

ВЛИЯНИЕ НИЗКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ МЕЛАТОНИНА НА КАЧЕСТВО ХРАНИМЫХ ЭРИТРОЦИТОВ *IN VITRO*

Shu Li^{1*}, Lihua Zhang², Haiqing Yuan², Lili Yang¹, Fang Song³, Heming Liu⁴, Chunhuang Wei¹, Haimai Ding¹, Qiang Ma^{1*}, Yan Su^{1*}

¹Институт консервации крови, Медицинский колледж Баотоу, Баотоу, Китай

²Отделение сбора крови, Центральная станция крови, Баотоу, Баотоу, Китай

³Отделение гистологии и эмбриологии, Медицинский колледж Баотоу, Баотоу, Китай

⁴Отделение ортопедии, Первая аффилированная больница Медицинского колледжа Баотоу, Баотоу, Китай

РЕЗЮМЕ

Введение. Окислительный стресс является одной из причин повреждения эритроцитов при хранении. Мелатонин (МТ) является эффективным антиоксидантом, однако про- и антиоксидантные свойства МТ зависят от типа клеток, окислительно-восстановительного состояния, а также экспериментальных условий.

Цель работы — изучить влияние низкой концентрации МТ на морфологию, агрегацию, окислительный стресс и метаболизм глюкозы эритроцитов при их долговременном хранении.

Материалы и методы. Лейкофильтрованные эритроциты инкубировали в течение 42 дней в условиях банка крови в добавочной среде МАР с МТ (150 пг/мл) и без МТ. Для выявления протективного эффекта МТ при хранении эритроцитов изучали морфологию эритроцитов, агрегационный индекс, концентрации метгемоглобина (MetHb), малонового диальдегида (МДА), глюкозы, мочевой кислоты и АТФ в эритроцитах в дни 0, 7, 14, 21, 28, 35 и 42.

Результаты. На количество деформированных эритроцитов, относительную скорость гемолиза, индекс агрегации, концентрации МДА и MetHb значительно влияли как время хранения ($p < 0,0001$), так и наличие мелатонина ($p < 0,01$), их взаимное действие влияло только на количество деформированных эритроцитов ($p < 0,0001$). На концентрацию глюкозы, молочной кислоты и АТФ влияло время хранения ($p < 0,0001$), но не концентрация МТ ($p > 0,05$). Количество деформированных эритроцитов, относительная скорость гемолиза, МДА и MetHb в группе МТ были значительно ниже, чем в контрольной группе в конце срока хранения ($p < 0,05$).

Заключение. Низкие концентрации МТ оказывали протективный эффект на качество хранимых эритроцитов благодаря антиоксидантному эффекту.

Ключевые слова: мелатонин, эритроциты, хранение эритроцитов, антиоксиданты, энергетический метаболизм

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Li S., Zhang L., Yuan H., Yang L., Song F., Liu H., Wei C., Ding H., Ma Q., Su Y. Влияние низкой концентрации мелатонина на качество хранимых эритроцитов *in vitro*. Гематология и трансфузиология. 2022; 67(1): 62–73. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2022-67-1-62-73>

EFFECT OF LOW CONCENTRATION OF MELATONIN ON THE QUALITY OF STORED RED BLOOD CELLS *IN VITRO*

Shu Li[#], Lihua Zhang^{1#}, Haiqing Yuan², Lili Yang¹, Fang Song³, Heming Liu⁴, Chunhuang Wei¹, Haimai Ding¹, Qiang Ma^{1*}, Yan Su^{1*}

¹Institute of Blood Conservation, Baotou Medical College, Baotou, China

²Department of Blood Collection, Baotou Central Blood Station, Baotou, China

³Department of Histology and Embryology, Baotou Medical College, Baotou, China

⁴Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou, China

ABSTRACT

Introduction. Oxidative stress is one of the important causes of red blood cells (RBCs) storage lesion. As a hormone, melatonin (MT) is also an effective antioxidant, however the pro- and antioxidative properties of MT depend on the cell type, redox state, as well as experimental conditions.

Aim of this study — to investigate the protective effects of low concentration of MT on the stored RBCs *in vitro*.

Materials and methods. Leukofiltered RBCs were incubated in MAP RBC additive solution with or without 150 pg/mL of MT for 42 days under blood bank conditions. The morphology, aggregation index, methemoglobin (MetHb), malondialdehyde (MDA), glucose, lactic acid and ATP of RBCs were detected on days 0, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 to observe the protective effects of MT during the storage of RBCs.

Results. During RBCs storage, the number of deformed RBCs, relative hemolysis rate, aggregation index, MDA and MetHb were significantly affected by both storage time ($p < 0.0001$) and melatonin ($p < 0.01$), and they had interaction only on the number of deformed RBCs ($p < 0.0001$). The concentration of glucose, lactic acid and ATP were affected by storage time ($p < 0.0001$), but not by MT concentration ($p > 0.05$). The number of deformed RBCs, relative hemolysis rate, MDA and MetHb in MT group were significantly lower than that in control group at the end of storage stage ($p < 0.05$).

Conclusion. Our study showed low hypnotic drug concentration of MT is speculated to have protective effects on the quality of stored RBCs through antioxidative mechanism.

Keywords: melatonin, red blood cells, blood storage, antioxidation, energy metabolism

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Financial disclosure: the study had no sponsorship.

For citation: Li S., Zhang L., Yuan H., Yang L., Song F., Liu H., Wei C., Ding H., Ma Q., Su Y. Effect of low concentration of melatonin on the quality of stored red blood cells *in vitro*. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2022; 67(1): 62–73 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2022-67-1-62-73>

Введение

Трансфузии эритроцитов являются важной составной частью интенсивной терапии и часто используются у больных с острой массивной кровопотерей, ожогами, анемией, хирургическим вмешательством, злокачественными новообразованиями и тяжелыми травмами. Они незаменимы для улучшения снабжения кислородом, содействуют коагуляции, спасают жизнь больных. Однако концентраты эритроцитов при хранении *in vitro* претерпевают ряд биохимических и морфологических

Introduction

Transfusion is an important medical practice of fluid resuscitation, and this service is commonly used for patients with acute massive blood loss, burns, anemia, surgery, malignancies, and severe trauma. It has an irreplaceable role in significantly improving oxygen supply, promoting coagulation, and saving lives. The concentrates of red blood cells (RBCs) during *in vitro* storage undergoes a series of biochemical and morphological changes, i. e., the RBCs storage lesions [1–2], which

изменений [1–2], которые приводят к повреждению мембран эритроцитов, уменьшают их функциональные свойства. Поэтому в последние годы проблемы улучшения качества хранения и продления времени хранения эритроцитов стали темами многих исследований. Истощение энергии и окислительное повреждение являются ключевыми факторами разрушения эритроцитов в процессе хранения [3–4]. Для уменьшения окислительного повреждения в раствор добавляются антиоксиданты. В настоящее время имеются сообщения об использовании эндогенных антиоксидантов, таких как витамин E [5], витамин C [6–7], глутатион [8–9] и N-ацетилцистеин [10], и некоторых экзогенных фенольных соединений, таких как пропифол [11]. Добавление большинства из этих антиоксидантов улучшает в определенной степени качество хранения эритроцитов, но не может полностью противодействовать сильному окислительному повреждению. Это происходит потому, что существует много разных видов свободных радикалов, и единственный поглотитель свободных радикалов не может эффективно блокировать полиморфную цепную реакцию. Для решения этой проблемы были изучены защитные эффекты витамина C [10, 12], витамина E [5, 12], цистеина [13] и их комбинаций [10]. При использовании всех их были достигнуты некоторые антиоксидантные эффекты за счет поглощения гидроксильных радикалов, стабилизации клеточной мембраны и поглощения H_2O_2 . Однако витамин C может быть легко окислен сам по себе, и эритроциты будут дополнительно повреждены образованием свободных радикалов. Кроме того, аддитивные растворы витамина C, цистеина и глутатиона водорастворимы, и поэтому их можно легко растворить, но трудно ввести в эритроциты. В противоположность этому, используемый в качестве липофильного антиоксиданта витамин E может поступать в клетку, но его трудно растворить в растворе. Изучение аддитивных растворов проводится уже много лет, но, несмотря на это, ситуация с повреждением эритроцитов при хранении существенно не улучшилась.

