

15. Versprille A., Jansen J. R. C. Mean systemic filling pressure as a characteristic pressure for venous return // *Pflugers Arch.*—1985.—405, N 2.—P. 226—233.
16. Yoshimura M., Kobayashi T., Kusama S. et al. Thromboxane synthetase inhibition and pulmonary response to hypoxia in conscious adult sheep // *Jap. Circulat. J.*—1988.—52, N 1.—P. 66—71.
17. Zweier Y. L., Flaherty J. T., Weisfeldt M. L. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1987.—84, N 7.—P. 1404—1407.

Ин-т физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Материал поступил в редакцию 19.08.88

УДК 612.111.014.462.5—08

А. Л. Белкин, К. А. Пендрак, М. С. Повжиткова,
С. В. Петренко, Я. Ф. Ковалишин, Т. А. Цисаренко,
П. В. Осадчий, О. А. Савицкая, Т. Н. Олейник

Влияние эритропифадена на морфофункциональные характеристики длительно хранимой донорской крови

Одним из весьма перспективных подходов к решению задачи длительного хранения консервированной крови и ее компонентов является применение метаболитических добавок (аденина, инозина, гуанозина и др.), позволяющих восстанавливать функциональную полноценность эритроцитов [1—3, 5, 7, 8]. Указанные вещества используют либо в составе консерванта, либо в виде растворов, добавляемых в кровь непосредственно перед ее трансфузией [4, 6, 8]. Во Всесоюзном гематологическом научном центре МЗ СССР теоретически разработан и создан препарат эритропифаден, содержащий метаболиты углеводно-фосфорного обмена — аденин, рибоксин, пируват и фосфат натрия. Добавление этого препарата позволяет нормализовать энергообеспеченность и кислородтранспортную функцию, улучшить форму и строение эритроцитов и существенно повысить посттрансфузионную приживаемость эритроцитов консервированной донорской крови 21—28 сут хранения [4, 4а]. Цель нашей работы — изучение возможности использования эритропифадена для восстановления функциональной полноценности эритроцитов консервированной донорской крови более поздних (до 49 сут) сроков хранения.

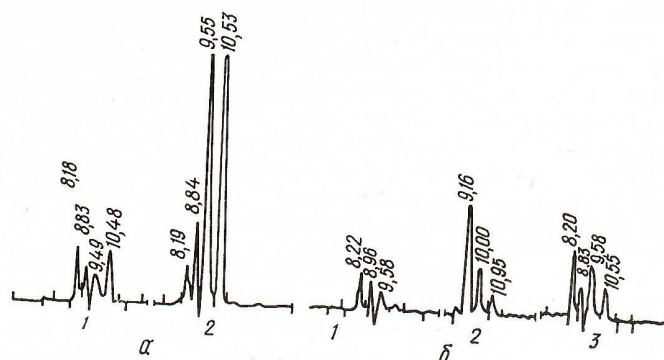
Методика

Кровь от 10 доноров заготавливали на консерванте (цитроглюкофосфате), содержащем 0,5 ммоль/л аденина, в стеклянные флаконы вместимостью 50 мл (по 4 флакона от каждого донора). На 35, 42 и 49-е сутки хранения в кровь добавляли эритропифаден в соотношении 3:1 и инкубировали при температуре 37 °C в течение 2 ч (кровь 49 сут хранения инкубировали в течение 4 ч).

В крови 1 сут хранения и во всех пробах крови до и после инкубации с препаратом определяли концентрацию АТФ, 2,3-ДФГ, лактата, пирувата с помощью ферментативных методов (наборы реактивов фирмы «Beringer», ФРГ) и калия, натрия с помощью метода пламенной фотометрии, осмотическую резистентность эритроцитов по степени гемолиза при различных концентрациях хлорида натрия, форму и строение эритроцитов с помощью метода нативной капли (микроскоп фирмы «Amplival», ГДР; ув. 40×10), деформабильность эритроцитов по скорости фильтрации через ядерные фильтры диаметром пор 5 мкм, концентрацию аденина, рибоксина и веществ среднемолекулярной массы, содержащихся в ультрафильтрате, полученном при пропускании плазмы крови через мембрану (фирма «Sartorius», ФРГ), диапазон пропускания которой до 20 кД, с помощью метода жидкостной хроматографии (аппарат фирмы «Waters», США) с использованием колонки Protein Pak i-60.

Результаты и их обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что по мере хранения крови концентрация АТФ снижается от $(1,2 \pm 0,14)$ до $(0,64 \pm 0,09)$ ммоль/л (или на 47 %) к 49-м суткам. Судя по результатам хроматографического анализа (рисунок, а), это связано с практически полной утилизацией входящего в состав консерванта аденина. Концентрация 2,3-ДФГ снижается от $(3,33 \pm 0,79)$ до $(0,06 \pm 0,013)$ ммоль/л



Изменение концентрации аденина и рибоксина (а) после инкубации консервированной донорской крови 42 сут хранения с эритропифадемом (1 — исходная концентрация на 42-е сутки хранения, 2 — после инкубации) и веществ среднемoleкулярной массы (б) при хранении консервированной донорской крови (1 — 10-е, 2 — 35-е, 3 — 42-е сутки хранения).

(или на 98 %) к 49-м суткам хранения. Инкубация крови с эритропифадемом приводит к нормализации концентрации АТФ в расчете на 1 л эритроцитов (к 35-м суткам — до $2,44 \pm 0,17$; к 42-м — до $2,94 \pm 0,07$ и к 49-м — до $2,87 \text{ ммоль/л} \pm 0,09 \text{ ммоль/л}$) и 2,3-ДФГ (до $3,89 \pm 0,41$; $5,42 \pm 0,44$ и $4,25 \text{ ммоль/л} \pm 0,58 \text{ ммоль/л}$ соответственно). Тот факт, что нет четкой зависимости между повышением концентрации АТФ и 2,3-ДФГ и сроком хранения крови можно объяснить, по-видимому, различной утилизацией введенных с препаратом аденина и рибоксина. Так, после инкубации крови 35 сут хранения утилизировалось $(0,082 \pm 0,025)$ ммоль/л аденина и $(1,15 \pm 0,33)$ ммоль/л рибоксина; после инкубации крови 42 сут хранения — $(0,12 \pm 0,023)$ и $(1,96 \pm 0,25)$ ммоль/л соответственно; после инкубации крови 49 сут хранения — $(0,18 \pm 0,018)$ и $(2,32 \pm 0,32)$ ммоль/л соответственно (см. рисунок). Следует отметить, что, несмотря на увеличение в 2 раза времени инкубации кро-

Изменение морфологических характеристик эритроцитов консервированной донорской крови

Показатель	Срок хранения		
	1-е	35-е сутки	
		До инкубации	После инкубации
Индекс осмотической резистентности эритроцитов (концентрация NaCl), %	$1,48 \pm 0,01$	$1,86 \pm 0,04^*$	$1,65 \pm 0,06^*$
Деформабильность эритроцитов, с	$11,3 \pm 0,89$	$21,6 \pm 2,6^*$	$18,9 \pm 2,4$
Относительное количество клеток крови, %			
нормоцитов	$94,7 \pm 5,42$	$14,8 \pm 3,4^*$	$30,1 \pm 4,4^{**}$
эхиноцитов 2—3-го порядка	$2,8 \pm 0,36$	$20,3 \pm 3,9^*$	$25,3 \pm 1,0$
сфероэхиноцитов 1-го порядка	$0,3 \pm 0,07$	$31,6 \pm 4,8^*$	$9,6 \pm 2,1^{**}$
сфероцитов	0	$26,5 \pm 6,4^*$	$23,3 \pm 6,2$
Концентрация свободного гемоглобина, г/л	$0,03 \pm 0,003$	$0,74 \pm 0,08^*$	$0,49 \pm 0,07^{**}$

* Различия достоверны по сравнению со значениями показателей, полученными к 1-м суткам до инкубации.

ви 49 сут хранения, утилизация аденина и рибоксина повысилась, по сравнению с таковой для крови 42 сут хранения, незначительно.

Приведенные результаты наряду с отмеченным повышением после инкубации утилизации пирувата (в среднем на 12 %) и увеличением концентрации лактата (на 27—30 %) свидетельствуют об относительной сохранности ферментных систем, обеспечивающих жизнеспособность эритроцитов.

При инкубации крови с эритропифадемом параллельно с синтезом АТФ осуществляется его утилизация, направленная в основном на улучшение свойств клеточной мембраны. Так, повышение осмотической резистентности эритроцитов на 11—16 % свидетельствует о частичном восстановлении соотношения поверхности и объема эритроцита, а уменьшение времени фильтрации (т. е. повышение деформальности) эритроцитов на 13—20,7 % — о повышении эластичности мембраны (таблица).

Положительные сдвиги после инкубации отмечаются в форме и строении эритроцитов. К 35-м суткам хранения основную массу клеток крови составляли эритроциты необратимых форм (сфероэхиноциты и сфероциты) и лишь незначительное их число оставалось в форме дискоцитов и эхиноцитов 1-го порядка. Последующая неделя хранения практически не повлияла на морфологический состав эритроцитов, однако, к 49-м суткам отмечено резкое снижение числа дискоидных форм за счет их трансформации в эхиноциты 2—3-го порядка и сфероэхиноциты 1-го порядка. В то же время число сфероцитов значительно уменьшилось, что, вероятно, связано с их разрушением, вследствие чего и возрастает к 49-м суткам гемолиз.

