
УДК: 612.111:57.043

Гулевский А.К., Жаркова Е.Е.

Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины,
Харьков, Украина

Gulevskiy A., Zharkova E.

Institute of kriomedicine and craniobiology problems of Academy of sciences, Ukrain

Актуальные вопросы восстановления морфо-функциональных свойств эритроцитов после длительного гипотермического хранения

Actual questions of morphological and functional properties
of erythrocytes after prolonged hypothermic storage

Резюме

В настоящем обзоре в историческом аспекте рассматриваются вопросы восстановления эритроцитов донорской крови человека после гипотермического хранения в консервирующих растворах. Проанализирована роль отдельных компонентов: аденина, рибоксина, пирувата в увеличении биоэнергетического потенциала эритроцитов, а также их эффективность в восстановлении функционально активных форм эритроцитов, их кислород-транспортной функции. Представлены новые подходы к восстановлению морфо-функциональных свойств эритроцитов с использованием низкомолекулярной фракции кордовой крови (до 5 кДа). Обсуждаются дальнейшие перспективы усовершенствования реабилитирующих сред.

Ключевые слова: эритроциты, кислород-транспортная функция, форма, восстановление, гипотермическое хранение.

Abstract

The details of erythrocytes restoration in human donor blood after hypothermic storage in conserving solutions were analysed in this article regarding historical aspect. The role of some components: adenine, riboxine, piruvate in the increase of bioenergetic potential of erythrocytes as well as their effectiveness in functionally active forms of erythrocytes recovery and recovery of their oxygen-binding function was analysed. The new approaches of restoration morphological and functional properties of erythrocytes with the use of low-molecular fraction (up to 5 kDa) of cord blood are described. The novel perspectives of further rehabilitation mediums improvement have being discussed.

Key words: erythrocytes, oxygen transport function, form, restoration, hypothermic storage.

■ ВВЕДЕНИЕ

Одной из актуальных задач современной гематологии является поиск новых методов восстановления морфофункциональных свойств клеток крови с целью удлинения сроков хранения цельной крови и эритроцитарной массы в физиологически полноценном состоянии, что позволило бы повысить терапевтическую эффективность трансфузий, а в случае с эритроцитарной массой решает проблему утилизации ее больших количеств, остающихся после заготовки плазмы.

Многочисленными исследованиями установлено, что срок хранения консервированной донорской цельной крови от 21 до 35 дней в зависимости от консервирующего раствора [2, 3, 10], однако уже на 3–4-е сутки значительно снижается основная функция эритроцитов – кислород-транспортная [3, 10]. При этом происходит ряд существенных изменений: снижается рН [3], увеличивается содержание свободного гемоглобина в плазме [4], изменяется содержание калия и натрия в эритроцитах [4], изменяются реологические показатели: дискоциты изменяют свою форму, становясь эхиноцитами, а в последствии и сфероцитами – непереходной формой эритроцитов, что связано с потерей эритроцитами молекул АТФ при их гипотермическом хранении [10]. Указанные изменения затрудняют использование такой ценной трансфузионной среды в клинической практике. Поэтому актуальным стал вопрос сохранения и восстановления «рабочей» формы эритроцитов для выполнения кислород-транспортной функции.

Одним из первых способов восстановления морфо-функциональных свойств эритроцитов был предложен в 1969 г. Валери С. метод так называемого «омолаживания» эритроцитов путем 3-часовой инкубации клеток донорской крови с метаболитами обмена веществ (аденин, пируват и фосфат натрия, инозин, глюкоза). Результатами данного метода явилось повышение уровня 2,3-ДФГ на 75%, АТФ – на 100%, рН – с 6,6 до 6,8, также изменялись реологические показатели эритроцитов: количество непереходных форм снижалось на 50%, а количество нормоцитов возрастало в 3 раза. В США метод прошел клинические испытания и в 1973 г. был запатентован [9].

Впоследствии в 1972 г. в Центральном институте переливания крови Виноград-Финкель, Дервиз и др. усовершенствовали способ «омоложения» Валери, используя стимуляторы обмена (этот комплекс обозначен ИАПФ), в их состав включаются: инозин 5 ммоль, аденин 1,3 ммоль, пируват натрия 3 ммоль, фосфат натрия двузамещенного 4,2 ммоль на 100 мл раствора, рН 5,65–5,75 [4]. Применение ИАПФ в цельной донорской консервированной крови в сочетании с консервантом ЦОЛИПК № 76 (Виноград-Финкель, Дервиз, Обшивалова, 1974 г.) проявило способность эритроцитов к восстановлению как морфологических показателей, так и биохимических.