Мелатонин (MT), также известный как N-ацетил-5-метокситриптамин, представляет собой гормон, синтезируемый и секретируемый шишковидной железой [14]. Он обладает широким спектром физиологических функций и влияет на биологические часы, регулирует иммунную систему и оказывает антиоксидантное действие, действуя как прямой поглотитель свободных радикалов, а также путем повышения экспрессии и активности эндогенных антиоксидантных ферментов [15–16]. Кроме того, MT может оказывать антиоксидантное действие на мембрану и на цитозол из-за его липофильных и гидрофильных свойств. Ввиду этого предполагается, что MT может явиться полезным аддитивным раствором для хранения концентратов эритроцитов.

leads to reduced survival rate of RBCs. Therefore, it is necessary to improve the storage quality and prolong the storage time, and these have become the hot research topics in recent years. Energy depletion and oxidative damage are the key factors of RBCs lesion during the storage [3–4]. To reduce oxidative damage, some antioxidants were added into the additive solution. Currently, the endogenous antioxidants such as vitamin E [5], vitamin C [6–7], glutathione (GSH) [8–9] and N-acetylcysteine [10], and some exogenous phenolic compounds, such as propofol [11], have been reported. The addition of most of these antioxidants could improve the storage quality of RBCs to a certain extent but could not completely counteract the strong oxidative damage. This is because there are many kinds of free radicals, and the single free radical scavenger cannot effectively block the polymorphic chain reaction. To solve this problem, the protective effects of vitamin C [10, 12], vitamin E [5, 12], cysteine [13] and their combination [10] were studied. All of these have achieved some antioxidative effects by scavenging hydroxyl radicals, stabilizing cell membrane, and scavenging H_2O_2 , respectively. However, vitamin C can be easily oxidized by itself, and the RBCs were further damaged by generated free radicals. In addition, the additives of additive solution, vitamin C, cysteine, and glutathione (GSH) are all water-soluble, and so they can be easily dissolved, but it's difficult for them to enter RBCs. In contrast, as a liposoluble antioxidant, vitamin E can enter the cell, but is difficult to dissolve in the additive solution. The study of additive solution has never stopped, and also the damage of RBCs during storage has not been substantially improved.

Melatonin (MT), also known as N-acetyl-5-methoxy tryptamine, is a hormone synthesized and secreted by pineal gland [14]. It has a wide range of physiological functions and influences biological clock, regulates immune system, and has antioxidant actions that can act as a direct free radical scavenger or by increasing the expression and activity of endogenous antioxidant enzymes [15–16]. In addition, MT can exert antioxidant effects in the membrane as well as cytosol because of its lipophilic and hydrophilic properties. In view of this, MT is speculated to be a better supplement for storage of RBCs. Some studies have shown that the pro- and antioxidative properties of MT depended on the type of cells, redox state, as well as experimental conditions [17]. The human serum MT concentration is lower during the day (10–20 pg/mL) and significantly higher at night (30–120 pg/mL), which reaches its peak at about 3:00 am [18]. The general hypnotic-curing oral dose of melatonin is 1 to 3 mg, and the blood drug concentration achieves more than 1.9 ng/mL after 1 hour. M.R. Şekeroğlu et al. [11] have shown that 500 pg/mL MT could prevent the accumulation of malondial-

Некоторые исследования показали, что про- и антиоксидантные свойства МТ зависели от типа клеток, окислительно-восстановительного состояния, а также условий эксперимента [17]. Концентрация МТ в сыворотке человека днем ниже (10–20 пг/мл), а ночью выше (30–120 пг/мл), достигая пика примерно в 3 часа утра [18]. Общая пероральная доза МТ, используемого в качестве снотворного препарата, составляет от 1 до 3 мг, концентрация лекарственного средства в крови достигает более 1,9 нг/мл через 1 час. М.Р. Şekeroğlu и соавт. [11] показали, что МТ в концентрации 500 пг/мл может предотвращать накопление малонового диальдегида (МДА) и сохранять концентрации глутатиона, глутатион пероксидазы и супероксид дисмутазы, но не влияет на каталазу эритроцитов. М. Allegra и соавт. [19] показали, что МТ не только предотвращает выработку МДА, но и предотвращает повреждение эритроцитов, вызываемое МДА. В некоторых исследованиях сообщалось об ограниченной антиоксидантной активности МТ [20] или даже приводились доказательства его проокислительных свойств [21–24].

Цель настоящей работы — изучить влияние низкой концентрации МТ на морфологию, агрегацию, окислительный стресс и метаболизм глюкозы эритроцитов при их долговременном хранении.

Материалы и методы

Сбор и подготовка проб

Исследование было одобрено комитетом по этике Медицинского колледжа Баотоу. Были рекрутированы 6 здоровых добровольцев в возрасте 18–23 лет. Все добровольцы перед сдачей крови подписали информированное согласие, у каждого из них было взято по 200 мл цельной крови. После лейкодеплеции эритроциты ресуспендировали с помощью 50 мл раствора MAP (лимонная кислота 0,20 г, дигидрат цитрата натрия 1,50 г, глюкоза 7,93 г, дигидрофосфат натрия 0,94 г, хлорид натрия 4,97 г, аденин 0,14 г, маннит 14,57 г в каждом 1000 мл раствора). Эритроциты осторожно перемешивали, а затем равномерно распределяли по двум пакетам. Основным компонентом пакета крови являлся пластифицированный поливинилхлорид (ПВХ) с двухэтилгексилловым эфиром (ДЕHP) (медицинские полимерные продукты группы Shandong Weigao Co., Ltd, Шаньдун, Китай). МТ добавляли в один мешок (группа МТ) для достижения конечной концентрации 150 пг/мл, в другой мешок добавляли равный объем растворителя без МТ (контрольная группа). Эритроциты затем хранили при 4 ± 2 °С. При сроке хранения 0, 7, 14, 21, 28, 35 и 42 дня из каждого пакета после осторожного смешивания суспензии отбирали по 5 мл образца крови и направляли для исследования.

dehyde (MDA) and protect GSH, glutathione peroxidase and superoxide dismutase levels, but did not affect the catalase levels of RBCs. M. Allegra et al. [19] have shown that MT not only prevents MDA production, but also prevents damage of RBCs caused by MDA. Some studies have reported the limited antioxidative activity of MT [20] or even provide evidence for its pro-oxidative properties [21–24].

