

УДК 615.385 : 57.086.13 : 544.277

БІОЛОГІЧНІ ЕФЕКТИ ІНЕРТНИХ ГАЗІВ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ЇХ ВИКОРИСТАННЯ ПРИ НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНОМУ ЗБЕРІГАННІ ГЕМОКОМПОНЕНТІВ (ОГЛЯД ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ)

Малигон О.І., Яворський В.В., Богданчикова О.А.

Комунальний заклад охорони здоров'я Харківський обласний центр служби крові, bogdanchik_11@mail.ru

Використання інертних газів в сучасній анестезіології, регенеративній медицині і біотехнології полягає у їх захисних ефектах на мембрани клітин, обумовлених легкістю проникнення газів через біологічні бар'єри, їх розчинністю у білках і ліпідах, здатністю до утворення клатратів з молекулами води. В даному огляді проаналізовано ряд експериментальних досліджень механізмів дії інертних газів, таких як аргон (Ar) і ксенон (Xe) на клітини крові *in vitro*. Теоретично обґрунтовано можливість застосування інертних газів при консервуванні і довготривалому зберіганні компонентів крові в умовах діяльності закладів служби крові (ЗСК).

Ключові слова: інертний газ, еритроцит, мембрана, низькотемпературне зберігання, гіпербарія, іонні канали.

Вивчення біологічних ефектів інертних газів на функціональний стан соматичних клітин розпочалося в 1958-1960 рр. За даними досліджень 1967 р. механізм біологічної дії інертних газів полягає у проникливості через біліпідний шар мембрани клітини нейтральних газів, до яких відноситься група одноатомних газів з низькою хімічною реактивністю – гелій (He), неон (Ne), аргон (Ar), криптон (Kr), ксенон (Xe) і радон (Rn) з впливом на сили поверхневого натягу в умовах гіпербарії. Такий вид абсорбції призводить до зворотного збільшення проникності мембрани для катіонів [1].

Ксенон має більш широке використання в медицині, але на даний час в світовій науковій базі є невелика кількість досліджень його дії на клітину після введення газу під тиском. Хе має значний рівень розчинності в ліпідах та з'єднується з молекулами білків, тому вчені припускають можливість взаємодії газу з біліпідним шаром клітинної стінки. З метою вивчення мембранотропних впливів

різноманітних речовин широко використовується мембрана еритроцитів. При дослідженні розчинів міоглобіну і суспензій мембран еритроцитів під впливом інертних газів було зафіксовано швидкий обмін Хе між рідкою та твердою фазами [2]. Згідно з гіпотезою про підвищену проникливість мембран, тиск 88 кг·с/см² стимулював активний відтік Na⁺ і надходження K⁺ через мембрану еритроцитів і пригнічувався блокатором іонних каналів оубаїном, що було показано в роботі [3].

Пізніше ці вчені довели, що абсолютний тиск 69 кг·с/см² в середовищі гелію або гідростатичний тиск пригнічував концентрацію K⁺ в синапсосомах головного мозку щурів, а підвищений тиск аргону, навпаки, стимулював накопичення іонів K⁺.

Аргон в умовах гіпербарії також підсилював активний транспорт натрію і калію в еритроцитах людини. Хоча транспорт іонів і стимулюється концентрацією речовини та пригнічується тиском, активність транспортного ферменту клітин-

них мембран Na-K-АТФазы не залежала від умов. На думку автора, ефекти тиску і концентрації газів впливали на надходження їх до клітини, а не на активність самого насосу, що може бути непрямим доказом відсутності шкідливої дії інертних газів на мембрану [4].

Picklesi та співавтори (1990 р.) досліджували вплив тиску та інертних газів на показники плазми людини, збагаченої тромбоцитами. Авторами зроблено висновок, що тромбоцити більш чутливі (за показником агрегації) до зміни гідростатичного тиску та відносно стабільні – до дії інертних газів [5]. В іншому дослідженні тромбоцити людини були оброблені He, Xe, N₂ в умовах високого тиску зі стимуляцією АТФ (5 мкМ). При підвищенні тиску інертних газів змінювалась проникливість мембрани до іонів Ca²⁺ [6].

