

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.11.085>

УДК 611.018.54:618.48:612.111.592:616:615.014.4

О.К. Гулевський, Ю.С. Ахатова, Є.Є. Жаркова

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків

E-mail: profgulevskyy@gmail.com

Посилення кисневотранспортної функції еритроцитів після гіпотермічного зберігання під дією низькомолекулярної фракції кордової крові людини і препарату Актотегін

Представлено академіком НАН України А.М. Гольцевим

Вивчено вплив низькомолекулярної фракції (до 10 кДа), отриманої з кордової крові людини, та препарату Актотегін на вміст різних форм гемоглобіну в еритроцитах, що зберігалися за гіпотермічних умов (2–4 °С) протягом 21 доби. Відомо, що в процесі тривалого зберігання еритроцитів відбувається зміна співвідношення між формами гемоглобіну в напрямку зменшення відносного вмісту оксигемоглобіну та збільшення дезокси- і метгемоглобіну, внаслідок чого зменшується і його спорідненість до кисню. Встановлено, що після інкубації еритроцитів у реабілітаційному середовищі з кожним із досліджуваних низькомолекулярних препаратів вірогідно підвищується вміст оксигемоглобіну та зменшується кількість дезокси- і метгемоглобіну відносно контрольних зразків. У результаті збільшується коефіцієнт оксигенації, який відображає насиченість гемоглобіну киснем, до рівня, характерного для свіжовиділених еритроцитів. Отримані дані свідчать про те, що низькомолекулярна фракція з кордової крові людини та препарат Актотегін нормалізують співвідношення форм гемоглобіну еритроцитів після гіпотермічного зберігання, але більш ефективним є препарат Актотегін.

Ключові слова: кордова кров, Актотегін, еритроцити, кисневотранспортна функція, гіпотермічне зберігання.

В останнє десятиліття одним з актуальних наукових напрямів є дослідження біологічної активності і терапевтичного потенціалу низькомолекулярних речовин, що містяться в продуктах фетоплацентарного походження [1, 2]. Відомо, що препарати з кордової крові та плаценти є високоефективними метаболічними стимуляторами [1, 3, 4]. Функціональний ефект, який спостерігається в результаті впливу екстрактів плаценти і кордової крові на клітини різних типів, пов'язують з їх комплексним складом та комбінованою дією на ключові реакції метаболізму окремих регуляторних компонентів, у тому числі секретованих стовбуровими клітинами, наприклад, пептидних гормонів, факторів росту, цитокінів, хе-

Цитування: Гулевський О.К., Ахатова Ю.С., Жаркова Є.Є. Посилення кисневотранспортної функції еритроцитів після гіпотермічного зберігання під дією низькомолекулярної фракції кордової крові людини і препарату Актотегін. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2020. № 11. С. 85–91. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.11.085>

мокінів та ін. [1, 2]. У результаті численних досліджень встановлено, що препарати, розроблені на основі подібних низькомолекулярних субстанцій, мають виражені регенеративні та протизапальні властивості, виявляють широкий спектр фармакологічної дії і порівняно з цільноклітинними препаратами мають ряд переваг, пов'язаних з виготовленням, зберіганням, транспортуванням і строком придатності готового продукту [4–6]. Крім того, використання низькомолекулярних безклітинних препаратів дає змогу виключити ризик імунного відторгнення, небажаного диференціювання, пріонних захворювань та онкогенезу [7]. Відомо, що подібні стимулюючі властивості відносно клітин крові мають також і препарати з крові молочних телят Актовегін та Солкосерил.

Актуальність даного запланованого дослідження обумовлена також тим, що препарати на основі кордової крові, як було раніше показано, підвищують енергетичний статус клітин донорської крові людини [8]. Це може бути використано в практичній трансфузіології з метою відновлення функціонального стану еритроцитів і лейкоцитів після довгострокового зберігання. Особливо важлива ця властивість і при різних патологічних станах, пов'язаних з порушенням кисневотransпортної функції еритроцитів, у тому числі у разі інфікування Covid-19. На сьогодні патогенетичний механізм Covid-19 остаточно не встановлений, але однією з гіпотез пошкоджуючого впливу коронавірусу, яка пояснює неефективність терапії додатковим киснем, є ураження молекул гемоглобіну та зміна метаболізму гему, що призводить до зменшення здатності еритроцитів транспортувати кисень і вуглекислий газ [9–11]. З огляду на це препарати, що здатні підвищувати спорідненість гемоглобіну до кисню та покращувати кисневотransпортну функцію еритроцитів, можуть бути використані в рамках комплексної терапії респіраторної дисфункції, спричиненої Covid-19. У зв'язку з цим за мету дослідження ставилося порівняльне вивчення впливу низькомолекулярної фракції кордової крові людини та препарату Актовегін на кисневотransпортну функцію ізольованих еритроцитів, що зберігаються в гіпотермічних умовах.

Матеріали та методи. Низькомолекулярну фракцію з компонентами молекулярною масою до 10 кДа отримували з кордової крові людини (НМФ ККЛ), підданій кріодеструкції, методом ультрафільтрації (обладнання “Sartorius”, Німеччина) [12]. Ультрафільтрат ліофілізували в сублімаційній установці при $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 18–20 год за середнього тиску в камері 102 Па. Готові зразки НМФ ККЛ мають вигляд гігроскопічної субстанції жовтуватого кольору. Перед застосуванням наважку препарату розчиняли в стерильному фізіологічному розчині.

З цільної донорської крові людини, консервованої з гемоконсервантом “Glugicir” (Центр переливання крові, Харків), видаляли лейкотромбоцитарний шар (центрифугування 5–7 хв при 3000 g), а отриману еритроцитарну масу зберігали в стерильних умовах при $2\text{--}4\text{ }^{\circ}\text{C}$. У контрольні періоди часу (1, 7, 14 і 21 доба) відбирали необхідну кількість зразків еритроцитарної маси (по 950 мкл) і додавали до них НМФ ККЛ (50 мкл розчину до кінцевої концентрації в зразках 0,6 мг/мл) або препарат для порівняльної серії експериментів – Актовегін (розчин для ін'єкцій, 40 мг/мл, “Takeda”, Австрія; кінцева концентрація в зразках становила 0,6 мг/мл). У контрольні зразки додавали 50 мкл стерильного фізіологічного розчину. Зразки інкубували 1 год при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, після чого тричі відмивали фізіологічним розчином (3000 об/хв 15, 5 і 5 хв відповідно) і визначали співвідношення форм гемоглобіну фотометричним методом згідно з [13].

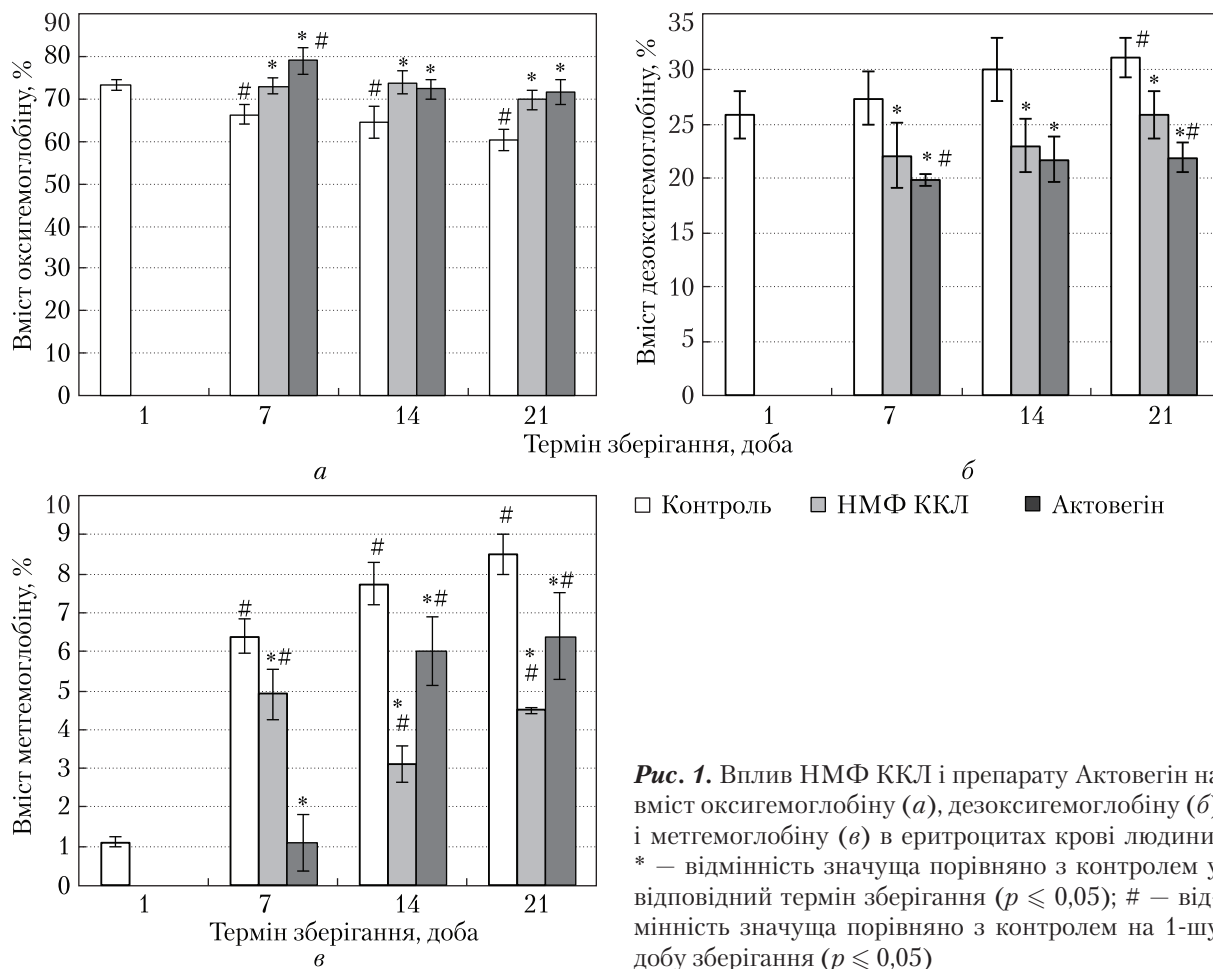


Рис. 1. Вплив НМФ ККЛ і препарату Актовегін на вміст оксигемоглобіну (а), дезоксигемоглобіну (б) і метгемоглобіну (в) в еритроцитах крові людини. * – відмінність значуща порівняно з контролем у відповідний термін зберігання ($p \leq 0,05$); # – відмінність значуща порівняно з контролем на 1-шу добу зберігання ($p \leq 0,05$)

Коефіцієнт оксигенації визначали як відношення кількості дезоксигемоглобіну до кількості оксигемоглобіну.

Перевірку нормальності розподілу даних проводили за W-критерієм Шапіро–Уїлка. Для порівняння даних використовували t -критерій Стьюдента. Експериментальні дані наведені як середнє арифметичне \pm середньоквадратичне відхилення.

Результати та обговорення. Відомо, що за фізіологічних умов Нв в еритроцитах може знаходитися в одній з трьох форм – оксигемоглобіну, дезоксигемоглобіну (не містить жодної молекули O_2) або метгемоглобіну, а оцінка вмісту цих форм в еритроцитах є маркером їх кисневотранспортної функції.

Оцінюючи співвідношення форм Нв в еритроцитах донорської крові, які зберігали в гіпотермічних умовах, ми виявили, що в контролі відбувається перерозподіл між вмістом окси-, дезокси- та метгемоглобіну у бік зростання частки останніх двох. Після інкубації в реабілітаційному середовищі з НМФ ККЛ спостерігалось значуще збільшення вмісту оксигемоглобіну (рис. 1, а) і паралельне зменшення кількості дезокси- і метгемоглобіну (рис. 1, б, в), що сприяло відновленню співвідношення між цими показниками у кожен з досліджуваних термінів.

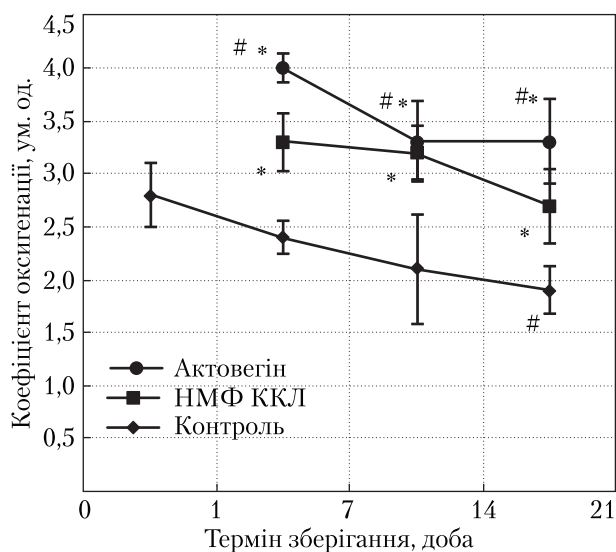


Рис. 2. Вплив НМФ ККЛ і препарату Актовегін на зміну коефіцієнта оксигенації гемоглобіну еритроцитів людини. * – відмінність значуща порівняно з контролем у відповідний термін зберігання ($p \leq 0,05$); # – відмінність значуща порівняно з контролем на 1-шу добу зберігання ($p \leq 0,05$)

Подібна закономірність виявлена і в порівняльній серії дослідів з використанням препарату Актовегін. Останній являє собою високоочищений гемодіалізат, отриманий методом ультрафільтрації з крові телят.

Відомо, що механізм дії цього препарату пов'язаний зі стимуляцією метаболізму глюкози, підвищенням синтезу макроергічних фосфатів (АТФ, АДФ) і збільшенням поглинання кисню клітинами [14]. Після інкубації еритроцитів у реабілітаційному середовищі з Актовегіном вміст оксигемоглобіну вірогідно збільшувався в кожній з точок спостереження (див. рис. 1, а). При цьому вміст дезокси- та метгемоглобіну значущо зменшувався (див. рис. 1, б, в), що сприяло нормалізації їх загального співвідношення.

На рис. 2 показано динаміку зміни коефіцієнта оксигенації, який являє собою відношення кількості оксигемоглобіну до кількості дезоксигемоглобіну та характеризує насиченість Нb киснем. У контрольних зразках еритроцитів коефіцієнт оксигенації поступово зменшувався протягом усього терміну спостереження і на 21-шу добу зберігання знижувався в 1,5 раза (див. рис. 2). НМФ ККЛ сприяла підвищенню коефіцієнта оксигенації після 7 діб гіпотермічного зберігання еритроцитів на 37,5 %, після 14 діб – на 52 %, а після 21 доби – на 42 %. Стимулюючий вплив на коефіцієнт оксигенації спостерігався і у разі додавання в середовище інкубації препарату Актовегін. Так, після 7, 14 і 21 доби зберігання в результаті реабілітації клітин з Актовегіном досліджуваний показник збільшувався на 67, 57 та 73 % відповідно (див. рис. 2).

Таким чином, за допомогою інкубації еритроцитів, що зберігалися за гіпотермічних умов, у середовищі з НМФ ККЛ або Актовегіном нам вдалося значно збільшити вміст оксигемоглобіну. При цьому НМФ ККЛ і препарат порівняння Актовегін впливали на співвідношення форм гемоглобіну однаковою мірою. Сумарно отримані дані свідчать про нормалізацію кисневотранспортної функції еритроцитів. На підставі цих даних можна зробити висновок, що обидва реабілітаційні середовища сприяють підвищенню кисневої ємності крові.

Виявлені факти можуть пояснюватися кількома причинами. По-перше, як було встановлено, НМФ ККЛ і Актовегін сприяють збільшенню вмісту АТФ і 2,3-ДФГ [15], які ре-

гулюють конформацію гемоглобіну і реакцію приєднання до нього кисню. По-друге, можливо, що у складі досліджуваних препаратів присутні компоненти, які здатні самостійно чи в результаті поєднаної комплексної дії змінювати конформацію гемоглобіну в напрямку збільшення його спорідненості до O_2 .

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Silini A.R., Cargnoni A., Magatti M., Pianta S., Parolini O. The long path of human placenta, and its derivatives, in regenerative medicine. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2015. № 3. 162. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00162>
2. Emara A.K., Anis H., Piuze N.S. Human placental extract: the feasibility of translation from basic science into clinical practice. *Ann. Transl. Med.* 2020. 8, № 5. 156. <https://doi.org/10.21037/atm.2020.01.50>
3. Gulevsky A.K., Moiseyeva N.N., Gorina O.L. Influence of low-molecular (below 5 kDa) fraction from cord blood and actovegin on phagocytic activity of frozen-thawed neutrophils. *CryoLetters.* 2011. 32, № 2. P. 131–140.
4. Shakouri-Motlagh A., Khanabdali R., Heath D.E., Kalionis B. The application of decellularized human term fetal membranes in tissue engineering and regenerative medicine (TERM). *Placenta.* 2017. 59. P. 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.07.002>
5. Harrell C.R., Jankovic M.G., Fellabaum C., Volarevic A., Djonov V., Arsenijevic A., Volarevic V. Molecular mechanisms responsible for anti-inflammatory and immunosuppressive effects of mesenchymal stem cell-derived factors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019. 1084. P. 187–206. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9558-4_306
6. Cai Y., Li J., Jia C., He Y., Deng C. Therapeutic applications of adipose cell-free derivatives: a review. *Stem Cell Res. Ther.* 2020. 11, № 1. 312. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01831-3>
7. Kumar L. P., Kandoi S., Misra R., Vijayalakshmi S, Rajagopal K, Verma R. S. The mesenchymal stem cell secretome: a new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2019. 46. P. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.04.002>
8. Gulevsky A.K., Akhatova Yu.S., Sysoev A.A., Sysoeva I.V. Energy metabolism of packed white cells after cryopreservation and rehabilitation in a medium containing a cord blood low-molecular fraction. *Biotechnology Acta.* 2015. 8, № 6. P. 63–70. <https://doi.org/10.15407/biotech8.06.063>
9. Cavezzi A., Troiani E., Corrao S. COVID-19: hemoglobin, iron, and hypoxia beyond inflammation. A narrative review. *Clin. Pract.* 2020. 10, № 2. 1271. <https://doi.org/10.4081/cp.2020.1271>
10. Liu W., Li H. COVID-19: attacks the 1-beta chain of hemoglobin and captures the porphyrin to inhibit human heme metabolism. *ChemRxiv.* 2020. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.11938173.v11938178>
11. Sotoudeh E., Sotoudeh H. A hypothesis about the role of fetal hemoglobin in COVID-19. *Med. Hypotheses.* 2020. 144. 109994. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109994>
12. 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.
13. Стусь Л.Н., Розанова Е.Д. Осциляція форм гемоглобіна в процесі зберігання крові. *Биофизика.* 1992. 37, № 2. С. 387–388.
14. Buchmayer F., Pleiner J., Elmlinger M.W., Lauer G., Nell G., Sitte H.H. Actovegin®: a biological drug for more than 5 decades. *Wien Med Wochenschr.* 2011. 161, № 3-4. P. 80–88. <https://doi.org/10.1007/s10354-011-0865-y>
15. Жаркова Е.Е., Гулевский А.К. Действие низькомолекулярной фракции криогемолизированной кордовой крови человека на восстановление морфологических свойств и метаболизм АТФ и 2,3-ДФГ эритроцитов донорской крови человека после гипотермического хранения. *Probl. Cryobiol. Cryomed.* 2018. 28, № 2. С. 157. <https://doi.org/10.15407/cryo28.02.157>

Надійшло до редакції 01.09.2020

REFERENCES

1. Silini, A. R., Cargnoni, A., Magatti, M., Pianta, S. & Parolini, O. (2015). The long path of human placenta, and its derivatives, in regenerative medicine. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, No. 3, 162, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00162>
2. Emara, A. K., Anis, H. & Piuizzi, N. S. (2020). Human placental extract: the feasibility of translation from basic science into clinical practice. *Ann. Transl. Med.*, 8, No. 5, 156. <https://doi.org/10.21037/atm.2020.01.50>
3. Gulevsky, A.K., Moiseyeva, N.N. & Gorina, O.L. (2011). Influence of low-molecular (below 5 kDa) fraction from cord blood and actovegin on phagocytic activity of frozen-thawed neutrophils. *CryoLetters*, 32, No. 2, pp.131-140.
4. Shakouri-Motlagh, A., Khanabdali, R., Heath, D. E & Kalionis, B. (2017). The application of decellularized human term fetal membranes in tissue engineering and regenerative medicine (TERM). *Placenta*, 59, pp. 124-130. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.07.002>
5. Harrell, C. R., Jankovic, M. G., Fellabaum, C., Volarevic, A., Djonov, V., Arsenijevic, A. & Volarevic, V. (2019). Molecular mechanisms responsible for anti-inflammatory and immunosuppressive effects of mesenchymal stem cell-derived factors. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1084, pp. 187-206. https://doi.org/10.1007/5584_2018_306
6. Cai, Y., Li, J., Jia, C., He, Y. & Deng, C. (2020). Therapeutic applications of adipose cell-free derivatives: a review. *Stem Cell Res Ther.*, 11, No. 1, 312. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01831-3>
7. Kumar, L. P., Kandoi, S., Misra, R., Vijayalakshmi, S., Rajagopal, K. & Verma, R. S. (2019). The mesenchymal stem cell secretome: a new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 46, pp. 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.04.002>
8. Gulevsky, A. K., Akhatova, Yu. S., Sysoev, A. A. & Sysoeva, I. V. (2015). Energy metabolism of packed white cells after cryopreservation and rehabilitation in a medium containing a cord blood low-molecular fraction. *Biotechnologia Acta*, 8, No. 6, pp. 63-70 (in Ukrainian). <https://doi.org/10.15407/biotech8.06.063>
9. Cavezzi, A., Troiani, E. & Corrao, S. (2020). COVID-19: hemoglobin, iron, and hypoxia beyond inflammation. A narrative review. *Clin Pract.*, 10, No. 2, 1271. <https://doi.org/10.4081/cp.2020.1271>
10. Liu, W. & Li, H. (2020). COVID-19: attacks the 1-beta chain of hemoglobin and captures the porphyrin to inhibit human heme metabolism. *ChemRxiv*, <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.11938173.v11938178>
11. Sotoudeh, E. & Sotoudeh, H. (2020). A hypothesis about the role of fetal hemoglobin in COVID-19. *Med. Hypotheses*, 144, 109994. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109994>
12. 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 (in Ukrainian).
13. Stus, L. N., Rozanova, E.D. (1992). The oscillation of hemoglobin forms during blood storage. *Biophysics*, 37, No. 2, pp. 387-388 (in Russian).
14. Buchmayer, F., Pleiner, J., Elmlinger, M. W., Lauer, G., Nell, G. & Sitte, H. H. (2011). Actovegin®: a biological drug for more than 5 decades. *Wien Med Wochenschr.*, 161, No. 3-4, pp. 80-88. <https://doi.org/10.1007/s10354-011-0865-y>
15. Zharkova, E. E. & Gulevsky, A. K. (2018). Effect of cryohemolyzed human cord blood-derived low molecular fraction on recovery of morphological properties and metabolism of ATP and 2,3-DPG of human donor blood erythrocytes under hypothermic storage. *Probl. Cryobiol. Cryomed.*, 28, No. 2, pp. 157. <https://doi.org/10.15407/cryo28.02.157>

Received 01.09.2020

O.K. Gulevskyy, Yu.S. Akhatova, Ye.Ye. Zharkova

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkiv

E-mail: profgulevskyy@gmail.com

ENHANCEMENT OF ERYTHROCYTE OXYGEN TRANSPORT
FUNCTION AFTER HYPOTHERMIC STORAGE UNDER
THE ACTION OF HUMAN CORD BLOOD LOW-MOLECULAR
FRACTION AND THE ACTOVEGIN DRUG

We study the effect of a low-molecular fraction (below 10 kDa) derived from human cord blood and Actovegin on the content of various forms of hemoglobin in erythrocytes stored under hypothermia (2-4 °C) for 21 days. During the long-term storage of erythrocytes, there is known to be a change in the hemoglobin forms ratio toward the decrease of the relative content of oxyhemoglobin and an increase of deoxy- and methemoglobin. As a result, the affinity of hemoglobin for oxygen reduces. The incubation of erythrocytes in a rehabilitation medium with each of the studied low-molecular drugs was found to be crucial to increase the content of oxyhemoglobin and to reduce the amounts of deoxy- and methemoglobin relative to the control. As a result, there was a rise in the oxygenation coefficient, reflecting the oxygen saturation of hemoglobin, up to the level characteristic of freshly isolated erythrocytes. The data obtained show that the human cord blood low-molecular fraction and the Actovegin normalize the ratio of hemoglobin forms in hypothermically stored erythrocytes, but the use of the Actovegin drug is more effective.

Keywords: cord blood, Actovegin, erythrocytes, oxygen transport function, hypothermia.