При инкубации крови с эритропифадемом увеличилось число дискоидных форм. Относительное (%) содержание эхиноцитов 2—3-го порядка при этом существенно не изменилось. Вполне вероятно, что реверсия эхиноцитов в дискоциты при инкубации уравнивалась реверсией сфероэхиноцитов 1-го порядка в эхиноциты 2—3-го порядка, в связи с чем число сфероэхиноцитов 1-го порядка резко снизилось. Следует отметить, что наиболее существенное увеличение числа дискоцитов и уменьшение числа сфероцитов наблюдались после инкубации крови 42 и, особенно, 49 сут хранения. Уменьшение после инкубации числа необратимых форм эритроцитов (при равном уменьшении их общего числа на 20—30 %) совпадает с увеличением концентрации свободного гемоглобина. Как видно из таблицы, степень гемолиза после инкубации крови с препаратом даже на 49-е сутки хранения соответствует его степени в крови длительных сроков хранения и не превышает допустимых значений. Тем не менее, с учетом разведения крови эритропифаде-

различных сроков хранения под влиянием эритропифадена

донорской крови			
42-е сутки		49-е сутки	
До инкубации	После инкубации	До инкубации	После инкубации
1,94±0,02*	1,63±0,04**	1,89±0,04*	1,64±0,03**
24,8±3,57*	21,95±3,25	28,9±1,24*	22,5±1,86**
15,0±1,4*	33,9±6,7**	3,9±0,8*	47,2±5,0**
19,5±1,8*	21,1±3,1	30,3±3,6*	29,0±4,7
31,8±1,9*	7,4±1,0**	40,3±4,0*	7,9±1,7**
31,3±3,4*	14,8±3,8**	24,9±2,5*	3,1±0,5**
0,82±0,21*	0,62±0,15	1,35±0,14*	0,93±0,14**

хранения донорской крови; ** То же по сравнению со значениями показателей, полученными

ном, на 42-е и 49-е сутки все же наблюдалось определенное повышение гемоллиза — до $(0,88 \pm 0,2)$ и $(1,43 \pm 0,2)$ г/л соответственно.

Баланс электролитов, резко нарушенный при хранении крови, практически не изменялся после инкубации. Отношение K^+/Na^+ в эритроцитах колебалось от 1,09 до 1,71 (что гораздо ниже нормальных значений) и увеличивалось после инкубации максимально на 0,28. Концентрация калия в плазме после инкубации (с учетом разведения) и эритроцитах существенно не изменялась, что свидетельствует об угнетении активности K^+ , Na^+ -АТФазы факторами, не зависящими от концентрации АТФ. Вероятно, это обусловлено структурными изменениями самой мембраны и экранированием ее различными метаболитами, образующимися при хранении и адсорбирующимися на поверхности эритроцитов. Возможен также выход калия из клетки, в связи с высокой концентрацией H^+ (рН крови после инкубации повышался всего на 0,074—0,08 и не превышал $6,755 \pm 0,02$). Следует все же отметить, что даже такое незначительное количество калия является вполне достаточным для сохранения активности ферментов гликолиза (в частности, пируваткиназы), необходимых для синтеза АТФ.

Суммарная концентрация веществ среднемoleкулярной массы увеличивается к 35—42-м суткам хранения в 2 раза (рисунок) за счет фракции, время выхода которой составляло 8,83—9,91 мин, и вновь появившейся фракции, время выхода которой — 10,48—10,86 мин. При дальнейшем хранении до 49 сут в 2,5 раза увеличивается суммарная концентрация этих веществ за счет фракции, имеющей время выхода 8,18—9,07 мин, что связано, по нашему мнению, с дальнейшей деградацией белковых компонентов крови.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности нормализации с помощью эритропифадена энергообеспеченности, кислород-транспортной функции и формы строения эритроцитов консервированной донорской крови 5—7 нед хранения. Однако в крови 42—49 сут хранения чрезвычайно низкой остается осмотическая резистентность и деформабильность эритроцитов и довольно высокой — концентрация рибоксина (метаболизирующегося в организме до мочевой кислоты) и веществ среднемoleкулярной массы, обладающих мембранотропным и капилляротоксичным действием. Для устранения указанных недостатков нам представляется перспективным применение метода гемосорбции, позволяющего эффективно удалять из крови вещества низкой и средней молекулярной массы.

ERYTHROPIFADEN EFFECT ON THE MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF DONOR BLOOD STORED OVER A LONG PERIOD OF TIME

A. L. Belkin, K. A. Pendrak, M. S. Povzhitkova, S. V. Petrenko,
Ya. F. Kovalishin, T. A. Tsisarenko, P. V. Osadchy, O. A. Savitskaya,
T. N. Oleinik

Adenine- and riboxine-containing erythropifaden has been studied for possibility to be used for restoring a functional value of erythrocytes in conserved donor blood stored for 35-49 days. Energy supply and oxygen transport function of erythrocytes are shown to get normal and their morphological composition — to get considerably improved. Besides, osmotic resistance and deformability of erythrocytes insignificantly change while concentration of riboxine in blood and that of substances with average molecular mass remain considerably high. One of the ways to remove the above shortcomings is application of hemosorbents.

R. E. Kavetsky Institute for Oncology Problems,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аграненко В. А., Обишвалова Н. Н. Метод восстановления (омолаживания) консервированных эритроцитов предельных сроков хранения / Сов. мед. — 1976. — № 8. — С. 66—69.