

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В.Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет
кафедра молекулярної біології та біотехнології

Вплив наночасток магнетиту на організм щурів

Допущено до захисту
«__»_____2025 р.
Завідуючий
кафедрою _____

Кваліфікаційна робота бакалавра
студентки кафедри молекулярної
біології та біотехнології
Білоусової Поліни Андріївни

Наукові керівники:
Ковальова М.К.
к.б.н. доцент кафедри молекулярної
біології та біотехнології ХНУ
імені В.Н. Каразіна
Медведева О. П.
к.б.н. старший науковий
співробітник лабораторії
фундаментальних та прикладних
досліджень НАЦ "Харківський
фізико-технічний інститут"

Оцінка «_____»
Голова ЕК

«__»_____2025 р.

Харків 2025

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	4
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ТА АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Загальна характеристика еритроцитів	8
1.2. Механізми деградації клітинної мембрани в умовах зберігання	11
1.3. Поняття "storage lesions" та їх клінічне значення.....	14
1.4. Клінічні наслідки зниження життєздатності еритроцитів.....	16
1.5. Методи консервації еритроцитів	20
1.5.1. Хімічні методи	20
1.5.2. Фізіологічні методи.....	23
1.5.3. Порівняльний аналіз хімічних та фізичних методів	28
1.6. Види наночастинок та їх біоактивні властивості	30
1.7. Характеристика магнетиту (Fe_3O_4)	33
1.7.1. Фізико-хімічні властивості магнетиту	33
1.7.2. Біосумісність магнетиту	34
1.7.3. Вплив магнетиту на клітинні мембрани.....	35
1.8. Обмеження сучасних досліджень із використанням наночастинок магнетиту.....	35
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....	38
2.1. Підготовка зразків крові для ІЧ-дослідження	38
2.2. Визначення спектрів поглинання водного розчину еритроцитів в ІЧ-діапазоні	39
2.3. Визначення складу та структурних характеристик наночастинок магнетиту.....	40

2.3.1. Розрахунки параметрів кристалічної ґратки магнетиту	41
2.3.2. Визначення процентного складу магнетиту	42
2.3.3. Визначення фазового складу наночастинок магнетиту	43
2.4. Аналіз фазового складу магнетиту та його значення для стабілізації мембран еритроцитів	46
2.5. Статистичні методи.....	46
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ.....	47
3.1. Визначення ІЧ-спектрів поглинання вихідних суспензій еритроцитів.....	47
3.2. ІЧ-спектроскопічний аналіз еритроцитів, збережених у консерванті CPD	51
3.3. ІЧ-спектроскопічний аналіз еритроцитів, збережених у консерванті CPDA-1.....	54
3.4. Аналіз змін у ІЧ-спектрах контрольних і експериментальних зразків	57
ВИСНОВКИ.....	59
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:.....	60

АНОТАЦІЯ

Робота присвячена експериментальному дослідженню молекулярно-структурних змін мембран еритроцитів під час зберігання при позитивних температурах за допомогою інфрачервоної (ІЧ) спектроскопії. Дослідження проводили на еритроцитарних компонентах крові (ЕКК) щурів, консервованих у середовищах CPD та CPDA-1. Як стабілізатор використовували фізіологічний розчин, оброблений наночастинками магнетиту.

ІЧ-спектральний аналіз показав, що в зразках, збережених у середовищі CPD, структурна деградація мембран у контрольній групі почалася на 14-й день і завершилася на 21-й день. На противагу цьому, в експериментальній групі початкові зміни спостерігалися лише на 28-й день, а повна деградація відбувалася на 35-й день.

У середовищі CPDA-1 деградація в контрольній групі розпочалася на 28 добу і завершилася на 42 добу, тоді як в експериментальній групі перші ознаки ослаблення внутрішньо- та міжмолекулярних зв'язків з'явилися лише на 42 добу. Примітно, що часткове збереження молекулярної структури все ще було очевидним на 49-й день.

Ці результати демонструють, що використання в експерименті наночастинок магнетиту ефективно зберігає цілісність білково-ліпідного каркасу мембран еритроцитів, тим самим значно подовжуючи термін їх зберігання.

Ключові слова: нанотехнології, консервовані еритроцити, наночастинок магнетиту, інфрачервона спектроскопія, молекулярна структура, зберігання еритроцитів.

Робота включає: 70 сторінок, 9 рисунків, 11 таблиць, 90 джерел.

ABSTRACT

This study focuses on the experimental investigation of molecular structural changes in erythrocyte membranes during storage at positive temperatures using infrared (IR) spectroscopy. The research was conducted on erythrocyte blood components (EBC) from rats, preserved in CPD and CPDA-1 media. A physiological saline solution treated with magnetite nanoparticles was employed as a stabilizing agent.

IR spectral analysis revealed that, in samples preserved in CPD medium, membrane structural degradation in the control group began on day 14 and was complete by day 21. In contrast, the experimental group showed initial changes only by day 28, with full degradation occurring on day 35.

In the CPDA-1 medium, degradation in the control group started on day 28 and was complete by day 42, while in the experimental group, the first signs of intra- and intermolecular bond weakening appeared only on day 42. Notably, partial preservation of molecular structure was still evident on day 49.

These results demonstrate that the use of magnetite nanoparticles effectively preserves the integrity of the protein-lipid framework of erythrocyte membranes, thereby significantly extending their storage lifespan.

Keywords: *nanotechnology, preserved erythrocytes, magnetite nanoparticles, infrared spectroscopy, molecular structure, erythrocyte storage.*

Thesis includes: 70 pages, 9 figures, 11 tables, 90 references.

ВСТУП

Еритроцитарна маса є життєво важливим компонентом донорської крові, яка широко використовується в клінічній практиці при гострих крововтратах, хронічних анеміях, онкологічних захворюваннях, в акушерстві та під час хірургічних втручань. Ефективність та безпечність гемотрансфузій значною мірою залежить від функціональної повноцінності еритроцитів, яка зберігається лише протягом обмеженого періоду часу після забору крові. За стандартами України, допустимий термін зберігання еритроцитів у консервантах не повинен перевищувати 42 діб, проте під час зберігання клітини піддаються прогресивному накопиченню певних фізико-хімічних змін, які у свою чергу знижують клінічну ефективність трансфузій і можуть підвищувати ризик ускладнень у реципієнтів.

Сучасні підходи до продовження терміну зберігання еритроцитів передбачають вдосконалення складу консервантів, оптимізацію температурних режимів та впровадження нових методів глибокого заморожування. Однак жоден із наразі існуючих традиційних методів не забезпечує стабілізацію молекулярної білково-ліпідної структури мембрани, що є вирішальним фактором для збереження функціональної цілісності клітини.

У зв'язку з цим особливої *актуальності* набувають підходи, спрямовані не лише на продовження терміну зберігання, а й на поліпшення якості самих клітин. А переваги, які отримуються завдяки цьому, виправдовують будь-які реальні чи передбачувані незручності, пов'язані з коригуванням процедур їх обробки або додатковими витратами на переробку.

У цьому контексті нанотехнології відкривають нові можливості — як для глибшого розуміння механізмів пошкодження клітин, так і для створення більш ефективних і безпечних способів їх зберігання поза організмом.

Мета дослідження:

Дослідити вплив наночастинок магнетиту на структурно-функціональні властивості еритроцитів *in vitro* з метою стабілізації молекулярної білково-ліпідної структури мембрани під час зберігання.

Об'єкт дослідження:

Еритроцити консервованої крові щурів.

Предмет дослідження:

Молекулярні та структурні зміни мембрани еритроцитів під час зберігання та можливості їх корекції з використанням наночастинок магнетиту.

Завдання роботи:

1. Вивчити фізико-хімічні властивості наночастинок магнетиту та їх потенціал як внутрішньоклітинних біокоректорів.
2. Здійснити порівняльний аналіз спектральних характеристик еритроцитів, збережених у середовищах CPD та CPDA-1, методом інфрачервоної спектроскопії.
3. У порівнянні з контролем дослідити вплив наночастинок магнетиту на стабільність білково-ліпідної структури мембрани еритроцитів при зберіганні.
4. Оцінити динаміку змін спектральних характеристик еритроцитів на етапах зберігання з подальшим проведенням статистичної обробки отриманих результатів.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ТА АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика еритроцитів

Еритроцити — без'ядерні клітини крові, основною функцією яких є транспорт кисню від легенів до тканин і вуглекислого газу у зворотному напрямку [1]. Завдяки своїй двоввігнутій формі вони мають велику питому поверхню, що сприяє ефективному газообміну. Така форма також забезпечує клітині здатність до деформації без втрати цілісності мембрани, що є необхідним для проходження через вузькі капіляри. В організмі людини еритроцити становлять приблизно 99% усіх формених елементів крові, а середній їхній термін життя складає близько 120 діб [2]. Після завершення життєвого циклу вони фагоцитуються макрофагами селезінки, печінки або кісткового мозку, де відбувається деградація гемоглобіну та реутилізація заліза.

Головним компонентом еритроцита є білок гемоглобін, який забезпечує зв'язування та перенесення молекул O_2 та CO_2 . Гемоглобін складається з чотирьох глобінових ланцюгів (двох α - і двох β -ланцюгів) і гема-залізовмісної групи, що безпосередньо бере участь у зв'язуванні кисню [3]. Гем містить двовалентне залізо (Fe^{2+}), яке здатне оборотно приєднувати молекулу кисню без її окиснення, що забезпечує ефективний газообмін. Важливим фактором є також здатність гемоглобіну змінювати свою конфігурацію залежно від рівня рН, температури та парціального тиску газів — феномен, відомий як ефект Бора.

Окрім внутрішнього вмісту, критичне значення для функціонування еритроцитів має структура їх плазматичної мембрани. Мембрана представлена ліпідним бішаром, до складу якого входять фосфоліпіди (переважно фосфатидилхолін, фосфатидилсерин, сфінгомієлін) та холестерин, що забезпечують гнучкість і стабільність клітини [4]. Ці ліпіди утворюють рідинно-кристалічну фазу, яка зберігає мембрану у стабільному, але

динамічному стані. У мембрану також вбудовані білки, серед яких особливу роль відіграють спектрин, анкірин та глікофорини. Ці компоненти формують цитоскелет, що підтримує форму еритроцита та його деформованість — здатність змінювати форму при проходженні вузькими капілярами [5]. Крім цього, структура цитоскелету є ключовою для збереження функціональної стабільності при механічних навантаженнях.

Крім транспорту кисню, еритроцити беруть участь у регуляції кислотно-лужного балансу (через буферну дію гемоглобіну), у детоксикації деяких метаболітів та транспорті біологічно активних речовин [6]. Буферна здатність гемоглобіну дозволяє нейтралізувати надлишок протонів (H^+), що особливо важливо при гіпоксії та метаболічних розладах. Додатково, еритроцити транспортують NO (оксид азоту), який бере участь у регуляції тонуусу судин. Відомо також, що еритроцити здатні впливати на мікроциркуляцію за рахунок вивільнення АТФ та модуляції тонуусу судин [7]. Цей механізм є частиною системної відповіді організму на гіпоксію і передбачає участь еритроцитів у судинній авторегуляції.

Таким чином, еритроцити становлять важливу частину гомеостатичних механізмів організму, і будь-які зміни їхньої структурної цілісності, особливо мембранних компонентів, можуть призводити до суттєвих функціональних порушень [8]. Порушення цілісності мембрани, деградація білків або окислення ліпідів сприяють підвищенню ризику гемолізу, втраті деформабельності та скороченню тривалості життя клітини — фактори, що мають критичне значення при зберіганні крові.

Ультраструктура плазматичної мембрани еритроцита

Плазматична мембрана еритроцита є високоспеціалізованою структурою, що забезпечує клітині стабільність, механічну гнучкість і функціональну цілісність. Мембрана складається з трьох основних компонентів: ліпідного бішару, мембранних білків та зовнішнього глікокаліксу [9]. Вона функціонує як динамічний бар'єр, який контролює обмін речовин між внутрішнім і зовнішнім середовищем, забезпечує

механічний захист клітини та виступає як платформа для міжмолекулярної взаємодії.

Ліпідний бішар утворений переважно фосфоліпідами та холестерином. Основні фосфоліпіди еритроцитарної мембрани включають фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін, фосфатидилсерин та сфінгомієлін, які асиметрично розподілені між зовнішнім і внутрішнім шарами мембрани [10]. Така асиметрія є важливою для клітинної сигналізації та фагоцитарного розпізнавання: зокрема, зовнішня експозиція фосфатидилсерину є сигналом для клітин-макрофагів про необхідність елімінації еритроцита. Холестерин, присутній у співвідношенні приблизно 1:1 з фосфоліпідами, відіграє ключову роль у стабілізації рідинно-кристалічної структури мембрани, забезпечуючи її еластичність і проникність [11].

У плазматичну мембрану вбудовано численні інтегральні та периферичні білки, які формують складну функціональну мережу. Серед найважливіших інтегральних білків еритроцитів — білки смуги 3 (band 3), які виконують функцію аніонного обміну, забезпечуючи транспорт бікарбонату й хлоридів, та глікофорини, відповідальні за негативний заряд поверхні клітини та взаємодії з глікокаліксом [12]. Периферичні білки — зокрема, спектрин, анкірин та актин — формують субмембранний цитоскелет, що підтримує двоввігнуту форму еритроцита і забезпечує його деформабельність [13]. Зв'язок між спектрином і анкірином є критичним для збереження мембранної стабільності; порушення цього зв'язку спостерігається при спадкових мембранопатіях, таких як сфероцитоз.

Особливу увагу заслуговує глікокалікс — вуглеводне покриття зовнішньої поверхні мембрани, утворене залишками сіалових кислот, зв'язаними з білками й ліпідами [14]. Він бере участь у міжклітинних взаємодіях, забезпечує імунологічну ідентифікацію, а також створює бар'єр проти неспецифічних взаємодій з іншими клітинами й поверхнями, включаючи ендотелій. Пошкодження або зменшення товщини глікокаліксу

може призводити до підвищеної адгезії та агрегації клітин, що підвищує ризик мікросудинних ускладнень.

Важливо також зазначити, що структурна цілісність усіх трьох компонентів мембрани має критичне значення для життєздатності еритроцитів. Зміни в ліпідному складі, порушення білкового каркасу або деградація глікокаліксу призводять до зниження механічної стійкості клітини, підвищення її агрегації та гемолізу — особливо за умов тривалого зберігання [15].

Можна зробити висновок, що плазматична мембрана еритроцита є не лише бар'єром, але й активним учасником процесів, що визначають функціональну стабільність клітини, а її ультраструктура — перспективною мішенню для нанотехнологічного втручання з метою пролонгації терміну зберігання.

1.2. Механізми деградації клітинної мембрани в умовах зберігання

Зберігання еритроцитів у вигляді консервованої крові або еритроцитарної маси супроводжується поступовими морфофункціональними змінами, які відомі як «зберігальні ушкодження» (storage lesions). До них належать зниження рівнів АТФ і 2,3-бісфосфогліцерату, окисне ушкодження структурних білків і ліпідів мембрани, активація фосфоліпазного каскаду, порушення деформабельності та осмотичної резистентності клітин. Такі зміни значно знижують ефективність транспорту кисню, збільшують ризик гемолізу, а продукти деградації можуть чинити імуногенну або токсичну дію, особливо в пацієнтів із тяжкою супутньою патологією. Комплекс цих ушкоджень формується вже на ранніх етапах зберігання і має тенденцію до прогресивного накопичення, що обумовлює обмежений термін зберігання еритроцитів навіть за умов сучасної консервації.

