## Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ’Я УКРАЇНИ

ЛУГАНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

**МАЛИШ ПАВЛО МИКОЛАЙОВИЧ**

УДК 577.12+612.12]:615.387

**БІОХІМІЧНІ, СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ**

**ТА МЕТАБОЛІЧНІ ЗМІНИ**

**КОНСЕРВОВАНОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ**

**В ПРОЦЕСІ ЗБЕРІГАННЯ ПРИ ПОЗИТИВНІЙ ТЕМПЕРАТУРІ**

14.01.32 – медична біохімія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття вченого ступеня

доктора медичних наук

Луганськ – 2007

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Луганському державному медичному університеті МОЗ України.

**Науковий консультант:**

доктор медичних наук, професор **Комарєвцева Ірина Олександрівна,** завідуюча кафедри медичної хімії Луганського державного медичного університету МОЗ України.

**Офіційні опоненти:**

член-кореспондент АМН України, засл. діяч науки і техніки України, доктор медичних наук, професор **Губський Юрій Іванович**, завідувач кафедри біоорганічної, біологічної та фармацевтичної хімії Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця МОЗ України(Київ);

доктор медичних наук, професор **Мечетний Юрій Миколайович**, завідувач кафедри проблем людини та філософії здоров’я Східноукраїнського національного університету ім. В. Даля МОН України(Луганськ);

доктор медичних наук, професор **Гоженко Анатолій Іванович**, директор державної установи «Український науково-дослідний інститут медицини транспорту» МОЗ України (Одеса).

Захист дисертації відбудеться 24 січня 2008 р. о 13.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 29.600.03 при Луганському державному медичному університеті МОЗ України (м. Луганськ, кв. 50-річчя Оборони Луганська, 1Г).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Луганського державного медичного університету МОЗ України (м. Луганськ, кв. 50-річчя Оборони Луганська, 1Г).

Автореферат розісланий «\_\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_2007 року.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради І.А. Вишницька

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

**Актуальність теми.** Донорська кров – обмежений національний ресурс, і у зв'язку з цим проблема підвищення об'ємів заготівлі гемотрансфузійних засобів на цей час є актуальною. Гостро необхідним є приріст донорського контингенту [Перехрестенко П.М., Назарчук Л.В., Чугрієв А.М., 2003], що у силу соціально-економічних умов, які мають місце в останні роки, сформувати непросто. У зв'язку з цим служба крові країни стоїть перед необхідністю проведення науково-дослідних робіт в області конструювання нових вітчизняних гемоконсервантів, здатних продовжити термін зберігання нативних властивостей еритроцитів людини в умовах, що не вимагають складного й коштовного встаткування, а саме: при позитивній температурі, з використанням звичайних рефрижераторів, адже гемоконсерванти «Глюгіцир» («ГГЦ») (Росія) і «ЦФДА-1» (США), які найбільш широко застосовуються в службі крові України, не в змозі забезпечити функціональну й морфологічну повноцінність основної маси еритроцитів після 21-ї доби зберігання [Малиш П.М., Орлова О.А., Комарєвцева І.О., 2004]. У даному аспекті актуальність розробленої теми полягає в необхідності: а) детального вивчення метаболічних і біохімічних аспектів «старіння» і загибелі консервованих еритроцитів із застосуванням сучасних методів дослідження; б) визначення тригерів і ланок ланцюга альтерацій, на які можливо впливати підбором коригуючих/моделюючих додатків у рецептуру гемоконсервантів. Дисертаційна робота в кінцевому її підсумку спрямована на благо здоров'я нації: створення гемостабілізаторів з досконалішими властивостями щодо збереження морфофункціональної цілісності консервованих еритроцитів буде сприяти забезпеченню високої якості гемотрансфузійних середовищ, отже, ефективній трансфузіологічній допомозі хворим.

**Мета дослідження.** Визначити роль альтераційних і регуляторних систем у регламентуванні строку адекватного функціонування консервованих еритроцитів людини шляхом вивчення біохімічних, структурно-функціональних і метаболічних змін у процесі зберігання консервованої крові при позитивній температурі. Виявлення сигнальних шляхів ушкодження й загибелі еритроцитів консервованої крові.

**Завдання дослідження:**

1. З використанням автоматичного гематологічного аналізатора й люмінесцентної мікроскопії визначити морфологічні й морфометричні зміни еритроцитів на етапах зберігання консервованої крові.
2. Простежити динаміку реологічних властивостей консервованої крові та її залежність від природи й архітектури мікроагрегатів, що утворюються.
3. Оцінити стан вуглеводного обміну консервованого еритроцита по змінах показників метаболізму глюкози в еритроциті й плазмі консервованої крові на етапах зберігання. Визначити вплив різних концентрацій глюкози в рецептурі гемоконсервантів на ступінь глікозилювання гемоглобіну.
4. Виявити й оцінити поетапні зміни енергетичної забезпеченості консервованих еритроцитів, провести кореляційний аналіз їх зв'язку з морфометричними показниками.
5. Визначити зміни водно-іонного гомеостазу консервованого еритроцита, для чого вивчити ЯМР-релаксацію протонів внутрішньоеритроцитарної води та її кореляційний зв'язок із транспортом іонів через плазматичну мембрану на етапах зберігання консервованої крові.
6. Виявити ознаки дестабілізації плазматичної мембрани еритроцита, вивчивши стан її фосфоліпідної складової, рівень цитозольних ферментів у плазмі, резистентність консервованих еритроцитів.
7. Установити наявність фосфоліпідів внутрішнього моношару мембрани на поверхні консервованого еритроцита з використанням біохімічного набору для детекції апоптозу.
8. Установити зміни показників дихальних газів (кисень, діоксид карбону) у консервованій крові на етапах її зберігання.
9. Оцінити стан L-аргінін-NO-системи консервованих еритроцитів за допомогою вивчення змін концентрації нітрит- і нітрат-аніонів при «старінні» донорської крові.
10. Простежити сигнальні шляхи загибелі консервованого еритроцита. Визначити можливість застосування флуоресцентного барвника Lucifer yellow для підрахунку «тіней» еритроцитів.
11. Оцінити ступінь антиоксидантного захисту консервованих еритроцитів на етапах спостерігання.

У завдання даної роботи входило не тільки одержання й обговорення конкретних лабораторних і клінічних матеріалів, але й розгляд окремих методичних підходів до оцінки морфофункціонального стану консервованого еритроцита, і, на основі цього, – до можливості вдосконалення консервуючих розчинів, вибору гемоконсерванта при заготівлі компонентів і препаратів з донорської крові, призначених для лікування тих або інших патологічних станів.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Всі отримані нами дані не тільки сприяли розвитку розуміння теорії виникнення пошкоджень, що відбуваються в консервованому еритроциті в міру його «старіння», але й надали можливості визначити етапи, на яких реальна корекція альтерацій.

Уперше ми одержали відомості про морфометричні показники консервованих еритроцитів, обмірювані методом проточної цитометрії.

Уперше встановлений зв'язок механізмів зміни клітинного об'єму зі змінами кількості протонів води, розрахованих з використанням показників ЯМР-релаксометрії.

Уперше екстерналізацію фосфатидилетаноламіну в мембрані консервованого еритроцита розцінено як ознаку апоптичних змін, так само як екстерналізацію фосфатидилсеріну, виявлену при флуоресцентній мікроскопії. Уперше показано кореляційний зв'язок визначеної методом тонкошарової хроматографії елюації фосфоліпідів мембрани еритроцита в плазму з гематокритом і питомою вагою необоротно змінених форм еритроцитів на етапах спостерігання.

Уперше встановлено, що ключова роль у формуванні реологічних властивостей консервованої крові належить еритроцитам. Уточнено архітектуру агрегатів еритроцитів, з'ясовано, що перехід асоціації еритроцитів в «монетні стовпчики» до структур більш високого порядку підвищує в'язкість консервованої крові.

Уперше простежено динаміку дихальних газів на етапах зберігання консервованій крові, що надало можливості уточнити механізм розвитку оксидативного стресу й припустити, що однією з основних причин ушкодження структур еритроцитів (зокрема, ліпідного шару мембрани, гемоглобіну) є генерація й дія активних форм кисню (АФК).

Уперше для консервованого еритроцита показаний біфункціональний характер впливу оксиду азоту (NO), низькі концентрації якого грають компенсаторну антиоксидантну роль, а його гіперпродукція при «старінні» консервованої крові справляє на еритроцити токсичний вплив, що підтверджено констатацією виникнення й накопичення тілець Гейнца-Эрліха.

Уперше для консервованого еритроцита встановлена активація метаболічного шляху монооксиду вуглецю (СО), що дозволило судити про активність системи гемоксигеназа-СО й зробити висновок про антиоксидантну дію ферменту гемоксигеназа-1 (ГО-1). Виявлено використання консервованим еритроцитом і інших природних антиоксидантів, як ферментів (супероксиддисмутаза (СОД), глутатіонредуктаза (ГР), каталаза), так і неферментної природи (відновлений глутатіон (ВГ), білірубін (Bi), сечовина, СО).

Уперше простежено сигнальні шляхи загибелі консервованого еритроцита, що включають зміни, типові для апоптозу ядерних клітин – оксидативний і осмотичний стрес (знайдено окремі причини розвитку останнього в консервованому еритроциті, – залежне від часу накопичення глюкози, катіонів натрію (Na+) й кальцію (Ca2+)), експресія на поверхні мембрани фосфоліпідів (ФЛ) внутрішнього моношару, зменшення об'єму клітини.

**Практичне значення отриманих результатів.** У роботі показані переваги вміщуючих у рецептурі аденін і неорганічний фосфат гемоконсервантів, у тому числі нового гемоконсерванту «Адглюфоцит» («АГЦ»), створеного вченими України. Результати досліджень дозволили стверджувати, що «АГЦ», маючи необхідні стабілізуючі й консервуючі властивості, протягом установленого строку зберігання гемотрансфузійного середовища більш успішно, ніж «ГГЦ», і в не меншому ступені, ніж «ЦФДА-1», зберігає морфофункціональні характеристики еритроцитів. Тому, застосовуючи в практичній діяльності «АГЦ», служба крові країни могла б забезпечити лікувальну мережу високоякісними й ефективними компонентами донорської крові. Після проведення клінічних випробувань і впровадження вітчизняного гемоконсерванту очікуються ефекти: а) науково-технічний, якому сприяють оптимальна збалансованість рецептури, високий рівень якості й сучасна технологія виробництва; б) економічний, завдяки якому можливі імпортозаміщення, можливість експорту. Менша технологічна собівартість нового гемоконсерванту дозволить закладам служби крові заощаджувати близько 40% коштів, призначених для придбання видаткових матеріалів; в) соціальний: використання «АГЦ» буде сприяти забезпеченню високої якості трансфузіологічної допомоги хворим, і в остаточному підсумку - оздоровленню нації.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертація є самостійною роботою автора.Дисертант особисто сформулював мету й завдання дослідження, здійснив інформаційний пошук і аналіз літературних джерел. Автор самостійно зробив відбір зразків донорської крові для досліджень, постановку біохімічних тестів, їхній аналіз. Інтерпретація отриманих результатів, основні положення й висновки, представлені на захист, належать авторові.Здобувач особисто провів статистичну обробку результатів досліджень, підготував до публікації матеріали дисертаційної роботи, сформулював практичні рекомендації.Опубліковано самостійні, а також створені в співавторстві роботи.

**Апробація результатів досліджень.** Результати досліджень, що ввійшли в дисертацію, апробовані на науково-практичній конференції «Сучасні проблеми трансфузіології» (Харків, 2004), науковому симпозіумі «Актуальні й невирішені питання гематології й трансфузіології» (Київ, 2006), семінарі з міжнародною участю «Державна реєстрація, технологія виробництва, контроль якості й клінічне застосування препаратів крові» (Луганськ, 2006), II-му міжнародному симпозіумі «Гемостаз – проблеми та перспективи» (Київ, 2006).

**Публікації.** Матеріали дисертації опубліковані в 34 наукових працях, у тому числі 30 статтях, з них 8 без співавторів. Публікації основного змісту дисертації здійснені в наукових виданнях, затверджених ВАК України.

**Структура дисертації.** Дисертація складається із вступу, 5 розділів, 30 підрозділів, висновків, списку літератури. Викладена на 300 сторінках, містить 72 таблиці, ілюстрована 50 малюнками. Список літератури включає 530 найменувань.

Робота виконана на кафедрі медичної хімії Луганського державного медичного університету (зав. кафедри д.мед.н., проф. І.О. Комарєвцева).

**ЗМІСТ РОБОТИ**

**Об'єкт дослідження.** Дози консервованої крові здорових донорів однієї статі (чоловіки), вікової категорії (20-36 років), групи крові (0(I)), у контейнерах з полівінілхлориду з гемостабілізаторами «ЦФДА-1» (Польща), «АГЦ» (Україна), і «ГГЦ» (Росія), що зберігалися при температурі (+4 - +8)0С.

Таблиця 1.

Рецептура гемоконсервантів

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Компонент | Кількість, г | | |
| ГГЦ | ЦФДА-1 | АГЦ |
| Натрію цитрату дігидрат | 20,0 | 26,3 | 16,0 |
| Лимонної кислоти моногідрат |  | 3,27 |  |
| Глюкози моногідрат | 30,0 | 31,9 | 30,0 |
| Натрію фосфат одноосновний |  | 2,22 | 5,0 |
| Аденін |  | 0,275 | 0,3 |
| Вода для ін’єкцій | до 1000 мл | до 1000 мл | до 1000 мл |

Вибір статі донорів, віку й групи крові (з найменшим вмістом еритроцитарних групових антигенів) здійснювали з метою максимальної стандартизації випробуваних зразків консервованих еритроцитів. Спостерігання здійснювали з першого по сорок другий день, з часовими проміжками в 7 діб.

