

На правах рукописи

**МАКЕДОНСКАЯ ОЛЬГА ГЕННАДЬЕВНА**

**ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ 3-ОКСИПИРИДИНА  
СУКЦИНАТА И ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ АЭРОИОНОВ КИСЛОРОДА  
ДЛЯ КОНСЕРВИРОВАНИЯ КРОВИ И ЭРИТРОЦИТНОЙ МАССЫ**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Саранск, 2015

Работа выполнена на кафедре поликлинической терапии и функциональной диагностики и кафедре госпитальной хирургии ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» Министерства образования и науки РФ, г. Саранск

**Научный руководитель:**

**Бякин Сергей Петрович**, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры госпитальной хирургии ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» Министерства образования и науки РФ, г. Саранск

**Официальные оппоненты:**

**Ловцова Любовь Валерьевна**, доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой общей и клинической фармакологии ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Нижний Новгород

**Рагимов Алигейдар Агаалекпер оглы**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической трансфузиологии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, г. Москва

**Ведущая организация:**

ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Казань

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 года в «\_\_\_» часов на заседании диссертационного совета Д 212.117.08 при ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» (430000 г. Саранск, ул. Большевикская, 68).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» (430000 г. Саранск, ул. Большевикская, 68), с авторефератом — на официальном сайте Министерства образования и науки РФ.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 года

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат медицинских наук доцент

А.Г. Голубев

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Проблема недостатка донорской крови и ее компонентов является не только медицинской, но и в большей степени социальной. Обусловлено это, с одной стороны, отсутствием существенного роста количества доноров в течение последних лет, с другой, ростом числа инфекционных заболеваний (СПИД, гепатиты, сифилис), что приводит к увеличению брака крови, затрат на лабораторную диагностику и повышает удельную стоимость дозы крови (Савченко В.Г. и соавт., 2006; Зингерман Б.В., Городецкий В.М., 2010; Донсков С.И. и соавт., 2010).

Решением проблемы недостатка донорской крови может стать внедрение методов, увеличивающих длительность хранения компонентов крови, особенно эритроцитов, как наиболее востребованных клеточных компонентов крови (Ташаев Ш.С. и соавт., 2004; Жибурт Е.Б., 2002). Пролонгированию предельной продолжительности хранения донорских эритроцитов способствует сохранение их в более молодом и функционально полноценном состоянии, что приводит к увеличению срока хранения эритроцитарной массы, сокращению объемов её заготовки и уменьшению брака, что позволяет более рационально использовать донорские ресурсы (Тибилова Н.Н., 1991; Козинец Г.И. и соавт., 2012).

По мере развития фундаментальных представлений о биохимии и физиологии клеток крови, возникает необходимость совершенствования методов гемоконсервирования, так как в процессе хранения донорской крови и ее компонентов происходит постепенное снижение жизнеспособности, биохимической и морфо-функциональной полноценности эритроцитов (Agranenko V.A., Tibilova N.N., 1991). Изменения структурно-функциональной организации клеточных мембран и повреждение функций мембраносвязанных ферментов при хранении компонентов донорской крови, а также избыточное образование свободных радикалов неизбежно приводит к ускоренному старению клеток, в значительной степени за счет активации процессов перекисного окисления липидов и накопления свободных радикалов на фоне угнетения антиоксидантной защиты (Владимиров Ю.А., 2002; Greagh T.A. et al., 1993). В связи с этим проблема предупреждения и коррекции изменений в гемотрансфузионных средах на этапе хранения весьма актуальна.

Многочисленные исследования показали, что в качестве потенциальных цитопротекторных фармагентов при воздействии на организм различных повреждающих факторов могут выступать соединения и лекарственные препараты с антиоксидантным типом действия (Чечет И.В. и соавт., 2007; Frei B., 1994), одним из которых является 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридина сукцинат, оказывающий ингибирующее влияние на ферментативное и неферментативное перекисное окисление липидов и проявляющий мембранопротекторное, антиангинальное, кардиопротекторное, дезагрегантное, антиаритмическое, нейротропное, противоишемическое и липидрегулирующее действие и поддерживающий активность аэробного гликолиза при гипоксии (Девяткина Т.А. и соавт., 1993; Зорькина А.В. и соавт., 1998; Власов А.П. и соавт., 2004 и др.).

В то же время, цитопротекцию могут оказывать опосредованные физико-химические воздействия (Ташаев Ш.С. и соавт., 2004; Козинец Г.И. и соавт., 2012). К таковым можно отнести озон, биологический эффект которого реализуется посредством его влияния на клеточные мембраны путем нормализации редокспотенциала тканей, как при непосредственном воздействии на организм в виде озонированного физиологического раствора, так и путем влияния отрицательными аэроионами кислорода, которые нормализуют агрегатное состояние крови, оказывают антигипоксическое и дезинтоксикационное действие, усиливают образование макроэргов в клетках, снижают активацию процессов ПОЛ и увеличивают антиоксидантные свойства тканей предупреждают метаболические нарушения в условиях гиподинамии и гипоксии (Скипетров В.П., Мартынова В.В., 1995; Инчина В.И. и соавт., 1996; Мельников В.М., 1997; Кондрашова М.Н., 1999; Власов А.П., 2004 и др.).

Свойства веществ антиоксидантного типа и антиоксидантные влияния различных физико-химических воздействий можно использовать для гемопротекции. Все гемоконсерванты имеют в своем составе лишь антикоагулянты и вещества питающие клетку, дающие ей энергию, т.е. клеточные нутрицевтики: глюкозу, фосфаты, аденин и др. (Аграненко В.А., 1982; Козинец Г.И. и соавт., 1990; Жибурт Е.Б. и соавт., 2005), что является, безусловно, необходимым, но далеко недостаточным условием полноценной гемопротекции. Гемоконсервантов с включением в их состав антиоксидантов до сих пор не создано.

Работ о роли антиоксидантов в процессе хранения крови мы не обнаружили. Известна работа J.D. Sweeney et al. (2001), которые установили, что L-карнитин, добавленный в гемоконсервант в концентрации 15 ммоль/л вызывает значительное уменьшение гемолиза крови при хранении. L-карнитин является препаратом с доказанным анаболическим типом действия, его антиоксидантные свойства дискутируются (Копелевич В. М., 2005; Коровина Н.А. и соавт., 2008; Олейник С.А. и соавт, 2008; Seim H. et al., 2001; Malaguarnera M. et al., 2007). Таким образом, настала настоятельная необходимость изучения вопроса о роли антиоксидантов при консервации и хранении донорских сред.

Работа является разделом комплексной программы исследований ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» «Фармакологическая коррекция повреждений, возникающих при гипоксических, токсических и радиационных воздействиях». Номер государственной регистрации темы 01200004103.

**Цель и задачи исследования.** Целью работы стало изучение влияния производного оксипиридина сукцината 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридина сукцината (3-ОПС) с антиоксидантным типом фармацевтического воздействия, включенного в состав гемоконсерванта глюгицир, и отрицательных аэроионов кислорода (ОАИК) на перекисное окисление липидов, антиоксидантную активность, свойства мембран и морфометрические характеристики эритроцитов, показатели качества консервированной крови и эритроцитарной массы в процессе их хранения до 30 суток.

В ходе выполнения работы решались следующие задачи:

1. Изучить динамику интенсивности свободнорадикального окисления и активность антиоксидантной системы плазмы и эритроцитов в консервированной крови и эритроцитной массе, заготовленных на гемоконсерванте глюгицир с введением его состав 3-ОПС в концентрациях 0,25 г/л, 0,5 г/л и 1,0 г/л, в процессе их хранения.

2. Исследовать в процессе хранения функциональные свойства мембран эритроцитов и их морфометрические характеристики в консервированной крови и эритроцитной массе, заготовленных на гемоконсерванте глюгицир с введением в его состав 3-ОПС в концентрациях 0,25 г/л, 0,5 г/л и 1,0 г/л.

3. Оценить показатели качества консервированной крови и эритроцитной массы, заготовленных на гемоконсерванте глюгицир с 3-ОПС в концентрациях 0,25 г/л, 0,5 г/л и 1,0 г/л.

4. Определить наилучшие гемопротекторные свойства при хранении консервированной крови и эритроцитной массы, заготовленных на глюгицире с введением в него 3-ОПС в различных концентрациях и выявить его оптимальную концентрацию в гемоконсерванте.

5. Изучить воздействие отрицательных аэроионов кислорода на динамику свободнорадикального окисления, антиоксидантную активность, сорбционную способность и проницаемость мембран эритроцитов, а также на качественные показатели консервированной на гемоконсерванте глюгицир донорской крови и эритроцитной массы в процессе их хранения.

6. Дать сравнительную оценку гемопротекторного влияния 3-ОПС и ОАИК в консервированной крови и эритроцитной массе в процессе хранения.

**Научная новизна работы.** В результате проведенных исследований впервые:

1. Обнаружено, что по мере увеличения сроков хранения донорской крови и эритроцитной массы, заготовленных на гемоконсерванте глюгицир, активируется перекисного окисления липидов на фоне снижения антиоксидантной защиты, что приводит к нарушению морфо-функциональной полноценности мембран эритроцитов, усилению гемолиза, и увеличению числа микросгустков в гемотрансфузионной среде.

2. Показано, что применение 3-ОПС в составе гемоконсерванта глюгицир в значительной степени ограничивает интенсивность перекисного окисления липидов в донорской крови и эритроцитной массе за счет эффективной антиоксидантной защиты, что приводит к улучшению свойств мембран эритроцитов, уменьшению числа эритроцитов в состоянии анизоцитоза, уменьшению гемолиза и числа микросгустков, повышению осморезистентности эритроцитов вплоть до 30-х суток хранения и свидетельствует о выраженном его гемопротекторном эффекте.

3. Выявлено, что оптимальной концентрацией 3-ОПС в гемоконсерванте глюгицир, необходимой для развития максимального гемопротекторного эффекта, является концентрация от 0,25 мг/мл гемоконсерванта, в то время как более высокие концентрации не только менее эффективны, но и экономически нецелесообразны.