В дослідженні [7] показано активуючий вплив Хе на нестимульовану або агоніст-індуковану експресію глікопротеїну в тромбоцитах.

Вивчалися біологічні ефекти інертних газів і на функцію клітин головного і спинного мозку. Доведено, що Хе діє на фізико-хімічні властивості мембран нейронів: газ може проникати крізь гематоенцефалічний бар'єр, посилювати токи біологічно-активних, в т.ч. лікувальних речовин шляхом підвищення проникливості каналів [8]. Міузакі (1999) досліджував вплив 70 %-вої концентрації Хе на нейрони задніх рогів спинного мозку кішки. Перев'язка спинного мозку не впливала на здатність інертного газу пригнічувати відповідь клітин на подразники, на відміну від закису азоту [9].

Ще з 1958 р. було з'ясовано, що інертним газам властива антиоксидантна дія. За даними Еберта і Хонесі, інертні гази витісняють із клітин кисень, перешкоджаючи утворення перекісних радикалів, тим самим стабілізують мембрани [10]. Виходячи з даних дослідження можна припустити, що мембранопротекторний вплив інертних газів на клітини при

дії низьких температур може бути пов'язаний підвищенням її резистентності і зниженням наслідків оксидативного стресу.

Питання кріопротекторної дії інертних газів на клітину в повній мірі не висвітлені і потребують проведення подальших досліджень. Існують декілька робіт, в яких кріопротекторний вплив інертного газу пояснюють утворенням специфічних з'єднань або так званих кластерів (кристалогідратів) ксенону, які конкурують з утворенням кристалів льоду [11, 12].

На даний час відсутні дослідження з використання інертних газів при заморожуванні та низькотемпературному зберіганні еритроцитів. Більшість гемоконсервантів, які використовуються в ЗСК для заготівлі донорської крові та наступного зберігання еритроцитомісних компонентів («Глюгидир», ЦФДА-1, ЦФД/САГМ) забезпечують функціональну повноцінність та відповідність показників якості до норми протягом 21 – 42 доби. При цьому друга половина терміну зберігання супроводжується переходом морфологічних форм від дискоцитів до сфероцитів та початком процесу гемолізу [13].

Недоліком використання відомих кріозахисних сполук (гліцерин, сахароза, диметилсульфоксид, пропіленгліколь та їх суміші) при заморожуванні еритроцитів є вплив на концентрацію іонів водню у позаклітинній рідині при виморожуванні води, що стимулює осмотичний гемоліз красних кров'яних клітин [14; 15]. Основні характерні особливості кріозахисних розчинів даного типу полягають у тому, що використовується хімічна сполука з мембранопроникливими або непроникливими компонентами, яка фіксує молекули поза- і внутрішньоклітинної води та перешкоджає росту кристалів льоду.

В роботі [16] показано можливість використання ксенону для кріоконсервування лейкоцитів людини. Лейкоцити

вводились в «клатратний анабіоз», завдяки чому ядерні клітини крові зберігали свою функцію.

В 2008 р. американськими вченими було проведено кріоконсервування кардіоміоцитів миші під захистом суміші ксенон-кисень. Насичення клітин здійснювали в барокамері, паралельно здійснюючи охолодження парами рідкого азоту, після було встановлено, що дана комбінація газів обумовлює збереженість структурної цілісності мітохондрій клітин [12].

Успішне кріоконсервування клітинних суспензій, а саме — мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (МСК) описано в дослідженні [17]. В якості захисного компоненту автори застосовували Хе, який вводили в підготовлену первинну культуру МСК при температурі 0°C та після насичення проводили охолодженням зі швидкістю 1°C/хв. Такий спосіб забезпечував віщий показник збереженості клітин в порівнянні з використанням стандартного методу кріоконсервування МСК з кріопротектором диметилсульфоксидом (ДМСО).

