

DOI: 10.26693/JMBS05.04.357

УДК 57.086.13:612.111.014.43:577.352.3

Головіна К. М., Боброва О. М., Шапкіна О. О.,
Ніпот О. Є., Говорова Ю. С.

ЗНИЖЕННЯ МЕХАНІЧНОЇ СТІЙКОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ ПРИ ГІПОТЕРМІЧНОМУ ЗБЕРІГАННІ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна

helen.bobrova.77@gmail.com

У роботі досліджено вплив гіпотермічного зберігання еритроцитів людини і барана на їх механічну стійкість. Відмиті еритроцити людини і барана змішували з середовищем Олсвера або 5% розчином маніту у співвідношенні 1:1 та зберігали при +4°C до 2-х місяців. Механічний шок моделювали перемішуванням суспензії еритроцитів протягом 120 хв у ємності, заповненої пластиковими кульками. Через певні інтервали часу проводили відбір суспензії еритроцитів для визначення виходу гемоглобіну з клітин. Показано, що під дією механічного стресу з часом наростає ступінь пошкодження клітин і гемоліз еритроцитів зростає в усіх зразках. Для свіжоотриманих еритроцитів людини середовище інкубування практично не впливає на їх механічну стійкість. Реакція еритроцитів барана на механічний стрес сильно залежить від середовища. З'ясовано, що еритроцити барана швидше гемолізують з часом при механічному впливі, ніж еритроцити людини. Механічна стійкість еритроцитів людини і барана знижується після 1 місяця гіпотермічного зберігання у всіх досліджених середовищах. Виявлено, що при гіпотермічному зберіганні консервуюче середовище відіграє ключову роль для збереження механічних властивостей еритроцитів людини. Для еритроцитів людини після 1 місяця зберігання механічна стійкість достовірно вища у середовищі Олсвера, ніж у розчині маніту і з часом механічного впливу різниця у рівнях гемолізу між цими середовищами зростає. Для еритроцитів барана різниця у механічній стійкості для середовища Олсвера і розчину маніта менш виражена. Гіпотермічне зберігання еритроцитів людини та барана протягом 2 місяців призводить до подальшого зниження їх механічної стійкості. Тому переливати кров після тривалого гіпотермічного зберігання недоцільно, оскільки еритроцити після трансфузії можуть швидко загинути у кровоносному руслі при проходженні скрізь капіляри і погіршити стан пацієнта.

Ключові слова: гіпотермічне зберігання, еритроцити, консервуючі середовища, механічний стрес, гемоліз.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота була виконана в рамках науково-дослідної теми відділу кріобіології ІПКіК НАН України «Дослідження дії оксидативного стресу на кріорезистентність клітин та реакції теплокровних тварин на холод», № держ. реєстрації 0110U000405.

Вступ. Еритроцити, завдяки їх здатності деформуватися і текти в мікросудинній мережі, виконують надважливу функцію в організмі людини, таку як газообмін між кров'ю і тканинами [1]. Протягом у середньому 120-денного життя еритроцити циркулюють артеріями, венами і малими капілярами, проходячи загалом відстань біля 500 км. Щоб виконати своє завдання з транспортування газів судинним руслом, еритроцити повинні мати високу здатність пружно деформуватися у відповідь на механічні впливи і проходити через вузькі судини в процесі мікроциркуляції [2]. Висока деформабільність еритроцитів, головним чином, обумовлена в'язкопружними властивостями плазматичної мембрани клітин, яка залежить від структурних властивостей "горизонтальних" цитоскелетних компонентів, таких як спектрин; вертикальної взаємодії цитоскелету та інтегральних трансмембранних комплексів, яке здійснюється анкірином, білками полоси 4.1 та 4.2 та цитозольним доменом білка полоси 3 і параметрів цитозолу (тобто внутрішньоклітинної в'язкості, стану гідратації еритроцитів та співвідношення поверхня-об'єм) [3]. На деформабільність також впливають метаболічні процеси, які контролюють рівень АТФ та окислювально-відновний стан.

