

Метаболический эффект щелочных добавок и гуанозина / глюконата в растворах для хранения эритроцитов

Анджело Д'Алессандро,¹ Джули А. Рейс,¹ Рэйчел Калп-Хилл,¹ Герберт Корстен,² Робин ван Брюгген,^{3,4} и Дирк де Корте^{2,3,4}

ПРЕДПОСЫЛКИ: Более ста лет разработок в области добавочных растворов для хранения эритроцитов позволили сделать трансфузионную терапию безопасной и эффективной практикой для миллионов пациентов во всем мире. Тем не менее, хранение крови в банке приводит к постепенному накоплению метаболических изменений — явлению, которое ослабляется при хранении при помощи новых добавок для хранения, таких как щелочные добавочные растворы. Несмотря на то, что были разработаны новые типы щелочных добавок, метаболическая характеристика до настоящего времени не проводилась.

ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ И МЕТОДЫ С помощью УВЭЖХ-МС мы провели метаболический анализ эритроцитов, хранящихся в SAGM — солевом растворе аденина, глюкозы и маннитола (стандартная добавка в Европе) (PAGGSM) или щелочных добавках SOLX, E-SOL 5 и PAG3M в течение 1, 21, 35 (окончание срока годности в Нидерландах) или 56 дней.

РЕЗУЛЬТАТЫ: Щелочные добавки (особенно PAG3M) лучше сохраняют 2,3-дифосфоглицерат и аденозинтрифосфат (АТФ). Дезаминированные пурины, такие как гипоксантин, являются предикторами гемолиза и морфологических изменений. Добавление гуанозина в PAGGSM и PAG3M стимулировало образование АТФ за счет участия в неокислительном пентозофосфатном пути посредством фосфорилиза. В щелочных добавках наблюдалось снижение соотношения урата к гипоксантину, что свидетельствует о снижении образования урата и перекиси водорода. Несмотря на многочисленные преимущества пуринового и окислительно-восстановительного метаболизма, щелочные добавки не препятствуют накоплению свободных жирных кислот и окисленных побочных продуктов, открывая окно для разработки новых щелочных составов, включая (липофильные) антиоксиданты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Подщелачивание с применением различных стратегий (замена хлорид-анионов либо высоким содержанием бикарбоната, высоким содержанием цитрата / фосфата либо глюконатом, неспособным к проникновению через мембрану) дает различные метаболические результаты, которые во всех случаях превосходят существующие стандартные добавки.

современной медицинской практики для более чем 11 миллионов американцев ежегодно.⁴ В 1981 году была разработана первая современная добавка, содержащая солевой раствор, аденин, глюкозу и маннитол (SAGM). Это позволило хранить эритроциты вплоть до 6 недель благодаря маннитолау, который балансировал осмолярность и снижал гемолиз.⁵ В Соединенных Штатах был впоследствии разработан добавочный раствор (AS-1) аналогичный SAGM⁶. В последующие десятилетия были разработаны AS-3 и AS-5⁶⁻⁸, при этом AS-3 содержал фосфатные буферы и цитрат (вместо маннитола), что стимулировало синтез высокоэнергетических фосфатных соединений и делало эту добавку более приемлемой для использования у детей. За прошедшие годы были разработаны модификации SAGM, в том числе использующие гуанозин в качестве источника рибозофосфата, вторичного к фосфорилизу (PAGGSM), который, таким образом, поддерживает поздние реакции гликолиза, генерирующие образование аденозинтрифосфат (АТФ), без необходимости чистого расхода АТФ.⁹

СОКРАЩЕНИЯ: ДФГ = дифосфоглицерат; GSSG = глутатион дисульфид; PLS-DA = дискриминантный анализ методом частных наименьших квадратов; ПФП = пентозофосфатный путь; ФС = фосфатидилсерин.

Из ¹Кафедры биохимии и молекулярной генетики, Университет Колорадо в Денвере — Медицинский кампус Аншутц, г. Аврора, Колорадо; и ²Отдел процессов проектирования и разработки, Банк Крови Сенкуин; ³Отдел исследований клеток крови, Сенкуин Рисерч; и ⁴Лаборатория Ландштайнер, Академический медицинский центр, г. Амстердам, Нидерланды.

Запросы по дополнительным копиям направляйте: Анджело Д'Алессандро, кафедра биохимии и молекулярной генетики, Университет Колорадо в Денвере, Медицинский кампус Аншутц, г. Аврора, штат Колорадо 80045; e-mail: angelo.dalessandro@ucdenver.edu.

Получено для публикации 18 января 2018 г., изменения получены 1 марта 2018 г., принято 1 марта 2018 года.

doi:10.1111/trf.14620

© 2018 AABB

TRANSFUSION 2018;00:00-00

В последние годы были разработаны новые добавки, такие как AS-7 (коммерческое название SOLX)¹⁰ или

Столетние достижения в области трансфузионной медицины и, в частности, в области добавок для хранения эритроцитов¹⁻³ сделали трансфузионную терапию безопасной и эффективной опорой

эритрозол-5 (ESOL 5)¹¹, на основе концепции хлоридного сдвига¹²⁻¹⁴, которая способствует подщелачиванию внутриклеточного pH путем стимулирования выноса хлоридов в добавках с низким содержанием хлоридов / без хлоридов / с высоким содержанием бикарбоната с положительным влиянием на энергетический и окислительно-восстановительный обмен (описываемый в настоящей статье).¹⁵ Подобные эффекты могут быть получены путем замены солевого компонента на анионы, содержащие соли, неспособные к проникновению через мембрану, такие как глюконат натрия, который генерирует обратимый внутриклеточный алкалоз.¹⁶⁻¹⁸

Учитывая, что ежегодно более от доноров получают 112,5 миллионов единиц крови и что средняя потеря функциональной активности по окончании срока хранения составляет минимум 17 %¹⁹ при использовании имеющихся на данный момент добавок (данные получены на основе исследований восстановления функциональной полноценности эритроцитов после переливания крови),²⁰ новые добавки для увеличения срока хранения по-прежнему предоставляют практическую возможность для внесения значительного вклада в область трансфузионной медицины за счет улучшенного качества хранимых эритроцитов.²¹ Изменения пуринового обмена, возникающие в результате потребления АТФ и распада на пурины, такие как гипоксантин, являются маркерами метаболического старения эритроцитов.²² Снижение уровня недезаминированных пуринов невозможно скорректировать за счет дополнительной адениновой нагрузки добавок для улучшения хранения.²³ Активация пуриновых дезаминаз, таких как эритроцит-специфическая АМФ-дезаминаза 3, в свою очередь, приводит к образованию потенциально токсичных побочных продуктов, таких как гипоксантин. Недавно было выявлено, что гипоксантин является отрицательным прогностическим фактором восстановления функциональной полноценности хранимых эритроцитов после переливания крови у мышей и человека²⁴ и субстратом для циркулирующей ксантиноксидазы для выработки урата и перекиси водорода²⁵. С учетом этого факта, было предложено проводить омоложение эритроцитов по окончании срока годности, которое основано на использовании инозина и пирувата для пополнения позднего гликолиза за счет полученных в ходе фосфорилиза пентозофосфатных сахаров и для стимулирования окисления NADH обратно в NAD⁺ через лактатдегидрогеназу, соответственно. Однако избыточное превращение инозина в гипоксантин приводит к необходимости отмывания омоложенных частиц перед переливанием.²⁶

Кроме того, использование альтернативных сахаров (или сахарных спиртов) вместо глюкозы, таких как манноза, фруктоза или сорбит (в качестве замены маннитола)^{27,28}, было предложено в качестве перспективной стратегии для предотвращения ранней гликолитической блокады, чему способствует ингибирование фосфофруктокиназы

по типу обратной связи путем внутриклеточного окисления — эволюционного механизма, который используется животными, например голыми землекопами, для противодействия экстремальной кислородной недостаточности²⁹. И наконец, антиоксиданты, такие как витамин C, N-ацетилцистеин и витамин E, были предложены в качестве добавок для улучшения хранения эритроцитов, поскольку они ослабляют окислительное разрушение в ходе хранения, особенно в отношении липидного компонента³⁰⁻³⁴, что имеет значение, учитывая корреляцию между окислением липидов и восстановлением функциональной полноценности эритроцитов после переливания

крови. 35

В настоящее время доступность новых технологий «омики» обеспечивает более глубокое понимание протеома и метаболома эритроцитов.^{36,37} Например, хотя эритроциты лишены митохондрий, на данный момент стало известно, что они метаболизируют карбоновые кислоты из цитратных антикоагулянтов или добавок для улучшения хранения^{38,39} кислородозависимым способом.⁴⁰ Технологии «омики» помогли исследователям в области трансфузионной медицины охарактеризовать многогранную природу ухудшения функциональных характеристик при хранении⁴¹, а также прокладывают путь для будущих разработок в данной области за счет качественной и количественной характеристики эволюции данного процесса при использовании различных добавок для хранения.⁴²⁻⁴⁵ Недавно мы провели сравнительный анализ гемолиза, ионного гомеостаза и осмотической хрупкости эритроцитов, хранимых в пяти различных добавках.⁴⁶ В данном анализе мы расширяем эти наблюдения, предоставляя метаболомические доказательства положительного эффекта щелочных добавок по сравнению с AS-3 и корреляцию данных метаболомики с ранее измеренными функциональными параметрами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Коммерческие реактивы были закуплены у компании «Сигма-Олдрич», если не указывается иное.

