and 5 females), which for 3 days were administered with doxorubicin in dosage similar to that in group I and S-ademethionine intraperitoneally in a dose of 100 mg/kg/day with a total dose of 300 mg/kg; III group (n=10) included rats (5 males and 5 females), which were injected intraperitoneally for 3 days with 0.9% sodium chloride 1 ml solution by 2 injections. Thiobarbituric acid reactants, arginine, catalase, arginase and ornithine decarboxylase activity were studied in the liver homogenate. Results. The rats of group I in the course of doxorubicin administration demonstrated the growth of the thiobarbituric acid reactants in 2.57 times ($p=0.002$) in the liver homogenate that was accompanied by 1.7-fold decreased arginase activity compared to the control group III. An inverse correlation was found between the content of thiobarbituric acid reactants and arginase activity in the liver homogenate of group I rats ($r=-0.71$; $p=0.02$). Coadministration of S-ademethionine and doxorubicin administration led to 1.4-fold increase in catalase activity in the liver homogenate of rats compared to the control ($p=0.009$) that reduced the severity of oxidative stress and prevented changes in the arginine/citrulline cycle. Conclusions: S-ademethionine combined with doxorubicin, reduces the activity of free radical oxidation by potentiating the production of antioxidant protective enzymes that prevent impairments in the arginine / citrulline cycle.

DOI 10.31718/2077-1096.20.2.161

УДК: 57.043: 547.42: 616.151.1

Рамазанов В.В., Руденко С.В., Семенченко А.Ю., Бондаренко В.А.

ЗАМОРАЖИВАНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ МОДИФИКАЦИИ СОСТАВА КРИОКОНСЕРВАНТА НА ОСНОВЕ ГЛИЦЕРИНА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Повреждения эритроцитов, происходящие при замораживании, также могут развиваться при трансфузии. Повышение концентрации свободного железа в крови при разрушении эритроцитов приводит к ускорению образования реактивных форм кислорода, перекисному повреждению клеток и стимуляции воспаления. При многократной трансфузии эритроцитов могут нарушению функции внутренних органов в результате перегрузки организма железом. Криопротекторные свойства глицерина включают в себя его коллигативную способность уменьшения концентрации NaCl при температурах ниже 0°C. Вместе с тем было выявлено, что криопротекторная эффективность глицерина была меньше, чем ожидалось от его коллигативных свойств. Повреждение эритроцитов при их быстром оттаивании является результатом осмотического шока из-за неспособности избытка внутриклеточного глицерина достаточно быстро выходить из клеток для предотвращения их набухания и гемолиза. Эти данные указывают на необходимость уменьшения концентрации глицерина в криоконсерванте. Однако для поддержания защитной эффективности криопротектора необходимо также уменьшение концентрации NaCl. В работе исследуется влияние состава криоконсерванта на гемолиз эритроцитов при замораживании и гипотермическом хранении. При этом использовали криоконсерванты: а) 38% (w/v) глицерин, 2,9% сорбитол, 0,63% NaCl (стандартный состав); б) 28% (w/v) глицерин, 6,8% сорбитол, 0,25% NaCl (модифицированный состав). Установлено, что уменьшение концентрации глицерина и увеличение концентрации сорбитола приводит к уменьшению показателей гемолиза эритроцитов. Полученные результаты позволяют предположить, что изменение состава криоконсерванта обеспечит ослабление осмотического стресса при оттаивании эритроцитов, что, в свою очередь, уменьшит их разрушение при трансфузии и вероятность развития воспаления.

Ключевые слова: эритроциты, замораживание, глицерин, осмотический стресс.

Данная работа является фрагментом темы № 121 (№ госрегистрации 0119U100441).

Повреждения эритроцитов, получаемые при замораживании или гипотермическом хранении (ГТХ), могут дополнительно развиваться после трансфузии. Повышение свободного железа в крови при разрушении эритроцитов приводит к ускорению образования активных форм кислорода, перекисному повреждению клеток и стимуляции воспаления. Поэтому постоянная трансфузия эритроцитов приводит к ухудшению функций различных органов в результате перегрузки железом, включая поджелудочную железу, сердце и печень [3, 5].

Известно, что в криозащитные свойства глицерина при замораживании эритроцитов вносит вклад его коллигативная способность снижать

концентрацию NaCl во внешней среде при температурах ниже 0°C. В то же время было установлено, что защитная эффективность глицерина оказалась меньше, чем ожидалось от коллигативных свойств данного криопротектора [9]. Повреждение эритроцитов при быстром их оттаивании является результатом осмотического шока из-за неспособности избытка внутриклеточного глицерина выходить из клеток достаточно быстро в процессе оттаивания для того, чтобы предотвратить чрезмерное набухание и гемолиз [8]. Кроме того, сам процесс глицеролиза-деглицеролиза эритроцитов без замораживания вызывает их повреждение и гемолиз [6].