Здатність еритроцитів піддаватися широкому діапазону деформацій під час проходження мікросудин має вирішальне значення для адекватної перфузії [4]. Відсутність збереження механічної стійкості і деформабільності еритроцитів після тривалого гіпотермічного зберігання можуть призвести до скорочення терміну життя еритроцитів у кровоносному руслі реципієнта та виникнення ускладнень [5]. Чисельні ретроспективні клінічні дослідження показали, що переливання еритроцитів, підданих тривалому гіпотермічному зберіганню,

пов'язане з ризиком погіршення результатів для певних груп пацієнтів, включаючи пацієнтів з травмою, інтенсивним лікуванням та кардіохірургічними операціями [6]. Тому продовжуються дослідження впливу модифікування консервуючого середовища, умов зберігання та інших аспектів на властивості еритроцитів [7, 8].

Мета роботи – вивчити вплив гіпотермічного зберігання у різних середовищах на механічну стійкість еритроцитів людини і барана.

Матеріал та методи дослідження. Донорську кров (чоловіча, А (II) + групи) отримували у Харківському обласному центрі служби крові. Цільну кров барана заготовляли на 3,8 % розчині цитрату натрію від здорових статевозрілих самців. Маніпуляції з тваринами проводили професійні ветеринари у відповідності з «Загальними принципами експериментів на тваринах». Кров центрифугували при 800 г протягом 5 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-буферу, рН 7,2. Отриманий еритроцитарний осад 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) протягом 2 місяців.

Механічну стійкість контрольних еритроцитів, а також після 1 та 2 місяців їх гіпотермічного зберігання у різних середовищах оцінювали, піддаючи еритроцити дії механічного шоку шляхом перемішування клітинної суспензії з гематокритом близько 20% у ємності, заповненій 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 X-100 в концентрації 0,1%).

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

Результати дослідження та їх обговорення.

Гемоліз еритроцитів росте з часом під дією механічного стресу (рис. 1), що свідчить про зростання ступеня пошкодження клітин [10]. Для контрольних еритроцитів людини не зареєстровано достовірної різниці у механічній стійкості еритроцитів у середовищі Олсвера та розчині маніту (рис. 1 А). Однак виявлені істотні відмінності у механічній стійкості еритроцитів барана і людини. По-перше, гемоліз еритроцитів барана зростає з часом швидше, ніж еритроцитів людини, а по-друге, реакція еритроцитів барана на механічний стрес сильно залежить від середовища інкубування (рис. 1 Б). Різна чутливість еритроцитів ссавців до дії різних фізико-хімічних факторів відома давно. Так, Matsuzawa Т.

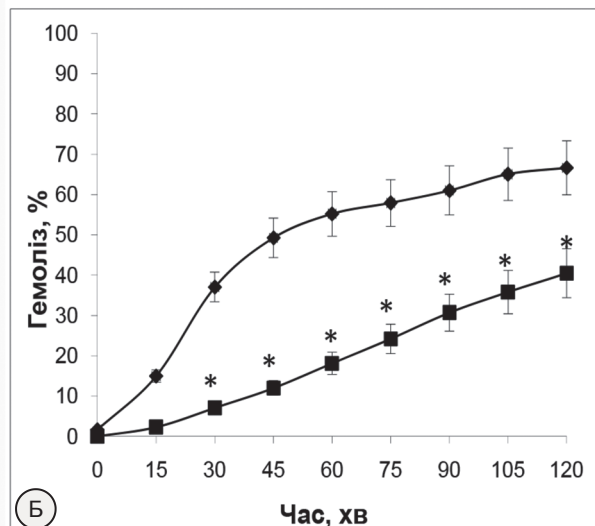
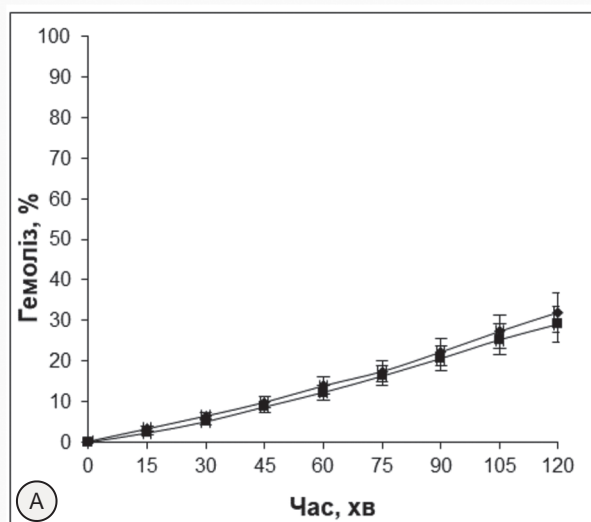