Сбор, обработка и хранение крови

Сбор, обработка и хранение крови были подробно описаны в других источниках.⁴⁶ Вкратце, у здоровых добровольцев-доноров (n 5 15) в соответствии с Хельсинкской декларацией было взято 500 мл крови в антикоагулянте цитрат-фосфат-декстроза (ЦФГ). Для каждой серии образцы были разделены на три партии, состоящие из 5 ABO-совместимых объединенных единиц крови, очищенных от плазмы и лейкоцитарной оболочки. Затем добавляли 110 мл различных растворов — SAGM, E-SOL5, PAGGSM («Фрезениус Каби» Эммер-Компаскуум), SOLX

(AS-7) или PAGGGM (оба приготовлены на собственной базе) с последующей лейкоредукцией ($<1 \times 10^6$ остаточных лейкоцитов). Составы добавочных растворов подробно описаны Лагербергом и др.⁴⁶ Единицы были асептически отобраны в течение срока хранения в 1-й, 21-й, 35-й (конец срока годности эритроцитов в Нидерландах) и 56-й день. Обоснование этого графика отбора образцов было основано на наблюдении, что «снижение уровня 2,3-ДФГ было остановлено при хранении в E-Sol 5 и AS-7, в то время как при использовании PAG3M уровень 2,3-ДФГ повышался выше исходного уровня до 35-го дня и обнаруживался до 56-го дня», как сообщили Лагерберг и др.⁴⁶ В данной работе мы хотели проверить, могут ли эти наблюдения для 2,3-дифосфоглицерата (ДФГ) распространяться и на другие метаболические пути. Эритроциты и надосадочные жидкости разделяли центрифугированием при скорости 2000 g в течение 10 минут при температуре 48 °C на каждом временном отрезке, и клеточную массу отправляли в замороженном виде в лабораторию метаболомики на метаболический анализ, как описано ниже.

Измерения осмотической хрупкости, морфологии и газов были выполнены, как сообщалось ранее.⁴⁶

Экстракция метаболитов

50 мкл эритроцитов экстрагировали в 450 мкл буфера для лизиса (метанол : ацетонитрил : вода — 5:3:2) до ледяной экстракции посредством перемешивания на вортексе в течение 30 минут при 4 °C.^{15,38} Нерастворимые белки осаждали центрифугированием (10 минут при 4 °C и 10000 g), надосадочные жидкости собирали и хранили при -80 °C до анализа.

Метаболомика и СВЭЖХ-МС

Анализы проводили при помощи системы жидкостной хроматографии (Vanquish UHPLC, Thermo Fisher), подключенной в онлайн режиме к масс-спектрометру (Q Exactive, Thermo Fisher). Разрешение образцов проводили на колонке по структуре ядро-оболочка (2,1 x 150 мм, 1,7 мкм; Kinetex C18, Phenomenex) при 25 °C, используя 3-минутный изократический режим: 5 % ацетонитрила, 95 % воды и 0,1 % муравьиной кислоты при скорости потока 250 мкл/мин,⁴⁷ или при помощи 9-минутного градиента при скорости потока 400 мкл/мин от 5 до 95 % В (А: вода/0,1 % муравьиная кислота; В: ацетонитрил/0,1 % муравьиная кислота).³⁸ Масс-спектрометрический анализ и обработку данных выполняли согласно описанию.³⁸ Описания метаболитов выполняли при помощи компьютерного программного обеспечения (MAVEN, Принстонский университет) указанным образом.⁴⁸

Статистические анализы

Графики и статистический анализ, включая метод проекций на латентные структуры для дискриминационного анализ (PLS-DA) и

двухфакторный (временной ряд + один фактор) статистический анализ выполняли при помощи компьютерного программного обеспечения (GraphPad Prism 5.0, GraphPad Software, Inc.) и Metaboanalyst 3.0.⁴⁹ Линейные графики получали путем интерполяции доступных опорных точек для всех проверенных дней хранения (многочлены третьей степени) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Анализ метаболических связей был описан недавно.⁵⁰ В нескольких словах, корреляционный анализ (коэффициент корреляции Пирсона или Спирмена — после проверки нормальности распределения данных с помощью теста Колмогорова-Смирнова) и вычисление отклонений $\Delta|r| > 30\%$ были выполнены при помощи ПО GraphPad Prism 5.0 и Excel 2017 (Microsoft), а графики на основании результатов были составлены при помощи программного обеспечения (GENE-E, Институт Брода). Вкратце, основополагающее допущение анализа метаболических связей⁵⁰ состоит в том, что, хотя корреляция не обязательно подразумевает причинную зависимость, уровни метаболитов из связанных путей значительно коррелируют из-за биохимических ограничений ферментативных реакций, необходимых для потребления одного метаболита для производства другого.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Газовый и ионный гомеостаз, осмотическая хрупкость, воздействие фосфатидилсерина и морфология

Для эритроцитов, хранящихся в различных добавках, измеряли гематокрит, средний объем эритроцитов (MCV), pH, % гемолиза, осмотическую хрупкость, воздействие фосфатидилсерина (ФС) и морфологические изменения (в процентах эхиноцитов) (частично сообщалось ранее⁴⁶ и повторно описано на Рис. S1 и S2, доступно в качестве вспомогательной информации в онлайн-версии настоящего документа). Несмотря на ограничения функциональных *in vivo* измерений качества хранения эритроцитов и эффективности трансфузии (например, восстановление функциональной полноценности эритроцитов после переливания), измеренные нами параметры отражают важные суррогатные показатели «функциональной» значимости (например, процент спонтанного и осмотического гемолиза). Среднеклеточный объем эритроцитов был самым высоким при хранении с SAGM в течение всего периода хранения (Рис. S2). Эритроциты, хранимые с добавкой SAGM, обладали наибольшей осмотической хрупкостью к концу срока хранения с тенденцией к повышению в течение периода хранения (в соответствии с предыдущими наблюдениями),⁵¹ в то время как при использовании других добавок наблюдались тенденции к снижению (Рис. S1). Подщелачивание при использовании различных добавок было достигнуто за счет высокой бикарбонатной нагрузки (SOLX), низкого содержания хлоридов (PAGGSM), либо отсутствия хлоридов (PA3GM, SOLX и E-SOL 5; Рис. S2). При

использовании PAG3M и PAGGSM наблюдался более низкий уровень pH в конце хранения по сравнению с SOLX и E-SOL 5, хотя в целом тенденции для всех добавок были сопоставимы. Самая низкая степень гемолиза и самое высокое воздействие (несмотря на узкий диапазон) в конце срока хранения наблюдались для добавок E-SOL 5 и PAG3M (последний параметр нормализовался для всех добавок при инкубации при 37 °C), несмотря на то, что после морфологического анализа в течение хранения для всех добавок был продемонстрирован одинаковый процент эхиноцитов (Рис. S1).