Эти данные литературы указывают на необ-

ходимость снижения концентрации глицерина в криоконсерванте. Однако для сохранения защитной эффективности глицерина, согласно данным [9], необходимо снижение концентрации NaCl. При этом изменения состава криоконсерванта возможно компенсировать повышением количества непроникающего защитного компонента (сорбитол).

Цель работы – исследование гемолитических показателей при замораживании эритроцитов вследствие изменения состава криоконсерванта на основе глицерина.

Объект и методы исследования

В работе использовали NaCl (хч); глицерин, сорбитол (хч). Среды замораживания (криоконсерванты) содержали: а) 38%(w/v) глицерина, 2,9% сорбитола, 0,63% NaCl – одного из стандартных криоконсервантов [6]; б) 28%(w/v) глицерина, 6,8% сорбитола, 0,25% NaCl – модифицированного по составу криоконсерванта.

Кровь II группы, заготовленная на консерванте «глюгидир», получали на Харьковской областной станции переливания крови. Кровь центрифугировали 3000 об/мин, 5 мин, после отбора плазмы эритроциты двукратно отмывали при 3000 об/мин в течение 3 мин в 10-кратном объеме физиологического раствора соли (0,9% NaCl). Третий раз отмывали при 3000 об/мин, 5 мин, при этом гематокрит осадка эритроцитов составлял 70-74%.

Процедуру насыщения эритроцитов глицерином (глицеролизацию) осуществляли как описано в [6]. К 0,5 мл осадка эритроцитов добавляли 0,5 мл криоконсерванта капельно в течении 2 мин. Полученные образцы эритроцитов в криоконсерванте объемом 1 мл в полиэтиленовых капсулах инкубировали в течение 20 мин при 22-24°C, погружали в жидкий азот (-196°C) и выдерживали в течении 15 мин. Капсулы после замораживания переносили на водяную баню при

40°C на 3 минуты (процедура быстрого замораживания-оттаивания). После отогрева размороженные образцы переносили в пробирки, центрифугировали, надсадочную жидкость удаляли, а эритроциты подвергали процедуре деглицеролизации с использованием 6% и 0,9 % NaCl, как описано в [6].

Гипотермическое хранение эритроцитов (4°C) в течении 24 час осуществляли в среде, содержащей 7% сахарозы, 0,3% NaCl, 0,2% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 0,1% $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$.

Осмотический гемолиз эритроцитов исследовали в среде, содержащей NaCl с различной концентрацией (0,09-0,9%). Клетки в среде объемом 1мл и гематокритом 0,4%, инкубировали 30 мин при 22°C, далее центрифугировали при 3000 об/мин в течение 3 мин и в надсадочной жидкости определяли степень гемолиза при длине волны 543 нм по формуле:

степень гемолиза (%) = $[\text{ОП}_1/\text{ОП}_2] \times 100\%$,

где ОП₁ – оптическая плотность супернатанта экспериментального образца;

ОП₂ – оптическая плотность при полном гемолизе контрольного образца.

Для определения статистической достоверности результатов использовали непараметрический метод Манна-Уитни при $p < 0,05$ [1].

Результаты и обсуждение

В таблице представлены результаты потери эритроцитов на различных этапах замораживания и при гипотермическом хранении (ГТХ). Снижение концентрации NaCl и повышение концентрации сорбитола по сравнению с их содержанием в стандартном криоконсерванте [6] позволяет уменьшить концентрацию глицерина с 38 % (w/v) до 28 % (w/v). При изменении состава криоконсерванта показатели гемолиза эритроцитов уменьшались на всех этапах криоконсервирования и при ГТХ (таблица).

Таблица.
Показатели гемолиза эритроцитов при замораживании и гипотермическом хранении (ГТХ).

Образцы эритроцитов	Среда замораживания	Гемолиз в цикле замораживания-оттаивания, %	Суммарный гемолиз при оттаивании и отмывании, %	Гемолиз после ГТХ(24 часа), %
Интактные	–	–	–	0,69±0,09
Замороженные	38% Глице-рин+2,9% сорбитол+ 0,63%NaCl	4,1±0,4	16±2,0	0,96±0,1
	28% Глице-рин+6,8% сорбитол+ 0,25%NaCl	2,8±0,3	11±1,5	0,75±0,07

Меньший гемолиз остаточных эритроцитов, замороженных в модифицированном составе, при последующем ГТХ указывает на их большую осмотическую устойчивость. Кроме того, сравнительное исследование осмотического гемолиза не выявило значительной разницы в осмотической хрупкости эритроцитов, замороженных в различных криоконсервантах (рис).

