

БІОЛОГІЧНІ НАУКИ

УДК: 616-001.18:612.111:612.014.464

Головіна К.М.,
аспірант,
Боброва О.,
старший науковий співробітник,
Шапкіна О.О.,
науковий співробітник,
Ніном О.Є.,
старший науковий співробітник,
ІПК і К НАН України, Харків

**ВПЛИВ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ НА МЕХАНІЧНУ СТІЙКІСТЬ
ЕРИТРОЦИТІВ ПРИ ГІПОТЕРМІЧНОМУ ЗБЕРІГАННІ**

У роботі досліджено вплив предобробки озоном еритроцитів людини на їх механічну стійкість після гіпотермічного зберігання протягом 1 та 2 місяців у двох консервуючих середовищах (Олсвера та 5% розчині манніту). Механічний шок моделювали перемішуванням протягом 120 хв клітинної суспензії у ємності, заповненої пластиковими кульками. Виявлено, що озонування еритроцитів у середовищі з маннітом не призводить до достовірної зміни механічної стійкості свіжоотриманих еритроцитів, в той час як у середовищі Олсвера гемоліз у озонованих еритроцитах нижче, ніж у контрольних. Предобробка озоном еритроцитів призводить до збільшення їх механічної стійкості після 1 та 2 місяців зберігання у середовищі з маннітом, порівняно з неозонованими еритроцитами. При зберіганні у розчині Олсвера спостерігається протилежний ефект.

Ключові слова: гіпотермічне зберігання, еритроцити, оксидативний стрес, механічна стійкість, озон.

Переливання консервованої крові вважається одним з найбільших досягнень сучасної медицини [1]. Ефективним методом рятування життя та поліпшення стану для ряду категорій пацієнтів, в тому числі і з травмами та геморагічним шоком, гемолітичною анемією та основними хірургічними операціями є переливання еритроцитарної маси (еритромаси) [2].

Проте під час зберігання в банках крові з еритроцитами протікає серія біохімічних і біомеханічних змін, які впливають на морфологію і фізіологію клітин і можуть знизити ефективність переливання крові [3]. Пошкодження, викликані тривалим зберіганням еритроцитів призводять до того, що чверть еритроцитів руйнується і видаляється з крові реципієнтів в перші 24 години після переливання. Ретроспективні клінічні дослідження показали, що перевищення терміну зберігання еритроцитів довше 14 днів, можуть корелювати з плохим прогнозом у критичних пацієнтів [1].

Виявлено, що збереженість еритроцитів під час гіпотермічного зберігання істотно залежить від використаних у консервуючому середовищі добавок [4]. Дослідження, проведені авторами роботи [5] на 599 зразках крові з різних банків крові також показали ведучий вплив компонен-

тів розчинів для обробки та зберігання еритроцитів на їх метаболічні характеристики при різних термінах зберігання. Автори підкреслюють необхідність подальшого поліпшення протоколів обробки еритроцитів і складу консервуючих добавок. Тому продовжуються пошуки способів зберігання еритроцитів, які дозволять максимально підтримувати корпускулярну цілісність і виживання після переливання крові.

Відомо, що один стрес-агент може звести нанівець шкідливі наслідки подальшого більшого стресу. Це може бути пов'язане з тим, що перший стрес-фактор викликає захисні механізми, що ведуть до підвищеної стійкості до наступних несприятливих факторів (явище перехресної адаптації) [6]. Воссі V.A. наводить ряд прикладів стимулюючих відповідей після стимулів нижче токсикологічного порогу [7]. Озонотерапія фармакологічно задумана як терапія, де низькі дози озону були стимулюючими, в той час високі дози були інгібуючими. Авторами роботи [8] виявлено позитивний вплив обробки озоном на реологічні властивості крові під час гіпотермічного зберігання.

Параметри механічної стійкості широко використовуються для оцінки стану еритроцитів різних видів ссавців в умовах дії стресових факторів

[9-11]. Тому метою даної роботи було дослідження впливу обробки озоном еритроцитів на їх механічну стійкість при гіпотермічному зберіганні.

Матеріали і методи. Донорську кров (чоловіча, А (II) + групи) отримували у обласному центрі переливання крові м. Харкова, центрифугували при 800 g протягом 10 хв, видаляли плазму і тричі відмивали шляхом центрифугування в тих же умовах в 10-кратному обсязі ізотонічного розчину NaCl, що містить 0,01 М трис-буфера, pH 7,2. Еритроцитарний осад ділили на дві частини. Пропускаючи газоподібний кисень через озонатор бар'єрного типу отримували озон і озонували першу половину відмитих еритроцитів (доза 120 мкг/мл). Далі озоновані та контрольні еритроцити ресуспендували рівним об'ємом розчину для гіпотермічного зберігання. В даній роботі застосовували два середовища: розчин Олсвера (20,5 г/л глюкози, 8 г/л цитрату натрію, 0,552 г/л лимонної кислоти, 4,2 г/л хлориду натрію, вода дистильована до 1 л) та розчин маніту (50 г/л маніту, 0,9 г/л хлориду натрію, вода дистильована до 1 л).

В усі зразки додавали антибіотик цифран, кінцева концентрація 0,01 мг/мл. Гіпотермічне зберігання підготовлених еритроцитів здійснювали у холодильнику при (+2...+4°C) на протязі 2 місяців.

Контрольні зразки еритроцитів і після 1 місяця та 2 місяців їх гіпотермічного зберігання у різних середовищах піддавали дії механічного шоку шляхом перемішування клітинної суспензії з гематокритом близько 20% у ємності, заповненої пластиковими кульками (діаметр 5 мм) [9]. Перемішування здійснювалося при

кімнатній температурі за допомогою магнітної мішалки ММ-5. Швидкість обертання складала 1200 оборотів за хвилину. Через певні інтервали часу проводили відбір суспензії еритроцитів для визначення виходу гемоглобіну з клітин. Рівень гемолізу еритроцитів визначали спектрофотометричним методом при довжині хвилі 543 нм. Гемоліз виражали в процентах по відношенню до 100% гемолізу (додавали тритон Х-100 в концентрації 0,1%).

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програми Microsoft Excel пакета Microsoft Office 2010.

Результати та обговорення. Як видно на рис. 1, гемоліз еритроцитів росте з часом під дією механічного стресу, що свідкує о наростанні ступеню пошкодження клітин [10]. Озонування еритроцитів у середовищі з маннітом не призводить до достовірної зміни механічної стійкості еритроцитів. У середовищі Олсвера, починаючи з 90 хв механічного стресу гемоліз у озонованих еритроцитах нижче, ніж у контрольних. Гіпотермічне зберігання еритроцитів людини протягом 1 місяця призводить до зниження механічної стійкості еритроцитів у всіх досліджених варіантах, але у середовищі з маннітом це зниження більш виражено (рис. 2). При цьому озонування по різному впливає на гемоліз еритроцитів при механічному стресі у різних середовищах. Продовження зберігання еритроцитів до 2 місяців призводить до посилення спостережуваних ефектів (рис. 3). У середовищі Олсвера гемоліз озонованих еритроцитів при механічному впливі достовірно вищий, ніж неозонованих. У розчині манніту спостерігається протилежний ефект.