Тими же авторами були проведені експерименти з консервування локусів шкіри протягом 4 діб в клатратах ксенону в умовах барокамери. Показано, що консервовані в клатратах ксенону ділянки шкіри не відрізнялись від інтактних за винятком незначної вакуолізації цитоплазми кератиноцитів [18].

Висновки

Узагальнюючи світовий експериментальний досвід з вивчення механізмів дії інертних газів на клітини *in vitro*, слід зазначити, що доказів негативного впливу останніх на структурно-функціональний стан різних типів клітин наведено не було. Таким чином, можна зробити висновок, що інертні гази являють собою відносно нетоксичні речовини, а головне, можуть бути використані з метою стабілізації і протекції клітинних мембран при дії пошкоджуючих факторів (низької температури, ішемії, тощо).

З'ясування дії інертних газів на мембрани та метаболічну активність еритроцитів *in vitro* має фундаментальне значення і дозволить розширити уявлення про функціонування цих клітин, сприятиме визначенню оптимальних умов зберігання еритроцитів та може стати підґрунтям для розробки довготривалого методу зберігання еритроцитовмісних компонентів донорської крові.

Література

1. Bennett P.B., Papahadjopoulos D., Bangham A.D. The effect of raised pressure of inert gases of phospholipids membranes // *Life Sciences*. – 1967. — V. 6, № 23. — P. 2527–2533.
2. Khlusov I.A., Naumov S.A., Vovk S.M., Kornetov N.A., Shpisman M.N., Lukinov A.V., Naumov A.V. Xenon effect son cells and receptors // *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk*. – 2003. – Vol. 9. – P.32-37.
3. Van Nice P.S., Galey W.R. Actions of hyperbaric elemental gases on electrolyte transport in the human erythrocyte // *Journal of Applied Physiology*. — 1980 Vol. 49, № 2. – P. 204-210.
4. Galey W.R. The Effect of Inert Gases on Ion Transport Across the Erythrocyte Membrane // *Defense Technical Information Center*. – 1984. – 21 p.
5. Pickles D.M., Ogston D., Macdonald A.G. Effects of hydrostatic pressure and inert gases on platelet aggregation *in vitro* // *J. Appl. Physiol*. — 1985. – Vol. 69, №6. – P. 2239-2247.
6. Philp R.B., Mc Iver D.J., Arora P. Effect of elevated pressures of inert gases on cytosolic free Ca²⁺ of human platelets stimulated with ADP // *Cell Calcium*. – 1993. -Vol. 14, № 7. – P. 525–529.
7. deRossi L.W., Horn N.A., Baumert J.H., Gutensohn K., Hutschenreuter G., Rossaint R. Xenon does not affect human platelet function *in vitro* // *AnesthAnalg*. – 2001. Vol. 93, № 3. – P. 635-640.
8. Bantel C., Maze M., Trapp S. Noble gas xenon is a novel adenosine triphosphate-sensitive potassium channel opener // *Anesthesiology*. – 2010. – Vol. 112, №3. – P.623-630.
9. Miyazaki, Y., Adachi, T., Utsumi, J. et al. Xenon has greater inhibitory effects on spinal dorsal horn neurons than nitrous oxide in spinal cord transected cats // *AnesthAnalg*. – 1999. – Vol. 88. – P. 893–897.