Повреждение эритроцитов при замораживании связано не только с гипертоническим стрессом при концентрировании NaCl, но и с осмоти-

ческим шоком. Осмотический шок связан с неспособностью избытка внутриклеточного глицерина выходить из клеток достаточно быстро в процессе оттаивания [8].

Можно предположить, что снижение концентрации глицерина и NaCl при повышении концентрации сорбитола в среде замораживания приводит к повышению осмотической устойчивости эритроцитов на этапе оттаивания и гипотермического хранения.

Рис. Залежність гемолізу еритроцитів від концентрації NaCl, отриманих після заморожування в середовищах:
2 – 38% гліцерин+2,9% сорбітол+0,63% NaCl;
3 – 28% гліцерин+6,8% сорбітол+0,25% NaCl;
1 – для інтактних еритроцитів

Исследование повреждения эритроцитов при замораживании-оттаивании в изотонических сахарозо-солевых средах показало, что снижение концентрации NaCl при замещении на сахарозу приводит к снижению степени гемоліза. Данный результат определяется ослаблением гипертонического солевого стресса [2] и согласуется с повреждающим действием гипертонического фактора, выявленного при замораживании в различных растворах, содержащих глицерин и NaCl [8].

Для проникающего криопротектора глицерина криозащитный эффект связан с коллигативной способностью уменьшать концентрацию NaCl во внешней среде и степень дегидратации клеток, а также со снижением температуры кристаллизации [7, 9].

Эритроциты, замороженные с глицерином, имеют высокую степень сохранности при оттаивании до тех пор, пока процедура разведения криопротектора является медленной и компенсируется добавлением сорбитола. Непроницающий криопротектор сорбитол индуцирует сжатие клеток, поэтому их набухание при разведении глицерина не приводит к гемолизу [4]. Авторы работы [4] сделали заключение о том, что относительно медленная скорость, с которой глицерин покидает клетки, является основной причиной повреждения клеточных мембран. Ве-

роятно, включение в криоконсервант сорбитола позволяет снизить концентрацию глицерина и, соответственно, его отрицательный осмотический эффект.

Следовательно, полученные результаты указывают на то, что снижение в криоконсерванте концентрации глицерина и NaCl при повышении концентрации сорбитола приводит к ослаблению осмотического стресса при оттаивании замороженных эритроцитов. Это обеспечивает снижение показателей гемолиза на разных этапах замораживания и при гипотермическом хранении. Можно предположить, что при подобной разработке состава криоконсерванта модифицированный состав обеспечит невысокую степень повреждения мембран эритроцитов при размораживании и меньшее разрушение клеток после трансфузии, что уменьшит вероятность стимуляции воспаления.

Перспективы дальнейших исследований

В последующей работе планируется исследовать морфологические и биохимические характеристики эритроцитов, замороженных в модифицированном составе криоконсерванта на основе глицерина.

Литература

1. Ashmarin IP, Vasilyev IP, Ambrosov VA. Bystrye metody statisticheskoy obrabotki i planirovaniya eksperimentov [Fast statistical processing and experiment planning]. Leningrad; 1975. 76 p. (Russian)
2. Ramazanov VV, Vliyaniye kombinirovannykh sred na povrezhdeniye eritrotsytov, zamorozennykh s razlytshnym hematokritom [The effect of combined media on damage to red blood cells frozen with various hematocrit]. Problemy kriobiologii 2006; 16(1): 155–163. (Russian)
3. Aniss A, Sparrow R. Variable adhesion of different red blood cell products to activated vascular endothelium under flow conditions. Am J Hematol. 2007 Jun;82(6):439–45. doi: 10.1002/ajh.20837
4. De Loecker R, Goossens W, Van Duppen V. Osmotic effects of dilution on erythrocytes after freezing and thawing in glycerol-containing buffer. Cryobiology. 1993. Jun;30(3):279–85. doi: 10.1006/cryo.1993.1026
5. Hod E. Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation. Blood. 2010. May 27;115(21):4284–92. doi: 10.1182/blood-2009-10-245001.
6. Leikens C, Noorman F, Koning J, Truijens-de Lange R, Stekkiner P, Bakker J, Lagerberg J, Brand A, Verhoeven A. Stability after thawing of RBCs frozen with the high- and low-glycerol method. Transfusion. 2003 Feb;43(2):157–64. doi: 10.1046/j.1537-2995.2003.00293.x
7. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. Cryobiology. 1977 Jun;14(3):251–72.
8. Miller R, Mazur P. Survival of frozen-thawed human red cells as a function of cooling and warming velocities. Cryobiology. 1976 Aug;13(4):404–14.
9. Rall W, Mazur P, Souza H. Physical-chemical basis of the protection of slowly frozen human erythrocytes by glycerol. Biophys J. 1978 Jul;23(1):101–20.