Aim of this study — to investigate the long-term preservation effects of low hypnotic drug concentration of MT on the morphology, aggregation, oxidative stress and metabolism of glucose in stored RBCs.

Materials and methods

Sample collection and preparation

This study was approved by the Ethics Committee of Baotou Medical College. Six healthy volunteers aged 18–23 years were recruited, and informed consent form was obtained before blood donation. 200 mL of whole blood was collected from each volunteer. After depletion of white blood cells, the packed RBCs were resuspended in 50 mL MAP solution (citric acid 0.20 g, sodium citrate dihydrate 1.50 g, glucose 7.93 g, sodium dihydrogen phosphate 0.94 g, sodium chloride 4.97 g, adenine 0.14 g, mannitol 14.57 g in each 1000 mL additive solution). The RBCs were gently mixed and then evenly distributed in 2 blood bags, the main component of the blood bag is 2-ethylhexyl ester (DEHP) plasticized polyvinyl chloride (PVC) (Shandong Weigao Group medical polymer products Co., Ltd, Shandong, China). MT was added in one bag (MT group) to reach a final whole blood concentration of 150 pg/mL, and an equal volume of MT solvent was added in the other bag (control group). These RBCs were then stored at 4 ± 2 °C. At shelf-life of 0, 7, 14, 21, 28, 35, and 42 days, 5 mL of blood sample was taken from each bag after gently mixing the suspension.

Определение морфологии эритроцитов

Суспензию эритроцитов объемом 50 мкл использовали для изготовления мазка крови, который окрашивали по Гимзе. Морфологию эритроцитов исследовали под микроскопом (увеличение $\times 100$), количество деформированных эритроцитов подсчитывали на 1000 эритроцитов.

Определение индекса агрегации эритроцитов

Для определения агрегации эритроцитов использовали автоматический реометр крови LBY-N6C.

Определение относительной скорости гемолиза

Суспензию эритроцитов объемом 1 мл центрифугировали при 3000 об./мин в течение 5 мин. Затем отбирали 200 мкл супернатанта и разбавляли деионизированной водой. С помощью многофункционального считывателя микропланшетов (Thermo 3001) определяли поглощение в супернатанте при 540 нм. Поглощение 50 раз разбавленного гемолизата использовали в качестве эталона, относительную скорость гемолиза каждого образца рассчитывали, используя приведенную ниже формулу:

Относительная скорость гемолиза = поглощение образца / поглощение эталона.

Определение метгемоглобина (MetHb), глюкозы и молочной кислоты

Концентрацию MetHb, глюкозы и молочной кислоты определяли с помощью газоанализатора крови ABL 90.

Определение pH, MDA и АТФ

pH образца крови определяли с использованием измерителя Mettler Toledo. Концентрацию MDA определяли в соответствии с инструкциями набора (S0131, Институт биотехнологии Бейотима). Содержание АТФ в эритроцитах определяли в соответствии с набором для обнаружения АТФ (S0027, Институт биотехнологии Бейотима).

Статистический анализ. Для статистики и анализа данных использовали статистическое программное обеспечение GraphPad Prism 5.02. Результаты измерений выражали в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. Для статистического анализа использовали двусторонний анализ дисперсии (ANOVA). В качестве статистически значимой разницы принимали $p < 0,05$.

Результаты

MT уменьшил количество деформированных эритроцитов на конечной стадии хранения

Мазок крови использовали для наблюдения морфологии эритроцитов. Как показано на рисунке 1А, при длительном времени хранения морфология эритроцитов изменялась от гладкого двойного вогнутого

Detection of RBCs morphology

RBCs suspension of 50 μ L was used to push the blood smear, and then was stained by Giemsa. The morphology of RBCs was observed under a microscope ($\times 100$) and the number of deformed RBCs was counted in each 1000 RBCs.

Detection of RBC aggregation index

LBY-N6C automatic blood rheometer was used to detect the aggregation of RBCs.

Detection of relative hemolysis rate

RBCs suspension of 1 mL was centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes. Then 200 μ L of supernatant was taken out and diluted with deionized water. The diluted supernatant was used for detecting the absorbance at 540 nm by multifunction microplate reader (Thermo 3001). The absorbance of 50 times diluted hemolysate was used as reference, and the relative hemolysis rate of each sample was calculated by using the following formula:

Relative hemolysis rate = sample absorbance / reference absorbance.

Detection of methemoglobin (MetHb), glucose and lactic acid

The concentration of MetHb, glucose and lactic acid was detected by the Radiometer ABL90 blood gas analyzer.

Detection of pH, MDA and ATP

The pH of blood sample was determined by using the Mettler Toledo pH meter. The concentration of MDA was detected according to the MDA kit instructions (S0131, Beyotime Institute of Biotechnology). The ATP level in RBCs was determined according to the ATP detection kit (S0027, Beyotime Institute of Biotechnology).

Statistical analyses. GraphPad Prism 5.02 statistical software was used for data statistics and analysis. Measurement data was expressed as means \pm standard deviation ($x \pm s$), and two-way Analysis of Variance (ANOVA) was used to do statistical analysis. $P < 0.05$ represents a statistically significant difference.

Results

MT reduced the number of deformed RBCs at the end storage stage

The blood smear was used to observe the morphology of RBCs. As shown in Figure 1A, with the prolonged storage time, the morphology of RBCs changes from smooth double concave disk to acanthocyte, smooth spherical

диска к акантоцитам, гладким сферическим и акантусным эритроцитам как в контрольной группе, так и в группе МТ. Статистический анализ (рис. 1B) показал, что на количество деформированных эритроцитов влияло как время хранения ($p < 0,0001$), так и концентрация МТ ($p < 0,0001$), между ними была взаимосвязь ($p < 0,0001$). Количество деформированных эритроцитов в группе МТ было значительно меньше, чем в контрольной группе на 21-й, 28-й, 35-й и 42-й дни ($p < 0,0001$).

МТ снижает относительную скорость гемолиза на конечной стадии хранения

Относительная скорость гемолиза отражает разрушение эритроцитов. На относительную скорость гемолиза влияли как время хранения ($p < 0,0001$), так и концентрация мелатонина ($p < 0,01$), между ними была выявлена значимая связь ($p < 0,01$) (рис. 3). По сравнению с контрольной группой относительная скорость гемолиза группы МТ была значительно ниже на 42-й день ($p < 0,0001$).

and acanthus erythrocyte in both control group and MT group. Statistical analysis (Figure 1B) showed that the number of deformed RBCs was affected by both storage time ($p < 0.0001$) and MT concentration ($p < 0.0001$), and there was interaction between them ($p < 0.0001$). The number of deformed RBCs in MT group was significantly less than that in the control group on days 21, 28, 35 and 42 ($p < 0.0001$).

MT reduced the relative hemolysis rate at the end storage stage

The relative hemolysis rate reflects the destruction of RBCs. The results (Figure 3) showed that the relative hemolysis rate was affected by both storage time ($p < 0.0001$) and melatonin concentration ($p < 0.01$), and there was interaction between them ($p < 0.01$). Compared with the control group, the relative hemolysis rate of MT group was significantly lower on day 42 ($p < 0.0001$).