10. Ebert M., Hornsey S., Howard A. Effect of inert gases on oxygen-dependent intracellular radio sensitivity // *Nature*. – 1958. – Vol. 181. – P. 613–616.
11. Rodin, V.V., Isangalin F.S., Volkov V.J. Structure of protein solutions in a presence of xenon clathrate // *Cryobiology&Cryo-Medicine*. – 1984. – Vol. 14. – P. 3-7.
12. Sheleg, S., Hixon H., Cohen B., Lowry D., Nedzved M. Cardiac mitochondrial membrane stability after deep hypothermia using a xenon clathrate cryostasis protocol – an electron microscopy study // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. – 2008. – Vol 5, № 1. – P. 440-447.
13. Малиш П.М., Орлова О.А., Комаревцева І.О. та співавт. Вивчення фізико-хімічних процесів в консервованих донорських еритроцитах на етапах зберігання при позитивних температурах // *Укр.мед.альманах*. – 2004. Т.7, № 6. – С. 100-102.
14. Парченко Т.А., Бондаренко В.А. Изменение объема эритроцитов при действии среды и модификаторов мембраны // *Проблемы криобиологии*. – 1999. – №4. – С. 3-7.
15. Lovelock J.E. The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing // *Biochim.Biophys.Acta*. – 1953. – Vol. 10. – P. 414-426.
16. Laptev D.S., Polezhaeva T.V., Zaitseva O.O., Khudyakov A.N., Solomina O.N., Utemov S.V. The use of inert gas xenon for cryopreservation of leukocytes // *Bull.Exp.Biol.Med*. – 2014. – Vol.157, № 2. – P. 282-284.
17. Макеев О.Г., Пономарев А.И., Коротков А.В. Применение клатрат образующего газа для криоконсервации мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток // *Вестник уральской медицинской академической науки*. – 2010. – №1. – С. 59-62.
18. Пономарев А. И., Макеев О. Г., Зверева А. И., Коротков А. В. Применение клатратов ксенона для консервации кожи человека // *Вестник уральской медицинской академической науки*. – 2014. – Т. 51, № 5. – С. 98–102.
2. Khlusov I.A., Naumov S.A., Vovk S.M., Kornetov N.A., Shpisman M.N., Lukinov A.V., Naumov A.V. Xenon effect on cells and receptors // *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk*. – 2003. – Vol. 9. – P.32-37.
3. Van Nice P.S., Galey W.R. Actions of hyperbaric elemental gases on electrolyte transport in the human erythrocyte // *Journal of Applied Physiology*. – 1980 Vol. 49, № 2. – P. 204-210.
4. Galey W.R. The Effect of Inert Gases on Ion Transport Across the Erythrocyte Membrane // *Defense Technical Information Center*. – 1984. – 21 p.
5. Pickles D.M., Ogston D., Macdonald A.G. Effects of hydrostatic pressure and inert gases on platelet aggregation in vitro // *J. Appl. Physiol*. – 1985. – Vol. 69, №6. – P. 2239-2247.
6. Philp R.B., Mc Iver D.J., Arora P. Effect of elevated pressures of inert gases on cytosolic free Ca²⁺ of human platelets stimulated with ADP // *Cell Calcium*. – 1993. – Vol. 14, № 7. – P. 525–529.
7. deRossi L.W., Horn N.A., Baumert J.H., Gutensohn K., Hutschenreuter G., Rossaint R. Xenon does not affect human platelet function in vitro // *AnesthAnalg*. – 2001. Vol. 93, № 3. – P. 635-640.
8. Bantel C., Maze M., Trapp S. Noble gas xenon is a novel adenosine triphosphate-sensitive potassium channel opener // *Anesthesiology*. – 2010. – Vol. 112, №3. – P.623-630.
9. Miyazaki, Y., Adachi, T., Utsumi, J. et al. Xenon has greater inhibitory effects on spinal dorsal horn neurons than nitrous oxide in spinal cord transected cats // *AnesthAnalg*. – 1999. – Vol. 88. – P. 893–897.
10. Ebert M., Hornsey S., Howard A. Effect of inert gases on oxygen-dependent intracellular radio sensitivity // *Nature*. – 1958. – Vol. 181. – P. 613–616.
11. Rodin, V.V., Isangalin F.S., Volkov V.J. Structure of protein solutions in a presence of xenon clathrate // *Cryobiology&Cryo-Medicine*. – 1984. – Vol. 14. – P. 3-7.
12. Sheleg, S., Hixon H., Cohen B., Lowry D., Nedzved M. Cardiac mitochondrial membrane stability after deep hypothermia using a xenon clathrate cryostasis protocol – an electron microscopy study // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. – 2008. – Vol 5, № 1. – P. 440-447.
13. Malysh P. M., Orlova O. A., Komarevtseva I.O., et al. Study of physical-and-chemical

References

1. Bennett P.B., Papahadjopoulos D., Bangham A.D. The effect of raised pressure of inert gases on phospholipid membranes // *Life Sciences*. – 1967. – V. 6, № 23. – P. 2527–2533.