У клінічній частині роботи групу спостерігання склали 48 хворих гематологічного відділення Луганської обласної клінічної лікарні, у віці 60±7 років, з дифузно-осередковою формою множинної мієломи. У всіх пацієнтів, крім основного захворювання, був анемічний синдром з рівнем гемоглобіну 70-89г/л, що проявлявся як змінами в загальному аналізі крові, так і клінічно. З метою корекції анемії здійснювалися гемотрансфузії: 50% хворих одержали еритроцитну масу (ЕМ), виділену з крові, консервованої «ЦФДА-1»; 50% - ЕМ із крові, консервованої «ГГЦ». Строк зберігання ЕМ з моменту ексфузії донорської крові не перевищував 3 доби. Переливання ЕМ здійснювалися трикратно: на 2, 4 і 6 добу після надходження пацієнтів. Сумарна доза перелитої ЕМ склала 750±50 мл на 1 хворого.

**Предмет дослідження**. Ознаки дезінтеграції й загибелі консервованих еритроцитів протягом строку зберігання консервованої крові; використання консервованим еритроцитом резервів, як природних (вихідні інгредієнти крові донора, зокрема, антиоксиданти), так і штучних (хімічні складові гемостабілізатора) для підтримки власної морфофункціональної стабільності протягом строку зберігання. Зазначені процеси, що породжують проблемну ситуацію (необхідність конструювання вдосконалених вітчизняних розчинів, які мають максимальні стабілізуючі та консервуючі властивості щодо забезпечення тривалої життєздатності клітин крові, їхньої приживлюваності і успішного виконання специфічних функцій у кровоносному руслі реципієнта), обумовили вибір предмета дослідження.

**Методи досліджень.** Для вивчення морфології й оцінки морфометричних змін еритроцитів консервованої крові на етапах зберігання застосовували автоматичний гематологічний аналізатор АВХ Micros 60 OT 18.

Для визначення кількості живих еритроцитів й тих, що дезінтегрували, використовували біохімічний набір «Apoptosis Detection Kit, Annexin V-CY3» («Sigma-Aldrich», США). Загиблі еритроцити вивчали за допомогою люмінесцентного мікроскопа Olympus AX70. Фарбування відмитих тричі еритроцитів у нативному препараті виконували барвником люмінесцентним Fits Lucifer yellow («US Biological», США), застосовували світлофільтр із діапазоном довжини хвилі 460-490 нм.

Визначення осмотичної резистентності еритроцитів (ОРКЕ) проводили методом Яновського Д. Н. (1957), а також за уніфікованою методикою в модифікації Ідельсона Л. І. (1974). Механічну резистентність вивчали за методом Ham T.H., Shen S.C., Fleming E.M. and Castle W.B. (1948), кислотну – за методом Терськова І.А. і Гітельзона І.І. (1959) у модифікації Воробйова А.І. (1960) з використанням фотоелектроколориметра ФЕК-56М (Росія).

Парціальну напругу газів (рО2, рСО2) і концентрацію Н+ у консервованій крові визначали з використанням газоаналізатора Medica EasyBloodGas (США).

Зміст глікозильованого гемоглобіну (Hb1c) в консервованих еритроцитах визначали з використанням набору реактивів «Гликозилированный гемоглобин (GHB 100)» («Біо-Ла-Тест», Чехія).

Концентрацію фосфоліпідів у плазмі визначали методом тонкошарової хроматографії з використанням хроматографа рідинного мікроколонкового «Міліхром-А 02» («Эконова», Росія); колонок нормальнофазових із силікагелем «Silasorb 600» («Медикант», Росія), діаметр пор 5 мкм, 80х2мм.

Динаміку внутрішньоклітинного й позаклітинного об'єму води в концентраті еритроцитів вивчали методом ЯМР-релаксометрії на ядрах 1Н за допомогою ЯМР-релаксометра «Minispec» («Bruker», Німеччина) з робочою частотою 25 Мгц.

Концентрацію неорганічного фосфору, аденозинтрифосфату (АТФ) і 2,3-діфосфогліцерату (2,3-ДФГ) визначали колориметричним методом Виноградової І.Л., Багрянцева С.Ю., Дервіз Г.В. (1980) у модифікації Камишнікова В.С. (2003).

Рівень лужних (натрій, калій) металів в еритроцитах і плазмі визначали фотометрією полум'яною емісійною з використанням ПАЖ-3 (Україна).

Концентрацію СО визначали по Chalmers (1991) за допомогою спектрофотометра СФ-46 (Росія) при довжині хвилі 541 і 555 нм.

Зміст NO визначали по його стабільних метаболітах – нітрит- та нітрат- аніонах (NO2-, NO3-), методом Green L.C., Wagner D.A., Glogowski, J. еt al. (1985) у модифікації Орлової О.А., Комарєвцевої І.О., Комарєвцева В.М. (2002).

Активність лактатдегідрогенази (ЛДГ) визначали в плазмі крові в ході зворотної реакції відновлення пірувата в лактат за Артюховим В.Г., Наквасиній М.А. (2000).

Визначення активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-ДФГ) у плазмі й еритроцитах консервованої крові проводили спектрофотометричним методом із використанням «Набору для визначення глюкозо-6-фосфатдегідрогенази» («Sentinel», Італія).

Активність  каталази в плазмі визначали за  Карпищенко А. І. (1999).

Рівень активності СОД в еритроцитах  визначали за допомогою набору «SOD Assay Kit-WST» («Fluka», Німеччина).

Активність ГР вивчали з використанням набору «Glutathione Reductase Colorimetric Assay Kit» («Sigma-Aldrich», США), шляхом колориметричної детекції при довжині хвилі 412 нм.

Активність глутатіонпероксидази (ГП)  оцінювали за допомогою кольорової реакції з 5',5'-дітіо-біс-2 (нітробензойної) кислотою (ДТНБ) (Карпищенко А. И., 1999).

Концентрацію загального, зв'язаного й вільного Bi визначали в плазмі фотометрично за допомогою «Набору реактивів для визначення загального, прямого білірубіна в сироватці крові (за методикою Єндрашика)» («Філісіт-Діагностика», Україна).

Концентрацію ВГ визначали спектрофотометричним методом, заснованим на здатності низькомолекулярних тіолів при взаємодії з ДТНБ утворювати пофарбовану сполуку – тіо-2-нітробензойну кислоту (Карпищенко А.И., 1999).

Визначення малонового діальдегіда (МДА) виконували спектрофотометричним методом, заснованим на взаємодії тіобарбітурової кислоти з низькомолекулярними діальдегідами з утворенням пофарбованого комплексу, що має максимум світлопоглинання при довжині хвилі 535 нм (Карпищенко А.И., 1999).

**Статистичний аналіз** даних проводили з використанням пакета програми Statistica v.6. Вірогідність розходжень середніх оцінювали з використанням t-критерію Стьюдента-Фішера.

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

**Морфологічні й морфометричні характеристики консервованих еритроцитів на етапах зберігання.** Результати досліджень показали, що кількість еритроцитів у консервованій крові поетапно зменшувалась, змінювалася форма від дискоцитів через оборотні (ехіноцити, стоматоцити) варіанти в необоротні (акантоцити, сфероцити) з наступною дезінтеграцією. У першу добу спостерігання в крові, заготовленій на всіх випробуваних гемоконсервантах, дискоїдні форми еритроцитів становили 92%, змінені – 8%. У структурі останніх основна частина становила оборотні форми еритроцитів – стоматоцити й ехіноцити. Сфероцити, клітини в термінальній стадії життя, становили 0,8% («АГЦ»); 1% («ГГЦ»); 1,2% («ЦФДА-1») від усієї кількості клітин. Дисксферотрансформація еритроцитів в «ГГЦ»- крові протікала з поетапним зменшенням об'єму клітин. У крові, консервованій «ЦФДА-1» і «АГЦ», накопиченню сфероцитів передував етап збільшення діаметра клітин на 14 – 21-шу добу спостерігання, про що свідчить другий пік кривих Прайс-Джонса (рис.1).

|  |  |
| --- | --- |
|  | легенда |

Рис. 1. Еритроцитометрична крива Прайс-Джонса на 14-ту добу спостерігання

Виявили, що гемоконсерванти «ГГЦ» з 14-ї доби, а «ЦФДА-1» – з 21-ї доби не зберігали нормальний морфологічний статус основної маси еритроцитів. На 35-ту добу в крові, консервованій «ГГЦ», були відзначені дегенеративні форми, «осколки» клітин, сфероцити, одиночні акантоцити, які в сумі становили 49,8% всіх клітин; дискоцити були відсутні. В цей час «ЦФДА-1»-крові в наявності 51,8% дискоцитів і оборотно змінених форм клітин, в «АГЦ»- крові їх 57,8%.

Гемоконсервант «АГЦ» ефективніше виявляв консервуючі якості, що знайшло відображення у пізніших необоротних змінах в популяції донорських еритроцитів.Так, на 28-му добу питома вага акантоцитів, сфероцитів і клітин, що дезінтегрували, у крові, консервованій «ГГЦ», становила 45,6%, в «ЦФДА-1»- крові - 39,0%, у той час як в «АГЦ»- крові - 34,0%; на 35 добу питома вага необоротно змінених форм складала 49,8, 49,0 і 42,2% відповідно.

**Реологічний статус консервованої крові.** Відомо, що в'язкість цільної крові людини визначається різними факторами: пружними й орієнтаційними властивостями еритроцитів, гематокритом, в'язкістю плазми. Окремі показники реологічного статусу крові донора властиві й консервованій крові, однак остання має особливості, створені умовами її існування [Терехов Н.Т., Петров М.М., 1983; Шафранова Е.И., Снегирева Е.И., 2000; Гуменюк Н.И., Лишневская В.Ю., 2003; Цветков В.Д., 2004]. Дослідили в'язкість консервованої крові та її залежність від в'язкості плазми, гематокрита, морфології еритроцитів, наявності білково-клітинних і еритроцитарних мікроагрегатів. Виявили немонотонність змін даного показника: підвищення до 21-ї доби й подальше зниження до кінця строку спостерігання. Установили, що в'язкість консервованої крові не мала достовірного причинно-наслідкового зв'язку з поетапним збільшенням кількості білково-клітинних мікроагрегатів, що виникають під час «старіння» крові, а також зі змінами в'язкості плазми. Визначили, що ключова роль у формуванні реологічних властивостей консервованої крові належить еритроцитам. Перехід асоціації еритроцитів в «монетні стовпчики» до структур більш високого порядку вірогідно підвищував в'язкість консервованої крові в період з 1-ї по 21-гу добу після заготівлі. Зниження в'язкості консервованої крові на етапі 21 – 42-га доба зберігання було обумовлено а) накопиченням еритроцитів зі зменшеним діаметром; б) зниженням гематокриту.

**Вуглеводний обмін консервованих еритроцитів.** Вивчили рівень глюкози в еритроцитах і плазмі консервованої крові, ефективність її використання клітинами на етапах зберігання. Установили, що в першу добу після заготівлі рівень глюкози в еритроцитах і плазмі крові, консервованої «ЦФДА-1», найнижчий, і зберігається таким до кінця спостерігання, що може бути пов'язане з меншою кількістю глюкози в гемоконсерванті, яка припадає на 1мл заготовленої цільної крові (в «ЦФДА-1»- крові – 0,004 г/мл, в «ГГЦ» і «АГЦ»- крові – 0,008 г/мл), а також з гліколізом, що протікає ефективно.Виявили більш високий ступінь убування глюкози з плазми крові, консервованої «ЦФДА-1», ніж «АГЦ»- і «ГГЦ» (до 14-ї доби - на 65,5% проти 20,1% і 31,7% відповідно), що можна пояснити ефективним залученням глюкози до метаболізму еритроцитів. В клітинах «ГГЦ»- крові відзначене лінійне підвищення рівня глюкози, що свідчить про менш інтенсивне здійснення гліколізу, а також про дестабілізацію мембранних структур, яка сприяє надходженню глюкози в еритроцит із плазми за градієнтом концентрації. Оскільки підвищення внутрішньоеритроцитарної концентрації глюкози пов’язане з розвитком осмотичного стресу, можна вважати середовище, створене гемоконсервантом «ГГЦ», менш сприятливим для клітин. В еритроцитах «АГЦ»- крові відзначено тенденцію до поетапного зменшення концентрації глюкози, що поряд із адекватним зниженням даного показника в плазмі свідчить про стабільність катаболізму глюкози. Вказане підтверджується динамікою концентрації лактату. Так, до 21-ї доби спостерігання рівень лактату в плазмі «ГГЦ»- крові перевищив первісний показник в 2,1 рази; в «ЦФДА-1»- і «АГЦ»- крові - в 3,1 і 3,4 рази відповідно. До кінця строку спостерігання рівень лактату в плазмі «АГЦ»- крові був вищим, ніж в «ЦФДА-1», на 4,5%, і на 6,3% вищим, ніж у плазмі «ГГЦ»- крові.

Відомо, що глюкоза у високій концентрації викликає глікозилювання гемоглобіну (Hb). Hb1c, як хімічно стійка сполука, втрачає здатність транспортувати гази крові, відповідно, знижує трансфузіологічну цінність донорських еритроцитів. Нами було встановлено, що концентрація Hb1c в еритроцитах на всіх етапах перевищує референтні цифри, особливо в крові, консервованій «ГГЦ» і «АГЦ», які містять більшу кількість глюкози, що обумовлено рецептурою даних гемостабілізаторів. У зв'язку з цим можна стверджувати, що висока концентрація глюкози в складі консерванту, поряд з позитивним (резерв субстрату для гліколізу) має й негативний бік - глікозилювання Hb, яке погіршує якість гемотрансфузійних еритроцитних середовищ відносно транспорту газів крові.