В работе [4] было установлено, что наиболее ранним показателем изменения функции эритроцитов является выход ионов калия из клетки (по градиенту концентрации), что характеризует самые начальные нарушения структуры мембраны клетки. В первый день хранения содержание калия в эритроцитах составляет 80–90 мэкв/л, с увеличением срока хранения крови оно уменьшается в результате выхода калия из клетки в плазму и к 3-й неделе снижается до 50–75 мэкв/л. При добав-

С увеличением срока хранения донорской крови внутриклеточная концентрация калия снижается, но при этом в каждый исследуемый срок концентрация калия в опытах с кровью, консервированной на растворе ЦОЛИПК № 76 в сочетании с ИАПФ, была выше, чем без него.

лении к консервирующему раствору ЦОЛИПК № 76 стимуляторов обмена (ИАПФ) за период инкубации крови исходная концентрация калия в эритроцитах повышается до 100–120 мэкв/л, что указывает на стимуляцию процессов метаболизма, сопровождающихся увеличением макроэргических связей, активацию работы K^+/Na^+ и на поступление калия из плазмы в эритроциты (рис.1).

Параллельно с определением динамики изменения концентрации калия в эритроцитах донорской крови авторы исследовали динамику выхода свободного гемоглобина из эритроцитов в плазму. Было показано, что в крови, консервированной только на растворе ЦОЛИПК № 76, к 3-й неделе хранения накапливается от 60 до 90 мг% свободного гемоглобина, а в сочетании с ИАПФ к 4-й неделе хранения всего лишь 50–70 мг% (рис.2).

В качестве одного из параметров функционирования консервированных эритроцитов была исследована их способность утилизировать глюкозу, т.е. гликолитическая активность, которую определяли по способности клеток утилизировать глюкозу. Полученные данные позволили установить, что в процессе гипотермического хранения консервированной крови гликолитическая активность практически не меняется. Незначительное уменьшение приходится на 3-ю неделю, когда значение глюкозы достигает 7–7,5 мкМ на 1 г гемоглобина в 1 час, что соответствует физиологической норме. В донорской крови с добавленными веществами ИАПФ гликолитическая активность остается на том же уровне.

Добавление к консервирующему раствору ЦОЛИПК № 76 комплекса ИАПФ вызывало увеличение концентрации АТФ в эритроцитах; это увеличение отмечено в течение всего периода наблюдения (рис. 3).

В результате проведенных исследований было установлено [11], что биохимический механизм действия примененных стимуляторов обмена заключается в том, что инозин включается в пентозофосфатный цикл и превращается в рибозо-6-фосфат. Последний на уровне триоз усиливает основной гликолитический путь (Эмбден – Мейергоф – Парнас). Аденин увеличивает ресурсы адениловой системы. Пируват стимулирует лактатдегидрогеназную реакцию, в результате которой НАДН₂ (никотинамидадениндинуклеотид) превращается в НАД (окисленный), усиливающий глицеральдегидфосфатдегидрогеназную реакцию, в результате которой получается 1,3-ДФГ, который переходит в 2,3-ДФГ.

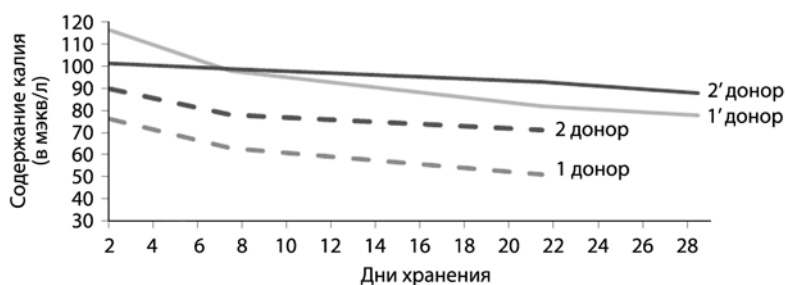


Рис. 1. Динамика содержания калия в эритроцитах донорской крови, консервированной на консерванте ЦОЛИПК №76 (пунктирная линия) и ЦОЛИПК № 76 в сочетании с ИАПФ (сплошная линия) [4]

