

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.03.084>

УДК 612.592.111

А.К. Гулевский, Е.Е. Жаркова

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

E-mail: evzharkova92@gmail.com

Влияние низкомолекулярной фракции (до 10 кДа) на структурно-функциональные свойства эритроцитов после гипотермического хранения

Представлено академиком НАН Украины А.Н. Гольцевым

Исследовано “омолаживающее” действие низкомолекулярной фракции кордовой крови человека (до 10 кДа) на морфологию эритроцитов и сродство гемоглобина к кислороду. Показана эффективность использования реабилитирующих сред, содержащих данную фракцию, для восстановления структурно-функциональных свойств эритроцитов на основе кордовой крови.

Ключевые слова: эритроциты, гипотермическое хранение, сатурация, морфология, восстановление.

Одной из актуальных задач гематологии и трансфузиологии является сохранение структурно-функциональных свойств эритроцитов донорской крови человека при гипотермическом хранении. Как известно, нарушение основных показателей функционального состояния эритроцитов: кислородтранспортной функции, содержания АТФ и 2,3-ДФГ, происходит уже через неделю гипотермического хранения (2–4 °С) [1].

Ранее были сделаны попытки ввести в среду хранения ряд соединений: аденин [1–3], рибоксин [2], инозин [3], которые способствуют увеличению энергетического потенциала красных клеток крови. Однако их общим недостатком является то, что включаемые ингредиенты оказывают побочное действие на организм реципиента [2]. В связи с этим нами была исследована возможность использования в качестве субстанции низкомолекулярной фракции (до 10 кДа) из кордовой крови человека (НМФ ККЧ), которая способна существенно повысить энергетический потенциал клетки, имеет сбалансированный состав компонентов и не оказывает на организм животного или культуры различных тканей токсического действия [4, 5].

Таким образом, цель исследования состояла в изучении влияния НМФ ККЧ на такие структурно-функциональные свойства эритроцитов, как морфология (форма) и сатурация (сродство гемоглобина к кислороду) после гипотермического хранения в течение 21 сут.

Экспериментальная часть. К цельной донорской крови человека, консервированной на гемоконсерванте “Глюгицир”, ЦФД, ЦФДА-1 или СРДА-1, которую хранили при 4 °С в

течение 1, 7, 14 и 21 сут, добавляли НМФ ККЧ (до 10 кДа). Полученный раствор инкубировали 1 ч при 37 °С, конечная концентрация фракции и препарата сравнения в растворе составляет 0,6 мг/мл. Низкомолекулярную фракцию кордовой крови в лиофилизированном виде получали с помощью метода ультрафильтрации как описано в работе [6]. После инкубации готовили мазки, которые фиксировали по Май-Грюнвальду и окрашивали по Романовскому [7].

В каждой экспериментальной точке проверяли уровень гемолиза путем определения концентрации гемоглобина гемихромным методом [8], используя набор реактивов фирмы “Филисит-Диагностика” (Днепропетровск).

С помощью световой микроскопии проводили морфологическую оценку полученных мазков, которая включает в себя определение количества дискоцитов и эхиноцитов.

В качестве главного параметра кислородтранспортной функции определяли сатурацию — насыщенность гемоглобина кислородом, то есть процентное содержание кислорода в крови. Данные показатели определяли с помощью катриджного анализатора IL GEM Premier—3000.

Результаты и обсуждение. Согласно результатам исследования, восстановление морфологических показателей эритроцитов, а именно увеличение числа дискоцитов на 60 %, достигается при конечной концентрации НМФ ККЧ в растворе 0,6 мг/мл, что было ярко выражено на 21 сут гипотермического хранения (табл. 1).

Результаты морфологических исследований эритроцитов после гипотермического хранения на 1, 7, 14 и 21 сут и инкубации в реабилитирующей среде, содержащей НМФ ККЧ, представлены на рис. 1, а микрофотографии на показательные 21 сут — на рис. 2.

Анализ полученных данных показывает, что начиная с 7 сут гипотермического хранения при последующей инкубации в реабилитирующей среде, содержащей НМФ ККЧ (до 10 кДа), морфологические показатели крови существенно улучшаются по отношению к контролю: содержание дискоцитов возрастает в 2 раза, количество эхиноцитов снижается на 20–30 % в зависимости от сроков гипотермического хранения.

Стимулирующая способность НМФ ККЧ относительно нормализации морфологических свойств эритроцитов сохраняется вплоть до 21 сут гипотермического хранения.