Краткий обзор метаболомики

Анализ метаболомики проводили в течение срока хранения в 1-й, 21-й, 35-й (конец срока годности эритроцитов в Нидерландах) и 56-й день. Результаты подробно описаны в Таблице S1, доступной в качестве вспомогательной информации в онлайн-версии настоящего документа. Была проведена иерархическая кластеризация метаболитических трендов для всех добавок (Рис. S3, доступная в качестве вспомогательной информации в онлайн-версии настоящего документа), и подробное описание основных существенных характеристик (повторные измерения дисперсионного анализа ANOVA; $p < 0,01$; скорректировано ожидаемое нулевой гипотезы) представлено на Рис. 1. На основании этих метаболитических фенотипов мы сгруппировали образцы с помощью PLS-DA (Рис. 2A; двумерные графики для PC1 по сравнению с PC2, PC1 по сравнению с PC3, и PC2 по сравнению с PC3 представлены на Рис. S4 [доступно в качестве вспомогательной информации в онлайн-версии этого документа]), и было показано, что PAG3M была единственной добавкой, не демонстрирующей типичную U-образную прогрессию по PC1 и PC2, ранее описанную как нами, так и другими авторами.^{22,43} Примечательно, что гликолитические измерения с помощью классических спектрофотометрических подходов и УВЭЖХ-МС (Рис. 2B и C, соответственно) соответственно показали более высокое потребление глюкозы и образование АТФ, ДФГ и лактата в PAG3M, который содержал половину начальной дозы глюкозы в виде SOLX и E-SOL 5. В частности, несмотря на более низкий внутриклеточный pH, PAG3M лучше сохранял уровни ДФГ в течение всего периода хранения, затем следовали SOLX и E-SOL 5 (Рис. 2B). Никаких существенных изменений в соотношениях восстановленного к окисленному глутатиону (глутатион / дисульфид глутатиона [GSSG]) между добавками не наблюдалось, хотя раствор PAG3M показал самое высокое соотношение фосфорной кислоты и седогептулозы / 6-фосфоглюконата, а E-SOL 5 — самое низкое (Рис. 2C).

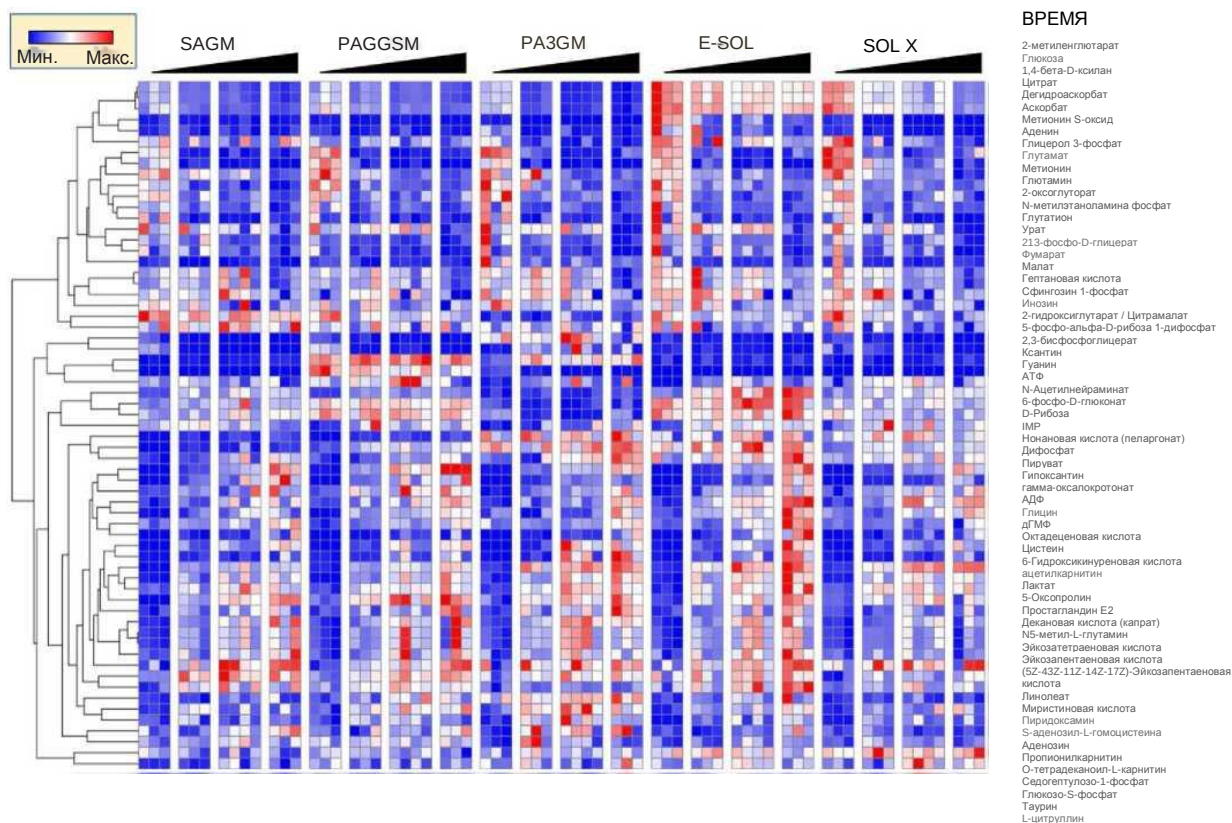


Рис. 1. Иерархический кластерный анализ временных измерений метаболитов эритроцитов на 1-й, 21-й, 35-й и 56-й день хранения в пяти различных добавках для хранения. Значительные метаболиты по данным анализа ANOVA (скорректировано ожидаемое нулевой гипотезы) показаны на тепловой карте (строки) после нормализации Z-баллов по всем образцам и цветовому кодированию (от синего до красного= от низкого до высокого — условные обозначения в верхнем левом углу). Векторная версия этого графика представлена на Рис. S3. [Цветной рисунок доступен на сайте wileyonlinelibrary.com]

В отсутствие данных о проникновении это наблюдение наводит на мысль о повышенном проникновении через пентозофосфатный путь (ПФП) в эритроцитах, хранимых в PAG3M, а также о более высокой способности генерировать НАДФН (то есть уменьшение содержания окисленного тиола). В E-SOL 5 и SOLX обнаруживались самые высокие уровни внутриклеточного малата (которые снижались во всех добавках в течение срока хранения, вероятно, вследствие высвобождения в надосадочные жидкости), несмотря на более высокие уровни цитрата в первой добавке (Рис. 2D).

Анализ метаболических связей (Рис. 3, подробно описан в предыдущих отчетах)⁵⁰ позволяет определить метаболическое перепрограммирование эритроцитов, хранящихся с применением различных добавок. Основное обоснование этого подхода заключается в том, что биохимические ограничения ферментативных реакций приводят к сильным и значительным положительным / отрицательным корреляциям между метаболитами в одних и тех же путях, если только активность одного фермента в каскаде не повышается / подавляется ввиду модулирующих событий (например, во время хранения эритроцитов наблюдается инактивирующее окисление цистеина активного центра глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы).⁵³ Уровни метаболитов в

эритроцитах, хранимых в присутствии SAGM, были схожими до повторения аналогичного корреляционного анализа для всех добавок при сохранении порядка метаболитов, обнаруженных в исходных исследованиях с SAGM (Рис. 3A), или выполнение иерархической кластеризации корреляций с поочередными добавками (Рис. 3B). Этот анализ дает краткий обзор метаболического перепрограммирования во всех добавках и указывает на сильное влияние на окислительно-восстановительный гомеостаз, карбоновую кислоту, жирные кислоты и пуриновый обмен в щелочных добавках по сравнению с SAGM (Рис. 3, дополнительная Таблица 2). Следует отметить, что изменения в метаболизме глутамина и гомеостазе глутатиона наблюдались для всех добавок по отношению к общему уровню глутатиона (как восстановленный, так и окисленный были самым низким в PAGGSM, Рис. S5 [доступно в качестве вспомогательной информации в онлайн-версии этой статьи]). В добавке SAGM наблюдались самые высокие уровни GSSG в течение первого 21 дня хранения. Цистеин значительно накапливался в эритроцитах, хранимых в ESOL 5, в течение срока хранения по сравнению с другими добавками, в основном, по истечении срока годности на 56-й день (Рис. S6, доступен в качестве вспомогательной информации в онлайн-версии этой статьи).

Метаболизм пуринов и жирных кислот

Добавление гуанозина в PAGGSM и PAG3M привело к значительно более высоким уровням

гуанина и аденозина и сравнительно более низким уровням инозина (особенно PAG3M) по сравнению со всеми другими добавками, протестированными в настоящем исследовании (Рис. 4).