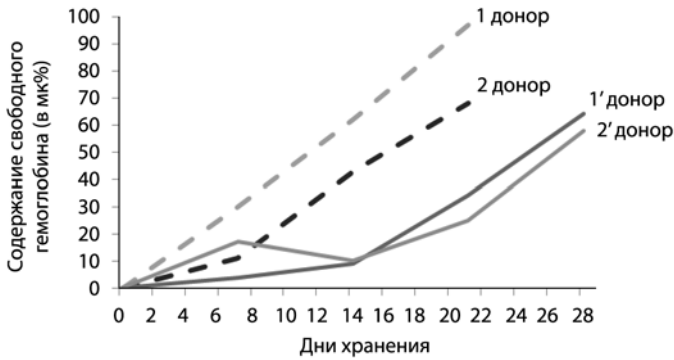


Рис. 2. Динамика содержания свободно гемоглобина в эритроцитах крови, консервированной на консерванте ЦОЛИПК № 76 (пунктирная линия) и ЦОЛИПК № 76 в сочетании с ИАПФ (сплошная линия) [4]

При хранении донорской консервированной крови только на консервирующем растворе в эритроцитах начиная с 3-го дня происходит резкое снижение концентрации 2,3-ДФГ, которая к 7-му дню хранения достигает половины или менее исходного количества (рис. 4).

Полученные данные соответствуют результатам, полученным многими авторами при изучении донорской крови, консервированной на растворах АСД и СРD, принятых за рубежом (Dawson и соавт.; Beutler). Как показано на рис. 4, в исследованиях при добавлении к ЦОЛИПК № 76 метаболитов наблюдается значительное повышение концентрации 2,3-ДФГ, которая даже на 21–26-е сутки хранения была выше, чем в крови, консервированной только на одном растворе.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что примененный консервирующий раствор, содержащий вещества – стимуляторы гликолиза, обеспечивает поддержание высокого уровня основных

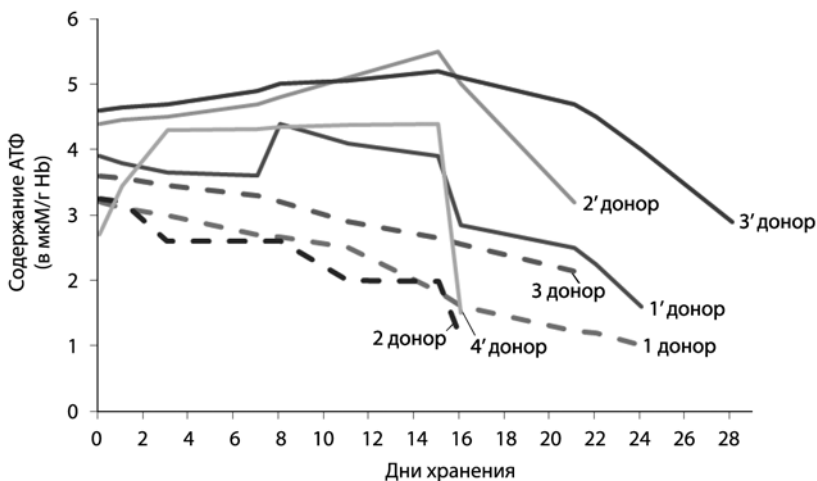


Рис. 3. Динамика содержания АТФ в эритроцитах крови, консервированной на консерванте ЦОЛИПК №76 (пунктирная линия) и ЦОЛИПК №76 в сочетании с ИАПФ (сплошная линия) [4]