Обсуждая возможные механизмы “омолаживающего” действия НМФ ККЧ на морфологию эритроцитов донорской крови человека, подверженной гипотермическому хранению, можно высказать следующие предположения. Во-первых, это может быть связано с улучшением энергетического потенциала клеток в результате стимуляции процесса гликолиза и соответствующего повышения АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах. Подобный механизм был обнаружен относительно влияния НМФ ККЧ на энергетический метаболизм в лейкоцитах донорской крови [4]. Во-вторых, не исключено, что это может быть связано с непосредственным действием компонентов, содержащихся в

Таблица 1. Содержание дискоцитов донорской крови человека после гипотермического хранения на 21 сут и инкубации в реабилитирующей среде, содержащей НМФ ККЧ

Количество дискоцитов, %	Конечная концентрация НМФ ККЧ, мг/мл
12	0
16	0,3
33	0,6
33	1,2
34	1,8

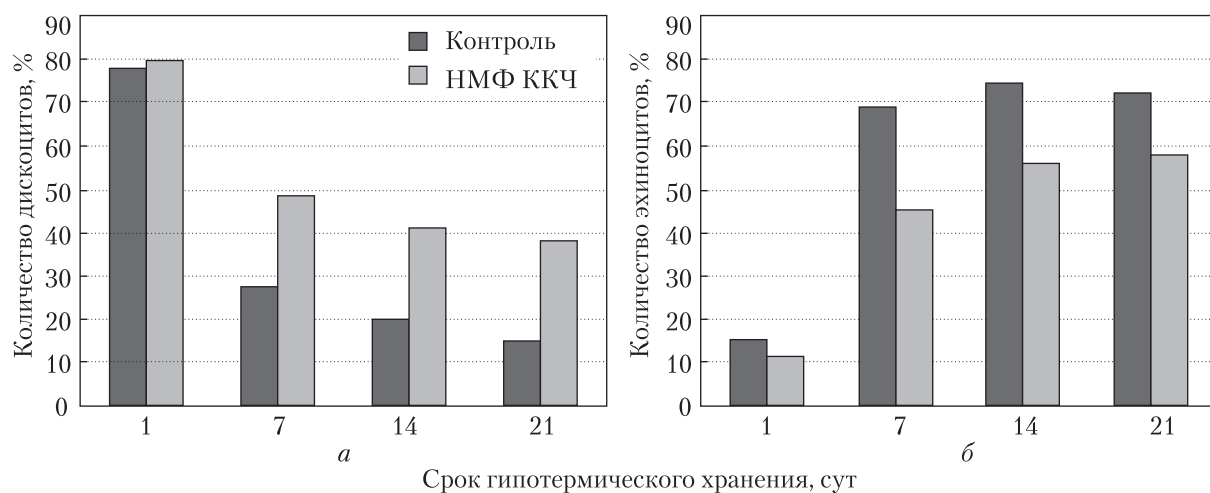


Рис. 1. Количество дискоцитов (а) и эхиноцитов (б) в зависимости от сроков гипотермического хранения и после инкубации в реабилитирующей среде, содержащей НМФ ККЧ с конечной концентрацией 0,6 мг/мл

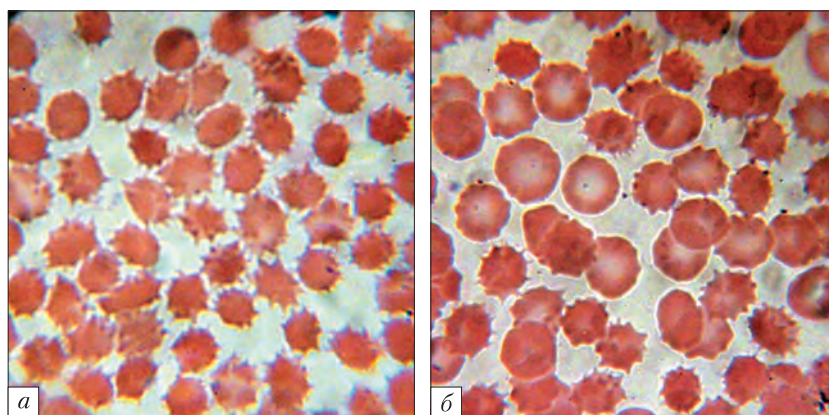


Рис. 2. Микрофотографии эритроцитов донорской крови человека на 21 сут гипотермического хранения и после инкубации в реабилитирующей среде с конечной концентрацией НМФ ККЧ 0,6 мг/мл: а – контроль; б – влияние НМФ ККЧ. Ув.: об. 100; иммерсия

Таблица 2. Влияние НМФ ККЧ (до 10 кДа) на сатурацию кислорода (%) в донорской крови человека

Срок гипотермического хранения, сут	Контроль	НМФ ККЧ
1	40	59
7	36	61
21	33	63

НМФ ККЧ, на цитоскелет эритроцитов. Такое предположение основывается на результатах наших экспериментов относительно влияния фракции на лейкоциты донорской крови с использованием цитохалазина В, который, как известно, оказывает ингибирующее действие на цитоскелет и ингибирует транспорт глюкозы в клетке путем блокирования глюкозных транспортеров семейства Glut [9, 10].