4. Установлено, что гемопротекторные свойства барботажной аэроионизации минимальны и значительно уступают соответствующим 3-ОПС.

### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

1. Разработан новый метод консервирования донорской крови и эритроцитной массы для пролонгирования жизнеспособности эритроцитов на основе введения в гемоконсервант глюгицир антиоксиданта 3-ОПС.

2. Получены данные, которые можно использовать для дальнейшего изучения адаптационных возможностей консервированных эритроцитов и способствовать разработке новых методов коррекции биохимических и морфологических изменений, возникающих в процессе их хранения.

3. Расширены представления о спектре действия 3-ОПС, которые являются научным обоснованием целесообразности использования этого вещества и иных веществ с антиоксидантным типом действия в качестве компонентов гемоконсервирующих растворов.

4. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что в состав гемоконсервантов, наряду с антикоагулянтами (цитрат натрия) и клеточными нутрицевтиками (глюкоза, аденин, фосфаты), должны входить еще и антиоксиданты.

5. Предложен и опробован новый метод хранения консервированной крови и эритроцитной массы с использованием воздействия отрицательных аэроионов кислорода путем барботажной аэроионизации.

### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Введение 3-ОПС в состав консервирующего раствора для цельной крови и эритроцитной массы способствует снижению активности процессов перекисного окисления липидов и поддержанию антиоксидантной защиты консервированных эритроцитов, что в значительной степени улучшает как их качество (улучшает свойства мембран эритроцитов, уменьшает интенсивность анизоцитоза, тормозит увеличение объема эритроцита), так и качество среды в целом (снижает интенсивность гемолиза, уменьшает число микросгустков, повышает осморезистентность эритроцитов) вплоть до 30-х суток хранения.

2. Для гемопротекторных целей наиболее эффективно и экономически целесообразно использовать 3-ОПС в концентрации 0,25 г/л гемоконсерванта, в то время как применение более высоких его концентраций (0,5 г/л и 1,0 г/л) менее эффективно.

3. Отрицательные аэроионы кислорода не позволяют пролонгировать жизнеспособность консервированных эритроцитов, при этом эффективность их гемопротекции мала и значительно уступает 3-ОПС при длительном хранении консервированной крови и эритроцитной массы.

**Реализация результатов исследования и внедрение в практику.** Предложены новый метод консервирования донорской крови и эритроцитной массы с использованием 3-ОПС в составе гемоконсерванта глюгицир и метод барботажной аэроионизации крови и эритроцитной массы. Первый из которых поз-

воляет пролонгировать сроки хранения трансфузионных сред, второй может использоваться как метод экстракорпоральной гемокоррекции. Разработано устройство «барботажный аэроионизатор крови».

По результатам работы получен патент РФ за изобретение «Способ консервирования донорской крови» и 2 удостоверения на рационализаторские предложения. За цикл исследований по применению антиоксидантов в качестве гемопротекторов в 2012 году присуждена Премия Правительства Республики Мордовия по итогам VIII Республиканского конкурса «Инженер года Республики Мордовия» в номинации «Лучшее техническое решение, изобретение, полезная модель, рационализаторское предложение».

Результаты работы включены в лекционный курс по фармакологии и клинической фармакологии, в программу обучения врачей-интернов и ординаторов по курсу «Трансфузиология».

**Апробация работы.** Результаты работы и основные положения диссертации доложены и обсуждены на VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Озон в биологии и медицине» (Нижний Новгород, 2007), на научно-практической конференции с международным участием «Новые технологии в медицине и интенсивной терапии» (Саранск, 2010), на I региональной научно-практической конференции «Научный потенциал молодежи — будущему Мордовии» (Саранск, 2009), на научно-практической конференции «XXXVIII Огаревские чтения» (Саранск, 2010), а также на научных конференциях молодых ученых Мордовского государственного университета (Саранск, 2008–2014) и на заседаниях Мордовского республиканского общества трансфузиологов (Саранск, 2008–2014).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 13 научных статей, из которых 5 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, четырех глав: обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов исследования, а также выводов, практических рекомендаций и библиографического списка. Текст диссертации изложен на 119 страницах машинописного текста компьютерного набора, иллюстрирован 10 рисунками и 22 таблицами. Библиография включает 173 источника, в том числе 49 зарубежных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования были выбраны:

1. 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридина сукцинат (3-ОПС). В работе использовался препарат «Мексидол» производства ООО МЦ «Эллара», состав которого включает 5 % раствор 3-ОПС в ампулах по 2 мл. Мексидол был избран для изучения возможности инактивации процессов перекисного окисления ли-

пидов и коррекции антиоксидантной активности в донорской крови и эритроцитной массе при хранении, так как он сочетает в себе антиоксидантные, антигипоксические, мембранопротекторные свойства.

2. Отрицательные аэроионы кислорода (ОАИК). В работе применялись отрицательные аэроионы кислорода, получаемые электроэффлювиализацией сжатого воздуха на барботажном аэроионизаторе крови (БАИК) собственной конструкции.

Всего использовано 1400 образцов донорских сред, из которых 700 образцов консервированной крови и 700 образцов эритроцитной массы, полученных от 200 доноров резерва (мужчин – 160, женщин – 40) в возрасте от 18 до 45 лет. Средний возраст доноров составил  $32,5 \pm 3,72$  года.

В соответствии с задачами исследования были сформированы 2 контрольные и 8 опытных серий экспериментов на консервированной крови и эритроцитной массе доноров (табл. 1).

Таблица 1

## Характеристика экспериментов

№ серии	Среда	Консервант	Число доноров
1. Контроль	кровь	глюгицир	20
2. Контроль	эритроцитная масса	глюгицир	20
3. Опыт	кровь	глюгицир+3-ОПС 0,25 мг/мл	20
4. Опыт	кровь	глюгицир+3-ОПС 0,50 мг/мл	20
5. Опыт	кровь	глюгицир+3-ОПС 1,00 мг/мл	20
6. Опыт	эритроцитная масса	глюгицир+3-ОПС 0,25 мг/мл	20
7. Опыт	эритроцитная масса	глюгицир+3-ОПС 0,50 мг/мл	20
8. Опыт	эритроцитная масса	глюгицир+3-ОПС 1,00 мг/мл	20
9. Опыт	кровь	глюгицир+АИ $1,3 \times 10^5$ анион/см <sup>3</sup>	20
10. Опыт	эритроцитная масса	глюгицир+АИ $1,3 \times 10^5$ анион/см <sup>3</sup>	20

В 1-й и 2-й контрольных сериях исследовалось морфофункциональное состояние эритроцитов в процессе хранения компонентов консервированной крови и эритроцитной массы соответственно в течение 30 суток. В качестве стабилизатора был использован гемоконсервант глюгицир, содержащий в 1 литре воды натрия гидроцитрат двузамещенный 20 г, глюкозы безводной 30 г. Гемоконсервант смешивали с донорской кровью в стандартном соотношении (4:1), разделяли полученную консервированную кровь на плазму и эритроцитную массу по стандартной методике.

В 3-й, 4-й и 5-й опытных сериях проводили заготовку цельной донорской крови на гемоконсерванте глюгицир, в который добавляли 3-ОПС в концентрации 0,25 мг/мл, 0,5 мг/мл и 1,0 мг/мл соответственно с последующим хранением данных образцов консервированной крови в течение 30 суток.



В 6-ой, 7-ой и 8-ой опытных сериях изучено состояние эритроцитной массы, консервированной на гемоконсерванте глюгицир, в который был добавлен 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат в концентрации 0,25 мг/мл, 0,5 мг/мл и 1,0 мг/мл соответственно, в процессе хранения в течение 30 суток.

В 9-ой и 10-ой опытных сериях определялось влияние отрицательно заряженных аэроионов кислорода (ОАИК) на консервированные донорские эритроциты (консервант глюгицир) при проведении барботажной аэроионизации консервированной крови и эритроцитной массы соответственно с последующим хранением гемотрансфузионных сред.

Кровь от донора получали с использованием полимерных гемоконтейнеров «Гемакон-500/300» (ОАО «Синтез», Россия) с гемоконсервантом. Введение мексидола (содержит 50 мг/мл 3-ОПС) в «Гемакон 500/300», уже содержащий 100 мл глюгицира, производили стерильным шприцем в объемах 0,5 мл, 1,0 мл и 2 мл соответственно. При смешивании с глюгициром, в контейнере формировалась концентрация 3-ОПС 0,25 мг/мл, 0,5 мг/мл и 1,0 мг/мл соответственно.

Разделение консервированной крови на эритроцитную массу и плазму осуществляли не позднее первого часа после донации с помощью рефрижераторной центрифуги «Sorvall-RS-3C plus» (США) при стандартных режимах центрифугирования.

Насыщение отрицательно заряженными аэроионами кислорода образцов консервированных на глюгицире донорской крови и эритроцитной массы проводили не позднее часа после получения среды путем барботажной аэрионизации сжатым стерильным воздухом в течение 15 минут на аппарате БАИК собственной конструкции, который создавал концентрацию ОАИК на входе в гемоконтейнер  $1,3 \cdot 10^5$  анион/см<sup>3</sup> (рис. 1).

Хранение всех образцов консервированной крови и эритроцитной массы осуществляли при температуре + 4 °С в течение 30 суток. Объектом изучения в донорской крови были избраны плазма и эритроциты, в эритроцитной массе — эритроциты. Кровь на исследование брали из контейнера в условиях стерильности сразу после донации, а в образцах эритроцитной массы — сразу после разделения консервированной крови на фракции, и затем, в процессе хранения через 6 часов, 3 суток, 7 суток, 14 суток, 21 суток и 30 суток.