Рис. 1. Гемоліз контрольних еритроцитів людини (А) і барана (Б) у середовищі Олсвера (◆) та розчині маніту (■) під впливом механічного стресу

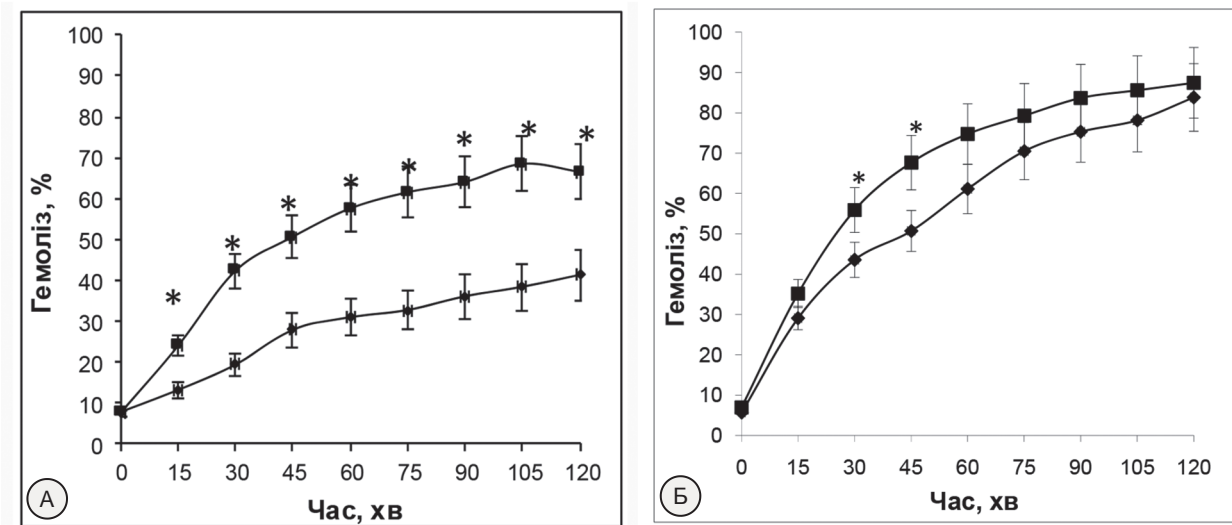
Примітки: * – статистично значимі відмінності у порівнянні з середовищем Олсвера ($p < 0,05$), $n = 5$.

та Ikarashi Y. [11] при порівняльному аналізі гемолізу еритроцитів миші, щура, кролика, хом'яка, корови, свині, барана, морської свинки, собаки та людини при змінах осмолярності та кислотності середовища виявили, що еритроцити людини більш стійкі у порівнянні з еритроцитами тварин, а еритроцити барана мають найменшу стійкість до змін параметрів середовища інкубування.