Полученные нами экспериментальные данные показывают, что степень сродства гемоглобина к кислороду в эритроцитах донорской крови, подверженных гипотермическому хранению, в контроле на 21 сут снижается на 30 %, а после инкубации в реабилитирующей среде возрастает на 30–50 % по отношению к контролю, в зависимости от сроков хранения, что сопоставимо по стимулирующей активности

с воздействием НМФ ККЧ с молекулярной массой до 5 кДа, обнаруженным нами в предыдущих исследованиях [11]. На показательные 21 сут гипотермического хранения сатурация кислорода в донорской крови возрастает в 2 раза по отношению к контролю (табл. 2).

Обнаруженный факт увеличения степени сродства гемоглобина к кислороду под влиянием НМФ ККЧ может объясняться несколькими причинами, в частности, это может быть связано с увеличением содержания АТФ и 2,3-ДФГ, регулирующих конформацию гемоглобина и реакцию присоединения кислорода к гемоглобину [12]. С другой стороны, не исключено, что в составе НМФ ККЧ присутствуют компоненты, способные самостоятельно изменять конформацию гемоглобина, в направлении увеличения его сродства к кислороду.

Таким образом, в результате проведенных исследований удалось выяснить, что НМФ ККЧ (до 10 кДа) в концентрации 0,6 мг/мл “омолаживает” морфофункциональные характеристики эритроцитов, подвергнутых гипотермическому хранению при 4 °С в течение 21 сут, что выражается в увеличении количества дискоцитов, а также повышении сродства гемоглобина к кислороду.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Виноград-Финкель Ф.Р., Дервиз Г.В., Андреева А.Г. и др. Метаболическая активность и дыхательная функция крови, консервированной на кислых глюкозо-цитратных растворах и пути усовершенствования этих растворов. *Пробл. гематологии и переливания крови*. 1974. № 7. С. 3–9.
2. Румянцев А.Г., Аграненко В.А. Клиническая трансфузиология. Москва: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1997. 575 с.
3. Valeri C. Blood banking and the use of frozen blood products. Cleveland: CRS Press, 1976. 417 p.
4. Гулевский А.К., Ахатова Ю.С., Сысоев А.А., Сысоева И.В. Стимулирующее действие низкомолекулярной фракции кордовой крови на энергетический обмен в лейкоцитах. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2014. № 7. С. 152–157. doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2014.07.152>
5. Гулевський О.К., Моїсєєва Н.М., Горіна О.Л., Ахатова Ю.С., Лаврик О.А., Трифонова А.В. Вплив низькомолекулярної фракції з кордової крові (до 5 кДа) на функціональні та біохімічні показники клітин у дослідах in vitro. *Укр. біохім. журн.* 2014. № 6. С. 167–174. doi: <http://doi.org/10.15407/ubj86.06.167>
6. Спосіб отримання низькомолекулярної фракції із кордової крові великої рогатої худоби: пат. 69652 Україна, МПК А 61 К 35/14; заявл. 12.10.2011. Опубл. 10.05.2012, Бюл. № 9.
7. Меньшиков В.В. Клиническая лабораторная аналитика. Москва: Лабиринт-РАМЛД, 1999. 352 с.
8. Пупкова В.И. Определение гемоглобина в крови. *Информационно-методическое пособие*. Кольцово, 2001. URL: http://www.technomedica.ru/site_files/docs/books/2-Pup.pdf
9. Wood T.E., Daliti S., Simpson C.D., Hurren R., Mao X., Saiz F.S., Gronda M., Eberhard Y., Minden M.D., Bilan P.J., Klip A., Batey R.A., Schimmer A.D. A novel inhibitor of glucose uptake sensitizes cells to FAS-induced cell death. *Mol. Cancer Ther.* 2008. 7, № 11. P. 3546–3555.
10. Blodgett D.M., Graybill C., Carruthers A. Analysis of glucose transporter topology and structural dynamics. *J. Biol. Chem.* 2008. 283, № 52. P. 36416–36424.
11. Гулевський А.К., Жаркова Е.Е. Восстановление морфофункциональных свойств эритроцитов донорской крови человека после гипотермического хранения. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2016. № 3. С. 93–97. doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2016.03.093>
12. Луценко М.Т., Надточий Е.В. Морфофункциональные изменения в эритроцитах периферической крови при гипоксии у больных с бронхиальной астмой. *Бюл. физиологии и патологии дыхания*. 2009. № 31. С. 12–15.