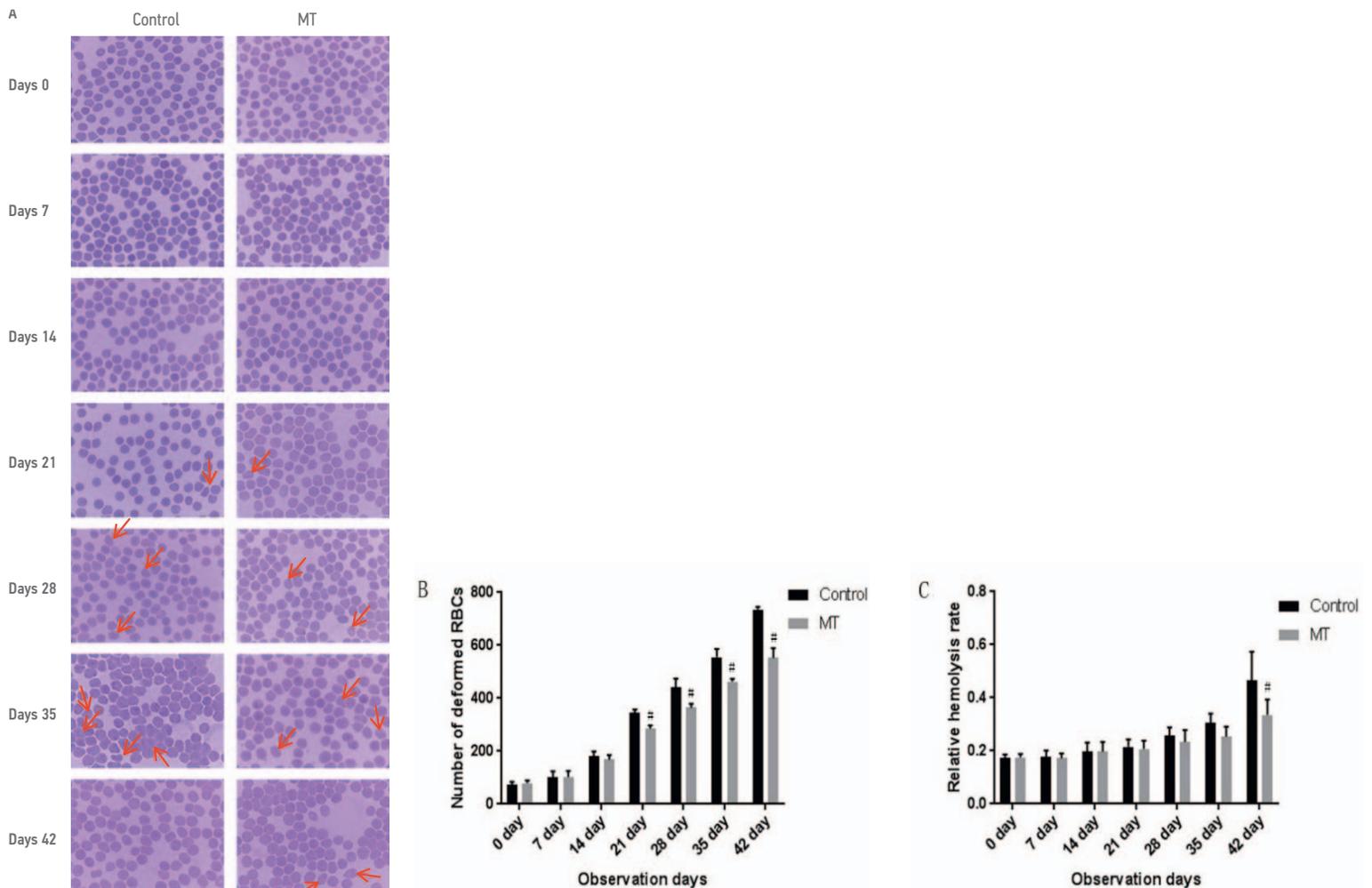


Рисунок 1. Влияние МТ на деформацию и гемолиз эритроцитов. **А** — эффект МТ на морфологию хранимых эритроцитов. Морфологию хранящихся эритроцитов наблюдали в мазке крови под микроскопом (×100) в дни 0, 7, 14, 21, 28, 35 и 42. Поврежденные эритроциты показаны красными стрелками. **В** — влияние МТ на количество деформированных эритроцитов. **С** — влияние МТ на скорость гемолиза эритроцитов. Образцы получены от 6 отдельных доноров крови. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. # — $p < 0,0001$ по сравнению с контрольной группой

Figure 1. Effect of MT on deformation and hemolysis of RBCs. **A** — the effect of MT on the morphology of stored RBCs. The morphology of stored RBCs was observed on the blood smear under microscope (×100) on days 0, 7, 14, 21, 28, 35 and 42. Damaged red blood cells were shown with red arrows. **B** — the effect of MT on the number of deformed RBCs. **C** — the effect of MT on the hemolysis rate of RBCs. Samples from 6 individual blood donors, and data are shown as means ± standard deviation. # — $p < 0.0001$ vs control group

Влияние МТ на индекс агрегации эритроцитов на этапе конечного хранения

Индекс агрегации эритроцитов был изучен на автоматическом реометре крови LBY-N6C. Как показано на рисунке 2, индекс агрегации эритроцитов постепенно повышался как в контрольной, так и в МТ группах во время хранения эритроцитов. Статистический анализ (рис. 2) показал, что как время хранения ($p < 0,0001$), так и концентрация МТ ($p < 0,01$) влияли на индекс агрегации, но между ними отсутствовала значимая связь ($p > 0,05$). Индекс агрегации в группе МТ был ниже, чем в контрольной группе, на 35-й день ($p = 0,0602$) и 42-й день ($p = 0,0542$), но не было существенной разницы в эти дни в группе МТ.

МТ уменьшал концентрацию МДА на конечной стадии хранения

МДА является одним из конечных продуктов перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот в клетках, и содержание МДА обычно используется в качестве маркера для отражения окислительного стресса и антиоксидантного статуса. Исследование показало (рис. 3А), что как время хранения ($p < 0,0001$), так и концентрация МТ ($p < 0,0001$) влияли на МДА и между ними существовала связь ($p < 0,01$). По сравнению с контрольной группой относительная скорость гемолиза в группе МТ была значительно ниже на 35-й день ($p < 0,05$) и 42-й день ($p < 0,0001$).

МТ уменьшал MetHb на конечной стадии хранения

MetHb образуется в результате обратимого окисления гемового железа (Fe^{2+}) до трехвалентного состояния (Fe^{3+}). Это реактивная молекула, которая может дополнительно усиливать окислительный стресс и вызывать осмотическую хрупкость и внутрисосудистый гемолиз. Как показано на рисунке 3В, время

The effect of MT on RBC aggregation index at the end storage stage

The RBC aggregation index was detected by LBY-N6C automatic blood rheometer. As shown in Figure 2, the RBC aggregation index was gradually increased in both control and MT groups during the storage of RBCs. Statistical analysis (Figure 2) showed that both storage time ($p < 0.0001$) and melatonin concentration ($p < 0.01$) affect the aggregation index, but there is no interaction between them ($p > 0.05$). The aggregation index of MT group is lower than control group on days 35 ($p = 0.0602$) and 42 ($p = 0.0542$), but there is no significant difference.

MT reduced the MDA at the end storage stage

MDA is one of the final products of polyunsaturated fatty acids peroxidation in the cells, and MDA level is commonly used as a marker to reflect oxidative stress and the antioxidant status. This study showed (Figure 3A) that both storage time ($p < 0.0001$) and melatonin concentration ($p < 0.0001$) affect the MDA, and there is also interaction between them ($p < 0.01$). Compared with the control group, the relative hemolysis rate of MT group was significantly lower on days 35 ($p < 0.05$) and 42 ($p < 0.0001$).

MT reduced the MetHb at the end storage stage

MetHb is formed by reversible oxidation of heme iron (Fe^{2+}) to ferric state (Fe^{3+}). It is a reactive molecule, which can further increase oxidative stress and cause osmotic fragility and intravascular hemolysis. As shown in Figure 3B, both storage time ($p < 0.0001$) and melatonin concentration ($p = 0.0002$) affect the MetHb, but there is no interaction between them ($p > 0.05$). The MetHb

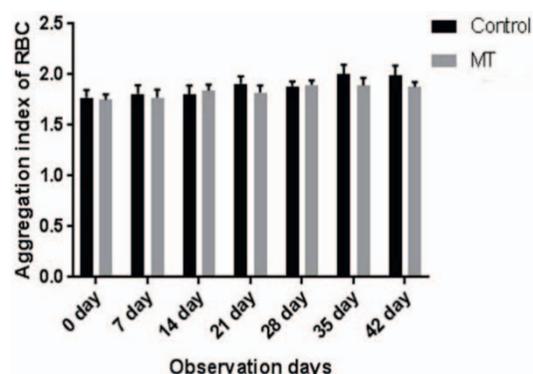


Рисунок 2. Влияние МТ на агрегацию эритроцитов во время хранения. Образцы крови получены от 6 отдельных доноров крови. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение
Figure 2. Effect of MT on the aggregation of RBCs during storage. Samples from 6 individual blood donors, and data are shown as means \pm standard deviation

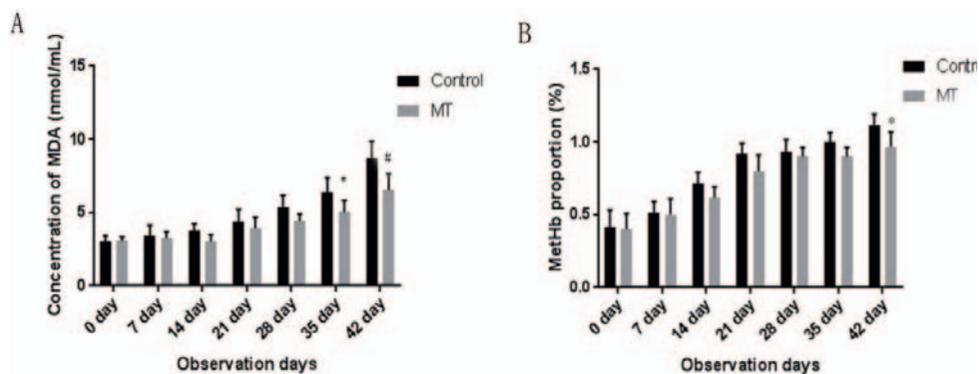


Рисунок 3. Влияние МТ на концентрацию МДА и долю MetHb при хранении. **А** — влияние МТ на концентрацию МДА в хранимых эритроцитах. **В** — влияние МТ на долю MetHb в хранимых эритроцитах. Образцы крови получены от 6 отдельных доноров крови. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, # — $p < 0,0001$ по сравнению с контрольной группой
Figure 3. Effect of MT on MDA level and MetHb proportion during storage. **A** — the effect of MT on the MDA level of stored RBCs. **B** — the effect of MT on the MetHb proportion of stored RBCs. Samples from 6 individual blood donors, and data are shown as means \pm standard deviation. * — $p < 0.05$ vs control group, # — $p < 0.0001$ vs control group.

хранения ($p < 0,0001$) и концентрация МТ ($p = 0,0002$) влияли на MetHb, но между ними отсутствовала связь ($p > 0,05$). Концентрация MetHb в группе МТ была значительно меньше, чем в контрольной группе на 42-й день ($p < 0,0001$).

Влияние МТ на концентрацию глюкозы

Глюкозу в добавочном растворе рассматривали как основной источник энергии эритроцитов. Концентрация глюкозы снижалась со временем хранения ($p < 0,0001$) (рис. 4А), на нее не влияла концентрация МТ ($p > 0,05$), и между ними не было никакой связи ($p > 0,05$).

Влияние МТ на концентрацию молочной кислоты

Молочная кислота является конечным продуктом анаэробного окисления глюкозы. При хранении молочная кислота накапливалась, и ее концентрация увеличивалась со временем хранения ($p < 0,0001$), но на нее не влияла концентрация МТ ($p > 0,05$), и между ними не было значимой связи ($p > 0,05$) (рис. 4В).

Влияние МТ на концентрацию АТФ эритроцитов

АТФ является прямым источником энергии для жизнедеятельности эритроцитов. Концентрация АТФ постепенно уменьшалась со временем хранения ($p < 0,0001$), но на нее не влияла концентрация МТ ($p > 0,05$), и между ними не было связи ($p > 0,05$) (рис. 4С).

Обсуждение

Хранящиеся концентраты эритроцитов рассматриваются как основной источник для проведения трансфузионной терапии. Качество хранящихся эритроцитов зависит от состава аддитивного раствора и условий их хранения. Однако аддитивный раствор может задерживать старение эритроцитов, но не предотвращает их старение. Другими словами, эритроциты претерпевают ряд морфологических, функциональных и биохимических

of МТ group was significantly lower than control group on day 42 ($p < 0.0001$).

Effect of МТ on the concentration of glucose

Glucose in the additive solution was considered as the main energy source of RBCs. Our results (Figure 4A) showed that the glucose concentration decreased with storage time ($p < 0.0001$) but could not be affected by МТ concentration ($p > 0.05$), and there is no interaction between them ($p > 0.05$).

Effect of МТ on the concentration of lactic acid

Lactic acid is the end product of the anaerobic oxidation of glucose. During storage, lactic acid was accumulated, and its concentration was increased with storage time ($p < 0.0001$) but could not be affected by melatonin concentration ($p > 0.05$), and there is no interaction between them ($p > 0.05$) (Figure 4B).

Effect of МТ on the ATP level of RBCs

ATP is the direct energy source for the life activities of RBCs. As shown in Figure 4C, the concentration of ATP was gradually decreased with storage time ($p < 0.0001$) but could not be affected by melatonin concentration ($p > 0.05$), and there is no interaction between them ($p > 0.05$).

Discussion

Stored RBCs are considered as the main source of transfusion therapy. The quality of stored RBCs depends on the composition of additive solution and their storage. However, the additive solution can only delay the aging of RBCs but cannot prevent their aging. In other words, RBCs undergo a series of changes in morphology, function and biochemistry, and these changes become more and more obvious with prolonged storage

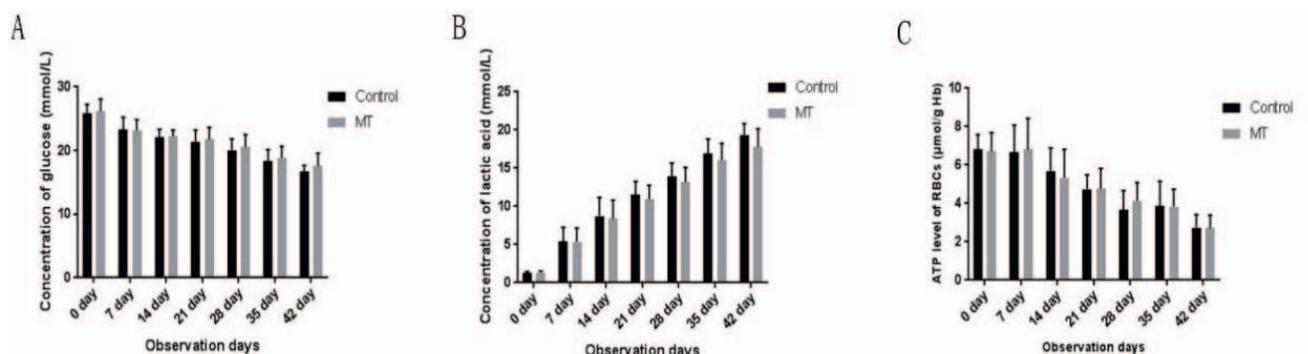


Рисунок 4. Влияние МТ на метаболиты гликолиза во время хранения. **А** — влияние МТ на концентрацию глюкозы. **В** — влияние МТ на концентрацию молочной кислоты. **С** — влияние МТ на концентрацию АТФ. Образцы крови получены от 6 отдельных доноров крови. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение

Figure 4. Effect of МТ on the glycolysis metabolites during storage. **A** — effect of МТ on the concentration of glucose. **B** — effect of МТ on the concentration of lactic acid. **C** — effect of МТ on the ATP level. Samples from 6 individual blood donors, and data are shown as means ± standard deviation

изменений, которые становятся все более очевидными с увеличением длительности хранения. Чтобы уменьшить или отсрочить повреждение эритроцитов во время хранения, необходимо найти эффективные добавки или составы для их сохранения. Это проблема исследуется во многих работах, посвященных хранению компонентов крови. У млекопитающих МТ не только регулирует циркадный и сезонный ритмы, тонус сосудов и подавляет развитие рака, но и является эффективным антиоксидантом как *in vivo*, так и *in vitro* [25–26]. В качестве поглотителя гидроксильных радикалов его поглощающая способность в 4 раза превышает глутатион и в 14 раз — маннит [27–28]. В качестве эффективного липофильного антиоксиданта поглощающая активность алкил-пероксид радикала в 2 раза превышает активность витамина Е [28]. Более того, М. Allegra и соавт. показали, что МТ может непосредственно удалять свободные радикалы, продуцируемые в эритроцитах [19]. Концентрация МТ в сыворотке обычно составляет менее 120 пг/мл (примерно 66 пг/мл концентрации цельной крови), а концентрация снотворного лекарственного средства в крови составляет более 1900 пг/мл (примерно 1045 пг/мл концентрации цельной крови). В этом исследовании защитные эффекты 150 пг/мл (концентрация цельной крови) МТ на эритроциты наблюдались во время длительного хранения эритроцитов.

Во-первых, морфология эритроцитов наблюдалась в различные моменты времени хранения. Как показано на рисунке 1А, имели место регулярные дегенеративные изменения морфологии эритроцитов (от гладкого двойного вогнутого диска до покрытых шипами или гладких шаровидных в обеих группах), и все больше и больше эритроцитов агрегировали в мазке крови, постепенно увеличиваясь вместе с индексом агрегации эритроцитов. Кроме того, при непрерывном разрушении эритроцитов относительная скорость гемолиза эритроцитов также увеличивалась. По сравнению с контрольной группой количество деформированных эритроцитов и относительная скорость гемолиза группы МТ значительно уменьшились на конечной стадии хранения. Индекс агрегации в группе МТ был ниже, чем в контрольной группе в дни 35 ($p = 0,0602$) и 42 ($p = 0,0542$), но разница не является статистически значимой, что может быть обусловлено небольшим количеством образцов. Из вышеприведенных результатов можно предварительно сделать вывод, что низкая концентрация МТ оказывает защитное влияние на долговременно хранящиеся эритроциты. Далее влияние МТ на окислительный стресс и метаболиты глюкозы хранимых эритроцитов измеряли в разное время хранения.

Окислительный стресс является одним из важных факторов повреждения эритроцитов при хранении. Для дальнейшего раскрытия защитного механизма МТ были изучены такие индикаторы окислительного стресса, как МДА и MetHb. МДА рассматривается как один из важнейших продуктов перекисного окисления липи-

time. To reduce or delay the damage to RBCs during storage, it is necessary to find effective blood preservation additives or formulations. This has become a hot research topic in blood conservation study. In mammals, MT not only regulates circadian rhythm, seasonal rhythm, vascular tone, and suppression of cancer, but also is an effective antioxidant both in *in vivo* and *in vitro* [25–26]. As a strong hydroxyl radical scavenger, its scavenging capacity is 4 times that of GSH and 14 times that of mannitol [27–28]. As an effective lipophilic antioxidant, the scavenging activity of peroxy alkyl radical is 2 times that of vitamin E [28]. Moreover, M. Allegra et al. have showed that MT can directly remove free radicals produced in RBCs [19]. The serum concentration of MT is generally less than 120 pg/ml (about 66 pg/mL of whole blood concentration), and the hypnotic blood drug concentration is more than 1900 pg/mL (about 1045 pg/mL of whole blood concentration). In this study, the protective effects of 150 pg/mL (whole blood concentration) of MT on RBCs were observed during long-term storage of RBCs.

Firstly, the morphology of RBCs was observed at different storage time points. As shown in Figure 1A, there were regular degenerative changes in the morphology of RBCs from smooth double concave disc to spiny to smooth ball in both groups, and more and more RBCs were aggregated together in the blood smear and were gradually increased with RBCs aggregation index. In addition, with the continuous destruction of RBCs, the relative hemolysis rate of RBCs was also increased. Compared with control group, the number of deformed RBCs and relative hemolysis rate of MT group decreased significantly at the end storage stage. The aggregation index of MT group was lower than that of control group on days 35 ($p = 0.0602$) and 42 ($p = 0.0542$), but the difference is not statistically significant, it might be related to the small number of samples. From the above results, we can preliminarily infer that low concentration of MT has protective effects on the long-term stored RBCs. Next, the effect of MT on the oxidative stress and glucose metabolites of stored RBCs were measured at different storage time.

Oxidative stress is one of the important factors of storage lesion. To further disclose the protective mechanism of MT, MDA and MetHb, the indicator of oxidative stress, were detected. MDA is considered as one of the most important products of membrane lipid peroxidation and indirectly reflects the degree of oxidative damage [23]. MetHb is a hemoglobin but cannot transport O_2 . MetHb occurs when oxyhemoglobin in a ferrous (Fe^{2+}) state is transformed into a ferric (Fe^{3+}) state. Low levels of MetHb (< 3 %) are always present in the circulation, but it markedly increases after exposure to certain pathological conditions. It also acts as an important oxidative marker of RBCs. The contents of MDA and MetHb

дов мембран и косвенно отражает степень окислительного повреждения [23]. MetHb является гемоглобином, но не может транспортировать O_2 . MetHb возникает, когда оксигемоглобин в состоянии железа Fe^{2+} преобразуется в состояние железа Fe^{3+} . Низкие концентрации MetHb (< 3 %) всегда присутствуют в кровотоке, но они заметно увеличиваются после воздействия определенных патологических состояний. MetHb также действует как важный окислительный маркер эритроцитов. Содержание МДА и MetHb постепенно увеличивалось со временем хранения в обеих группах, и это может быть связано с уменьшением восстановительных веществ, таких как никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ) в эритроцитах. НАДФ продуцируется пентозофосфатным путем и является коферментом глутатионредуктазы, которая отвечает за восстановление окисленного глутатиона до восстановленного глутатиона. При низкой температуре хранения эритроцитов пентозофосфатный путь замедляется, что приводит к уменьшению содержания НАДФ и глутатиона. Глутатион является существенным компонентом антиоксидантного стресса. В этом исследовании предполагалось, что уменьшение концентрации глутатиона коррелирует с увеличением концентрации МДА и MetHb. Однако концентрация МДА и MetHb в группе МТ была ниже, чем в контрольной группе, что указывает на то, что низкая концентрация МТ может уменьшить окислительный стресс и защитить хранящиеся эритроциты.

Гликолиз рассматривается как основной источник энергии эритроцитов. Этот путь расщепляет глюкозу с образованием АТФ и молочной кислоты. Накопление молочной кислоты снижает рН раствора для хранения. В нашем исследовании концентрация глюкозы и АТФ постепенно уменьшалась, и молочная кислота постепенно накапливалась с увеличением времени хранения в обеих группах, однако статистически значимых различий между контрольной группой и группой МТ не наблюдалось. Поэтому мы предположили, что защитный эффект низкой концентрации МТ реализуется в основном через антиоксидантную функцию МТ, но также может влиять на метаболизм глюкозы хранящихся эритроцитов, что усиливает пентозофосфатный путь, уменьшая при этом гликолиз и потребление энергии по какому-то неизвестному механизму, улучшая условия среды и способствуя «выживанию» хранящихся эритроцитов.

А. Krokosz и соавт. [17] показали, что длительная инкубация эритроцитов в присутствии МТ в количестве от 0,02 до 3 мМ в течение до 96 ч при 37 °С индуцировала прогрессирующую деструкцию эритроцитов. Чтобы избежать возможного повреждающего действия высоких концентраций МТ на эритроциты, в нашем эксперименте первоначально исследовали влияние низких концентраций (150 пг/мл) МТ на хранение эритроцитов. Результаты показали, что МТ не только защищает морфологию эритроцитов, улучшает индекс

were gradually increased with the storage time in both the groups, and this might be because of the decrease of reductive substances (such as NADPH) in RBCs. NADPH is produced by pentose phosphate pathway, and is the coenzyme of glutathione reductase, which is responsible for the reduction of oxidized glutathione (GSSG) to reduced GSH. At low temperature, pentose phosphate pathway slows down in the storage of RBCs, leading to decreased NADPH and GSH. GSH is an essential component of antioxidative stress, and decreased GSH was speculated to have correlation with increased MDA and MetHb in this study. However, the MDA and MetHb level in MT group were lower than that of the control group, indicating that low concentration of MT could reduce oxidative stress and protect the stored RBCs.

Glycolysis is regarded as the main energy source of RBCs. This pathway breaks down glucose to produce ATP and lactic acid. Accumulation of lactic acid decreases the pH of the storage solution. In our study, the concentration of glucose and ATP were gradually decreased, and the lactic acid were gradually accumulated with the increasing storage time in both groups, however, no statistically significant differences were observed between control and MT group. Therefore, we speculated that the protective effect of low concentration of MT mainly through its antioxidant function of MT, but also could affect glucose metabolism of stored RBCs, which might strengthen the pentose phosphate pathway while reducing glycolysis and energy consumption by some unknown mechanism to improve the survival environment of stored RBCs.

A. Krokosz et al. [17] had revealed that the prolonged incubation of RBCs at 0.02 to 3 mM MT for up to 96 hours at 37 °C induced a progressive destruction of erythrocytes. In order to avoid the possible damage of high concentrations of MT on RBCs, low concentrations (150 pg/mL) of MT on stored RBCs were initially observed in our experiment. The results showed that MT not only protects the morphology of RBCs, improves the hemolysis and aggregation index, but also reduces the oxidative stress. It is worth mentioning, at the middle and end of storage, the consumption rate of glucose and ATP, and the accumulation rate of lactose in MT group were all lower than that in control group, although no statistically significant differences were observed, the trends of these 3 related indicators remained consistent. In recent year, some research showed that increased MT signaling has relation with glucose metabolism in some types of cells [29–30]. Therefore, MT was speculated to strengthen the pentose phosphate pathway while reducing glycolysis and energy consumption by some unknown mechanism to improve the survival environment of stored RBCs in our study. In the further research, the concentration

гемолиза и агрегации, но и уменьшает окислительный стресс. Стоит отметить, что в середине и конце сроков хранения потребление глюкозы и АТФ и накопление лактозы в группе МТ были ниже, чем в контрольной группе, хотя статистически значимых различий не наблюдалось. Тенденции этих трех связанных показателей оставались неизменными. В последние годы некоторые исследования показали, что повышенная регуляторная роль МТ связана с метаболизмом глюкозы в некоторых типах клеток [29–30]. Поэтому предполагалось, что МТ усиливает пентозофосфатный путь, уменьшая при этом гликолиз и потребление энергии с помощью какого-то неизвестного механизма, улучшая условия хранения эритроцитов. В дальнейших исследованиях диапазон концентраций МТ должен быть расширен, чтобы наблюдать влияние на метаболизм глюкозы хранимых эритроцитов. Эти исследования обеспечат теоретическую основу для разработки более эффективного решения для хранения эритроцитов.

Благодарности

Авторы благодарят Национальный фонд естественных наук Китая (81860029); Научно-исследовательский проект в области медицины и планирования семьи во Внутренней Монголии (201701090); проект группы талантов «Грассленд» автономного района Внутренняя Монголия; Естественно-научный фонд Внутренней Монголии (2020MS08008) за финансовую поддержку и добровольцев, пожертвовавших кровь для наших исследований.

Авторы также благодарят Qiaomei Yan и Shiqi Huang за их отличную техническую помощь.

Литература / References

1. D'Alessandro A., Zimring J.C., Busch M. Chronological storage age and metabolic age of stored red blood cells: are they the same? *Transfusion*. 2019; 59(5): 1620–3. DOI: 10.1111/trf.15248.
2. Yoshida T., Prudent M., D'Alessandro A. Red blood cell storage lesion: Causes and potential clinical consequences. *Blood Transfus*. 2019; 17(1): 27–52. DOI: 10.2450/2019.0217-18.
3. Koch C.G., Figueroa P.I., Li L., et al. Red blood cell storage: How long is too long? *Ann Thorac Surg*. 2013; 96(5): 1894–9. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2013.05.116.
4. D'Alessandro A., Kriebardis A.G., Rinalducci S., et al. An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies. *Transfusion*. 2015; 55(1): 205–19. Doi: 10.1111/trf.12804.
5. Silva C.A.L., Azevedo Filho C.A., Pereira G., et al. Vitamin E nanoemulsion activity on stored red blood cells. *Transfus Med*. 2017; 27(3): 213–7. DOI: 10.1111/tme.12394.
6. Stowell S.R., Smith N.H., Zimring J.C., et al. Addition of ascorbic acid solution to stored murine red blood cells increases posttransfusion recovery and decreases microparticles and alloimmunization. *Transfusion*. 2013; 53(10): 2248–57. DOI: 10.1111/trf.12106.
7. Fontes J.A., Banerjee U., Iazbik M.C., et al. Effect of ascorbic acid on storage of Greyhound erythrocytes. *Am J Vet Res*. 2015; 76(9): 789–800. DOI: 10.2460/ajvr.76.9.789.

of MT should be expanded to observe the effects on glucose metabolism of stored RBCs. These will provide a theoretical basis for the development of more effective RBCs storage solution.