**Енергетичний статус консервованих еритроцитів.** Виявили поетапне зниження рівня АТФ і 2,3-ДФГ в еритроцитах крові, заготовленої з використанням всіх зазначених гемоконсервантів, однак у крові, стабілізованій «ЦФДА-1» і «АГЦ», що містять у рецептурі аденін і неорганічний фосфат, – у меншому ступені. Відзначили, що до 14-ї доби – у період найбільшого використання еритроцитвміщуючих середовищ для переливання хворим – дані гемоконсерванти підтримували більш високу концентрацію макроергічних сполук (не менше 90% АТФ і 60% 2,3-ДФГ) отже, віддаляли в часі дисксферотрансформацію еритроцитів. На цьому етапі використання «ГГЦ» сприяло збереженню лише 81,4% АТФ і 53,1% 2,3-ДФГ. Показники збереження АТФ еритроцитів виявили придатність останніх як переносників газів крові (концентрація  АТФ  не нижче 50% від вихідного рівня) [Технічне керівництво Американської асоціації банків крові, 2000], в «ГГЦ»-крові – до 21-ї, «ЦФДА-1» і «АГЦ» - до 35-ї доби, що відповідає вимогам. Перевагу «ЦФДА-1» і «АГЦ» перед «ГГЦ» відносно збереження морфофункціональних властивостей донорських еритроцитів обумовлено, зокрема, наявністю в складі аденіну, який має здатність швидкого проникнення в еритроцит з утворенням додаткової кількості АТФ. Ми встановили, що в крові, заготовленій з використанням «ГГЦ», в 1-шу добу спостерігання рівень аденіну істотно не відрізняється від такого в крові, заготовленій на «ЦФДА-1» і «АГЦ». Парадоксальний, на перший погляд, результат дослідження можна пояснити високим ступенем пошкодження еритроцитів донора в момент їхнього переміщення в штучне середовище консерванту «ГГЦ». Дезінтеграція структур клітин, що мають у складі пуринові сполуки, є причиною накопичення аденіну в плазмі. Можна припустити, що момент «зустрічі» крові з «ЦФДА-1» і «АГЦ» протікає м'якіше, у противному випадку рівень аденіну істотно перевищував би такий у плазмі «ГГЦ»- крові. Досліджуючи споживання аденіну консервованим еритроцитом, установили поетапне зниження його рівня в плазмі крові, консервованої «ГГЦ», на 7-му добу спостерігання, а в плазмі крові, консервованій «АГЦ» і «ЦФДА-1», які містять цю пуринову основу, – на 14-ту. Раннє зниження даного показника в «ГГЦ»- крові можна пояснити більшою потребою клітин в аденіні – наслідком більш вираженого збитку макроергічних сполук у порівнянні з «ЦФДА-1»- і «АГЦ»- кров'ю.

Відомо, що дії АТФ і 2,3-ДФГ адитивні відносно збереження стабільності мембрани еритроцита [Зинчук В. В., 2001; Дедов И.И., Александров А.А., 2004].

**Стан фосфоліпідної складової мембрани консервованого еритроцита.** Виявили елюацію в плазму по мірі «старіння» консервованої крові структурних ФЛ внутрішнього моношару мембрани – фосфатидилсеріну (ФС) і фосфатидилетаноламіну (ФЕ). Рівень ФС у плазмі «ГГЦ»- і «ЦФДА-1»- крові в період 1 – 14-та доба мав тенденцію до підвищення, і вірогідно перевищив вихідний на 21-шу добу; в плазмі «АГЦ»- крові – на 28-му добу. Динаміка рівня ФС у плазмі «ГГЦ»- і «АГЦ»- крові була аналогічній динаміці ФЕ; у плазмі «ЦФДА1»- крові рівень ФС перевищив первісний на 7-му добу (табл.2).

Таблиця 2.

Фосфоліпіди в плазмі консервованої крові на етапах зберігання, мг/мл

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Доба | Фосфатидилетаноламін | | | Фосфатидилсерін | | |
| ГГЦ | ЦФДА-1 | АГЦ | ГГЦ | ЦФДА-1 | АГЦ |
| 1 | 0,253±0,048 | 0,214±0,036 | 0,167±0,034 | 0,035±0,020 | 0,014±0,003 | 0,015±0,083 |
| 7 | 0,315±0,149 | 0,267±0,060 | 0,190±0,044 | 0,026±0,013 | 0,038±0,010\* | 0,027±0,008 |
| 14 | 0,321±0,065 | 0,254±0,035 | 0,239±0,084 | 0,077±0,027 | 0,040±0,010\* | 0,058±0,024 |
| 21 | 0,557±0,106\* | 0,367±0,061\* | 0,323±0,086 | 0,233±0,063\* | 0,126±0,027\* | 0,126±0,044 |
| 28 | 0,598±0,172\* | 0,418±0,076\* | 0,346±0,059\* | 0,325±0,108\* | 0,188±0,037\* | 0,151±0,027\* |
| 35 | 0,543±0,113\* | 0,484±0,059\* | 0,379±0,094\* | 0,307±0,086\* | 0,296±0,041\* | 0,171±0,048\* |
| 42 | 0,657±0,182\* | 0,641±0,144\* | 0,499±0,187\* | 0,490±0,154\* | 0,349±0,115\* | 0,281±0,083\* |

\*р<0,05 у порівнянні з показником 1-ї доби зберігання

Отримані дані ми розцінили як наслідок порушення фізіологічної транслокації ФЛ. Втрата ФЕ й ФС мембраною приводить до сферуляції та зменшення діаметра консервованих еритроцитів, знижується їх фізіологічна здатність до деформації, отже, і здатність до адекватної циркуляції в кровоносному руслі реципієнта.

Для того щоб підтвердити факт присутності ФС на поверхні консервованого еритроцита, ми використали метод фарбування флуоресцентним комплексом біохімічного набору для детекції апоптичних змін. Установили, що в першу добу після вилучення крові від донора спостерігається світіння клітин тільки в зеленій області спектра, що є сигналом життєздатності еритроцитів. Уперше флуоресценцію в червоній області спектра відзначили на 21-шу добу в крові, консервованій «ГГЦ» і «ЦФДА-1», і на 28-му – у крові, консервованій «АГЦ». До 42-ї доби кількість еритроцитів, що флуоресціює у червоній області спектра, збільшилося в порівнянні з 21-28-ю добою в 3 рази, у зеленій – зменшилося в 5 разів.

Це свідчило про наростання в клітинних структурах деструктивних процесів і «просування» значного числа еритроцитів по шляху суїцидної загибелі – ериптозу [Lang K.S., Lang P.A., Bauer C. et al., 2005]. З огляду на викладене, ми припустили, що лінійне, статистично достовірне підвищення ступеня елюації ФС в плазму консервованої крові можна вважати маркером такої ланки сигнального шляху запрограмованої загибелі еритроцита, як транслокація даного ФЛ у зовнішній моношар мембрани. На нашу думку, аналогічний перехід ФЕ також може вважатися етапом на шляху консервованого еритроцита до власної загибелі (стверджується вперше).

Ми встановили, що в першу добу дослідження зміст фосфатидилхоліну (ФХ) у плазмі перевищував референтні значення (1-2 мг/мл) в 3,8-7,7 разів. Тому може спричинитися ушкодження зовнішнього шару клітинної мембрани еритроцитів у момент переміщення із кровоносного русла донора в штучне середовище. Даний показник у крові, консервованій «ГГЦ», перевищує такий в «ЦФДА-1»- крові на 13,0%, в «АГЦ»- крові - на 26,2%, із чого можна зробити висновок про найбільший ступінь травматизації еритроцитів гемоконсервантом «ГГЦ», і найменший – «АГЦ». Відзначили тенденцію до поетапного зниження рівня ФХ у плазмі крові, консервованій «ЦФДА-1» і «АГЦ», і статистично достовірне зниження до 35-ї доби даного показника в плазмі крові, консервованої «ГГЦ». Відомо, що ФХ використовується еритроцитом як для «будівництва» мембрани, так і для корекції її ушкоджень, а також як джерело біологічно активних речовин, що беруть участь у механізмі ліпідного й вуглеводного обміну клітини, і що метаболізм ФЛ включає їхнє взаємоперетворення [Кольман Я., Рем К.-Г., Вирт Ю., 2000]. Так, ФС при декарбоксилюванні утворює ФЕ, що є попередником ФХ. Тому не виключено, що забезпеченню стабільності ФХ- складової мембрани сприяла висока концентрація в плазмі (особливо з 21-ї доби спостерігання) ФЕ й ФС, яка створювала можливість використання консервованими еритроцитами зазначених ФЛ для побудови ФХ, тобто консервований еритроцит здатний до реконструювання власної мембрани за рахунок наявних ФЛ- ресурсів.

**Водно-електролітний обмін у консервованій крові.** Оскільки в дійсному дослідженні виявлені ознаки дестабілізації ФЛ- сполук мембрани клітини, розподілу ФЛ у бішарі й зниження концентрації АТФ, було очікуваним порушення транспорту катіонів і води.

Виявили поетапний підйом концентрації Са2+, більше виражений в еритроцитах крові, консервованої «ГГЦ». Визначили, що найзначніший приріст концентрації Са2+ відбувається в період з 7-ї по 14-ту добу, що відповідає накопиченню води в еритроцитах та їх морфометричним змінам, які настають на 14-ту добу. Очевидно, гідратовані Са2+, входячи в клітину, несуть з собою певну кількість води. Однак залежність накопичення води й, відповідно, діаметра еритроцитів від внутрішньоклітинної концентрації Са2+, не настільки велика, як залежність від входу в клітину гідратованих Na+, концентрація яких на три порядки вище.

Ми встановили, що в крові, заготовленій на всіх узятих для порівняння гемоконсервантах, внутрішньоеритроцитарна концентрація Na+, починаючи з 7-ї доби зберігання, була вищою за вихідний рівень. До кінцевого етапу дослідження в «ГГЦ»- крові даний показник перевищував базовий на 85,7%, в «ЦФДА-1»- і «АГЦ»- крові – на 99,2% і 96,6% відповідно. У період 14 – 21-ша доба концентрація Na+ в еритроцитах крові, заготовленої з використанням «ЦФДА-1» і «АГЦ», була вище, ніж у крові, консервованій «ГГЦ», і це відповідало виявленому накопиченню кількості еритроцитів збільшеного діаметра. В плазмі «ГГЦ»- крові до кінця строку зберігання рівень Na+ зростав, у той час як у плазмі крові, консервованої «ЦФДА-1» і «АГЦ», знижувався. Це свідчило про меншу здатність гемоконсерванта «ГГЦ» до збереження цілісності структур еритроцитів і про вихід значних кількостей Na+  у позаклітинне середовище.

Підвищення внутрішньоеритроцитарної концентрації Na+ супроводжувалося втратою калію, вірогідність якої визначили в крові, консервованій «ГГЦ» і «ЦФДА-1», на 14 добу, а в крові, консервованій «АГЦ», – на 21-шу.

Зі змінами транспорту катіонів пов’язаний перерозподіл клітинної води. Ми вивчили поетапні зміни ЯМР-релаксації протонів води в еритроконцентраті, заготовленому з консервованої крові. Нами встановлене подовження Т1 та Т2- складових часу ЯМР-релаксації в зразках еритроконцентрата крові, консервованої «ГГЦ» і «АГЦ», до 14-ї доби спостерігання, а крові, консервованій «ЦФДА-1», – до 21-ї. Одночасне подовження Т1 і Т2 свідчило про вповільнення протонного обміну між вільною й зв'язаною фракціями води в еритроцитах, а також про ущільнення шару гідратної води.

В еритроцитах крові, консервованої «ГГЦ» і «АГЦ», з 21-ї, а в «ЦФДА-1»- еритроцитах з 28-ї доби спостерігання відзначене зниження параметрів Т1 і Т2, що дозволило судити про зменшення рухливості молекул води в міру «старіння» консервованої крові й припустити можливість її структуризації за рахунок підвищення рівня осмотично активних іонів Na+ (рис. 2).

|  |  |
| --- | --- |
| **Т1** | **Т2** |
|  |  |
| легенда | |

Рис. 2. Зміни складових часу ЯМР-релаксації Т1 і Т2 (мсек) в еритроконцентраті

\*p<0,05 у порівнянні із групами «ГГЦ» і «АГЦ»

В еритроцитах крові, консервованої «ГГЦ», динаміка Т1 і Т2 була подібна такій у крові, консервованій «ЦФДА-1». Максимум часу ЯМР-релаксації доводився на 14-ту добу: ріст Т1 – на 126,8% , Т2 – на 134,2% щодо вихідних показників. Однак в «ЦФДА-1»- еритроцитах показник Т1 у період з 7-ї по 35-ту добу, Т2 на 21-28-му добу вірогідно перевищував аналогічний в еритроцитах «ГГЦ»- крові, що корелювало з морфометричними параметрами, які вказували на накопичення в «ЦФДА-1»- крові еритроцитів зі збільшеним діаметром, а також з підвищеним внутрішньоклітинним вмістом катіонів Na+. У зразках еритроконцентрата групи «АГЦ» складові часу релаксації на етапах спостерігання змінювалися набагато плавніше. Максимальний підйом Т1 і Т2 відзначений на 14-ту добу (на 5,8 і 3,0% відповідно).

На підставі отриманих даних можна стверджувати, що встановлені нами показники ЯМР-релаксації протонів води й трансмембранного переносу катіонів характеризують гемостабілізатор «АГЦ» як той, що забезпечує в порівнянні з «ГГЦ» і «ЦФДА-1» більшу стабільність гідроосмотичних механізмів у життєзабезпеченні консервованих еритроцитів.

**Маркери пошкодження мембрани консервованого еритроцита.**

*Цитозольні ферменти в плазмі.* Було встановлено, що в плазмі крові, заготовленої як на «ГГЦ», так і на гемостабілізаторах, що містять аденін та фосфат натрію, у першу добу після заготівлі рівень активності ЛДГ і Г-6-ФДГ був вище референтних меж, що пояснюється травматизацією клітин крові в момент консервування.Далі активність ЛДГ у плазмі поетапно зростала, і до 14-ї доби зберігання крові, заготовленої на «ГГЦ» і «ЦФДА-1», перевищувала верхню межу норми в 2,0 і в 1,9 рази відповідно; у плазмі крові, консервованої «АГЦ», - в 1,6 разів, що свідчило про присутність в останній більшої кількості інтактних клітин.До 21-ї доби зберігання крові, заготовленої на «ГГЦ», активність ЛДГ перевищувала фонову на 109,8%. У плазмі крові, заготовленої на «ЦФДА-1» і «АГЦ», цей показник дорівнював 97,3% і 95,2% відповідно. Активність Г-6-ФДГ у першу добу в плазмі «ГГЦ»- крові була вище в 2,1 рази, ніж в «ЦФДА-1»-, і в 2,2 рази – ніж в «АГЦ»- плазмі, і це підтверджувало більшу травматичність середовища «ГГЦ». Починаючи з 21-ї доби, рівень Г-6-ФДГ у плазмі зріс, що свідчило про прогресуюче руйнування структур еритроцитів, особливо помітне в період з 35-ї по 42-гу добу спостерігання. У плазмі крові, консервованої «ЦФДА-1» і «АГЦ», активність Г-6-ДФГ до 28-ї доби лише мала тенденцію до підвищення, отже, ступінь вивільнення даного ферменту із клітинних структур і його виходу в плазму був нижчим.

*Резистентність консервованих еритроцитів.*Визначили зниження осмотичної резистентності еритроцитів крові, заготовленої на всіх узятих в дослідження гемоконсервантах, уже в першу добу після вилучення в донора, навіть в ізоосмотичному середовищі, яким є 0,85% розчин натрію хлориду, і це підтверджує виникнення стресової ситуації для клітин у момент їхньої зустрічі зі штучним середовищем гемоконсерванта. Повний гемоліз еритроцитів крові, заготовленої на гемоконсервантах, що містять аденін і фосфат натрію, відбувався в більш гіпоосмотичних розчинах натрію хлориду, ніж еритроцитів крові, консервованої «ГГЦ». Нижня границя ОРКЕ в «ГГЦ»- крові в усі строки зберігання перевищувала таку в крові, стабілізованій «ЦФДА-1» і «АГЦ», що свідчило про меншу стійкість «ГГЦ»- еритроцитів до гіпоосмотичного впливу. Руйнування клітин крові, консервованої «ГГЦ», відбувалося на більш ранніх етапах зберігання, ніж крові, консервованої «ЦФДА-1» і «АГЦ». Гемоконсерванти, що містять аденін і неорганічний фосфат, ефективніше зберігали стійкість донорських еритроцитів до осмотичного гемолізу порівняно з «ГГЦ», отже, дестабілізація мембранних структур еритроцитів на етапах зберігання «ЦФДА-1»- і «АГЦ»- крові була виражена в меншому ступені й відбувалася в пізніший термін.

При дослідженні механічної резистентності консервованих еритроцитів установили, що в крові, заготовленій з використанням всіх узятих для порівняльного дослідження гемоконсервантах, концентрація позаеритроцитарного Hb до й після механічного впливу вже на 7-му добу зберігання зросла щодо вихідного показника. Далі в крові, консервованій «ГГЦ», рівень позаеритроцитарного Hb на всіх етапах дослідження перевищував аналогічний показник у зразках крові, консервованої «ЦФДА-1» і «АГЦ». До 14-ї доби близько 50% еритроцитів руйнувалися центрифугуванням в «ГГЦ»-крові, і близько 25% - у крові, консервованій «ЦФДА-1» і «АГЦ». На 21-шу добу в крові, консервованій «ГГЦ», спостерігалися одиничні еритроцити, стійкі до механічного впливу, у той час як в «ЦФДА-1»- і «АГЦ»- крові близько 60% еритроцитів витримували центрифугування. До 28-ї доби після механічного впливу «ГГЦ»- кров неушкоджених еритроцитів не містила; в «ЦФДА-1»- і «АГЦ»- крові близько 50% еритроцитів залишалися стійкими до механічної дії. На 35-ту добу спостерігання тільки кров, заготовлена на «ЦФДА-1» і «АГЦ», містила поодинокі еритроцити, резистентні до механічного впливу.

Результати вивченої нами кислотної резистентності еритроцитів консервованої донорської крові показала, що жодна з узятих для порівняння рецептур гемоконсервантів не забезпечує достатнього захисту від гемолізуючої дії кислоти. Установили, що рівень пониженостійких і середньостійких до впливу кислоти еритроцитів у першу добу зберігання вище в крові, консервованій «ГГЦ»; підвищеностійких – нижче, що свідчить про менший ступінь резистентності «ГГЦ»- еритроцитів до кислотного впливу. У міру «старіння» консервованої крові, до кінця встановленого строку зберігання для компонентів крові - переносників газів, що становить 21 добу для «ГГЦ»- еритроцитів і 35 діб для «ЦФДА-1»- і «АГЦ»- еритроцитів, мало місце збільшення питомої ваги еритроцитів зі зниженою стійкістю до руйнуючого впливу кислоти.

Для того щоб підтвердити отримані дані про прогресуючу дестабілізацію клітинних структур під час зберігання консервованої крові, вивчили здатність еритроцитів до фарбування люмінесцентним барвником Lucifer yellow. Результати дослідження показали зростання числа пофарбованих клітин на етапах зберігання консервованої крові. Відомо, що великі молекули люмінесцентного барвника здатні проникати в клітину тільки при наявності дефектів плазматичної мембрани діаметром не менше 3,5 мкм, зокрема, обумовлених апоптичними змінами [Sauer H., Pratsch L., Fritzsch G. еt al., 1991; Satchell D., 2000]. Якщо в першу добу після заготівлі крові, консервованої «ГГЦ», люмінесценція еритроцитів була відсутня, то на 7-му добу число пофарбованих Lucifer yellow клітин склало 1-2 у полі зору, і до 21-ї доби їхнє число зросло в 3 рази. У крові, консервованій «ЦФДА-1» і «АГЦ», на 14-ту добу спостерігання число пофарбованих Lucifer yellow клітин склало 1-2, на 35-ту - 3-4 у полі зору. Отже, використання люмінесцентного барвника Lucifer yellow є об'єктивним методом індикації еритроцитів з високим ступенем дезінтеграції клітинних структур, специфічним для еритроцитів, які не мають характерних для апоптозу ядерних клітин механізмів, таких як фрагментація ДНК, активація каскаду каспаз, але зазнають апоптичних змін мембрани («спінювання», утворення пор, порушення фізіологічної транслокації ФЛ), характерних для ериптозу [Schulze-Lohoff E., Hugo C., Rost S. et al., 1988; Krutovskikh V.A., Piccoli C., Yamasaki H., 2002; Lang K.S., Lang P.A., Bauer C. et al., 2005].

**Гази консервованої крові.** Для розуміння механізмів альтерації структур еритроцитів вивчили динаміку газів консервованої крові. У цей час дихальний цикл in vivo розглядається як «система трьох газів» – О2, СО2 і азоту [Gross S.S., Lane P., 1999]. Ми вивчили рО2, рСО2, а також концентрацію стабільних метаболітів NO на етапах зберігання консервованої крові.

*Участь NO* в процесі розвитку загибелі консервованих еритроцитів на дійсний момент залишається малодослідженою. У зв'язку із цим вивчили рівень стабільних метаболітів NO (NO2- і NO3-) у консервованих еритроцитах на етапах зберігання (рис. 3).

|  |  |
| --- | --- |
| **NO2–** | **NO3–** |
|  |  |
| легенда | |

Рис. 3. Рівень стабільних метаболітів NO у консервованих еритроцитах

\*p<0,05 у порівнянні з 1 добою після консервування крові

Установили, що в еритроцитах крові, заготовленої на «ЦФДА-1», у період з 7-ї по 21-шу, а в еритроцитах крові, заготовленої на «АГЦ», – з 14-ї по 21-шу добу відзначили підвищення концентрації NO2- щодо вихідної.

Активація роботи L-аргінін-NO-системи відіграє регуляторну роль у здійсненні еритроцитом кисневотранспортної функції. Крім того, відомо, що нітрозилгемоглобін, що в нормі міститься у венозній крові, здатний при високих рО2 розпадатися з вивільненням молекули NO, що окисляється до NO2- і далі до NO3- [Wennmalm A., Benthin G., Edlund A. et al., 1993]. Оскільки в нашому дослідженні виявлене поетапне підвищення рО2, можна також прийняти зазначений механізм утворення й наростання стабільних метаболітів NO як одну зі складових даного процесу. В еритроцитах крові, консервованої «ГГЦ», з 7-ї доби й до кінця строку спостерігання рівень NO2- був вірогідно нижчим, ніж у крові, консервованій «ЦФДА-1» і «АГЦ». Це могло свідчити про меншу активність L-аргінін-NO-системи, отже, про менший ступінь здатності еритроцитів до вивільнення О2. На 28-му добу й далі до кінця строку спостерігання в крові, заготовленій на всіх узятих для дослідження гемоконсервантах, відзначене зниження продукції NO2-, що могло бути обумовлене включенням NO у формі іонів нітрозонію в низькомолекулярні сполуки. Можна також припустити, що продукція NO2- і NO3- на даному етапі спостерігання знизилася внаслідок інактивації NO-синтаз.

Встановлено, що з дією NO2- пов’язаний окисний процес перетворення Hb в метгемоглобін (metHb), утворення якого ініціює появу тілець Гейнца-Эрліха, – локальних мембраноасоційованих преципітатів денатурованого Hb [Василенко Н. М., 2002]. Уперше виявлені нами на 7-му добу спостерігання, дані включення містилися в 17% еритроцитів «ГГЦ»- крові, і в 12% еритроцитів «ЦФДА-1»- і «АГЦ»- крові. До 14 -ї доби вони були помітні в 50% клітин, заготовлених на всіх рецептурах гемостабілізаторів, а в «ГГЦ»-крові розташовувалися й у позаклітинному просторі, мабуть, потрапляючи в нього з еритроцитів, що зруйнувалися. До 21-ї доби в «ГГЦ»-крові тільця Гейнца-Эрліха містили більше 80%, в «ЦФДА-1»- і «АГЦ»- крові - близько 70% еритроцитів. На цей термін збільшився вміст метаболітів NO, менш виражений в еритроцитах крові, заготовленої на гемоконсервантах, які містять аденін та неорганічний фосфат. Ефект цитотоксичності вторинних оксидантів NO проявлявся надалі через збільшення кількості еритроцитів з тільцями Гейнца-Эрліха. З 28-ї доби зберігання 100% «ГГЦ»- клітин мали ці включення, що дозволяє зробити висновок про готовність еритроцитів до гемолізу. У цей час близько 20% «ЦФДА-1»- і «АГЦ»- клітин ще були вільні від тілець Гейнца-Эрліха, і тільки на 35-ту добу їх містили 100% еритроцитів.

*Парціальна напруга кисню.* В 1-шу добу після заготівлі донорської крові, стабілізованої гемоконсервантами «ГГЦ», «ЦФДА-1» і «АГЦ», рО2  була мінімальною, статистично значимих розходжень не мала й перебувала в межах референтного рівня для венозної крові – близько 40 мм рт. ст. [Камышников В. С., 2005]. Зі збільшенням строку зберігання консервованої крові рО2 зростала. На 14-ту добу зберігання був помічений істотний приріст рО2: у крові, заготовленій на «ГГЦ», - в 1,2 рази; у крові, заготовленій на вміщуючих аденін і неорганічний фосфат рецептурах гемоконсервантів – в 2,9-3,3 рази. До 42-ї доби рО2 збільшилася в 7,2; 7,4 і 6,7 разів відповідно (рис. 4).

Отже, для підвищення рО2 повинне бути додаткове джерело розчиненого в плазмі О2. Таким джерелом має бути Hb. О2 може вивільнятися зі зв'язку з гемом через високий рСО2 (показано нижче). Значна кількість О2 в плазмі могла бути обумовленою його витисненням з оксигемоглобіну оксидом азоту.

Рис. 4. рО2 у консервованій крові на етапах зберігання

\*p<0,05 у порівнянні з 1 добою спостерігання

Враховуючи високий рівень стабільних метаболітів NO, можна припустити, що останній, вступаючи у зв'язок з Hb і маючи в 8000 разів більшу спорідненість до Hb, ніж О2, переводив Нb із конформаційного стану R у Т (у свою чергу, Т-конформація має в 500 разів нижчу спорідненість до О2, ніж R-конформація) [Зинчук В. В., 2003]. Оскільки головною функцією еритроцитів in vivo є постачання тканин О2, можна стверджувати, що NO, вивільняючи О2 зі зв'язку з Hb, відіграє регуляторну роль у даному процесі. Очевидно, еритроцит в умовах консервації намагається виконати генетично закладену програму передавання О2 тканинам за допомогою NO – механізму, нездійсненного у штучних умовах. Таким чином, еритроцит дестабілізує власне навколишнє середовище, тим самим просуваючись шляхом до своєї загибелі. Відсутність у консервованого еритроцита можливості віддавати О2 тканинам, нездатність до власної утилізації О2, витиснення О2 з оксигемоглобіну й накопичення його в консервованій крові можуть ініціювати перехід О2  в АФК. In vivo у нормі невелика частина О2 (2-5%) спонтанно переходить в АФК; в умовах консервації їхня кількість може наростати у зв'язку з оксидативною трансформацією білків, що містять кисневі радикали й іони металів змінної валентності, до яких, насамперед, належить Hb [Кулинский В. И., 1999; Тимочко М. Ф., Кобилiнська Л. I., 1999]. Тому можливо, що одним із тригерів утворення додаткових об'ємів О2 у консервованій крові була генерація АФК і продуктів їхнього впливу на клітинні структури, що примусово створювало в клітинах оксидативні зміни. Останні могли активувати ліпооксигеназний й інші шляхи метаболізму ненасичених жирних кислот, призводячи до надлишку АФК і перекісного окислювання ліпідів (ПОЛ). Оскільки стійким продуктом перекісного окислювання ненасичених жирних кислот клітинних мембран, яке здійснюється в анаеробних умовах, є О2, можна прийняти ПОЛ як одну із причин накопичення О2 у гемотрансфузійному середовищі. Для підтвердження цієї тези вивчили концентрацію МДА. Установили, що в першу добу спостерігання концентрація МДА в еритроцитах крові, консервованої «АГЦ», вірогідно нижче, ніж у крові, заготовленої на «ГГЦ», і не має розходжень із такою в «ЦФДА-1»- крові. Стосовно базового рівня концентрація МДА вірогідно підвищувалася до 7-ї і далі до 42-ї доби зберігання в крові, заготовленій на всіх узятих для порівняльного вивчення гемоконсервантах. У цей період рівень МДА в еритроцитах крові, консервованої «ГГЦ», був вірогідно вищим (що свідчило про більшу виразність ПОЛ), ніж у крові, заготовленій на аденінвміщуючих гемоконсервантах. У період з 14-ї по 28-му добу виявлена достовірна різниця в рівні рО2 у порівнянні між консервантами: у крові, консервованій «ГГЦ», даний показник в 2,0-2,1 рази нижче, ніж у крові, консервованій «ЦФДА-1», і в 2,2-3,3 рази нижче, ніж в «АГЦ»-крові. Припустили, що в крові, консервованій «ГГЦ», більшою мірою, чим у крові, заготовленій на «ЦФДА-1» і «АГЦ», О2 перебуває в хімічно зв'язаному стані, у тому числі, з Hb. Такою сполукою є, зокрема, metHb, вміст якого в еритроцитах «ГГЦ»- крові, судячи з питомої ваги клітин із включеннями тілець Гейнца-Эрліха, вище.

Визначили кореляційну відповідність рО2 у консервованій крові питомій вазі карбоксигемоглобіну на етапах зберігання, а також концентрацію Hb (НGB). Виявили зниження показника НGB щодо його базового рівня до кінця строку спостерігання в «ГГЦ»- крові на 44,7%, в «ЦФДА-1»- і «АГЦ»- крові – на 36,6%. Очевидно, дезінтеграція Нb також сприяла вивільненню О2 з хімічних зв'язків і його накопиченню в консервованій крові.

*Парціальна напруга вуглекислого газу.*У першу добу з моменту вилучення крові в донора рСО2 перевищувала рО2 у крові, стабілізованій «ГГЦ», в 2,7 рази; в «ЦФДА-1»-крові – в 2,6 рази, і в «АГЦ»- крові – в 3,2 рази, у той час як у нормі для венозної крові людини рСО2 перевищує рО2 тільки в 1,15 разів. Високий показник рСО2 можна вважати результатом взаємодії цитрату натрію/лимонної кислоти, що входять до складу гемоконсервантів, з бікарбонатом плазми. Оскільки висока концентрація СО2 збільшує локальну концентрацію протонів (Н+), чому сприяє активність цитозольного ферменту карбоангідрази, то, як наслідок, відбувається зниження спорідненості гема до кисню й посилене звільнення О2. Це дає можливість стверджувати, що підвищене утворення СО2 у момент «зустрічі» крові з гемоконсервантом може служити пусковим моментом витиснення О2 зі зв'язку з Нb і подальших оксидативних змін структур еритроцитів. У крові, консервованій «ГГЦ», у період з 7-ї по 21-шу добу намітилася тенденція рСО2 до зниження; у період з 28-ї по 42-гу добу зниження рСО2 стало достовірним. У крові, заготовленій на «ЦФДА-1» та «АГЦ», у період з 7-ї по 42-гу добу мала місце лише тенденція до зниження рСО2.

Відзначили пряму достовірну кореляцію між зниженням рН і рівнем рСО2. Очевидно, на етапах зберігання крові дисоціація оксигема підсилювалася, О2 поступово дифундував у плазму, і його місце займав СО2, утворюючи карбогемоглобін. Іншими причинами зниження рСО2, що досягло достовірного рівня на 28-му добу, можна вважати зв'язування СО2 у гідрокарбонати й протеїнати. У результаті зазначених хімічних взаємодій надлишок СО2, що утворився спочатку, на 35-ту добу зберігання консервованої крові вже не спостерігався.

Проведена робота по визначенню динаміки газів консервованої крові призвела до висновку: слід рекомендувати заміну цитрату натрію та лимонної кислоти у складі гемоконсерванта на стабілізатор, який не вступає в хімічні взаємодію з буферними системами консервованої крові.

Таким чином, еритроцити людини з моменту вилучення із кровоносного русла донора й переміщення в штучне середовище гемоконсерванту зазнають осмотичних, механічних, хімічних і температурних впливів, нефізіологічних для живої клітини. Схематичне зображення виявлених у роботі альтерацій структур консервованого еритроцита показано рисунком 5.

**Природний захист** **еритроцитів консервованої крові.** Одним з головних компонентів ферментативної ланки системи антирадикального захисту клітин є СОД, що перетворює токсичний супероксиданіон-радикал (\*О2–) у менш токсичний пероксид водню (Н2О2) [Чумаков В. Н., Осинская Л. Ф., 1977; Boveris A., 1977; Hassan H.M., Fridovich I., 1983; Agostoni A, Gerli GC, Beretta L. et al., 1980; Барабой В. А., Брехман И. И., Голотин В. Г. і соавт., 1992]. Встановили підвищення активності СОД в еритроцитах крові, заготовленої на всіх узятих для порівняння гемоконсервантах, з 7-ї доби зберігання. Виявили, що даний показник вірогідно зростав: в «ГГЦ»- крові – у період 1 – 14-та доба (на 56,6%), в «ЦФДА-1» крові – 1 – 21-ша доба (на 40,9%), в «АГЦ»- крові – 1 – 28-ма доба (на 41,4%), після чого в «АГЦ»- крові мав тенденцію до зниження, а в «ГГЦ»- і «ЦФДА-1»- крові знижувався. Останнє можна пояснити тим, що білкова природа ферменту в умовах генерації АФК робить його об'єктом неконтрольованоі модифікації, денатурації та фрагментації при прогресуванні явищ оксидативного стресу [Денисенко О.І., 2004]. Отже, адекватне функціонування СОД як антиоксиданту найдовше зберігалося в еритроцитах крові, консервованої «АГЦ».

Оскільки СОД утилізує \*О2– з утворенням Н2О2, очікуваним було підвищення активності каталази [Мазо В. К., 1998; Васильєва И. Ф., 2003]. В 1-шу добу спостерігання в еритроцитах крові, консервованої «ГГЦ», виявили максимальну напругу активності каталази, що перевищує таку в еритроцитах крові, консервованої «ЦФДА-1» і «АГЦ», в 3,1 і 3,5 рази відповідно. Це свідчило про більший ступінь накопичення H2O2 і необхідність каталазного антипероксидного захисту. Виявили зростання активності ферменту на 240% у період з 1-ї по 14-ту добу в крові, консервованій «ГГЦ», та на 160% і 178% у період з 1-ї по 21-шу добу в крові, заготовленій на «ЦФДА-1» і «АГЦ», відповідно. В «ГГЦ»- крові в період 14 – 42-га доба, а в «ЦФДА-1»- і «АГЦ»- крові – 21 - 42-га доба активність каталази знизилася (у крові, консервованій «ГГЦ», на 32,5%

Ендогенна

продукція NO

Нітрозуван-ня тіоло-вих груп білків

Утворення СО

Вихід гема до плазми

Розрив мембрани

Механічна травма

**Переміщення еритроцита в штучне сере-довище**

Р-я цитрата з бікар-бонатами плазми

Утворення СО2

Витискання О2 з окси-гемогло-біну

Накопичен-ня О2 в кон-сервованій крові

Витискання киснем

NO з HbFe2+NO

Активні форми NО

Дія високої концентрації глюкози

Вплив низь-кої темпера-тури збері-гання

Глікозуван-ня гемо-глобіну

Порушення

діяльності кальцієвих каналів

Пригнічення біохімічних процесів в клітині

Окислення SH-груп в актив-ному центрі

К,Na-АТФази

Накопичен-ня лактату й зниження рН

Накопичен-ня води

Хімічний гемо-глобіноліз

Енерго-дефіцит

Зниження актив-ності ферментів гліколізу, ПФШ, ДФГШ

ПОЛ

Дестабілі-зація мембрани

АФК

Втрата К+ і накопи-чення Na+

Внутрішньо-клітинне накопичення Са2+ й інгібіція фліппази

**Дезінтеграція еритроцитів**

Підсилення

проводимості Са2+ за градієн-том концентр.

**Рис. 5. Схематичне зображення альтерацій консервованого еритроцита в процесі зберігання**

відносно 14-ї; у крові, консервованій «ЦФДА-1», на 50,7%, в «АГЦ»- крові – на 32,0% відносно 21-ї доби). Це могло бути обумовлено: а) гіперпродукцією H2O2 (субстратна інгібіція); б) розривом іонних взаємодій ферменту з мембраною й виходом у плазму при наростанні в мембрані явищ ПОЛ [Верболович В.П., Підгірський Ю.К., Підгірська Л.М., 1989; Терьохіна Н.А., Короваїв В.Г., 2003];

в) дестабілізацією молекули ферменту.

Виявили високий ступінь кореляційного зв'язку активності каталази й СОД («ГГЦ»- еритроцити: r=0,82, р<0,05; «ЦФДА-1»- еритроцити: r=0,89, р<0,05; «АГЦ»- еритроцити: r=0,93, р<0,01), що відповідає даним літератури, яка свідчить про синергізм роботи СОД і каталази в першій лінії антиоксидантного захисту клітини [Мазо В.К., 1998; Кулинский В.И., 1999].

Вивчили *зміни активності глутатіонпероксидази* в консервованій крові.Установили, що в 1-шу добу після заготівлі крові в донора активність ГП в «ГГЦ»-еритроцитах вірогідно перевищувала таку в «ЦФДА-1»- і «АГЦ»- еритроцитах. Далі в еритроцитах крові, заготовленої на всіх узятих для порівняння гемоконсервантах, активність ГП підвищувалась, що свідчить про зростання концентрації гідроперекісних сполук, досягаючи вірогідно високого рівня на 7-му добу. На 42-гу добу спостерігання показник активності ГП перевищив первісний в еритроцитах крові, консервованої «ГГЦ», в 2,1 рази; у «ЦФДА-1»- і «АГЦ»- крові – в 1,9 рази. Це свідчить про функціонування ГП еритроцитів на всьому протязі строку зберігання гемотрансфузійного середовища і про найвищу напруженість роботи даної системи в еритроцитах крові, консервованої «ГГЦ», мабуть, обумовлену найбільшим ступенем накопичення гідроперекісних сполук.

*Активність глутатіонредуктази на етапах зберігання консервованої крові.*На 7-му добу спостерігання встановлене підвищення активності ГР щодо вихідного. В еритроцитах крові, консервованої «ГГЦ», найбільш висока активність ГР була виявлена в 1-14-ту добу, зростання щодо базового рівня склало 104,9%, що свідчило про накопичення окисленого глутатіону – субстрату для ГР – до зазначеного етапу спостерігання. У період 21-ша – 42-га доба активність ферменту знизилася, можливо, через: а) субстратну інгібіцію, б) альтерації молекули.У крові, консервованій «ЦФДА-1» і «АГЦ», до 21-ї доби розходження в активності ГР встановлені не були, відзначене підвищення на 168,9 і 171,6% відповідно. Далі в еритроцитах крові, консервованої «ЦФДА-1», активність ГР знизилася, у той час як в еритроцитах «АГЦ»- крові продовжувала підвищуватися до 28-ї доби з наступною тенденцією до зниження. У період 28-ма – 42-га доба рівень активності ГР в «АГЦ»- еритроцитах вірогідно перевищував такий в «ГГЦ»- і «ЦФДА-1»- еритроцитах, що свідчило про ефективніше функціонування ферменту.

Визначили високі коефіцієнти кореляції при зіставленні рівня активності ГР і концентрації NO3- у крові, консервованій «АГЦ» і «ЦФДА-1», у зв'язку із чим припустили, що ГР, здійснюючи антиоксидантну дію, сприяла нейтралізації активних форм азоту.

*Зміни концентрації відновленого глутатіону на етапах зберігання консервованої крові.* Відомо, що концентрація ВГ в еритроцитах in vivo, in vitro і в консервованій крові з часом знижується [Baur G., Iung A., Wendel A., 1982; Suzuki T., Agar N.S., Suzuki M., 1984].Ми встановили, що в 1-шу добу в зразках еритроцитів крові, заготовленої на альтернативних гемоконсервантах, рівень ВГ не розрізнявся. Далі концентрація ВГ поетапно знижувалася, досягаючи вірогідних значень щодо вихідних на 7-му добу спостерігання. У період 7-ма – 14-та доба рівень ВГ в еритроцитах «ГГЦ»- крові був нижчим, ніж в «АГЦ»- і «ЦФДА-1»- крові. З 21-ї по 35-ту добу даний показник істотно не відрізнявся від такого в «ЦФДА-1»- крові, але був нижчим, ніж в «АГЦ»- крові. З 35-ї по 42-гу добу рівень ВГ у крові, консервованій «АГЦ», перевищував такий у крові, консервованій «ГГЦ», але не відрізнявся від показника «ЦФДА-1»- крові. До 42-ї доби втрата еритроцитами ВГ до кінця строку спостерігання склала: у крові, консервованій «ГГЦ», 67,1%; у крові, консервованій «ЦФДА-1» і «АГЦ», 66,5 і 66,3% відповідно. Зменшення вмісту ВГ в консервованих еритроцитах було обумовлене наступним:

1. Зниження енергетичного метаболізму. Установлено відповідність поетапних змін кількості ВГ в консервованому еритроциті кількості АТФ, 2,3-ДФГ і аденіну. Високі коефіцієнти прямої кореляції свідчили про те, що зниження енергоутворення негативно позначається на ефективності здійснення антиоксидантного захисту.

2. Витрата ВГ на підтримку нативної структури біологічно значимих макромолекул (так званий «дефіцит споживання»). Значимість ВГ як природного антиоксиданту для збереження структур консервованих еритроцитів підтверджується високими коефіцієнтами кореляції між його витратою й показниками деструкції фосфоліпідного бішару мембрани (поетапне зростання елюації ФС, ФЕ в плазму).

3. Підвищена продукція АФК при зниженні активності ферментів відновлення ВГ (ГР й Г-6-ФДГ) і інших ферментів. Установлено високі коефіцієнти прямої корелятивної відповідності концентрації ВГ активності ЛДГ в еритроцитах і відсутність такої при зіставленні з активністю Г-6-ФДГ. Останнє, можливо, мало місце через нелінійність змін активності ферменту на етапах зберігання консервованих еритроцитів (установлене прогресуюче зниження концентрації ВГ й параболічний характер зміни активності Г-6-ФДГ). Виявлено негативну кореляцію показників концентрації ВГ й активності цитозольних ферментів ЛДГ і Г-6-ФДГ у плазмі, що свідчить про залежну від часу дезінтеграцію еритроцитів.

*Використання консервованим еритроцитом білірубіну як антиоксиданту.*Відомо, що стресові умови, що розвиваються в гемотрансфузійному середовищі в ході його «старіння», викликають лізис еритроцитів з накопиченням гема в плазмі [Жибурт Е. Б., 2000]. Незв'язаний гем, будучи потужним прооксидантом, стимулює утворення вільних радикалів і активує ПОЛ з наступним ушкодженням біомолекул мембран еритроцитів [Wagener F.A.D.T.G.A., Eggert А., Boerman O.C., 2001]. Захист від прооксидантної дії гема здійснює ГО-1 [Maines M.D., 1997; Otterbein L.E., Choi A.M.K., 2000]. Bi, що утворюється при впливі ГО-1 і білівердінредуктази, є одним із найпотужніших природних антиоксидантів [Зайцев В.Г., Островский О.В., Закревский В.И., 2003].

Виявили, що у всіх зразках крові, стабілізованої альтернативними гемоконсервантами, у першу добу спостерігання рівні загального, вільного й зв'язаного Ві перебувають у референтних межах, однак у крові, заготовленій на гемоконсервантах, які містять аденін і фосфат натрію, вміст загального Ві істотно нижче, ніж у крові, консервованій «ГГЦ». Це можна пояснити більшим ступенем травматизації еритроцитів у момент їхнього потрапляння в середовище «ГГЦ», виходом гемоглобіну із клітини й перетворенням його на Bi внаслідок дії ГО-1 і білівердінредуктази лейкоцитів. У крові, консервованій «ГГЦ», найбільш високий рівень загального Bi спостерігався протягом 1-ї – 7-ї доби консервації. Концентрація вільного Bi на даному етапі перевищувала показник «ЦФДА-1»- і «АГЦ»- крові в 1,5 - 1,8 і 1,8 - 1,6 разів відповідно. Є логічним, що «ГГЦ»- клітини в момент їхнього переміщення в середовище гемоконсерванту і в наступні 7 діб перебували в стресових умовах, що вимагають максимальної напруги функціонування ГО-1. На пізніших строках спостерігання (14-42 доба) статистично достовірних відмінностей даного показника в порівнянні між зразками крові, заготовленої на альтернативних гемоконсервантах, не виявили.Установили можливість впливу Bi як антиоксиданту на ступінь дезінтеграції структур консервованих еритроцитів, визначивши достовірну пряму кореляцію рівня Bi з поетапними змінами гематокриту, зворотну - з рівнем позаеритроцитарного Hb, активністю Г-6ФДГ і ЛДГ у плазмі.На пізніх етапах зберігання крові, консервованої всіма досліджуваними гемоконсервантами (28-ма – 42-га доба), низькі концентрації Bi не забезпечували достатній рівень антиоксидантного захисту.

*Антиоксидантна дія монооксиду карбону.*Відомо, що СО, який є регулятором гуанілатциклази, забезпечує антиапоптозний і антиоксидантний ефект [Otterbein L.E., Choi A.M.K., 2000]. У нашому дослідженні в першу добу після переміщення донорських еритроцитів у середовище гемоконсерванта визначалася максимальна концентрація СО в еритроцитах (13,98; 8,55 і 11,51 ммоль/л відповідно), що могло бути обумовлене його інтенсивним утворенням внаслідок високої активності ГО-1. Висока концентрація СО у перші 14 діб вказувала на наявність у консервованих еритроцитах ефективного антиоксидантного захисту за рахунок роботи системи ГО-1-СО, причому в «АГЦ» - консервованих еритроцитах у період 1-ша – 14-та доба відзначено найвищий рівень СО у порівнянні з «ГГЦ»- і «ЦФДА-1»- консервованими еритроцитами (р<0,05). В цей період в еритроцитах «ГГЦ»-, «ЦФДА-1»- і «АГЦ»- крові відзначене зниження рівня СО, можливо, обумовлене оксидативною дестабілізацією молекули ГО-1, а також його споживанням як антиоксиданту, що, відповідно до даних літератури, могло сприяти зниженню концентрації Н2О2 у клітині й, відповідно, зменшенню ступеня ПОЛ [Sa, Zhi-Sheng; Huang, Li-Qin; Wu, Guo-Lin et al., 2007]. Щоб підтвердити або відкинути даний постулат, вивчили кореляційний зв'язок між концентрацією СО на етапах спостереження й активністю СОД і каталази в еритроцитах (табл. 3).

Таблиця 3.

Матриця корелятивного зв'язку кількості СО і активності ферментів-антиоксидантів

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Показник | Гемоконсервант | | |
| ГГЦ | ЦФДА-1 | АГЦ |
| СО-активність СОД | r=-0,64, p>0,05 | r=-0,21, p>0,05 | r=-0,36, p>0,05 |
| СО-активність каталази | r=-0,93, p<0,01 | r=-0,36, p>0,05 | r=-0,71, p>0,05 |

Відсутність достовірної корелятивної відповідності зазначених показників не дала можливості точно визначити «точку дії» СО як антиоксиданту (за винятком статистично достовірної відповідності СО – активність каталази в «ГГЦ»- еритроцитах, що, можливо, мала місце через більше накопичення пероксидів). Підвищений рівень СО в еритроцитах, консервованих розчинами, що містять аденін і фосфат натрію, свідчив про більш виражений СО-гемоксигеназний антиоксидантний захист. Починаючи з 21-ї доби, утворення/витрата СО перебували на практично постійному рівні. Очевидно, СО активно реалізував свою антиоксидантну функцію в «ГГЦ»- стабілізованих еритроцитах протягом 2/3 строку їхнього зберігання, в «ЦФДА-1»- еритроцитах – менше половини строку зберігання, в «АГЦ»- еритроцитах – до 2/3 строку зберігання. Можливо, потреба у витраті СО еритроцитами «АГЦ»- крові була нижче, ніж «ЦФДА-1»- і «ГГЦ»-еритроцитами. Роль СО як антиоксиданту для консервованих еритроцитів показана нами вперше.

*Сечовина консервованої крові як антиоксидант.*Відомо, що сечовина  втримується в крові в частково зв'язаному з гемоглобіном і сироватковим альбуміном вигляді. Завдяки тропності до металів змінної валентності, сечовина перешкоджає утворенню metHb [Коровина Н. А., Захарова И. Н., Обыночная Е. Г., 2003], а також проявляє антиоксидантні властивості, скорочуючи число залізовмісних центрів ПОЛ [Гершенович З.С., Кричевская А.А., Лукаш А.И., 1970].

Ми встановили, що в першу добу після вилучення крові в донора рівень сечовини в плазмі відповідав нормі; з 7-ї («ГГЦ») – 14-ї доби («ЦФДА-1» і «АГЦ») він почав знижуватися. Оскільки в штучних умовах, створених консервуванням, у донорській крові синтез сечовини неможливий, так само як і подальший її катаболізм, можна припустити витрату даної речовини як антиоксиданту, що підтверджується й витратою білірубіну, яка відбувалася в тісному достовірному кореляційному зв'язку з витратою сечовини: r=0,96, p<0,01 для всіх досліджуваних зразків.

Вірогідно нижчий вміст сечовини в крові, консервованій «ГГЦ», у період 14-21 доба, свідчить про інтенсивнішу її витрату, отже, про більшу потребу еритроцитів в антиоксидантному захисті і про його здійснення. Роль сечовини як антиоксиданту при зберіганні консервованої крові показана нами вперше.

**Клінічне застосування еритроцитвмістних гемотрансфузійних середовищ, заготовлених з використанням альтернативних гемоконсервантів, для корекції анемічного синдрому.** Після переливання еритроцитної маси з крові, заготовленої на «ГГЦ» і «ЦФДА-1», ми відзначили зменшення ступеня важкості анемії у хворих дифузно-осередковою формою множинної мієломи в 100% випадків. На всіх етапах спостерігання мали місце статистично достовірні розходження RBC, МСН, МСНС, HGb і КП: дані показники в реципієнтів «ЦФДА-1»- консервованих еритроцитів вірогідно перевищували відповідні показники в реципієнтів еритроцитної маси із крові, консервованої «ГГЦ». Застосування «ЦФДА-1»- еритроцитної маси ефективніше, ніж застосування еритроцитів, консервованих «ГГЦ», усувало тканинну гіпоксію. Очевидно, порівняно високий середній рівень насичення О2 популяції молекул Hb у реципієнтів «ЦФДА-1»- ЕМ був обумовлений циркуляцією в кровоносному руслі донорських еритроцитів з вищим вмістом органічних фосфатів у порівнянні із еритроцитами «ГГЦ»- крові. Беручи до уваги встановлений нами факт більш високої концентрації в «ЦФДА-1»- еритроцитах 2,3-ДФГ, який грає основну й провідну роль у виконанні донорським еритроцитом кисневотранспортної функції, можна вважати ступінь порушення транспорту О2 до тканин у хворих після переливання «ЦФДА-1»- ЕМ меншою. Крім того, ЕМ стимулювала в реципієнтів еритропоез, про що свідчило підвищення кількості еритроцитів у периферичній крові щодо вихідного рівня на 15-ту добу: у реципієнтів «ГГЦ»- консервованих клітин - на 21,6%, у реципієнтів «ЦФДА-1»- еритроцитів - на 31,8% при трансфузії однакової дози цього компоненту крові.

**Висновки:**

Отримано важливі результати, що формують рішення поставленої проблеми визначення тригерів і ланок ланцюга альтерацій консервованих еритроцитів, на які можливо впливати підбором моделюючих добавок у рецептуру гемоконсервантів. Оцінка вихідного стану проблеми – додавання неорганічного фосфату й аденіну в рецептуру гемоконсервантів «ЦФДА-1» і «Адглюфоцит» – показала їхню перевагу перед консервантом «Глюгіцир», який не має в складі зазначених метаболітів, у строках збереження морфології й функцій донорських еритроцитів. Однак і ці гемоконсерванти не можуть забезпечити морфофункціональну повноцінність еритроцитів в пізні строки їх зберігання, хоча найкращі консервуючі властивості були визначені в розчині «Адглюфоцит». Отже, оцінка проявів альтерацій консервованого еритроцита й виявлені «слабкі ланки» у його захисті надали можливості вказати на необхідність: а) розробки рецептур гемоконсервантів з інгредієнтами, що справляють на еритроцит модулюючу дію; б) заміни стабілізатора системи згортання крові на такий, що не вступає в реакцію з бікарбонатами плазми.