Зниження рівня АТФ та 2,3-БФГ:

Під час зберігання еритроцитів рівень АТФ зменшується через уповільнення гліколізу, що призводить до порушення активного транспорту

іонів та дестабілізації цитоскелету. Унаслідок цього клітини втрачають біконкаву форму, що підвищує їхню схильність до фагоцитозу та знижує виживаність після трансфузії [16]. Зменшення АТФ також послаблює функціонування іонних насосів, зокрема Na^+/K^+ -АТФази, що призводить до порушення іонного гомеостазу, набряку клітини та підвищення ризику спонтанного гемолізу. Також спостерігається зниження 2,3-бісфосфогліцерату (2,3-БФГ), що спричиняє зростання спорідненості гемоглобіну до кисню й обмежує його віддачу тканинам [17]. Ці зміни критично впливають на клінічний результат гемотрансфузії, особливо в умовах тканинної гіпоксії. Крім того, низький рівень 2,3-БФГ може зберігатися навіть після трансфузії протягом кількох годин, що обмежує терапевтичну ефективність донорської крові.

Окисне ушкодження білків і ліпідів мембрани:

Одним із центральних механізмів деградації мембрани є накопичення активних форм кисню (АФК), які ініціюють ліпідну пероксидацію. Вільнорадикальні реакції пошкоджують ненасичені жирні кислоти фосфоліпідів, що призводить до зниження плинності мембрани та порушення її цілісності [18]. Пероксидовані ліпіди можуть змінювати фазовий стан мембрани, підвищуючи її жорсткість і схильність до мікровезикуляції. Крім того, окиснення білків, таких як спектрин, анкірин, викликає їх агрегацію, що знижує деформабельність клітини й ускладнює проходження капілярів [19]. Відомо, що окиснені білки втрачають здатність до зв'язування з цитоскелетом, що призводить до нестабільності мембранного каркасу. Утворення метгемоглобіну та геміхромів також сприяє додатковому ушкодженню мембранного скелету [20]. Метгемоглобін, втрачаючи здатність до транспорту кисню, виступає як джерело додаткових прооксидантних факторів, що поглиблює оксидативний стрес.

Активація каскадів фосфоліпідної деградації:

Під впливом АФК активуються ферменти, зокрема фосфоліпаза А₂, що розщеплює фосфоліпіди мембрани до лізофосфоліпідів та вільних жирних

кислот. Ці продукти мають детергентні властивості й ушкоджують мембрану, спричиняючи мікровезикуляцію та підвищення гемолізу [21]. Особливо небезпечною є активність фосфоліпази у пізні терміни зберігання, коли знижені рівні антиоксидантних систем, таких як глутатіон, вже не здатні нейтралізувати продукти ліпідного гідролізу. Активація каскаду супроводжується вивільненням біоактивних ліпідів, таких як лізофосфатидилхолін, які можуть мати прозапальний або імуномодулюючий ефект, що негативно впливає на реципієнта при переливанні.

Зміна осмотичної резистентності та деформабельності:

Втрата енергії клітиною та структурна дестабілізація мембрани призводять до зниження її здатності адаптуватися до осмотичних коливань. Еритроцити стають більш жорсткими, часто набувають сферичної форми і втрачають здатність до деформації в мікроциркуляторному руслі [22]. Це у свою чергу значно знижує їхню життєздатність після трансфузії і підвищує ймовірність передчасного руйнування в селезінці. Нездатність проходити крізь вузькі капіляри спричиняє мікроциркуляторні порушення, які особливо критичні при масивних крововтратах або у пацієнтів з тяжкими соматичними захворюваннями.

Імуногенний та токсичний ефект продуктів деградації:

Продукти деградації — мікровезикули, окиснені ліпіди, змінені білки — можуть стимулювати імунну відповідь у реципієнта. Вони розглядаються імунною системою як потенційні антигени, що може спричинити алоїмунізацію, фебрильні реакції або навіть системні ускладнення [23]. Особливо це небезпечно в пацієнтів з імунодефіцитами чи аутоімунними захворюваннями, де будь-який додатковий стимул може мати клінічно значимі наслідки. Крім того, мікровезикули здатні взаємодіяти з ендотелієм, активуючи коагуляційний каскад і сприяючи розвитку тромботичних ускладнень. Окиснені продукти, присутні у консервованій крові, можуть також впливати на функцію лейкоцитів і ендотеліальних клітин, викликаючи локальне запалення й ендотеліальну дисфункцію [24,25].

Таким чином, деградація клітинної мембрани еритроцитів під час зберігання є багатофакторним процесом, що включає енергетичні, окисні, ферментативні та імунологічні механізми. Розуміння цих змін є критично важливим для розробки нових підходів до покращення якості консервованих еритроцитів, зокрема із використанням нанотехнологічних методів стабілізації мембранних структур.

1.3. Поняття "storage lesions" та їх клінічне значення

Як вже зазначалося, зберігання еритроцитів поза організмом є складним процесом, що супроводжується поступовими морфологічними, біохімічними та функціональними змінами. І саме сукупність цих змін, які відбуваються у клітинах крові під час зберігання, називаються «зберігальні ушкодження» (англ. storage lesions). Незважаючи на вдосконалення консервувальних середовищ, навіть за оптимальних умов зберігання ці процеси є неминучими та можуть суттєво впливати на ефективність трансфузійної терапії.

Серед основних проявів зберігальних ушкоджень найчастіше фіксуються: зниження рівня аденозинтрифосфату (АТФ) та 2,3-бісфосфогліцерату (2,3-БФГ), підвищення оксидативного стресу, зміни кислотно-основного балансу, активація фосфоліпазних каскадів, порушення структурної цілісності клітинної мембрани, а також зміни в експресії поверхневих білків [26,27].

Зниження АТФ пов'язане з пригніченням гліколітичної активності в умовах охолодження. У результаті зменшується активність Na^+/K^+ -АТФази та Ca^{2+} -АТФази, що веде до дисбалансу іонного складу, набряку клітин, порушення осмотичного гомеостазу й втрати деформабельності мембрани [15]. Ці зміни знижують здатність еритроцитів ефективно проходити через капіляри та посилюють ризик їх механічного ушкодження у кровоносному руслі.

Зниження рівня 2,3-БФГ має не менш важливі наслідки: цей метаболіт знижує спорідненість гемоглобіну до кисню, сприяючи його вивільненню в

тканинах. При його дефіциті спостерігається зсув кривої дисоціації оксигемоглобіну вліво, що ускладнює транспортування кисню та знижує ефективність оксигенації органів після переливання [28].

Окремої уваги заслуговує оксидативне ушкодження — одна з ключових ланок патогенезу зберігальних ушкоджень. У процесі зберігання в еритроцитах накопичуються активні форми кисню (АФК), які ініціюють перекисне окислення ліпідів мембрани та змінюють структуру мембранних білків. Це призводить до утворення малонового діальдегіду, 4-гідроксиноненалу та інших цитотоксичних продуктів, які погіршують механічні властивості мембрани та сприяють її фрагментації [29].

Окиснена мембрана стає мішенню для імунної системи — змінюється заряд поверхні, втрачається антиген CD47 («сигнал не поглинати»), зменшується глікозилування мембранних білків, що веде до активації фагоцитозу в селезінці та печінці [23]. Як наслідок, перелиті еритроцити мають коротший період циркуляції, що знижує клінічну ефективність трансфузії та може вимагати повторного переливання.

Морфологічно ці ушкодження проявляються у вигляді появи ехіноцитів, сфероцитів та анізоцитів. Такі клітини менш гнучкі, схильні до агрегації та не здатні ефективно виконувати транспортну функцію. Під мікроскопом спостерігається підвищення частоти еритроцитів із загостреними відростками або сферичною формою, що свідчить про втрату нормальної біконкавної структури [30].

Зростання рівня оксидативного стресу також супроводжується підвищеним вивільненням вільного гемоглобіну, гема та заліза, які мають прооксидантні властивості. Це посилює системне запалення, викликає ушкодження ендотелію та збільшує ризик розвитку тромбозів, ниркової недостатності та органної дисфункції у вразливих пацієнтів [31,32].

У клінічному контексті зберігальні ушкодження асоціюються з такими ускладненнями, як зменшення посттрансфузійного виживання еритроцитів, підвищення рівня лактатдегідрогенази, розвиток гемолітичних реакцій,

активація імунної відповіді, а також зниження ефективності трансфузії у пацієнтів з тяжкою соматичною патологією [28,33].

1.4. Клінічні наслідки зниження життєздатності еритроцитів

Зниження життєздатності еритроцитів — зумовлене як змінами, що відбуваються під час зберігання, так і факторами, пов'язаними з фізіологічним старінням або патологічними станами — має широкі клінічні наслідки, що можуть суттєво вплинути на результат лікування пацієнтів, особливо в умовах критичних станів.

Одним із першочергових наслідків зниження життєздатності еритроцитів є погіршення кисневої доставки до тканин. Це обумовлено, зокрема, зниженням концентрації 2,3-бісфосфогліцерату (2,3-БФГ), який регулює спорідненість гемоглобіну до кисню. За низьких рівнів 2,3-БФГ афінність гемоглобіну до кисню зростає, що унеможлиблює його ефективне вивільнення в периферичних тканинах [15]. У клінічному контексті це може призвести до зниження насичення киснем життєво важливих органів, особливо в умовах гіпоксії, наприклад, під час операцій, сепсису чи поліорганної недостатності.

Крім того, втрати АТФ і структурні ушкодження мембрани сприяють зниженню деформабельності еритроцитів, що веде до порушення мікроциркуляції, особливо в капілярах із низьким просвітом, як це характерно для нирок, мозку та сітківки ока [34]. Втрата здатності клітин до змін форми у відповідь на механічне навантаження є критичним фактором, що обмежує їхній функціональний ресурс. Нездатність таких еритроцитів ефективно проходити крізь мікросудини сприяє формуванню зон ішемії, а також викликає вторинне ушкодження ендотелію та посилює оксидативний стрес у тканинах.

У клінічній практиці зниження життєздатності еритроцитів асоціюється з коротшим посттрансфузійним виживанням клітин. Згідно з даними клінічних досліджень, вже через 24 години після трансфузії значна частина «старих»

еритроцитів, які зазнали зберігальних ушкоджень, елімінується із циркуляції фагоцитами системи мононуклеарних макрофагів [28]. Це значно знижує ефективність гемотрансфузії, змушуючи клініцистів вдаватися до повторного введення додаткових доз компонентів крові, що, своєю чергою, підвищує ризик побічних реакцій, алоїмунізації та інфекційних ускладнень.

Крім безпосередніх функціональних втрат, порушення цілісності мембран призводить до вивільнення вільного гемоглобіну, калію, заліза та інших внутрішньоклітинних компонентів у плазму. Це може викликати низку небажаних ефектів, зокрема гемоліз, судинну дисфункцію, підвищення рівня вільного заліза (що сприяє бактеріальному росту) та оксидативний стрес. Вільний гемоглобін зв'язується з оксидом азоту (NO), знижуючи його біодоступність і сприяючи вазоконстрикції, що ще більше погіршує тканинну перфузію [35, 36].

У пацієнтів із важкими супутніми патологіями, такими як сепсис, онкопатологія, тяжка хронічна ниркова недостатність або імунодефіцити, наявність в організмі продуктів деградації еритроцитів може стати тригером системної запальної відповіді. Так званий “трансфузійно-індукований запальний синдром” (TIPS) характеризується підвищеним рівнем прозапальних цитокінів, активацією ендотелію та тромбоцитів, що сприяє розвитку тромбозу, поліорганної недостатності та погіршенню прогнозу госпіталізованих пацієнтів [37]. Патофізіологічно TIPS розвивається внаслідок дії ендогенних молекул небезпеки (DAMPs), що виділяються з ушкоджених еритроцитів і активують Toll-подібні рецептори імунних клітин.

Особливо чутливими до наслідків низької життєздатності еритроцитів є новонароджені, зокрема недоношені діти, та пацієнти з порушенням функцій печінки або селезінки. В цих групах пацієнтів навіть незначне підвищення концентрації вільного гемоглобіну або заліза може призводити до тяжких ускладнень, зокрема метгемоглобінемії або гепатоспленомегалії. Знижена активність ферментативних систем детоксикації у таких пацієнтів ускладнює

кліренс токсичних метаболітів, що робить їх надзвичайно вразливими до оксидативного ушкодження та органної дисфункції.

Зміни, що відбуваються в еритроцитах під час зберігання, мають чітко виражену часову динаміку [34], що відображається в показниках клітинного метаболізму, структури мембран та посттрансфузійної ефективності; наведені у таблиці 1.1.

Таблиця 1.1.

Зміни показників еритроцитів під час зберігання та їхній вплив на клінічні результати

Показник	1 день	7 днів	14 днів	21 день	35 днів	Клінічні наслідки
Рівень 2,3-БФГ (ммоль/л)	8.5	6.1	4.4	3.2	1.7	Зниження здатності до вивільнення кисню з гемоглобіну, погіршення кисневої доставки в тканини
Рівень АТФ (ммоль/л)	4.2	3.8	3.2	2.4	1.1	Порушення функції іонних насосів, зниження деформабельності еритроцитів
Концентрація вільного	0.01	0.03	0.08	0.12	0.15	Гемоліз, токсичний ефект для органів, підвищення

гемоглобіну (г/л)						ризик розвитку гострих ушкоджень нирок
Пошкодження мембрани (на основі щільності LPO)	Низьке	Середнє	Високе	Високе	Дуже високе	Оксидативне ушкодження мембран, зниження стабільності еритроцитів, активація фагоцитозу
Наявність ехіноцитів (%, кількість на 1000 клітин)	1.0	2.5	4.8	6.0	7.5	Порушення форми клітини, зниження здатності до проходження через капіляри
Вживання еритроцитів після трансфузії (%)	95	92	85	72	58	Зниження ефективності трансфузії, збільшення потреби в повторних переливаннях
Час циркуляції	24	22	19	16	12	Зниження тривалості циркуляції,

еритроцитів (години)						підвищення ймовірності гемолізу та тромбообразуван ня
-------------------------	--	--	--	--	--	---

1.5. Методи консервації еритроцитів

1.5.1. Хімічні методи

Традиційні консерванти

Одним із ключових напрямів у забезпеченні збереження еритроцитарної маси є використання консервувальних розчинів, що підтримують життєздатність клітин *in vitro* протягом визначеного терміну зберігання. Основна їх мета полягає в уповільненні метаболічних процесів, запобіганні гемолізу, стабілізації рН, збереженні енергетичного потенціалу (рівня АТФ) та підтримці цілісності мембран клітин [38].

У клінічній практиці найчастіше застосовуються розчини-консерванти:

CPDA-1 (цитрат-фосфат-декстроза-аденін) — класичний склад, що дозволяє зберігати еритроцити до 35 діб. Цитрат виконує функцію антикоагулянта, фосфат підтримує кислотно-лужну рівновагу, декстроза служить джерелом енергії для гліколізу, а аденін — для синтезу АТФ [39].

SAGM (салин-аденін-глюкоза-манітол) — удосконалений розчин, який дозволяє продовжити термін зберігання до 42 діб. Манітол у його складі діє як осмопротектор і стабілізатор мембран, знижуючи рівень гемолізу [40].

PAGGSM — модифікована версія SAGM з додаванням гуанідина та підвищеним вмістом фосфатів, що сприяє покращенню енергетичного статусу еритроцитів. Дослідження показують, що PAGGSM забезпечує вищий рівень АТФ і 2,3-бісфосфогліцерату, ніж CPDA-1 [41].

Також використовуються:

AS-1 (Adsol) — один із найбільш поширених адитивних розчинів, що містить салін, глюкозу, аденін та манітол. Дозволяє зберігати еритроцити до 42 діб, аналогічно SAGM. Манітол виконує захисну функцію, зменшуючи ушкодження мембран, тоді як глюкоза й аденін забезпечують підтримку метаболічної активності клітин [42].

AS-3 (Nutricel) — розчин, що включає цитрат, фосфат, глюкозу та аденін. На відміну від AS-1, не містить манітолу, проте характеризується нижчим рівнем гемолізу при тривалому зберіганні. Завдяки цитрату, AS-3 також має помірну буферну здатність і антикоагулянтні властивості [43].

AS-5 (Optisol) — подібний за складом до AS-1, але з вищою концентрацією глюкози, що сприяє активнішому гліколізу. Цей розчин забезпечує кращу стабільність клітин протягом усього терміну зберігання, особливо при температурі +2...+6 °C [44].