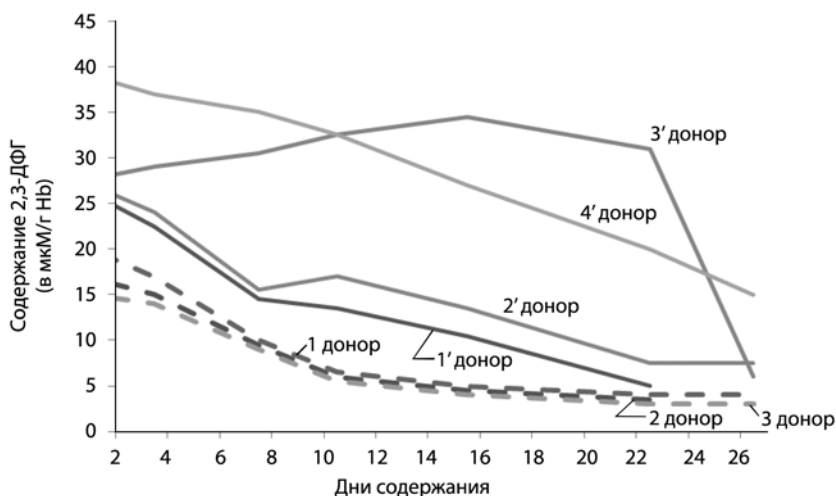


Рис. 4. Динамика содержания 2,3-ДФГ в эритроцитах крови, консервированной на консерванте ЦОЛИПК №76 (пунктирная линия) и ЦОЛИПК №76 в сочетании с ИАПФ (сплошная линия) [4]

фосфатных компонентов гликолиза, ответственных за сохранение кислород-транспортной функции эритроцитов. Это является большим преимуществом данного раствора перед другими.

Одновременно с изучением этих показателей определяли кислородно-диссоциационные кривые цельной крови в разные сроки ее гипотермического хранения для определения показателя P_{50} – показателя, отражающего способность крови снабжать ткани кислородом.

Начальное значение P_{50} донорской крови, консервированной на растворе ЦОЛИПК № 76, было меньше, чем аналогичный показатель свежезаготовленной крови на гепарине (24–26 мм рт.ст.). С увеличением срока хранения крови P_{50} уменьшалось, что показано на рис. 5 и 6. Эти результаты соответствуют данным, которые были получены други-

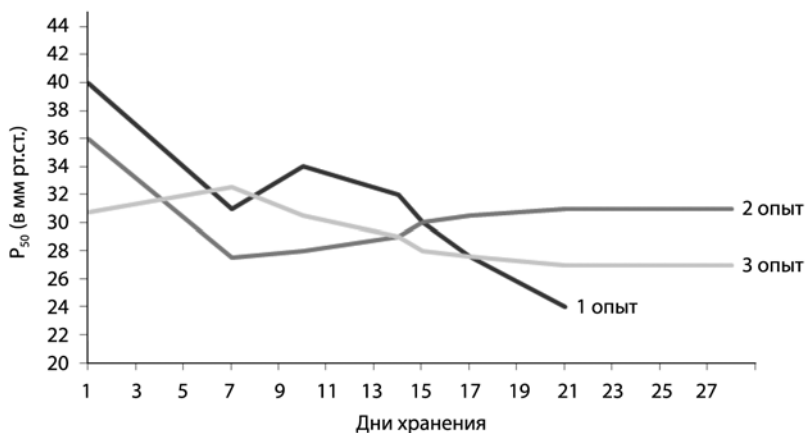


Рис. 5. Зависимость P_{50} от сроков хранения крови, заготовленной на консерванте ЦОЛИПК №76 в сочетании с ИАПФ от 3 доно́ров [4]

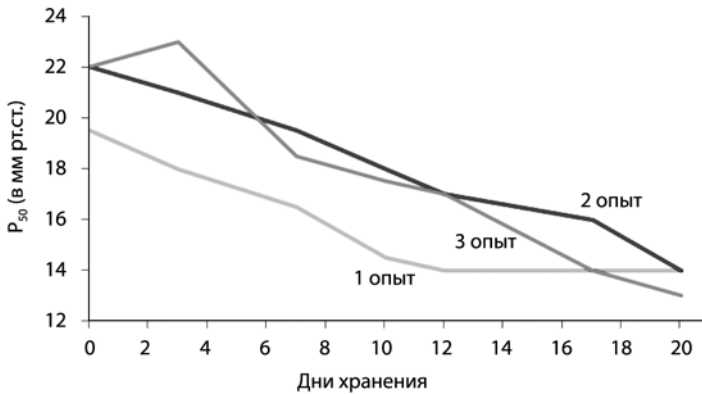


Рис. 6. Зависимость P_{50} от сроков хранения крови, заготовленной на консерванте ЦОЛИПК № 76 от тех же 3 доноров [4]

ми зарубежными авторами при исследовании донорской крови, заготовленной на консервантах ACD и CPD (Dubosi соавт.).

При применении консервирующего раствора ЦОЛИПК № 76 в сочетании с ИАПФ уже в 1-й день гипотермического хранения донорской крови отмечено резкое увеличение величины P_{50} . Полученные величины были выше P_{50} гепаринизированной крови, а также крови, заготовленной на зарубежных консервантах ACD и CPD с прибавлением только аденина и инозина (Chanutin и соавт.). С увеличением срока гипотермического хранения донорской крови значение величины P_{50} уменьшается, однако даже в последние сроки исследований (20–28 дней) оно было на уровне (или выше), соответствующем уровню свежей (1-й день хранения) гепаринизированной донорской крови.

Результаты определения исследуемых биофизических показателей представлены в табл. 1.

В 1976 г. Аграненко В.А. и Тибилова Н.Н., усовершенствовали методы С. Валери («омолаживание» эритроцитов путем инкубации их с метаболитами обмена веществ) и Виноград-Финкеля (использование ИАПФ) и разработали собственный метод получения безглюкозного восстанавливающего раствора, который был назван Эритропифаден. Он содержит следующие препараты квалификации «хч» (нетоксические метаболиты): рибоксин 24,8 ммоль/л, аденин 1,56 ммоль/л, пируват натрия 24,8 ммоль/л, двузамещенный фосфат натрия 14 ммоль/л на основе физиологического раствора хлорида натрия – 9 г/л (рН 7,76) [10].

При разработке «Эритропифадена» для эритроцитов особое внимание было уделено созданию обоснованного, эффективно влияющего на полноценность эритроцитов и перспективного с точки зрения введения в практику состава раствора.

Положительным в рецептуре данного раствора является прежде всего то, что он является безглюкозным. Количества глюкозы в гемоконсервантах (ЦГФ, Глюгидир) вполне достаточно для поддержания гликолиза в эритроцитах даже в предельные сроки хранения донорской крови. Также большое значение имеет то, что восстанавливающий раствор готовится на основе хлорида натрия, который обладает

Таблица 1

Результаты определения содержания АТФ, 2,3-ДФГ и P_{50} в донорской крови, консервированной на одном консерванте № 7, а также на консерванте в сочетании с ИАПФ в разные сроки ее хранения [4].

№ опыта	Консервирующий раствор							
	ЦОЛИПК № 76				ЦОЛИПК № 76 + ИАПФ			
	Срок хранения (дни)	АТФ (мкМ/г Hb)	2,3-ДФГ (мкМ/г Hb)	P_{50} (рН 7,4)	Срок хранения (дни)	АТФ (мкМ/г Hb)	2,3-ДФГ (мкМ/г Hb)	P_{50} (рН 7,4)
1	0	3,16	15	19,0	1	3,85	25,7	39,3
	3	2,87	11,9	17,9	7	3,67	15,4	30,5
	10	2,50	4,36	14,3	10	4,18	16,9	33,9
	16	1,64	3,57	13,5	14	4,11	12,5	31,3
	24	0,98	3,50	13,8	22	2,3	2,1	24,0
2	0	3,22	20,5	22,0	1	4,6	27,0	36,3
	3	3,10	15,5	22,4	7	4,94	14,2	27,6
	7	2,90	9,07	17,58	10	5,0	12,9	–
	10	2,62	5,0	–	21	3,14	5,05	31,0
	23	0,94	2,75	12,59	28	2,8	5,0	26,6
3	0	3,64	18,2	22,0	1	4,84	28,0	31,2
	8	3,32	9,03	17,8	7	2,80	32,0	32,4
	10	2,92	4,1	17,0	14	5,35	34,0	28,9
	16	2,5	3,5	14,1	21	4,55	30,0	26,6
					28	2,80	5,0	26,6

деагрегационными свойствами и тем самым улучшает реологические свойства эритроцитарной массы [Reiss, Katz]. Инкубация эритроцитов после предельных сроков хранения сопровождалась увеличением содержания свободного гемоглобина в супернатанте, тогда как хранение эритроцитов в одном физиологическом растворе без метаболитов недопустимо именно из-за быстрого выхода гемоглобина из красных клеток крови (Prins и соавт.).