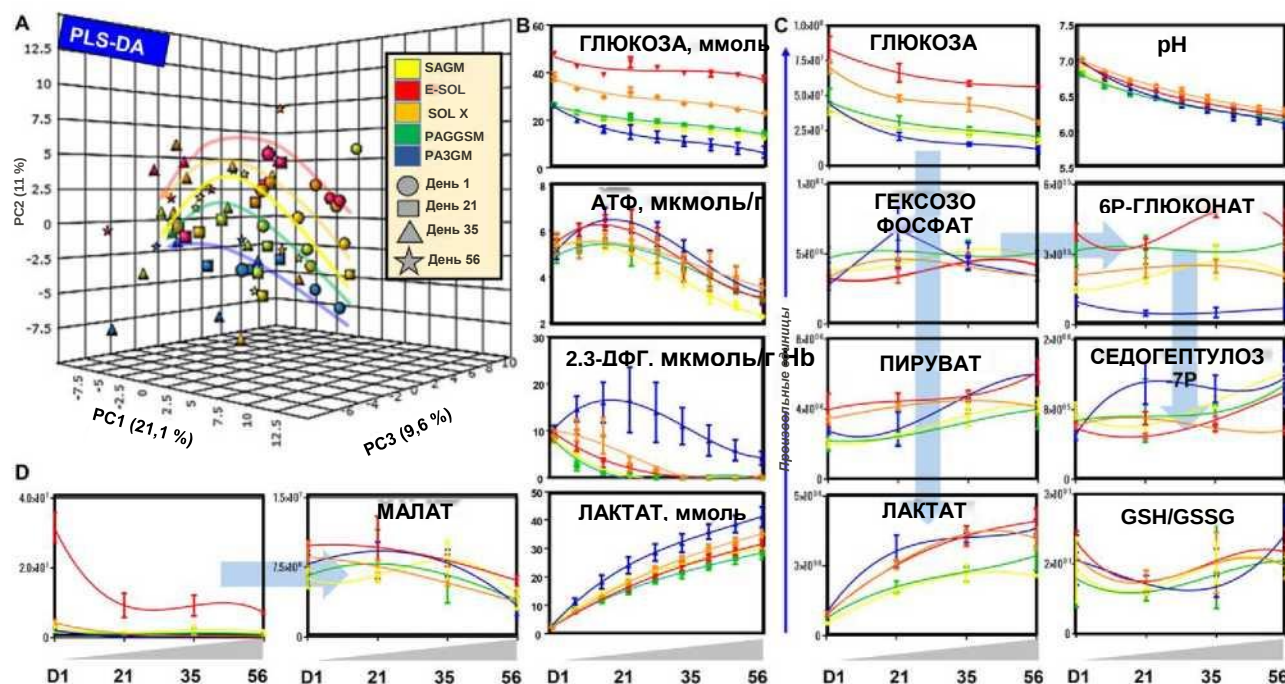


Рис. 2. PLS-DA данных метаболомики эритроцитов, хранящихся в пяти добавочных растворах, следуя цветовому коду на правой стороне панели А. На линейных графиках В, С и D указывается средний диапазон $\pm$ (непрерывные $\pm$ планки погрешностей) для метаболитов, участвующих в гликолизе, измеренных классическим спектрофотометрическим подходом (В) или СВЭЖХ-МС (С), и карбоновых кислот цитрата и малата (D). Цветовые коды соответствуют условным обозначениям на Рис. А. [Цветной рисунок доступен на сайте wileyonlinelibrary.com]

Это говорит о том, что гуанозин из PAGGSM и PAG3M в основном метаболизируется посредством фосфорилиза, а не гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (ГТФТ). Уровни дезаминированных пуринов (и соотношение дезаминированных / недезаминированных пуринов — например, аденозин / инозин; АМФ / инозинмонофосфат; аденин / гипоксантин) были самыми низкими в PAG3M (Рис. 4). С другой стороны, соотношения урата / ксантина (или гипоксантина) были самыми высокими в E-SOL 5 и SAGM, а затем в SOLX (Рис. 4). Исходя из данных о стационарных состояниях, эти результаты указывают на повышенное дезаминирование пурина и катаболизм в урат (реакция, которая также продуцирует прооксидант перекись водорода) в SAGM и E-SOL 5. Данный процесс частично смягчен при использовании SOLX.

С другой стороны, для SOLX наблюдалось наименьшее накопление свободных жирных кислот и продуктов перекисного окисления арахидоновой кислоты. Далее следуют SAGM, PAGGSM, E-SOL 5 и PAG3M (Рис. S3).

Корреляция данных метаболомики с функциональными результатами

Данные метаболомики были сопоставлены с функциональными результатами (включая энергетический уровень, определяемый по уровням

АТФ, гемолизу, осмотической хрупкости, воздействием ФС и морфологическим изменениям) в зависимости от добавки (таблица S1, Рис. 5 и 6B) и вне зависимости от добавки (Рис. S7 [доступно в качестве вспомогательной информации в онлайн-версии этого документа], Рис. 6A). Обзор основных метаболитов, показывающих значительную положительную (красный цвет) или отрицательную (синий цвет) корреляцию с АТФ по всем добавкам, представлен на Рис. 5A. Следует отметить, что большинство наблюдаемых тенденций демонстрируют прогрессирование в сторону все более высоких (например, лактата и АТФ, Рис. 5B) или более низких (например, АТФ и сфингозин-1-фосфата) корреляций по всем добавкам (Рис. 5A). Корреляции между АТФ и ДФГ были плохими для всех добавок, за исключением PAG3M (Рис. 5C), что предполагает перепрограммирование цикла Рапопорта-Люберинга конкретно для этой добавки. Следует отметить, что метаболиты пурина (особенно АТФ, аденозин и продукты дезаминирования инозин и гипоксантин) лучше всего коррелируют с функциональными исходами (Рис. 6B), причем гипоксантин является наилучшим прогнозирующим параметром гемолиза и морфологических изменений (процент эхиноцитов) во всех добавках. Следует отметить, что инозин был хорошим предиктором осмотической хрупкости во всех добавках, за исключением SAGM (Рис. 6B).

ОБСУЖДЕНИЕ

В последние несколько лет анализ данных метаболомики хранимых эритроцитов позволил получить большое количество результатов

измерений, клиническая значимость которых до сих пор остается предметом дискуссий⁵⁴.