Влияние различных концентраций 3-ОПС и ОАИК на кровь и эритроцитную массу исследовали по 3-м группам показателей. К первой группе показателей отнесены показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной активности (уровень свободнорадикального окисления, концентрация малонового диальдегида, активность каталазы и общая антиоксидантная активность), ко второй — показатели функционального состояния мембран эритроцитов (коэффициент проницаемости мембран и сорбционная способность эритроцитов) и морфометрические показатели эритроцитов (объем эритроцита, содержание гемоглобина в эритроците, ширина распределения эритроцитов), к третьей — показатели качества эритроцитсодержащей среды (гематокрит, общее содержание эритроцитов и гемоглобина в среде, содержание свободного гемоглобина, уро-

вень гемолиза, количество микросгустков, доля осмотически неустойчивых эритроцитов).

Об интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) и уровне антиоксидантной активности (АОА) в процессе хранения консервированной крови и эритроцитной массы судили по нарастанию в плазме и эритроцитах концентрации малонового диальдегида (МДА, мкмоль/л), который определяли по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой по методике Л.И. Андреевой (1988), интенсивности свободнорадикального окисления (СРО, усл. ед.) и общей антиоксидантной активности (ОАА, усл.ед) плазмы и эритроцитов, определяемых с использованием хемилюминесцентного метода Г.Б. Афониной и В.Г. Бордонос (1990) на хемилюминометре Emilite-1105 (Латвия), совмещенным с персональным компьютером, а так же по активности каталазы плазмы и эритроцитов (КТ, мкат/л), определяемых методом М.А. Королук (1988).



Рис. 1. Схема аппарата для барботажной аэроионизации крови (эритроцитной массы) (сокр.: БАИК).

Для оценки функционального состояния мембран эритроцитов использовали коэффициент проницаемости мембран (КПМ, ед.) эритроцитов по Л.Я. Розенко и Ю.С. Сидоренко (1999) и сорбционную способность эритроцитов (ССЭ, %) по А.А. Тоганбаеву и соавт. (1988). Морфометрические показатели: среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH) в пикограммах (пг;  $1\text{ пг} = 10^{-12}\text{ г}$ ), средний объем эритроцита (MCV) в фемтолитрах (фл;  $1\text{ фл} = 10^{-15}\text{ л}$ ) и ширину распределения (анизоцитоз) эритроцитов (RDW) в процентах от общего числа эритроцитов (% CV) исследовали на гематологическом анализаторе МЕК-6410К (Япония).

Гематокрит (Ht, %), содержание гемоглобина (Hb, г/л), содержание эритроцитов ( $\times 10^{12}/л$ ) оценивали с помощью унифицированных методов. Содержание свободного гемоглобина (Hв св., г/л) определяли бензидиновым методом, долю осмотически неустойчивых эритроцитов (ОНЭ, %) по содержанию свободного гемоглобина после помещения эритроцитов в 0,6 % раствор натрия хлорида, количество микросгустков ( $\times 10^6/л$ ) путем подсчета их под микроскопом. Гемолиз (%) рассчитывали по отношению количества свободного гемоглобина к общему количеству гемоглобина.

Статистическую обработку результатов исследования проводили на персональных компьютерах с использованием программы Microsoft Excel пакета Microsoft Office. Результаты представлены в виде средней арифметической и ошибки среднего арифметического ( $M \pm m$ ).

С целью определения оптимального содержания 3-ОПС в глюгицире рассчитали корреляцию Пирсона между динамикой показателей СРО, с одной стороны, и показателями антиоксидантного статуса, физико-химических свойств мембран и морфометрических характеристик эритроцитов, а также трансфузиологическими критериями качества среды, с другой. Расчет корреляции по Пирсону произведен за весь период наблюдения (от исхода до тридцатых суток включительно) и отдельно: за ранний период хранения (до седьмых суток включительно) и за поздний период хранения (с седьмых по тридцатые сутки включительно). Корреляцию считали значимо высокой при  $|\pm 0,666| \leq r \leq |\pm 1|$ , средней значимости — при  $|\pm 0,333| < r < |\pm 0,666|$  и низкой значимости — при  $0 \leq r \leq |\pm 0,333|$ .

Для оценки достоверности различий независимых переменных между группами и достоверности различий корреляционных отношений использовали критерий Стьюдента (t) с определением величины достоверности (p). Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

Графические материалы и текст составлены с использованием программ Microsoft Power Point и Microsoft Word пакета Microsoft Office на современных персональных компьютерах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### **Влияние 3-оксипиридина сукцината и отрицательных аэроионов кислорода на перекисное окисление липидов и антиоксидантный статус консервированной крови и эритроцитной массы при их хранении.**

Причину роста неустойчивости эритроцитов, следствием которого является значительное сокращение сроков хранения крови и эритроцитной массы, многие авторы видят в резкой интенсификации свободнорадикальных процессов (Harman D., 1981). Эритроциты более других клеток контактируют с кислородом и его активными формами. Неконтролируемая генерация активных форм кислорода при недостатке компенсирующих систем приводит к окислительному стрессу (Еропкин М.Ю., 1999; Redl H. et al., 1993) и дезорганизации струк-

туры биомембран клеток крови (Ляхин Р.Е., 1999; Рябов Г.А., 2000; Halliwell В., 1996; Menger M.D. et al., 1996).

Уже к 6 часам хранения в донорской крови наблюдается рост СРО на 38 % ( $p < 0,05$ ) в плазме и на 21 % ( $p < 0,05$ ) в эритроцитах относительно исходных значений, а при хранении эритроцитной массы — только на 18 % ( $p < 0,05$ ) (рис. 2). Содержание МДА в эритроцитах в первые сутки возросло на 17 % ( $p < 0,05$ ) от исходных значений (рис. 3). В эритроцитной массе с минимальной концентрацией 3-ОПС в гемоконсерванте (0,25 мг/мл) к 6 часам хранения наблюдалось нарастание СРО относительно контроля, однако интенсивность свободнорадикального окисления в опытных образцах эритроцитной массы в последующие сроки наблюдения (после 3-х суток) была ниже, чем в контрольных образцах.

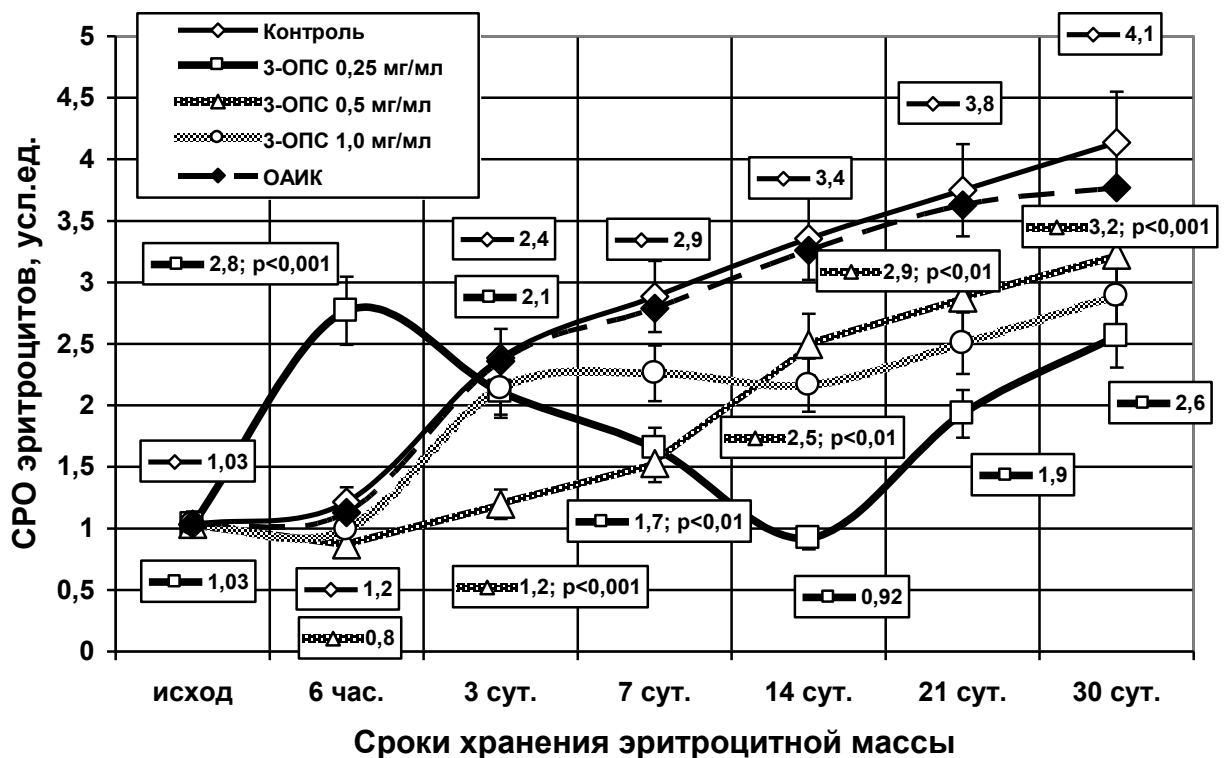


Рис. 2. Влияние сроков хранения эритроцитной массы на уровень свободнорадикального окисления (СРО).

Воздействие ОАИК позволило снизить к 6 часам хранения уровень МДА в контрольных образцах эритроцитов консервированной крови и эритроцитной массы на 13 % ( $p < 0,05$ ) и 15 % ( $p < 0,05$ ) соответственно, а к 21 суткам их хранения их уровень был на 21 % ( $p < 0,001$ ) меньше, чем в контроле (рис. 2). Снижение СРО в эритроцитах консервированной крови по сравнению с контролем наблюдалось на поздних сроках (21–30 сутки), тогда как в плазме консервированной крови меньший уровень СРО регистрировался на протяжении всего периода хранения.

По истечении 3 суток в донорской крови наблюдалась дальнейшая интенсификация СРО в плазме и в эритроцитах — рост в 2,8 раза ( $p < 0,001$ ) и в 1,3 раза ( $p < 0,001$ ) от исходного уровня соответственно. При этом концентрация

МДА возросла в плазме на 23 %, в эритроцитах — на 72 % ( $p < 0,001$ ) от исходных значений. Уровень СРО на 3 сутки в ЭМ превышал исходные значения на 131% ( $p < 0,001$ ), а МДА — на 75% ( $p < 0,001$ ) соответственно.

На фоне применения 3-ОПС на 3-и сутки хранения регистрировали снижение концентрации МДА относительно уровня в контрольных образцах, причем наиболее выражено (на 75 %;  $p < 0,001$ ) оно было в образцах с 3-ОПС в концентрации 0,5 мг/мл.

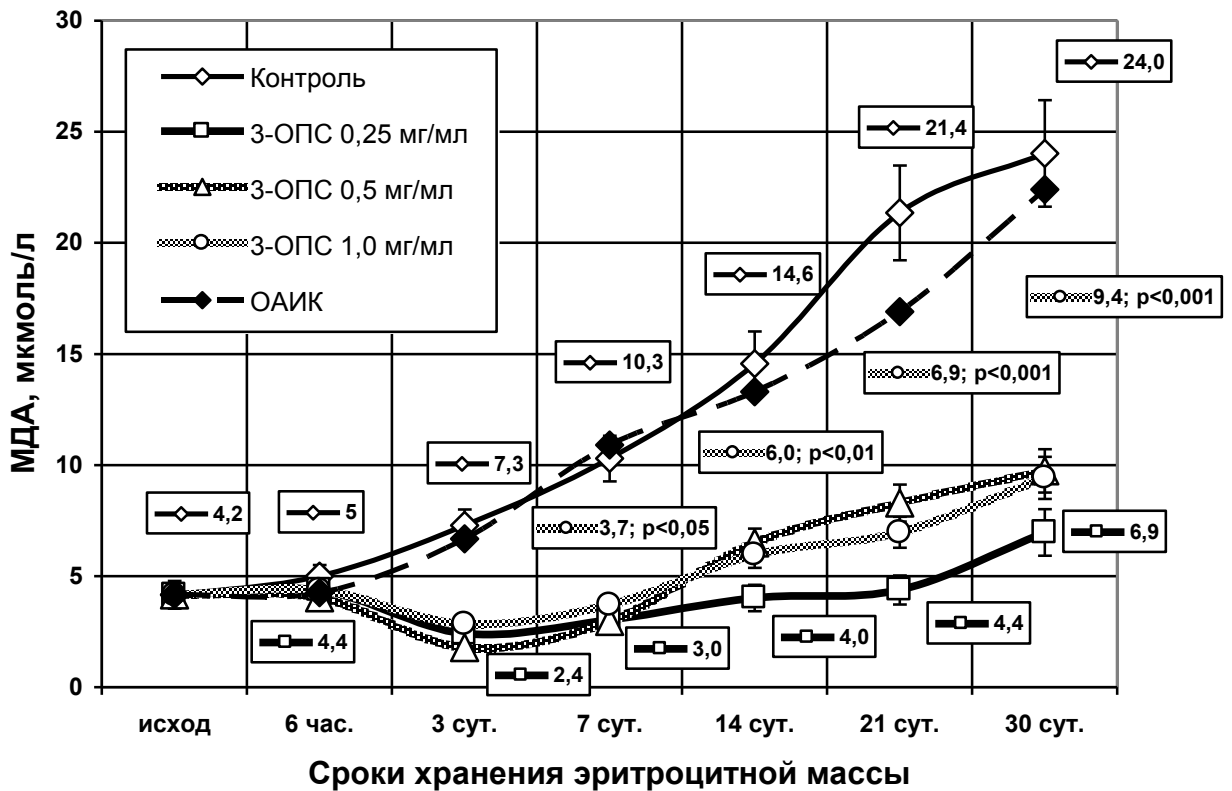


Рис. 3. Влияние сроков хранения эритроцитной массы на концентрацию малонового диальдегида (МДА).

Через 7 суток в консервированных крови и эритроцитной массе наблюдалась дальнейшая активация ПОЛ. Так, уровень МДА в плазме и эритроцитах консервированной крови возрос на 63% ( $p < 0,001$ ) и на 143% ( $p < 0,001$ ), а активность СРО в целом — в 3,9 раза ( $p < 0,001$ ) и в 1,9 раза ( $p < 0,001$ ) в плазме и эритроцитах соответственно. В образцах консервированной крови с 3-ОПС подавление процессов СРО в первую неделю хранения отмечено в сериях с концентрациями 3-ОПС 0,5 мг/мл и 1,0 мг/мл, тогда как с 14 суток антирадикальный эффект 3-ОПС более выражен в серии с концентрацией 0,25 мг/мл. Увеличение уровней МДА в эритроцитной массе в 1,5 раза ( $p < 0,001$ ) и СРО в 1,8 раза ( $p < 0,0001$ ) от исходных значений сопоставимо с изменениями данных показателей в эритроцитах консервированной крови.

На второй неделе наблюдения было выявлено дальнейшее нарастание липопероксидации, что подтверждалось увеличением уровня СРО на в 4,2 раза ( $p < 0,001$ ) в плазме и в 2,4 раза ( $p < 0,001$ ) в эритроцитах консервированной кро-

ви, а так же в 2,25 раза ( $p < 0,001$ ) в эритроцитной массе. Регистрировался рост МДА на 79% ( $p < 0,001$ ) в плазме и в 2,3 раза ( $p < 0,001$ ) в эритроцитах консервированной крови и в 2,5 раза ( $p < 0,001$ ) в эритроцитах ЭМ по сравнению с исходными значениями. Наибольшее уменьшение СРО наблюдалось при использовании именно меньшей концентрации 3-ОПС (0,25 мг/мл), где уровень СРО постепенно снижался, достигнув минимума на 14 сутки ( $1,41 \pm 0,07$  усл. ед.,  $p < 0,001$ ) и, затем, на протяжении всего срока хранения был достоверно минимальным. При продлении сроков хранения донорской крови и эритроцитной массы, заготовленной на гемоконсерванте глюципр, более 21 суток происходит многократное увеличение в плазме и эритроцитах содержания МДА. Так, к 30 суткам МДА плазмы крови возрастает в 3,8 раза ( $p < 0,001$ ), эритроцитов консервированной крови — в 4,9 раза ( $p < 0,001$ ) относительно исходных показателей. Это сопровождается значительным ростом СРО в 5,4 раза ( $p < 0,001$ ) и в 3,2 раза ( $p < 0,001$ ) от исходных данных в плазме и в эритроцитах консервированной крови соответственно.

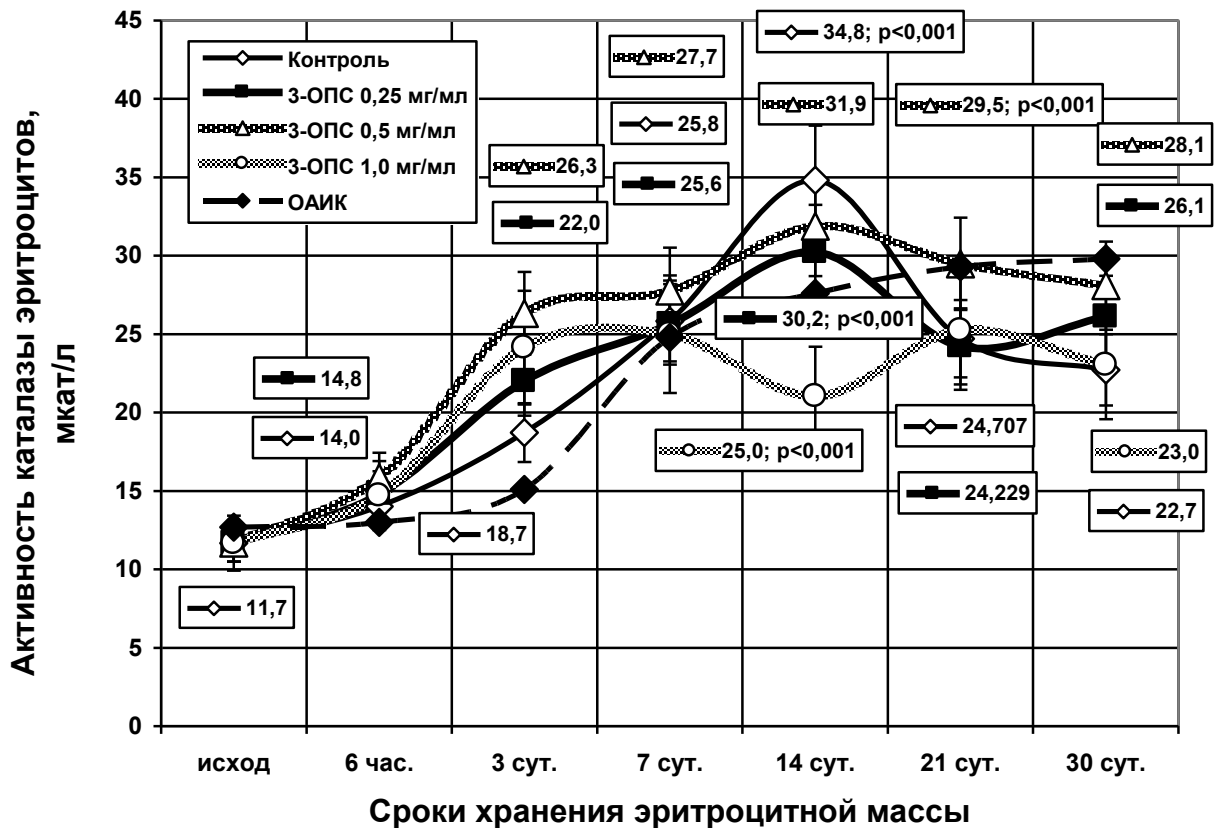


Рис. 4. Влияние сроков хранения эритроцитной массы на активность каталазы (КТ) эритроцитов.