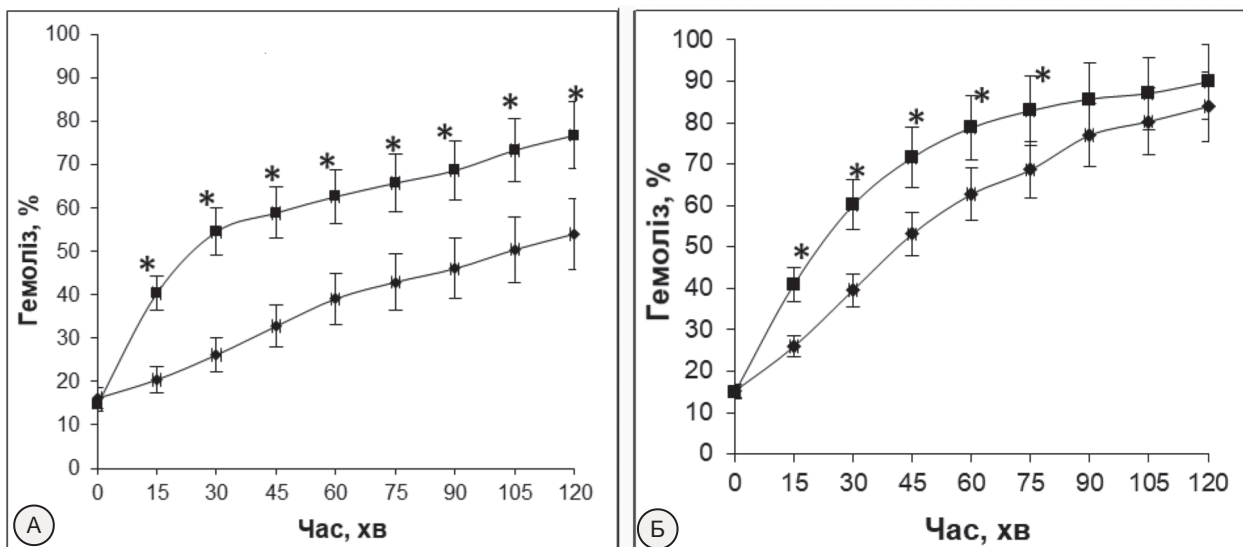
Гіпотермічне зберігання еритроцитів людини і барана протягом 1 місяця призводить до зниження механічної стійкості еритроцитів у всіх досліджених середовищах (рис. 2). Для еритроцитів людини різниця у гемолізі у розчині маніту і середовищі

Олсвера із часом механічного впливу зростає, що свідкує про достовірні відмінності у механічній стійкості еритроцитів після зберігання у різних середовищах. Для еритроцитів барана різниця у механічній стійкості для середовища Олсвера і розчину маніта виражена не так сильно, як для еритроцитів людини. Можна відмітити, що гемоліз для еритроцитів барана при механічному впливі зростає з часом значно швидше, ніж для еритроцитів людини у обох досліджених середовищах.

Подовження зберігання еритроцитів до 2 місяців призводить до посилення спостережених ефектів зниження механічної стійкості (рис. 3).



Примітки: * – статистично значимі відмінності у порівнянні з середовищем Олсвера ($p < 0,05$), $n=5$.



Примітки: * – статистично значимі відмінності у порівнянні з середовищем Олсвера ($p < 0,05$), $n=5$.

Під час мікроциркуляції *in vivo* еритроцити переміщуються через мікросудини, діаметр яких менший за розмір окремих клітин, щоб забезпечити оптимальну передачу газу між кров'ю і тканинами [1]. Тому переливати кров після 2-х місяців гіпотермічного зберігання, яка має погані показники механічної стійкості еритроцитів, не рекомендується, оскільки, незважаючи на невисокий відсоток гемолізу у суспензії клітин, після зберігання (14-16%) під дією механічного стресу гемоліз може зрости більш, ніж у 5 разів. Такі еритроцити після трансфузії можуть швидко загинути у кровоносному руслі при проходженні скрізь капіляри і погіршити стан пацієнта.