Реферат

ЗАМОРОЖУВАННЯ ЕРИТРОЦИТІВ ПРИ ВНЕСЕННІ ЗМІН ДО СКЛАДУ КРІОКОНСЕРВАНТА НА ОСНОВІ ГЛІЦЕРИНУ.

Рамазанов В.В., Руденко С.В., Семенченко О.Ю., Бондаренко В.А.

Ключові слова: еритроцити, заморожування, гліцерин, осмотичний стрес.

Пошкодження еритроцитів, які відбуваються при заморожуванні, також можуть розвиватися при трансфузії. Підвищення концентрації вільного заліза в крові при руйнуванні еритроцитів приводить до прискорення виникнення реактивних форм кисню, перекисному пошкодженню клітин і стимуляції запалення. При багаторазовій трансфузії еритроцитів можуть порушуватися функції внутрішніх органів в результаті перевантаження організму залізом. Кріопротекторні властивості гліцерину включають в себе його колігативну здатність зменшення концентрації NaCl при температурах нижче 0 °C. Разом з тим

було виявлено, що кріопротекторна ефективність гліцерину була менше, ніж очікувалося від його колігативних властивостей. Пошкодження еритроцитів при їх швидкому відтаванні є результатом осмотичного шоку через нездатність надлишку внутрішньоклітинного гліцерину досить швидко виходити з клітин для запобігання їх набухання і гемолізу. Ці дані вказують на необхідність зменшення концентрації гліцерину в кріоконсерванті. Однак для підтримки захисної ефективності кріопротектори необхідно також зменшення концентрації NaCl. В роботі досліджується ефект складу кріоконсерванту на гемоліз еритроцитів при заморожуванні і гіпотермічному зберіганні. При цьому використовували кріоконсерванти: а) 38% (w / v) гліцерин, 2,9% сорбітол, 0,63% NaCl (стандартний склад); б) 28% (w / v) гліцерин, 6,8% сорбітол, 0,25% NaCl (модифікований склад). Встановлено, що зменшення концентрації гліцерину і збільшення концентрації сорбітолу призводить до зменшення показників гемолізу еритроцитів. Отримані результати дозволяють припустити, що зміна складу кріоконсерванту забезпечить ослаблення осмотичного стресу при відтаванні еритроцитів, що, в свою чергу, зменшить їх руйнування при трансфузії і ймовірність розвитку запалення.

Summary

ERYTHROCYTE FREEZING DURING THE MODIFICATION IN COMPOSITION OF CRYOCONSERVANT BASED ON GLYCEROL

Key words: red blood cells, freezing, glycerin, osmotic stress.

Ramazanov V.V., Rudenko S.V., Semenchenko A.Yu., Bondarenko V.A.

Damage to red blood cells occurring during freezing can also develop with transfusion. An increase in the concentration of free iron in the blood during the destruction of red blood cells results in an acceleration of the reactive oxygen species production, peroxide damage to cells and stimulation of inflammation. With multiple transfusions of red blood cells, the function of internal organs may be impaired as a result of iron overload. The cryoprotective properties of glycerol include its colligative ability to reduce the concentration of NaCl at temperatures below 0°C. However, it was found out that the cryoprotective efficacy of glycerol was far less than it was expected from its colligative properties. Damage to red blood cells during their rapid thawing is the result of osmotic shock due to the inability of an excess of intracellular glycerol to exit the cells quickly enough to prevent their swelling and hemolysis. These data indicate the need to reduce the glycerol concentration in the cryoconservant. However, maintaining the protective effectiveness of the cryoprotectant requires a decrease in the NaCl concentration. This study investigates the effect of the composition of the cryoconservant on erythrocyte hemolysis during freezing and hypothermic storage. We used 2 types of cryoconservants: a) 38% (w / v) glycerin, 2.9% sorbitol, 0.63% NaCl (standard composition); b) 28% (w / v) glycerol, 6.8% sorbitol, 0.25% NaCl (modified composition). It was found out that a decrease in the concentration of glycerol and an increase in the concentration of sorbitol leads to a decrease in the erythrocyte hemolysis. The results obtained suggest that a change in the composition of the cryoconservant will reduce osmotic stress during thawing of red blood cells, which, in turn, will reduce their destruction upon transfusion and the likelihood of inflammation.