактных клеток. Как известно, данные показатели зависят от концентрации внутриклеточного аденозинтрифосфата (АТФ), потеря которого при гипотермическом хранении или замораживании эритроцитов сопровождается потерей 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ). В работе исследовали содержание главных фосфоорганических соединений эритроцитов (АТФ и 2,3-ДФГ) после замораживания в среде с декстраном и в комбинированной среде с декстраном и 1,2-пропандиолом (1,2-ПД). Показано, что при замораживании эритроцитов в среде с декстраном отмечается значительная потеря АТФ и 2,3-ДФГ. Комбинирование в среде замораживания декстрана и проникающего криопротектора 1,2-ПД обеспечивает удовлетворительное сохранение данных фосфоорганических соединений. Полученные результаты, вероятно, связаны с тем, что включение в среду проникающего криопротектора и проникновение его в клетки обеспечивает ослабление их «критического» сжатия при охлаждении. Это способствует сохранению нормальной локализации ферментов на мембранных структурах и поддержанию клеточного метаболизма в размороженных эритроцитах.

Ключевые слова: эритроциты, замораживание, комбинированный криоконсервант, аденозинтрифосфат, 2,3-дифосфоглицерат.

Данная работа является фрагментом темы «Исследование чувствительности эритроцитов животных к охлаждению, дегидратации и замораживанию при действии модифицирующих факторов и криопротекторов» (№ гос. регистрации 0114U0001318).

В системе микроциркуляции тканей низкое парциальное давление кислорода и механическая деформация эритроцитов запускают последовательность реакций в клетке, в результате которой происходит высвобождение молекул аденозинтрифосфата (АТФ). После выхода из клеток молекулы АТФ связываются с эндотелиальными пуринергическими рецепторами и инициируют «сигнальный» механизм, который приводит к релаксации микрососудов. При этом увеличивается приток крови к органам и тканям, обеспечивая необходимую поставку кислорода [11,16]. При гипотермическом хранении эритроцитов (4-6°С) отмечается нарушение реологических свойств клеток (деформируемость, адгезия) [8]. Такие эритроциты после переливания больным при неотложных состояниях не всегда обеспечивают нормализацию гемодинамики и поставки кислорода тканям [15,20].

Содержание АТФ и 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ), а также реологические характеристики эритроцитов после хранения являются основными показателями для предсказания осложнений трансфузионной терапии [11,16]. При длительном хранении эритроцитов отмечается потеря АТФ и 2,3-ДФГ, а также блокада клеточного механизма высвобождения молекул АТФ при деформирующем воздействии [16,20]. Потеря 2,3-ДФГ при хранении эритроцитов является основной причиной их неспособности увеличивать поставку кислорода в ткани при переливании [12]. Поэтому после хранения необходимо «омоложение» эритроцитов при инкубации в специальных средах, которое приводит к восстановлению концентраций АТФ, 2,3-ДФГ и реологических характеристик клеток [8,14]. С целью исключения процедуры «омоложения» разработан консервант, не содержащий хлоридных ани-

онов, который может обеспечивать сохранение АТФ и 2,3-ДФГ эритроцитов в ходе гипотермического хранения [12].

При замораживании эритроцитов в средах с глицерином или гидроксиэтилированным крахмалом (ГЭК) [13], а также с декстраном [17] отмечается значительная потеря главных фосфоорганических соединений. Поэтому для сохранения АТФ и 2,3-ДФГ забор крови от доноров и получение эритромассы осуществляют в специальных растворах, которые обеспечивают поддержание клеточного метаболизма и уровня АТФ и 2,3-ДФГ до и после замораживания, а также при последующем гипотермическом хранении [19].

В связи с отрицательным воздействием замораживания на содержание АТФ и 2,3-ДФГ необходимо разработать криоконсервант, который обеспечит сохранение данных фосфоорганических соединений и, возможно, исключит использование специальных «омолаживающих» растворов. Ранее было показано, что при замораживании эритроцитов в комбинированных средах с непроникающими и проникающими криопротекторами клетки после размораживания имеют удовлетворительные осмотические и морфологические характеристики [4,5,6]. Данные характеристики при хранении эритроцитов определяются содержанием АТФ [7].

Цель работы

Цель работы – определение степени потери АТФ и 2,3-ДФГ при замораживании эритроцитов в среде с декстраном и в комбинированной среде, содержащей декстран (непроникающий криопротектор) и 1,2-пропандиол (1,2-ПД, проникающий криопротектор).

Объект и методы исследования

В работе использовали NaCl (х.ч.); декстран с молекулярной массой 10000 (Pharmacea Fine Chemicals); 1,2-пропандиол (1,2-ПД, Украина).

Среды замораживания (криоконсерванты) готовили на солевом (0,9% NaCl) растворе, при конечных концентрациях: NaCl – 0,6%, декстран – 20%, 1,2-ПД – 16%.

Кровь II группы, заготовленную на консерванте «глюгицир», получали на Харьковской областной станции переливания крови. После удаления плазмы эритромассу дважды отмывали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 2 мин в 10-кратном объеме физиологического раствора соли (0,9% NaCl) при 4-8°С. Третий раз центрифугировали 5 мин, при этом гематокрит осадка эритромассы составлял 70-75%.

Образцы эритроцитов в криоконсерванте объемом 1,2 мл с гематокритом 35-37% в полиэтиленовых капсулах инкубировали 30 мин при 22-24°С, погружали в жидкий азот (-196°С) и выдерживали в течение 5 мин. Капсулы после замораживания переносили на водяную баню при 40°С на 3 минуты (процедура быстрого замораживания-отогрева). После отогрева размороженные образцы перемешивали. Контрольный образец эритроцитов (гематокрит 35-37%) готовился на 0,9% NaCl.

Концентрацию суммарного фосфора, неорганического фосфора и фосфора главных фосфоорганических соединений (АТФ и 2,3-ДФГ) определяли, как представлено в работе [3], включая некоторые модификации:

1) Методический подход исключает процедуру адсорбции нуклеотидов на активированном угле из ТХУ-экстракта и последующее озоление пробы, насыщенной 2,3-ДФГ, как это использовалось для определения данного фосфоорганического соединения [3]. В то же время, для определения суммарного кислоторастворимого фосфора эритроцитов, озолению подвергали общий ТХУ-экстракт.

2) В нашей работе не использовался стабилизирующий раствор, содержащий мышьяк, как в [3], где определения оптической плотности (ОП) производили на длине волны 660 нм после 15-минутной выдержки экспериментальных и калибровочных проб. С учетом исключения «катализатора» из реакционной среды измерение ОП осуществляли на длине волны 830 нм после выдерживания экспериментальных и калибровочных проб в течение 60 мин [2].

3) Кроме того, в наших экспериментах используется меньшее количество клеток – 1 мл эритроцитов с гематокритом 35-37%, тогда как в работе [3] – 1 мл плотного осадка эритроцитов (~90%). Это позволяет снизить концентрацию ТХУ от 12,5 до 9%.

Из контрольного и размороженного образцов эритроцитов отбирали 50 мкл с последующим гемолизом и определением концентрации гемоглобина на длине волны λ=415 нм, при использовании коэффициента молярной экстинкции равным $5{,}36\times10^5$ моль$^{-1}$ см$^{-1}$ как представлено в работе [18].

К 1 мл контрольного и замороженного образцов эритроцитов добавляли 1,5 мл ТХУ (9%), перемешивали и инкубировали 15 мин на ледяной бане, затем центрифугировали при 3000 об/мин 15 мин. Полученный надосадок (ТХУ-экстракт) использовали для определения суммарного фосфора, неорганического фосфора и фосфора АТФ, как это представлено в работе [3].

АТФ определяли по формуле (1) [3]:

$АТФ=(Ф_{кг}-Ф_н)/2$, (мкмоль/г Hb) (1)

где: $Ф_н$ – концентрация неорганического фосфора в ТХУ-экстракте (мкмоль/г Hb),

$Ф_{кг}$ – концентрация фосфора после кислотного гидролиза ТХУ-экстракта на кипящей водяной бане (7 мин). Данный гидролиз производит отщепление 2-х фосфатных групп от молекулы АТФ с образованием молекулы АМФ [3].

Определение 2,3-ДФГ эритроцитов осуществляли по формуле (2):

$2{,}3\text{-ДФГ}=(Ф_{общ}-Ф_{ост}-Ф_н-3*АТФ-2*АДФ-3\text{-ФГ})/2$ (2)

где: $Ф_{общ}$ – концентрация общего фосфора после выпаривания и сжигания пробы ТХУ-экстракта в нитрате магния и растворения остатка в 0,36 н H_2SO_4 [3];

$Ф_{ост}$=0,07*$Ф_{общ}$, включает ~7% фосфора триозо-, пентозо- и гексозофосфат; гуаниновых и инозиновых фосфонуклеотидов и др. «следовых» фосфосоединений [10];

$АДФ^{к(з)}$=$АДФ^{н(к)}$+($АТФ^{н(к)}$–$АТФ^{к(з)}$), при этом $АТФ^{н}$=4,23±0,29 мкмоль/г Hb; $АДФ^{н}$=0,635±0,1 мкмоль/г Hb [9].

$3\text{-}ФГ^{к(з)}$=$3\text{-}ФГ^{н(к)}$+(($Ф_{н}^{к(з)}$–$Ф_{н}^{н(к)}$) – ($АТФ^{н(к)}$–$АТФ^{к(з)}$), при этом

$3\text{-}ФГ^{н}$=0,143 мкмоль/г Hb [9]; $Ф_{н}^{н}$=4,17±0,38 мкмоль/г Hb [10].

Надстрочные индексы *н,к,з* обозначают – в норме, в контроле и при замораживании, соответственно.

Определение $Ф_{общ}$, по методике цитируемой работы, дает величину $Ф_{общ}$=44±3,5 мкмоль/г Hb, которая незначительно отличается от $Ф_{общ}$, представленной в литературе [9,10]. Вычисления проводились с учетом фактора разведения. Концентрация фосфора и фосфоорганических соединений представлялась как мкмоль/г Hb.

Следует представить еще одну формулу (3) для определения 2,3-ДФГ, использование которой исключает экспериментальное определение $Ф_{общ}$, а также исключает $Ф_{ост}$, АДФ и 3-ФГ:

$2,3\text{-}ДФГ^{к(з)}$=$2,3\text{-}ДФГ^{н(к)}$–(($Ф_{н}^{к(з)}$–$Ф_{н}^{н(к)}$) – ($АТФ^{н(к)}$–$АТФ^{к(з)}$)) (3)

В данной формуле $2,3\text{-}ДФГ^{н}$=12,27±0,187 мкмоль/г Hb, $АТФ^{н}$=4,23±0,29 мкмоль/г Hb [9], $Ф_{н}^{н}$=4,17±0,38 мкмоль/г Hb [10], и представляют величины в норме. Разность ($Ф_{н}^{к(з)}$–$Ф_{н}^{н(к)}$) представляет собой общий прирост неорганического фосфора при «гидролизе» АТФ и 2,3-ДФГ; разность ($АТФ^{н(к)}$–$АТФ^{к(з)}$) представляет вклад фосфора при «гидролизе» АТФ до АДФ и $Ф_{н}$; разность ($Ф_{н}^{к(з)}$–$Ф_{н}^{н(к)}$)–($АТФ^{н(к)}$–$АТФ^{к(з)}$) представляет собой прирост фосфора при «гидролизе» 2,3-ДФГ.

Вычисления по формуле (3) дает совершенно близкие величины 2,3-ДФГ величинам, которые были вычислены по формуле (2), что обеспечивает упрощение экспериментальных процедур. Вычисления проводились с учетом фактора разведения. Концентрация фосфора и фосфоорганических соединений представлялась как мкмоль/г Hb.

Статистические расчеты производили на основе результатов, полученных на эритроцитах от 6 доноров. Для определения статистической достоверности результатов использовали непараметрический метод Манна-Уитни при $p< 0,05$ [1].

Результаты исследований и их обсуждение

В контрольных эритроцитах концентрации АТФ и 2,3-ДФГ составляют 3,79 и 9,64 мкмоль/г Hb соответственно. При замораживании в среде с декстраном отмечается значительное снижение концентраций АТФ и 2,3-ДФГ. Если среда замораживания содержала комбинацию декстрана с 1,2-ПД, то это способствовало меньшей потере фосфоорганических соединений (табл).

Табл.