- processes in banked donor erythrocytes on the stages of their preservint at positive temperatures // Ukrainian medical almanac. – 2004. Vol. 7, № 6. – P. 100-102. (ukr.)
14. Parchenko T.A., Bondarenko V.A. Change of erythrocytes volume at pH medica action and membrane modifcator // Problems of cryobiology. – 1999. — №4. — P. 3-7. (Rus.)
 15. Lovelock J.E. The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing // Biochim.Biophys.Acta. – 1953. – Vol. 10. – P. 414-426.
 16. Laptev D.S., Polezhaeva T.V., Zaitseva O.O., Khudyakov A.N., Solomina O.N., Utemov S.V. The use of inert gas xenon for cryopreservation of leukocytes // Bull.Exp.Biol.Med. – 2014. – Vol.157, № 2. – P. 282-284.
 17. Makeyev O. G., Ponomarev A. I., Korotkov A. V. Use of clathrate-forming gas for cryopreservation of mesinhemal multipotent stromal cells // Herald of Ural medical academic science. – 2010. — №1. – P. 59-62. (Rus.)
 18. Ponomarev A. I., Makkeyev O. G., Zvereva A. I., Korotkov A. V. Use of kxenon's clathrates for preserving of human skin // Heral of Ural medical academic science. – 2014. – Vol. 51, № 5. — P. 98–102. (rus.)

Резюме

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ИНЕРТНЫХ ГАЗОВ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ ХРАНЕНИИ ГЕМОКОМПОНЕНТИВ (ОБЗОР ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ)

Малигон А.И., Яворский В.В., Богданчикова О.А.

Использование инертных газов в современной анестезиологии, регенеративной медицине, биотехнологии заключается в их защитных эффектах на мембраны клеток, обусловленных легкостью проникновения газов через биологические барьеры, растворимостью в липидах и белках, способностью образовывать клатраты с молекулами воды. В данном обзоре проанализировано ряд экспериментальных исследований механизмов

действия инертных газов, таких как аргон (Ar) и ксенон (Xe) на клетки крови invitro. Теоретически обоснована возможность применения инертных газов при консервировании и длительном хранении компонентов крови в условиях работы организаций службы крови.

Ключевые слова: *инертный газ, эритроцит, мембрана, низкотемпературное хранение, гипербария, ионные каналы.*

Summary

BIOLOGICAL EFFECTS OF INERT GASES AND THE PROSPECTS FOR THEIR USE IN LOW-TEMPERATURE STORAGE OF BLOOD COMPONENTS (REVIEW OF EXPERIMENTAL STUDIES)

Malyhon A.I., Yavorsky V.V., Bogdanchikov O.A.

Biological effects of noble gases and perspectives of their use at low temperature preservation of blood components (review of experimental researches)

The use of inert gases in modern anesthetics, regenerative medicine, biotechnology is in their protective effect on the cell membranes. The inert gas action caused by penetration of gases move through the biological barriers, solubility in the lipids and proteins and the ability to form inclusion complexes with water molecules.

A number of experimental studies of argon (Ar) and xenon (Xe) action on the blood cells in vitrowere analyzed in this review. The possibility of inert gases using on the cryopreservation and storage of blood components was theoretically described in the work of Blood Service.

Keywords: *inert gas, erythrocyte membrane, long therm storage, hyperbaric conditions, ion channels.*

Впервые поступила в редакцию 09.06.2015 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования