

UDK 548.736:546.655-31]-022.513.2:612.1:57.086.13

О.В. Фалько<sup>1\*</sup>, А.О. Коваленко<sup>2</sup>, Т.М. Овсяннікова<sup>2</sup>,  
В.К. Клочков<sup>3</sup>, В.В. Чижевський<sup>1</sup>

## Дія нанокристалічного діоксиду церію на стан мембран еритроцитів за умов гіпотермічного зберігання крові

UDC 548.736:546.655-31]-022.513.2:612.1:57.086.13

O.V. Falko<sup>1\*</sup>, A.O. Kovalenko<sup>2</sup>, T.M. Ovsianikova<sup>2</sup>,  
V.K. Klochkov<sup>3</sup>, V.V. Chyzhevsky<sup>1</sup>

## Nanocrystalline Cerium Dioxide Affects Erythrocyte Membrane State Under Blood Hypothermic Storage

**Реферат:** У роботі досліджували дію часток нанокристалічного діоксиду церію (НДЦ) на стан мембран еритроцитів на моделі гіпотермічного зберігання зразків крові за вмістом первинних продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та гематологічними показниками (вільний та загальний гемоглобін, рівень гематокриту і гемолізу). Після п'яти тижнів гіпотермічного зберігання зразків крові значущої різниці у гематологічних показниках клітин контрольної та експериментальної груп не виявлено. Після гіпотермічного зберігання протягом двох тижнів у клітин експериментальної групи в присутності НДЦ підвищувався вміст переважно тих первинних продуктів ПОЛ, попередниками яких є поліненасичені жирні кислоти з двома подвійними зв'язками (дієнові та оксидієнові кон'югати), що є ознакою активації вільно радикальних процесів. Після чотирьох тижнів зберігання у клітин експериментальної групи значуще зменшувався вміст усіх первинних продуктів ПОЛ на відміну від контрольної. На кінцевому етапі дослідження (після п'яти тижнів зберігання) вміст усіх первинних продуктів ПОЛ експериментальної та контрольної груп був однаковим, що свідчить про здатність часток НДЦ впливати на мембрану еритроцитів та змінювати інтенсивність процесів ПОЛ залежно від терміну зберігання.

**Ключові слова:** нанорозмірні частки, діоксид церію, еритроцити, гіпотермічне зберігання, гемоліз, гематокрит, перекисне окиснення ліпідів, кон'югати жирних кислот.

**Abstract:** Here, we have studied the impact of nanocrystalline cerium dioxide (NCD) particles on erythrocyte membrane state in a model of hypothermic storage of blood samples by examining the content of lipid peroxidation (LPO) primary products and hematological indices (free and total hemoglobin, hematocrit and hemolysis levels). After hypothermic storage of blood samples within 5 weeks, no significant difference in hematological indices between the control and experimental groups was revealed. In 2 weeks of hypothermic storage, the cells from experimental group in NCD presence showed an increased content of mainly those primary LPO products, which precursors were polyunsaturated fatty acids with two double bonds (conjugated dienes and oxidiene), thereby indicating the free radical processes activation. Four weeks' storage demonstrated significantly decreased content of all primary LPO products in the experimental group cells in contrast to the control group. To the final step of the study (5 weeks of storage), the content of all primary LPO products in experimental and control groups was similar, that was an evidence of the ability of NCD particles to affect the erythrocyte membrane as well change the LPO intensity depending on storage period.

**Key words:** nanosized particles, cerium dioxide, erythrocytes, hypothermic storage, hemolysis, hematocrit, lipid peroxidation, conjugated fatty acids.

На даний час відомою біологічно активною сполукою є нанокристалічний діоксид церію (НДЦ), частки якого складаються з атома церію, пов'язаного з двома атомами кисню [19, 21, 23]. Значний інтерес до НДЦ обумовлений його здатністю проявляти захисну активність, яка подібна до дії ферментів системи антиоксидантного захисту організму [15]. Крім того, НДЦ є нетоксичним матеріалом, що має високу ефективність у терапії різних патологічних станів [14, 17, 18].

Currently, the nanocrystalline cerium dioxide (NCD) is a known biologically active compound, the particles of which consist of cerium atom bonded to two oxygen atoms [18, 20, 23]. It attracts high attention due to its ability of exhibiting protective activity similar to enzyme effect of antioxidant defense system in the body [14]. In addition, as a non-toxic material, the NCD is highly efficient in therapy of various pathological states [12, 16, 17].

<sup>1</sup>Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

<sup>2</sup>Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, м. Харків, Україна

<sup>3</sup>Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України, м. Харків, Україна

**\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: o.v.falko@gmail.com

Надійшла 25.02.2021

Прийнята до друку 05.11.2022

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup>V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

<sup>3</sup>Institute for Scintillation Materials of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

**\*To whom correspondence should be addressed:**

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: o.v.falko@gmail.com

Received 25, February, 2021

Accepted 05, November, 2022

У багатьох лабораторіях світу досліджується застосування наночастинок (НЧ) для зберігання крові [7, 24]. Відомо, під час зберігання крові в еритроцитах відбувається нейтралізація супероксид-іонів, що призводить до руйнування клітин. Одним із можливих способів запобігання підвищеному окисному стресу у процесі зберігання крові є використання НЧ із антиоксидантними властивостями.

Вивчення дії НДЦ на мембрану еритроцитів необхідне для розроблення нових підходів до регулювання окиснювальних процесів, які виникають протягом зберігання крові, оскільки саме мембрана клітин першою реагує на дію будь-яких негативних чинників підвищенням вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) [24].

Мета роботи — дослідження дії нанокристалічного діоксиду церію на стан мембрани еритроцитів у процесі гіпотермічного зберігання крові.

### Матеріали та методи

У роботі використовували водний розчин НДЦ із розміром часток 2 нм у концентрації 2 г/л (виробник — Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України, м. Харків).

Для експериментів брали кров донорів групи II+. Антикоагулянтном був CPDA1, який додавали у зразки крові (2,5 мл CPDA-1 до 15,5 мл крові). Після отримання і стабілізації крові досліджувані зразки розділяли на групи: контрольну — додавання 0,018 мл води для ін'єкцій («Галичфарм», Україна) до 9,0 мл крові; експериментальну — додавання 0,018 мл розчину НДЦ до 9,0 мл крові (кінцева концентрація НДЦ складала 20 мг/л). Вказана концентрація НДЦ не чинить токсичної дії [9]. Зразки крові зберігали у стерильних пластикових пробірках при температурі 4–5°C упродовж п'яти тижнів.

Кров після зберігання змішували з фізіологічним розчином (3:1), центрифугували 15 хв при 1250g. У отриманих осадах еритроцитів після екстракції у суміші гептану та ізопропанолу (1:1) спектрофотометрично вимірювали концентрацію первинних продуктів ПОЛ, яку розраховували за законом Бугера-Ламберта-Бера у наномолях на 1 мл еритроцитів з використанням коефіцієнта молярної екстинкції  $\epsilon_0$ : для дієнових кон'югатів (ДК)  $\epsilon_0 = 2,2 \cdot 10^5 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , триєнових кон'югатів (ТК)  $\epsilon_0 = 4,34 \cdot 10^5 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , оксидієнових кон'югатів (ОДК)  $\epsilon_0 = 2,7 \cdot 10^5 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Для тетраєнових кон'югатів (ТЕТ) коефіцієнт молярної екстинкції не визначений, тому їх вміст виражали у одиницях молярної екстинкції на 1 мл еритроцитів [2, 3, 6].

The use of nanoparticles (NPs) for blood storage is being studied in many laboratories worldwide [2, 24]. The superoxide ions are known to be neutralized in erythrocytes during blood storage, thereby resulting in cell destruction. One of the possible ways to prevent an increased oxidative stress during blood storage is the use of NPs with antioxidant properties.

The study of NCD effect on erythrocyte membrane is essential for designing the novel approaches to regulate the oxidative processes, occurring during storage of blood, since the very cell membrane responds first to the effect of any negative factors by increasing the lipid peroxidation products (LPO) content [24].

The research aim was to explore whether the nanocrystalline cerium dioxide affected the erythrocyte membrane state during blood hypothermic storage.

### Materials and methods

Here, we applied an aqueous NCD solution with 2 nm particle size at a concentration of 2 g/l (manufactured by the Institute for Scintillation Materials of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv).

Experiments were carried out with donated A(II)+ blood. The CPDA-1, supplemented to blood samples (2.5 ml of CPDA-1 to 15.5 ml of blood) was used as anticoagulant. After blood collection and stabilization, the studied samples were divided into the following groups: the control was the samples, supplemented with 0.018 ml of water for injections (Halychpharm, Ukraine) to 9.0 ml of blood; in the experimental group there were the specimens with added 0.018 ml of NCD solution to 9.0 ml of blood (20 mg/l final concentration of NCD). The mentioned concentration of NCD has no toxic effect [6]. Blood samples were stored in sterile plastic tubes at 4–5°C for 5 weeks.

After storage, blood was mixed with physiological saline (3:1), and centrifuged for 15 min at 1250g. In the obtained erythrocyte sediments after extraction in heptane and isopropanol mixture (1:1), the concentration of primary LPO products was measured spectrophotometrically, calculated by means of the Beer-Lambert-Bouguer law in nanomoles per 1 ml of erythrocytes using the molar extinction coefficient ( $\epsilon_0$ ):  $\epsilon_0 = 2.2 \cdot 10^5 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  for conjugated dienes (CDs),  $\epsilon_0 = 4.34 \cdot 10^5 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  for conjugated trienes (CTs), and  $\epsilon_0 = 2.7 \cdot 10^5 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  for conjugated oxidienes (COs). For conjugated tetraenes (CTETs), the molar extinction coefficient is not determined, so their content was expressed in units of molar extinction per 1 ml of erythrocytes [3, 4, 21].



Осмотичну резистентність еритроцитів визначали уніфікованим методом Л.І. Ідельсона у модифікації з використанням фотоколориметрії при довжині хвилі 500–560 нм. Вміст гемоглобіну у крові і плазмі донорів вимірювали за допомогою набору реактивів фірми «Філісіт» (Україна). Для визначення гематокриту у досліджуваних зразках використовували центрифугу «Haematokrit 200» (Hettich, Німеччина).

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою програми «Statistica 10.0» (StatSoft Inc., США). Множинні порівняння для визначення значущості ( $p \leq 0,05$ ) показників груп проводили з використанням непараметричного критерію Манна-Вітні [1].

### Результати та обговорення

Для вивчення впливу НДЦ на стан мембран еритроцитів після гіпотермічного зберігання протягом п'яти тижнів нами були досліджені гематологічні показники: вміст вільного та загального гемоглобіну, рівень гематокриту і гемолізу.

Як видно з таблиці, гематологічні показники на досліджуваних термінах зберігання у експериментальній та контрольній групах значуще не відрізнялися. Встановлено, що після п'ятого тижня зберігання зразків крові вміст вільного гемоглобіну суттєво підвищувався (майже у чотири рази) порівняно з відповідними зразками на менш тривалому терміні зберігання. Даний факт свідчить про гемоліз частини клітин після тривалого

Erythrocyte osmotic resistance was assessed by the unified method of L.I. Idelson (modified) using a photocolormeter at 500–560 nm wavelengths. Hemoglobin content in donated blood and plasma was measured with a reagent kit of 'Filisit' company (Ukraine). We used the Haematokrit 200 centrifuge (Hettich, Germany) to estimate the hematocrit level in the studied samples.

Results were statistically processed using the Statistica 10.0 software (StatSoft Inc., USA). The non-parametric Mann-Whitney test was used for multiple comparisons to assess the significance ( $p \leq 0.05$ ) between the group indices [1].

### Results and discussion

The following hematological indices such as: free and total hemoglobin content, hematocrit and hemolysis levels were studied to elucidate the NCD impact on erythrocyte membrane state after hypothermic storage for 5 weeks.

The Table shows no significant difference between hematological indices in experimental and control groups within the studied storage periods. After week 5 of blood sample storage, the content of free hemoglobin was established to significantly increase (almost 4 times) vs. the corresponding samples with a shorter storage period. This fact evidenced the hemolysis of some cells after the samples' long-term storage irrespective of blood preservative composition.

Показники крові на різних термінах зберігання  
Blood indices at different storage terms

Термін зберігання Storage term	Додатки до середовища CPDA-1 Supplements to CPDA-1	Гемоглобін вільний, г/л Free hemoglobin, g/l	Гемоглобін загальний, г/л Total hemoglobin, g/l	Гематокрит, % Hematokrit, %
1 доба 1 day	НДЦ NCD	2,18 ± 0,44	74,0 ± 2,3	17,6 ± 0,8
	Вода для ін'єкцій Water for injections	2,45 ± 0,32	69,5 ± 3,1	16,8 ± 0,9
2 тижні 2 weeks	НДЦ NCD	2,46 ± 0,30	72,1 ± 4,7	16,6 ± 0,6
	Вода для ін'єкцій Water for injections	2,13 ± 0,35	67,4 ± 2,5	16,1 ± 1,5
5 тижнів 5 weeks	НДЦ NCD	9,55 ± 0,21 <sup>1,3</sup>	72,30 ± 3,2	15,5 ± 1,6
	Вода для ін'єкцій Water for injections	9,16 ± 0,29 <sup>2,4</sup>	70,1 ± 1,6	15,7 ± 1,2

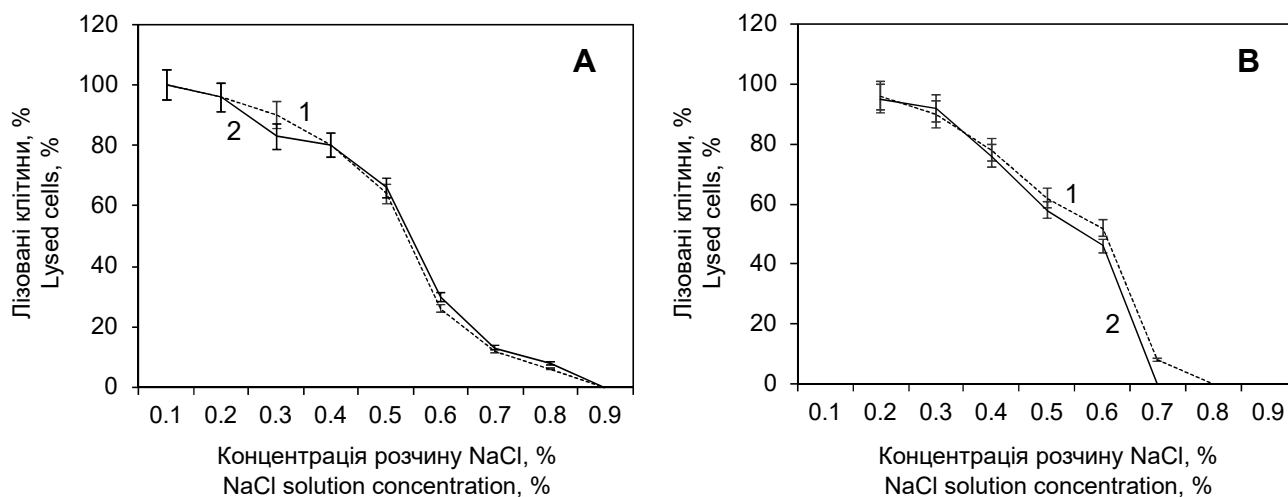
**Примітки:** відмінності значущі ( $p \leq 0,001$ ) порівняно з наступними варіантами зберігання зразків: <sup>1</sup> — НДЦ, перша доба; <sup>2</sup> — вода для ін'єкцій, перша доба; <sup>3</sup> — НДЦ, два тижні; <sup>4</sup> — вода для ін'єкцій, два тижні.

**Notes:** differences are significant ( $p \leq 0.001$ ) as compared with the following sample storage options: <sup>1</sup> – NCD, day 1; <sup>2</sup> – water for injections, day 1; <sup>3</sup> – NCD, 2 weeks; <sup>4</sup> – water for injections, 2 weeks.

зберігання зразків незалежно від складу гемаконсерванта.

Осмотична резистентність еритроцитів (ОРЕ) є одним з показників їхньої стабільності, який використовується для якісної характеристики стану еритроцитів, у тому числі в умовах дії низьких температур [5, 26]. Результати визначення ОРЕ представлені на рис. 1. Показано, що після першої доби гіпотермічного зберігання у зразках крові досліджуваних груп концентра-

Erythrocyte osmotic resistance (EOR) is among the indices of their stability, used to qualitatively characterize the erythrocyte state, in particular when they are exposed to low temperatures [13, 26]. Figure 1 shows the results of EOR assessment. Blood samples of the studied groups after the day 1 of hypothermic storage showed the concentration of NaCl solution, where the erythrocyte hemolysis began, to be 0.55% (minimum resistance). When it was 0.35% (maximum resistance),



**Рис. 1.** Осмотична резистентність еритроцитів після гіпотермічного зберігання крові після першої доби (А), 35 днів (В); 1 — зберігання еритроцитів у присутності НДЦ; 2 — зберігання еритроцитів без НДЦ.

**Fig. 1.** Erythrocyte osmotic resistance after blood hypothermic storage after day 1 (A), day 35 (B); 1 – erythrocyte storage in NCD presence; 2 – NCD-free erythrocyte storage.

ція розчину NaCl, за якої починався гемоліз еритроцитів, становила 0,55% (мінімальна резистентність). При концентрації розчину NaCl 0,35% (максимальна резистентність) у зразках всіх досліджуваних груп відбувався повний гемоліз еритроцитів. Таким чином, додавання розчину НДЦ до крові та подальше її зберігання при 4–5°C протягом доби не впливало на ОРЕ. Подовження терміну зберігання крові до п'яти тижнів незначно зменшувало ОРЕ як з додаванням, так і без додавання НДЦ. При цьому гемоліз еритроцитів відбувався за більшої концентрації розчину NaCl (0,65%), тобто на тривалих строках зберігання мембрани еритроцитів ставали уразливішими незалежно від присутності консерванта у розчині.

Аналіз гематологічних показників протягом гіпотермічного зберігання крові не виявив відмінностей у зразках обох груп.

Дослідження впливу НДЦ на утворення первинних продуктів ПОЛ як показника стану мембран еритроцитів на молекулярному рівні показало різну інтенсивність окислативних про-

a complete erythrocyte hemolysis occurred in all the studied group samples. Thus, the supplement of NCD solution to blood and its further storage at 4–5°C for a day caused no effect on the EOR. Prolonging the blood storage period for up to 5 weeks slightly reduced the EOR both with and without NCD supplement. Herewith, the erythrocyte hemolysis occurred under higher concentration of NaCl solution (0.65%), *i. e.* during long-term storage, the erythrocyte membranes became more fragile whatever the preservative presence in solution.

Analysis of hematological indices during blood hypothermic storage revealed no differences between the samples of both groups.

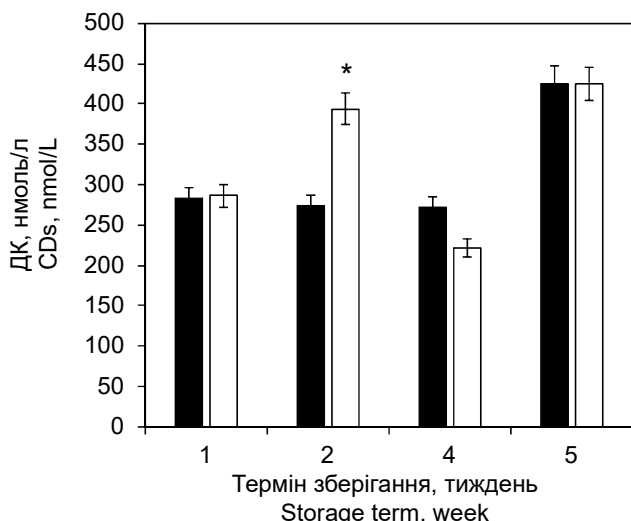
The study of NCD impact on primary LPO product formation as an index of erythrocyte membrane state at a molecular level has found different intensity of oxidative processes, occurred during blood hypothermic storage.

Among the investigated conjugated fatty acids, the CDs were shown to have the highest content (Figs. 2–4). This might be due to the fact, that the octadadienoic acid (18:1 ( $\Delta 9,12$ )), a CD precursor



цесів, які виникають протягом гіпотермічного зберігання крові.

Показано, що серед досліджуваних кон'югатів жирних кислот найвищий вміст мали ДК (рис. 2–4). Це може бути пов'язано з тим, що серед жирних кислот у складі мембрани еритроцитів переважає (близько 15%) октадекадієнова кислота (18:1 ( $\Delta 9,12$ )), — попередник ДК [12, 16]. Вміст ДК у контрольних зразках тримався приблизно



**Рис. 2.** Концентрація дієнових кон'югатів в умовах гіпотермічного зберігання крові: ■ — контроль; □ — НДЦ; \* — відмінності значущі порівняно з показниками контрольної групи після відповідного терміну зберігання;  $p \leq 0,05$ .

**Fig. 2.** Concentration of conjugated dienes under blood hypothermic storage: ■ – control, □ – NCD; \* – differences are significant as compared with control group indices after corresponding storage term;  $p \leq 0.05$ .

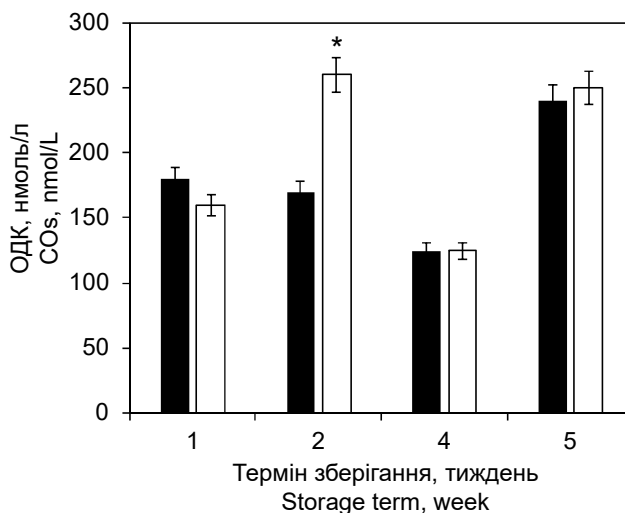
на однаковому рівні протягом всього терміну зберігання (див. рис. 2). Жирні кислоти фосфоліпідів мембран еритроцитів, які є попередниками ДК, на чверть довжини коротші за тих, що мають чотири і більш подвійних зв'язків. Активні форми кисню, що досягають неглибоких шарів ліпідної мембрани, ймовірно, витрачаються саме на утворення ДК. За більш тривалого гіпотермічного зберігання крові утворення продуктів вільнорадикального окиснення сягає більш занурених у мембрану еритроцитів аліфатичних фрагментів жирних кислот.

Після п'ятого тижня зберігання зразків крові утворення активних форм кисню, можливо, стає більш інтенсивним, що приводить до значної генерації всіх первинних продуктів ПОЛ, у тому числі більш віддалених їхніх форм — ОДК, у яких до аліфатичного ланцюга з кон'югованими зв'язками приєднується молекула кисню.

[10, 15], was predominant (about 15%) among fatty acids within the erythrocyte membrane. The CDs content in the control samples remained at approximately the same level throughout the storage period (see Fig. 2). Erythrocyte membrane phospholipid fatty acids, being CDs precursors, are a quarter of their length shorter than those with four or more double bonds. Reactive oxygen species, that can reach the shallow lipid membrane layers are probably spent precisely on CDs formation. During longer blood hypothermic storage, the formation of free radical oxidation products comes to the fatty acid aliphatic fragments more immersed in erythrocyte membrane.

After week 5 of blood sample storage, the ROS formation appeared likely to proceed more intensively, resulting in a significant generation of all the primary LPO products, including their more distant forms: COs, where an oxygen molecule adds to the aliphatic chain with conjugated bonds.

An ordered molecule packaging within the erythrocyte membrane, which limits the interaction between the substrate and peroxidation catalysts, is a structural antioxidant. Due to this structure, the reactive oxygen species cannot freely pass through the lipid bilayer, thereby preserving physiological structure of cell membrane [19]. Double bonds within this structural antioxidant at an initial stage of reactive oxygen impact on lipid bilayer result in radical neutralization. However, when free radical processes are activated, the potential of structural



**Рис. 3.** Концентрація оксидієнових кон'югатів в умовах гіпотермічного зберігання крові: ■ — контроль, □ — НДЦ; \* — відмінності значущі порівняно з показниками контрольної групи після відповідного терміну зберігання,  $p \leq 0,05$ .

**Fig. 3.** Concentration of conjugated oxidienes under blood hypothermic storage: ■ – control; □ – NCD; \* – differences are significant as compared with control group indices after corresponding storage term,  $p \leq 0.05$ .

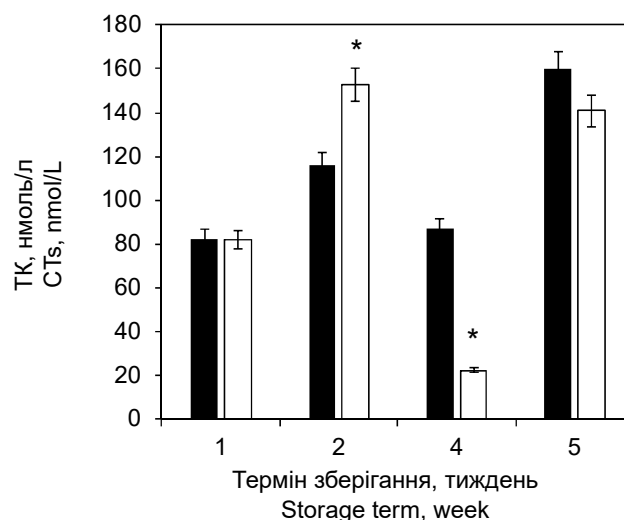


Упорядкована упаковка молекул у складі мембрани еритроцитів, яка обмежує взаємодію субстрату і каталізаторів переокиснення, є структурним антиоксидантом. Завдяки такій будові активні форми кисню не можуть вільно проходити крізь ліпідний бішар, тим самим зберігається фізіологічна структура мембрани клітини [20]. Подвійні зв'язки у складі цього структурного антиоксиданта на початковому етапі впливу активного кисню на ліпідний бішар приводять до нейтралізації радикалів. Однак за активації вільнорадикальних процесів потенціалу структурного антиоксиданта може не вистачити для збереження структури ліпідного бішару мембрани клітин. У результаті відбувається генерація вторинних продуктів ПОЛ, наприклад, малонного діальдегіду. Одним з ефективних компонентів захисних сумішей може бути так звана «пастка» активних форм кисню, яка здатна приймати та віддавати електрон радикальній формі кисню (редокс-активний компонент). За фізико-хімічними властивостями та біологічною активністю до таких матеріалів можна віднести НДЦ [22].

На рис. 2–4 наведено дані щодо утворення різних кон'югатів у досліджуваних зразках крові залежно від складу гемоконсерванта та строків зберігання. Додавання НДЦ до крові викликало впродовж двох тижнів зберігання поступове збільшення вмісту переважно тих продуктів ПОЛ, попередниками яких є поліненасичені жирні кислоти з двома подвійними зв'язками (ДК та ОДК). Це опосередковано вказує на глибину занурення НЧ у ліпідний шар, яка відповідає розмірам залишків жирних кислот з двома подвійними зв'язками. Лише частина більш довгих попередників з трьома та чотирма подвійними зв'язками перетворюється в ТК та ТЕТ, про що свідчить їхній вміст. Однак вже після чотирьох тижнів зберігання еритроцитів з НДЦ виявлялося значуще зниження генерації первинних продуктів ПОЛ у порівнянні з контрольною групою. Після п'яти тижнів зберігання вміст усіх кон'югатів у зразках експериментальної групи підвищився до контрольного показника.

Окремо слід описати зміни концентрації ТЕТ-інтермедіатів довголанцюгових жирних кислот, наприклад, арахідонової. Як видно на рис. 5, після двох тижнів зберігання еритроцитів у середовищі з НДЦ концентрація ТЕТ-інтермедіатів значно збільшувалася, після чотирьох тижнів зменшувалася, а після п'ятого тижня не відрізнялася від контролю.

Таким чином, протягом гіпотермічного зберігання крові після додавання НДЦ проявлявся його різноспрямований вплив на систему анти-



**Рис. 4.** Концентрація триєнових кон'югатів в умовах гіпотермічного зберігання: ■ — контроль, □ — НДЦ; \* — відмінності значущі порівняно з показниками контрольної групи після відповідного терміну зберігання,  $p \leq 0,05$ .

**Fig. 4.** Concentration of conjugated trienes under hypothermic storage: ■ — control; □ — NCD; \* — differences are significant as compared with control group indices after corresponding storage term,  $p \leq 0.05$ .

antioxidant may be insufficient to preserve the lipid bilayer structure of cell membranes. As a result, the generation of secondary LPO products, malondialdehyde in particular, occurs. One of the efficient components of protective mixtures can be the so-called 'trap' of reactive oxygen species, which is able to accept and give up an electron to radical oxygen species (redox-active component). The NCD may be referred to these materials based on its physicochemical properties and biological activity [22].

The Figs. 2–4 presents the data on formation of various conjugates in the studied blood samples depending on blood preservative composition and storage terms. During two weeks of storage, NCD supplement to the blood caused a gradual increase in the content of mainly those LPO products, the precursors of which were polyunsaturated fatty acids with two double bonds (CDs and COs). This indirectly indicated the depth of NPs immersion into the lipid layer, which corresponded to the size of fatty acid residues with two double bonds. Only a part of longer precursors with three and four double bonds is converted into CTs and CTETs, as evidenced by their content. However, even after 4 weeks of erythrocyte storage with NCD, a significant decrease in the primary LPO product generation as compared with the control group, was revealed. After 5 weeks of storage, the content of all the conjugates in experimental group samples increased up to the control indices.

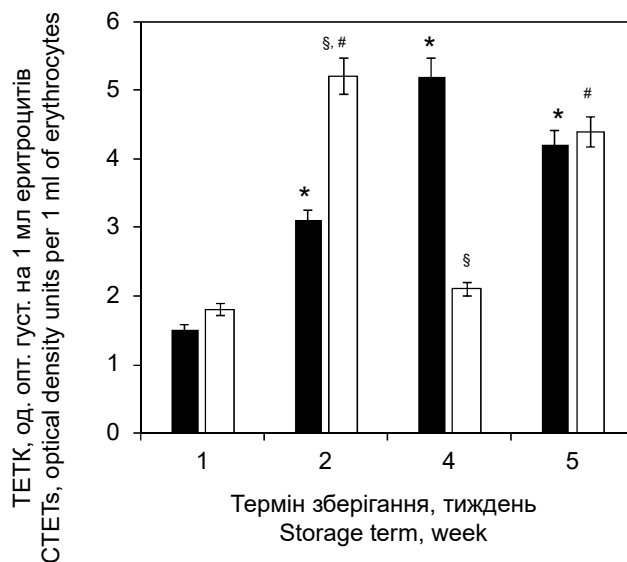


оксидантного захисту. Схожу дію було виявлено у деяких низькомолекулярних «пасток» для вільних радикалів, наприклад токоферолу [13]. На нашу думку, дослідження дії НДЦ у якості «пастки» для вільних радикалів є більш перспективним, оскільки на відміну від вітамінів молекула НДЦ «самовідновлюється» після циклу окиснення.

Враховуючи виявлені закономірності зменшення вмісту продуктів ПОЛ у зразках експериментальної групи на четвертому тижні зберігання, можна припустити, що НДЦ поводить як структурний антиоксидант, неглибоко розташований у ліпідному бішарі мембрани еритроцита та здатний обмінюватися електронами з будь-якими радикальними субстратами. Отже, НДЦ виступає посередником між органічними радикальними формами залишків жирних кислот і неорганічними активними формами кисню. В світовій літературі описані математичні моделі для визначення таких властивостей НДЦ залежно від різних метаболічних факторів [19].

Для розуміння механізму захисту клітин від несприятливого впливу довкілля слід враховувати той факт, що клітинна мембрана є мобільною структурою, яка бере участь у метаболізмі та міжклітинній трансдукції, що приводить до її модифікації та потребує періодичної перебудови. За допомогою методу атомно-силової мікроскопії було показано, що у процесі зберігання еритроцитів змінюється морфологічна структура мембран. У будові мембран на 5–6-у добу з'являлися дефекти, які розвивалися протягом подальшого зберігання крові, на 30-ту добу вони викликали незворотну деструкцію мембран клітин [4]. Деякі автори відносять ці зміни до шкідливих, але існує інша теорія, яка була доведена як теоретично, так і експериментально: за умов метаболічних змін в організмі клітинні та субклітинні бішарові мембранні структури здатні перетворюватися на так звані кубічні мембрани [10, 25], які сприяють адаптації мембранного апарату до негативних умов існування.

Отже, одержані нами результати довели, що частки НДЦ здатні впливати на процеси ПОЛ мембрани еритроцитів протягом тривалого гіпотермічного зберігання. Про це свідчить зменшення вмісту первинних продуктів ПОЛ у зразках крові на четвертому тижні. Присутність НДЦ у зразках крові, які зберігалися від одного до двох тижнів, викликала активацію вільнорадикальних процесів, про яку свідчило підвищення вмісту кон'югатів жирних кислот у суспензії еритроцитів. Можливо, на більш коротких строках зберігання зразків крові НЧ беруть



**Рис. 5.** Концентрація тетраєнових кон'югатів в умовах гіпотермічного зберігання крові: ■ — контроль, □ — НДЦ; відмінності значущі порівняно з показниками зразків контрольної групи після відповідного періоду зберігання (§), одного тижня зберігання (\*), та порівняно зі зразками з додаванням НДЦ після одного тижня зберігання (#),  $p \leq 0,01$

**Fig. 5.** Concentration of conjugated tetraenes under blood hypothermic storage: ■ – control; □ – NCD; § – differences are significant as compared with indices of control group samples after corresponding storage term; \* – differences are significant as compared with control group indices after 1 week of storage; # – differences are significant as compared with indices of samples with NCD supplement after 1 week of storage,  $p \leq 0.01$

Changes in concentration of CTET-intermediates of long-chain fatty acids, such as arachidonic acid, should be described separately. Fig. 5 shows a significant increase in their concentration after 2 weeks of erythrocyte storage in NCD-supplemented medium, its decrease after 4 weeks, and no difference from the control after 5 weeks.

Thus, during blood hypothermic storage after NCD supplement, its versatile effect on antioxidant defense system was manifested. A similar effect was found in some low-molecular 'traps' for free radicals, such as tocopherol [9]. We believe that the study of NCD effect as a 'trap' for free radicals is more promising, since, unlike vitamins, the NCD molecule may 'self-restore' after oxidation cycle.

Bearing in mind the revealed patterns of a decreased LPO product content in the experimental group samples to the week 4 of storage, the NCD may be assumed to behave as a structural antioxidant, located shallowly in the lipid bilayer of erythrocyte membrane and capable of exchanging electrons with any radical substrates. Therefore, the NCD acts as a mediator between organic radical species of fatty acid residues and inorganic reactive oxygen species. Mathematical models to detect



участь у вилученні пошкоджених клітин та подальшому ериптозі [11], про що може свідчити рівень вільного гемоглобіну. Після п'яти тижнів зберігання рівень вільного гемоглобіну значно зростає, тобто частина еритроцитів руйнувалася, але клітини зразків обох досліджуваних груп за вмістом загального гемоглобіну, гематокриту та ОРЕ мали незначущі відмінності порівняно з першим тижнем зберігання.

Крім того, відсутність токсичної дії НДЦ, яка була доведена по відношенню до гепатоцитів [8], дозволяє його використовувати у протоколах консервування інших видів клітин.

Отримані результати вказують на перспективність подальших досліджень часток НДЦ з метою пошуку нових та підвищення ефективності сучасних методів зберігання донорської крові.

### Висновки

1. Показники вільного та загального гемоглобіну, гематокриту та гемолізу значуще не відрізнялись у зразках крові як з додаванням, так і без додавання НДЦ протягом п'яти тижнів гіпотермічного зберігання

2. Після зберігання крові протягом двох тижнів (4–5°C) з додаванням НДЦ значуще підвищувався вміст переважно тих первинних продуктів ПОЛ, попередниками яких є поліненасичені жирні кислоти з двома подвійними зв'язками (ДК і ОДК).

3. Після подовження терміну зберігання крові до чотирьох тижнів з додаванням НДЦ значуще знижувалася генерація ДК, ОДК, ТК та ТЕТ по відношенню до зразків контрольної групи.

4. Наприкінці п'ятого тижня зберігання крові вміст первинних продуктів ПОЛ у зразках експериментальної групи відповідав показникам контрольній.

5. Присутність НДЦ у зразках крові під час гіпотермічного зберігання протягом п'яти тижнів впливав на перебіг процесів ПОЛ, змінюючи інтенсивність накопичення продуктів ПОЛ залежно від терміну зберігання.

### Література

1. Атраментова ЛА, Утевская ОМ. Статистические методы в биологии. Горловка: «Видавництво Ліхтар»; 2008. 248 с.
2. Гаврилов ВБ, Мишкорудна МИ. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови. Лабораторное дело. 1983; (3): 33–6.

such NCD properties depending on different metabolic factors are described in foreign reports [18].

For understanding the mechanism of cell protection against adverse environmental effects, we should bear in mind the fact that cell membrane is a mobile structure, involved in metabolism and intercellular transduction, resulting in its modification and requiring periodic re-arrangement. Using atomic force microscopy, we showed the membrane morphology to undergo changes during erythrocyte storage. To days 5–6, the defects in membrane structure appeared, that developed within further blood storage, and caused irreversible destruction of cell membranes to day 30 [11]. Some authors consider these changes to be harmful, but there is another theory, that has been proven both theoretically and experimentally, *i. e.* under metabolic changes in a body, the cellular and subcellular bilayer membrane structures are able of transformation into the so-called cubic membranes [7, 25], facilitating the membrane adaptation to negative living conditions.

So, our findings proved the ability of the NCD particles to affect the LPO processes of erythrocyte membrane during long-term hypothermic storage, as evidenced by a decreased content of primary LPO products in blood samples to week 4. The NCD presence in blood samples, stored for one to two weeks caused the activation of free radical processes, confirmed by an increased content of conjugated fatty acids in erythrocyte suspension. During shorter terms of blood sample storage, the NPs were likely involved in damaged cell removal and further eryptosis [8], as might be evidenced by free hemoglobin level. After a 5-week storage, it was significantly increased, *i. e.* some erythrocytes were destroyed, but cells of the samples from both studied groups had insignificant differences in total hemoglobin, hematocrit, and EOR contents as compared with the first week of storage.

Also the absence of NCD toxic effect, which was proven in hepatocytes [5], enables using it in the protocols for cryopreservation of other cell types.

These results show the prospects for further studies of NCD particles aimed at finding the novel methods for donated blood storage and improving the efficiency of the current ones.

### Conclusions

1. Indices of free and total hemoglobin, hematocrit and hemolysis did not significantly differ in blood samples both with and without NCD supplement during 5 weeks of hypothermic storage

2. After blood storage for 2 weeks (4–5°C) with the NCD supplement, there was a significant increase in the content of mainly those primary lipid





3. Ганстон ФД. Жирные кислоты. Липиды. В: Бартон Д, Оллис УД, редакторы. Общая органическая химия. Т. 11. Липиды, углеводы, макромолекулы, биосинтез. Москва: Химия; 1986. с. 12–106.
4. Мороз ВВ, Голубев АМ, Черныш АМ, и др. Изменения структуры поверхности мембран эритроцитов при длительном хранении донорской крови. *Общая реаниматология*. 2012; 8(1): 5–12.
5. Никифорова ОА. Вплив стрес-факторів на функціональний стан еритроцитів крові шурів. *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія*. 2011; 19(2): 109–13.
6. Шведова АА, Полянский НБ. Метод определения конъюгатов гидроперекисей липидов в экстрактах из тканей. В: Бурлакова ЕБ, редактор. Исследование синтетических и природных антиоксидантов *in vivo* и *in vitro*. Москва: Наука; 1992. с. 74–5.
7. Barzegar S, Asri Kojabad A, Manafi Shabestari R, et al. Use of antioxidant nanoparticles to reduce oxidative stress in blood storage. *Biotechnol Appl Biochem*. 2022; 69(4):1712–22.
8. Khorrami MB, Sadeghnia HR, Pasdar A, et al. Antioxidant and toxicity studies of biosynthesized cerium oxide nanoparticles in rats. *Int J Nanomedicine* 2019; 14: 2915–26.
9. Klimova EM, Bozhkov AI, Bychenko EA, et al Characteristics of the response of the microalga (*Dunaliella viridis*) to cerium compounds in culture. *Biosystems Diversity*. 2019; 27(2): 142–7.
10. Kong D, Liu R, Liu J, et al. Cubic membranes formation in synchronized human hepatocellular carcinoma cells reveals a possible role as a structural antioxidant defense system in cell cycle progression. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2020 Dec14 [cited 2022 Jan 13]; 8: 617406. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.617406/full>
11. Lang KS, Lang PA, Bauer C, et al. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell physiol biochem*. 2005; 15(5): 195–202.
12. Lee Y-J, Jenkins TC. Biohydrogenation of linolenic acid to stearic acid by the rumen microbial population yields multiple intermediate conjugated diene isomers. *J Nutr*. 2011; 141(8): 1445–50.
13. Miyazawa T, Burdeos GC, Itaya M, et al. Vitamin E: Regulatory redox interactions. *IUBMB Life*. 2019; 71(4): 430–41.
14. Nadeem M, Khan R, Afridi K, et al. Green synthesis of cerium oxide nanoparticles (CeO<sub>2</sub>NPs) and their antimicrobial applications: a review. *Int J Nanomedicine*. 2020; 15: 5951–61.
15. Nourmohammadi E, Oskuee RK, Hasanzadeh L, et al. Cytotoxic activity of greener synthesis of cerium oxide nanoparticles using carrageenan towards a WEHI 164 cancer cell line. *Ceram Int*. 2018; 44(16): 19570–75.
16. Poirier B, Michel O, Bazin R, et al. Conjugated dienes: a critical trait of lipoprotein oxidizability in renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2001; 16(8): 1598–606.
17. Popov AL, Shcherbakov AB, Zhlobak NM, et al. Cerium-dioxide nanoparticles as third-generation enzymes (nanozymes). *Nanosystems: Physics Chemistry Mathematics*. 2017; 8(6): 760–81.
18. Pourkhalili N, Hosseini A, Nili-Ahmadabadi A, et al. Biochemical and cellular evidence of the benefit of a combination of cerium oxide nanoparticles and selenium to diabetic rats. *World J Diabetes*. 2011; 2(11): 204–10.
19. Reed K, Cormack A, Kulkarni A, et al. Exploring the properties and applications of nanoceria: is there still plenty of room at the bottom? *Environ Sci Nano*. 2014; 1(5): 390–405.
20. Schmid-Siegert E, Stepushenko O, Glauser G, Farmer EE. Membranes as structural antioxidants: recycling of malondialdehyde to its source in oxidation-sensitive chloroplast fatty acids. *J Biol Chem*. 2016; 291(25): 13005–13.
21. Schubert D, Dargusch R, Raitano J, Chan SW. Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 342(1): 86–91.

products, whose precursors were polyunsaturated fatty acids with two double bonds (CDs and COs).

3. After extending the blood storage term up to 4 weeks with the NCD adding, the generation of CDs, COs, CTs and CTETs was significantly decreased vs. the control group samples.

4. At the end of 5 weeks of blood storage, the content of primary LPO products in experimental group samples corresponded to the control group indices.

5. The NCD presence in blood samples during hypothermic storage within 5 weeks affected the LPO processes, by changing the intensity of LPO product accumulation depending on storage period.

## References

1. Atramentova LA, Utevskaia OM. [Statistical methods in biology]. Gorlovka: «Likhitar», 2008. 248 p. Russian.
2. Barzegar S, Asri Kojabad A, Manafi Shabestari R, et al. Use of antioxidant nanoparticles to reduce oxidative stress in blood storage. *Biotechnol Appl Biochem*. 2022; 69(4): 1712–22.
3. Gavrilov VB, Mishkorudna MI. [Spectrophotometric determination of the content of lipid hydroperoxides in blood plasma]. *Laboratornoye delo*. 1983; (3): 33–6. Russian.
4. Gunston FD. [Fatty acid. Lipids]. In: Barton D, Ollis UD, editors. [General organic chemistry. Vol. 11. Lipids, carbohydrates, macromolecules, biosynthesis]. Moscow: Khimiya. 1986. p. 12–106. Russian.
5. Khorrami MB, Sadeghnia HR, Pasdar A, et al. Antioxidant and toxicity studies of biosynthesized cerium oxide nanoparticles in rats. *Int J Nanomedicine*. 2019; 14: 2915–26.
6. Klimova EM, Bozhkov AI, Bychenko EA, et al. Characteristics of the response of the microalga (*Dunaliella viridis*) to cerium compounds in culture. *Biosystems Diversity*. 2019; 27(2): 142–7.
7. Kong D, Liu R, Liu J, et al. Cubic membranes formation in synchronized human hepatocellular carcinoma cells reveals a possible role as a structural antioxidant defense system in cell cycle progression. *Front Cell Dev Biol*. [Internet]. 2020 Dec14 [cited 2022 Jan 13]; 8: 617406. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.617406/full>
8. Lang KS, Lang PA, Bauer C, et al. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem*. 2005; 15(5): 195–202.
9. Miyazawa T, Burdeos GC, Itaya M, et al. Vitamin E: Regulatory redox interactions. *IUBMB Life*. 2019; 71(4): 430–41.
10. Lee Y-J, Jenkins TC. Biohydrogenation of linolenic acid to stearic acid by the rumen microbial population yields multiple intermediate conjugated diene isomers. *J Nutr*. 2011; 141(8): 1445–50.



22. Sims CM, Hanna SK, Heller DA, et al. Redox-active nanomaterials for nanomedicine applications. *Nanoscale*. 2017; 9(40): 15226–51.
23. Srivastava V, Gusain D, Sharma YC. Critical review on the toxicity of some widely used engineered nanoparticles. *Ind Eng Chem Res.* 2015; 54(24): 6209–33.
24. Wadhwa R, Aggarwal T, Thapliyal N, et al. Red blood cells as an efficient *in vitro* model for evaluating the efficacy of metallic nanoparticles. *3 Biotech* [Internet]. 2019 Jun 21 [cited 2022 Jan 12]; 9(7): 279. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6588668/>
25. Zakaria AA, Sepp DK, Yuru D. Cubic membranes: a legend beyond the Flatland of cell membrane organization. *J Cell Biol* 2006; 173(6): 839–44.
26. Zemlyanskikh NG, Denisova ON. Changes in the erythrocyte membrane–cytoskeleton complex induced by dimethyl sulfide, polyethylene glycol, and low temperature. *Biophysics*. 2009; 54: 490–6.
11. Moroz VV, Golubev AM, Chernysh AM, et al. [Structural changes in the surface of red blood cell membranes during long-term donor blood storage]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2012; 8(1): 5–12. Russian.
12. Nadeem M, Khan R, Afridi K, et al. Green synthesis of cerium oxide nanoparticles (CeO<sub>2</sub> NPs) and their antimicrobial applications: a review. *Int J Nanomedicine*. 2020; 15: 5951–61.
13. Nikiforova OA. [Influence of stress factors on functional state of blood erythrocytes in rats]. *Bulletin of Dnipropetrovsk University. Biology. Ecology*. 2011; 19(2): 109–13. Russian.
14. Nourmohammadi E, Oskuee RK, Hasanzadeh L, et al. Cytotoxic activity of greener synthesis of cerium oxide nanoparticles using carrageenan towards a WEHI 164 cancer cell line. *Ceram Int*. 2018; 44(16): 19570–75.
15. Poirier B, Michel O, Bazin R, et al. Conjugated dienes: a critical trait of lipoprotein oxidizability in renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2001; 16(8): 1598–606.
16. Popov AL, Shcherbakov AB, Zholobak NM, et al. Cerium dioxide nanoparticles as third-generation enzymes (nanozymes). *Nanosystems: Physics Chemistry Mathematics*. 2017; 8(6): 760–81.
17. Pourkhalili N, Hosseini A, Nili-Ahmadabadi A, et al. Biochemical and cellular evidence of the benefit of a combination of cerium oxide nanoparticles and selenium to diabetic rats. *World J Diabetes*. 2011; 2(11): 204–10.
18. Reed K, Cormack A, Kulkarni A, et al. Exploring the properties and applications of nanoceria: is there still plenty of room at the bottom? *Environ Sci Nano*. 2014; 1(5): 390–405.
19. Schmid-Siegert E, Stepushenko O, Glauser G, Farmer EE. Membranes as structural antioxidants: recycling of malonaldehyde to its source in oxidation-sensitive chloroplast fatty acids. *J Biol Chem*. 2016; 291(25): 13005–13.
20. Schubert D, Dargusch R, Raitano J, Chan SW. Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 342(1): 86–91.
21. Shvedova AA, Polyansky NB. [Method for determination of conjugated lipid hydroperoxides in tissue extracts]. In: Burlakova EB, editor. [Investigation of synthetic and natural antioxidants *in vivo* and *in vitro*]. Moscow: Nauka; 1992. p. 74–5. Russian.
22. Sims CM, Hanna SK, Heller DA, et al. Redox-active nanomaterials for nanomedicine applications. *Nanoscale*. 2017; 9(40): 15226–51.
23. Srivastava V, Gusain D, Sharma YC. Critical review on the toxicity of some widely used engineered nanoparticles. *Ind Eng Chem Res.* 2015; 54(24): 6209–33.
24. Wadhwa R, Aggarwal T, Thapliyal N, et al. Red blood cells as an efficient *in vitro* model for evaluating the efficacy of metallic nanoparticles. *3 Biotech* [Internet]. 2019 Jun 21 [cited 2022 Jan 12]; 9(7): 279. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6588668/>
25. Zakaria AA, Sepp DK, Yuru D. Cubic membranes: a legend beyond the Flatland of cell membrane organization. *J Cell Biol*. 2006; 173(6): 839–44.
26. Zemlyanskikh NG, Denisova ON. Changes in the erythrocyte membrane–cytoskeleton complex induced by dimethyl sulfide, polyethylene glycol, and low temperature. *Biophysics*. 2009; 54: 490–6.