Универсальной добавкой «омолаживающих» растворов является аденин – соединение, которое способно после проникновения в эритроцит включаться в обменные процессы и непосредственно превращаться в АТФ. Аденин реагирует с фосфорибозилпирофосфатом с образованием предшественника АТФ – АМФ, который под влиянием аденилаткиназы превращается затем в АДФ, а после, в процессе гликолиза, – в АТФ (Sugita и Simon).

Для поддержания еще одного важного соединения в клетке – 2,3-ДФГ – был использован рибоксин, который под влиянием нуклеозидфосфорилазы распадается на гипоксантин и рибозо-1-фосфат; последний входит в пентозный цикл на уровне глицеральдегидфосфата и затем в гликолитический путь через его связь с пентозным шунтом и ведет к увеличению концентрации 2,3-ДФГ (Duhm, 1973).

Применение рибоксина и пирувата в сочетании регулирует соотношение НАДН/НАД в процессе гликолиза (пируваткиназная реакция) и способствует поддержанию концентраций АТФ и 2,3-ДФГ в консервируемых эритроцитах (Warrendorf, Rubinstein).

Применение метода восстановления эритроцитов предельных сроков хранения приближает к показателям свежезаготовленной консервированной донорской крови их реологические свойства, приживаемость и морфофункциональную полноценность (Valeri).

Результаты использования этого восстанавливающего раствора к эритроцитарной массе после 21 дня хранения показал следующее:

- концентрация 2,3-ДФГ восстанавливается до 80% от исходных значений, которые наблюдают в день заготовки крови от донора;
- концентрация АТФ и величина P_{50} (парциальное напряжение кислорода, при котором уровень насыщения гемоглобина кислородом составляет 50%) восстанавливаются до 100–125%;
- возрастает приживаемость на 10–12% от нормы;
- значительно улучшаются электрокинетические свойства эритроцитов;
- реологические свойства эритроцитарной массы улучшаются, приближаясь к показателям консервированной крови 7 дней хранения;
- рН эритроцитарной массы (взвеси) возрастает с 6,68 в 21-й день хранения до 6,88 после процедуры «омолаживания»;
- количество дискоцитов (нормоцитов) возрастает с 7 до 22,5%;
- количество непреходных форм снижается с 46,0 до 21,0%.

Восстановленные таким образом клетки крови (их функциональная полноценность) после предельных сроков гипотермического хранения могут быть сохранены в течении 3–4 суток при температуре 4°C [10], затем наступает резкое снижение всех параметров эритроцитов. В связи с этим следующим вопросом стало изучение возможных путей сохранения восстановленных эритроцитов.

Несмотря на привлекательность описанных выше сред, включающих энергетические добавки, все же они обладают рядом технологических недостатков. Во-первых, это необходимость стерилизации компонентов, а во-вторых, наличие в свободном состоянии существенных количеств азотистых оснований, что может негативным образом влиять на выделительную систему [10].

Кордовая кровь является универсальным источником веществ, которые имеют огромный биологический потенциал и способны поддерживать и активировать клеточный метаболизм. Собрано большое количество экспериментальных данных (Гулевский, Моисеева, Горина и др.) о том, что низкомолекулярная фракция (до 5 кДа) кордовой крови оказывает положительное воздействие на функциональную активность лейкоцитов донорской крови после гипотермического хранения.

Инкубация лейкоцитов с этой фракцией стимулировало поглотительную и переваривающую способности нейтрофилов, т.е. реабилитировала фагоцитарные показатели после 24 ч гипотермического хранения (табл. 2).

Исследования А.К.Гулевского и А.С.Ахатовой [6,7] позволили установить, что низкомолекулярная фракция кордовой крови стимулирует транспорт глюкозы в клетки нативных и деконсервированных лейкоцитов, а также способствует восстановлению энергетического потенциала клеток. С помощью ингибиторного анализа было установлено, что низкомолекулярная фракция стимулирует активность ферментов гликолиза и гликогенолиз. Результатом активации гликолиза является увеличение аденилатного пула деконсервированных клеток, в том числе и АТФ [7].

Исследование состава низкомолекулярной фракции кордовой крови человека позволили установить, что положительное влияние

Таблица 2

Фагоцитарные показатели нейтрофилов после хранения концентрата лейкоцитов в условиях гипотермии (4°C) на протяжении 24 часов [5].

Условия эксперимента	Показатель фагоцитарной активности				
	Фаго-цитарный индекс, % (45 мин инкубации)	Фаго-цитарный индекс, % (120 мин инкубации)	Фаго-цитарное число, абс. ед. (45 мин инкубации)	Фаго-цитарное число, абс. ед. (120 мин инкубации)	Индекс завершенности фагоцитоза, абс. ед
Концентрат лейкоцитов до хранения	60,52±2,32	58,56±1,17	15,37±1,32	11,79±1,02	1,30±0,03
Концентрат лейкоцитов после гипотермического хранения	42,71±1,03	34,78±0,86	11,49±0,71	10,79±0,61	1,06±0,02

кордовой крови на энергетический метаболизм клеток, вероятнее всего, связан со сбалансированным содержанием регуляторных пептидов и гормонов (табл. 3).

На основании полученных данных было выдвинуто предположение о целесообразности включения в реабилитирующую среду для эритроцитов низкомолекулярную фракцию (до 5 кДа) кордовой крови.

Проведенные эксперименты позволили установить, что эта фракция проявляет «омолаживающее» действие в отношении к эритроцитам, что следует из сравнения морфологических изменений (табл. 4).

Исходя из полученных данных можно сделать вывод о восстановительных способностях низкомолекулярной фракции кордовой крови человека на эритроциты консервированной донорской крови, а именно число нормоцитов на 21-е сутки восстанавливаются до их количе-

Таблица 3

Состав фракции кордовой крови человека (для концентрации 2 мг/мл)

Компонент	Содержание
Эстрадиол	9,29 пг/мл
Трийодтиронин свободный	2,26 пкмоль/л
Кортизол	6,86 нмоль/л
Прогестерон	0,257 нг/мл
Кальций общий	0,21 ммоль/л
Магний	0,25 ммоль/л
Фосфор	0,20 ммоль/л
Цинк	4,23 мкмоль/л
Глюкоза	0,20 ммоль/л
Лактат	5,39 ммоль/л
Креатенин	<15,0 мкмоль/л
Хондроитинсульфаты общие	1,7 мг/л
Уроновые кислоты	9,78 мг/л
Гликопротеины	1,5 мг/л
Суммарные ГАГ	0,008 Ед

Таблица 4

Результаты морфологических изменений эритроцитов с низкомолекулярной (до 5 кДа) фракцией кордовой крови человека и без, в предельные сроки гипотермического хранения

Сутки Донор	Форма	1-е			7-е		14-е		21-е	
		к	к	[0,6]	к	[0,6]	к	[0,6]	к	[0,6]
1-й	Нормоциты	78,2	19,2	43	11,66	31,66	7,75	25,3		
	Эхиноциты	14,3	63	44,68	72	59	75,5	62,66		
	Сфероциты	-	5,33	3,66	10,33	5,33	6,25	4,66		
	Другие	7,5	12,74	8,66	6,66	5,33	11	7,33		
2-й	Нормоциты	80	17,66	41	11	32	7,66	20		
	Эхиноциты	13,33	68,66	45,66	74	54,33	70	66		
	Сфероциты	-	6,33	4,66	9,66	6	14,33	8,66		
	Другие	6,66	7,66	8,66	6	8,66	7	5,33		
3-й	Нормоциты	78	18	41	14,66	30	8,33	24,66		
	Эхиноциты	14,66	69	45,66	70,66	54,66	67,66	64,33		
	Сфероциты	-	7	3,66	10	6	16,33	9,66		
	Другие	7,33	6,66	8,33	5,33	9,33	7,66	1,33		

Примечание: Низкомолекулярную фракцию кордовой крови получают, как описано в работах [1, 8]. Содержание низкомолекулярной фракции кордовой крови человека в реабилитирующей среде 0,6 мг/мл.