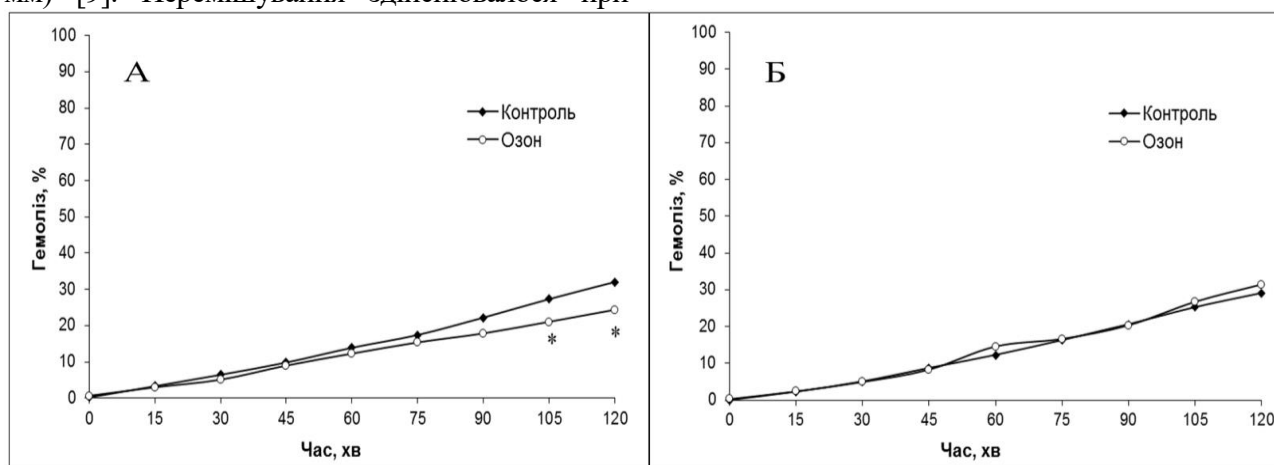


Рис. 1 Вплив механічного стресу на гемоліз контрольних та озонованих еритроцитів в середовищі Олсвера (А) та розчині маніту (Б);

* - статистично значимі відмінності у порівнянні з контрольними клітинами ($p < 0,05$), $n = 5$.

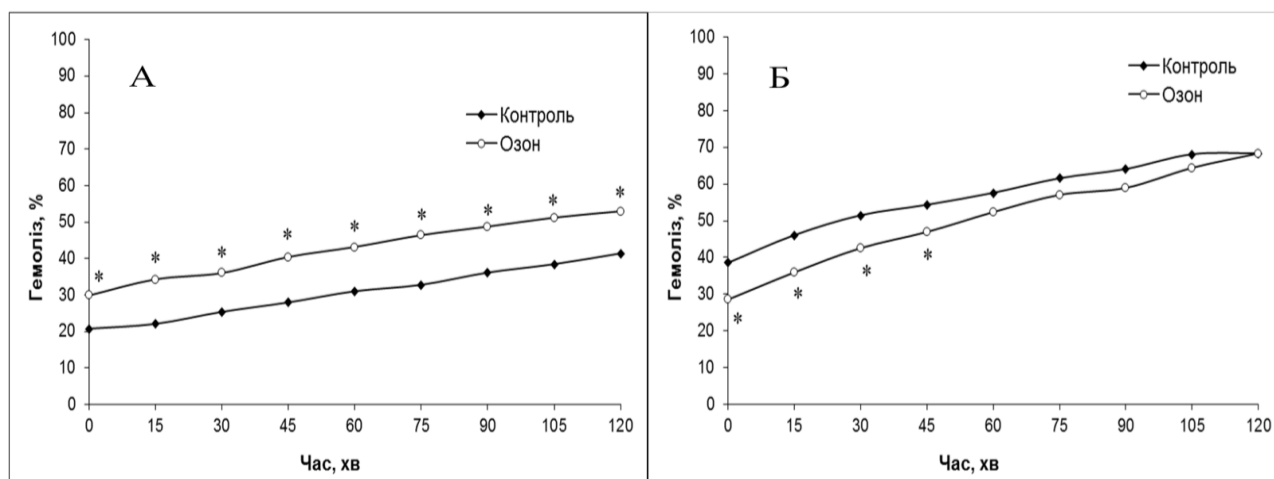


Рис. 2 Вплив механічного стресу на гемоліз контрольних та озонованих еритроцитів, які зберігалися протягом 1 місяця у середовищі Олсвера (А) та розчині маніту (Б);
* - статистично значимі відмінності у порівнянні з контрольними клітинами ($p < 0,05$), $n = 5$.