Acknowledgments

The authors would like to express their gratitude to the National Natural Science Foundation of China (81860029); Medical and Family Planning Research Project of Inner Mongolia (201701090); Grassland Talent Team Project of Inner Mongolia Autonomous Region; Natural Science Foundation of Inner Mongolia (2020MS08008) for their financial support and the volunteers for their donations of blood for our research.

The authors also thank Qiaomei Yan and Shiqi Huang for their excellent technical assistance.

8. van't Erve T.J., Doskey C.M., Wagner B.A., et al. Heritability of glutathione and related metabolites in stored red blood cells. *Free Radic Biol Med*. 2014; 76: 107–13. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.040.
9. Dumaswala U.J., Wilson M.J., Wu Y.L., et al. Glutathione loading prevents free radical injury in red blood cells after storage. *Free Radic Res*. 2000; 33(5): 517–29. DOI: 10.1080/10715760000301061.
10. Pallotta V., Gevi F., D'Alessandro A., Zolla L. Storing red blood cells with vitamin C and N-acetylcysteine prevents oxidative stress-related lesions: A metabolomics overview. *Blood Transfus*. 2014; 12(3): 376–87. DOI: 10.2450/2014.0266-13.
11. Şekeroğlu M.R., Huyut Z., Him A. The susceptibility of erythrocytes to oxidation during storage of blood: Effects of melatonin and propofol. *Clin Biochem*. 2012; 45(4-5): 315–9. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2011.12.021.
12. Czubak K., Antosik A., Cichon N., Zbikowska H.M. Vitamin C and Trolox decrease oxidative stress and hemolysis in cold-stored human red blood cells. *Redox Rep*. 2017; 22(6): 445–50. DOI: 10.1080/13510002.2017.1289314.
13. Dumaswala U.J., Zhuo L., Mahajan S., et al. Glutathione protects chemokine scavenging and antioxidative defense functions in human RBCs. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 280(4): C867–73. DOI: 10.1152/ajpcell.2001.280.4.C867.
14. Quintana C., Cabrera J., Perdomo J., et al. Melatonin enhances hyperthermia induced apoptotic cell death in human leukemia cells. *J Pineal Res*. 2016; 61(3): 381–95. DOI: 10.1111/jpi.12356.

15. Tan D.X., Manchester L.C., Hardeland R., et al. Melatonin: A hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res.* 2003; 34(1): 75–8. DOI: 10.1034/j.1600-079x.2003.02111.x.
16. Reiter R.J. Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev.* 1991; 12(2): 151–80. DOI: 10.1210/edrv-12-2-151.
17. Krokosz A., Grebowski J., Szveda-Lewandowska Z., et al. Can melatonin delay oxidative damage of human erythrocytes during prolonged incubation? *Adv Med Sci.* 2013; 58(1): 134–42. DOI: 10.2478/v10039-012-0067-x.
18. Zhang L., Han X., Du H., et al. Identification of melatonin poisoning markers in biological samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Case report and analysis. *Forensic Science and Technology.* 2016; 41(5): 402–4. DOI: 10.16467/j.1008-3650.2016.05.014
19. Allegra M., Gentile C., Tesoriere L., Livrea M.A. Protective effect of melatonin against cytotoxic actions of malondialdehyde: An in vitro study on human erythrocytes. *J Pineal Res.* 2002; 32(3): 187–93. DOI: 10.1034/j.1600-079x.2002.10852.x.
20. Antunes F., Barclay L.R., Ingold K.U., et al. on the antioxidant activity of melatonin. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26(1-2): 117–28. DOI: 10.1016/s0891-5849(98)00168-3.
21. Wölfler A., Caluba H.C., Abuja P.M., et al. Prooxidant activity of melatonin promotes fas-induced cell death in human leukemic Jurkat cells. *FEBS Lett.* 2001; 502(3): 127–31. DOI: 10.1016/s0014-5793(01)02680-1.
22. Albertini M.C., Radogna F., Accorsi A., et al. Intracellular pro-oxidant activity of melatonin deprives U937 cells of reduced glutathione without affecting glutathione peroxidase activity. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1091: 10–6. DOI: 10.1196/annals.1378.050.
23. Cristofanon S., Uguccioni F., Cerella C., et al. Intracellular prooxidant activity of melatonin induces a survival pathway involving NF-kappa B activation. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1171: 472–8. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.04896.x.
24. Ximenes V.F., Pessoa A.S., Padovan C.Z., et al. Oxidation of melatonin by AAPH-derived peroxy radicals: Evidence of a pro-oxidant effect of melatonin. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1790(8): 787–92. DOI: 10.1016/j.bbagen.2009.03.021.
25. Poeggeler B., Saarela S., Reiter R.J., et al. Melatonin – a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: New aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 738: 419–20. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb21831.x.
26. da Silva D.G., Ricci O. Jr, de Almeida E.A., Bonini-Domingos C.R. Potential utility of melatonin as an antioxidant therapy in the management of sickle cell anemia. *J Pineal Res.* 2014; 58(2): 178–88. DOI: 10.1111/jpi.12204.
27. Tesoriere L., D'Arpa D., Conti S., et al. Melatonin protects human red blood cells from oxidative hemolysis: New insights into the radical-scavenging activity. *J Pineal Res.* 1999; 27(2): 95–105. DOI: 10.1111/j.1600-079x.1999.tb00602.x.
28. Mayo J.C., Tan D.X., Sainz R.M., et al. Protection against oxidative protein damage induced by metal-catalyzed reaction or alkylperoxy radicals: Comparative effects of melatonin and other antioxidants. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1620(1-3): 139–50. DOI: 10.1016/s0304-4165(02)00527-5.
29. Sharma S., Singh H., Ahmad N., et al. The role of melatonin in diabetes: Therapeutic implications. *Arch Endocrinol Metab.* 2015; 59(5): 391–9. DOI: 10.1590/2359-3997000000098.
30. Karamitri A., Jockers R. Melatonin in type 2 diabetes mellitus and obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2019; 15(2): 105–25. DOI: 10.1038/s41574-018-0130-1.

АВТОРЫ, ОТВЕТСТВЕННЫЕ ЗА ПЕРЕПИСКУ

Yan Su — Baotou Medical College, 31 Jianshe Road, Baotou, Inner Mongolia, China.

Email: synmg@126.com

Qiang Ma — Address: Baotou Medical College, 31 Jianshe Road, Baotou, Inner Mongolia, China.

Email: ximenzi4554@sina.com

Поступила: 21.11.2021

Принята в печать: 16.02.2022

Received 21.11.2021

Accepted 16.02.2022