Поступило в редакцию 07.02.2019

REFERENCES

1. Vinograd-Finkel, F.R., Derviz, G.V., Andreeva, A.G. et al. (1974). Metabolic activity and respiratory function of blood preserved on acidic glucose-citrate solutions and ways to improve these solutions. *Problemy gematologii i perelivaniya krovi*, No. 7, pp. 3-9 (in Russian).

2. Rumyantsev, A.G. & Agranenko, V.A. (1997). Clinical transfusiology. Moscow: GEOTAR MEDITSINA (in Russian).
3. Valeri, C. (1976). Blood banking and the use of frozen blood products. Cleveland: CRS Press.
4. Gulevsky, O.K., Akhatova, Yu.S., Sysoev, A.A. & Sysoeva, I.V. (2014). Stimulating effect of a low-molecular fraction cord blood on the energy metabolism in leukocytes. *Dopov. Nac. acad. nauk Ukr.*, No. 7, pp. 152-157 (in Russian). doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2014.07.152>
5. Gulevsky, O.K., Moiseeva, N.M., Gorina, O.L., Akhatova, J.S., Lavrik, A.A. & Trifonova, A.V. (2014). The influence of low-molecular fraction from cord blood (below 5 kDa) on functional and biochemical parameters of cells in vitro. *Ukr. Biochem. J.*, No. 6, pp. 167-174 (in Ukrainian). doi: <http://doi.org/10.15407/ubj86.06.167>
6. Pat. 69652 Ukraine, IPC A 61 K 35/14. The method of obtaining low molecular weight fraction from cord blood of cattle, Gulevsky, O.K., Moiseeva, N.M., Abakumova, O.S., Schenyavsky, I.Y., Nikolchenko, A.Yu., Gorina, O.L., Publ. 10.05.2012.
7. Menshikov, V.V. (1999). Clinical laboratory analytics. Moscow: Labirint-RAMLD (in Russian).
8. Pupkova, V.I. (2001). Determination of hemoglobin in the blood. Koltsovo (in Russian). Retrieved from http://www.technomedica.ru/site_files/docs/books/2-Pup.pdf
9. Wood, T.E., Daliti, S., Simpson, C.D., Hurren, R., Mao, X., Saiz, F.S., Gronda, M., Eberhard, Y., Minden, M.D., Bilan, P.J., Klip, A., Batey, R.A. & Schimmer, A.D. (2008). A novel inhibitor of glucose uptake sensitizes cells to FAS-induced cell death. *Mol. Cancer Ther.*, 7, No. 11, pp. 3546-3555.
10. Blodgett, D.M., Graybill, C. & Carruthers, A. (2008). Analysis of the glucose transporter and structural dynamics. *J. Biol. Chem.*, 283, No. 52, pp. 36416-36424.
11. Gulevsky, A.K. & Zharkova, E.E. (2016). Restoration of the morphological and functional properties of erythrocytes in donated blood after hypothermic storage. *Dopov. Nac. acad. nauk Ukraine*, No. 3, pp. 93-97 (in Russian). doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2016.03.093>
12. Lutsenko, M.T. & Nadochy, E.V. (2009). Morphofunctional changes in erythrocytes of peripheral blood at hypoxia in patients with bronchial asthma. *Byulleten fiziologii i patologii dyhaniya*, No. 31, pp. 12-15 (in Russian).

Received 07.02.2019

О.К. Гулевський, Е.Е. Жаркова

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків
E-mail: evzharkova92@gmail.com

ВПЛИВ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНОЇ ФРАКЦІЇ (ДО 10 кДа)
КОРДОВОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ
ВЛАСТИВОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ ПІСЛЯ ГІПОТЕРМІЧНОГО ЗБЕРІГАННЯ

Досліджено дію “омолодження” низькомолекулярної фракції кордової крові людини (до 10 кДа) на морфологію еритроцитів та спорідненість гемоглобіну до кисню. Показано ефективність використання реабілітуючих середовищ, що містять дану фракцію, для відновлення структурно-функціональних властивостей еритроцитів на основі кордової крові.

Ключові слова: еритроцити, гіпотермічне зберігання, сатурація, морфологія, відновлення.

A.K. Gulevsky, Ye.Ye. Zharkova

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkiv
E-mail: evzharkova92@gmail.com

THE EFFECT OF THE LOW MOLECULAR WEIGHT FRACTION
(UP TO 10 kDa) OF HUMAN CORD BLOOD ON THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL
PROPERTIES OF ERYTHROCYTES AFTER HYPOTHERMIC STORAGE

The “rejuvenating” effect of the low molecular weight fraction cord blood (below 10 kDa) on the erythrocyte morphology and the affinity of hemoglobin to oxygen is investigated. The efficiency of using the rehabilitating media containing this fraction to restore the structural and functional properties of red blood cells based on cord blood is shown.

Keywords: erythrocytes, hypothermic storage, saturation, morphology, recovery.