ства на 7-е сутки гипотермического хранения, а число непереходных форм снижается в 2 раза по сравнению с контролем.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описанные выше данные помогают сделать вывод об определенном резерве эритроцитов, т.е. более молодые клетки способны воспринимать сигнал к восстановлению, а более старые «омолодить» уже невозможно. Таким образом, улучшить биохимические и реологические показатели восстановленных эритроцитов не удастся, и остается вопрос о поиске оптимального состава таких восстановительных растворов. Приведенные в обзоре данные указывают на перспективность дальнейших поисков рецептур реабилитирующих сред с целью восстановления морфофункциональных свойств эритроцитов консервированной донорской крови.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Abakumova O. (2009) *Vy`dilennaya ta zberigannya biologichnoakty`vnoyiny`z`komolekulyarnoyif rakciyi (do 5 kDa) z kordovoyikrovizadopomogoyuny`z`ky`x temperature [Isolation and storage of biologically active low molecular weight fraction (5 kDa) from cord blood using low temperatures].* Kharkiv: IPC&C. (in Ukrainian).
2. Agranenko V., Azovskaya S. (1986) *Lechebnajajeffektivnost' transfuzij vosstanovlennyh («omolozhennyh») jericitocitov pri anemicheskikh sostojanijah [Therapeutic efficacy of transfusion reduction ("rejuvenation") of erythrocytes in anemic conditions].* *Gematologijaitransfuziologija*, no 10, pp. 3–7.
3. Agranenko V., Suvorova I. (1985) *Novyj konservirujushhij rastvor dlja krovi s adeninom, nikotinamidom i fosfatom [The new preservative solution for blood adenine, nicotinamide and phosphate].* *Gematologija I transfuziologija*, no 2, pp. 12–18.

4. Vinograd-Finkel' F., Derviz G. (1974) *Metabolicheskaia aktivnost' i dyhatel'naja funkciia krovi, konservirovannoi na kislykh gl'ukozo-citratnykh rastvorakh i puti usovershenstvovaniia jetih rastvorov* [Metabolic activity and respiratory function of blood preserved in acid citrate-glucose solutions and ways to improve these solutions]. *Problemy gematologii i perelivaniia krovi*, no 7, pp. 3–9.
5. Gorina O. (2011) *Reabilitacija kriokonservirovannykh lejkocitov v srede, sodержashhej nizkomolekuljarnuju frakciju kordovoi krovi* [Rehabilitation of leucocytes cryopreserved in medium containing the low molecular weight fraction of cord blood]. Kharkiv: IPC&C. (in Russian).
6. Gulevskiy A., Akhatova Yu. (2014) *Stimulirujushhee dejstvie nizkomolekuljarnoi frakcii kordovoi krovi na jenergeticheskij obmen v lejkocitah* [The stimulating effect of low molecular weight fraction of cord blood for energy metabolism in leukocytes]. *Dopovidi NAN Ukrayiny*, no 7, pp. 152–157.
7. Gulevskiy O., Moiseeva N. (2014) *Vplyv nyz'komolekuljarnoi frakcii z kordovoi krovi (do 5 kDa) na funkcional'ni ta bioximichni pokaznyky klityn u doslidax in vitro* [Effect of the low molecular weight fraction with cord blood (5 kDa) on functional and biochemical parameters in cell experiments in vitro]. *Ukrayins'kyj bioximichnyj zhurnal*, no 6, pp. 167–174.
8. Pat. UA 69652, A 61 K 35/14. *Sposib otrymannya nyz'komolekuljarnoi frakcii iz kordovoi krovi velykoyirogatoiyudoby* [A process for preparing low molecular weight fraction from cattle cord blood] O. Gulevskiy, N. Moisyeyeva, O. Abakumova, I. Shhenyavskiy, A. Nikolchenko, O. Gorina, applicant IPC&C, № u 201112006; stated 12.10.2011, published 10.05.2012.
9. Pat. DE 4002693 (A1), A 61 K 35/18. *Regeneration of stored erythrocyte concentrates – with soln. contg. inosine, pyruvate, phosphate, sodium chloride and sodium hydroxide* / Giese Ralf, Strauss Dorothea, Braeutigam Ralf-Peter, applicant Braeutigam Ralf-Peter; DE19904002693 19900126, stated 11.10.89, published 11.07.1991.
10. Rummyantsev A., Agranenko V. (1997) *Klinicheskaja transfuziologija* [Clinical Transfusiology]. Moscow: GJeOTAR MEDICINA. (in Russian).
11. Tibilova N., Golubeva V. (1983) *Biohimicheskie mehanizmy vosstanovleniya (omolazhivaniya) eritrocitov* [Biochemical mechanisms of restoration (rejuvenation) of red blood cells]. *Gematologija i transfuziologija*, no 1, pp. 18–21.