

Осмотичні характеристики та індукована зміна форми еритроцитів, оброблених перед кріоконсервуванням глутаміном і N-ацетилцистеїном

В.В. Рамазанов, С.В. Руденко

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків;
e-mail: ramazanovviktor9891@gmail.com

Трансфузія еритроцитів пацієнтам при геморагічному шоці призводить до розвитку посттрансфузійного запалення внаслідок руйнування пошкоджених еритроцитів макрофагами селезінки та печінки пацієнтів, звільнення іонів заліза та підвищення рівня активних форм кисню. Постійна трансфузія еритроцитів призводить до погіршення функції основних органів – підшлункової залози, печінки та серця внаслідок навантаження організму залізом. Такі негативні обставини вимагають розробки процедури стабілізації кріоконсервованих еритроцитів для запобігання значного гемолізу під час переливання. Ми досліджували осмотичні характеристики та зміну форми еритроцитів у сульфатному середовищі за умов дії інгібітора аніонного каналу DIDS. Зміна інтенсивності флукутації оптичної щільності (ОЩ) у клітинній суспензії, що перемішується, є показником зміни вмісту дискоїдних клітин (нормоцитів). Показано, що в середовищі, що містить сульфат натрію, еритроцити протягом близько 20 с трансформуються у сферичні форми. Включення у середовище DIDS перед внесенням еритроцитів викликає оборотну ретрансформацію клітин у напрямку сфери → диски → сфери. Ця ретрансформація блокується у кріоконсервованих клітинах. Водночас обробка еритроцитів перед заморожуванням середовищем, яке включає субстрати для синтезу глутатіону (глутамін і N-ацетилцистеїн) забезпечує зниження гемолізу клітин після відтавання та відмивання клітин. Спостерігається підвищення осмотичної стійкості відмитих еритроцитів при гіпотермічному зберіганні. Виявляється також відновлення оборотної ретрансформації кріоконсервованих клітин на дію DIDS. Отримані результати вказують на те, що стимуляція синтезу глутатіону субстратами сприяє підвищенню стійкості еритроцитів до пошкоджуючих факторів заморожування. Ймовірно, що ця стійкість може забезпечити зниження ступеня руйнування еритроцитів в організмі при трансфузії. Крім того, підвищення вмісту глутатіону сприяє зростанню антиоксидантного потенціалу еритроцитів, що є необхідністю для нейтралізації активної форми кисню та стримування розвитку посттрансфузійного запалення.

Ключові слова: еритроцити; кріоконсервування; глутамін; N-ацетилцистеїн; форма клітин.

ВСТУП

Після гіпотермічного зберігання (ГТЗ) або кріоконсервування еритроцитів показник посттрансфузійного гемолізу може становити 25% [1, 2]. Показано, що Fe^{2+} є прямим агоністом активації промотора фактора некрозу пухлини (ФНП- α) і індукції вивільнення білка ФНП- α культивованими макрофагами печінки (клітини Купфера) залежно від окисно-відновного статусу [3]. ФНП- α стимулює синтез прозапальних

цитокінів у макрофагах, моноцитах та активує лейкоцити, має цитотоксичні ефекти [3].

Вагома частка ускладнень, які виникають при переливанні ГТЗ-еритроцитів при нормальному вмісті 2,3-ДФГ та АТФ, пов'язана з порушенням у системі нітрозотолів через нестачу глутатіону [4]. Відзначається зменшення вмісту глутатіону та нітрозоглутатіону, які необхідні для нітрозилювання білків, включаючи гемоглобін та білки цитоскелету. Зниження ступеня

нітрозилювання α - та β -спектринів спричиняє порушення деформованості еритроцитів. Зменшення вмісту нітрозогемоглобіну інгібує постачання оксиду азоту (NO) гемоглобіном у мікросудинах. Все в результаті призводить до послаблення здатності еритроцитів при трансфузії забезпечувати гіпоксичну вазодилатацію, покращення гемодинаміки та оксигенацію тканин [5].