MAP (манітол-аденін-фосфат) — розчин, що демонструє ефективність у підтримці морфології та функціонального стану еритроцитів завдяки поєднанню осмозахисних, енергетичних та буферних компонентів. Часто застосовується в Європі як альтернатива SAGM [15].

Попри свою ефективність, ці розчини не забезпечують повного захисту від структурних ушкоджень мембран еритроцитів. Навіть за оптимальних умов зберігання спостерігається поступове зниження концентрації АТФ і 2,3-БФГ, що критично впливають на деформабельність клітин і здатність гемоглобіну зв'язувати кисень [45]. Крім того, накопичуються продукти метаболізму (наприклад, лактат), зростає осмотична крихкість та активуються процеси мікровезикуляції, що є передумовою до апоптозу клітин [46].

Ще одним суттєвим обмеженням традиційних консервантів є їх недостатня здатність протидіяти окисному стресу — одному з основних чинників ушкодження клітинних мембран під час зберігання. Вільні радикали сприяють перекисному окисненню ліпідів, ушкодженню білкових структур і порушенню проникності мембран. Це знижує потенціал тривалого зберігання

та ускладнює відновлення повноцінної функціональності еритроцитів після трансфузії [15]. У зв'язку з цим наразі ведуться активні дослідження щодо включення антиоксидантів (глутатіону, вітаміну Е) у консервувальні середовища, а також використання наночастинок для стабілізації мембранного середовища [47].

Антиоксиданти

Окислювальний стрес є одним із ключових факторів деградації еритроцитів під час зберігання, спричиняючи пошкодження мембран, зниження гнучкості клітин та індукцію гемолізу. У зв'язку з цим, використання антиоксидантів як адитивів до консервувальних розчинів набуває дедалі більшого значення. Сучасні дослідження зосереджені як на класичних сполуках, так і на новітніх нанотехнологіях.

Вітамін Е (альфа-токоферол) є одним з найефективніших природних ліпофільних антиоксидантів, що вбудовується в мембрану еритроцитів, стабілізуючи ліпідні бішари та запобігаючи перекисному окисненню. При додаванні до консервувальних розчинів, зокрема Adsol, він здатен зменшувати рівень гемолізу до 40% після 42 днів зберігання [48,49]. Комбіноване застосування вітаміну Е з аскорбіновою кислотою (вітаміном С), що діє у водному середовищі, демонструє синергічний ефект: одночасний захист як ліпідів, так і гідрофільних компонентів мембрани [50].

Поліфенольні сполуки, зокрема катехіни, які входять до складу екстрактів зеленого чаю, здатні нейтралізувати активні форми кисню (АФК) та захищати мембрани еритроцитів від окислювального пошкодження. Їхній механізм дії полягає у донорстві електронів та стабілізації вільних радикалів, що запобігає пероксидній деградації ліпідів. Встановлено, що додавання катехінів до середовищ зберігання значно знижує рівень перекисів та продовжує функціональну життєздатність клітин [51,52].

Також останніми роками значну увагу привертають **наночастинки оксиду церію (CeO_2)**, які проявляють високі антиоксидантні властивості завдяки здатності змінювати валентний стан ($\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$) у каталітичному циклі.

Ці наночастинки здатні ефективно відновлювати АФК, включно з супероксидом та перекисом водню, і тим самим попереджати окислення мембранних компонентів [53].

Комбіновані антиоксидантні системи

Особливий науковий інтерес наразі викликають підходи, що поєднують антиоксидантний захист з підтримкою метаболічної активності клітин. Одним з прикладів комбінованої антиоксидантної системи є використання наночастинок оксиду церію (CeO_2) у поєднанні з вітаміном Е та аденозином. Оксид церію володіє сильними антиоксидантними властивостями завдяки своїй здатності змінювати валентний стан ($\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$) під час каталітичного циклу, що дозволяє ефективно нейтралізувати активні форми кисню (АФК), зокрема супероксидні радикали та перекис водню. Це у свою чергу дозволяє зменшити ризик окислювального пошкодження мембран. Вітамін Е, в свою чергу, стабілізує ліпідні бішари мембрани, запобігаючи їх перекисному окисненню, а аденозин забезпечує підтримку енергетичного метаболізму еритроцитів [41].

1.5.2. Фізіологічні методи

Фізіологічні методи консервації ґрунтуються на використанні оптимізованих температурних режимів та технологій, які не змінюють біохімічний склад середовища, в якому зберігаються клітини, а також мінімізують пошкодження їх мембран і внутрішньоклітинних структур.

Гіпотермічне зберігання

Гіпотермічне зберігання еритроцитів при температурі $+2\dots+6^\circ\text{C}$ є одним з найбільш використовуваних методів зберігання крові в сучасній трансфузіології. Він забезпечує ефективне уповільнення метаболічних процесів в клітинах, що дозволяє значно продовжити їх збереження. Уповільнення метаболізму зменшує потребу еритроцитів в енергії та кислороді, що дозволяє зберігати їх життєздатність протягом кількох тижнів чи навіть місяців (в залежності від складу консервувального розчину) [46].

Гіпотермічне зберігання еритроцитів забезпечує оптимальні умови для збереження їх функціональних характеристик. При температурі 2-6°C, еритроцити залишаються стабільними, оскільки при низьких температурах уповільнюються всі біохімічні реакції, що відбуваються в клітинах. У свою чергу це дозволяє знизити швидкість розпаду клітинних компонентів і уповільнити процеси, пов'язані з накопиченням токсичних продуктів обміну, таких як лактат та іони водню [47]. Також метод сприяє збереженню структурної цілісності еритроцитів, що важливо для підтримки їх здатності до деформації в кровообігу. Це дозволяє еритроцитам виконувати свою основну функцію – транспортувати кисень до тканин організму [48].

Одним з основних умов для успішного гіпотермічного зберігання є використання консервувальних розчинів, які допомагають підтримувати стабільність еритроцитів у холодному середовищі. Розчини, такі як CPDA-1 (цитрат-фосфат-декстран-аденін) або більш сучасні варіанти, як PAGGSM, забезпечують оптимальні умови для збереження еритроцитів, знижуючи ризик їх пошкодження та підтримуючи життєдіяльність клітин [42].

Кріоконсервація

Кріоконсервація еритроцитів — це метод тривалого зберігання клітин крові за дуже низьких температур із використанням речовин, які запобігають утворенню кристалів льоду всередині клітин, що може призвести до механічного пошкодження клітинних мембран — кріопротекторів [54]. Одними з найпоширеніших кріопротекторів на сьогодні є гліцерин, диметилсульфоксид (DMSO) та пропіленгліколь.

Гліцерин

Є одним з найбільш вивчених і ефективних кріопротекторів, що використовується для збереження еритроцитів. Механізм його дії полягає в здатності зв'язувати воду, що зменшує ймовірність утворення льодових кристалів всередині клітини при заморожуванні. Це дозволяє підтримувати структурну цілісність клітинних мембран, знижуючи механічне навантаження на еритроцити під час кріоконсервування. Проте важливо ретельно

контролювати концентрацію гліцерину в консервуючому розчині, оскільки її надмірна кількість може спричинити осмотичний стрес і призвести до пошкодження клітин.

Згідно результатам дослідження, відображених в таблиці 1.2, проведеними на моделях заморожування еритроцитів [55], було встановлено, що концентрація гліцерину та температурний режим зберігання суттєво впливають на виживаність клітин після розморожування.

Таблиця 1.2

Результати дослідження ефективності заморожування еритроцитів за різних температурних режимів

Показник	при -40°C	при -80°C
Відсоток гемолізу	0,06%	0,53%
Вміст гемоглобіну в дозі	49,5 г	18,4 г
Відсоток збережених еритроцитів	83,8%	31,1%

Таким чином, оптимальна температура для збереження клітин з використанням гліцерину складає -40°C. При цьому, еритроцити, збережені при -40°C, показують значно кращі морфофункціональні характеристики порівняно з клітинами, збереженими при -80°C.

Диметилсульфоксид (DMSO)

Зазвичай застосовуються концентрації DMSO в межах 5–10%, що дозволяє досягти оптимального балансу між ефективністю кріозахисту та підтримкою метаболічної стабільності клітин.

У одному дослідженні було порівняно ефективність двох кріопротекторів — 10% DMSO та 20% гліцерину — для збереження еритроцитів курей породи Амергаусана [56]. Після двомісячного зберігання в

рідкому азоті оцінювалися показники відновлення клітин, їх осмотична стабільність, рівень апоптозу та морфологічні зміни.

Таблиця 1.3

Порівняльні показники ефективності кріопротекторів – 20% гліцерину та 10% DMSO при збереженні еритроцитів

Кріопротектор	Відновлення клітин (%)	Осмотична стабільність (%)	Рівень апоптозу (%)
20% Гліцерин	99,71 ± 0,04	94,5 ± 0,3	1
10% DMSO	98,9 ± 0,05	96,1 ± 0,25	3

Результати показали, що 10% DMSO забезпечує високу осмотичну стабільність еритроцитів після розморожування та низький рівень апоптозу, що свідчить про ефективний захист клітинних мембран. Хоча 20% гліцерин демонстрував дещо вищий відсоток відновлення клітин, осмотична стабільність була нижчою порівняно з DMSO.

Пропіленгліколь (1,2-пропандіол)

У іншому дослідженні було порівняно ефективність 1,2-пропандіолу та гліцерину як кріопротекторів для еритроцитів людини. Еритроцити охолоджували в буферних розчинах, що містили різні концентрації (10–35% мас./мас.) 1,2-пропандіолу або гліцерину, до температури -196°C з різними швидкостями охолодження (від 1 до 3500°C/хв), після чого швидко розморожували [57]. Вживаність клітин оцінювали після розморожування.

Таблиця 1.4

Показники виживаності клітин за використання 1,2-пропандіолу та гліцерину

Кріопротектор	Концентрація (% мас./мас.)	Швидкість охолодження (°C/хв)	Вживаність клітин (%)

1,2-пропандіол	15	1	Вища, ніж у гліцерину
Гліцерин	15	1	Нижча, ніж у 1,2-пропандіолу
1,2-пропандіол	20	3500	Вища, ніж у гліцерину
Гліцерин	20	3500	Нижча, ніж у 1,2-пропандіолу

Результати показують, що при низьких швидкостях охолодження (де ушкодження клітин обумовлені ефектами розчину), 1,2-пропандіол забезпечував кращий захист еритроцитів, ніж гліцерин, при однакових концентраціях.

Ліофілізація

Ліофілізація (сублімаційне висушування) є ще одним методом тривалого зберігання еритроцитів з видаленням води з клітинного середовища шляхом заморожування з наступною сублімацією льоду в умовах вакууму. Цей процес дозволяє мінімізувати механічне пошкодження мембран та зберегти структурну цілісність клітин при тривалому зберіганні за кімнатної температури [58]. Основною перевагою ліофілізації є можливість зберігати еритроцити без необхідності охолодження, що значно спрощує транспортування та використання клітин у польових умовах або при надзвичайних ситуаціях.

Процес ліофілізації включає кілька етапів: заморожування еритроцитарної маси, первинне сублімаційне висушування (видалення незв'язаної води) та вторинне висушування (видалення пов'язаної води). Одним із критичних аспектів успішної ліофілізації є використання захисних агентів: кріо- та ліопротекторів (наприклад, трегалоза, сахароза або поліетиленгліколь), які у свою чергу стабілізують клітинні мембрани та запобігають утворенню великих кристалів льоду [59].

Експериментальні дослідження показують, що додавання трегалози значно підвищує виживаність еритроцитів після ліофілізації та відновлення. Наприклад, у одній роботі було продемонстровано, що використання 0,5 М трегалози дозволяє зберегти до 70–80% життєздатних клітин після процесу сублімації і регідратації [58].

Таблиця 1.5

Ефективність різних протекторних систем при ліофілізації еритроцитів:

Варіант захисту	Вживаність клітин після відновлення (%)	Примітки
Без захисників	<5%	Значний гемоліз
Трегалоza 0,5 М	70–80%	Висока стабільність мембран
Сахароза 0,5 М	60–65%	Помірна ефективність
Трегалоza + PEG	80–85%	Синергетичний захист

1.5.3. Порівняльний аналіз хімічних та фізичних методів

Було з'ясовано, що існує два основні підходи до консервації еритроцитів — хімічні та фізичні, кожен з яких має свої переваги та обмеження.

Хімічні методи базуються на застосуванні спеціальних консервувальних розчинів, які підтримують життєздатність еритроцитів шляхом регуляції рН, запобігання гемолізу, стабілізації енергетичного обміну та захисту мембран клітин.

Переваги хімічних підходів полягають у їх простоті, стандартизації та можливості масштабного застосування в умовах медичних закладів. Однак ці методи мають свої обмеження: навіть у присутності буферів та енергетичних компонентів з часом знижується рівень АТФ і 2,3-БФГ, зростає осмотична

крихкість мембран, активуються процеси мікровезикуляції. Крім того, більшість стандартних розчинів не забезпечують захист від окисного стресу.

З метою підвищення ефективності хімічної консервації наразі розробляються нові антиоксидантні системи, які включають вітамін Е, поліфеноли або наночастинки оксиду церію. Такі добавки дозволяють значно знизити рівень гемолізу і краще зберегти функціональну активність клітин. Комбіновані підходи (наприклад, CeO_2 + вітамін Е + аденозин) демонструють синергічну дію і відкривають перспективи для подовження строку зберігання крові без значної втрати її якості.

Фізичні методи включають гіпотермічне зберігання, кріоконсервацію та ліофілізацію. Їх перевага полягає в мінімальному впливі на хімічний склад еритроцитів та можливості довготривалого зберігання.

Гіпотермія ($2-6^\circ\text{C}$) є стандартом у практичній трансфузіології. Вона уповільнює метаболізм клітин, знижуючи потребу в енергії, та дозволяє зберігати клітини до 42 діб при використанні відповідних розчинів. Проте навіть за таких умов відбувається поступове накопичення продуктів метаболізму та зниження функціональності клітин.

Кріоконсервація дозволяє зберігати еритроцити роками, використовуючи кріопротектори (гліцерин, DMSO, пропіленгліколь). При температурі -40°C спостерігається найкраще співвідношення між збереженням морфології та мінімальним гемолізом. DMSO забезпечує високу осмотичну стабільність і нижчий рівень апоптозу порівняно з гліцерином, хоча останній демонструє кращий відсоток відновлення. Пропіленгліколь за певних умов забезпечує ще вищу виживаність клітин.

Ліофілізація — новітній метод, який дозволяє зберігати еритроцити без охолодження. Використання трегалози, сахарози чи поліетиленгліколю під час сублімаційного висушування сприяє високій виживаності клітин після відновлення. Однак процес є технологічно складним і наразі обмежено застосовується у практиці.

Хоча традиційні методи, як хімічні, так і фізичні, мають свої переваги і активно використовуються в сучасній медичній практиці, важливо зазначити, що жоден з них не здатний забезпечити повну стабільність молекулярної структури мембранних ліпідів і білків еритроцитів на рівні, необхідному для підтримки їх функціональної цілісності протягом тривалого зберігання. Ці зміни в структурі мембран можуть призводити до зниження здатності еритроцитів до транспорту кисню та підвищення рівня гемолізу.

Отже, хоча хімічні методи залишаються основою трансфузіології завдяки простоті та стандартизації, фізичні методи, зокрема кріоконсервація та ліофілізація, демонструють значно вищий потенціал для збереження функціональних властивостей еритроцитів при довготривалому зберіганні. Однак жоден із цих традиційних методів не вирішує проблему стабільності молекулярної структури мембран, що є критично важливим для збереження функціональної активності клітин.