Таким чином, еритроцити барана менш стійкі до механічних впливів, ніж еритроцити людини і при тривалому гіпотермічному зберіганні їх механічна стійкість знижується швидше. Вони мають високу чутливість не тільки до механічного стресу,

але й до змін осмолярності та pH середовища [11]. Такі особливості еритроцитів барана можуть бути пов'язані, як з їх дуже малими розмірами, порівняно з еритроцитами інших ссавців, так і з особливостями будови їх мембран.

Висновки. Гіпотермічне зберігання еритроцитів протягом 1 та 2 місяців приводить до зниження механічної стійкості еритроцитів. Механічна стійкість еритроцитів барана нижча, ніж еритроцитів людини, і в більшій мірі залежить від середовища інкубування.

Перспективи подальших досліджень. Необхідне подальше вивчення впливу складу консервуючого середовища та строку зберігання на механічну стійкість та осмотичні властивості еритроцитів різних ссавців для виявлення закономірностей та поглиблення уявлень про пошкодження еритроцитів при гіпотермічному зберіганні та методи їх захисту.

References

1. Tomaiuolo G, Lanotte L, D'Apolito R, Cassinese A, Guido S. Microconfined flow behavior of red blood cells. *Med Eng&Phys.* 2016; 38 (1): 11-6. doi: 10.1016/j.medengphys.2015.05.007
2. Diederich L, Suvorova T, Sansone R, Keller TCS 4th, Barbarino F, Sutton TR, et al. On the Effects of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide on Red Blood Cell Deformability. *Frontiers in Physiology.* 2018; 9: 332. doi: 10.3389/fphys.2018.00332
3. Huisjes R, Bogdanova A, van Solinge W, Lars Kaestner S, van Wijk R. Squeezing for Life – Properties of Red Blood Cell Deformability. *Frontiers in Physiology.* 2018; 9: 656. doi: 10.3389/fphys.2018.00656
4. Sosa JM, Nielsen ND, Vignes SM, Chen TG, Shevkoplyas S. The relationship between red blood cell deformability metrics and perfusion of an artificial microvascular network. *Clinical Hemorheology and Microcirculation.* 2014; 57: 291-305. doi: 10.3233/CH-131719
5. 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: 535-42. doi: 10.2450/2017.0366-16
6. Sparrow RL. Red blood cell storage duration and trauma. *Transfusion Medicine Reviews.* 2015; 29 (2): 120-6. doi: 10.1016/j.tmr.2014.09.007
7. Hess JR. Red cell storage *Journal of Proteomic.* 2010; 73 (3): 368-73. doi: 10.1016/j.jprot.2009.11.005
8. 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: 383-91. doi: 10.1111/j.1365-3148.2010.01024.x
9. Shpakova NM, Orlova NV, Nipot EE, Aleksandrova DI. Comparative study of mechanical stress effect on human and animal erythrocytes. *Fiziologichnyi zhurnal.* 2015; 61(3): 75-80. doi: 10.15407/fz61.03.075 [Ukrainian]
10. Shpakova NM, Orlova NV, Nipot EE. Dehydration of mammalian erythrocytes affects their sensitivity to mechanical stress. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine.* 2015; 25(1): 24-32. doi: 10.15407/cryo25.01.024
11. Matsuzawa T, Ikarashi Y. Haemolysis of various mammalian erythrocytes in sodium chloride, glucose and phosphate-buffer solutions. *Laboratory Animals.* 1979; 13: 329-31. doi: 10.1258/002367779780943297

УДК 57.086.13:612.111.014.43:577.352.3

ПОНИЖЕНИЕ МЕХАНИЧЕСКОЙ СТОЙКОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ГИПОТЕРМИЧЕСКОМ ХРАНЕНИИ

Головина К. Н., Боброва Е. Н., Шапкина О. А., Нипот Е. Е., Говорова Ю. С.

Резюме. В работе исследовано влияние гипотермического хранения эритроцитов человека и барана на их механическую стойкость. Отмытые эритроциты человека и барана смешивали со средой Олсвера или 5% раствором маннита в соотношении 1:1 и хранили при +4 °C до 2-х месяцев. Механический шок моделировали перемешиванием суспензии эритроцитов в течение 120 мин в емкости, заполненной пластовыми шариками. Через определенные интервалы времени проводили отбор суспензии эритроцитов для определения выхода гемоглобина из клеток. Показано, что под действием механического стресса со

временем нарастает степень повреждения клеток и гемолиз эритроцитов возрастает во всех образцах. Для контрольных эритроцитов человека среда инкубирования практически не влияет на их механическую устойчивость. Реакция эритроцитов барана на механический стресс сильно зависит от среды. Установлено, что эритроциты барана быстрее гемолизируют со временем при механическом воздействии, чем эритроциты человека. Механическая устойчивость эритроцитов человека и барана снижается после 1 месяца гипотермического хранения во всех исследованных средах. Выявлено, что при гипотермическом хранении консервирующие среды играют ключевую роль для сохранения механических свойств эритроцитов человека. Для эритроцитов человека после 1 месяца хранения механическая стойкость достоверно выше в среде Олсвера, чем в растворе маннита и со временем механического воздействия разница в уровнях гемолиза между этими средами растет. Для эритроцитов барана разница в механической стойкости для среды Олсвера и раствора маннита менее выражена. Гипотермическое хранение эритроцитов человека и барана в течение 2-х месяцев приводит к дальнейшему снижению их механической стойкости. Поэтому переливать кровь после длительного гипотермического хранения нецелесообразно, поскольку эритроциты после трансфузии могут быстро погибнуть в кровеносном русле при прохождении через капилляры и ухудшить состояние пациента.

Ключевые слова: гипотермическое хранения, эритроциты, консервирующие среды, механический стресс, гемолиз.

UDC 57.086.13:612.111.014.43:577.352.3

Decreasing of Erythrocytes Mechanical Resistance during Hypothermic Storage

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

Abstract. To carry out its task of transporting gases by vascular network erythrocytes must have a high ability to elastically deform in response to mechanical influences and to pass through narrow vessels of microcirculation.

The purpose of work was to study the influence of hypothermic storage in different media on the mechanical stability of human and ovine erythrocytes.

Material and methods. The washed human and ovine erythrocytes were mixed with an Olsver medium or 5% mannitol solution and stored at + 4 °C for up to 2 months. Mechanical shock was simulated by stirring of erythrocytes suspension for 120 min in the container filled with plastic beads. At certain intervals a selection of erythrocyte suspension was performed to determine the output of hemoglobin from the cells.

Results and discussion. The obtained results showed that under the influence of mechanical stress the degree of cell damage lowered over time and the erythrocyte hemolysis increased in all samples. The incubation medium has no effect on their mechanical stability. However, in hypothermic storage the preserving medium plays a key role in preservation of the mechanical properties of human red blood cells. Significant differences in the mechanical stability of ovine and human erythrocytes were found: the reaction of ovine erythrocytes on mechanical stress strongly depended on the incubation medium; ovine erythrocytes were more hemolyzed over time under mechanical action than human erythrocytes.

The mechanical resistance of human and ovine erythrocytes decreased after 1 month of hypothermic storage in all tested media. For human erythrocytes after 1 month of storage, the mechanical stability was significantly higher in Olsver medium than in mannitol solution, and with time of mechanical exposure, the difference in hemolysis levels between these media increased. For ovine erythrocytes the difference in mechanical resistance for Olsver medium and mannitol solution was not as pronounced as for human erythrocytes. Hypothermic storage of human and ovine erythrocytes for 2 months led to further decrease in their mechanical stability.

Conclusions. Hypothermic storage of red blood cells for 1 and 2 months led to decrease in the mechanical resistance of red blood cells. The mechanical stability of ovine erythrocytes was lower than that of human erythrocytes and was more dependent on the incubation medium.

Keywords: hypothermic storage, erythrocytes, preserving media, mechanical stress, hemolysis.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 14.04.2020 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування