



УДК 612.592.111

<http://dx.doi.org/10.15407/dopovidi2016.03.093>

А. К. Гулевский, Е. Е. Жаркова

Институт криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

E-mail: evgeniyadanilenko@mail.ru

Восстановление морфофункциональных свойств эритроцитов донорской крови человека после гипотермического хранения

(Представлено академиком НАН Украины А.Н. Гольцевым)

Исследовано восстановительное действие низкомолекулярной фракции кордовой крови на эритроциты донорской крови человека по таким показателям, как морфология и кислородтранспортная функция. Показана перспективность использования реабилитирующих сред на основе кордовой крови.

Ключевые слова: эритроциты, гипотермическое хранение, кислородтранспортная функция, донорская кровь, восстановление.

Эффективность переливания консервированной крови, как показывает клиническая практика, в значительной степени зависит от сроков хранения крови в гипотермических условиях (2–4 °С). При длительном хранении качество крови снижается по изменению таких показателей, как рН, содержание свободного гемоглобина, содержание калия и натрия, АТФ и 2,3-ДФГ, реологические свойства, а главное кислородтранспортная функция [1].

На скорость наступления изменений в консервированной крови при гипотермическом хранении оказывают влияние: 1) состав консервирующей среды; 2) условия, при которых хранится кровь; 3) индивидуальные свойства крови донора [2].

Рядом авторов были предприняты попытки создания реабилитирующих сред, которые бы восстанавливали все перечисленные показатели до уровня нормы (Валери, Виноград-Финкель, Дервиз, Аграненко, Тибилова и др.). В основе этих методов лежало включение в консервирующую среду метаболитов предшественников макроэргических соединений и 2,3-ДФГ, среди которых аденин, рибоксин, инозин, фосфат и пируват натрия и др.

Недостатком указанных способов является необходимость приготовления и стерилизации реабилитирующих компонентов, а также несбалансированность рецептуры, так как в нее включены лишь отдельные компоненты, участвующие в процессе гликолиза.

© А. К. Гулевский, Е. Е. Жаркова, 2016

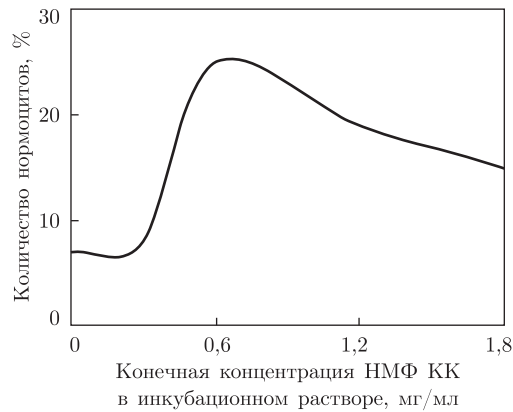


Рис. 1. График зависимости количества нормоцитов от концентрации НМФ КК на 21 сут гипотермического хранения

Ранее в работах [3, 4] была показана высокая эффективность низкомолекулярной (до 5 кДа) фракции кордовой крови (НМФ КК) при восстановлении энергетического потенциала животных клеток различного происхождения. Использование НМФ КК, по сравнению с рецептурами вышеуказанных авторов, имеет преимущество: она включает в себя в сбалансированном виде как метаболиты, так и регуляторы процессов энергетического метаболизма. В связи с этим представляло интерес использование НМФ КК для исследования морфологии и кислородтранспортной функции эритроцитов.

Экспериментальная часть. К цельной донорской крови человека, консервированной на гемоконсерванте “Глюгидир” или СРДА-1, которую хранили при 4 °С в течение 1, 7, 14 и 21 суток добавляли НМФ КК. Полученный раствор инкубировали в течение 1 ч при 37 °С, конечная концентрация фракции в растворе составила 0,6 мг/мл. НМФ КК в лиофилизированном виде получали с помощью метода ультрафильтрации как описано в работе [5]. По истечении отведенного времени готовили мазки, которые фиксировали по Май-Грюнвальду и окрашивали по Романовскому [6].

С помощью световой микроскопии проводили морфологическую оценку полученных мазков, которая включает в себя определение количества нормоцитов (дискоцитов), эритроцитов и непереходную форму эритроцитов — сфероцитов.

В качестве основных параметров кислородтранспортной функции оценивали напряженность кислорода, напряженность углекислого газа и сатурацию, или насыщенность, гемоглобина кислородом, т.е. процентное содержание кислорода в крови. Данные показатели определяли с помощью картриджного анализатора IL GEM Premier-3000.

Результаты и их обсуждение. Проведенные исследования показали, что улучшение морфологических показателей эритроцитов по увеличению содержания нормоцитов достигается при конечной концентрации НМФ КК в растворе 0,6 мг/мл, которая является оптимальной (рис. 1). В дальнейших исследованиях использовали НМФ КК в этой концентрации.

Результаты морфологических исследований эритроцитов после инкубации в течение 1, 7, 14 и 21 суток гипотермического хранения представлены в табл. 1, а микрофотографии — на рис. 2.

Анализ полученных данных показывает, что начиная с 7 суток гипотермического хранения в инкубационном консервирующем растворе, как в “Глюгидире”, так и в СРДА-1,

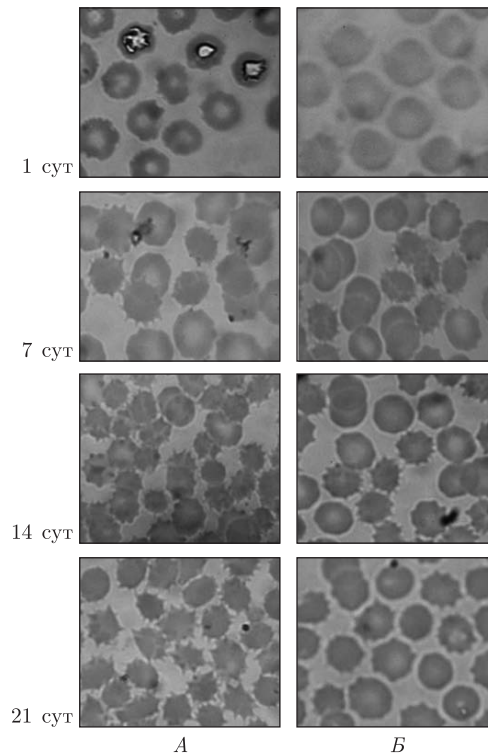


Рис. 2. Микрофотографии, отображающие влияние НМФ КК на эритроциты донорской крови человека на разных сроках гипотермического хранения: А — контроль; Б — влияние НМФ КК. Ув.: об. 100; иммерсия

морфологические показатели крови существенно улучшаются, в частности содержание нормоцитов возрастает в 2,5 раза, количество эхиноцитов и сфероцитов снижается.

Следует отметить, что при инкубации в растворе СРДА-1 показатели нормализации относительно контроля несколько лучше, что, возможно, связано с наличием в этой среде энергетического предшественника АТФ — аденина.

Стимулирующая способность НМФ КК относительно нормализации свойств эритроцитов сохраняется вплоть до 21 суток гипотермического хранения.

Результаты исследования параметров кислородтранспортной функции (табл. 2) показывают, что под влиянием НМФ КК на инкубационный консервирующий раствор сродство

Таблица 1. Морфологические изменения эритроцитов, %

Консервирующий раствор	Форма	1 сут		7 сут		14 сут		21 сут	
		К	Ф	К	Ф	К	Ф	К	Ф
"Тлюгицир"	Нормоциты	79,33	81,33	18,66	42	12,66	31,66	7,83	23,16
	Эхиноциты	14,66	13,16	67,99	44,66	72,33	55,99	78,99	66,99
	Сфероциты	0,66	0,33	6,33	4,33	10,33	6,33	12,66	8,66
	Др. формы	5,33	5	6,99	7,66	5,66	6,33	7,16	5,16
СРДА-1	Нормоциты	84,66	86,66	23,16	49,49	16,99	35,16	9,66	26,16
	Эхиноциты	10,66	10	65	42,16	67,16	57,83	76,83	64,99
	Сфероциты	0,66	0,33	7,49	3,16	9,33	5,99	10,83	5,16
	Др. формы	3,33	3	4,33	5,33	5,33	2,33	2,33	3,83

Примечание. Содержание низкомолекулярной фракции кордовой крови в реабилитирующей среде 0,6 мг/мл. К — контроль, Ф — фракция.

Таблица 2. Значения основных параметров кислородтранспортной функции

Консервирующий раствор	Параметр	1 сут		7 сут		14 сут		21 сут	
		К	Ф	К	Ф	К	Ф	К	Ф
“Глюгидир”	P_{O_2}	30	44	28	51	42	80	33	71
	P_{CO_2}	83,1	78,6	97,9	88	111,3	103,2	117,6	106,5
CPDA-1	Sp_{O_2}	44,9	62,3	42,2	59,9	39,9	57,7	37,3	55,4
	P_{O_2}	34	47	30	52	40	74	37	73
	P_{CO_2}	81,8	75,5	95,3	86	110,8	105,7	114,6	103,9
	Sp_{O_2}	47,1	63,8	45,3	60,7	40,5	58,5	38,6	56,4

Примечание. P_{O_2} — напряженность кислорода, мм. рт. ст.; P_{CO_2} — напряженность углекислого газа, мм. рт. ст.; Sp_{O_2} — сатурация, %, К — контроль, Ф — фракция

гемоглобина к кислороду повышается в среднем на 20%, увеличивается показатель напряженности кислорода и уменьшается параметр напряженности углекислого газа.

Сравнение эффективности НМФ КК с ранее использованными растворами [1, 7, 8] свидетельствуют о сопоставимости результатов.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что внесение НМФ КК в реабилитирующую среду позволяет нормализовать морфологические свойства эритроцитов донорской крови человека и параметры кислородтранспортной функции.

Цитированная литература

1. *Виноград-Финкель Ф. Р., Дервиз Г. В., Андреева А. Г. и др.* Метаболическая активность и дыхательная функция крови, консервированной на кислых глюкозо-цитратных растворах, и пути совершенствования этих растворов // Проблемы гематологии и переливания крови. – 1974. – № 7. – С. 3–9.
2. *Шраго М. И., Бередикина Л. П.* Критерии жизнеспособности эритроцитов (о функциональном направлении в криобиологии) // Криобиология и криомедицина. – 1975. – № 1. – С. 27–33.
3. *Гулевский А. К., Ахатова Ю. С., Сысоев А. А., Сысоева И. В.* Стимулирующее действие низкомолекулярной фракции кордовой крови на энергетический обмен в лейкоцитах // Доп. НАН України. – 2014. – № 7. – С. 152–157.
4. *Гулевський О. К., Моїсєєва Н. М., Горіна О. Л. та ін.* Вплив низькомолекулярної фракції з кордової крові (до 5 кДа) на функціональні та біохімічні показники клітин у дослідах *in vitro* // Укр. біохім. журн. – 2014. – № 6. – С. 167–174.
5. Пат. 69652 Україна, МПК А 61 К 35/14. Спосіб отримання низькомолекулярної фракції із кордової крові великої рогатої худоби / О. К. Гулевський, Н. М. Моїсєєва, О. С. Абакумова, І. Й. Щенявський, А. Ю. Нікольченко, О. Л. Горіна; Заявник ІПКіК НАН України – № у 201112006. – Заявл. 12.10.2011; Опубл. 10.05.2012, Бюл. № 9.
6. *Меньшиков В. В.* Клиническая лабораторная аналитика. – Москва: Лабиринт-РАМЛД, 1999. – 352 с.
7. *Румянцев А. Г., Аграненко В. А.* Клиническая трансфузиология. – Москва: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1997. – 575 с.
8. *Valeri C. R.* Blood banking and the use of frozen blood products. – Cleveland: CRS Press, 1976. – 417 p.

References

1. *Vinograd-Finkel' F. R., Derviz G. V., Andreeva A. G. et al.* Problemy gematologii i perelivaniya krovi, 1974, No 7: 3–9 (in Russian).
2. *Shrago M. I., Beredihina L. P.* Cryobiology and cryomedicine, 1975, No 1: 27–33 (in Russian).
3. *Gulevsky O. K., Akhatova Yu. S., Sysoev A. A., Sysoeva I. V.* Dop. NAN Ukraine, 2014, No 7: 152–157 (in Ukrainian).
4. *Gulevsky A. K., Moisieieva N. N. et al.* Biochem. J., 2014, No 6: 167–174 (in Ukrainian).

5. *Pat. UA 69 652, A 61 K 35/14. A process for preparing low molecular weight fraction from cord blood of cattle, O.K. Gulevs'kyj, N.M. Moisyeyeva, O.S. Abakumova, I.J. Shhenyavs'kyj, A. Yu. Nikol'chenko, O.L. Gorina, Applicant IPC&C, No u 201 112 006; Stated 12.10.2011, Publ. 10.05.2012, Bull. No 9 (in Ukrainian).*
6. *Menshikov V. V. Clinical laboratory analytics, Moskov: Labirint-RAMLD, 1999 (in Russian).*
7. *Rumyantsev A. G., Agranenko V. A. Clinical Transfusiology, Moskov: GJeOTAR MEDICINA, 1997 (in Russian).*
8. *Valeri C. R. Blood banking and the use of frozen blood products, Cleveland: CRS Press, 1976.*

Поступило в редакцію 31.08.2015

О. К. Гулевський, Є. Є. Жаркова

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків

E-mail: evgeniyadanilenko@mail.ru

Відновлення морфофункціональних властивостей еритроцитів донорської крові після гіпотермічного зберігання

Досліджено відновлювальну дію низькомолекулярної фракції кордової крові на еритроцити донорської крові людини за такими показниками, як морфологія та кисневотransпортна функція. Показано перспективність використання реабілітуючих середовищ, до складу яких входить кордова кров.

Ключові слова: еритроцити, гіпотермічне зберігання, кисневотransпортна функція, донорська кров, відновлення.

A. K. Gulevsky, E. E. Zharkova

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkiv

E-mail: evgeniyadanilenko@mail.ru

Restoration of the morphological and functional properties of erythrocytes in donated blood after hypothermic storage

The restorative effect of a low molecular weight fraction of cord blood on erythrocytes in donated blood of man on such indicators as the morphology and the oxygen-transport function is investigated. The perspective of using the rehabilitative environments based on cord blood is shown.

Keywords: erythrocytes, hypothermic storage, oxygen-transport function, donated blood, recovery.