1.6. Види наночастинок та їх біоактивні властивості

Наночастинки (НЧ) є однією з ключових складових сучасних біомедичних технологій, зокрема у сфері збереження клітин крові. Завдяки своєму нанорозміру (1–100 нм), високій площі поверхні та здатності до функціоналізації, наночастинки демонструють широкий спектр біоактивних властивостей, які можуть бути корисними для стабілізації еритроцитів під час їх тривалого зберігання. Особливу увагу в цьому контексті привертають наночастинки металів, оксидів металів, полімерні наноструктури та ліпосомальні комплекси, що володіють антиоксидантною, мембраностабілізуючою, протизапальною та бактерицидною активністю.

Серед найбільш перспективних типів наночастинок варто відзначити наночастинки оксиду заліза, а саме магнетиту (Fe_3O_4), які проявляють виражені антиоксидантні властивості. Як вже зазначалось, завдяки здатності до зв'язування активних форм кисню (АФК) вони ефективно знижують інтенсивність перекисного окислення ліпідів мембран еритроцитів, зберігають

структурну цілісність білкових компонентів та перешкоджають активації апоптотичних механізмів. Крім того, наночастинки магнетиту проявляють біоінертність та високу сумісність з клітинними мембранами, що є критично важливим фактором у трансфузіології [59].

Іншим прикладом наноматеріалів є наночастинки діоксиду церію (CeO_2), які мають здатність імітувати активність ферментів антиоксидантного захисту, таких як супероксиддисмутаза і каталаза. Завдяки унікальному механізму саморегенерації поверхні вони нейтралізують як супероксидні, так і пероксидні радикали, зменшуючи таким чином оксидативний стрес у середовищі зберігання крові [60].

У свою чергу, срібні та золоті наночастинки також демонструють значні біологічні ефекти, насамперед антибактеріальні, що дозволяє застосовувати їх для профілактики мікробного контамінування крові. Проте відомо, що надмірне накопичення срібла в клітинах може спричинити цитотоксичність, що обмежує їх використання у трансфузіології без попередньої функціоналізації або інкапсуляції [61].

Полімерні наночастинки та наноліпосоми мають потенціал як транспортні системи для цільової доставки антиоксидантів, стабілізаторів мембран або гліколітичних коферментів. Наприклад, інкапсуляція вітаміну E, глутатіону або NAD^+ у полімерні носії дозволяє подовжити активність цих сполук у консервувальних розчинах і забезпечити повільне вивільнення активних речовин, що підтримує життєздатність еритроцитів [62].

Варто також згадати карбонові наноматеріали, такі як графен і вуглецеві нанотрубки, які, попри значний потенціал у сенсорних технологіях та електрохімічному моніторингу, мають обмежене застосування в зберіганні еритроцитів через їхню високу реакційну здатність і можливу токсичність [63].

Загалом, сучасні дослідження доводять, що застосування наночастинок у середовищах для зберігання еритроцитів позитивно впливає на збереження їх морфологічної та функціональної цілісності. Наприклад, при додаванні

наночастинок магнетиту до стандартного консервувального середовища спостерігалось значне зниження рівня гемолізу, стабілізація рівнів АТФ та 2,3-бісфосфогліцерату, збереження біфосфоліпідного шару та підвищення посттрансфузійної виживаності еритроцитів [64].

Ці ефекти обумовлені комплексною дією наночастинок на біомолекули клітинної мембрани, зниженням інтенсивності перекисного стресу та підтримкою енергетичного метаболізму клітин.

Таким чином, використання наночастинок як біоактивних агентів відкриває нові перспективи для розробки інноваційних стратегій пролонгації термінів зберігання еритроцитів з мінімізацією зберігальних ушкоджень.

Серед вищезазначених типів наночастинок, що вивчаються для біомедичних застосувань, особливо привертає увагу завдяки своїм властивостям саме магнетит (Fe_3O_4). Для системного аналізу ефективності магнетиту порівняно з іншими типами наночастинок була створена узагальнююча таблиця, в якій наведені ключові критерії оцінки їх біоактивних властивостей.

Таблиця 1.6

**Ключові критерії оцінки біоактивних властивостей наночастинок
(магнетит, полімерних, ліпосом, срібних, золотих)**

Тип наночастинок	Антиоксидантна активність	Біосумісність	Стабілізація мембран	Токсичність при зберіганні
Магнетит (Fe_3O_4)	Висока	Висока	Висока	Низька (при контрольованих дозах)
Полімерні (PLA, PEG)	Середня	Висока	Середня	Низька
Ліпідні (ліпосоми)	Середня	Висока	Висока	Низька

Срібні (Ag)	Низька	Середня	Низька	Середня– висока
Золоті (Au)	Низька	Висока	Низька	Середня

Проведений порівняльний аналіз демонструє, що наночастинки магнетиту (Fe_3O_4) мають найвищу сумарну ефективність серед досліджених типів наноматеріалів, що використовуються для пролонгації терміну зберігання еритроцитів. У поєднанні з низькою токсичністю в контрольованих концентраціях та високою біосумісністю, магнетит можна вважати найперспективнішим кандидатом серед наноматеріалів для застосування в трансфузіології.

1.7. Характеристика магнетиту (Fe_3O_4)

У межах сучасних нанотехнологій магнетит (Fe_3O_4) набув значної уваги як перспективний матеріал для біомедичних застосувань завдяки поєднанню унікальних магнітних властивостей, високої стабільності та гарної біосумісності. Його використання в галузі біотехнологій, медицини та зокрема трансфузіології обґрунтоване можливістю взаємодії з клітинними структурами без суттєвого цитотоксичного ефекту.

1.7.1. Фізико-хімічні властивості магнетиту

Магнетит (Fe_3O_4) є природним оксидом заліза з інверсною шпінелеподібною структурою, в якій іони Fe^{2+} і Fe^{3+} розміщені у тетраедричних та октаедричних позиціях кристалічної ґратки. Наявність обох форм іонів заліза забезпечує магнетиту електронну провідність та відзначну магнітну активність, що обумовлює його феромагнітні властивості при кімнатній температурі [65]. Завдяки цим структурним особливостям магнетит широко застосовується в наномедицині як платформа для створення функціоналізованих наноматеріалів.

У наноформі (розмір частинок у межах 10–100 нм) магнетит виявляє суперпарамагнітну поведінку, що характеризується відсутністю залишкової намагніченості після припинення дії зовнішнього магнітного поля. Це явище забезпечує стабільність наночастинок у колоїдних системах і зменшує ймовірність їх агрегації, що є важливою умовою для застосування в біологічних рідинах [66–68]. Наночастинки такого розміру також мають значну питому площу поверхні, що сприяє високій ефективності функціоналізації та взаємодії з клітинними структурами [69].

Без додаткової обробки поверхні наночастинки Fe_3O_4 схильні до агрегації, окиснення та утворення нестабільних структур, що обмежує їх біомедичне застосування. З метою підвищення стабільності, біосумісності та контрольованої поведінки у фізіологічних умовах, проводиться функціоналізація поверхні наночастинок полімерними або органічними оболонками. Найбільш поширеними є покриття з декстрану, хітозану, поліетиленгліколю (ПЕГ), альгінату, а також білків, які запобігають агрегації, зменшують токсичність, полегшують транспортування наночастинок у кровотоці та створюють можливість приєднання лігандів для цілеспрямованої доставки [70,71].

1.7.2. Біосумісність магнетиту

Встановлено, що наночастинки магнетиту з інертним покриттям добре переносяться клітинами організму. Вони не спричиняють оксидативного стресу, некрозу чи апоптозу при концентраціях <100 мкг/мл [72]. Додатково вони можуть зв'язувати активні форми кисню, виконуючи антиоксидантну функцію, що особливо важливо у процесі зберігання еритроцитів [73].

Перші біосумісні наночастинки магнетиту для медичного використання в Україні були синтезовані А. М. Білоусовим у 1998 році. До них належать інтракорпоральний нанобіокоректор (ІКНБ), магнітокерований сорбент (МКУ-Б) і біоактивне нанопристрій (Мікромаг-Б) [74]. Ці платформи

проявили виражену модуляторну активність відносно ферментної системи антиоксидантного захисту, а також регуляції метаболізму лейкоцитів [75].

1.7.3. Вплив магнетиту на клітинні мембрани

Експериментальні дослідження продемонстрували, що наночастинки магнетиту формують захисний наношар на клітинній мембрані, знижуючи ризик окисного ушкодження ліпідів і білків. Серед іншого, було встановлено стабілізацію мембранного потенціалу, збереження активності АТФ-аз, зниження гемолізу та підвищення седиментаційної стабільності [76].

Сорбційні властивості наночастинок дають змогу вибірково поглинати білки мембран, стабілізувати рецепторні зони та активність мембранозв'язаних ферментів. Було також показано, що попередня екстракорпоральна обробка крові MCS-B призводить до достовірного зниження активності Ca^{2+} -, Mg^{2+} -залежної АТФ-ази еритроцитів ($p < 0,001$) [77].

1.8. Обмеження сучасних досліджень із використанням наночастинок магнетиту

Слід враховувати ряд певних досліджень, що вказують на обмеження використання магнетиту, які вплинули на ефективність цієї технології. Недоліки включають саме проблеми з гемолізом, морфологічними змінами еритроцитів та необхідністю контролю за фізико-хімічними властивостями наночастинок.

Одним із ключових аспектів, на який звертають увагу дослідники, є гемолітична активність магнетиту. У одній роботі виявили, що при термічній обробці синтезованих магнетитних наночастинок вдалося зменшити рівень гемолізу, але цей процес не був повністю ефективним для забезпечення стабільності еритроцитів на довгий період [78]. Хоча зменшення гемолізу за допомогою термічної обробки є важливим кроком, необхідні були додаткові дослідження для розуміння довгострокових ефектів стабілізації еритроцитів.

Ще однією проблемою є вплив розміру та поверхневих характеристик наночастинок на їх взаємодію з еритроцитами. Автори іншої роботи зазначають, що розмір частинок магнетиту має вирішальне значення для їхньої біосумісності та гемокомпатибельності [79]. Частинки невеликого розміру можуть проникати в клітинні мембрани, викликаючи їх пошкодження та зміну морфології еритроцитів. Це підтверджується дослідженнями, де відзначено, що наночастинок з великим розміром можуть бути менш токсичними, але мають обмежену здатність до проникнення через мембрану еритроцитів, що знижує їхню ефективність у біомедичних застосуваннях.

Також важливою проблемою є недосконалість синтезу магнетитних наночастинок. Автори підкреслюють, що навіть незначні зміни в процесі синтезу можуть суттєво вплинути на стабільність частинок та їхню здатність до функціональної взаємодії з клітинами. Вони наголошують на важливості стабілізації магнетиту, оскільки агрегація частинок може призвести до непередбачуваних біологічних ефектів, включаючи порушення цілісності клітинних мембран [80].

Важливим фактором є токсичність наночастинок магнетиту. Автори дослідження виявили, що при великих дозах наночастинок може спостерігатися токсичний вплив на клітини, включаючи еритроцити, що ставить під сумнів безпеку їх використання в медичних цілях, зокрема в трансфузіології. Вони також зазначають, що ці токсичні ефекти можуть залежати від характеристик частинок, таких як розмір і стабільність [81].

Крім того, дослідження інших авторів показали, що магнетитні наночастинок, в залежності від їхнього розміру, взаємодіють з еритроцитами різним чином. У роботі вказується, що частинки меншого розміру можуть спричинити зміни в морфології еритроцитів, зокрема утворення ехіноцитів, що призводить до зниження їх пластичності та здатності проходити через капіляри. Такі морфологічні зміни можуть призвести до швидкого видалення еритроцитів з кровообігу після трансфузії, що обмежує їхню ефективність в клінічних умовах [82].

Таким чином, основні обмеження, виявлені в дослідженнях, включають:

1. Недостатню ефективність стабілізації еритроцитів — навіть за допомогою термічної обробки чи оптимізації розміру частинок не вдається повністю уникнути гемолізу чи змін морфології еритроцитів.
2. Вплив поверхневих стабілізаторів — присутність залишкових стабілізаторів може знижувати біосумісність наночастинок, викликаючи цитотоксичність.
3. Невідповідність фізико-хімічних характеристик фізіологічним умовам — агрегація частинок або їхня нестабільність можуть бути основною причиною токсичних ефектів.
4. Обмеження в тривалості досліджень — багато робіт фокусуються лише на короткострокових тестах, не враховуючи довгострокову ефективність стабілізації еритроцитів.

Аналіз сучасних наукових джерел свідчить про значний потенціал наночастинок магнетиту (Fe_3O_4) у зберіганні еритроцитів. Водночас наявні експериментальні дані мають низку обмежень, які ускладнюють їх практичне застосування. Зокрема, більшість досліджень не містять достатньо детальної інформації щодо складу, морфологічних і фізико-хімічних характеристик наночастинок магнетиту, що використовувалися в експериментах. Оскільки саме ці параметри істотно впливають на біологічну активність наноматеріалу та його взаємодію з клітинними структурами, така невизначеність ускладнює інтерпретацію результатів та їх відтворення. У зв'язку з цим у межах даного дослідження передбачено всебічну характеристику застосованих наночастинок, що має забезпечити відтворюваність експериментів і надійність сформульованих висновків.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У межах експериментальної частини роботи використовували еритроцитарні компоненти крові (ЕЦК), отримані з крові лабораторних щурів-самців молодого віку, наданих віварієм Національного наукового центру «Харківський фізико-технічний інститут» НАН України. Умови утримання тварин, включно з режимом годівлі, температурним режимом та освітленням, відповідали чинним нормативам утримання лабораторних тварин, що визначаються «Державними санітарними правилами утримання лабораторних тварин» [83]. Забір крові здійснювали з хвостової вени під легким ефірним наркозом з дотриманням етичних вимог щодо поводження з лабораторними тваринами.

2.1. Підготовка зразків крові для ІЧ-дослідження

Еритроцити (ЕЦК) вносили до пробірок, що містили антикоагулянт цитрат, питний фосфат і декстрозу (CPD), а також до пробірок з антикоагулянтом цитратом, питним фосфатом, декстрозою та аденіном (CPDA-1).

З кожної пробірки з еритроцитами (CPD та CPDA-1) по 3 мл розподіляли в 20 стерильних скляних пробірок. Потім у перші 10 пробірок контролю додавали по 2 мл 0,9% розчину NaCl. У наступні 10 пробірок вводили по 2 мл 0,9% розчину NaCl, попередньо обробленого наночастинками магнетиту.

Пробірки контролю:

1. 3 мл еритроцитів (CPD) + 2 мл 0,9% розчину NaCl (n=10)
2. 3 мл еритроцитів (CPDA-1) + 2 мл 0,9% розчину NaCl (n=10).

Пробірки з тестом:

1. 3 мл еритроцитів (CPD) + 2 мл 0,9% розчину NaCl, обробленого наночастинками магнетиту у співвідношенні 4:1 (n=10);
2. 3 мл еритроцитів (CPDA-1) + 2 мл 0,9% розчину NaCl, обробленого наночастинками магнетиту у співвідношенні 4:1 (n=10).

2.2. Визначення спектрів поглинання водного розчину еритроцитів в ІЧ-діапазоні

Для реєстрації спектрів поглинання водного розчину еритроцитів в інфрачервоному діапазоні використовували ІЧ-спектрофотометр-29 (ЛОМО), предоставлений ННЦ «Харківський фізико-технічний інститут» НАН України.

Інфрачервона спектроскопія – це метод ідентифікації та аналізу хімічних сполук. Інфрачервоне випромінювання спрямовується на зразок, і, вимірюючи поглинання випромінювання на різних частотах, можна визначити, які молекули входять до складу досліджуваного об'єкта [84]. Метод ґрунтується на явищі поглинання електромагнітного випромінювання в інфрачервоному діапазоні групами атомів досліджуваного об'єкта. При опроміненні молекул інфрачервоним випромінюванням вони поглинають кванти, частоти яких відповідають частотам валентних, деформаційних та лібраційних коливань молекул.

ІЧ-спектр дозволяє відстежувати зміни всіх основних типів зв'язків у молекулах досліджуваних речовин. Спектр відображається у вигляді графіка, на якому видно, на якій частоті та в якому об'ємі відбулося поглинання. Оскільки різні молекули поглинають випромінювання на певних частотах у відомих кількостях, спектр може бути використаний для ідентифікації зразка на молекулярному рівні.

Інфрачервона спектроскопія застосовується в дослідженнях для проведення кількісного аналізу, розпізнавання зразків або виявлення домішок. Вона може бути використана для газоподібних, рідких або твердих зразків і не руйнує матеріал під час аналізу, тому також широко використовується для аналізу біологічних рідин, зокрема крові та її компонентів [85].

Спектри реєстрували в діапазоні $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$ (від 2 до 25 мкм — середня інфрачервона область). Калібрування проводили за спектром полістиролу з відомими частотами максимумів поглинання. Поправка становила в середньому 10^{-5} см^{-1} .

Рідка вода характеризується сильним поглинанням у досліджуваному діапазоні, тому для запису спектрів водних розчинів необхідно отримати тонкий шар речовини. Для цього використовували дві тонкі пластини з прозорого матеріалу CaF_2 , який не має власних характерних смуг поглинання в середньому ІК-діапазоні, що могло б вплинути на інтерпретацію спектра. Краплю досліджуваної рідини роздавлювали між двома круглими пластинами CaF_2 і встановлювали у вимірювальний канал приладу. У канал порівняння встановлювали такі ж пластини без рідини. Реєстрація спектра проводилась одразу після поміщення зразка в прилад і тривала 10 хвилин. Температура в камері становила 25–30°C.

Випробування проводились у вісім етапів:

день 1 — I, день 7 — II, день 14 — III, день 21 — IV, день 28 — V, день 35 — VI, день 42 — VII, день 49 — VIII.

Кров після проведення біохімічного дослідження зберігалася в холодильній камері при температурі +4°C.

2.3. Визначення складу та структурних характеристик наночастинок магнетиту

У рамках дослідження використовувалися наночастинки магнетиту (Fe_3O_4), видані лабораторією прикладних нанотехнологій Білоусова А.М., синтезовані методом співосадження. Синтез здійснювали у водному середовищі за контрольованого співвідношення солей Fe^{2+} та Fe^{3+} у присутності лужного агента, при температурі 60°C та рН 10–11.

Концентрація колоїдного розчину наночастинок у фізіологічному розчині NaCl становила 0,0225%;

Теоретична осмолярність колоїдного розчину — 500 мосмоль/л;

Розмір наночастинок — 6–12 нм;

Питома площа поверхні S_s — 800–1200 м²/г;

Насичена намагніченість I_s — 2,15 ка/м;

ζ-потенціал — -19 мВ.

Контрольні середовища включали:

0,9% розчин натрію хлориду (NaCl);

0,9% розчин натрію хлориду, оброблений наночастинками магнетиту у співвідношенні 4:1 шляхом змішування та подальшої інкубації протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.

2.3.1. Розрахунки параметрів кристалічної ґратки магнетиту

У таблиці 2.1 наведено розраховані параметри кристалічної ґратки для різних фаз матеріалу, що містять наночастинки магнетиту. Дані були отримані за допомогою рентгеноструктурного аналізу (РСА) у лабораторії прикладних нанотехнологій Білоусова А.М, який дозволив з високою точністю визначити просторову конфігурацію атомів у кристалічній решітці.

Таблиця 2.1

Розраховані параметри ґратки фаз магнетиту

Назва фази	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)
Низький рівень магнетиту	8.387836	8.387836	8.387836	90.00	90.00	90.00
Магнетит низький, син	5.930687	5.930687	14.705912	90.00	90.00	120.00
Йохансеніт	9.891680	9.059276	5.282908	90.00	105.54	90.00

Визначення параметрів решітки (довжини осей a, b, c та кути α , β , γ) дозволяє оцінити стабільність та симетрію наночастинок. Фаза «магнетит низький, син» демонструє тригональну симетрію ($\gamma = 120^\circ$) і може бути найбільш придатною для використання як стабілізатора при зберіганні еритроцитів, знижуючи окислювальний стрес та зберігаючи цілісність клітинної мембрани.

2.3.2. Визначення процентного складу магнетиту

Також у таблиці 2.2 представлено результати напівкількісного рентгенофлуоресцентного аналізу наночастинок магнетиту, проведеного за допомогою спектрометра ARL OPTIM'X. Метод дозволив визначити елементний склад зразка та оцінити вміст основних оксидів і домішок.

Таблиця 2.2

Визначення процентного складу магнетиту за допомогою рентгенівського спектрометра ARL OPTIM'X (напівкількісний аналіз)

Оксид/Елемент	Масова частка (%)	StdErr
Fe ₂ O ₃	97.37	0.09
CaO P	2.26	0.07
O ₂₅	0.280	0.027
MnO	0.255	0.013
SiO ₂	0.098	0.027
SO ₃	0.032	0.013
Cl	0.0280	0.0090

Елемент	Масова частка (на O ₂), %	StdErr
Fe	68.40	0.07
Ca	1.71	0.05
Px	0.122	0.012
Mn	0.198	0.010
Si	0.046	0.013
Sx	0.0126	0.0051
Cl	0.0280	0.0090

Елемент	Підсумкова маса (%)	StdErr
Fe	97.62	0.09
Ca	2.30	0.07

Px	0.157	0.015
Mn	0.278	0.014
Si	0.059	0.016
Sx	0.0164	0.0066
Cl	0.0380	0.012

Основним компонентом наночастинок є оксид заліза (Fe_2O_3), масова частка якого становить понад 97%, що підтверджує високий рівень чистоти матеріалу та переважання фази магнетиту. Окрім того, присутність кальцію, фосфору, марганцю, кремнію, сірки та хлору виявлено у слідових кількостях, що свідчить про відсутність значних домішок, здатних впливати на біосумісність або викликати токсичний ефект.

2.3.3. Визначення фазового складу наночастинок магнетиту

Фазовий склад наночастинок магнетиту (Fe_3O_4) є параметром, що визначає їхню біосумісність, стабільність у фізіологічних середовищах та потенційну здатність до взаємодії з клітинними мембранами. Як показано в результатах рентгеноструктурного аналізу (табл. 2.3), синтезовані наночастинок містять дві основні фази: кубічну фазу $\text{Fe}_{2.886}\text{O}_4$ (Fd-3m) та гексагональну фазу Fe_3O_4 (R-3m). Подальший кількісний аналіз методом корундових чисел (RIR) підтвердив, що вміст кубічної фази становить 71%, тоді як гексагональної — 29% (табл. 2.4).

Таблиця 2.3

Рентгеноструктурний аналіз на рентгенівському дифрактометрі Rigaku Ultima IV (CuK α , K β фільтр - Ni), однокоординатний напівпровідниковий детектор DTeX.

Фаза	Формула	Космічна група №	База даних карт ICDD
------	---------	------------------	----------------------

Низький рівень магнетиту	$\text{Fe}_{2.886}\text{O}_4$	227 : Fd-3m, вибір-2	10861339 (ICDD)
Магнетит низький, син	Fe_3O_4	166 : R-3m, гексагональний	10716766 (ICDD)

Додатково досліджувалися наночастинки магнетиту за допомогою іонно-електронного растрового типу (рис. 2.1.) та електронного просвічувального мікроскопа (рис. 2.2.) з демонстрацією просторової структури магнетиту з фазою Fd-3m (рис. 2.3.).

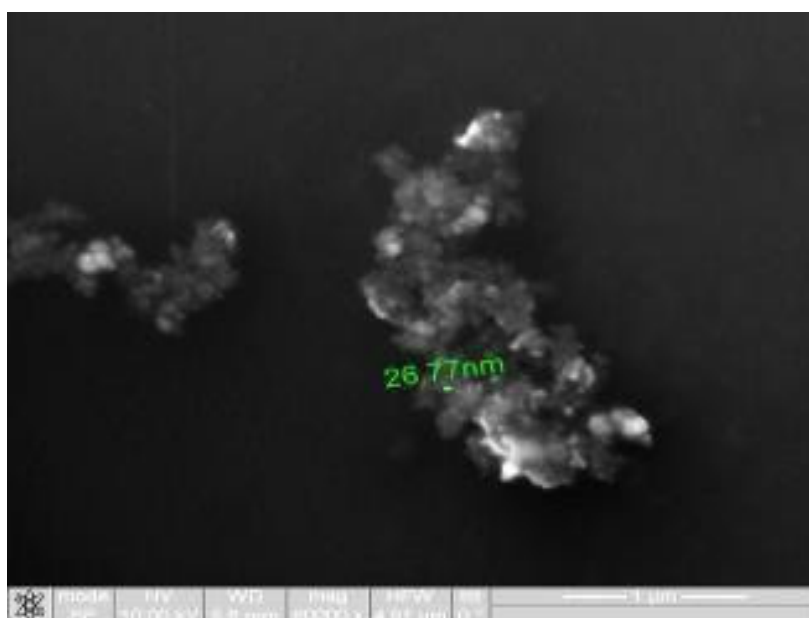


Рис. 2.1. Дослідження наночастинок магнетиту з використанням мікроскопа іонно-електронного растрового типу Quanta 200 3D

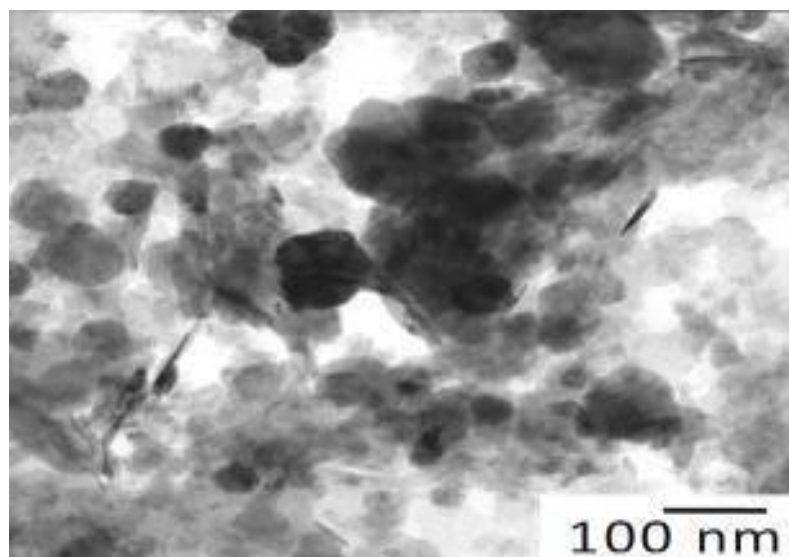


Рис. 2.2. Дослідження наночастинок магнетиту за допомогою електронного просвічувального мікроскопа JEM-2100

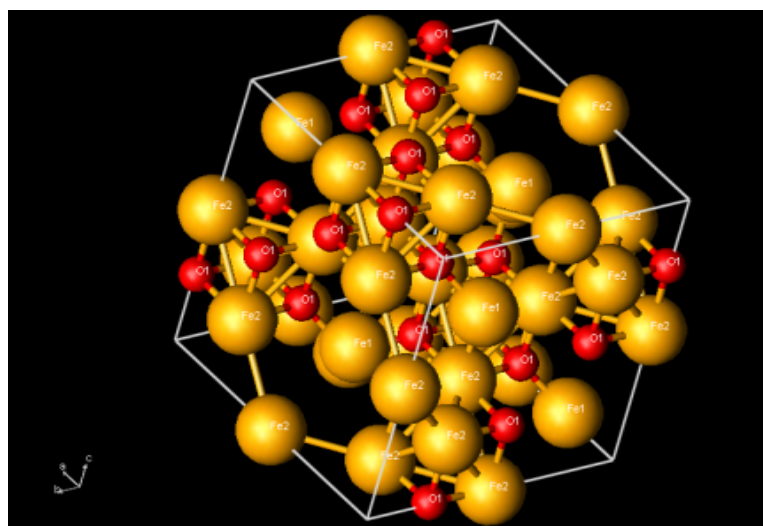


Рис. 2.3. Просторова структура магнетиту (фаза Fd-3m)

Таблиця 2.4

Фази магнетита наночастинок (RIR-метод; похибка $8\pm 3\%$)

Фази (метод корундових чисел)	Зміст, %
Низький рівень магнетиту	71
Магнетит низький, син (гексагональний)	29

2.4. Аналіз фазового складу магнетиту та його значення для стабілізації мембран еритроцитів

Кубічна фаза магнетиту є термодинамічно стабільною та широко вивченою в біомедичних застосуваннях завдяки її мінімальній реактивності, високій кристалографічній впорядкованості та відносно низькому рівню генерування вільних радикалів [80, 86].

Її домінування в структурі наночастинок у даному дослідженні слугує важливим фактором зменшення гемолітичної активності та стабілізації білково-ліпідного шару мембран еритроцитів, що було підтверджено морфологічними та функціональними дослідженнями.

Гексагональна фаза (R-3m), хоча й менш стабільна, але може проявляти вищу поверхневу активність, що в деяких випадках сприяє тимчасовій фіксації частинок на клітинних мембранах. Такі властивості можуть бути корисними для посилення міжмолекулярних взаємодій між наночастинками і компонентами мембрани, зокрема білками скелету мембрани. Однак слід враховувати, що надмірний вміст цієї фази пов'язаний із ризиком виникнення морфологічних змін еритроцитів (наприклад, ехіноцитозу), що було продемонстровано в інших роботах [87, 88].

Таким чином, оптимальне співвідношення фаз, зафіксоване у даному зразку, дозволяє поєднати біобезпечність стабільної фази та функціональну активність реактивної фази. Подібне поєднання забезпечує ефективну адсорбцію наночастинок на поверхню клітин без тривалого ушкодження мембрани.

2.5. Статистичні методи

Статистична обробка отриманих результатів проводилася параметричним методом варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента. Обробку даних здійснювали за допомогою програми Excel.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Визначення ІЧ-спектрів поглинання вихідних суспензій еритроцитів

Дослідження змін у молекулярній структурі мембран еритроцитів, що зберігались у присутності класичних консервантів CPD та CPDA-1, проводилось за допомогою методу інфрачервоної (ІЧ) спектроскопії у середньому ІЧ-діапазоні ($4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$). Спектри фіксувалися на визначених етапах зберігання: день 1 (стадія I), день 7 (II), день 14 (III), день 21 (IV) та день 28 (V). На рисунках 3.1. і 3.2. зображено діапазон $400\text{--}1300\text{ см}^{-1}$ та $1200\text{--}4000\text{ см}^{-1}$.

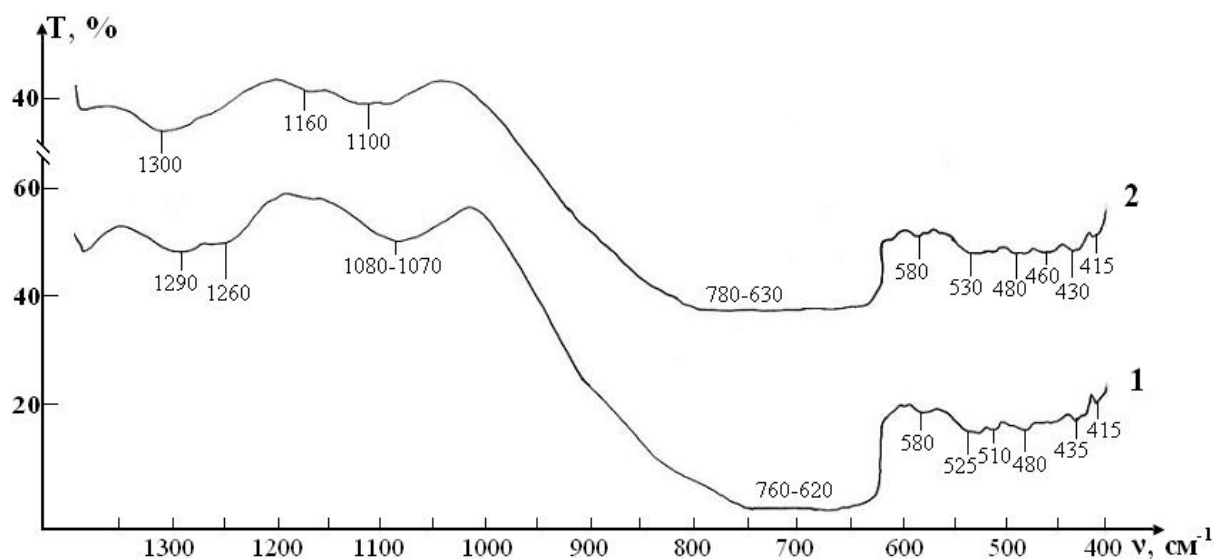


Рис. 3.1. ІЧ-спектри поглинання вихідних суспензій еритроцитів у діапазоні $400\text{--}1300\text{ см}^{-1}$: крива 1 — контроль; крива 2 — експеримент

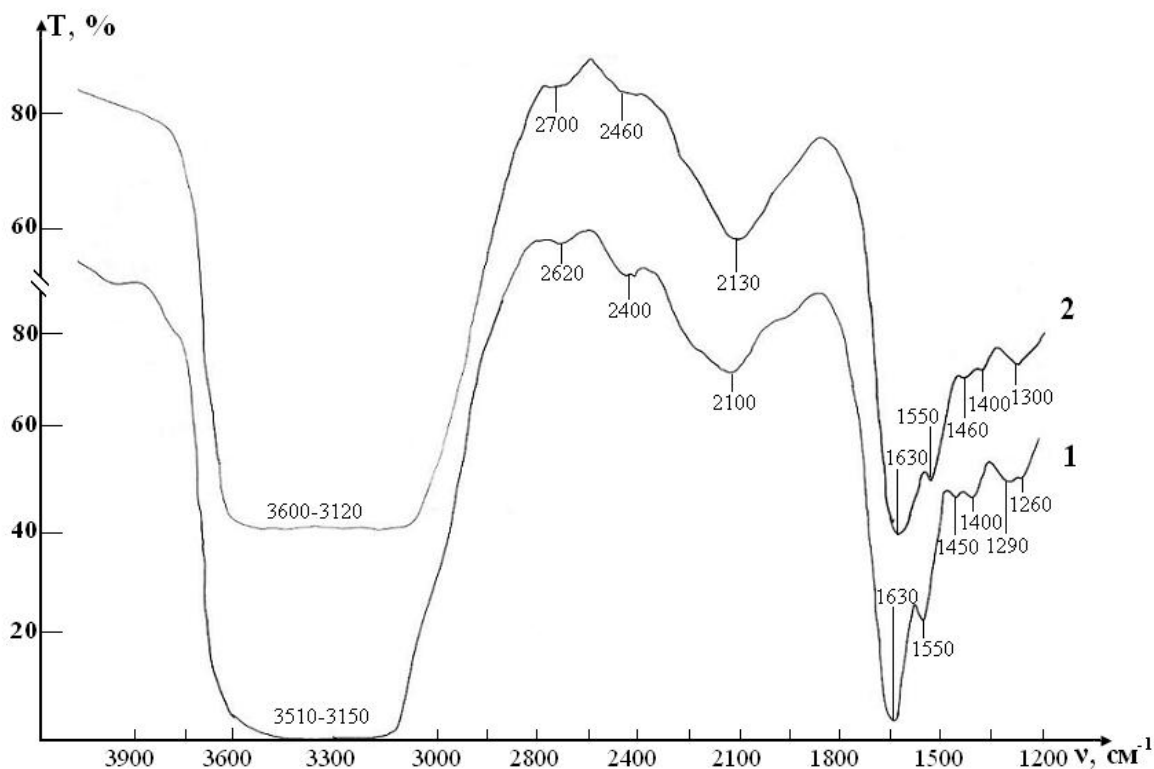


Рис. 3.2. ІЧ-спектри поглинання вихідних суспензій еритроцитів у діапазоні 1200–4000 cm^{-1} : крива 1 — контроль; крива 2 — експеримент

Оскільки основним компонентом експериментальних зразків є рідка вода, найбільш інтенсивні та широкі смуги у спектрах пов'язані з характерними коливаннями молекул H_2O :

1. У діапазоні 800–600 cm^{-1} зафіксовано виражене поглинання, що відповідає лібраційним модам води (рис. 3.1).

2. У зоні 1630 cm^{-1} реєструється вузька інтенсивна смуга, обумовлена деформаційними коливаннями групи N–O–N, які виникають внаслідок зміни валентних кутів (рис. 3.2).

3. Складне поєднання деформаційних і лібраційних коливань H_2O проявляється в області 2150–2100 cm^{-1} (рис. 3.2).

4. Широка смуга у межах 3600–3000 cm^{-1} відповідає валентним коливанням O–H зв'язків (рис. 3.2).

У спектрах також виявлено сигнали, характерні для компонентів консерванту, присутнього у фізіологічному розчині. До них належать:

1. Серія піків низького діапазону: 415, 435, 480, 510, 530 та 580 cm^{-1} (рис. 3.1)
2. Широка смуга з максимумом поблизу 1100 cm^{-1} (рис. 3.1)
3. Слабкі піки у ділянці 1260 та 1400 cm^{-1} (рис. 3.2).

Окрім цього, спектри демонструють три характерні смуги, що безпосередньо пов'язані з внутрішньомолекулярними коливаннями структурних компонентів еритроцитів:

1. 1290 cm^{-1} — амід III та ароматичні фрагменти білків,
2. 1450 cm^{-1} — деформаційні коливання метильних груп у складі ліпідів та білків,
3. 1550 cm^{-1} — амідні коливання II типу (поєднання N–H і C–N).

Ідентифікація основних смуг поглинання, зареєстрованих в ІЧ-спектрах вихідної суспензії еритроцитів, подана у таблиці 3.1

Таблиця 3.1

ІЧ-спектри поглинання вихідних суспензій еритроцитів у різних діапазонах (cm^{-1}) та характеристика смуг

Діапазон, cm^{-1} (контроль / тест)	Характеристика смуг поглинання
415 / 415	Колівальні режими хімічних сполук, що входять до складу консерванту для еритроцитів
435 / –	
– / 450	
480 / 480	
510 / 510	
– / 520	
– / 525	

580 / 580	
760–620 / 780–630	Лібраційні моди молекул H ₂ O
1080–1070 / 1100	Смуги, характерні для компонентів консерванту
– / 1160	
1260 / –	
1290 / –	Коливання в кільцевій структурі білка та амідів III
– / 1300	
1400 / 1400	Смуги консерванту
1450 / –	Деформаційні коливання метильних груп (CH ₃) у структурі ліпідів і білків
– / 1460	
1550 / 1550	Валентні коливання (N–H) + (C–N) амідів II
1630 / 1630	Деформаційні коливання H–O–H
2100 / –	Складний режим деформаційних і лібраційних коливань молекул H ₂ O
– / 2130	
2400 / –	Смуги, пов'язані з фізіологічним розчином
– / 2460	
2620 / –	
– / 2700	
3510–3150 / 3600–3120	Смуги валентних коливань H–O–H

Спектральний діапазон, у якому спостерігаються характерні смуги, що відповідають основним фрагментам структури еритроцитарної мембрани, представлений на рисунках 3.3 та 3.4. Ідентифікація цих смуг здійснюється наступним чином:

3.2. ІЧ-спектроскопічний аналіз еритроцитів, збережених у консерванті CPD

Контрольний зразок суспензії еритроцитів у середовищі CPD з нативним фізіологічним розчином був досліджений на п'яти етапах (рис. 3.3). Спектр першої доби демонстрував слабку смугу при 1290 см^{-1} , що відповідає коливанням кільцевої структури білків та амідів III [85]. Полоса з низькою інтенсивністю на 1450 см^{-1} асоціюється з деформаційними коливаннями метильних груп (CH_3) у ліпідах та білках [89, 90]. Інтенсивна смуга на 1550 см^{-1} зумовлена валентними коливаннями аміда II типу (N-H та C-N) [85]. На рис. 3.4 видно, що на 7-й день (стадія II) інтенсивність цих смуг почала знижуватися, що свідчить про початкові зміни вторинної структури білка. Через 14 днів (стадія III) спостерігалось зміщення смуги 1290 см^{-1} у бік більших частот ($\sim 1300\text{ см}^{-1}$) з трансформацією у слабкий вигин, смуга 1450 см^{-1} ставала ледве помітним плечем, а інтенсивність піка аміду II (1550 см^{-1}) суттєво знижувалась.

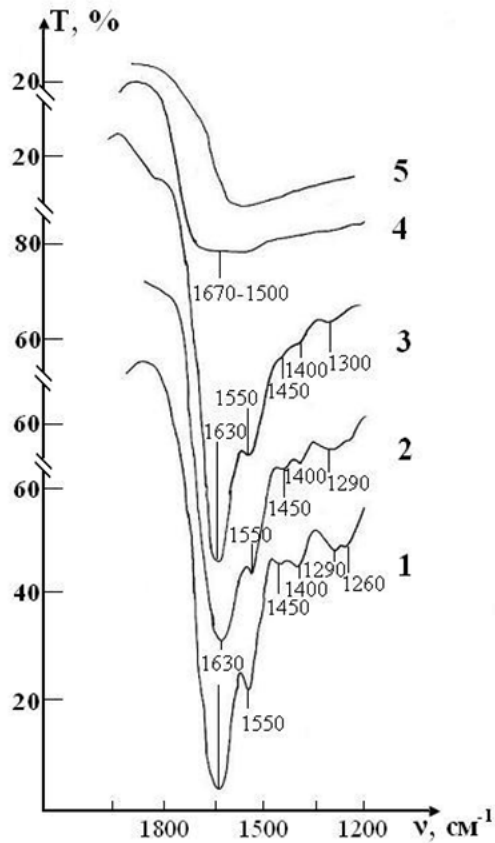


Рис. 3.3. ІЧ-спектри поглинання контрольного зразка, що складається із суспензії еритроцитів у нативному фізіологічному розчині в середовищі CPD: крива 1 — етап I (1 день); крива 2 — етап II (7 день); крива 3 — етап III (14 день); крива 4 — етап IV (21 день); крива 5 — етап V (28 день).

Такі зміни свідчать про деградацію молекулярної структури білків та ослаблення внутрішньо- та міжмолекулярних зв'язків. Після трьох тижнів зберігання (стадія IV) ІЧ-спектр контрольного зразка втратив характерні смуги еритроцитів, натомість з'явилась широка розмита полоса у діапазоні коливань O–H ($1650\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$). Четвертий тиждень (стадія V) не вніс суттєвих змін у спектр, через що подальші дослідження на наступних етапах не проводилися.

Експериментальний зразок суспензії еритроцитів у консерванті CPD з фізіологічним розчином, обробленим наночастинками магнетиту, представлений на рисунку 3.4.

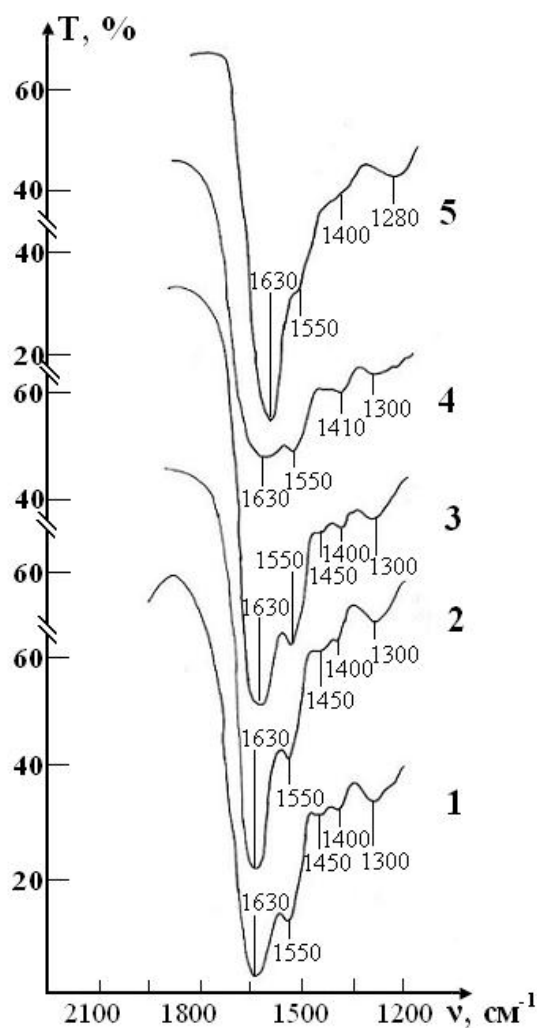


Рис. 3.4. ІЧ-спектри поглинання експериментального зразка, що складається із суспензії еритроцитів у нативному фізіологічному розчині, обробленого наночастинками магнетиту в середовищі CPD: крива 1 — стадія I (1 день); крива 2 — стадія II (7 день); крива 3 — стадія III (14 день); крива 4 — стадія IV (21 день); крива 5 — стадія V (28 день).

ІЧ-спектр на першій добі (стадія I) практично ідентичний контролю, за винятком того, що замість дублета $1290\text{--}1260\text{ cm}^{-1}$ відзначається смуга на 1300 cm^{-1} із слабким плечем при 1240 cm^{-1} (рис. 3.4). Протягом наступних двох тижнів ніяких істотних змін, які б свідчили про руйнування молекулярної структури еритроцитів, не було виявлено.

Інтенсивність смуг 1300 та 1550 cm^{-1} знижувалася, а смуга 1450 cm^{-1} повністю зникла на 21-й день (стадія IV) зберігання. Це свідчить про початок деградації білкових і ліпідних компонентів мембрани еритроцитів. Лише на 28-й день (стадія V) у спектрах з'явилися слабкі перевищення, пов'язані з внутрішньомолекулярними коливаннями на фоні води та смуг консерванту. Таким чином, молекулярна структура мембрани еритроцитів у експериментальному зразку руйнується повільніше і не повністю.

3.3. ІЧ-спектроскопічний аналіз еритроцитів, збережених у консерванті CPDA-1.

Контрольний зразок суспензії еритроцитів у консерванті CPDA-1 з інтактним фізіологічним розчином на основних етапах дослідження представлений на рис. 3.5

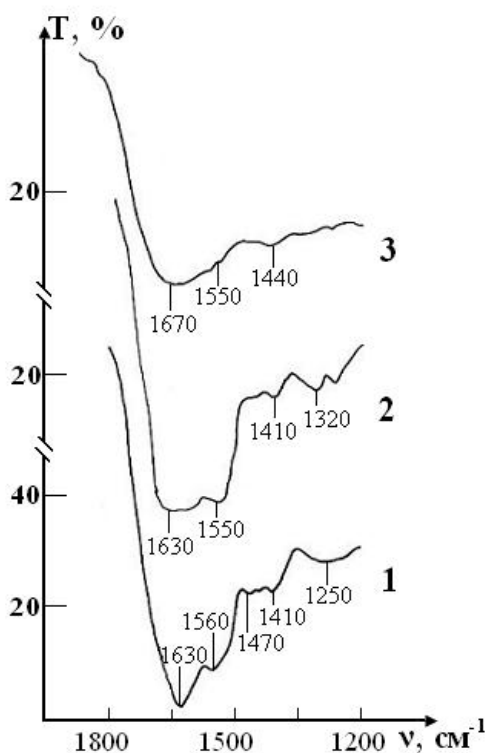


Рис. 3.5. ІЧ-спектри поглинання контрольного зразка, що складається із суспензії еритроцитів у нативному фізіологічному розчині в середовищі CPDA-1 на основних етапах дослідження: крива 1 — етап I (1 день); крива 2 — етап V (28 день); крива 3 — етап VII (42 день).

ІЧ-спектр контрольного зразка містить ті ж смуги функціональних груп, що були описані вище у експерименті 1. Проте спостерігаються певні відмінності в їхній інтенсивності, що пояснюється індивідуальними особливостями крові донора, від якого отримано зразок. Після трьох тижнів зберігання еритроцитів (стадія IV) у спектрі не виявлено суттєвих змін, що свідчили б про порушення молекулярної структури мембрани еритроцитів.