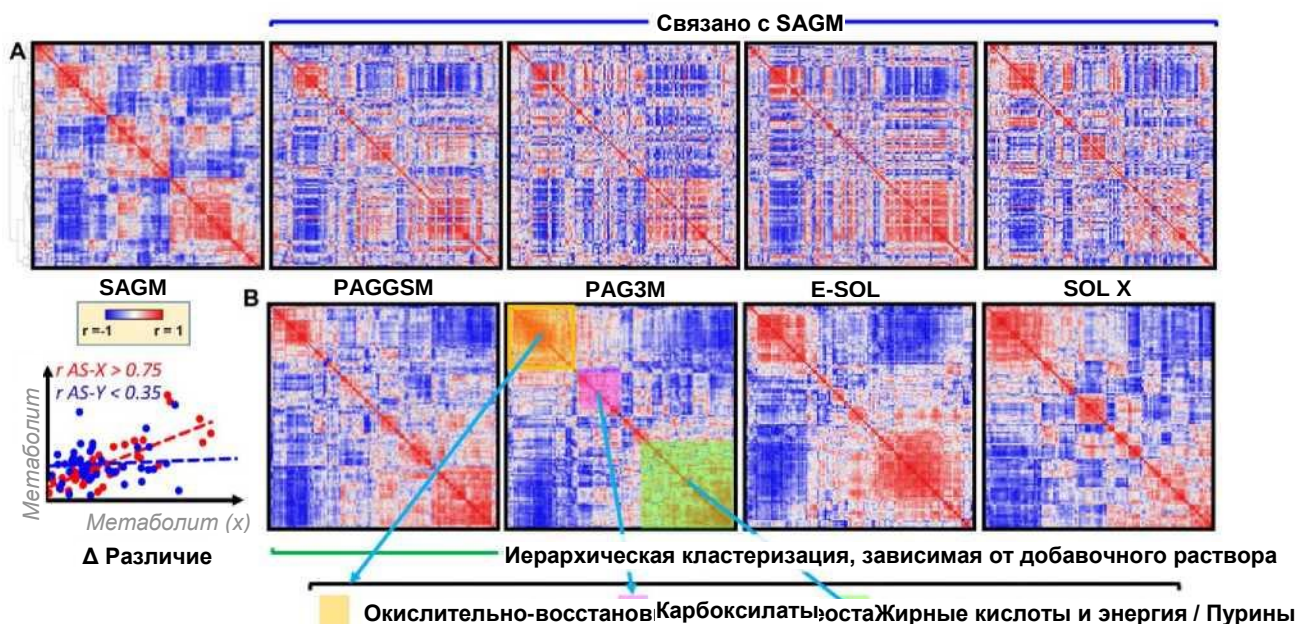


Рис. 3. Анализ метаболической связи эритроцитов, хранимых в пяти различных добавочных растворах. А) Проводили сопоставление метаболитов и результаты наносили на график в виде корреляционных карт (от синего до красного = от -1 до +1; корреляция Спирмена). Таким образом, метаболиты были иерархически сгруппированы на основе корреляций Спирмена всех значений в любой временной точке по результатам измерения в SAGM. Таким образом, порядок метаболитов поддерживался во всех добавках, хотя корреляции Спирмена рассчитывали отдельно для каждой добавки, чтобы визуально показать нарушение метаболических связей⁵⁰ (корреляция между метаболитами) при различных условиях хранения. Этот анализ позволяет выявить нарушение корреляций и образование новых как реакцию на хранение в присутствии различных добавок, что является косвенной мерой метаболического перепрограммирования. Гипотетический пример двух метаболитов (x и y), по-разному коррелирующих в условиях AS-X (красный цвет) и AS-Y (синий цвет), представлен в нижнем левом углу рисунка. (В) Иерархическая кластеризация корреляций Спирмена по всем метаболитам была проведена независимо для каждого добавочного раствора, чтобы выявить образование новых кластеров высокоррелированных метаболитов в щелочных добавках, включающих метаболиты из окислительно-восстановительного гомеостаза, карбоновых кислот, жирных кислот и пуринового обмена. [Цветной рисунок доступен на сайте wileyonlinelibrary.com]

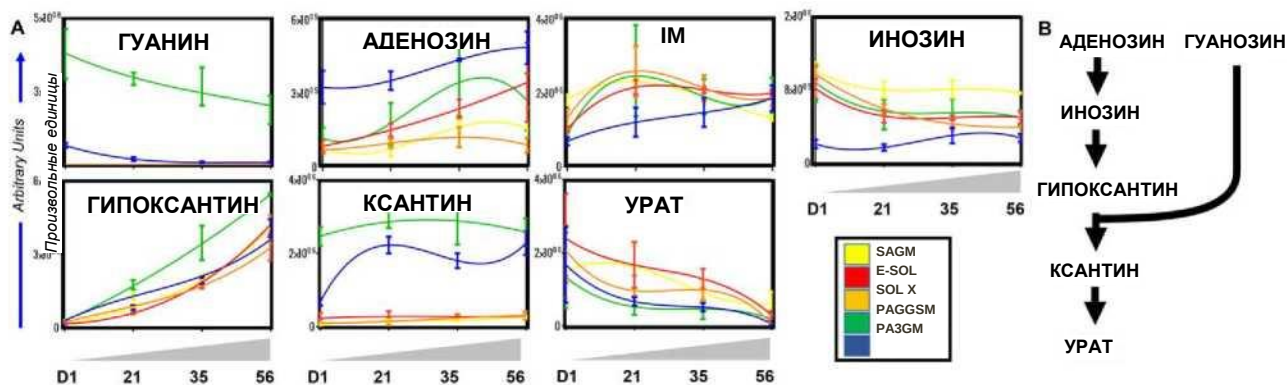


Рис. 4. Пуриновый обмен. (А) Линейные графики показывают медианный ± диапазон (непрерывные ± планки погрешностей) для метаболитов, участвующих в метаболизме пурина, по данным измерения методом СВЭЖХ-МС. Цветовые коды указаны в правом нижнем углу панели А. (В) Общий обзор пути, включающего метаболиты, указанные на графике А [Цветной рисунок доступен на сайте wileyonlinelibrary.com]

Исходя из того, что для переноса и доставки кислорода перелитые эритроциты должны оставаться цельными и циркулировать в кровотоке реципиента, были опубликованы соответствующие исследования на мышах и людях, описывающие потенциал окисления липидов и пуринов (например,

5-гидроксиэкозатетраеновой кислоты и других гидроксиэкозатетраеновых кислот, АТФ и гипоксантина) при посредничестве в гемолизе эритроцитов и восстановления функциональной полноценности эритроцитов после переливания крови.^{24,35,55,56} Эти наблюдения важны в том плане,

что они согласуют наблюдения метаболомики *ex vivo* с потенциальными клинически значимыми результатами. С этой точки зрения, улучшенный состав добавочного раствора для хранения эритроцитов сможет смягчить метаболические

патологические изменения, чтобы уменьшить гемолиз и ускорить восстановление функциональной полноценности эритроцитов после переливания крови.

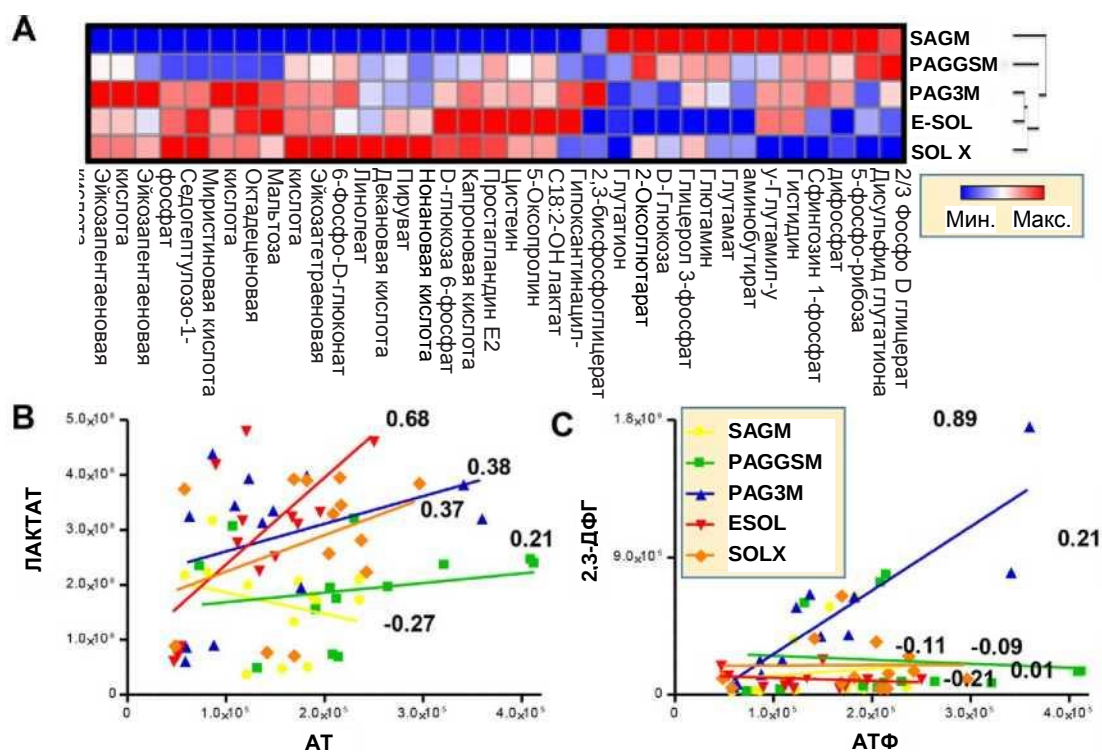


Рис. 5. Самые значимые корреляции метаболитов с АТФ во всех добавочных растворах, представленные в виде иерархической кластерной тепловой карты (А). (В, С) Линейные корреляции Спирмена (числа на каждой панели) лактата и 2,3-ДФГ с АТФ в каждой добавке, нанесенные на график в соответствии с цветовым кодом на Рис. С. [Цветной рисунок доступен на сайте wileyonlinelibrary.com]

В настоящем исследовании мы собрали данные метаболомики для пяти добавок для хранения эритроцитов, включая SAGM (стандартно используемый в Европе раствор для хранения) и недавно представленный PAGGSM, а также три щелочные добавки (SOLX, E-SOL 5 и PAG3M). Следует отметить, что результаты для SAGM и PAGGSM, о которых сообщается в настоящей статье, согласуются с результатами, о которых сообщил Рольфссон и др.,³⁹ которые также исследовали метаболическое воздействие других нещелочных добавок, таких как AS-1 и AS-3, но не сосредотачивали свое внимание на эффекте внутриклеточного подщелачивания на метаболизм эритроцитов. Внутриклеточное подщелачивание в этих добавках достигается за счет использования концепции переноса хлора путем устранения хлорид-анионов из состава, сбалансированного либо высоким содержанием бикарбоната (SOLX), высоким содержанием цитрата и фосфата (E-SOL 5), либо глюконатом, неспособным к проникновению через мембраны (PAG3M). Теоретически, эффект оттока хлорида, опосредованный добавлением глюконата в добавочный раствор, должен быть обратимым после достижения анионного равновесия, в отличие от оттока хлорида, вызванного добавками с высоким содержанием

бикарбоната и низким содержанием хлорида (или отсутствием хлорида). Однако влияние глюконата на сдвиг хлоридов (как определено измерениями бикарбонатных и хлоридных анионов, Рис. S2) полностью совпадает с щелочными добавками PAG3M, E-SOL 5 и SOLX. Тем не менее, глюконат-содержащая добавка (PAG3M) показала самые высокие уровни ДФГ в течение всего периода хранения, что позволяет предположить, что явления, отличные от только подщелачивания (т.е. усиление позднего гликолиза в присутствии пентозофосфатных соединений, высвобождаемых в результате фосфорилирования гуанозина), могут способствовать активации цикла Рапопорта-Люберинга. Классическое биохимическое понимание энергетического метаболизма эритроцитов предполагает, что синтез 2,3-ДФГ по циклу Рапопорта-Люберинга «жертвует» образованием одной молекулы АТФ.⁵⁷ И хотя это было отмечено и в настоящем исследовании для всех добавок для улучшения хранения эритроцитов, включая щелочные и гуанозин-содержащие добавки, глюконат-содержащий раствор PAG3M был единственной добавкой, демонстрирующей значительную положительную корреляцию между уровнями АТФ и 2,3-ДФГ, подчеркивая метаболическую особенность эритроцитов,

хранящихся в присутствии добавки PAG3M.

Ожидается, что внутриклеточное подщелачивание усилит гликолиз, ПФП и путь Рапопорта-Люберинга через pH-зависимое увеличение активности ферментов, лимитирующих скорость — фосфофруктокиназы, глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы и бисфосфоглицерат мутазы.¹⁵ В

настоящей статье мы показываем, что в щелочных добавках наблюдаются уменьшение образования спикул на поверхности эритроцитов (то есть образование морфологически измененных эхиноцитов) и гемолиза — феномена, который коррелирует с уменьшением расщепления АТФ и дезаминированием пурина, а не окислением свободных жирных кислот и жирных кислот.

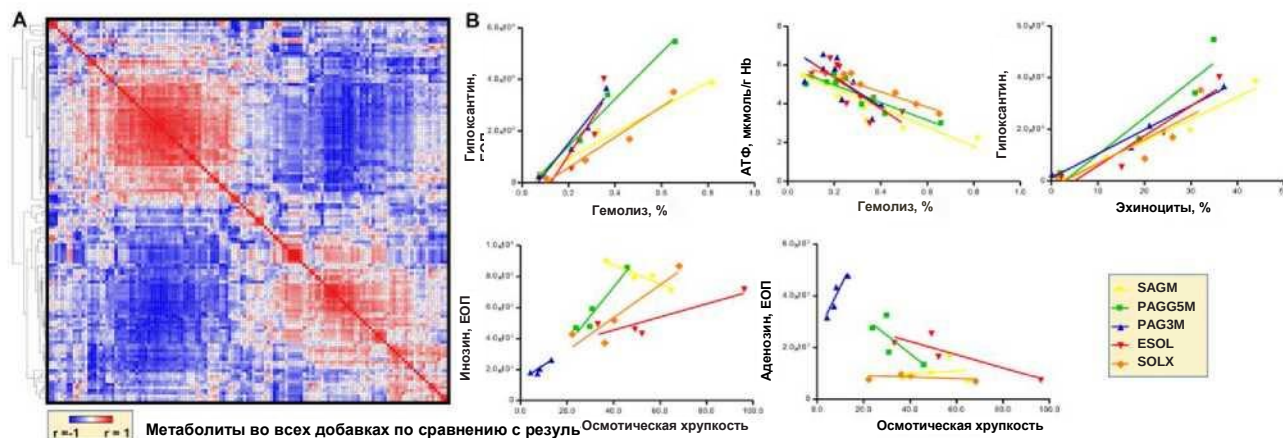


Рис. 6. Корреляционная матрица всех метаболитов с результатами (А) и освещение основных корреляций метаболитов с гемолизом, морфологией и осмотической хрупкостью во всех добавках. Пурины, особенно аденозин и продукты его дезаминирования (инозин и гипоксантин) наилучшим образом коррелировали со всеми проверенными функциональными результатами независимо (верхний ряд) или зависимо (нижний ряд) от добавочного раствора. Цветовой код в правом нижнем углу рисунка определяет линейные кривые корреляции для всех добавок во все проверенные моменты времени. [Цветной рисунок доступен на сайте wileyonlinelibrary.com]

Это наблюдение, хотя и предварительное, указывает на то, что гомеостаз с сохранением энергии смягчает образование спикул на эритроцитах — феномен «спасения или жертвоприношения» для устранения продуктов окисления (включая окисленные липиды). Однако гомеостаза с сохранением энергии в щелочных добавках (особенно PAG3M и E-SOL 5) недостаточно для полного предотвращения окисления липидов. В таких случаях введение гидрофильных (например, аскорбат) или липофильных (например, витамин Е) антиоксидантов может быть более результативным.³⁰⁻³⁴ Альтернативным объяснением этого явления является увеличение рециркуляции окисленных липидов в цикле Лэнгса — феномен, который стимулируется гипоксией⁵⁸ и на которую также может оказывать влияние подщелачивание.

С другой стороны, щелочные добавки эффективно предотвращают дезаминирование пурина, особенно в случае PAG3M. Следует отметить, что введение гуанозина в состав добавок PAGGSM и PAG3M в конечном итоге привело к увеличению нуклеотидного пула гуанинов и стимулированию образования АТФ без первоначального вложения энергии в поздний гликолиз за счет фосфорилиза, а не с образованием инозина за счет активности гипоксантин-гуанинфосфорилтрансферазы. Более низкие уровни гипоксантина и более высокие соотношения недезаминированных и дезаминированных пуринов (например, АТФ / гипоксантин) или пониженное содержание катаболитов окисления пурина (урат / гипоксантин) действительно наблюдались во всех щелочных добавках, особенно в PAG3M, SOLX и ESOL 5 (в этом порядке).

Повышенный фосфорилиз может также объяснить наблюдаемое увеличение равновесных концентраций метаболитов неокислительной фазы PPP (например, фосфата седогептулозы). Данное наблюдение также может быть альтернативно объяснено увеличением потоков через окислительный ПФП, что приводит к более высоким промежуточным отношениям неокислительного / окислительного этапов (что согласуется с более высокой активностью глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и, таким образом, увеличивает антиоксидантную способность эритроцитов в щелочной среде). Действительно, недавно мы провели оценку роли, которую окислительный стресс играет в активации АМФ-деаминазы 3 для стимулирования дезаминирования пурина и, таким образом, накопления гипоксантина — явления, которое отрицательно коррелирует с восстановлением функциональной полноценности эритроцитов после переливания крови и предотвращается за счет хранения в гипоксических условиях (которое также вызывает внутриклеточную подщелачивание).²⁴ Однако прямое сравнение уровней гипоксантина в щелочных и нещелочных добавках (SOLX по сравнению с AS-3) в первых исследованиях показало увеличение в первой группе, что также сопровождалось более высокими общими уровнями недезаминированных пуринов и АТФ.⁴⁵ Аналогичным образом, добавление CO₂ к хранимым в гипоксических условиях эритроцитам снижало уровни гипоксантина, но увеличивало соотношение урат / гипоксантин. Это указывает на роль подщелачивания в предотвращении катаболизма гипоксантина или на явление, не зависящее от подщелачивания, в объяснении вызванного гипоксией снижения уровня гипоксантина в

эритроцитах.⁵⁷ Аналогичным образом, следует отметить, что, в отличие от эритроцитов, клетки, содержащие митохондрии, производят гипоксантин в условиях гипоксии. Следует учитывать это предостережение и соблюдать осторожность при рассмотрении данных относительно пуринового дезаминирования при гипоксическом хранении эритроцитов в присутствии остаточных лейкоцитов (учитывая, что единицы лейкоредуцированных эритроцитов, использованные в данном исследовании, содержали $<0,1 \times 10^6$ лейкоцитов). Соотношения АТФ / гипоксантина или метаболизм гипоксантина в урат и перекись водорода, а не уровни гипоксантина как таковые, могут быть потенциальными маркерами метаболического повреждения эритроцитов, что может использоваться в качестве альтернативного варианта для будущих исследований. И наконец, активация пуриnergической передачи сигналов через аденозиновые рецепторы, как было показано, стимулирует гликолиз эритроцитов и образование ДФГ *in vivo* и *ex vivo* — феномен, который может быть использован для дальнейшей стимуляции гомеостаза пурина в хранимых эритроцитах в (щелочных) нормоксических или гипоксических условиях.⁵⁹ Разрабатываемые в будущем добавки могут содержать антиоксиданты для стимулирования энергетического обмена путем ингибирования дезаминирования пурина редокс-чувствительными дезаминазами, хотя в эти составы следует включать антиоксиданты, кроме от аскорбатов, или сахара, кроме глюкозы, чтобы избежать негативного влияния на гликолиз, вызванного конкурентным поглощением глюкозы и дегидроаскорбата транспортером глюкозы 1.³⁰

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании мы представили первый сравнительный анализ метаболизма эритроцитов, хранящихся в различных щелочных добавках: SOLX, E-SOL 5 и PAG3M, или в нещелочных / классических добавках, таких как SAGM или PAGGSM. Результаты нашего метаболического анализа указывают на улучшенную консервацию эритроцитов в PAG3M по сравнению с другими щелочными добавками и, как правило, в щелочных добавках по сравнению с нещелочными SAGM и PAGGSM. В частности, процессы образования и поддержания уровней ДФГ и АТФ, а также метаболизм пурина и окислительно-восстановительный гомеостаз (особенно ПФП и продукты его неокислительного этапа) были лучше при использовании PAG3M и других щелочных добавок по сравнению с SAGM и PAGGSM. Однако наблюдаемые метаболические преимущества не распространяются на предотвращение выделения жирных кислот и окисления липидов при хранении. Корреляция метаболитов, образовавшихся в ходе этих процессов, с суррогатными *ex vivo* индексами функциональных результатов (например, морфология клеток и осмотическая хрупкость) важна в связи с тем, что она подтверждает и расширяет недавнее наблюдение (коррелятивной) роли дезаминирования пурина в восстановлении функциональной полноценности эритроцитов после переливания крови.²⁴ Однако дополнительные

функциональные измерения *in vivo* (например, восстановлении функциональной полноценности после переливания крови) будут способствовать дальнейшему расширению нашего понимания роли, которые эти добавки играют в улучшении эффективности переливания крови. Результаты настоящего исследования дают дополнительную информацию о метаболических преимуществах щелочных добавок и наверняка помогут при разработке новых добавок в ближайшем будущем.

БЛАГОДАРНОСТИ

Часть исследований, о которых сообщается в настоящей статье, были спонсированы фондами Boettcher Webb-Waring, премия в области биомедицинских исследований — грант Early Career (ADA) и грант Shared Instrument от Национального института здравоохранения (S10OD021641).

А.Д.А., Р.Б.В. и Д.Д.К. составили проект исследования. Х.Х., Р.Б.В. и Д.Д.К. получили образцы. Р.С.Х., Дж.А.Р. и А.Д.А. провели анализы метаболомов. А.Д.А. написал первый черновой вариант рукописи, и все авторы внесли свой вклад в ее доработку.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

А.Д.А. является основателем «Омикс Текнолоджис Инк.» (Omix Technologies, Inc.) и консультантом для «Нью Хэлс Сайенсез, Инк.» (New Health Sciences, Inc.). Все остальные авторы ни о каких конфликтах интересов не сообщали.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mollison PL. The introduction of citrate as an anticoagulant for transfusion and of glucose as a red cell preservative. *Br J Haematol* 2000;108:13-8.
2. Greenwalt TJ. A short history of transfusion medicine. *Transfusion* 1997;37:550-63.
3. Hess JR. An update on solutions for red cell storage. *Vox Sang* 2006;91:13-9.
4. Ellingson KD, Sapiano MRP, Haass KA, et al. Continued decline in blood collection and transfusion in the United States—2015. *Transfusion* 2017;57(Suppl 2):1588-98.
5. Hoegman CF, Hedlund K, Sahleström M Y. Red cell preservation in protein-poor media. III. Protection against *in vitro* hemolysis. *Vox Sang* 1981;41:274-81.
6. Heaton A, Miripol J, Aster R, et al. Use of Adsol preservation solution for prolonged storage of low viscosity AS-1 red blood cells. *Br J Haematol* 1984;57:467-78.
7. Simon TL, Marcus CS, Myhre BA, et al. Effects of AS-3 nutrient-additive solution on 42 and 49 days of storage of red cells. *Transfusion* 1987;27:178-82.
8. Cicha I, Suzuki Y, Tateishi N, et al. Gamma-ray-irradiated red blood cells stored in mannitol-adenine-phosphate medium: rheological evaluation and susceptibility to oxidative stress. *Vox Sang* 2000;79:75-82.
9. Walker WH, Netz M, Geanshirt KH. 49 day storage of erythrocyte concentrates in blood bags with the PAGGS-mannitol solution. *Beitr Zur Infusionstherapie Contrib Infus Ther* 1990;26:55-9.
10. Cancelas JA, Dumont LJ, Maes LA, et al. Additive solution-7 reduces the red blood cell cold storage lesion. *Transfusion* 2015;55:491-8.
11. Radwanski K, Thill M, Min K. Red cell storage in E-Sol 5 and Adsol additive solutions: paired comparison using mixed and non-mixed study designs. *Vox Sang* 2014;106:322-9.
12. Hess JR, Hill HR, Oliver CK, et al. Alkaline CPD and the preservation of RBC 2,3-DPG. *Transfusion* 2002;42:747-52.
13. Hess JR, Rugg N, Joines AD, et al. Buffering and dilution in red blood cell storage. *Transfusion* 2006;46:50-4.

14. Meryman HT, Hornblower M, Keegan T, et al. Refrigerated storage of washed red cells. *Vox Sang* 1991;60:88-98.
15. Nemkov T, Hansen KC, Dumont LJ, et al. Metabolomics in transfusion medicine. *Transfusion* 2016;56:980-93.
16. Cotterrell D, Whittam R. The influence of the chloride gradient across red cell membranes on sodium and potassium movements. *J Physiol* 1971;214:509-36.
17. Burger P, Korsten H, De Korte D, et al. An improved red blood cell additive solution maintains 2,3-diphosphoglycerate and adenosine triphosphate levels by an enhancing effect on phosphofructokinase activity during cold storage. *Transfusion* 2010;50:2386-92.
18. de Korte D, Kleine M, Korsten HGH, et al. Prolonged maintenance of 2,3-diphosphoglycerate acid and adenosine triphosphate in red blood cells during storage. *Transfusion* 2008;48:1081-9.
19. Mays JA, Hess JR. Modelling the effects of blood component storage lesions on the quality of haemostatic resuscitation in massive transfusion for trauma. *Blood Transfus* 2017;15:153-7.
20. Dumont LJ, AuBuchon JP. Evaluation of proposed FDA criteria for the evaluation of radiolabeled red cell recovery trials. *Transfusion* 2008;48:1053-60.
21. de Korte D. New additive solutions for red cells. *ISBT Sci Ser* 2016;11:165-70.
22. Paglia G, D'Alessandro A, Rolfsson O, et al. Biomarkers defining the metabolic age of red blood cells during cold storage. *Blood* 2016;128:e43-50.
23. Paglia G, Sigurjonsson OE, Bordbar A, et al. Metabolic fate of adenine in red blood cells during storage in SAGM solution. *Transfusion* 2016;56:2538-47.
24. Nemkov T, Sun K, Reisz JA, et al. Hypoxia modulates the purine salvage pathway and decreases red blood cell and supernatant levels of hypoxanthine during refrigerated storage. *Haematologica* 2018;103:361-72.
25. Casali E, Berni P, Spisni A, et al. Hypoxanthine: a new paradigm to interpret the origin of transfusion toxicity. *Blood Transfus* 2015;14:555-6.
26. D'Alessandro A, Gray AD, Szczepiorkowski ZM, et al. Red blood cell metabolic responses to refrigerated storage, rejuvenation, and frozen storage. *Transfusion* 2017;57:1019-30.
27. Fagiolo E, Littarru GP, Lippa S, et al. Biochemistry of packed red blood cell concentrates stored in PAGGS-sorbitol solution for 42 days. *Vox Sang* 1987;52:301-4.
28. Rolfsson O, Johannsson F, Magnusdottir M, et al. Mannose and fructose metabolism in red blood cells during cold storage in SAGM. *Transfusion* 2017;57:2665-76.
29. Park TJ, Reznick J, Peterson BL, et al. Fructose-driven glycolysis supports anoxia resistance in the naked mole-rat. *Science* 2017;356:307-11.
30. Pallotta V, Gevi F, D'Alessandro A, et al. Storing red blood cells with vitamin C and N-acetylcysteine prevents oxidative stress-related lesions: a metabolomics overview. *Blood Transfus* 2014;12:376-87.
31. Vani R, Soumya R, Carl H, et al. Prospects of vitamin C as an additive in plasma of stored blood. *Adv Hematol* 2015;2015: 961049.
32. Czubak K, Antosik A, Cichon N, et al. Vitamin C and Trolox decrease oxidative stress and hemolysis in cold-stored human red blood cells. *Redox Rep* 2017;22:445-50.
33. Sanford K, Fisher BJ, Fowler E, et al. Attenuation of red blood cell storage lesions with vitamin C. *Antioxidants (Basel)* 2017;6.
34. Silva CAL, Azevedo Filho CA, Pereira G, et al. Vitamin E nanoemulsion activity on stored red blood cells. *Transfus Med Oxf Engl* 2017;27:213-7.
35. Fu X, Felcyn JR, Zimring JC. Bioactive lipids are generated to micromolar levels during RBC storage, even in leukoreduced units. *Blood* 2015;126:2344.
36. D'Alessandro A, Dzieciatkowska M, Nemkov T, et al. Red blood cell proteomics update: is there more to discover? *Blood Transfus* 2017;15:182-7.
37. Bryk AH, Wisniewski JR. Quantitative analysis of human red blood cell proteome. *J Proteome Res* 2017;16:2752-61.
38. D'Alessandro A, Nemkov T, Yoshida T, et al. Citrate metabolism in red blood cells stored in additive solution-3. *Transfusion* 2017;57:325-36.
39. Rolfsson O, Sigurjonsson OE, Magnusdottir M, et al. Metabolomics comparison of red cells stored in four additive solutions reveals differences in citrate anticoagulant permeability and metabolism. *Vox Sang* 2017;112:326-35.
40. Nemkov T, Sun K, Reisz JA, et al. Metabolism of citrate and other carboxylic acids in erythrocytes as a function of oxygen saturation and refrigerated storage. *Front Med* 2017;4: 175.
41. D'Alessandro A, Kriebardis AG, Rinalducci S, et al. An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies. *Transfusion* 2015;55:205-19.
42. Roback JD, Josephson CD, Waller EK, et al. Metabolomics of AS-1 RBC storage. *Transfus Med Rev* 2014;28:41-55.
43. D'Alessandro A, Nemkov T, Kelher M, et al. Routine storage of red blood cell (RBC) units in additive solution-3: a comprehensive investigation of the RBC metabolome. *Transfusion* 2015;55:1155-68.
44. D'Alessandro A, Hansen KC, Silliman CC, et al. Metabolomics of AS-5 RBC supernatants following routine storage. *Vox Sang* 2015;108:131-40.
45. D'Alessandro A, Nemkov T, Hansen KC, et al. Red blood cell storage in additive solution-7 preserves energy and redox metabolism: a metabolomics approach. *Transfusion* 2015;55: 2955-66.
46. Lagerberg JW, Korsten H, Van Der Meer PF, et al. Prevention of red cell storage lesion: a comparison of five different additive solutions. *Blood Transfus* 2017;15:456-62.
47. Nemkov T, Hansen KC, D'Alessandro A. A three-minute method for high-throughput quantitative metabolomics and quantitative tracing experiments of central carbon and nitrogen pathways. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2017; 31:663-73.
48. Xia J, Sinelnikov IV, Han B, et al. MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res* 2015;43: W251-7.
49. D'Alessandro A, Nemkov T, Reisz J, et al. Omics markers of the red cell storage lesion and metabolic linkage. *Blood Transfus* 2017;15:137-44.
50. Blasi B, D'Alessandro A, Ramundo N, et al. Red blood cell storage and cell morphology. *Transfus Med Oxf Engl* 2012;22: 90-6.
51. Reisz JA, Wither MJ, Dzieciatkowska M, et al. Oxidative modifications of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase regulate metabolic reprogramming of stored red blood cells. *Blood* 2016;128:e32-42.
52. Zimring JC. Widening our gaze of red blood storage haze: a role for metabolomics. *Transfusion* 2015;55:1139-42.
53. de Wolski K, Fu X, Dumont LJ, et al. Metabolic pathways that correlate with post-transfusion circulation of stored murine red blood cells. *Haematologica* 2016;101:578-86.
54. Van't Erve TJ, Wagner BA, Martin SM, et al. The heritability of hemolysis in stored human red blood cells. *Transfusion* 2015;55:1178-85.
55. Dumont LJ, D'Alessandro A, Szczepiorkowski ZM, et al. CO₂-dependent metabolic modulation in red blood cells stored under anaerobic conditions. *Transfusion* 2016;56: 392-403.
56. Wu H, Bogdanov M, Zhang Y, et al. Hypoxia-mediated impaired erythrocyte Lands' cycle is pathogenic for sickle cell disease. *Sci Rep* 2016;6:29637.
57. Sun K, D'Alessandro A, Xia Y. Purinergic control of red blood cell metabolism: novel strategies to improve red cell storage quality. *Blood Transfus* 2017;15:535-542. □

ВСПОМОГАТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Дополнительную вспомогательную информацию можно найти в онлайн-версии этой статьи на сайте издателя.

Рис. S1. Функциональные результаты, включая гемолиз (в процентах), кривые осмотической хрупкости, морфологию (процент эхиноцитов) и апоптотические клетки (воздействие фосфатидилсерина до и после инкубации при 37 °C). Показаны линейные графики (средняя величина $\pm$ диапазон) для каждой отдельной добавки в соответствии с цветовой схемой в правом нижнем углу рисунка.

Рис. S2. Измерения газов, гематологические параметры и ионный гомеостаз при хранении во всех различных добавках (тестируют еженедельно с 1-го по 56-й дни хранения — ось x). Показаны линейные графики (средняя величина $\pm$ диапазон) для каждой отдельной добавки в соответствии с цветовой схемой в правой стороне рисунка.

Рис. S3. Векторная версия иерархического кластерного анализа временных измерений метаболитов эритроцитов в 1-й, 21-й, 35-й и 56-й дни хранения в пяти различных добавках для хранения.

Рис. S4. Двухмерные графики анализа основных компонентов (ОК), показывающие ОК1 по сравнению с ОК2, ОК1 по сравнению с ОК3 и ОК2 по сравнению с ОК3.

Рис. S5. Гомеостаз глутатиона. Показаны линейные графики (средняя величина $\pm$ диапазон) для каждой отдельной добавки в соответствии с цветовой схемой на рисунках, указанных в данном манускрипте.

Рис. S6. Жирная кислота и эйкозаноиды (существенные изменения по добавкам и при хранении). Показаны линейные графики (средняя величина $\pm$ диапазон) для каждой отдельной добавки в соответствии с цветовой схемой на рисунках, указанных в данном манускрипте.

Рис. S7. Векторная версия корреляционной матрицы метаболитов и исходов, независимо от испытуемого добавочного раствора.

Таблица S1. Метаболические измерения в эритроцитах, хранимых в разных стандартных и щелочных добавках.

Таблица S2. Матрица корреляции между метаболическими фенотипами и функциональными измерениями в эритроцитах, хранящихся в стандартных и щелочных добавках.