1. Проведені з використанням автоматичного гематологічного аналізатора й люмінесцентної мікроскопії дослідження показали, що еритроцити в процесі зберігання консервованої крові піддаються морфометричним змінам. Їх кількість поетапно убуває, досягаючи вірогідно низького значення в порівнянні з вихідним: у крові, заготовленій на консервантах «Глюгіцир» і «ЦФДА-1», – після закінчення 2/3 встановленого нормативно-технічною документацією строку придатності, а в крові, консервованій розчином «Адглюфоцит», – до кінця зазначеного строку. Змінюється форма еритроцитів від дискоцитів через оборотні (ехіноцити, стоматоцити) варіанти в необоротні (акантоцити, сфероцити) з наступною дезінтеграцією. Кількість сферульованих еритроцитів зі зниженим показником об’єму вище в більш ранній строк у крові, заготовленій з застосуванням «Глюгіцир». Дисксферотрансформація еритроцитів в «Глюгіцир»- крові протікає з поетапним зменшенням об'єму клітин. У крові, консервованій розчинами «ЦФДА-1» і «Адглюфоцит», накопиченню сфероцитів передує етап збільшення діаметра еритроцитів (з чотирнадцятої по двадцять першу добу). Гемоконсервант «ЦФДА-1» так само, як і «Глюгіцир», в останню третину установленого строку придатності гемотрансфузійних середовищ не зберігає нормальний морфологічний статус основної маси клітин. Гемоконсервант «Адглюфоцит» проявляє порівняно вищу здатність віддаляти в часі настання необоротних змін у популяції еритроцитів.

2. Ключова роль у формуванні реологічного стану консервованої крові належить еритроцитам, перехід асоціації яких в «монетні стовпчики» до структур більш високого порядку вірогідно збільшує в'язкість консервованої крові. На пізніх строках її зберігання зниження в'язкості обумовлене накопиченням еритроцитів зі зменшеним діаметром, а також зниженням гематокриту.

3. Із трьох узятих для порівняльних досліджень гемоконсервантів тільки «Глюгіцир» створює середовище, у якому еритроцити поетапно накопичують глюкозу. Гемоконсерванти «ЦФДА-1» та «Адглюфоцит» забезпечують стабільніше протікання її катаболізму. Висока концентрація глюкози в складі гемоконсерванту поряд з позитивними сторонами (резерв субстратів для гліколізу, пентозофосфатного й 2,3-діфосфогліцератного шунтів) має й негативну - глікозилювання гемоглобіну, що погіршує транспорт газів крові. Існує достовірна зворотна кореляція показників рівня глікозильованого гемоглобіну й концентрації глюкози в плазмі крові, заготовленої на гемоконсервантах «Глюгіцир» і «Адглюфоцит», які містять підвищену кількість глюкози на 1мл цільної крові.

4. Гемоконсерванти «ЦФДА-1» і «Адлгюфоцит» підтримують вищу концентрацію макроергічних сполук відносно консерванту «Глюгіцир», отже, віддаляють в часі дисксферотрансформацію еритроцитів. Енергетична забезпеченість консервованих еритроцитів на етапах зберігання має негативний кореляційний зв’язок з відносною кількістю необоротно змінених еритроцитів. Зниження рівня аденозинтрифосфату і внутрішньоклітинне накопичення катіонів кальцію дестабілізують фосфоліпідну складову мембрани консервованих еритроцитів, тож існує взаємозв'язок енергетичної забезпеченості, транспортування катіонів і фізіологічного розподілу фосфоліпідів у плазматичній мембрані.

5. Підвищення концентрації катіонів натрію збільшує вміст глюкози й води в консервованих еритроцитах, впливає на їх морфометричні характеристики і сприяє накопиченню популяції клітин зі збільшеним діаметром. Катіони натрію й кальцію, діючи аддитивно з водою, мають причетність до прогресування дисксферотрансформації еритроцитів. Вивчення гідроосмотичних ефектів у консервованому еритроциті з використанням методу ЯМР-релаксометрії сприяє розумінню сутності конверсії дискоїдної форми еритроцита в сферичну.

6. Підвищення рівня глюкозо-6-фосфатдегідрогенази й лактатдегідрогенази у плазмі консервованої крові може служити показником дезінтеграції консервованих еритроцитів. Активність лактатдегідрогенази у плазмі є не тільки достовірним, але й більш раннім, у порівнянні з гематокритом, показником адаптованості/ушкодження еритроцита в умовах консервації. Зберігання еритроцитів при позитивній температурі супроводжується елюацією у плазму структурних фосфоліпідів внутрішнього моношару мембрани – фосфатидилетаноламіну й фосфатидилсеріну, що є наслідком порушення фізіологічної транслокації фосфоліпідів. Втрата фосфатидилетаноламіну й фосфатидилсеріну мембраною консервованих еритроцитів приводить до зменшення діаметра останніх і сферуляції.

7. Ланка сигнального шляху запрограмованої загибелі клітини, якою є експресія фосфатидилсеріну на поверхні плазматичної мембрани, притаманна і консервованому еритроциту, що було підтверджено за допомогою біохімічного набору для детекції апоптозу.

8. Високий показник парціальної напруги вуглекислого газув момент консервування крові є результатом взаємодії цитрату натрію/лимонної кислоти (складових гемоконсервантів) з бікарбонатами плазми. Зниження цього показниката підвищення парціальної напруги кисню під час зберігання консервованої крові свідчать про поступове витискання кисню з оксигемоглобіну діоксидом карбону. Крім того, накопичення молекулярного кисню є наслідком його заміщення у молекулі гемоглобіну на оксид азоту, монооксид карбону, а також перекісного окислення ліпідів мембрани.

9.Оксид азоту справляє біфункціональний вплив на структури консервованого еритроцита. У першій половині строку спостерігання підвищення рівня стабільних метаболітів оксиду азоту є свідченням зростання його концентрації внаслідок активного функціонування L-аргінін-NO-системи, спрямованого на модуляцію кисневотранспортної функції еритроцита. Поступове підвищення концентрації метаболітів оксиду азоту здійснює цитотоксичний вплив на консервований еритроцит, що підтверджується зростанням кількості клітин із включенням тілець Гейнца-Эрліха.

10. Консервованому еритроциту притаманні такі шляхи загибелі, як эриптоз – без'ядерна стадія апоптозу, та осмотичний гемоліз. Використання люмінесцентного барвника Lucifer yellow є об'єктивним методом індикації клітин з високим ступенем дезінтеграції, специфічним для еритроцитів, які зазнають апоптичних змін мембрани.

11. Консервований еритроцит використовує для захисту від оксидативних впливів природні антиоксиданти, такі як ферменти (супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза, каталаза, глутатіонредуктаза) та речовини неферментної природи (глутатіон, білірубін, монооксид карбону, сечовина).

**Список опублікованих робіт:**

|  |  |
| --- | --- |
| 1. | Бондарь С.И., Малыш П.Н. Адглюфоцит – первый отечественный гемоконсервант. Проблемы и перспективы внедрения в работу учреждений службы крови Украины // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – Луганськ, 2006. – Т.1, №2. – С. 77–82. |
| 2. | Гудзенко О.П., Малиш П.М. Новий вітчизняний гемоконсервант і очікувана ефективність його впровадження // Вісник фармації. – Харків, 2005. – № 4 (44). – С. 56–57. |
| 3. | Комаревцева И.А., Малыш П.Н., Письменная Т.В., Золотаревская М.В. Изучение проявлений оксидативного стресса в эритроцитах консервированной крови на этапах хранения // Укр. мед. альманах. – Луганськ, 2005. – Т.8, №4. – С. 95–98. |
| 4. | Малыш П.Н. Билирубин и антиоксидантная защита консервированных эритроцитов // Медико-социальні проблеми сім’ї. – Донецьк, 2006. – Т.11, №2. – С. 143–148. |
| 5. | Малыш П.Н. Кальций и консервированные эритроциты // Український журнал екстремальної медицини імені Г.О. Можаєва. – Луганськ, 2006. – Т.7, №1. – С. 76–79. |
| 6. | Малыш П.Н. Консервированная кровь: катионтранспортная функция мембраны эритроцита // Український морфологічний альманах. – Луганськ, 2005. – Т.3, № 4. – С. 58–60. |
| 7. | Малыш П.Н. Лактатдегидрогеназа как показатель дестабилизации консервированных эритроцитов в процессе хранения // Проблеми військової охорони здоров’я. Зб. наук. пр. Укр. військ.-мед. акад. – Київ, 2006. – Вип.17. – С. 586–592. |
| 8. | Малыш П.Н. Некоторые показатели дестабилизации консервированных эритроцитов // Український журнал гематології та трансфузіології. – Київ, 2007. – №2(7). – С. 34–37. |
| 9. | Малыш П.Н. Реологический статус консервированной крови на этапах хранения // Український журнал екстремальної медицини імені Г.О. Можаєва. – Луганськ, 2007. – Т.8, №1. – С. 58–62. |
| 10. | Малыш П.Н. Эритроптоз - миф или реальность? // Український журнал екстремальної медицини імені Г.О. Можаєва. – Луганськ, 2006. – Т.7, №2. – С. 62–65. |
| 11. | Малыш П.Н. Фосфолипиды мембраны консервированного эритроцита и зависимость их стабильности от энергетического статуса клетки // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – Луганськ, 2007. – Т.2, №1. – С. 65–71. |
| 12. | Малиш П.М., Гаврик С.Ю., Гусакова В.Я., Ласточкіна О.В. Досвід роботи Луганської обласної станції переливання крові по підвищенню інфекційної безпеки засобів гемокомпонентної терапії // Лабораторна діагностика. – Київ, 2005. – №3(33). – С. 19–22. |
| 13. | Малиш П.М., Комарєвцева І.О., Золотаревська М.В. Вивчення рівня глюкози в еритроцитах консервованої донорської крові на етапах зберігання при позитивній температурі // Галицький лікарський вісник. – Івано-Франківськ, 2005. – Т.12, ч. 4. – С. 60–62. |
| 14. | Малыш П.Н., Комаревцева И.А., Золотаревская М.В. Изучение уровня монооксида углерода в эритроцитах консервированной крови на этапах хранения при позитивных температурах // Український журнал екстремальної медицини імені Г.О. Можаєва. – Луганськ, 2005. – Т.6, №3. – С. 62–65. |
| 15. | Малыш П.Н., Комаревцева И.А., Золотаревская М.В. Консервированные эритроциты и гликозилированный гемоглобін // Український медичний альманах. – Луганськ, 2005. – Т.8, № 6. – С. 47–49. |
| 16. | Малыш П.Н., Комаревцева И.А., Золотаревская М.В. Монооксид углерода как показатель антиоксидантной защиты консервированных эритроцитов // Український морфологічний альманах. – Луганськ, 2005. – Т.3, №3. – С. 45–47. |
| 17. | Малыш П.Н., Комаревцева И.А., Золотаревская М.В. Углеводный обмен в эритроцитах донорской крови, консервированной рецептурами, содержащими аденин // Український журнал екстремальної медицини імені Г.О. Можаєва. – Луганськ, 2005. – Т.6, №4. – С. 66–69. |
| 18. | Малиш П.М., Комаревцева І.О., Климочкіна О.М. та співавт. Дослідження рівня похідних оксиду азоту в консервованій крові донорів на етапах зберігання при позитивних температурах // Медична хімія. – Київ, 2005. – Т.7, №3. – С. 92–94. |
| 19. | Малиш П.М., Комарєвцева І.О., Письменна Т.В. Вивчення резистентності еритроцитів консервованої крові на етапах зберігання при позитивних температурах // Український медичний альманах. – Луганськ, 2005. – Т.8, №3. – С. 125–129. |
| 20. | Малыш П.Н., Комаревцева И.А., Торопцева Е.Л., Гусакова В.Я. Кальций, магний и запрограммированная гибель консервированных эритроцитов // Медико-социальні проблеми сім’ї. – Донецьк, 2005. –Т.10, №3,4. – С. 72–76. |
| 21. | Малыш П.Н., Новак В.Л., Гусакова В.Я., Письменная Т.В., Примак С.В. Изменение концентрации АТФ и 2,3-БФГ в аспекте эритроптоза // Український медичний альманах. – Луганськ, 2006. – Т.9, №3. – С. 87–90. |
| 22. | Малиш П.М., Орлова О.А., Комарєвцева І.О., Письменна Т.В., Гусакова В.Я. Вивчення фізико-хімічних процесів в консервованих донорських еритроцитах на етапах зберігання при позитивних температурах // Український медичний альманах. – Луганськ, 2004. – Т.7, № 6. – С. 100–102. |
| 23. | Малиш П.М., Письменна Т.В., Гусакова В.Я., Оленич В.В., Якубенко О.Д. Вивчення рівня аденіну в плазмі донорської крові, стабілізованої рецептурами «Глюгіцир» та «ЦФДА-1» // Медико-социальні проблеми сім’ї. – Донецьк, 2005. – Т.10, №2. – С. 116–120. |
| 24. | Малиш П.М., Письменна Т.В., Гусакова В.Я. Морфометричні зміни в консервованих донорських еритроцитах на етапах зберігання при позитивних температурах // Український морфологічний альманах. – Луганськ, 2005. – Т.3, №1. – С. 48–52. |
| 25. | Малыш П.Н., Письменная Т.В., Гусакова В.Я. Неорганический фосфор и органические фосфаты на этапах хранения консервированной крови // Український журнал екстремальної медицини імені Г.О. Можаєва. – Луганськ, 2006. – Т.7, №3. – С. 26–30. |
| 26. | Малиш П.М., Письменна Т.В., Торопцева О.Л., Самуйлова О.Л., Гусакова В.Я. Перспективи розвитку методів консервування донорської крові в закладах служби крові Луганської області // Український журнал екстремальної медицини імені Г.О. Можаєва. – Луганськ, 2005. – Т.6, №1. – С. 80–84. |
| 27. | Малыш П.Н., Торопцева Е.Л., Самуйлова Е.Л., Джевага Ю.В., Письменная Т.В., Гусакова В.Я. Изучение электролитного обмена эритроцитов донорской крови // Український журнал екстремальної медицини імені Г.О. Можаєва. – Луганськ, 2005. – Т.6, №2. – С. 62–65. |
| 28. | Малыш П.Н., Фролова Е.В. Клиническая эффективность применения эритроцитной массы для коррекции анемического синдрома при множественной миеломе // Український медичний альманах. – Луганськ, 2007. – Т.10, №1. – С. 99–101. |
| 29. | Малыш П.Н., Фролова Е.В. Некоторые аспекты трансфузионной терапии ДВС-синдрома в акушерстве // Український журнал екстремальної медицини імені Г.О. Можаєва. – Луганськ, 2005. – Т.6, №1(Д). – С. 46–51. |
| 30. | Новак В.Л., Бондарь С.И., Малыш П.Н. К вопросу о применении тары из пластифицированного поливинилхлорида в практической деятельности учреждения службы крови // Вестник гигиены и эпидемиологии. – Донецьк, 2004. – Т.8, №2. – С. 293–297. |
| 31. | Малыш П.Н. К вопросу о повышении инфекционной безопасности гемотрансфузионной терапии // Сучасні проблеми трансфузіології: Матеріали науково-практичної конференції (3–4 червня 2004 р.). – Харків, 2004. – Гематологія і переливання крові. – 2004. – №32. – С. 75–77. |
| 32. | Малыш П.Н., Фролова Е.В. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа как показатель жизнеспособности консервированных эритроцитов // Гемостаз – проблеми та перспективи: Матеріали II міжнародного симпозіуму (8-9 листопада 2006 р.). – Київ, 2006. – Гематологія і переливання крові.– 2006. – №33. – С. 129–133. |
| 33. | Малыш П.Н., Новак В.Л., Гусакова В.Я., Письменная Т.В., Золотаревская М.В. Билирубин и антиоксидантная защита консервированных эритроцитов // Актуальні та невирішені питання гематології та трансфузіології: Матеріали V міжнародного симпозіуму (1-2 червня 2006 р.). – Київ, 2006. – Нове в гематології та трансфузіології. – 2006. – Вип. 5. – С. 49–57. |
| 34. | Гудзенко А.П., Малыш П.Н., Агафонова Е.В., Могильникова И.В. Луганская область: проблемы и перспективы инфекционной безопасности препаратов из донорской крови // Державна реєстрація, технологія виробництва, контроль якості і клінічне застосування препаратів крові: Матеріали Всеукраїнського семінару з міжнародною участю (2-3 листопада 2006 р.). – Луганськ, 2006. – Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – 2006. – Т.1, №2. – С. 73–76. |

**Анотація**

Малиш Павло Миколайович «Біохімічні, структурно-функціональні та метаболічні зміни консервованої крові людини в процесі зберігання при позитивній температурі». – Рукопис.

Дисертація на здобуття вченого ступеню доктора медичних наук, за спеціальністю 14.01.32 – медична біохімія. – Луганський державний медичний університет, м. Луганськ, 2007 р.

Дисертацію присвячено визначенню альтераційних та регуляторних систем, сигнальних шляхів ушкодження та загибелі консервованих еритроцитів людини. В основі роботи лежить вивчення біохімічних, структурно-функціональних та метаболічних змін консервованої крові в процесі зберігання.

Встановлено тригери загибелі консервованих еритроцитів: механічна травма клітин крові при вилученні з кровообігу донора та переміщенні до штучного середовища; вплив інгредієнтів гемоконсерванту, таких як глюкоза в високій концентрації (розвиток осмотичного стресу, глікозування гемоглобіну), стабілізатори системи згортання (вступаючи до реакції з бікарбонатами плазми, останні створюють надмірну кількість вуглекислоти, що є пусковим моментом для витискання кисню із зв’язку з гемоглобіном, індукції активних форм кисню та розвитку оксидативного стресу).

Робота є першою, в якій виявлено ознаки апоптичних процесів в консервованих еритроцитах, такі як екстерналізація фосфатидилсеріну та фосфатидилетаноламіну на поверхні мембрани, внутрішньоеритроцитарне накопичення катіонів кальцію, зниження об’єму клітини. Вперше встановлено, що в консервованому еритроциті функціонує система захисту від оксидативного впливу активних форм кисню та азоту, що включає високо- та низькомолекулярні речовини. Отримані результати надають можливості розвитку наукових уявлень про бажану композицію гемоконсервантів та сприяють новим дослідженням щодо розробки антиоксидантних стимулів для консервованих еритроцитів людини.

**Ключові слова:** кров, гемоконсервант, ЯМР-релаксація, оксид азоту, еритроцит, мембрана, фосфатидилсерін, фосфатидилетаноламін, ериптоз.

**Аннотация**

Малыш Павел Николаевич «Биохимические, структурно-функциональные и метаболические изменения консервированной крови человека в процессе хранения при позитивной температуре». – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук, по специальности 14.01.32 – медицинская биохимия. – Луганский государственный медицинский университет, г. Луганск, 2007 г.

Диссертация посвящена определению альтерационных и регуляторных систем, сигнальных путей повреждения и гибели консервированных эритроцитов человека. В основе работы лежит изучение биохимических, структурно-функциональных и метаболических изменений консервированной крови в процессе хранения при позитивной температуре.

Результаты исследований показали, что эритроциты с момента изъятия из кровеносного русла донора и перемещения в искусственную среду гемоконсерванта испытывают осмотические, механические, химические и температурные влияния, нефизиологичные для живой клетки. Эритроциты противостоят этим влияниям, используя природную систему защиты, по мере истощения которой повреждаются метаболические пути, нарастают морфологические (дисксферотрансформация) и морфометрические изменения, конечным итогом которых является деструкция клеток.

Впервые установлено, что основные пути гибели консервированных эритроцитов инициируются несколькими триггерами: механической травматизацией при извлечении клеток крови из кровеносного русла донора и перемещении в искусственную среду; влиянием на компоненты крови ингредиентов гемоконсерванта, таких как глюкоза в высокой концентрации, стабилизаторы свертывающей системы (цитрат натрия, лимонная кислота). Последние, вступая в реакцию с бикарбонатами плазмы, образуют избыточное количество углекислого газа, что является пусковым моментом для вытеснения кислорода из связи с гемоглобином, индукции активных форм кислорода и развития оксидативного стресса в консервированных эритроцитах.

Впервые обнаружено, что накопление молекулярного кислорода в консервированной крови по мере её «старения» является следствием перекисного окисления липидов мембраны, а также замещения кислорода в молекуле гемоглобина на углекислый газ, монооксид углерода, оксид азота. Показано, что последний оказывает бифункциональное воздействие на структуры консервированного эритроцита. На ранних этапах повышение уровня его стабильных метаболитов свидетельствует об активном функционировании L-аргинин-NO-системы, направленном на модуляцию кислородтранспортной функции эритроцита. В дальнейшем достигнутая высокая концентрация метаболитов оксида азота оказывает цитотоксическое влияние на консервированный эритроцит, что подтверждается поэтапным нарастанием количества эритроцитов с включениями телец Гейнца-Эрлиха.

С 21-х – 28-х суток хранения консервированных эритроцитов выявлены альтерации трансмембранного перехода катионов, что нашло выражение в потере калия и магния и накоплении натрия и кальция. Последние, действуя аддитивно с водой, способствуют дисксферотрансформации эритроцитов. Впервые выявлена взаимосвязь нарушений транспорта катионов, энергетической обеспеченности, физиологического распределения фосфолипидов в плазматической мембране и морфометрических показателей эритроцитов консервированной крови. Установлено, что снижение уровня АТФ и внутриклеточное накопление катионов кальция способствуют потере мембраной фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина, что приводит к уменьшению диаметра и сферуляции консервированных эритроцитов. Следовательно, в путях гибели консервированного эритроцита присутствуют признаки апоптических процессов, такие как экстернализация фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина на поверхности мембраны, внутриэритроцитарное накопление катионов кальция, снижение объема клетки.

Впервые установлено, что в консервированном эритроците функционирует система защиты от оксидативных воздействий активных форм кислорода и азота, используется работа высокомолекулярных веществ (гемоглобин, ферменты супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, каталаза), а также низкомолекулярных веществ (глутатион, билирубин, мочевина, монооксид углерода).

В работе показано, что усовершенствование гемоконсервантов имеет значение для эффективной трансфузиологической коррекции гематологических патологий. Так, введение в консервант аденина и фосфата натрия не только оказало благоприятное воздействие на морфофункциональное состояние эритроцитов донора, но также имело позитивное влияние на эритропоэз и синтез гемоглобина в специализированных клетках эритроидного ряда у реципиентов гемотрансфузионных эритроцитсодержащих сред – больных множественной миеломой с анемическим синдромом.

Результаты настоящего исследования, подтвердив эффективность нового отечественного гемоконсерванта «Адглюфоцит» в обеспечении морфофункциональной полноценности консервированных эритроцитов, могут быть использованы при создании усовершенствованных консервирующих растворов для крови и взвешивающих растворов для эритроцитов донора. Полученные результаты, анализ и оценка многообразия выявленных альтераций донорских эритроцитов развивают научные представления о композиции гемоконсервантов и могут быть использованы в поиске антиоксидантных стимулов для консервированных эритроцитов человека.

**Ключевые слова:** кровь, гемоконсервант, ЯМР-релаксация, оксид азота, эритроцит, мембрана, фосфолипиды, катионы, эриптоз.

**Summary**

Malysh Pavel Nikolaevich. Biochemical, structured-functional and metabolic changes of the human canned blood in the process of keeping under positive temperature. - Manuscript.

Dissertation for a Doctor’s of medical science degree on speciality 14.01.32 - medical biochemistry. - Lugansk state medical university, Lugansk, 2007.

The thesis is dedicated to determination of alterative and regulatory systems, signal ways of canned human erythrocytes damage and ruins. This work is based on the studying of biochemical, structured-functional and metabolic changes of canned blood in process of keeping.

There are installed triggers of canned human erythrocytes death: the mechanical trauma of the blood cells at the time of extraction from donor’s circulatory system and displacement to the artificial ambience; the influence of haemo-conserving agent ingredients such as glucose in high concentration (the development of osmotic stress, glicateness of hemoglobin), the stabilizers of the rolling up systems (taking part in the reaction with bicarbonate of the plasma that form the surplus amount of the carbonic acid that is an activate moment for displacing the oxygen from bonding with hemoglobin and for induction of the active forms of the oxygen and development of oxidative stress in canned human erythrocytes).

Work is the first determination of apoptotic processes signs in canned human erythrocytes such as phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine externalization on the membrane surface, calcium ions intracellular accumulation, the cell volume reduction. It is for the first time installed that in canned human erythrocytes the system of protection from active forms of the oxygen and nitrogen oxidative influence functions, that includes the high-molecular (the hemoglobin, superoxide dismutase, cathalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase) and low-molecular (glutathione, bilirubine, urea, carbon monoxide) substances.

The got results develop the scientific conceptions about haemo-conserving agent’s composition and promote new studies on the antioxidant stimulus development for human canned erythrocytes.

**Key words:** blood, haemo-conserving agent, NMR relaxation, nitrogen oxide, erythrocyte, membrane, phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine, eryptosis.

**Список скорочень**

|  |  |
| --- | --- |
| АГЦ | - «Адглюфоцит» |
| АФК | - активні форми кисню |
| ВГ | - відновлений глутатіон |
| Г-6-ФДГ | - глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа |
| ГГЦ | - «Глюгіцир» |
| ГО-1 | - гемоксигеназа-1 |
| ГП | - глутатіонпероксидаза |
| ГР | - глутатіонредуктаза |
| ДТНБ | - 5’,5’-дітіо-біс-2(нітробензойна) кислота |
| ЕМ | - еритроцитна маса |
| ЕМА | - еритроцитарні мікроагрегати |
| КП | - кольоровий показник |
| ЛДГ | - лактатдегідрогеназа |
| МДА | - малоновий діальдегід |
| ОРКЕ | - осмотична резистентність консервованих еритроцитів |
| ПОЛ | - перекісне окислювання ліпідів |
| ПФШ | - пентозофосфатний шлях |
| СОД | - супероксиддисмутаза |
| ФЕ | - фосфатидилетаноламін |
| ФЛ | - фосфоліпіди |
| ФС | - фосфатидилсерін |
| ФХ | - фосфатидилхолін |
| ЯМР | - ядерно-магнітний резонанс |
| 2,3-ДФГ | - 2,3-діфосфогліцерат |
| Bi | - білірубін |
| Hb1c | - глікозильований гемоглобін |
| HGB | - концентрація гемоглобіну, г/л |
| МСН | - середній вміст гемоглобіну в еритроциті |
| МСНС | - кількість гемоглобіну, г, в 100 мл еритроцитів |
| metHb | - метгемоглобін |
| \*O2- | - супероксиданіон-радикал |
| pCO2 | - парціальна напруга вуглекислого газу |
| pO2 | - парціальна напруга кисню |
| RBC | - кількість еритроцитів в 1 мкл крові |
| T1 | - поздовжня складова часу ЯМР-релаксації |
| T2 | - поперечна складова часу ЯМР-релаксації |

Здано до набору 13.12.2007 р. Підписано до друку 12.12.2007 р.

Формат 60x90/16. Папір офсетний. Обл. вид. арк. 1,18.

Наклад 100 прим. Зам. 25.

ПП „ Гелиос”. Тел. 59-88-12

Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>