На четвертому тижні (стадія V) у спектрі з'являються виражені зміни — частина смуг згладжується, зменшується їх інтенсивність, зникають дрібні піки. Це свідчить про початок руйнування молекулярної структури білків і ліпідів мембран еритроцитів. На п'ятому тижні (стадія VI) суттєвих змін у спектрі не зафіксовано. Через шість тижнів (стадія VII) у спектрі спостерігаються ледь помітні надлишки, пов'язані з внутрішньомолекулярними коливаннями, на фоні широкої розмитої смуги в діапазоні коливань O–H ($1650\text{--}1500\text{ см}^{-1}$), що притаманні воді (H₂O), — це вказує на повне руйнування молекулярної структури мембрани еритроцитів.

Експериментальний зразок суспензії еритроцитів у середовищі CPDA-1 з фізіологічним розчином, попередньо обробленим наночастинками магнетиту, представлений на рис. 3.6

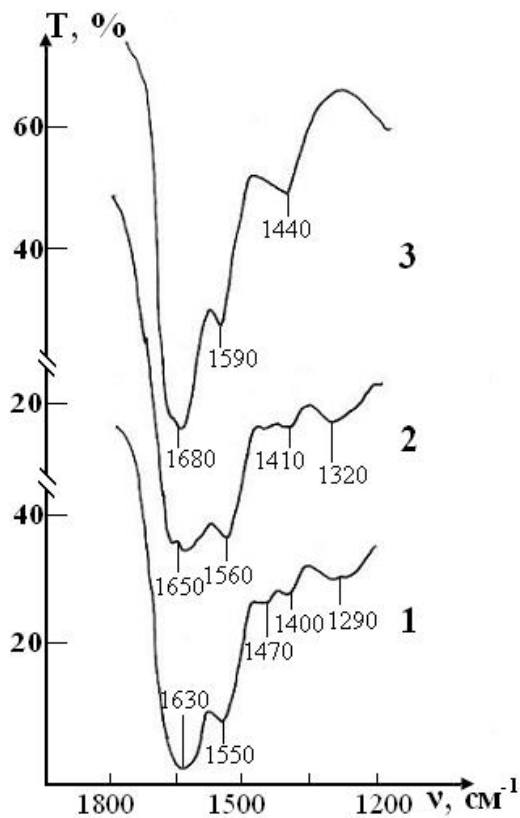


Рис. 3.6. ІЧ-спектри поглинання експериментального зразка, що складається із суспензії еритроцитів у консерванті CPDA-1 з фізіологічним розчином, попередньо обробленого наночастинками магнетиту на основних етапах дослідження: крива 1 — етап I (1 день); крива 2 — етап V (28 день); крива 3 — етап VII (42 день).

Динаміка змін у молекулярній структурі експериментального зразка (рис. 3.6) свідчить про повну стабільність мембран еритроцитів протягом перших чотирьох тижнів зберігання. Перші ознаки незначного зниження інтенсивності смуг, що відповідають білковим і ліпідним структурам, спостерігаються лише після 28 діб зберігання. Проте ці зміни суттєво менш виражені, ніж у контрольному зразку.

Після шести тижнів спектр змінюється переважно за рахунок зміщення смуг у високочастотну область та згладжування дрібних піків. Це вказує на суттєве ослаблення внутрішньо- та міжмолекулярних зв'язків у структурі мембрани еритроцитів, але повного руйнування не спостерігається.

Через сім тижнів (стадія VIII) у спектрі еритроцитів залишається лише одна слабо виражена смуга, що відповідає валентним коливанням найстійкішого зв'язку $\nu(\text{N-H}) + \nu(\text{C-N})$ амідю II, який раніше (у контрольному зразку) зазнав значного зсуву у високочастотну область внаслідок його ослаблення. Зникають смуги деформаційних коливань білкових і ліпідних молекул, що свідчить про порушення молекулярної структури еритроцитів.

3.4. Аналіз змін у ІЧ-спектрах контрольних і експериментальних зразків

Таким чином, аналіз змін у ІЧ-спектрах контрольного та експериментального зразків у середовищі CPD показав, що протягом перших 28 днів:

1. У контрольній суспензії руйнівні зміни у молекулярній структурі мембрани еритроцитів починаються на 14-й день (стадія III), а до 21-го дня мембрана руйнується повністю.

2. У експериментальному зразку ослаблення молекулярних зв'язків спостерігається лише на 28-й день, а повне руйнування мембрани відбувається на 35-й день (стадія VI).

Аналіз змін, що відбуваються в ІЧ-спектрах контрольних і експериментальних зразків у середовищі CPDA-1, показав, що протягом 49 діб зберігання:

1. У контрольній суспензії РБК деструктивні зміни молекулярної структури розпочинаються через чотири тижні, а після шести тижнів спостерігається повне руйнування мембрани еритроцитів.

2. У експериментальному зразку після шести тижнів фіксується значне ослаблення внутрішньо- та міжмолекулярних зв'язків у структурі мембрани, однак повного руйнування не відбувається. Через сім тижнів зберігання (стадія VIII) еритроцити демонструють ознаки порушення

структури білків і ліпідів, проте деякі найбільш стійкі зв'язки залишаються збереженими.

Таким чином, проведене ІЧ-спектроскопічне дослідження еритроцитів, збережених у середовищах CPD і CPDA-1, показало, що додавання наночастинок магнетиту сприяє стабілізації структурних компонентів клітинних мембран під час гіпотермічного зберігання. У контрольних зразках без магнетиту спостерігалось поступове порушення просторової структури білків та деградація ліпідів, що проявлялося в зміщенні максимумів амідних смуг А і В, а також у зменшенні інтенсивності характерних смуг білкових і ліпідних компонентів.

Натомість у експериментальних зразках з магнетитом ці зміни були менш вираженими: спостерігалось зменшення амплітуди коливань інтенсивностей, стабільніші положення смуг, а також збереження ознак цілісності білкових структур. Такі результати свідчать про те, що магнетит виконує роль інтракорпорального нанобіокоректора, забезпечуючи захист мембранних компонентів і уповільнюючи прояв "storage lesions" незалежно від типу консервувального середовища.

Отримані дані свідчать про перспективність використання магнетиту як інтракорпорального нанобіокоректора для збереження функціональної цілісності еритроцитів під час їхнього зберігання.

ВИСНОВКИ

1. У результаті комплексного дослідження фізико-хімічних властивостей наночастинок магнетиту встановлено, що їх фазовий склад представлений термодинамічно стабільною кубічною (71%) та гексагональною фазами (29%). Така структура обумовлює високу біосумісність магнетиту та його потенціал як ефективного внутрішньоклітинного біокоректора, здатного стабілізувати клітинні мембрани.

2. Дослідження впливу наночастинок магнетиту на мембрану еритроцитів при зберіганні засвідчило про їх здатність стабілізувати білково-ліпідний шар, що проявилось у зниженні ступеня морфологічних змін, зменшенні проявів гемолізу та збереженні структурної цілісності мембрани. Це підтверджено спектроскопічними та морфофункціональними параметрами і що свідчить про захисну дію наночастинок у середовищах зберігання.

3. Проведений порівняльний аналіз спектральних характеристик еритроцитів, збережених у середовищах CPD та CPDA-1, показав, що додавання наночастинок магнетиту сприяє більшій стабільності білково-ліпідної структури мембран у обох середовищах. При цьому в експериментальних зразках із магнетитом спостерігалось уповільнення деструктивних процесів у молекулярній організації мембран у порівнянні з контрольними зразками без магнетиту, незалежно від типу консервантів, що підтверджено збереженням характерних інфрачервоних смуг білкових і ліпідних компонентів.

4. Оцінка динаміки змін спектральних характеристик еритроцитів упродовж 49 діб зберігання в присутності наночастинок магнетиту виявила достовірне уповільнення деструктивних процесів у мембранах. Результати статистичної обробки підтвердили вірогідність отриманих даних ($p < 0,05$), що свідчить про стабілізаційний вплив магнетиту на молекулярну структуру мембранного каркасу протягом тривалого періоду зберігання.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Guyton, A. C., Hall, J. E. Textbook of Medical Physiology / A. C. Guyton, J. E. Hall. — 11th ed. — Philadelphia : Elsevier Saunders, 2006. — 1056 p.
2. Bessis, M. Living Blood Cells and Their Ultrastructure / M. Bessis. — Berlin : Springer-Verlag, 1973. — 282 p.
3. Perutz, M. F. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin / M. F. Perutz // Nature. — 1970. — Vol. 228, No. 5273. — P. 726–739. — DOI: 10.1038/228726a0
4. Dodge, J. T., Mitchell, C., Hanahan, D. J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes / J. T. Dodge, C. Mitchell, D. J. Hanahan // Archives of Biochemistry and Biophysics. — 1963. — Vol. 100, No. 1. — P. 119–130. — DOI: 10.1016/0003-9861(63)90007-4
5. Bennett, V. The spectrin–actin junction of erythrocyte membrane skeletons / V. Bennett // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes. — 1989. — Vol. 988, No. 2. — P. 107–121. — DOI: 10.1016/0304-4157(89)90038-3
6. Morrison, M., Passow, H. Metabolism and function of red blood cells / M. Morrison, H. Passow // Handbook of Physiology. — Bethesda : American Physiological Society, 1965. — P. 221–243.
7. Sprague, R. S., Ellsworth, M. L., Stephenson, A. H., Lonigro, A. J. Participation of cAMP in a signal-transduction pathway relating erythrocyte deformation to ATP release / R. S. Sprague, M. L. Ellsworth, A. H. Stephenson, A. J. Lonigro // American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. — 2001. — Vol. 281, No. 3. — P. H1150–H1155. — DOI: 10.1152/ajpheart.2001.281.3.H1150
8. Mohandas, N., Gallagher, P. G. Red cell membrane: past, present, and future / N. Mohandas, P. G. Gallagher // Blood. — 2008. — Vol. 112, No. 10. — P. 3939–3948. — DOI: 10.1182/blood-2008-05-078873
9. Mohandas, N., Evans, E. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects / N. Mohandas,

E. Evans // *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. — 1994. — Vol. 23, No. 1. — P. 787–818. — DOI: 10.1146/annurev.bb.23.060194.004123

10. Zachowski, A. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement / A. Zachowski // *Biochemical Journal*. — 1993. — Vol. 294, No. 1. — P. 1–14. — DOI: 10.1042/bj2940001

11. Lange, Y., Steck, T. L. Cholesterol exchange between membranes and cyclodextrin / Y. Lange, T. L. Steck // *Journal of Biological Chemistry*. — 1985. — Vol. 260, No. 25. — P. 13003–13008.

12. Anstee, D. J. The nature and abundance of human red cell surface glycoproteins / D. J. Anstee // *Journal of the Institute of Biology*. — 1990. — Vol. 7, No. 3. — P. 24–32.

13. Bennett, V., Baines, A. J. Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues / V. Bennett, A. J. Baines // *Physiological Reviews*. — 2001. — Vol. 81, No. 3. — P. 1353–1392. — DOI: 10.1152/physrev.2001.81.3.1353

14. Schauer, R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions / R. Schauer // *Current Opinion in Structural Biology*. — 2009. — Vol. 19, No. 5. — P. 507–514. — DOI: 10.1016/j.sbi.2009.08.005

15. D'Alessandro, A., et al. Red blood cell storage: the story so far / A. D'Alessandro, et al. // *Blood Transfusion*. — 2015. — Vol. 13, No. 2. — P. 215–227. — DOI: 10.2450/2014.0155-14

16. Tzounakas, V. L., Kriebardis, A. G., Georgatzakou, H. T., Papassideri, I. S., Antonelou, M. H. Donor variation effect on red blood cell storage lesion: A close relationship emerges / V. L. Tzounakas, A. G. Kriebardis, H. T. Georgatzakou, I. S. Papassideri, M. H. Antonelou // *Transfusion Medicine Reviews*. — 2016. — Vol. 30, No. 3. — P. 132–139. — DOI: 10.1016/j.tmr.2016.03.001

17. Yoshida, T., Prudent, M., D'Alessandro, A. Red blood cell storage lesion: causes and potential clinical consequences / T. Yoshida, M. Prudent, A. D'Alessandro // *Blood Transfusion*. — 2019. — Vol. 17, No. 1. — P. 27–52.

18. Barshtein, G., et al. Storage-induced damage to red blood cell mechanical properties can be only partially reversed by rejuvenation / G. Barshtein et al. // *Transfusion*. — 2021. — Vol. 61, No. 4. — P. 1180–1190.
19. Tzounakas, V. L., et al. Red blood cell storage lesions: a focus on redox alterations and oxidative stress / V. L. Tzounakas et al. // *Transfusion Medicine Reviews*. — 2022. — Vol. 36, No. 1. — P. 1–13.
20. Moller, M. N., et al. Oxidative stress and red blood cell storage / M. N. Moller et al. // *Free Radical Biology and Medicine*. — 2023. — Vol. 193. — P. 1–10.
21. Zimrin, A. B., Hess, J. R. Current issues relating to the transfusion of stored red blood cells / A. B. Zimrin, J. R. Hess // *Vox Sanguinis*. — 2009. — Vol. 96, No. 2. — P. 93–103.
22. Koshkaryev, A., et al. Oxidative stress alters red blood cell membrane properties / A. Koshkaryev et al. // *Transfusion*. — 2020. — Vol. 60, No. 5. — P. 1010–1020.
23. Burger, P., et al. CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis / P. Burger et al. // *Blood*. — 2012. — Vol. 119, No. 26. — P. 6296–6304.
24. Mobarrez, F., Vikerfors, A., Gustafsson, J. T., Gunnarsson, I., Zickert, A., Larsson, A., ... Svenungsson, E. Microparticles in autoimmunity: Cause or consequence of disease? / F. Mobarrez et al. // *Frontiers in Immunology*. — 2022. — Vol. 13. — Article 822995. — DOI: 10.3389/fimmu.2022.822995
25. Siti, H. N., Kamisah, Y., Kamsiah, J. Mechanisms of oxidized LDL-mediated endothelial dysfunction in atherosclerosis / H. N. Siti, Y. Kamisah, J. Kamsiah // *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. — 2022. — Vol. 9. — Article 925923. — DOI: 10.3389/fcvm.2022.925923
26. Bordbar, A., et al. Oxidative damage and antioxidant defense in stored red blood cells / A. Bordbar et al. // *Transfusion Medicine Reviews*. — 2016. — Vol. 30, No. 3. — P. 138–146. — DOI: 10.1016/j.tmr.2016.02.001

27. Leal-Noval, S. R., et al. Transfusion of red blood cells with storage lesions in critically ill patients / S. R. Leal-Noval et al. // *Current Opinion in Hematology*. — 2020. — Vol. 27, No. 6. — P. 418–424. — DOI: 10.1097/MOH.0000000000000646
28. Hod, E. A., Spitalnik, S. L. Storage of red blood cells: biology and clinical relevance / E. A. Hod, S. L. Spitalnik // *Transfusion*. — 2017. — Vol. 57, No. 9. — P. 2271–2278. — DOI: 10.1111/trf.14194
29. Reisz, J. A., et al. Metabolic rewiring of stored red blood cells under hypoxia accelerates phospholipid degradation / J. A. Reisz et al. // *Blood*. — 2016. — Vol. 128, No. 12. — P. e32–e42. — DOI: 10.1182/blood-2016-03-707380
30. Almizraq, R. J., et al. Morphological and biochemical changes in stored red blood cells / R. J. Almizraq et al. // *Vox Sanguinis*. — 2020. — Vol. 115, No. 3. — P. 197–205. — DOI: 10.1111/vox.12882
31. Zimring, J. C. Established and theoretical factors to consider in assessing the red cell storage lesion / J. C. Zimring // *Blood*. — 2013. — Vol. 121, No. 26. — P. 5221–5228. — DOI: 10.1182/blood-2013-02-453779
32. Weiskopf, R. B. Do red cell storage lesions matter? / R. B. Weiskopf // *Anesthesiology*. — 2019. — Vol. 130, No. 4. — P. 602–605. — DOI: 10.1097/ALN.0000000000002613
33. Lacroix, J., et al. Transfusion strategies for patients in pediatric intensive care units / J. Lacroix et al. // *New England Journal of Medicine*. — 2015. — Vol. 372, No. 9. — P. 836–845. — DOI: 10.1056/NEJMoa1403612
34. Yoshida, T., Shevkoplyas, S. S. Anaerobic storage of red blood cells / T. Yoshida, S. S. Shevkoplyas // *Blood Transfusion*. — 2019. — Vol. 17, No. 3. — P. 238–247. — DOI: 10.2450/2018.0082-18
35. Donadee, C., et al. Nitric oxide scavenging by red blood cell microparticles and cell-free hemoglobin as a mechanism for the red cell storage lesion / C. Donadee et al. // *Circulation*. — 2011. — Vol. 124, No. 4. — P. 465–476. — DOI: 10.1161/circulationaha.110.008698