Глутатіон вважається важливим антиоксидантом, що відіграє роль у нейтралізації внутрішньоклітинних та позаклітинних окислювачів клітин. Субстрати синтезу глутатіону (глутамін, гліцин, цистеїн) сприяють збільшенню вмісту цього антиоксиданта в еритроцитах, зменшенню ступеня окиснення гемоглобіну та зміцненню мембрани [6]. При заморожуванні клітин кордової крові, що містять ядро, додавання N-ацетил-цистеїну до кріоконсерванту зменшувалася кількість клітин з надлишковим вмістом активних форм кисню (АФК) і збільшувалися показники їх збереження і життєздатності. Це відзначалося на етапі еквілібрації з кріоконсервантом, а також після заморожування-відтавання клітинних зразків [7]. Також показано, що при кріоконсервуванні сперми кролика включення глутаміну в середовище заморожування значно покращувало рухливість сперматозоїдів та цілісність мембран, призводило до інгібування перекисного окиснення ліпідів у заморожено-відігрітих сперматозоїдах. Крім того, збільшувався вміст глутатіону та активність γ -глутамілцистеїнсинтетази та глутатіонпероксидази з супутнім зниженням вмісту АФК як до заморожування, так і після відтавання [8].

Раніше ми показали, що в сульфатному середовищі при перемішуванні включення DIDS перед еритроцитами викликає оборотну зміну форми клітин у напрямку сфери $\rightarrow$ диски $\rightarrow$ сфери протягом 5 хв (DIDS-індукована оборотна зміна форми). Крім того, ця зміна форми інгібується в кріоконсервованих клітинах [9]. Це інгібування, ймовірно, визначається пошкодженням структури

клітинної мембрани при заморожуванні. Тому порушення DIDS-індукованої зміни форми еритроцитів може бути показником ушкодження клітинної мембрани. Дані літератури вказують на те, що субстрати синтезу глутатіону можуть стимулювати підвищення антиоксидантного потенціалу клітин, що необхідно для нейтралізації АФК. Крім того, стимуляція антиоксидантного потенціалу сприяє зміцненню зв'язку мембранних білків із мембраною. Останнє є суттєвим при заморожуванні-відтаванні клітин, коли мембрани піддаються дії кристалів льоду та відчувають осмотичні впливи.

Мета нашої роботи – дослідити вплив обробки еритроцитів глутаміном та N-ацетилцистеїном на осмотичні характеристики та DIDS-індуковану зміну форми кріоконсервованих клітин у сульфатному середовищі.

МЕТОДИКА

Наші експерименти було узгоджено з Комітетом з біоетики при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (протокол № 1 від 4.02.2025), проведено відповідно до етичних стандартів Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людини у якості об'єкта дослідження» (1964). У роботі використовували інгібітор аніонного каналу та модифікатор форми еритроцитів 4,4'-діізотіоціанато-стильбен-2,2'-дисульфат (DIDS, «Sigma», США). Еритроцити з донорської крові (2-3 доби зберігання при 4°C) осаджували (430g, 5 хв) і відмивали середовищем, що містить 0,9% NaCl і 0,1% глюкозу (середовище відмивання). Відмиті еритроцити суспендували у середовищі відмивання, що містить (2,5 ммоль/л) N-ацетилцистеїну і глутаміну, а також 10 ммоль/л фосфатний буфер (pH 7.4; гематокрит 17-18%) і інкубували при 37°C протягом 40 хв з наступним осадженням. Отриманий осад комбінували з середовищем (1:1), що містить гліцерин (38%), сорбітол

(2,9%) і NaCl (0,63%), і кріоконсервували при зануренні у рідкий азот (-196°C). Заморожені зразки клітин (1 мл) відігрівали при 40°C протягом 2 хв з подальшим відмиванням клітин комбінацією розчинів 6% NaCl і 0,9%-го NaCl і 0,2%-ї глюкози [10]. Вміст вільного гемоглобіну в позаклітинному середовищі визначали спектрофотометричним методом при довжині хвилі 543 нм. Відсоток гемолізу розраховували відношенням оптичної щільності дослідного зразка до оптичної щільності зразка гемолізованого на 100% [11]. Гіпотермічне зберігання еритроцитів (4°C) протягом 24 год здійснювали у середовищі, яке містить 7% сахарози, 0,3% NaCl, 0,2% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,1% $\text{NaNH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Зміну форми еритроцитів досліджували при реєстрації інтенсивності флуктуації оптичної щільності (ОЩ, $\lambda = 720$ нм) клітинної суспензії, що перемішується ($\sim 3,0 \cdot 10^6$ кл/мл) у кюветі спектрофотометра (СФ) при $20\text{--}22^{\circ}\text{C}$. Дiskoїдні клітини розсіюють світло анізотропно і виробляють максимальну флуктуацію ОЩ, сферичні клітини виявляють ізотропне світлорозсіювання – флуктуацій ОЩ не виявляється. Тому інтенсивність флуктуацій ОЩ визначається співвідношенням discoїдних і сферичних форм клітин [12].

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням програми «Excel». Представляли їх як середнє значення 9 незалежних визначень $\pm$ помилка ($M \pm m$). Статистичну значимість різниці середніх показників оцінювали, використовуючи критерій t Стюдента. Різницю вважали вірогідною при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У таблиці представлені результати гемолізу еритроцитів після заморожування та при ГТЗ. Обробка еритроцитів перед заморожуванням у середовищі з субстратами синтезу глутатіону (глутамін, N-ацетилцистеїн) призводила до зниження ступеня гемолізу як після відмивання відігрітих клітин ($P < 0,05$), так і при їхньому ГТЗ ($P < 0,05$). При внесенні еритроцитів у сульфатне середовище знижувалася ОЩ клітинної суспензії протягом 20 с і далі відзначався стійкий рівень ОЩ протягом 5 хв, що вказує на утворення сферичних форм клітин (рисунк). Раніше було показано, що у сульфатному середовищі еритроцити морфологічно представлені дрібними стоматоцитами [13]. Водночас включення в середовище DIDS, перед внесенням еритроцитів, викликає оборотну ретрансформацію клітин від сфер до discoїдів і назад – зниження ОЩ з паралельним зростанням інтенсивності флуктуації ОЩ протягом 1 хв, з подальшим зростанням ОЩ і паралельним ослабленням флуктуації ОЩ до 5-ї хв.

При внесенні кріоконсервованих еритроцитів у сульфатне середовище динаміка запису ОЩ незначно відрізняється від такої для інтактних клітин (див. рисунок). За наявності DIDS у середовищі розвиток флуктуації ОЩ відзначається лише на 5-й хвилині, подібне до інтенсивності розвитку для інтактних клітин на 1-й хв. Очевидно, кріоконсервування еритроцитів призводить до гальмування ретрансформації клітин. Як було зазначено раніше, пригнічення ретрансформації кріоконсервованих еритро-

Гемолиз (%) еритроцитів після кріоконсервування та гіпотермічного зберігання ($n = 9$)

Зразки кріоконсервованих еритроцитів	Після заморожування–відтавання–відмивання	Після гіпотермічного зберігання (24 год, 4°C)
Контрольні	$18,0 \pm 1,5$	$1,5 \pm 0,2$
Еритроцити оброблені глутаміном і N-ацетилцистеїном перед заморожуванням	$14,0 \pm 1,3^*$	$0,9 \pm 0,2^*$

$P < 0,05$ відносно контролю.

цитів може бути пов'язане з порушенням структури поверхні мембран [9]. Інкубація еритроцитів перед кріоконсервуванням у середовищі із субстратами синтезу глутатіону призводить до зниження гемолізу клітин після відтавання та відмивання від 18 до 14% (таблиця). Крім того, після обробки субстратами відзначається вища стійкість кріоконсервованих еритроцитів до ГТЗ. Така передобробка субстратами синтезу глутатіону сприяє відновленню оборотної ретрансформації клітин на дію DIDS. Разом з тим загальмованість DIDS-індукованої ретрансформації залишається (див. рисунок).

DIDS є інгібітором аніонного каналу та переносника, який формується основним інтегральним білком мембран еритроцитів – білком смуги 3. Молекула цього інгібітора



Зміна інтенсивності флукуацій оптичної щільності суспензії еритроцитів. Експериментальне середовище містить 110 ммоль/л Na_2SO_4 , 10 ммоль/л тріс-буфер (pH7,4). 1,2 – інтактні клітини, 3–6 – кріоконсервовані клітини, 5, 6 – клітини оброблені перед кріоконсервуванням у середовищі з глутаміном та N-ацетил-цистеїном (див. методи). 2, 4, 6 – у середу перед внесенням еритроцитів додано DIDS (2 мкмоль/л)

несе два негативні заряди і може відтворити електростатичний ефект при вбудовуванні у вхідну порожнину каналу, що включає позитивні залишки амінокислот [14]. Раніше ми показали, що за наявності підвищеної концентрації DIDS (20 мкмоль/л) відзначалося гальмування досліджуваної ретрансформації клітин, яка починає проявлятися на 4-5-й хвилині експерименту [9]. Це, ймовірно, пов'язано з тим, що після заповнення каналів зарядженими молекулами DIDS, вони частково адсорбуються на інші ділянки мембран, змінюючи їх електростатичну структуру, що призводить до інгібування DIDS-індукованої ретрансформації. Слід відзначити, що для кріоконсервованих клітин розвиток дискоїдності також починається на 4-й хвилині (див. рисунок). Є дані, що при кріоконсервуванні еритроцитів у середовищі з гліцерином або 1,2-пропандиолом знижувався поверхневий електричний потенціал через порушення електростатичної структури клітинних мембран [15]. Представлені дані та отримані результати вказують на те, що механізм DIDS-індукованої оборотної ретрансформації еритроцитів визначається зворотними змінами локальної електростатичної структури ділянок мембран біля входу в аніонний канал.

Зберігання еритроцитів у замороженому стані потенційно зводить до мінімуму ушкодження, які спостерігаються при ГТЗ [16, 17]. У разі ГТЗ еритроцитів відзначається енергетичне виснаження, що призводить до зміни катіонного гомеостазу та окисно-відновного метаболізму. Наростання окисного стресу призводить до окиснення білків (карбонілювання, нітрування) та ліпідів (перекисне окиснення). Змінюється морфологія та реологія еритроцитів із супутнім накопиченням мембранних мікрочастинок, які вивільняються у супернатант. При трансфузії ГТЗ-еритроцитів мікроевезикули поглинають NO та стимулюють розвиток запалення та тромбозу [5].

Експозиція фосфатидилсерину (ФС) на зовнішній поверхні мембран еритроцитів

при ГТЗ є однією з причин адгезії клітин до ендотелію, що робить внесок у гальмування кровотоку, погіршення оксигенації та перфузії тканин [5]. Слід зазначити, що кріоконсервування еритроцитів у середовищі з гліцерином не викликає мікровезикуляції мембран та зміни рівня експозиції ФС [17]. Також встановлено, що дія гліцерину на еритроцити при інкубації протягом 24 год при 37°C не впливає на здатність клітин контролювати асиметричний трансмембранний розподіл ФС [18].

Кріоконсервування еритроцитів забезпечує збереження основних маркерів метаболізму (2,3-ДФГ, АТФ та глутатіон) [10, 19]. Водночас технології кріоконсервування еритроцитів, котрі використовуються, призводять до прискорення їх пошкодження після розморожування, що пов'язано з порушеннями в клітинних мембранах [10, 20]. Виявляється прискорене зниження концентрації метаболічних маркерів після розморожування та відмивання еритроцитів, що особливо відзначається для 2,3-ДФГ [10]. Показано, що після збереження еритроцитів у рідкому азоті протягом 12 тиж концентрації 2,3-ДФГ та АТФ в клітинах не змінювалися, при цьому вміст натрію збільшувався, а калію – знижувався. Середній клітинний обсяг еритроцитів був вищим і відзначалася зміна деформованості та зменшення в'язкості клітин. Активність NO-синтази, ступінь фосфорилування та рівень нітрування білків не змінювалися під час кріоконсервування [21]. Автори цієї роботи зробили висновок у тому, що при кріоконсервуванні зберігається метаболічна функція еритроцитів, але структура мембран змінюється. Ймовірно, основною причиною негативу методів кріоконсервування є ослаблення захисної ефективності гліцерину на стадії розморожування еритроцитів. При відтаванні настає осмотичний шок через нездатність виходу надлишку внутрішньоклітинного гліцерину з клітин, запобігаючи надходженню води та набухання [11]. Подібний висновок був зроблений в експериментах при відмиван-

ні розморожених еритроцитів середовищем з сорбітолом. Цей непроникний кріопротектор індукує стискування клітин, тому їх набухання при розведенні кріоконсерванта з гліцерином може не призводити до гемолізу. Однак швидке розведення гліцерину буфером, що містить сорбітол, провокує значний гемоліз еритроцитів. Відносно повільна швидкість, з якою гліцерин залишає клітини, є основною причиною пошкодження клітинних мембран [22]. Включення в кріоконсервант сорбітолу в концентрації 2,9% дає змогу знизити вміст гліцерину до 38%. Однак така модифікація складу кріоконсерванта не забезпечує більшу стабільність та зниження рівнів втрати 2,3-ДФГ та АТФ у розморожених еритроцитах [10]. Необхідна додаткова корекція складу кріоконсерванта, яка сприятиме підвищенню стійкості клітин до осмотичного стресу при відтаванні та відмиванні.

Включення у середовище ГТЗ еритроцитів субстратів для стимуляції синтезу глутатіону забезпечує зниження втрат мембранних білків, включаючи антиген Duffy та попередження везикуляції мембран еритроцитів при ГТЗ [23]. Показано, що при ендотоксимії еритроцити пов'язують хемокіни IL-8 та RANTES, що взаємодіють *in vivo* з антигеном Duffy. Автори праці [24] зробили висновки, що еритроцити пов'язують хемокіни, обмежуючи їхню ефективну концентрацію в плазмі та сприяють їх виведенню з організму. Супутня втрата глутатіону, білків і антигенів в еритроцитах, що зазнали окисного стресу, може поставити під загрозу функцію утилізації не тільки активних радикалів кисню і азоту, але і прозапальних цитокінів і хемокінів [25], а активація синтезу глутатіону може захистити ці функції [23]. Це має велике значення при трансфузії еритроцитів пацієнтам у критичному стані, після операцій та травм, при сепсисі та інших анемічних станах, при яких розвивається нітроксидативний стрес, системне запалення та імуносупресія [25, 26].

У категорії пацієнтів із травмами було виявлено, що трансфузія кріоконсервованих

еритроцитів більш ефективна та безпечна, ніж ГТЗ-еритроцитів. Відзначалася нижча запальна відповідь, менша активація фібринолітичної системи та підвищення вмісту 2,3-ДФГ після переливання кріоконсервованих еритроцитів [17]. Останні порівняно з ГТЗ-еритроцитами сприяють підвищенню оксигенації периферичних тканин у пацієнтів з травмами. Водночас це не покращує негативні клінічні наслідки у категорії пацієнтів з травмами, що страждають на ожиріння (порушення метаболізму та процесу загоєння, інфекційні ускладнення та летальність) [27]. Крім того, при трансфузії тих та інших еритроцитів значна частка клітин (до 25%) може руйнуватися протягом 24 год [1, 2]. Тому негативні наслідки гемолізу при трансфузії кріоконсервованих еритроцитів можуть бути такими, як при переливанні ГТЗ-еритроцитів.

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що обробка еритроцитів перед заморожуванням середовищем з субстратами синтезу глутатіону (глутамін, N-ацетилцистеїн) забезпечує підвищення ступеня збереження клітин після відтавання-відмивання. Крім того, вона знижує ступінь гемолізу кріоконсервованих еритроцитів за умов гіпотермічного зберігання. Таке поліпшення осмотичної стійкості еритроцитів, імовірно, відбувається за допомогою стимуляцій антиоксидантного потенціалу та посилення міцності зв'язку мембранних білків із клітинними мембранами. Водночас відновлення DIDS-індукованої оборотної ретрансформації кріоконсервованих еритроцитів, мабуть забезпечується збереженням структури поверхні клітин при стимуляції синтезу глутатіону. Стимуляція редокс-потенціалу кріоконсервованих еритроцитів може забезпечити зниження рівня гемолізу, а також уповільнити розвиток окисного стресу та запалення в організмі при трансфузії.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated

with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

V.V. Ramazanov, S.V. Rudenko

OSMOTIC CHARACTERISTICS AND INDUCED SHAPE CHANGE OF RED BLOOD CELLS TREATED WITH GLUTAMINE AND N-ACETYLCYSTEINE BEFORE CRYOPRESERVATION

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv; e-mail: ramazanovvictor9891@gmail.com

Transfusion of red blood cells (RBC) to patients with hemorrhagic shock leads to the development of post-transfusion inflammation due to the destruction of damaged RBC by macrophages in the spleen and liver, the release of iron ions, and an increase in active oxygen species levels. Constant transfusion of RBC leads to deterioration of the function of the main organs, the pancreas, liver, and heart, as a result of iron overload of the body. These negative circumstances require the development of a procedure for stabilizing cryopreserved RBC in order to prevent their significant hemolysis during transfusion. The osmotic characteristics and shape changes of RBC in a sulfate medium were studied in response to the anion channel inhibitor DIDS. The change in the intensity of optical density fluctuations in a stirred RBC suspension is an indicator of changes in the content of discoid cells (normocytes). It was shown that in a medium containing Na_2SO_4 (110 mmol/l), RBC were transformed into spherical shapes within ~20 s. Inclusion of DIDS in the medium before adding RBC causes reversible cell retransformation in the direction of spheres → discs → spheres. This retransformation is blocked for cryopreserved cells. At the same time, treatment of erythrocytes before freezing with a medium that includes substrates for the synthesis of glutathione (glutamine and N-acetylcysteine) ensures a reduction in cell hemolysis after thawing and washing of the cells. An increase in the osmotic stability of washed RBC during hypothermic storage is noted. In addition, the restoration of reversible retransformation of cryopreserved cells to the action of DIDS is revealed. The obtained results indicate that stimulation of glutathione synthesis by substrates promotes an increase in the resistance of RBC to damaging freezing factors. This resistance can likely provide a decrease in the degree of destruction of RBC in the body during transfusion. In addition, an increase in the level of glutathione promotes an increase in the antioxidant potential of RBC, which is necessary for neutralizing active oxygen species and inhibiting the development of post-transfusion inflammation.

Key words: erythrocytes; cryopreservation; glutamine; N-acetylcysteine; cell shape.

REFERENCES

- Lahmann JM, Sanchez CC, Benson JD, Acker JP, Higgins AZ. Implications of variability in cell membrane permeability for design of methods to remove glycerol from frozen-thawed erythrocytes. *Cryobiology*. 2020; 92(1):168-79. doi: 10.1016/j.cryobiol.2020.01.006.
- Spitalnik SL. Stored red blood cell transfusions: iron, inflammation, immunity, and infection. *Transfusion*. 2014;54(10):2365-71. doi: 10.1111/trf.12848.
- Ansari RA, Husain K, Rizvi SA. Role of transcription factors in steatohepatitis and hypertension after ethanol: The epicenter of metabolism (Review). *Biomolecules*. 2016; 6(3): 1-15. doi: 10.3390/biom6030029.
- Xiong Y, Wang Z, Zhang A, et al. Inhibition of glutathione synthesis via decreased glucose metabolism in stored RBCs. *Cell Physiol Biochem*. 2018; 51(5):2172-84. doi: 10.1159/000495864.
- Yoshida T, Prudent M, D'alessandro A. Red blood cell storage lesion: causes and potential clinical consequences. *Blood Transfus*. 2019;17(1):27-52. doi: 10.2450/2019.0217-18.
- Daraghmeh DN, Karaman R. The redox process in red blood cells: Balancing oxidants and antioxidants (Review). *Antioxidants (Basel)*. 2024;14(1):36. doi: 10.3390/antiox14010036.
- Makashova OE, Babiychuk LA, Zubova OL. Optimization of cryopreservation technique for human cord blood nucleated cells using combination of cryoprotectant DMSO and antioxidant N-acetyl-L-cysteine. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2016;26(4):295-307. [Ukrainian].
- Zhu Z, Fan X, Lv Y, et al. Glutamine protects rabbit spermatozoa against oxidative stress via glutathione synthesis during cryopreservation. *Reprod Fertil Dev*. 2017;29(11):2183-94. doi: 10.1071/RD17020.
- Ramazanov VV, Volovelskaya EL, Rudenko SV. Shape modification of erythrocytes in sulfate medium. The 11th International Scientific and Practical Conference "Results of modern scientific research and development" (Jan 16-18, 2022) Barca Academy Publishing, Madrid, Spain. 2022:50-56.
- Lelkens CC, Noorman F, Koning JG, et al. Stability after thawing of RBCs frozen with the high- and low-glycerol method. *Transfusion*. 2003;43(2):157-64. doi: 10.1046/j.1537-2995.2003.00293.x.
- Miller RH, Mazur P. Survival of frozen-thawed human red cells as a function of cooling and warming velocities. *Cryobiology*. 1976;13(4):404-14.
- Rudenko SV. Erythrocyte morphological states, phases, transitions and trajectories. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1798(9): 1767. doi: 10.1016/j.bbame.2010.1798(9): 1767.
- Ramazanov VV, Rudenko SV. Shape change of erythrocytes during mechanical mixing and replacement of sulfate with chloride in the medium. *Physiol J*. 2024;70(4):72-9. [Ukrainian].
- Reithmeier RA., Casey JR, Kalli AC, Sansom MS, Al-guel Y, Iwata S. Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1858(7 Part A):1507-32. doi: 10.1016/j.bbame.2016.03.030.
- Gordiyenko OI, Anikieieva MO, Rozanova SL, Kovalenko S Ye, Kovalenko I F. Development of a model to investigate red blood cell surface characteristics after cryopreservation. *Cryo Lett*. 2015;36(3):221-6.
- Holovati JL, Kenneth A, Wong KA, et al. The effects of cryopreservation on red blood cell microvesiculation, phosphatidylserine externalization, and CD47 expression. *Transfusion*. 2008;48(8):1658-68. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01735.x.
- Hampton DA, Wiles C, Fabricant LJ, et al. Cryopreserved red blood cells are superior to standard liquid red blood cells. *J Trauma Acute Care Surg*. 2014;77(1):20-7. doi: 10.1097/TA.0000000000000268.
- Zemlyanskikh NG. Regulation of asymmetric lipid distribution in the human erythrocyte membrane in the presence of glycerol and polyethylene glycol. *Cytology*. 2020;62(2):1-9.
- Ramazanov VV, Volovelskaya EL, Koptelov VA, Bondarenko VA. Properties of erythrocytes frozen in a medium with polyethylene glycol and 1,2-propanediol. *Bull Probl Biol Med*. 2014;2(3):230-36. [Ukrainian].
- Chang A, Kim Y, Hoehn R, Jernigan P, Pritts T. Cryopreserved packed red blood cells in surgical patients: past, present, and future. *Blood Transfus*. 2017;15(4):341-47. doi: 10.2450/2016.0083-16.
- Bizjak DA, Jungen P, Bloch W, Grau M. Cryopreservation of red blood cells: Effect on rheologic properties and associated metabolic and nitric oxide related parameters. *Cryobiology*. 2018;84:59-68. doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.08.001.
- De Loecker R, Goossens W, Van Duppen V. Osmotic effects of dilution on erythrocytes after freezing and thawing in glycerol-containing buffer. *Cryobiology*. 1993;30(3):279-85.
- Dumaswala UJ, Zhuo L, Mahajan S, et al. Glutathione protects chemokine-scavenging and antioxidative defense functions in human RBCs. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280(4):C867-73.
- Manten AD, Pajkrt RJ, Winter P, Jong J. Erythrocyte-bound interleukin-8 and RANTES in human endotoxemia. *J Endotoxin Res*. 1997;4(1):1-9.
- Karsten E, Herbert BR. The emerging role of red blood cells in cytokine signalling and modulating immune cells. *Blood Rev*. 2020;41:100644. doi: 10.1016/j.blre.2019.100644.
- Remy KE, Hall MW, Cholette J. Mechanisms of red blood cell transfusion-related immunomodulation. *Transfusion*. 2018;58(3):804-15. doi: 10.1111/trf.14488.
- McCully BH, Underwood SJ, Kiraly L, et al. The effects of cryopreserved red blood cell transfusion on tissue oxygenation in obese trauma patients. *J Trauma Acute Care Surg*. 2018;84(1):104-11. doi: 10.1097/TA.0000000000001717.

*Матеріал надійшов
до редакції 09.04.2025*