

<https://doi.org/10.35339/ekm.2020.88.03.02>

УДК 57.043: 616.155.1: 547.42/43

В.В. Рамазанов, Е.Л. Воловельская, А.Ю. Семенченко, В.А. Бондаренко

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
г. Харьков, Украина*

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ РАЗВИТИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА ПРИ ТРАНСФУЗИИ ЭРИТРОЦИТОВ

Проведен обзор литературы с целью определения возможных методических процедур, необходимых для повышения устойчивости эритроцитов к повреждающим факторам гипотермического хранения и криоконсервирования, с целью уменьшения разрушения клеток в организме после трансфузии и предупреждения развития воспалительного процесса. Трансфузия эритроцитов при геморрагическом шоке у пациентов с травмой или при операциях приводит к развитию посттрансфузионного воспаления. При трансфузии криоконсервированных эритроцитов показан более низкий воспалительный ответ по сравнению с применением эритроцитов, хранившихся в гипотермических условиях. Криоконсервирование эритроцитов позволяет сохранить некоторые структурные и биохимические характеристики клеток и избежать накопления метаболитических продуктов распада. Вместе с тем, при замораживании эритроцитов в средах с глицерином отмечаются повреждения мембран, которые усугубляются при деглицеролизации клеток. Кроме того, данные повреждения претерпевают дальнейшее развитие при трансфузии, что приводит к внутрисосудистому гемолизу, а также к внесосудистому разрушению эритроцитов в печени и селезенке. Это вызывает повышение уровня несвязанного железа в системе циркуляции крови, стимуляцию окислительного стресса и воспаления, повреждение клеток и нарушение функций внутренних органов. Представленные данные литературы указывают на необходимость стимуляции антиоксидантного потенциала эритроцитов при гипотермическом хранении или замораживании. Данная стимуляция, возможно, приведет к повышению устойчивости эритроцитов к повреждающим факторам замораживания–оттаивания и ограничению повреждений клеточных мембран. Это обеспечит уменьшение степени разрушения эритроцитов в организме после трансфузии и замедлит развитие окислительного стресса и воспаления.

Ключевые слова: эритроциты, гипотермическое хранение, криоконсервирование, трансфузия, воспаление, глицерин.

Переливание эритроцитов является распространенным методом лечения состояний, которые включают острую кровопотерю, нарушение продукции эритроцитов или их повышенное разрушение [1–3]. Безопасность и эффективность переливания эритроцитов зависит от срока гипотермического хранения (ГТХ) и является актуальной проблемой, которая в определенной степени решается использованием криоконсервированных эритроцитов [1, 4–6]. Трансфузия ГТХ-эритроцитов пациентам с геморрагическим шоком (тяже-

лая травма, операция на сердце) приводит к росту уровней провоспалительных цитокинов в крови и вызывает развитие посттрансфузионного воспаления [6–8]. Было сделано предположение, что освобождение ионов железа при разрушении поврежденных эритроцитов в макрофагах селезенки и печени инициирует провоспалительный ответ через влияние активных форм кислорода (АФК) на активацию инфламмасом [9]. Повышение свободного железа в крови приводит к ускорению образования АФК и перекисному повреждению

клеток. Поэтому многократная трансфузия эритроцитов приводит к нарушению функционирования внутренних органов в результате перегрузки организма железом [10–12]. Неблагоприятные клинические последствия при трансфузии эритроцитов у пациентов с травмой или при операциях могут определяться свободным гемоглобином, который является одним из основных медиаторов воспаления и тромботических осложнений [8, 13, 14]. При гемолизе высвобожденный в плазму гемоглобин окисляется в метгемоглобин, который также стимулирует образование АФК, окислительный стресс и повреждение клеточных мембран, включая эритроцитарные [13, 15]. Кроме того, свободный гемоглобин связывает оксид азота (NO) и снижает биодоступность NO к эндотелию сосудов, что вызывает гипертензию, агрегацию тромбоцитов и воспалительные реакции, которые приводят к ишемии и повреждению органов и тканей [16]. Трансфузия криоконсервированных эритроцитов более эффективна и безопасна, чем ГТХ-эритроцитов, что было выявлено у категории пациентов с травмами. Отмечался более низкий воспалительный ответ, меньшая активация фибринолитической системы и повышение уровня 2,3-ДФГ после переливания криоконсервированных эритроцитов [5, 17, 18].

При трансфузии аутологичных криоконсервированных эритроцитов здоровым добровольцам выявлено отсутствие воспалительного эффекта, хотя отмечался быстрый гемолиз [19]. При переливании криоконсервированных эритроцитов уровень свободного гемоглобина в плазме и степень гемолиза были ниже, чем при трансфузии ГТХ-эритроцитов. Криоконсервированные эритроциты по сравнению с ГТХ-эритроцитами способствуют повышению уровня оксигенации периферических тканей у пациентов с травмами. В то же время, это не улучшает негативные клинические последствия у категории пациентов с травмами, страдающими ожирением (нарушение метаболизма и процесса заживления, инфекционные осложнения и летальность) [20]. Кроме того, при трансфузии и тех и других эритроцитов, значительная часть клеток разрушается в течение 24 часов (~25 %) [9, 18]. Поэтому негативные последствия гемолиза при трансфузии криоконсервированных эритроцитов могут быть такими же, как при переливании ГТХ-эритроцитов.

Негативные последствия трансфузии эритроцитов определяются их повреждениями при

выделении из цельной крови и последующего ГТХ, а также при замораживании. При ГТХ эритроцитов отмечается энергетическое истощение, которое приводит к изменению катионного гомеостаза и окислительно-восстановительного метаболизма. Нарастание окислительного стресса приводит к окислению белков (карбонилирование, нитрование) и липидов (перекисное окисление). Происходит изменение морфологии и реологии эритроцитов с сопутствующим накоплением мембранных микрочастиц, которые высвобождаются в супернатант. При трансфузии ГТХ-эритроцитов микровезикулы поглощают NO и стимулируют развитие воспаления и тромбоза. Экспозиция фосфатидилсерина (ФС) на внешней поверхности мембран эритроцитов при длительном ГТХ является одной из причин адгезии клеток к эндотелию, что вносит вклад в торможение кровотока, ухудшение оксигенации и перфузии тканей [1, 6, 21, 22]. Необходимо отметить, что криоконсервирование эритроцитов в среде с глицерином не вызывает микровезикуляции мембран и изменение уровня экспозиции ФС [23]. Кроме того, установлено, что действие глицерина на эритроциты при инкубации в течение 24 часов при 37°C не влияет на их способность контролировать асимметричное трансмембранное распределение ФС [24].