Меньший уровень МДА по сравнению с контролем был в консервированной крови и эритроцитной массе в присутствии 3-ОПС на всем протяжении хранения. Причем концентрации 0,5 мг/мл и 1,0 мг/мл не обеспечивают достаточного предупреждения радикалообразования в отличие от меньшей концентрации 3-ОПС (0,25 мг/мл).

К концу третьих суток рост активности каталазы в плазме составил 77 % ( $p < 0,001$ ), в эритроцитах консервированной крови — 60 %, в образцах эритро-массы — 50% (рис. 4). Пик каталазной активности регистрировался в образцах к 14-м суткам хранения (рост в 1,5 раза ( $p < 0,001$ ) в плазме и в 2 раза ( $p < 0,001$ ) в эритроцитах, в 1,6 раза ( $p < 0,001$ ) в эритроцитной массе от исходных значений), что позволяет судить о нарастании образования перекиси водорода вследствие ПОЛ на протяжении первых двух недель хранения. В эритроцитах консервированной крови при добавлении 3-ОПС во всех изученных концентрациях до 3 суток хранения активность каталазы превышала контрольный уровень, а к 7–14 суткам сравнивалась с контролем.

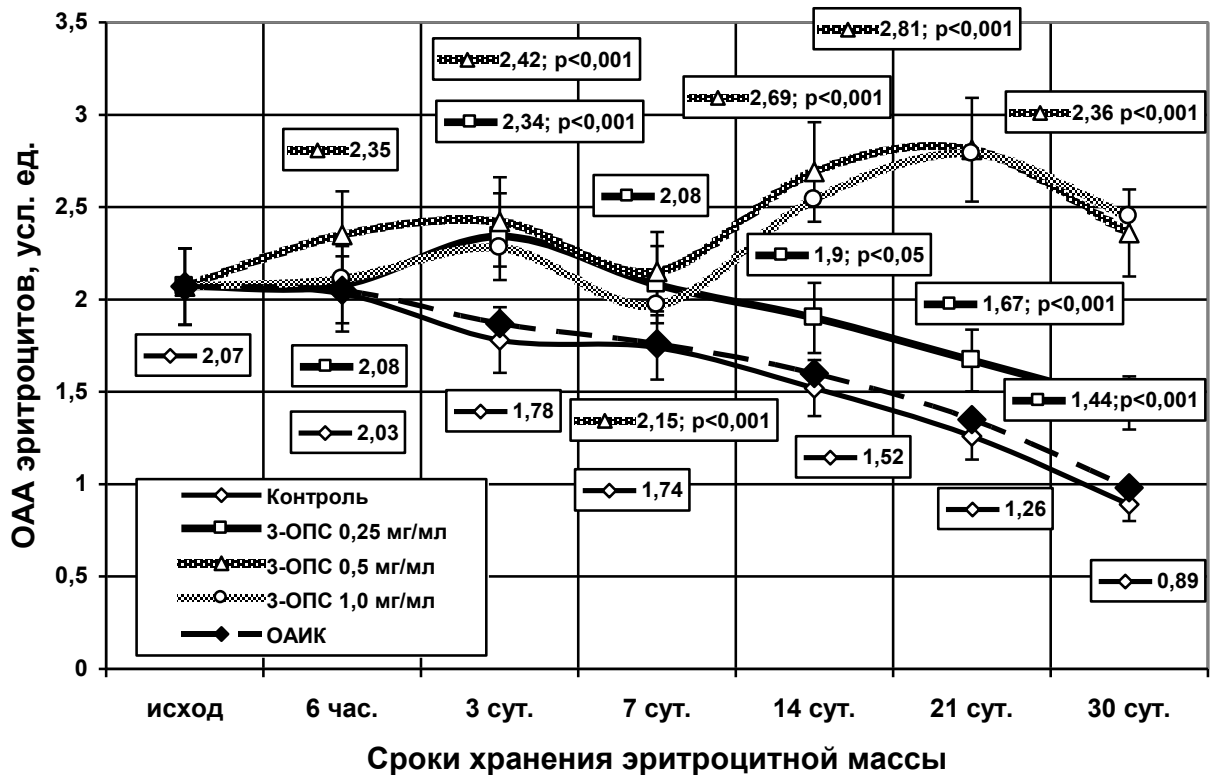


Рис. 5. Влияние сроков хранения эритроцитной массы на общую антиоксидантную активность (ОАА).

Прогрессирование ПОЛ на поздних сроках хранения, вероятно, связано с нарастающим дефицитом факторов антиоксидантной защиты. Так, в эритроцитах консервированной крови на 21 и 30 сутки хранения отмечено снижение активности каталазы на 29 % ( $p < 0,001$ ) и на 35 % ( $p < 0,001$ ), в эритроцитной массе — на 21 % ( $p < 0,001$ ) и 23 % ( $p < 0,001$ ) относительно соответствующих показателей на 14-е сутки хранения соответственно. При использовании 3-ОПС в концентрации 0,5 мг/мл на 21 и 30 сутки активность каталазы была выше контрольного уровня. В плазме крови при этом она возрастала до 3 суток, а затем стабилизировалась, в отличие от контроля, где наблюдался прогрессивный рост активности каталазы в плазме, свидетельствующий о развитии гемолиза.

В эритроцитной массе на фоне добавления 3-ОПС в гемоконсервант наблюдалась сходная динамика показателя, но к 30 суткам более высокие

уровни сохранялись при использовании 3-ОПС в концентрации 0,25 мг/мл и 0,5 мг/мл. В то же время, это свидетельствовало о том, что 3-ОПС в концентрации 0,25 мг/мл предотвращал появление большого количества перекиси водорода, в то время как в иных случаях этого не происходило.

Это подтверждается корреляционным анализом, показавшим соотношение динамик интенсивности СРО и активности КТ в эритроцитах крови и свидетельствующем о преимуществах концентрации 3-ОПС 0,25 мг/мл в консерванте на поздних сроках хранения ( $r=-0,707$ ;  $p<0,001$ ) против контроля ( $r=-0,449$ ) и концентраций 3-ОПС 0,5 мг/мл ( $r=+0,186$ ) и 1,0 мг/мл ( $r=+0,156$ ), при этом на ранних сроках корреляция была обратной.

Уровень каталазы в эритроцитах после ОАИК так же оставался стабильным, превышая контрольные данные на 3–4 неделях на 20 % ( $p<0,05$ ) в эритроцитной массе, и на 25 % ( $p<0,05$ ) — в консервированной крови.

К концу первой недели отмечено незначительное снижение ОАА, которое могло явиться следствием интенсивной активации антиоксидантов для подавления ПОЛ (рис. 5). 3-ОПС в дозах 0,5 мг/мл и 1,0 мг/мл способен активировать ОАА в течение всего периода хранения консервированной крови и эритроцитной массы, в то время как в дозе 0,25 мг/мл — эффективность антиоксидантного воздействия до 14 суток была меньше. После этого срока в образцах с концентрацией 3-ОПС в 0,25 мг/мл ОАА превышала контрольные значения, но была ниже данных других серий опытных образцов. В то же время, ОАА в консервированной крови и эритроцитной массе к 30 суткам хранения была выше, чем в контрольных образцах. При этом 3-ОПС высоких концентраций после 7 суток хранения, хотя и вызывал рост ОАА, но не снижал уровень СРО в эритроцитах.

Снижение СРО наблюдалось в эритроцитной массе и после воздействия ОАИК. При этом имело место повышение ОАА плазмы на протяжении всего срока хранения консервированной крови после воздействия ОАИК относительно контроля. В эритроцитах этот эффект был более выражен на 21-е и 30-е сутки.

Корреляционный анализ между СРО и ОАА показал, что более высокий и длительный антиоксидантный статус, крови и эритроцитной массы с высоким содержанием 3-ОПС в консерванте 0,5 мг/мл ( $r=+0,472$  и  $r=+0,534$  для крови и эритроцитной массы соответственно) и 1,0 мг/мл ( $r=+0,340$  и  $r=+0,253$  соответственно) не обеспечивал эффективной коррекции свободнорадикального окисления на поздних сроках хранения в отличие от 3-ОПС с содержанием его в глюцидере 0,25 мг/мл ( $r=-0,817$  ( $p<0,05$ ) и  $r=-0,748$  ( $p<0,05$ ) соответственно). Это свидетельствовало о бесполезности повышения концентраций 3-ОПС выше 0,25 мг/мл.

**Влияние 3-оксипиридина сукцината и отрицательных аэроионов кислорода на морфо-функциональные показатели эритроцитов и их мембран в консервированной крови и эритроцитной массе при их хранении.** О повреждении клеточных мембран при хранении крови и эритроцитной массы свидетельствует повышение ССЭ, являющейся ключевым показателем функци-



онального состояния мембран эритроцитов и отражающей их поглотительную способность. К 21 суткам хранения ССЭ увеличилась на 50 % ( $p < 0,001$ ), к 30-м — на 63 % ( $p < 0,001$ ) относительно исходного уровня. При этом наблюдали также снижение коэффициента проницаемости мембран эритроцитов консервированной крови (табл. 2). КППМ эритроцитов к 21 и 30 суткам снизился на 28 % ( $p < 0,001$ ) и 39 % ( $p < 0,001$ ) в крови и эритроmasсе соответственно относительно его значений на 14-е сутки, что объясняется дестабилизацией клеточных мембран в эти сроки. Это находит подтверждение в литературе, данные которой свидетельствуют, что накапливающиеся в избыточном количестве гидроперекиси, образующиеся в процессе ПОЛ (Синицина Н.Г., 1992; Попов А.П., 1994), обладают цитотоксическим эффектом (Жуков Н.А., 1989; Дубанский Н.В., 1991; Филлипенко П.С., 1992).

Процесс хранения эритроцитов всегда сопровождался увеличением проницаемости их клеточных мембран и ростом их сорбционной способности, что, вероятно, является следствием скрытых структурных повреждений. По мере увеличения сроков хранения гемотрансфузионной среды эритроциты теряют способность противостоять осмотическим нагрузкам. При включении в состав глюцира 3-ОПС происходит стабилизация мембранных структур клеток, что проявляется в снижении признаков гемолиза в гипоосмотической среде. В первые 6 часов хранения, число осмотически неустойчивых эритроцитов в контрольных образцах эритроmasсы превышает на 91 % ( $p < 0,001$ ), 90 % ( $p < 0,001$ ) и 87 % ( $p < 0,001$ ) их значения в с образцах с 3-ОПС в концентрациях 0,25 мг/мл, 0,5 мг/мл и 1,0 мг/мл соответственно. Аналогичные изменения прослеживаются в течение всего срока хранения консервированной крови и эритроцитной массы, что связано с повышением осмотической резистентности эритроцитов в присутствии 3-ОПС.

Отмечена стабилизация соотношения активности каталаза эритроциты/плазмы, а так же увеличение ССЭ при воздействии ОАИК, что указывает на его мембранопротекторное действие. Корреляционный анализ соотношений СРО и ОНЭ свидетельствовал о преимуществах концентрации 3-ОПС 0,25 мг/мл в консерванте ( $r = -0,192$  ( $p < 0,001$ ) и  $r = +0,812$  ( $p < 0,05$ ) на ранних и поздних сроках хранения соответственно) против контроля ( $r = +0,897$  и  $r = +0,995$  соответственно) и концентраций 3-ОПС 0,5 мг/мл ( $r = 0,951$  и  $r = +0,901$ ) и 1,0 мг/мл ( $r = +0,835$  и  $r = +0,920$ ) соответственно.

Увеличение объема и потеря клеточной поверхности (микровезикуляция) в процессе хранения консервированной крови приводит к снижению деформируемости эритроцитов (Мовшев Б.И., Витвицкий И.Л. и др. 2001). Исследования показали, что в течение всего периода хранения образцов консервированной крови средний объем эритроцитов (МСV) постепенно увеличивался, но не превышал нормальных значений. Подтверждением снижения деформируемости эритроцитов могут служить выраженные изменения МСV зарегистрированные на 3–4 неделях хранения. Увеличение МСV к 30 суткам хранения в образцах консервированной крови составило 14,4 % ( $p < 0,05$ ) от исходного. Это связано с «отеком эритроцита» — поступлением в него воды из внешней среды вследствие повреждения биомембраны.

Таблица 2

Влияние 3-ОПС и ОАИК на свойства мембран эритроцитов при хранении эритроцитной массы ( $M \pm m$ ,  $n=20$ )

Показатель	Протектор	Сроки хранения эритроцитной массы, сут.						
		Исход	6 час.	3 сут.	7 сут.	14 сут.	21 сут.	30 сут.
ССЭ, %	контроль	20,4±1,02	23,8±0,54	31,6±0,58	30,2±1,83	31,9±0,94	40,4±0,45	53,1±0,54
	3-ОПС 0,25 мг/мл		23,07±0,72	23,38±0,89*	20,10±0,39 *	20,18±0,37 *	22,37±0,31*	24,29±0,47*
	3-ОПС 0,5 мг/мл		30,76±0,36	29,74±1,54	34,97±0,72	32,10±0,33	30,42±0,75*	30,75±1,61*
	3-ОПС 1,0 мг/л		29,83±0,35	32,47±0,32	39,94±0,69*	40,06±1,03*	38,27±0,39*	39,59±0,92*
	ОАИК		23,8±0,54	24,4±1,17*	28,2±1,02	30,3±0,42	30,6±0,93 *	31,51±0,82*
КПМ: Кат эр. Кат.пл.	контроль	1,677±0,180	1,869±0,216	1,322±0,129	1,518±0,051	1,675±0,182	1,343±0,121	1,406±0,243
	3-ОПС 0,25 мг/мл		2,137±0,12	1,614±0,07*	1,788±0,07*	2,291±0,18 *	2,424±0,23*	2,82±0,15 *
	3-ОПС 0,5 мг/мл		2,312±0,21	1,93±0,08 *	1,88±0,07 *	2,348±0,18*	3,052±0,18*	3,27±0,14*
	3-ОПС 1,0 мг/л		2,137±0,22	1,84±0,10*	1,71±0,07*	1,51±0,11	2,77±0,18*	2,94±1,15 *
	ОАИК		1,79±0,12	1,19±0,07	1,70±0,10	2,02±0,13	2,05±0,08 *	2,14±0,09*

Примечание: ССЭ — сорбционная способность эритроцитов; КПМ — коэффициент проницаемости мембран; \* — достоверность различий  $p < 0,05$  по сравнению с данными контроля соответствующего срока наблюдения.

Положительным эффектом применения 3-ОПС является нормализация качественных показателей эритроцитсодержащих трансфузионных сред. Исследование мазков крови при световой микроскопии в сериях образцов с добавлением 3-ОПС не выявило измененных клеточных форм, тогда как в контроле, их доля составляла около 10 %. На всем этапе хранения средний объем эритроцитов не превышал нормальных значений. К 30 суткам хранения в контрольных образцах MCV увеличился на 14 % ( $p < 0,05$ ) от исходного. Наиболее выраженные изменения MCV зарегистрированы на 3–4 неделях хранения, достигнув к 30-м суткам верхней границы нормальных значений. К 30-м суткам хранения MCV опытных образцов консервированной крови и эритроцитной массы соответствовал соответствующему 21-х суток хранения контрольных.

Показатели анизоцитоза эритроцитов при хранении образцов консервированной крови и эритроцитной массы до 21 суток сохранялись в пределах нормальных значений, но к 30 суткам увеличивались до 56,7 % ( $p < 0,001$ ) от исходного и превышали допустимые значения для трансфузионных сред.

В контрольных образцах ЭМ анизоцитоз эритроцитов до 21 суток сохранялся в пределах нормальных значений, но к 30 суткам он возрос на 57 % ( $p < 0,001$ ) от исходного. В опытных образцах этот показатель увеличивался лишь на 37 % ( $p < 0,001$ ), 38 % ( $p < 0,001$ ) и 48 % ( $p < 0,001$ ) при концентрациях 3-ОПС 0,25 мг/мл, 0,5 мг/мл и 1,0 мг/мл соответственно и не превышал нормальных значений к концу срока хранения. Минимальная выраженность анизоцитоза относительно контрольных и других опытных образцов выявлена в образцах с концентрацией 3-ОПС 0,25 мг/мл. На 30 сутки хранения анизоцитоз эритроцитов группы образцов с 3-ОПС в концентрации 0,25 мг/мл соответствовал лишь второй неделе хранения в контрольной серии и третьей неделе в серии образцов с 3-ОПС в концентрации 1,0 мг/мл. Среднее удельное содержание гемоглобина в эритроците на протяжении всего срока хранения во всех образцах соответствовало нормальным значениям. Содержание гемоглобина в эритроците (MCH) на протяжении всего срока хранения соответствовало нормальным значениям. Корреляция между СРО и показателями эритромометрии свидетельствовала о преимуществе концентраций 3-ОПС в 0,25 г/л и 0,5 г/л.

**Влияние 3-оксипиридина сукцината и отрицательных аэроионов кислорода на качество консервированной крови и эритроцитной массы при их хранении.** При исследовании динамики гематокрита, общего содержания гемоглобина и эритроцитов во всех сериях образцов не было выявлено достоверных отличий их друг от друга (табл 3). Показатели находились в пределах нормальных значений на протяжении всего периода хранения трансфузионных сред. Механизм гемолиза и образования большого количества активных форм кислорода тесно связаны между собой. Известно, что при различных окислительных воздействиях на эритроциты наблюдается окисление и денатурация гемоглобина, сопровождающиеся высвобождением гема/гемина (Hchiu D.T.H., Huang T.Y.H., 1997). Экзогенный гемин, встраиваясь в мембрану, дестабилизирует ее и вызывает гемолиз (Fitch C.D., Chevli R., 1983; Huy N.T., Kamei K., 1997, 2002).

Содержание свободного гемоглобина уже через 6 часов после донации на 16 % ( $p < 0,001$ ) превышало исходные значения (табл. 3). К 3-м суткам наблюдения уровень свободного гемоглобина продолжал возрастать на 72 % ( $p < 0,001$ ) от исходных значений. К концу первой недели хранения данный показатель составил  $0,041 \pm 0,001$  г/л, что на 143 % ( $p < 0,001$ ) превышало исходные значения. Указанные изменения могут быть связаны с тем, что на начальных этапах хранения консервированной крови происходит разрушение популяции старых эритроцитов, которые, лишённые привычного для них кровотока, первыми не выдерживают условий существования в среде вне живого организма.

Воздействие ОАИК предупреждало гемолиз, о чем свидетельствуют более низкие показатели свободного гемоглобина и гемолиза в течение всего периода хранения как консервированной крови, так и эритроцитной массы, подвергнутых БАИК.

Антигемолитическое влияние 3-ОПС может быть следствием снижения накопления продуктов ПОЛ в мембранах клеток и проявляется на протяжении всего хранения гемотрансфузионных сред. В контроле содержание свободного гемоглобина к концу срока хранения ЭМ увеличивалось в 19 раз ( $p < 0,001$ ), а в образцах с 3-ОПС с концентрацией в 0,25 мг/мл — только в 6 раз ( $p < 0,001$ ), 0,5 мг/мл и 1,0 мг/мл — в 9 раз ( $p < 0,001$ ) от исходного уровня соответственно.

Повышение содержания свободного гемоглобина в консервированной крови ко второй и к третьей неделям хранения в 2,4 раза ( $p < 0,001$ ) и в 3,8 раза ( $p < 0,001$ ) от исходных значений соответственно, происходило на фоне активации ПОЛ и радикалообразования, увеличения проницаемости мембран, а также снижения антиоксидантного статуса эритроцитов. В образцах консервированной крови, хранимых более 21 суток, наблюдалась выраженная интенсификация выхода гемоглобина из эритроцитов. На 30 сутки было зарегистрировано достоверное повышение уровня свободного гемоглобина в 23 раза ( $p < 0,001$ ) относительно исходных значений. Указанные изменения превышали критически допустимые значения для гемотрансфузионных сред.

На 21 сутки хранения в эритроцитной массе с добавлением 3-ОПС в дозе 0,25 мг/мл выявлено минимальное содержание свободного гемоглобина, которое составляло 65% от контрольного значения. И если на 30 сутки в контроле наблюдалась интенсификация выхода гемоглобина из эритроцитов, превышающая критически допустимые значения для гемотрансфузионных сред, то в образцах с добавлением 3-ОПС к концу срока хранения эритроцитной массы соответствовала международным стандартам качества гемокомпонентов.

Оценка влияния 3-ОПС на изменение гемолиза, подтверждает данные результаты. Нормой для гемотрансфузионных сред считается гемолиз, не превышающий 0,8 % к концу хранения. Величина гемолиза соответствовала 21-м суткам хранения контрольных образцов эритроцитной массы. К 30 суткам хранения в опытных образцах гемолиз составил 0,5 % при добавлении 3-ОПС в концентрации 0,25 мг/мл в консерванте и 0,7 % — при увеличении дозы 3-ОПС до 0,5 мг/мл и 1,0 мг/мл в консерванте. Аналогичная динамика показателей гемолиза отмечена и при хранении консервированной крови, но влияние 3-ОПС на гемолитические процессы в ней была выражена слабее.

Таблица 3

Влияние 3-ОПС и ОАИК на развитие гемолитических процессов при хранении эритроцитной массы ( $M \pm m$ ,  $n=20$ )

Показатель	Протектор	Сроки хранения эритроцитной массы, сут.						
		исход	6 час	3 сут.	7 сут.	14 сут.	21 сут.	30 сут.
Hb св., г/л.	контроль	0,029±0,001	0,036±0,000	0,044±0,002	0,051±0,001	0,079±0,007	0,206±0,008	0,583±0,018
	3-ОПС 0,25 мг/мл		0,029±0,001*	0,037±0,001*	0,039±0,001*	0,069±0,001*	0,135±0,015*	0,219±0,010*
	3-ОПС 0,5 мг/мл		0,029±0,001*	0,037±0,001*	0,039±0,001*	0,069±0,001*	0,239±0,010*	0,284±0,010*
	3-ОПС 1,0 мг/л		0,029±0,001*	0,037±0,001*	0,039±0,001*	0,069±0,001*	0,239±0,010*	0,284±0,010*
	ОАИК		0,030±0,001*	0,042±0,001	0,046±0,002*	0,076±0,006	0,178±0,01*	0,218±0,03*
Гемолиз, %	контроль	0,058±0,002	0,075±0,003	0,095±0,003	0,113±0,003	0,175±0,015	0,458±0,017	1,456±0,044
	3-ОПС 0,25 мг/мл		0,058±0,002*	0,078±0,003*	0,085±0,002*	0,153±0,003	0,299±0,034*	0,545±0,024*
	3-ОПС 0,5 мг/мл		0,058±0,002*	0,081±0,004*	0,089±0,004*	0,157±0,004	0,530±0,021*	0,750±0,038 *
	3-ОПС 1,0 мг/л		0,120±0,062	0,128±0,050	0,087±0,002*	0,166±0,008	0,514±0,025	0,711±0,025*
	ОАИК		0,061±0,003	0,087±0,003	0,100±0,003*	0,168±0,01	0,394±0,02*	0,536±0,07 *

Примечание: \* - достоверность различий  $p < 0,05$  по сравнению с данными контроля соответствующего срока наблюдения.

Таблица 4

Влияние 3-ОПС и ОАИК на показатели качества эритроцитной массы при хранении ( $M \pm m$ ,  $n=20$ )

Показатель	Протектор	Сроки хранения эритроцитной массы						
		исход	6 час.	3 сут.	7 сут.	14 сут.	21 сут.	30 сут.
ОНЭ, %	контроль	0,037±0,003	0,835±0,058	2,29±0,066	7,45±0,11	12,24±0,12	16,97±0,09	22,905±0,36
	3-ОПС 0,25 мг/мл		0,078±0,04*	0,428±0,08*	3,54±0,08*	5,09±0,07*	11,33±0,16*	13,84±0,15*
	3-ОПС 0,5 мг/мл		0,086±0,02*	0,905±0,06*	3,50±0,07*	4,98±0,08*	11,32±0,14*	13,57±0,11*
	3-ОПС 1,0 мг/л		0,099±0,07*	1,22±0,06*	3,94±0,06*	7,45±0,08*	12,24±0,13*	16,99±0,11*
	ОАИК		0,835±0,058	2,29±0,066	7,10±0,10**	11,70±0,15**	16,60±0,13**	22,54±0,26
Кол-во мик- росгустков, x10 <sup>6</sup> /л	контроль	0,001±0,0001	0,001±0,0001	2,20±0,277	4,50±0,224	47,3±1,14	145,45±1,6	198,8±6,3
	0,25 мг/мл		0,001±0,001	0,59±0,05*	1,01±0,04*	41,9±0,73**	111,4±1,48*	151,7±1,73*
	0,5 мг/мл		0,001±0,0001	0,51±0,04*	0,91±0,04*	41,7±0,42**	110,6±1,26*	176,7±2,25**
	1,0 мг/л		0,001±0,0001	0,44±0,04*	0,90±0,05*	42,2±0,62**	111,5±1,72*	177,7±2,07**
	ОАИК		0,001±0,0001	1,95±0,22	3,50±0,136*	44,5±0,82**	143,00±1,25	190,9±3,5

Примечание: \* — достоверность различий  $p < 0,001$  показателя при соответствующем сроке хранения по сравнению с исходными данными

Так, к 30 суткам в образцах консервированной крови с концентрациями 3-ОПС 0,25 мг/мл, 0,5 мг/мл и 1,0 мг/мл в гемоконсерванте гемолиз составил 0,7 %, 0,77 % и 0,8 % соответственно, что превышает соответствующие значения в эритроцитной массе, но не превышает общепринятую норму.

Уровень гемолиза к концу срока хранения после воздействия ОАИК соответствовал норме и составил 0,5 % в эритроцитной массе и 0,8 % — в консервированной крови, тогда как в контроле — 1,4 %. При этом в отличие от контрольной серии образцов, где интенсификация выхода гемоглобина из эритроцитов к 30 суткам превышала критически допустимые значения для гемотрансфузионных сред, после применения ОАИК образцы консервированной крови и эритроцитной массы к концу срока хранения соответствовали международным стандартам качества гемоконпонентов.

Уже в первые 6 часов хранения, число осмотически неустойчивых эритроцитов достоверно многократно превышало исходные показатели. К третьим суткам хранения число осмотически неустойчивых эритроцитов возросло в 3 раза ( $p < 0,0001$ ) относительно первых суток.

Наращение доли осмотически неустойчивых эритроцитов в образцах консервированной крови на последующих этапах хранения свидетельствует о снижении резистентности эритроцитов к осмотическим нагрузкам. В образцах эритроцитной массы уже с первых часов происходит нарастание количества осмотически неустойчивых эритроцитов более чем в 22 раза (табл. 4). К концу срока хранения доля осмотически неустойчивых эритроцитов возрастает в более чем в 47 раз. Снижение резистентности клеток в гипоосмотической среде свидетельствует о наличии поврежденных и функционально неполноценных форм со сниженной способностью приживаемости к циркуляции в кровеносном русле реципиента и склонности к возникновению гемолиза.

При использовании ОАИК отметили отсутствие недискоидных клеток и гемолизирующих форм в мазках крови и достоверное снижение содержания микросгустков в образцах на 7-е (на 93 %,  $p < 0,001$ ) и 14-е сутки хранения (на 70 %,  $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. В образцах эритроцитной массы при ОАИК была достигнута стабилизация гематологических показателей: среднее содержание гемоглобина в эритроцитах, их объём и выраженность анизоцитоза были в пределах нормальных значений на всех сроках хранения.

С первых часов хранения в консервированной крови спонтанно образуются агрегаты тромбоцитов. В течение суток в них включаются лейкоциты. Вокруг тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов формируются нити фибрина, что неизбежно приводит к образованию микросгустков в гемотрансфузионных средах (Нуну N.T., Kamei K., 2002). Результаты, полученные нами в процессе изучения образцов консервированной крови с помощью световой микроскопии, подтверждают данный факт и свидетельствуют о многократном нарастании количества микросгустков по мере увеличения срока хранения.

При оценке влияния 3-ОПС на процесс образования микроагрегатов в хранимых средах, отмечена тенденция к достоверному снижению образования количества микросгустков во всех образцах консервированной крови и эритроцитной массы по сравнению с контрольными.

Минимальное содержание микросгустков определялось в образцах с добавлением 3-ОПС в концентрации 0,25 мг/мл. Корреляционный анализ между динамикой СРО и показателями качества трансфузионных сред однозначно свидетельствовал о преимуществе концентрации 3-ОПС в 0,25 мг/мл.

Нормализация этих показателей в опытных сериях подтверждает мембранопротекторный эффект 3-ОПС и способствует сохранению барьерной функции мембран эритроцитов. На сроках хранения свыше 14 суток наибольшим гемопротекторным действием обладает 3-ОПС в концентрации 0,25 мг/мл.

Таким образом, традиционное хранение консервированной крови и эритроцитной массы сопровождается развитием оксидантного стресса и гемолитическими процессами в клетках. Все вышеописанные изменения, в целом, приводят к нарушению морфофункциональной полноценности и жизнеспособности клеток крови уже к 7-14 суткам хранения. Введение 3-ОПС в состав глюгицира при заготовке крови способствует снижению активности процессов перекисного окисления липидов и поддержанию антиоксидантной защиты консервированных эритроцитов, что в значительной степени улучшает как их качество (улучшало свойства мембран эритроцитов, уменьшает интенсивность анизоцитоза, тормозит увеличение объема эритроцита), так и качество среды в целом (снижает интенсивность гемолиза, уменьшает число микросгустков, повышает осморезистентность эритроцитов) вплоть до 30-х суток хранения.

При этом для наиболее эффективного развития гемопротекторных свойств и исходя из экономической целесообразности следует использовать 3-ОПС в концентрации 0,25 г/л гемоконсерванта. В то же время, отрицательные аэроионы кислорода не позволяют пролонгировать жизнеспособность консервированных эритроцитов в сроки более 7 суток, при этом эффективность их гемопротекции мала и значительно уступает 3-ОПС при длительном хранении эритроцитсодержащих трансфузионных сред.

## ВЫВОДЫ

1. При хранении консервированной крови и эритроцитной массы, заготовленных на глюгицире и глюгицире с добавлением 3-ОПС в концентрациях 0,5 г/л и 1,0 г/л, имеет место линейный рост свободнорадикального окисления с интенсивным накоплением малонового диальдегида в плазме и эритроцитах, в то время как при использовании концентрации 0,25 г/л первичная активация свободнорадикального окисления сменяется его снижением к 14-м суткам до исходных значений с последующим меньшим ростом.

2. В цельной крови и эритроцитной массе, заготовленных на глюгицире, падение общей антиоксидантной активности обнаружено уже к 3 суткам хранения, в это же время в средах, заготовленных на глюгицире с добавлением 3-ОПС, наблюдается её незначительный рост, с последующим линейным снижением с 14-х суток в средах с концентрацией 3-ОПС 0,25 г/л, и с 21-х — с концентрацией 3-ОПС 0,5 г/л и 1,0 г/л, однако более высокий и длительный анти-



оксидантный статус последних не обеспечивал эффективной коррекции свободнорадикального окисления на поздних сроках хранения.

3. В процессе хранения крови и эритроцитной массы, заготовленных на глюгицире и глюгицире с добавлением 3-ОПС, динамика активации свободнорадикального окисления больше коррелировала с активацией каталазы эритроцитов, а не с общей антиоксидантной активностью, причем меньшие значения этой корреляции получены при концентрации 3-ОПС в глюгицире 0,25 г/л, что свидетельствует о большем гемопротектирующем влиянии указанной концентрации.

4. Хранение крови и эритроцитной массы, заготовленной на глюгицире, сопровождается после 3-х–7-х суток нарушением морфо-функциональной полноценности эритроцитов, что проявляется увеличением их сорбционной способности, уменьшением мембранной проницаемости, ростом объема и анизцитозом эритроцитов, в то время как введение в глюгицир 3-ОПС во всех концентрациях (с преимуществом концентраций 0,25 г/л и 0,5 г/л) тормозит развитие этих деструктивных явлений.

5. Качество крови и эритроцитной массы, заготовленных на глюгицире и глюгицире с 3-ОПС, было выше при концентрации 3-ОПС в консерванте 0,25 г/л, меньше — при концентрациях 0,5 г/л и 1,0 г/л, и еще меньше — при использовании глюгицира без добавления 3-ОПС, о чем свидетельствуют интенсивность роста числа микросгустков после 7 суток, нарастание гемолиза и осмотической неустойчивости эритроцитов после 14-х суток хранения.

6. Барботаж непосредственно после донации, заготовленных на глюгицире крови и эритроцитной массы, отрицательными аэроионами кислорода в концентрации  $1,3 \cdot 10^5$  анионов/см<sup>3</sup> в барботажном воздухе не способствовал в процессе хранения торможению свободнорадикального окисления и росту общей антиоксидантной активности, а после 14-суток усиливал деструктивные процессы в эритроцитах, что приводило к росту гемолиза и числа микросгустков, причем указанные явления были больше выражены в эритроцитной массе, чем в консервированной крови.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Материалы исследования свидетельствуют о необходимости включения антиоксидантов, наряду с антикоагулянтами и клеточными нутрицевтиками, в состав гемоконсервантов, особенно в тех случаях, когда планируется длительное хранение трансфузионных сред.

2. Целесообразно введение антиоксиданта 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридина сукцината, используемого в настоящее время под различными коммерческими наименованиями для лечения больных различными заболеваниями, в состав гемоконсерванта глюгицир в концентрации 0,25 г/л для улучшения качества трансфузионной среды и продления сроков хранения донорской крови и эритроцитной массы до 30 суток.

3. Полученные данные не позволяют рекомендовать использование отрицательных аэроионов кислорода для улучшения качества донорской крови и эритроцитарной массы при их хранении, а также указывают на нецелесообразность продолжения исследования эффективности различных режимов барботажной аэроионизации донорской крови и её компонентов в аспекте пролонгирования сроков хранения донорских сред.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Зорькина А.В. Македонская О.Г., Бякин С.П., Федосейкин И.В., Махров В.И. Влияние 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцината на перекисное окисление липидов и антиоксидантную защиту эритроцитов в процессе хранения донорской эритроцитной массы // **Физиология человека**. – 2009. – Т. 35, № 5. – С. 139–142.

2. Македонская О.Г., Бякин С.П., Зорькина А.В., Федосейкин И.В., Байтяков В.В. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита эритроцитов при барботажной аэроионизации донорской эритроцитарной массы // **Физиология человека**. – 2010. – Т. 36, № 1. – С. 142–144.

3. Бякин С.П., Пиксин И.Н., Фомин С.Н., Батяшина А.Н., Федосейкин И.В., Македонская О.Г., Герман В.Ю. Клинико-экономическая эффективность использования некоторых эфферентно-квантовых методов // **Казанский медицинский журнал**. – 2007. – Т. LXXXVIII, № 4. – С. 284–286.

4. Makedonskaya O.G., Byakin S.P., Zor'kina A.V., Fedoseikin I.V., Baityakov V.V. Lipid peroxydation and antioxydant defense of erythrocytes during bubbling air ionization of donor packed red blood cells // **Human Physiology**. – 2010. – Vol. 36, №. 1. – P. 121–122.

5. Makedonskaya O.G., Byakin S.P., Zor'kina A.V., Fedoseikin I.V., Machrov V.I. Effects of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine succinate on lipid peroxidation and antioxidant defense in erythrocytes during storage of donor erythrocyte mass // **Human Physiology**. – 2009. – Vol. 35, №. 5. – P. 647–649.

6. Македонская О.Г., Бякин С.П., Зорькина А.В. Влияние мексидола на некоторые морфо-функциональные показатели эритроцитов при хранении донорской эритроцитарной массы // *Естественно-научные исследования: теория, методы, практика: Межвузовский сборник научных трудов*. – Выпуск IV. – Саранск: СВМО, 2008. – С. 104–106.

7. Македонская О.Г., Бякин С.П., Зорькина А.В., Борченко Р.В., Кузьмичева Л.В. Влияние мексидола на процессы перекисного окисления липидов и антиоксидантную защиту в эритроцитах при хранении донорской эритроцитной массы // *Естественно-научные исследования: теория, методы, практика: Межвузовский сб. науч. трудов*. – Выпуск IV. – Саранск: СВМО, 2008. – С. 106–108.

8. Македонская О.Г. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита эритроцитов при барботажной аэроионизации // *Медицинские проблемы жизнедеятельности организма в норме, патологии и эксперименте: Матери-*

алы I Региональной науч.-практ. конференции «Научный потенциал молодежи — будущему Мордовии». – Саранск: Тип. «Прогресс», 2009. – С. 96 – 98.

9. Македонская О.Г. Влияние 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцината на перекисное окисление липидов и антиоксидантную защиту эритроцитов // Медицинские проблемы жизнедеятельности организма в норме, патологии эксперименте: материалы I региональной научно-практической конференции «Научный потенциал молодежи — будущему Мордовии» – Саранск: Тип. «Прогресс», 2009. – С. 99–101.

10. Македонская О.Г., Бякин С.П., Зорькина А.В. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита при барботаже донорской эритроцитной массы аэроионами // XXXVIII Огаревские чтения: Материалы научной конференции в 3 частях: Ч. 2: Естественные науки. – Саранск: ИМУ, 2010. – С. 55–56.

11. Бякин С.П., Македонская О.Г., Зорькина А.В. К вопросу сохранения биологической активности донорской эритроцитной массы при использовании барботажной аэроионизации // Новые технологии в медицине и интенсивной терапии: Материалы научно-практической конференции с международным участием. – Саранск: Тип. «Прогресс», 2010. – С. 47–49.

12. Македонская О.Г., Дмитриева А.С., Широков И.И., Бякин С.П. Влияние 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридина сукцината на свободнорадикальное окисление при хранении эритроцитной массы // Актуальные проблемы медико-биологических дисциплин: Сб. трудов III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием – Саранск: ИМУ, 2014. – С. 279–282.

13. Бякин С.П., Македонская О.Г., Пиксин И.Н., Аверина А.В., Махров В.И. К вопросу о клинико-экономической эффективности использования некоторых трансфузиологических методов лечения в медицине // Проблемы экспериментальной и клинической хирургии: Сб. науч. трудов. – Саранск: ИМУ, 2014. – С. 27–30.

## **ИЗОБРЕТЕНИЯ И РАЦИОНАЛИЗАТОРСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

1. Македонская О.Г., Зорькина А.В., Бякин С.П. «Способ консервирования донорской крови». Патент РФ: RU, рег № 2410103. Бюллетень «Изобретения, полезные модели» № 3 от 27.01.2011. Приоритет от 07.09.2009.

2. Македонская О.Г., Зорькина А.В., Бякин С.П.. Удостоверение на рационализаторское предложение № 1110 от 12.07.2010. «Способ хранения донорской эритроцитной массы», принятое к использованию от 07.06.2010.

3. Македонская О.Г., Зорькина А.В., Бякин С.П.. Удостоверение на рационализаторское предложение № 1111 от 12.07.2010. «Способ консервирования и хранения донорской эритроцитной массы», принятое к использованию от 10.06.2010.