36. Tzounakas, V. L., et al. Red blood cell storage in additive solutions: where do we stand? / V. L. Tzounakas et al. // *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. — 2021. — Vol. 48, No. 3. — P. 180–192. — DOI: 10.1159/000510555
37. Spinella, P. C., et al. Multiple organ dysfunction syndrome secondary to red cell storage lesion: transfusion-associated inflammation and immunomodulation / P. C. Spinella et al. // *Transfusion and Apheresis Science*. — 2019. — Vol. 58, No. 1. — Article 102648. — DOI: 10.1016/j.transci.2018.12.013
38. Hess, J. R. Red cell changes during storage / J. R. Hess // *Transfusion and Apheresis Science*. — 2010. — Vol. 43, No. 1. — P. 51–59. — DOI: 10.1016/j.transci.2010.05.009
39. Högman, C. F., Meryman, H. T. Storage parameters affecting red blood cell quality / C. F. Högman, H. T. Meryman // *Transfusion Medicine Reviews*. — 1999. — Vol. 13, No. 4. — P. 275–296. — DOI: 10.1016/S0887-7963(99)80058-3
40. Sparrow, R. L. Red blood cell storage and transfusion-related immunomodulation / R. L. Sparrow // *Blood Transfusion*. — 2012. — Vol. 10, Suppl. 2. — P. s26–s30. — DOI: 10.2450/2010.005S
41. Tzounakas, V. L., et al. Antioxidant additives in blood storage: effect on red cell metabolism and function / V. L. Tzounakas et al. // *Blood Transfusion*. — 2016. — Vol. 14, No. 5. — P. 450–457. — DOI: 10.2450/2016.0043-16
42. Dumont, L. J., AuBuchon, J. P. Evaluation of proposed FDA criteria for the evaluation of radiolabeled red cell recovery trials / L. J. Dumont, J. P. AuBuchon // *Transfusion*. — 2008. — Vol. 48, No. 6. — P. 1053–1060. — DOI: 10.1111/j.1537-2995.2008.01799.x
43. Cardigan, R., et al. Viability and function of red cells stored in SAG-M and AS-3 additive solutions / R. Cardigan et al. // *Transfusion Medicine*. — 2005. — Vol. 15, No. 4. — P. 295–303. — DOI: 10.1111/j.1365-3148.2005.00645.x
44. Luten, M., et al. Survival of red blood cells after transfusion: a comparison between blood bank storage and clearance / M. Luten et al. //

Transfusion. — 2008. — Vol. 48, No. 7. — P. 1478–1485. — DOI: 10.1111/j.1537-2995.2008.01799.x

45. Zolla, L. Red blood cell storage: the story so far / L. Zolla // Blood Transfusion. — 2012. — Vol. 10, Suppl. 2. — P. s3–s7. — DOI: 10.2450/2010.0122-09

46. Bardyn, M., et al. Red blood cells stored in SAGM and PAGGSM reveal differences in oxidative stress and hemolysis / M. Bardyn et al. // Transfusion. — 2017. — Vol. 57, No. 9. — P. 2281–2291. — DOI: 10.1111/trf.14194

47. Dumaswala, U. J., Zhuo, L., Jacobsen, D. W., Jain, S. K., & Sukalski, K. A. Vitamin E analogue Trolox protects red blood cells against oxidative stress during storage / U. J. Dumaswala et al. // Transfusion Medicine and Hemotherapy. — 2001. — Vol. 28, No. 1. — P. 20–26. — DOI: 10.1159/000053270

48. Kumar, A., & Singh, A. Vitamin C as a modulator of oxidative stress in erythrocytes of stored blood / A. Kumar, A. Singh // Acta Haematologica Polonica. — 2017. — Vol. 48, No. 1. — P. 1–6. — DOI: 10.1016/j.achaem.2017.01.001

49. Singh, A., & Kumar, A. Synergistic activity of vitamin C and vitamin E to ameliorate the oxidative stress in stored blood / A. Singh, A. Kumar // Transfusion Clinique et Biologique. — 2018. — Vol. 25, No. 4. — P. 1–6. — DOI: 10.1016/j.tracli.2018.04.001

50. Samarghandian, S., Farkhondeh, T., & Samini, F. Antioxidant effects of green tea catechins on oxidative stress-induced damage / S. Samarghandian, T. Farkhondeh, F. Samini // Pharmacognosy Research. — 2017. — Vol. 9, No. 4. — P. 328–334. — DOI: 10.4103/pr.pr_44_17

51. Khan, N., & Mukhtar, H. Tea polyphenols for health promotion / N. Khan, H. Mukhtar // Life Sciences. — 2007. — Vol. 81, No. 7. — P. 519–533. — DOI: 10.1016/j.lfs.2007.06.011

52. Celardo, I., Pedersen, J. Z., Traversa, E., & Ghibelli, L. Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles / I. Celardo et al. //

Nanoscale. — 2011. — Vol. 3, No. 4. — P. 1411–1420. — DOI: 10.1039/C0NR00875C

53. Slater, N. K., & Rahmoune, H. Cryopreservation of Red Blood Cells / N. K. Slater, H. Rahmoune // *Methods in Molecular Biology*. — 2015. — Vol. 1916. — P. 235–246. — DOI: 10.1007/978-1-4939-8994-2_22

54. Zemlianskykh, A. S., et al. The Effect of Cryoprotective Agents on Proteins of the Erythrocyte Membrane-Cytoskeleton Complex / A. S. Zemlianskykh et al. // *Biology Bulletin Reviews*. — 2021. — Vol. 11, No. 2. — P. 65–72. — DOI: 10.1134/S1990750821020128

55. Hoffman, A. M., et al. Comparison of the effects of glycerol, dimethyl sulfoxide, and hydroxyethyl starch solutions for cryopreservation of avian RBCs / A. M. Hoffman et al. // *American Journal of Veterinary Research*. — 2015. — Vol. 76, No. 6. — P. 487–494. — DOI: 10.2460/ajvr.76.6.487

56. Pegg, D. E., Diaper, M. P., & Hunt, C. J. Comparison of the cryoprotection of red blood cells by 1,2-propanediol and glycerol / D. E. Pegg, M. P. Diaper, C. J. Hunt // *Cryobiology*. — 1984. — Vol. 21, No. 6. — P. 631–637. — DOI: 10.1016/0011-2240(84)90330-4

57. Crowe, J. H., Carpenter, J. F., & Crowe, L. M. The role of vitrification in anhydrobiosis / J. H. Crowe, J. F. Carpenter, L. M. Crowe // *Annual Review of Physiology*. — 1998. — Vol. 60. — P. 73–103. — DOI: 10.1146/annurev.physiol.60.1.73

58. Eroglu, A. Cryopreservation and freeze-drying protocols / A. Eroglu // *Methods in Molecular Biology*. — 2010. — Vol. 368. — P. 229–246. — DOI: 10.1007/978-1-60761-746-4_22

59. Wu, W., et al. Iron oxide nanoparticles for biomedical applications: A review / W. Wu et al. // *Current Medicinal Chemistry*. — 2020. — Vol. 27, No. 35. — P. 5825–5847. — DOI: 10.2174/0929867327666200106154526

60. Celardo, I., et al. CeO₂ nanoparticles: A promise for applications in therapy / I. Celardo et al. // *Nanomedicine*. — 2011. — Vol. 6, No. 2. — P. 175–181. — DOI: 10.2217/nnm.10.113

61. Labouta, H. I., et al. Mechanisms and consequences of nanoparticle interactions with the human blood system / H. I. Labouta et al. // *Nature Nanotechnology*. — 2020. — Vol. 15, No. 8. — P. 586–598. — DOI: 10.1038/s41565-020-0709-4
62. Akbarzadeh, A., et al. Liposome: classification, preparation, and applications / A. Akbarzadeh et al. // *Nanoscale Research Letters*. — 2013. — Vol. 8. — Article 102. — DOI: 10.1186/1556-276X-8-102
63. Seabra, A. B., et al. Nanotoxicity of graphene and graphene oxide / A. B. Seabra et al. // *Chemical Research in Toxicology*. — 2014. — Vol. 27, No. 2. — P. 159–168. — DOI: 10.1021/tx400383w
64. Yahia, I. S., et al. Magnetite nanoparticles as membrane protectors: Applications in red blood cell storage / I. S. Yahia et al. // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. — 2023. — Vol. 50. — Article 102640. — DOI: 10.1016/j.nano.2023.102640
65. Petrov, K. D., Chubarov, A. S. Magnetite nanoparticles for biomedical applications / K. D. Petrov, A. S. Chubarov // *Encyclopedia*. — 2022. — Vol. 2, No. 4. — P. 1811–1828. — DOI: 10.3390/encyclopedia2040125
66. Shen, H., Wang, X., Tian, F., et al. Enhanced functionalization of superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles for advanced drug enrichment and separation applications / H. Shen et al. // *BMC Chemistry*. — 2024. — Vol. 18. — Article 1258. — DOI: 10.1186/s13065-024-01258-4
67. Batlle, X., Moya, C., Escoda Torroella, M., et al. Magnetic nanoparticles: from the nanostructure to the physical properties / X. Batlle et al. // *arXiv preprint*. — 2024.
68. Loura, N., Singh, M., Dhull, V. Anticancer activity of surface functionalized magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles—effect of polymer coating / N. Loura, M. Singh, V. Dhull // *Emergent Materials*. — 2023. — Vol. 6, No. 5. — P. 1415–1440. — DOI: 10.1007/s42247-023-00611-y
69. Kumar, C. S. S. R., Mohammad, F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery / C. S. S. R. Kumar,

F. Mohammad // *Advanced Drug Delivery Reviews*. — 2011. — Vol. 63, No. 9. — P. 789–808. — DOI: 10.1016/j.addr.2011.03.008

70. Estelrich, J., Escribano, E., Queralt, J., Busquets, M. A. Iron oxide nanoparticles for magnetically-guided and magnetically-responsive drug delivery / J. Estelrich et al. // *International Journal of Nanomedicine*. — 2015. — Vol. 10. — P. 1727–1741. — DOI: 10.2147/IJN.S72967

71. Gupta, A. K., Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications / A. K. Gupta, M. Gupta // *Biomaterials*. — 2005. — Vol. 26, No. 18. — P. 3995–4021. — DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.012

72. Safi, M., Clowez, S., Galimard, A., Berret, J.-F. In vitro toxicity and uptake of magnetic nanorods / M. Safi et al. // *arXiv preprint*. — 2011.

73. Vazhnichaya, E. M., Semaka, O. V., Lutsenko, R. V., Bobrova, N. O., Kurapov, Y. A. Toxicity factors of magnetite nanoparticles and methods of their research / E. M. Vazhnichaya et al. // *Innovative Biosystems and Bioengineering*. — 2024. — Vol. 8, No. 1. — P. 3–18.

74. Belousov A. N. The use of magnetite nanoparticles in applied medicine // *Materials Science Forum*. – Trans Tech Publications Ltd, 2011. – T. 694. – C. 205-208.

75. Dobrovolskaia M. A., McNeil S. E. Immunological properties of engineered nanomaterials // *Nature Nanotechnology*. - 2007. - Vol. 2, No. 8. - P. 469-478. - DOI: 10.1038/nnano.2007.223.

76. Nel A. E., Madler L., Velegol D. —Б—∞ —Ц—Ъ. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface // *Nature Materials*. - 2009. - Vol. 8, No. 7. - P. 543-557. - DOI: 10.1038/nmat2442.

77. Gonzalez-Ortiz A., Coronado-Puchau M., Maier S. A., Liz-Marz^on L. M. Impact of magnetic nanoparticles on blood components: from erythrocytes to coagulation // *Nanomedicine*. - 2020. - Vol. 15, No. 21. - P. 2051-2068. - DOI: 10.2217/nmm-2020-0152.

78. Barahuie F. G., Saifullah B., Fakurazi S., Hussein M. Z., Zainal Z., Ahmad M. Thermal treatment reduced hemolysis of green-synthesized magnetite nanoparticles for biomedical applications // *Nanomaterials*. — 2023. — Vol. 13, № 21. — P. 2824.

79. Rojas D., Rodríguez E., Pérez M., Sánchez J., Martínez L. Biocompatibility and hemocompatibility of iron oxide nanoparticles: Size and surface effects // *RSC Advances*. — 2021. — Vol. 11, № 2. — P. 10124–10136.

80. Laurent S., Dutz S., Häfeli U. O., van der Linden M. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications // *Chemical Reviews*. — 2008. — Vol. 108, № 6. — P. 2064–2110. — DOI: 10.1021/cr068445e.

81. Mahmoudi M., Simchi A., Milani A. S., Stroeve P. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles // *Journal of Colloid and Interface Science*. — 2009. — Vol. 336, № 2. — P. 510–518.

82. Ghosh S., Dutta S., Gomes E., Ray D., Bandyopadhyay S. Size-dependent interaction of iron oxide nanoparticles with human red blood cells and possible implications for biomedical applications // *Materials Science and Engineering: C*. — 2021. — Vol. 126. — Article ID 112178.

83. Державні санітарні правила утримання лабораторних тварин: Наказ МОЗ України № 441 від 19.07.2004 р. — Київ, 2004. — 24 с.

84. Савчук О. М., Ніжнікова І. В. Методи спектрального аналізу / О. М. Савчук, І. В. Ніжнікова. — Київ: НМЦ «Університетська книга», 2017. — 288 с.

85. Gutu M. et al. Exploratory Infrared Spectroscopy study of erythrocytes in cancer chemotherapy // *Rev Roum Chim*. — 2017. — Т. 62. — №. 2. — С. 181-190.

86. Barahuie F., Razavi M., Ahsan F. Surface-engineered magnetic nanoparticles: Preparation, characterization, and biomedical applications // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. — 2023. — Vol. 23, № 4. — P. 2151–2165.

87. Rojas L., Fernández M., Pérez J. Effects of magnetic nanoparticles on human red blood cell morphology and aggregation: A mechanistic approach //

Materials Science & Engineering: C. — 2021. — Vol. 118. — Article ID 111456.
— DOI: 10.1016/j.msec.2020.111456.

88. Ghosh D., Ghosh P., Basu S. Magnetic nanoparticles and their interactions with biological membranes: Implications for medical applications // Nano Today. — 2021. — Vol. 36. — Article ID 101001. — DOI: 10.1016/j.nantod.2020.101001.

89. Ходоровська І. В., Данилевська Н. Б. Фізико-хімічні властивості води після впливу електромагнітного випромінювання / І. В. Ходоровська, Н. Б. Данилевська // Вісник Львівського університету. Серія хімічна. — 2015. — № 56. — С. 111–119.

90. Kong F., Zhang X., Ma Y., Li L. Optical methods for blood diagnostics: From traditional to advanced photonic techniques // Journal of Biomedical Optics. - 2021. - Vol. 26, No. 8. - Article 080601. - DOI: 10.1117/1.JBO.26.8.080601.