Содержание фосфоорганических соединений в интактных и замороженных эритроцитах (мкмоль/г Hb).

Образцы эритроцитов	Контроль-ные	Замороженные в декстране	Замороженные в декстран +1,2-ПД	Нормальные Величины [9]
АТФ	3,79±0,51 (100%)	1,69±0,27 (44,8%)	2,83±0,39 (74,6%.)	4,23±0,29
2,3-ДФГ	9,64±1,25 (100%)	5,28±0,71 (54,8%)	7,36±1,08 (76,3%)	12,27±0,187

Донорская кровь, получаемая на станции переливания крови, отпускается на 3-й день (2-е суток хранения в растворе «Глюгицир» при 4-6°С) после ее заготовки, поэтому концентрация $Ф_{н}$ в ней несколько повышена по сравнению с нормой вследствие частичного гидролиза АТФ и 2,3-ДФГ. Результаты показывают, что через 2-е суток хранения крови потеря 2,3-ДФГ выше, чем АТФ. Так, в норме АТФ составляет 4,23 мкмоль/г Hb, а после хранения – 3,79 мкмоль/г Hb (табл.). Содержание 2,3-ДФГ в норме – 12,27 мкмоль/г Hb, после хранения – 9,64 мкмоль/г Hb (табл.).

Полученные результаты, свидетельствующие о потере АТФ и 2,3-ДФГ при замораживании в среде с декстраном, согласуются с данными литературы [17]. Кроме того, при замораживании эритроцитов в среде с глицерином или ГЭК также отмечается потеря данных фосфоорганических соединений [13]. В связи с удовлетворительной степенью сохранения АТФ и 2,3-ДФГ при замораживании эритроцитов в комбинированной среде с непроникающим (декстран) и проникающим (1,2-ПД) криопротекторами следует отметить, что подобные криоконсерванты обеспечивают сохранение осмотических и морфологических характеристик клеток [4,5,6], которые, как известно, определяются содержанием внутриклеточного АТФ [7].

Таким образом, представленный методический подход позволяет оценить содержание основных фосфоорганических соединений АТФ и 2,3-ДФГ как в интактных, так и в замороженных эритроцитах. Кроме того, данный метод можно использовать для оценки концентраций данных соединений при гипотермическом хранении крови и эритромассы.

Выводы

1. При замораживании эритроцитов в среде с декстраном отмечается значительная потеря

главных фосфоорганических соединений АТФ и 2,3-ДФГ.

2. Комбинированный криоконсервант, содержащий декстран и 1,2-пропандиол обеспечивает удовлетворительное сохранение АТФ и 2,3-ДФГ при замораживании.

Перспективы дальнейших исследований

В последующей работе планируется исследовать содержание главных фосфоорганических соединений (АТФ и 2,3-ДФГ) в эритроцитах, замороженных в среде с полиэтиленгликолем и в комбинированной среде с полиэтиленгликолем и 1,2-пропандиолом.