Весомая доля осложнений, которые возникают при переливании ГТХ-эритроцитов при нормальном уровне 2,3-ДФГ и АТФ, связана с нарушением в системе нитрозотиолов из-за недостатка глутатиона [21, 25]. При ГТХ отмечается снижение уровня глутатиона и нитрозоглутатиона, которые необходимы для нитрозилирования белков, включая гемоглобин и белки цитоскелета. Снижение степени нитрозилирования α и β -спектринов вызывает нарушение деформируемости эритроцитов. Уменьшение уровня нитрозогемоглобина ингибирует поставку NO гемоглобином в микрососудах. Все в сумме приводит к ослаблению способности эритроцитов при трансфузии производить гипоксическую вазодилатацию, улучшение гемодинамики и оксигенацию тканей [6, 21, 26]. Вместе с тем при включении субстратов синтеза глутатиона (глутамин, глицин и N-ацетил-цистеин) в ГТХ-среду, установлено, что данные субстраты способствуют увеличению уровня глутатиона, уменьшению степени окисления гемоглобина и снижению потерь мембранных белков (полосы: 3, 4.1, 4.2) [27]. Окислительное повреждение

эритроцитов при ГТХ было меньше, если до сдачи крови доноры принимали в течение 10 дней смесь антиоксидантов [28]. Эти данные указывают на то, что эритроциты в норме при циркуляции подвергаются окислительному стрессу, который понижает их максимальный антиоксидантный потенциал. Кроме того, улучшение метаболического статуса эритроцитов перед криоконсервированием (повышение уровня АТФ), позволяет продлить срок ГТХ размороженных эритроцитов от 14 до 35 дней [29].

Показано, что при замораживании ядро-содержащих клеток кордовой крови добавление N-ацетилцистеина (N-АЦ) в среды с ДМСО приводило к уменьшению количества клеток с избыточным содержанием АФК и увеличению показателей их сохранности и жизнеспособности на этапе эквilibрации с криопротектором, а также после замораживания–оттаивания клеточных образцов. Максимальный эффект был достигнут после добавления N-АЦ к средам с концентрацией ДМСО – 7,5 и 10 % [30]. Увеличение количества клеток с избыточным содержанием АФК при возрастании концентрации ДМСО [30], вероятно, связано с ингибированием антиоксидантной системы данным криопротектором [31]. В связи с этим необходимо отметить, что инкубация эритроцитов в криоконсерванте с глицерином, а также криоконсервирование и последующее ГТХ не вызывали активации образования АФК [32]. При криоконсервировании спермы кролика установлено, что включение глутамин в среду замораживания значительно улучшало подвижность сперматозоидов и целостность мембран, приводило к ингибированию перекисного окисления липидов в замороженно-отогретых сперматозоидах. Кроме того, отмечалось увеличение содержания глутатиона и активности γ -глутамилцистеинсинтетазы и глутатионпероксидазы с сопутствующим снижением уровня АФК, как до замораживания, так и после оттаивания [33]. Представленные выше данные литературы указывают на то, что субстраты синтеза глутатиона и АТФ могут стимулировать повышение энергетического и антиоксидантного потенциала клеток на этапе прединкубации перед замораживанием.

Криоконсервирование эритроцитов в среде, содержащей глицерин может осуществляться двумя основными методами: 1-й – при -80°C с использованием в клеточных образцах высокого содержания глицерина (40 %, HGM-метод); 2-й – при -196°C с использова-

нием в клеточных образцах относительно невысокой концентрации глицерина (19–20 %, LGM-метод) [18, 34, 35]. Необходимо отметить, что состав криоконсерванта в LGM-методе включает сорбитол, который является непроникающим криопротектором [36], тогда как состав HGM-метода не содержит сорбитола [35]. В настоящее время эритроциты, криоконсервированные HGM-методом, разрешены к использованию после хранения до 10 лет при -80°C и доступны в течение 14 дней после оттаивания и деглицеролизации при использовании автоматизированной и функционально закрытой системы отмывания эритроцитов (АСР 215, Haemonetics). Данная система способствует сокращению времени глицеролизации и деглицеролизации клеточных образцов и решению проблемы бактериального загрязнения отмываемых эритроцитов [35]. Преимуществом криоконсервирования является обеспечение запаса эритроцитов редких групп крови, а также их заготовка для условий, которые характеризуются непредсказуемыми потребностями компонентов крови (военные действия, аварии, катастрофы) [17, 37].

Показана большая стабильность эритроцитов, замороженных HGM-методом, на 7-е сутки ГТХ, по сравнению с клетками, замороженными LGM-методом [35]. Авторы данной работы заключили, что этот результат отражает лучшую криопротекцию эритроцитов при замораживании HGM-методом. С другой стороны, отмывание размороженных эритроцитов при HGM-методе дает больший гемолиз $[(10 \pm 2) \text{ \%}]$ по сравнению с LGM-методом $[(4,4 \pm 1) \text{ \%}]$. При ГТХ эритроцитов от 7 до 36 дней при использовании методов HGM и LGM отмечается подобная динамика нарастания гемолиза до 5–7 % [35]. Данный результат указывает на нестабильность эритроцитов, которая приведет к более выраженному гемолизу после трансфузии. Посттрансфузионные воздействия на эритроциты дополнительно усиливают повреждения, получаемые при ГТХ или замораживании [38]. Суточная потеря замороженных эритроцитов при трансфузии составляет $\sim 25 \text{ \%}$ (HGM-метод) [18]. При замораживании в криоконсерванте на основе 1,2-пропандиола потеря эритроцитов после трансфузии составляет 18 % [39]. Большая устойчивость эритроцитов во втором случае, вероятно, связана с тем, что при размораживании клетки испытывают меньший осмотический стресс и меньше поврежде-

даются, так как коэффициент проницаемости мембран для 1,2-ПД на два порядка выше, чем для глицерина [40].

Хранение эритроцитов в замороженном состоянии потенциально сводит к минимуму повреждения, которые отмечаются при ГТХ [1, 4, 23]. Криоконсервирование эритроцитов обеспечивает сохранение основных маркеров метаболизма независимо от состава криоконсерванта (2,3-ДФГ, АТФ и глутатион) [35, 41–45]. Вместе с тем используемые технологии криоконсервирования эритроцитов приводят к ускорению их повреждения после размораживания, что связано с нарушениями в клеточных мембранах [4, 35]. Выявляется ускоренное снижение концентрации метаболитических маркеров после размораживания и отмывания эритроцитов, что особенно отмечается для 2,3-ДФГ [35].

Показано, что при криоконсервировании эритроцитов НГМ-методом в течение 12 недель уровни 2,3-ДФГ и АТФ не изменялись, при этом концентрация натрия в клетках увеличивалась, а калия снижалась. Средний клеточный объем эритроцитов был выше и отмечалось изменение деформируемости и уменьшение вязкости клеток. Активность NO-синтазы, степень фосфорилирования и уровень нитрования белков не изменялись в ходе криоконсервирования [44]. Авторы данной работы сделали заключение о том, что при криоконсервировании сохраняется метаболитическая функция эритроцитов, но структура мембран изменяется. Вероятно, основной причиной негатива НГМ- и LGM-методов является ослабление защитной эффективности глицерина на стадии оттаивания эритроцитов в результате осмотического шока из-за способности избытка внутриклеточного глицерина выходить из клеток достаточно быстро, предотвращая поступление воды и набухание [4]. Подобный вывод был сделан в экспериментах при разведении размороженных эритроцитов средой с сорбитолом. Данный непроницающий криопротектор индуцирует сжатие клеток, поэтому их набухание при разведении глицерина может не приводить к гемолизу. Однако быстрое разбавление глицерина буфером, содержащим сорбитол, провоцирует значительный гемолиз эритроцитов. Относительно медленная скорость, с которой глицерин покидает клетки, является основной причиной повреждения клеточных мембран [36]. Включение в криоконсервант сорбитола в концентрации 2,9 % позволяет снизить содержа-

ние глицерина в образцах эритроцитов от 40 % (НГМ-метод) до 19–20 % (LGM-метод). Однако данная модификация состава криоконсерванта не обеспечивает большую стабильность и снижение уровней потери 2,3-ДФГ и АТФ в размороженных эритроцитах [35].

Представленные данные литературы [4, 35, 36, 44] указывают на необходимость разработки состава криоконсерванта, который будет способствовать повышению устойчивости эритроцитов к осмотическому стрессу при оттаивании и отмывании. Подобные криоконсерванты могут быть комбинированными и содержать проникающие и непроницающие криопротекторы [41–43].

Следовательно, при геморрагическом шоке у пациентов с травмой или при операциях массивная трансфузия эритроцитов после гипотермического хранения может вызывать посттрансфузионное воспаление с нарушением функционирования внутренних органов. Данные патологии развиваются вследствие разрушения эритроцитов, перегрузки организма железом, окислительного стресса, снижения биодоступности оксида азота и воспаления. При трансфузии криоконсервированных эритроцитов показано, что они более безопасны и эффективны и инициируют более низкий воспалительный ответ по сравнению с эритроцитами после гипотермического хранения. Хранение эритроцитов в замороженном состоянии, по сравнению с гипотермическим хранением, обеспечивает сохранение главных метаболитических маркеров – 2,3-ДФГ, АТФ и глутатиона, однако после размораживания отмечается потеря данных маркеров и особенно 2,3-ДФГ. Это, вероятно, связано с тем, что при замораживании–оттаивании–деглицеролизации эритроцитов отмечается повреждение мембран и, как следствие, нарушение катионного баланса и изменение объема клеток. Основной причиной повреждения мембран является недостаточная защитная эффективность криоконсерванта, которая определяется неспособностью избытка внутриклеточного глицерина выходить из клеток достаточно быстро в процессе оттаивания, предотвращая поступление воды и набухание эритроцитов.

Выводы

Данные литературы указывают на необходимость стимуляции антиоксидантного потенциала эритроцитов перед гипотермическим хранением и криоконсервированием. Кроме того, необходима разработка комбинирован-

ного криоконсерванта, который может включать непроникающий криопротектор. Это позволит снизить концентрацию проникающего криопротектора, что обеспечит ослабление осмотического стресса при размораживании. Указанные методические процедуры, вероятно, приведут к повышению устойчивости эритроцитов к повреждающим факторам гипотермического хранения и замораживания–оттаивания, а так же ограничению повреждений клеточных мембран. Это обеспечит уменьшение степени разрушения эритроцитов в организме после трансфузии, и предупредит развитие окислительного стресса и воспаления.

роцитов к повреждающим факторам гипотермического хранения и замораживания–оттаивания, а так же ограничению повреждений клеточных мембран. Это обеспечит уменьшение степени разрушения эритроцитов в организме после трансфузии, и предупредит развитие окислительного стресса и воспаления.

Литература

1. Red blood cell storage time and transfusion: current practice, concerns and future perspectives / M. Garcia-Roa, M. Del Carmen Vicente-Ayuso, A. M. Bobes [et al.] // *Blood Transfus.* – 2017. – Vol. 15, № 3. – P. 222–231. – DOI: 10.2450/2017.0345-16.
2. Liu C. Red blood cell transfusion for hematologic disorders / C. Liu, B. J. Grossman // *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* – 2015. – Vol. 2015, Issue 1. – P. 454–461. – DOI: 10.1182/asheducation-2015.1.454.
3. Sharma S. Transfusion of blood and blood products: indications and complications / S. Sharma, P. Sharma, L. N. Tyler // *Am Fam Physician.* – 2011. – Vol. 83, № 6. – P. 719–724.
4. Cryopreserved packed red blood cells in surgical patients: past, present, and future / A. Chang, Y. Kim, R. Hoehn [et al.] // *Blood Transfus.* – 2017. – Vol. 15, № 4. – P. 341–347. – DOI: 10.2450/2016.0083-16.
5. Cryopreserved red blood cells are superior to standard liquid red blood cells / D. A. Hampton, C. Wiles, L. J. Fabricant [et al.] // *J Trauma Acute Care Surg.* – 2014. – Vol. 77, № 1. – P. 20–27. – DOI: 10.1097/TA.0000000000000268.
6. Yoshida T. Red blood cell storage lesion: causes and potential clinical consequences / T. Yoshida, M. Prudent, A. D'alessandro // *Blood Transfus.* – 2019. – Vol. 17, № 1. – P. 27–52. – DOI: 10.2450/2019.0217-18.
7. Very early posttraumatic serum alterations are significantly associated to initial massive RBC substitution, injury severity, multiple organ failure and adverse clinical outcome in multiple injured patients / V. Bogner, L. Keil, K. G. Kanz [et al.] // *Eur J Med Res.* – 2009. – Vol. 14, № 7. – P. 284–291.
8. Valeri C. R. An approach to prevent the severe adverse events associated with transfusion of FDA-approved blood products / C. R. Valeri, G. Ragno // *Transfus Apher Sci.* – 2010. – Vol. 42, № 3. – P. 223–233. – DOI: 10.1016/j.transci.2009.08.001.
9. Spitalnik S. L. Stored red blood cell transfusions: iron, inflammation, immunity, and infection / S. L. Spitalnik // *Transfusion.* – 2014. – Vol. 54, № 10. – P. 2365–2371. – DOI: 10.1111/trf.12848.
10. Dreyfus F. The deleterious effects of iron overload in patients with myelodysplastic syndromes / F. Dreyfus // *Blood Rev.* – 2008. – Vol. 22, Suppl. 2. – P. S29–S34. – DOI: 10.1016/S0268-960X(08)70006-7.
11. Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation / E. A. Hod, N. Zhang, S. A. Sokol [et al.] // *Blood.* – 2010. – Vol. 115, Issue 21. – P. 4284–4292. – DOI: 10.1182/blood-2009-10-245001.
12. Thuret I. Post-transfusional iron overload in the haemoglobinopathies / I. Thuret // *Comptes Rendus Biologies.* – 2013. – Vol. 336, № 3. – P. 164–172. – DOI: 10.1016/j.crvi.2012.09.010.
13. Grimshaw K. New frontiers in transfusion biology: identification and significance of mediators of morbidity and mortality in stored red blood cells / K. Grimshaw, J. Sahler, S. L. Spinelli // *Transfusion.* – 2011. – Vol. 51, № 4. – P. 874–880. – DOI: 10.1111/j.1537-2995.2011.03095.x.
14. Pediatric Critical Care Blood Research Network (Blood Net). Mechanisms of red blood cell transfusion-related immunomodulation / K. E. Remy, M. W. Hall, J. Cholette [et al.] // *Transfusion.* – 2018. – Vol. 58, № 3. – P. 804–815. – DOI: 10.1111/trf.14488.
15. Balaji S. N. Extracellular Methemoglobin Mediated Early ROS Spike Triggers Osmotic Fragility and RBC Destruction: An Insight into the Enhanced Hemolysis During Malaria / S. N. Balaji, V. Trivedi // *Indian J Clin Biochem.* – 2012. – Vol. 27, № 2. – P. 178–185. – DOI: 10.1007/s12291-011-0176-5.
16. Lei C. Perioperative Red Blood Cell Transfusion: What We Do Not Know / C. Lei, L. Z. Xiong // *Chin Med J (Engl).* – 2015. – Vol. 128, № 17. – P. 2383–2386. – DOI: 10.4103/0366-6999.163384.
17. Transfusion of cryopreserved packed red blood cells is safe and effective after trauma: a prospective randomized trial / M. A. Schreiber, B. H. McCully, J. B. Holcomb [et al.] // *Ann Surg.* – 2015. – Vol. 262, № 3. – P. 426–433.

18. 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 [et al.] // *Transfusion*. – 2001. – Vol. 41, № 7. – P. 928–932.
19. Hult A. Transfusion of cryopreserved human red blood cells into healthy humans is associated with rapid extravascular hemolysis without a proinflammatory cytokine response / A. Hult, C. Malm, P. Oldenborg // *Transfusion*. – 2012. – Vol. 53. – P. 28–33.
20. The effects of cryopreserved red blood cell transfusion on tissue oxygenation in obese trauma patients / B. H. McCully, S. J. Underwood, L. Kiraly [et al.] // *J Trauma Acute Care Surg*. – 2018. – Vol. 84, № 1. – P. 104–111. – DOI: 10.1097/TA.0000000000001717.
21. An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies / A. D'Alessandro, A. G. Kriebardis, S. Rinalducci [et al.] // *Transfusion*. – 2015. – Vol. 55, № 1. – P. 205–219. – DOI: 10.1111/trf.12804.
22. Hess J.R. Measures of stored red blood cell quality / J. R. Hess // *Vox Sang*. – 2014. – Vol. 107. – P. 1–9.
23. The effects of cryopreservation on red blood cell microvesiculation, phosphatidylserine externalization, and CD47 expression / J. L. Holovati, K. A. Wong, J. M. Webster [et al.] // *Transfusion*. – 2008. – Vol. 48. – P. 1658–1668.
24. Землянских Н. Г. Регуляция асимметричного распределения липидов в мембране эритроцитов человека в присутствии глицерина и полиэтиленгликоля / Н. Г. Землянских // *Цитология*. – 2020. – Т. 62, № 2. – С. 1–9.
25. The effects of long-term storage of human red blood cells on the glutathione synthesis rate and steady-state concentration / S. Whillier, J. E. Raftos, R. L. Sparrow [et al.] // *Transfusion (Paris)*. – 2011. – Vol. 51, № 7. – P. 1450–1459.
26. Microcirculation and red cell transfusion in patients with sepsis / O. Wendelbo, T. Hervig, O. Haugen [et al.] // *Transfus Apher Sci*. – 2017. – Vol. 56, № 6. – P. 900–905. – DOI: 10.1016/j.transci.2017.11.020.
27. Glutathione protects chemokine-scavenging and antioxidative defense functions in human RBCs / U. J. Dumaswala, L. Zhuo, S. Mahajan [et al.] // *Am J Physiol Cell Physiol*. – 2001. – Vol. 280, № 4. – P. C867–C873. – DOI: 10.1152/ajpcell.2001.280.4.C867.
28. Greenwalt T. J. Recent developments in the long-term preservation of red blood cells / T. J. Greenwalt // *Curr Opin Hematol*. – 1997. – Vol. 4, № 6. – P. 431–435. – DOI: 10.1097/00062752-199704060-00013.
29. Lelkens C. C. The effect of prefreeze rejuvenation on postthaw storage of red blood cells in AS-3 and SAGM / C. C. Lelkens, J. W. M. Lagerberg, D. de Korte // *Transfusion*. – 2017 – Vol. 57, № 6. – P. 1448–1458. – DOI: 10.1111/trf.14093.
30. Оптимізація методу кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові людини з використанням комбінації кріопротектора ДМСО та антиоксиданту N-ацетил-L-цистеїну / О. Э. Макашова, Л. О. Бабійчук, О. Л. Зубова [та ін.] // *Проблемы криобиологии и криомедицины*. – 2016. – Т. 26, № 4. – С. 295–307.
31. Assessing the toxic effects of DMSO on cord blood to determine exposure time limits and the optimum concentration for cryopreservation / L. J. Fry, S. Querol, S. G. Gomez [et al.] // *Vox Sang*. – 2015. – Vol. 109, Issue 2. – P. 181–190. – DOI: 10.1111/vox. 12267.
32. Землянских Н. Г. Образование активных форм кислорода в эритроцитах человека при криоконсервировании с глицеролом и полиэтиленгликолем / Н. Г. Землянских, Л.А. Бабийчук // *Биофизика*. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 706–715.
33. Glutamine protects rabbit spermatozoa against oxidative stress via glutathione synthesis during cryopreservation / Z. Zhu, X. Fan, Y. Lv [et al.] // *Reprod Fertil Dev*. – 2017. – Vol. 29, № 11. – P. 2183–2194. – DOI: 10.1071/RD17020.
34. Utilization and quality of cryopreserved red blood cells in transfusion medicine / S. Henkelman, F. Noorman, J. F. Badloe [et al.] // *Vox Sang*. – 2015. – Vol. 108, № 2. – P. 103–112. – DOI: 10.1111/vox.12218.
35. Stability after thawing of RBCs frozen with the high- and low-glycerol method / C. C. Lelkens, F. Noorman, J. G. Koning [et al.] // *Transfusion*. – 2003. – Vol. 43, № 2. – P. 157–164.
36. De Loecker R. Osmotic effects of dilution on erythrocytes after freezing and thawing in glycerol-containing buffer / R. De Loecker, W. Goossens, V. Van Duppen // *Cryobiology*. – 1993. – Vol. 30, № 3. – P. 279–285.

37. Nationwide analysis of cryopreserved packed red blood cell transfusion in civilian trauma / K. Hanna, M. Chehab, L. Bible [et al.] // *J Trauma Acute Care Surg.* – 2020. – Vol. 89, Issue 5. – P. 861–866. – DOI: 10.1097/TA.0000000000002711.
38. Stored red blood cell susceptibility to in vitro transfusion-associated stress conditions is higher after longer storage and increased by storage in saline-adenine-glucose-mannitol compared to AS-1/ D. Mittag, A. Sran, K. S.Chan [et al.] // *Transfusion.* – 2015. – Vol. 55, № 9. – P. 2197–2206. – DOI: 10.1111/trf.13138.
39. Лечебная эффективность эритроцитов, криоконсервированных под защитой препарата «Пропандиосахароль» / В. М. Гучок, А. М. Воротилин, В. И. Луговой [и др.] // *Проблемы криобиологии.* – 1994. – № 4. – С. 44–47.
40. Гордиенко Е. А. Определение коэффициентов проницаемости мембран эритроцитов для криопротекторов / Е. А. Гордиенко, Ю. Е. Панина, И. Ф. Коваленко / *Біофізичний вісник.* – 1998. – № 422. – С. 59–64.
41. Свойство эритроцитов, замороженных в среде с полиэтиленгликолем и 1,2-пропандиолом / В. В. Рамазанов, Е. Л. Воловельская, В. А. Коптелов [и др.] // *Вісник проблем біології і медицини.* – 2014. – Т. 2, Вип. 3. – С. 230–236.
42. Рамазанов В. В. Криозащитная эффективность комбинированной среды с непроникающим и проникающим криопротекторами при замораживании эритроцитарных суспензий различного объема / В. В. Рамазанов // *Проблемы криобиологии.* – 2013. – Т. 23, №2 – С. 124–134.
43. 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.
44. Cryopreservation of red blood cells: Effect on rheologic properties and associated metabolic and nitric oxide related parameters / D. A. Bizjak, P. Jungen, W. Bloch [et al.] // *Cryobiology.* – 2018. – Vol. 84. – P. 59–68. – DOI: 10.1016/j.cryobiol.2018.08.001.
45. Red blood cell phenotype fidelity following glycerol cryopreservation optimized for research purposes / S. C. Rogers, L. B. Dosier, T. J. McMahon [et al.] // *PLoS One.* – 2018. – Vol. 13, Issue 12. – e0209201. – DOI: 10.1371/journal.pone.0209201.

References

1. Garcia-Roa M., Del Carmen Vicente-Ayuso M., Bobes A.M. et al. (2017). Red blood cell storage time and transfusion: current practice, concerns and future perspectives. *Blood Transfus*, vol. 15 (3), pp. 222–231, DOI: 10.2450/2017.0345-16.
2. Liu C., Grossman B.J. (2015). Red blood cell transfusion for hematologic disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, vol. 2015, issue 1, pp. 454–461, DOI: 10.1182/asheducation-2015.1.454.
3. Sharma S., Sharma P., Tyler L.N. (2011). Transfusion of blood and blood products: indications and complications. *Am Fam Physician*, vol. 83 (6), pp. 719–724.
4. Chang A., Kim Y., Hoehn R., Jernigan P., Pritts T. (2017). Cryopreserved packed red blood cells in surgical patients: past, present, and future. *Blood Transfus*, vol. 15 (4), pp. 341–347, DOI: 10.2450/2016.0083-16.
5. Hampton D.A., Wiles C., Fabricant L.J. et al. (2014). Cryopreserved red blood cells are superior to standard liquid red blood cells. *J Trauma Acute Care Surg*, vol. 77 (1), pp. 20–27, DOI: 10.1097/TA.0000000000000268.
6. Yoshida T., Prudent M., D'alessandro A. (2019). Red blood cell storage lesion: causes and potential clinical consequences. *Blood Transfus*, vol. 17 (1), pp. 27–52, DOI: 10.2450/2019.0217-18.
7. Bogner V., Keil L., Kanz K.G. et al. (2009). Very early posttraumatic serum alterations are significantly associated to initial massive RBC substitution, injury severity, multiple organ failure and adverse clinical outcome in multiple injured patients. *Eur J Med Res*, vol. 14 (7), pp. 284–291.
8. Valeri C.R., Ragno G. (2010). An approach to prevent the severe adverse events associated with transfusion of FDA-approved blood products. *Transfus Apher Sci*, vol. 42 (3), pp. 223–233, DOI: 10.1016/j.transci.2009.08.001.
9. Spitalnik S.L. (2014). Stored red blood cell transfusions: iron, inflammation, immunity, and infection. *Transfusion*, vol. 54 (10), pp. 2365–2371, DOI: 10.1111/trf.12848.
10. Dreyfus F. (2008). The deleterious effects of iron overload in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood Rev*, vol. 22, suppl. 2, pp. S29–S34, DOI: 10.1016/S0268-960X(08)70006-7.

11. Hod E.A., Zhang N., Sokol S.A. et al. (2010). Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation. *Blood*, vol. 115 (21), pp. 4284–4292, DOI: 10.1182/blood-2009-10-245001.
12. Thuret I. (2013). Post-transfusional iron overload in the haemoglobinopathies. *Comptes Rendus Biologies*, vol. 336, issue 3, pp. 164–172, DOI: 10.1016/j.crv.2012.09.010, PMID: 23643400.
13. Grimshaw K., Sahler J., Spinelli S.L. (2011). New frontiers in transfusion biology: identification and significance of mediators of morbidity and mortality in stored red blood cells. *Transfusion*, vol. 51 (4), pp. 874–880, DOI: 10.1111/j.1537-2995.2011.03095.x.
14. Remy K.E., Hall M.W., Cholette J. et al. (2018). Pediatric Critical Care Blood Research Network (Blood Net). Mechanisms of red blood cell transfusion-related immunomodulation. *Transfusion*, vol. 58 (3), pp. 804–815, DOI: 10.1111/trf.14488.
15. Balaji S.N., Trivedi V. (2012). Extracellular Methemoglobin Mediated Early ROS Spike Triggers Osmotic Fragility and RBC Destruction: An Insight into the Enhanced Hemolysis During Malaria. *Indian J Clin Biochem*, vol. 27 (2), pp. 178–185, DOI: 10.1007/s12291-011-0176-5.
16. Lei C., Xiong L.Z. (2015). Perioperative Red Blood Cell Transfusion: What We Do Not Know. *Chin Med J (Engl)*, vol. 128 (17), pp. 2383–2386, DOI: 10.4103/0366-6999.163384, PMID: 26315088, PMCID: PMC4733804.
17. Schreiber M.A., McCully B.H., Holcomb J.B. et al. (2015). Transfusion of cryopreserved packed red blood cells is safe and effective after trauma: a prospective randomized trial. *Ann Surg*, vol. 262 (3), pp. 426–433.
18. Valeri C.R., Ragno G., Pivacek L., O'Neill E.M. (2001). 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. *Transfusion*, vol. 41 (7), pp. 928–932.
19. Hult A., Malm C., Oldenborg P. (2012). Transfusion of cryopreserved human red blood cells into healthy humans is associated with rapid extravascular hemolysis without a proinflammatory cytokine response. *Transfusion*, vol. 53, pp. 28–33.
20. McCully B.H., Underwood S.J., Kiraly L. et al. (2018). The effects of cryopreserved red blood cell transfusion on tissue oxygenation in obese trauma patients. *J Trauma Acute Care Surg*, vol. 84 (1), pp. 104–111, DOI: 10.1097/TA.0000000000001717.
21. D'Alessandro A., Kriebardis A.G., Rinalducci S. et al. (2015). An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies. *Transfusion*, vol. 55 (1), pp. 205–219, DOI: 10.1111/trf.12804.
22. Hess J.R. (2014). Measures of stored red blood cell quality. *Vox Sang*, vol. 107, pp. 1–9.
23. Holovati J.L., Wong K.A., Webster J.M., Acker J.P. (2008). The effects of cryopreservation on red blood cell microvesiculation, phosphatidylserine externalization, and CD47 expression. *Transfusion*, vol. 48, pp. 1658–1668.
24. Zemlyansky N.G. (2020). Regulatsiya asimmetrichnogo raspredyleniya lipidov v membrane eritrocytov cheloveka v prisutstvii glitserina i polietilenglikola [Regulation of asymmetric distribution of lipids in the human erythrocyte membrane in the presence of glycerol and polyethylene glycol]. *Cytologiya – Cytology*, vol. 62 (2), pp. 1–9 [in Russian].
25. Whillier S., Raftos J.E., Sparrow R.L., Kuchel P.W. (2011). The effects of long-term storage of human red blood cells on the glutathione synthesis rate and steady-state concentration. *Transfusion (Paris)*, vol. 51 (7), pp. 1450–1459.
26. Wendelbo O., Hervig T., Haugen O. et al. (2017). Microcirculation and red cell transfusion in patients with sepsis. *Transfus Apher Sci*, vol. 56 (6), pp. 900–905, DOI: 10.1016/j.transci.2017.11.020.
27. Dumaswala U.J., Zhuo L., Mahajan S. et al. (2001). Glutathione protects chemokine-scavenging and antioxidative defense functions in human RBCs. *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 280 (4), pp. C867–C873, DOI: 10.1152/ajpcell.2001.280.4.C867, PMID: 11245604.
28. Greenwalt T.J. (1997). Recent developments in the long-term preservation of red blood cells. *Curr Opin Hematol*, vol. 4 (6), pp. 431–435, DOI: 10.1097/00062752-199704060-00013.
29. Lelkens C.C., Lagerberg J.W.M., de Korte D. (2017). The effect of prefreeze rejuvenation on postthaw storage of red blood cells in AS-3 and SAGM. *Transfusion*, vol. 57 (6), pp. 1448–1458, DOI: 10.1111/trf.14093.
30. Makashova O.E., Babiychuk L.O., Zubova O.L., Zubov P.M. (2016). Optimizatsiya metodu kriokonservuvannya yadrosoderzhashchikh kletok kordovoy krovi ludyny z vykorystannyam kombinatsii

krioprotektora DMSO ta antyoksydantu N-acetil-L-systeinu [Optimization of the method of cryopreservation of nuclear-containing cells of human cord blood using a combination of cryoprotectant DMSO and antioxidant N-acetyl-L-cysteine]. *Problemy kriobiologiy i kriomeditsyny – Problems of cryobiology and cryomedicine*, № 26 (4), pp. 295–307 [in Ukrainian].

31. Fry L.J., Querol S., Gomez S.G. et al. (2015). Assessing the toxic effects of DMSO on cord blood to determine exposure time limits and the optimum concentration for cryopreservation. *Vox Sang*, vol. 109 (2), pp. 181–190, DOI: 10.1111/vox. 12267.

32. Zemlyanskykh N.G., Babiychuk L.A. (2019). Obrazovaniye aktivnykh form kisloroda v eritrotsitakh cheloveka pri kriokonservirovani s glitserolom i polietilenglikolem [Formation of reactive oxygen species in human erythrocytes during cryopreservation with glycerol and polyethylene glycol]. *Biofizika – Biophysics*, № 64 (4), pp. 706–715 [in Russian].

33. Zhu Z., Fan X., Lv Y. et al. (2017). Glutamine protects rabbit spermatozoa against oxidative stress via glutathione synthesis during cryopreservation. *Reprod Fertil Dev*, vol. 29 (11), pp. 2183–2194, DOI: 10.1071/RD17020.

34. Henkelman S., Noorman F., Badloe J.F., Lagerberg J.W. (2015). Utilization and quality of cryopreserved red blood cells in transfusion medicine. *Vox Sang*, vol. 108 (2), pp. 103–112, DOI: 10.1111/vox.12218.

35. Lelkens C.C., Noorman F., Koning J.G. et al. (2003). Stability after thawing of RBCs frozen with the high- and low-glycerol method. *Transfusion*, vol. 43 (2), pp. 157–164.

36. De Loecker R., Goossens W., Van Duppen V. (1993). Osmotic effects of dilution on erythrocytes after freezing and thawing in glycerol-containing buffer. *Cryobiology*, vol. 30 (3), pp. 279–285.

37. Hanna K., Chehab M., Bible L. et al. (2020). Nationwide analysis of cryopreserved packed red blood cell transfusion in civilian trauma. *J Trauma Acute Care Surg*, vol. 89, issue 5, pp. 861–866, DOI: 10.1097/TA.0000000000002711, PMID: 3236676238.

38. Mittag D., Sran A., Chan K.S. et al. (2015). Stored red blood cell susceptibility to in vitro transfusion-associated stress conditions is higher after longer storage and increased by storage in saline-adenine-glucose-mannitol compared to AS-1. *Transfusion*, vol. 55 (9), pp. 2197–2206, DOI: 10.1111/trf.13138.

39. Guchok V.M., Vorotilin A.M., Lugovoy V.I., Shrago M.I. (1994). Lechebnaya effektivnost eritrocytov, kriokonservirovannykh pod zashitoy preparata «Propandiosacharol» [Therapeutic effectiveness of erythrocytes cryopreserved under the protection of the drug «Propandiosacharol»]. *Problemy kriobiologiy – Cryobiology problems*, № 4, pp. 44–47 [in Russian].

40. Gordienko Ye.A., Panina Yu.Ye., Kovalenko I.F. (1998). Opredelenie koeffitsientov pronitsaemosti membran eritrocytov dlya krioprotektorov [Determination of permeability coefficients of erythrocyte membranes for cryoprotectants]. *Biofizychnyi visnik – Biophysical Bulletin*, vol. 422, pp. 59–64 [in Russian].

41. Ramazanov V.V., Volovelskaya E.L., Koptelov V.A., Bondarenko V.A. (2014). Svoystvo eritrocytov, zamorozennykh v srede s polietilenglikolem i 1,2-propandiolom [Property of erythrocytes frozen in a medium with polyethylene glycol and 1,2-propanediol]. *Visnyk problem biologiy i meditsyny – Bulletin of problems of biology and medicine*, № 2 (3), pp. 230–236 [in Russian].

42. Ramazanov V.V. (2013). Kriozashitnaya effektivnost kombinirovannoy sredy s nepronykayushim i pronikayushim krioprotektorami pri zamorazivani eritrocytarnykh suspenziy razlichnogo obyoma [Cryoprotective efficacy of a combined medium with non-penetrating and penetrating cryoprotectants for freezing erythrocyte suspensions of various volumes]. *Problemy kriobiologiy – Cryobiology problems*, vol. 23 (2), pp. 124–134 [in Russian].

43. Ramazanov V.V., Deyneko T.I., Volovelskaya E.L., Koptelov V.A., Bondarenko V.A. (2012). Svoystva eritrotsitov, zamorozhennykh v kombinirovannoy srede s polietilenglikolem i dimetilsulfoksidom [Properties of erythrocytes frozen in a combined medium with polyethylene glycol and dimethyl sulfoxide]. *Biotechnologiya – Biotechnology*, № 5 (2), pp. 106–114 [in Russian].

44. Bizjak D.A., Jungen P., Bloch W., Grau M. (2018). Cryopreservation of red blood cells: Effect on rheologic properties and associated metabolic and nitric oxide related parameters. *Cryobiology*, vol. 84, pp. 59–68, DOI: 10.1016/j.cryobiol.2018.08.001.

45. Rogers S.C., Dosier L.B., McMahon T.J. et al. (2018). Red blood cell phenotype fidelity following glycerol cryopreservation optimized for research purposes. *PLoS One*, vol. 13 (12), e0209201, DOI: 10.1371/journal.pone.0209201.

В.В. Рамазанов, Є.Л. Воловельська, О.Ю. Семенченко, В.А. Бондаренко

ЗАПОБІГАННЯ РОЗВИТКУ ЗАПАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ ПРИ ТРАНСФУЗІЇ ЕРИТРОЦИТІВ

Проведено огляд літератури з метою визначення можливих методичних процедур, необхідних для підвищення стійкості еритроцитів до пошкоджень факторами гіпотермічного зберігання і криоконсервування, з метою зменшення руйнування клітин в організмі після трансфузії та запобігання розвитку запального процесу. Трансфузія еритроцитів при геморагічному шоці у пацієнтів з травмою або при операціях призводить до розвитку посттрансфузійного запалення. При трансфузії криоконсервованих еритроцитів показана більш низька запальна відповідь у порівнянні з застосуванням еритроцитів, що зберігалися у гіпотермічних умовах. Криоконсервування еритроцитів дозволяє зберегти деякі структурні та біохімічні характеристики клітин й уникнути накопичення метаболічних продуктів розпаду. Разом з тим, при заморожуванні еритроцитів в середовищах з гліцерином відзначаються пошкодження мембран, які посилюються при дегліцеролізації клітин. Крім того, дані пошкодження зазнають подальший розвиток при трансфузії, що призводить до внутрішньосудинного гемолізу, а також до позасудинного руйнування еритроцитів у печінці та селезінці. Це викликає підвищення рівня незв'язаного заліза в системі циркуляції крові, стимуляцію окисного стресу і запалення, пошкодження клітин і порушення функцій внутрішніх органів. Представлені дані літератури вказують на необхідність стимуляції антиоксидантного потенціалу еритроцитів при гіпотермічному зберіганні або заморожуванні. Дана стимуляція, можливо, призведе до підвищення стійкості еритроцитів до пошкоджень факторами заморожування–відтавання і обмеження пошкоджень клітинних мембран. Це забезпечить зменшення ступеня руйнування еритроцитів в організмі після трансфузії та сповільнить розвиток окисного стресу і запалення.

Ключові слова: еритроцити, гіпотермічне зберігання, криоконсервування, трансфузія, запалення, гліцерин.

V.V. Ramazanov, E.L. Volovelskaya, A. Yu. Semchenko, V.A. Bondarenko

PREVENTION OF INFLAMMATORY PROCESS DEVELOPMENT DURING ERYTHROCYTES TRANSFUSION

A literature review was carried out in order to determine possible methodological procedures necessary to increase the resistance of erythrocytes to the damaging factors of hypothermic storage and cryopreservation, in order to reduce the destruction of cells in the body after transfusion and prevent the development of an inflammatory process. Transfusion of erythrocytes in hemorrhagic shock in patients with trauma or during surgery leads to the development of post-transfusion inflammation. Transfusion of cryopreserved erythrocytes showed a lower inflammatory response compared to the use of erythrocytes stored under hypothermic conditions. Cryopreservation of erythrocytes allows you to preserve some of the structural and biochemical characteristics of cells and avoid the accumulation of metabolic decay products. At the same time, when erythrocytes are frozen in media with glycerol, membrane damage is noted, which is aggravated by deglycerolization of cells. In addition, these injuries undergo further development during transfusion, which leads to intravascular hemolysis, as well as to extravascular destruction of erythrocytes in the liver and spleen. This causes an increase in the level of unbound iron in the blood circulation, stimulation of oxidative stress and inflammation, cell damage and dysfunction of internal organs. The presented literature data indicate the need to stimulate the antioxidant potential of erythrocytes during hypothermic storage or freezing. This stimulation may lead to an increase in the resistance of erythrocytes to damaging factors of freezing–thawing and limiting damage to cell membranes. This will ensure a decrease in the degree of destruction of red blood cells in the body after transfusion and slow the development of oxidative stress and inflammation.

Keywords: erythrocytes, hypothermic storage, cryopreservation, transfusion, inflammation, glycerin.

Надійшла до редакції 23.09.2020

Відомості про авторів

Рамазанов Віктор Володимирович – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник відділу кріоцитології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків.

Адреса: Україна, 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Тел.: +38(057)373-41-35.

E-mail: ramazanovviktor9891@gmail.com.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0321-5766>.

Воловельська Єлізавета Леонідівна – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник відділу кріоцитології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків.

Адреса: Україна, 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Тел.: +38(057)373-41-35.

E-mail: volelzeleon1948@gmail.com.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0321-5991>.

Семенченко Олександр Юрійович – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник відділу кріоцитології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків.

Адреса: Україна, 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Тел.: +38(057)373-41-35.

E-mail: olexasem777@ukr.net.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0321-5870>.

Бондаренко Валерій Антонович – доктор біологічних наук, професор, керівник відділу кріофізіології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків.

Адреса: Україна, 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Тел.: +38(057)373-41-35

E-mail: valant.bond@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0321-6087>.