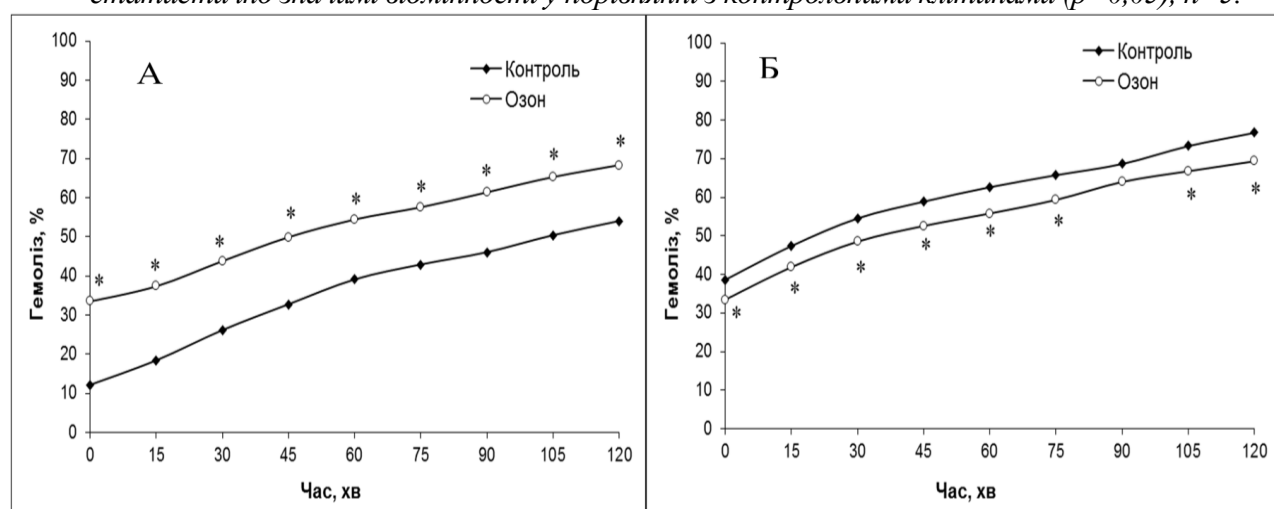


Рис. 3 Вплив механічного стресу на гемоліз контрольних та озонованих еритроцитів, які зберігалися протягом 2 місяців у середовищі Олсвера (А) та розчині маніту (Б);
* - статистично значимі відмінності у порівнянні з контрольними клітинами ($p < 0,05$), $n = 5$.

Отримані неоднозначні дані по впливу озонування на механічну стійкість еритроцитів при гіпотермічному зберіганні необхідно доповнити подальшими дослідженнями цього параметру з іншими дозами озону, оскільки використана у роботі концентрація озону 120 мг/мл вища за рекомендовані терапевтичні дози [7, 8].

Висновки. Гіпотермічне зберігання еритроцитів протягом 1 та 2 місяців приводить

до зниження механічної стійкості еритроцитів. Вплив предобробки озоном на механічну стійкість еритроцитів залежить від консервуючого середовища. При зберіганні еритроцитів у середовищі з маннітом озонування еритроцитів призводить до достовірного збільшення механічної стійкості еритроцитів, у середовищі Олсвера – навпаки.

Список літератури:

1. Sun K., D'Alessandro A., Xia Ya. Purinergic control of red blood cell metabolism: novel strategies to improve red cell storage quality. – Blood Transfus. 2017; 15. P.535–542. DOI: 10.2450/2017.0366-16
2. Weisbach V., Riego W., Strasser E., Zingsem J., Ringwald J., Zimmermann R. & Eckstein R. The in vitro quality of washed, prestorage leucocyte-depleted red blood cell concentrates. – Vox Sanguinis. 2004. 87. P. 19–26.
3. Sparrow R. L. Red blood cell storage duration and trauma. – Transfusion Medicine Reviews. 2015. Vol. 29(2). P. 120–126.

4. Wiltshire M., Cardigan R., Thomas St. Manufacture of red cells in additive solution from whole blood refrigerated for 5 days or remanufactured from red cells stored in plasma Transfusion Medicine. – 2010. 20. P. 383–391. DOI: 10.1111/j.1365-3148.2010.01024.x
5. D'Alessandro A., Culp-Hill R., Reisz J.A. [et al] Heterogeneity of blood processing and storage additives in different centers impacts stored red blood cell metabolism as much as storage time: lessons from REDS-III—Omics. – Transfusion. 2018, 9999. P. 1–12.
6. Alexieva V., Ivanov S., Sergiev I., Karanov E. Interaction between stresses. – Bulg. J. Plant Physiol. Special Issue. 2003. P. 1–17.
7. Bocci V.A, Zanardi I., Travagli V. Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. – Journal of Translational Medicine. 2011. 9:66. <http://www.translational-medicine.com/content/9/1/66>
8. Baieth H. El-S. A., Elashmawi I.Sh. Influence of ozone on the rheological and electrical properties of stored human blood. – Journal of Biomedical Research. 2012. 26(3). P. 185–192. DOI: 10.7555/JBR.26.20110070
9. Shpakova N.M., Orlova N.V., Nipot E.E., Aleksandrova D.I. Comparative study of mechanical stress effect on human and animal erythrocytes. – Fiziologichnyi zhurnal. 2015. 61(3). P. 75–80.
10. Shpakova N.M., Orlova N.V., Nipot E.E. Dehydration of mammalian erythrocytes affects their sensitivity to mechanical stress. – Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2015. 25(1). P. 24–32.
11. Шпакова Н.М. Температурна та осмотична стійкість еритроцитів різних видів ссавців: автореф. дис. на здобуття наукового ступеня доктора біол. наук: спец. 03.00.19 «Кріобіологія». – 2014. 44с.

Головина К.Н., Боброва Е.Н., Шапкина О., Нипот Е.Е.

ВЛИЯНИЕ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА НА МЕХАНИЧЕСКУЮ СТОЙКОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ГИПОТЕРМИЧЕСКОМ ХРАНЕНИИ

В работе исследовано влияние предобработки озоном эритроцитов человека на их механическую устойчивость после гипотермического хранения в течение 1 и 2 месяцев в двух консервирующих средах (Олсвера и 5% растворе маннита). Механический шок моделировали перемешиванием в течение 120 мин клеточной суспензии в емкости, заполненной пластиковыми шариками. Выявлено, что озонирование эритроцитов в среде с маннитом не приводит к достоверному изменению механической устойчивости свежеполученных эритроцитов, в то время как в среде Олсвера гемолиз в озонированных эритроцитах ниже, чем в контрольных. Предобработка озоном эритроцитов приводит к увеличению их механической устойчивости после 1 и 2 месяцев хранения в среде с маннитом, по сравнению с неозонированными эритроцитами. При хранении в растворе Олсвера наблюдается противоположный эффект.

Ключевые слова: гипотермическое хранение, эритроциты, оксидативный стресс, механическая стойкость, озон

Golovina K., Bobrova O., Shapkina O., Nipot E.

EFFECT OF OXIDATIVE STRESS ON THE MECHANICAL STABILITY OF ERYTHROCYTES DURING HYPOTHERMAL STORAGE

In this paper, the effect of ozone pre-treatment of human erythrocytes on their mechanical stability after hypothermic storage for 1 and 2 months in two preservative media (Olsver and 5% mannitol solution) was investigated. Mechanical shock was simulated by mixing the cell suspension for 120 min in a container filled with plastic balls. It was revealed that ozonation of erythrocytes in a mannitol medium does not lead to a significant change in the mechanical stability of fresh erythrocytes, while in Olsver medium hemolysis in ozonated erythrocytes is lower than in control ones. Erythrocyte pretreatment with ozone leads to an increase in their mechanical stability after 1 and 2 months' storage in mannitol medium, compared with non-ozonated erythrocytes. When stored in the Olsver solution, the opposite effect was observed.

Key words: hypothermic storage, red blood cells, oxidative stress, mechanical resistance, ozone