Литература

1. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов / Ашмарин И.П., Васильев И.П, Амбросов В.А. – Л.: Из–во Ленингр. Ун–та. – 1975. – 76 с.
2. Басова Е.М. Спектрофотометрическое определение ортофосфат-ионов в пластовых водах для проведения индикаторных исследований / Е.М. Басова, В.М. Иванов // Вест. Моск. Ун-та. Сер.2. Химия. – 2012. – Т.53, № 3. – С. 165-180.
3. Виноградова И.Л. Метод одновременного определения 2,3-ДФГ и АТФ в эритроцитах / И.Л. Виноградова, С.Ю. Багрянцева, Г.В. Дервиз // Лаб. Дело. – 1980. – № 7. – С. 424-426.
4. Рамазанов В.В. Свойство эритроцитов, замороженных в среде с полиэтиленгликолем и 1,2-пропандиолом / В.В. Рамазанов, Е.Л. Воловельская, В.А. Коптелов, В.А. Бондаренко // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – Т. 2, Вип. 3. – С. 230–236.
5. Рамазанов В.В. Свойства эритроцитов, замороженных в комбинированной среде с полиэтиленгликолем и диметилсульфоксидом / В.В. Рамазанов, Т.И. Дейнеко, Е.Л. Воловельская [и др.] // Биотехнология.– 2012.– Т.5, №2. – С. 106–114.
6. Рамазанов В.В. Эффективность комбинированных криоконсервантов, содержащих глицерин или 1,2-пропандиол при замораживании эритроцитов / В.В. Рамазанов // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, №2 – С. 125–136.
7. Almizraq R. Storage of red blood cells affects membrane composition, microvesiculation, and in vitro quality / R. Almizraq, J.D. Tchir, J.L. Holovati, J.P. Acker // Transfusion. – 2013. – Vol.53, N10 – P.2258-2267.
8. Barshtein G. Storage-induced damage to red blood cell mechanical properties can be only partially reversed by rejuvenation / G. Barshtein, A. Gural, N. Manny [et. al.] // Transfus Med Hemother. – 2014. – Vol. 41, N3 – P.197-204. Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods / E. Beutler // Grune&Stratton, New York, 1975. – 160 p.
9. Dyce B.J. A rapid nonenzymatic assay for 2,3-DPG in multiple specimens of blood / B.J. Dyce, S.P. Bessman // Arch Environ Health. – 1973. – Vol. 27, N2 – P.112-115.
10. Ellsworth M.L. Role of erythrocyte-released ATP in the regulation of microvascular oxygen supply in skeletal muscle / M.L. Ellsworth, C.G. Ellis, R.S. Sprague // Acta Physiol (Oxf). – 2016. – Vol.216, N3. – P.265-276.
11. Högman C.F. Storage of red blood cells with improved maintenance of 2,3-bisphosphoglycerate / C.F. Högman, H. Löf, H.T. Meryman // Transfusion. – 2006. Vol.46, N9 – P.1543-1552.
12. Korsak J. Evaluation of two distinct cryoprotectants for cryopreservation of human red blood cell concentrates / J. Korsak, A. Goller, A. Rzeszotarska, K. Pleskacz // Cryo Letters. – 2014. – Vol. 35, N1 – P.15-21.
13. Koshkaryev A. Rejuvenation treatment of stored red blood cells reverses storage-induced adhesion to vascular endothelial cells / A. Koshkaryev, O. Zelig, N. Manny [et. al.] // Transfusion. – 2009. – Vol. 49, N10 – P.2136-2143.
14. Qu L. Clinical effects of red blood cell storage / L. Qu, D.J. Triulzi // Cancer Control. – 2015. – Vol. 22, N1. – P.26–37.
15. Patel R.P. Losing control over adenosine 5'-triphosphate release: implications for the red blood cell storage lesion / R.P. Patel // Crit Care Med. – 2011. – Vol.39, N11. – P.2573-2574.
16. Pellerin-Mendes C. In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen / C. Pellerin-Mendes, L. Million, M. Marchand–Arvier [et al.] // Cryobiology. – 1997. – Vol. 35, N2. – P.173–186.
17. Shaklai N. Classification and localization of hemoglobin binding sites on the red blood cell membrane / N. Shaklai // Biochemistry. – 1977. – Vol.16, N25. – P.5593–5597.
18. Valeri C.R. In vivo survival of apheresis RBCs, frozen with 40–percent (wt/vol) glycerol, deglycerolized in the ACP 215, and stored at 4 degrees C in AS–3 for up to 21 days / C.R. Valeri, G. Ragno, L. Pivacek // Transfusion. – 2001. – Vol. 41, N7. – P.928–932.
19. Zhu H. Impaired adenosine-5'-triphosphate release from red blood cells promotes their adhesion to endothelial cells: a mechanism of hypoxemia after transfusion / H. Zhu, R. Zennadi, B.X. Xu [et. al.] // Crit Care Med. – 2011. – Vol. 39, N11. P.2478-2486.

References

1. Bystrye metody statisticheskoj obrabotki i planirovanie jeksperimentov / Ashmarin I.P., Vasil'ev I.P, Ambrosov V.A. – L.: Iz–vo Leningr. Un–ta. – 1975. – 76 s.
2. Basova E.M. Spektrofotometricheskoe opredelenie ortofosfat-ionov v plastovyh vodah dlja provedenija indikatornyh issledovanij / E.M. Basova, V.M. Ivanov // Vest. Mosk. Un-ta. Ser.2. Himija. – 2012. – T.53, № 3. – S. 165-180.
3. Vinogradova I.L. Metod odnovremennogo opredelenija 2,3-DFG i ATF v jeritrocitah / I.L. Vinogradova, S.Ju. Bagrjanceva, G.V. Derviz // Lab. Delo. – 1980. – № 7. – S. 424-426.
4. Ramazanov V.V. Svojstvo jeritrocitov, zamorozhennyh v srede s polijetilenglikolem i 1,2-propandiolom / V.V. Ramazanov, E.L. Volovel'skaja, V.A. Koptelov, V.A. Bondarenko // Visnik problem biologiї i medicini. – 2014. – T. 2, Vip. 3. – S. 230–236.
5. Ramazanov V.V. Svojstva jeritrocitov, zamorozhennyh v kombinirovannoj srede s polijetilenglikolem i dimetilsul'foksidom / V.V. Ramazanov, T.I. Dejneko, E.L. Volovel'skaja [i dr.] // Biotehnologija.– 2012.– T.5, №2. – S. 106–114.
6. Ramazanov V.V. Jeffektivnost' kombinirovannyh kriokonservantov, soderzhashhih glicerin ili 1,2-propandiol pri zamorazhivanii jeritrocitov / V.V. Ramazanov // Problemy kriobiologii. – 2011. – T. 21, №2 – S. 125–136.
7. Almizraq R. Storage of red blood cells affects membrane composition, microvesiculation, and in vitro quality / R. Almizraq, J.D. Tchir, J.L. Holovati, J.P. Acker // Transfusion. – 2013. – Vol.53, N10 – P.2258-2267.
8. Barshtein G. Storage-induced damage to red blood cell mechanical properties can be only partially reversed by rejuvenation / G. Barshtein, A. Gural, N. Manny [et. al.] // Transfus Med Hemother. – 2014. – Vol. 41, N3 – P.197-204. Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods / E. Beutler // Grune&Stratton, New York, 1975. – 160 p.
9. Dyce B.J. A rapid nonenzymatic assay for 2,3-DPG in multiple specimens of blood / B.J. Dyce, S.P. Bessman // Arch Environ Health. – 1973. – Vol. 27, N2 – P.112-115.
10. Ellsworth M.L. Role of erythrocyte-released ATP in the regulation of microvascular oxygen supply in skeletal muscle / M.L. Ellsworth, C.G. Ellis, R.S. Sprague // Acta Physiol (Oxf). – 2016. – Vol.216, N3. – P.265-276.
11. Högman C.F. Storage of red blood cells with improved maintenance of 2,3-bisphosphoglycerate / C.F. Högman, H. Löf, H.T. Meryman // Transfusion. – 2006. Vol.46, N9 – P.1543-1552.
12. Korsak J. Evaluation of two distinct cryoprotectants for cryopreservation of human red blood cell concentrates / J. Korsak, A. Goller, A. Rzeszotarska, K. Pleskacz // Cryo Letters. – 2014. – Vol. 35, N1 – P.15-21.
13. Koshkaryev A. Rejuvenation treatment of stored red blood cells reverses storage-induced adhesion to vascular endothelial cells / A. Koshkaryev, O. Zelig, N. Manny [et. al.] // Transfusion. – 2009. – Vol. 49, N10 – P.2136-2143.
14. Qu L. Clinical effects of red blood cell storage / L. Qu, D.J. Triulzi // Cancer Control. – 2015. – Vol. 22, N1. – P.26–37.
15. Patel R.P. Losing control over adenosine 5'-triphosphate release: implications for the red blood cell storage lesion / R.P. Patel // Crit Care Med. – 2011. – Vol.39, N11. – P.2573-2574.
16. Pellerin-Mendes C. In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen / C. Pellerin-Mendes, L. Million, M. Marchand–Arvier [et al.] // Cryobiology. – 1997. – Vol. 35, N2. – P.173–186.
17. Shaklai N. Classification and localization of hemoglobin binding sites on the red blood cell membrane / N. Shaklai // Biochemistry. – 1977. – Vol.16, N25. – P.5593–5597.
18. Valeri C.R. In vivo survival of apheresis RBCs, frozen with 40–percent (wt/vol) glycerol, deglycerolized in the ACP 215, and stored at 4 degrees C in AS–3 for up to 21 days / C.R. Valeri, G. Ragno, L. Pivacek // Transfusion. – 2001. – Vol. 41, N7. – P.928–932.
19. Zhu H. Impaired adenosine-5'-triphosphate release from red blood cells promotes their adhesion to endothelial cells: a mechanism of hypoxemia after transfusion / H. Zhu, R. Zennadi, B.X. Xu [et. al.] // Crit Care Med. – 2011. – Vol. 39, N11. P.2478-2486.

Реферат

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТУ І 2,3-ДИФОСФОГЛІЦЕРАТУ В ЕРИТРОЦИТАХ ДОНОРСЬКОЇ КРОВІ ПРИ ЗАМОРОЖУВАННІ.

Рамазанов В.В., Бондаренко В.А.

Ключові слова: еритроцити, заморожування, комбінований кріоконсервант, аденозинтрифосфат, 2,3-дифосфогліцерат.

Раніше було показано, що середовища, які містять непроникні та проникні захисні компоненти при заморожуванні-відігріві зразків еритроцитів, забезпечують стійкість клітин до дії гіпертонічного і осмотичного (післягіпертонічного) стресів. Крім того, еритроцити, які були заморожені в комбінованих середовищах з непроникними і проникними кріопротекторами, незначно відрізняються за осмотичними і морфологічними характеристиками від інтактних клітин. Як відомо, дані показники залежать від концентрації внутрішньоклітинного аденозинтрифосфату (АТФ), втрата якого при гіпотермічному зберіганні або заморожування еритроцитів супроводжується втратою 2,3-дифосфогліцерату (2,3-ДФГ). В роботі досліджували вміст головних фосфоорганічних з'єднань еритроцитів (АТФ і 2,3-ДФГ) після заморожування в середовищі з декстраном і в комбінованому середовищі з декстраном та 1,2-пропандіолом (1,2-ПД). Показано, що при заморожуванні еритроцитів в середовищі з декстраном відзначається значна втрата АТФ і 2,3-ДФГ. Комбінування в середовищі заморожування декстрану і проникного кріопротектору 1,2-ПД забезпечує задовільне збереження даних фосфоорганічних з'єднань. Отримані результати, ймовірно, пов'язані з тим, що включення в середовище проникного кріопротектору і проникнення його в клітини забезпечує послаблення їх «критичного» стиснення при охолодженні. Це сприяє збереженню нормальної локалізації ферментів на мембранних структурах і підтримці клітинного метаболізму в розморожених еритроцитах.

Summary

EVALUATION OF ATP AND 2,3-BIPHOSPHO-GLYCERATE CONTENT IN ERYTHROCYTES OF DONOR BLOOD DURING FREEZING

Ramazanov V.V., Bondarenko V.A.

Key words: red blood cells, freeze, combined cryopreservatives, adenosine triphosphate, 2.3- biphospho-glycerate.

It was previously shown that media containing permeable and impermeable protective components during freezing-warming of red blood cell samples provide cell resistance to the action of osmotic and hypertonic (post-hypertonic) stress. In addition, the red blood cells that have been frozen in combined environments with impermeable and permeable cryoprotectants slightly differ in osmotic and morphological characteristics from intact cells. These figures are known to depend on the concentration of intracellular adenosine triphosphate (ATP), the loss of which during hypothermic storage or freezing of red blood cells is accompanied by the loss of 2.3-biphosphor-glycerate (2,3-BPG). This study was aimed to evaluating the contents of the main phosphor-organic compounds of erythrocytes (ATP and 2,3-BPG) after freezing in the medium with dextran and in the medium with dextran and combined 1,2-propanediol (1,2-PD). It has been shown that the freezing of red blood cells in the medium with dextran markes a significant loss of ATP and 2,3-BPG. Combining of dextran and permeable cryopreservatives 1,2-PD in the medium provides satisfactory storage of phosphor-organic compounds. The results obtained are probably due to the fact that the inclusion of permeable cryoprotectants and its entering cells into the medium provides weakening of their "critical" compression in cooling. This helps to preserve normal localization of enzymes on membrane structures and to support cellular metabolism in thawed red blood cells.