

Витамины-антиоксиданты: могут ли они продлить срок жизни консервированного эритроцита?

П.Н.Малыш, Е.В.Фролова, С.В.Коваленко,
Е.Л.Горопцева, Ю.Г.Джевага, В.Я.Гусакова

Главное управление здравоохранения Луганской областной государственной администрации,
Луганская областная станция переливания крови
Луганск, Украина

Исследовано влияние витаминов на способность консервированного эритроцита к осуществлению трансмембранного переноса катионов по мере «старения». Установлено, что пиридоксина гидрохлорид, в отличие от никотиновой кислоты, оказывает стабилизирующее действие на мембрану консервированного эритроцита, препятствуя нарушению баланса активного и пассивного транспорта катионов натрия, калия и кальция.

Ключевые слова: консервированная кровь, эритроцит, пиридоксина гидрохлорид, никотиновая кислота, антиоксидант.

Введение

Известно, что стабилизаторы донорской крови, используемые в настоящее время производственной трансфузиологией, не обеспечивают долгосрочную сохранность структур и функций консервированных эритроцитов [11]. Необходим поиск добавок к рецептуре гемоконсервантов и ресуспендирующих растворов, которые могли бы продлить срок полноценного функционирования консервированных клеток крови.

Многочисленными работами отечественных и зарубежных авторов установлены антиоксидантные свойства витаминов, в частности аскорбиновой кислоты, пиридоксина, никотиновой кислоты [2, 9, 13, 14, 19, 20]. В связи с этим было исследовано влияние указанных витаминов на состояние мембраны консервированного эритроцита, подверженной «возрастзависимому» перекисному разрушению липидов, в частности на ее способность к осуществлению активного переноса катионов.

Материалы и методы исследования

Дозы крови (450 мл каждая) 20 доноров-мужчин А(II) группы крови, наиболее часто встречающейся у жителей Луганской области, заготовили в поливинилхлоридные контейнеры («Ravimed», Польша) с гемоконсервантом «CPDA-1». Каждую дозу в асептических ус-

ловиях разделяли на 12 аликвот в стерильные стеклянные флаконы. Четыре аликвоты (1-й, 2-й, 3-й, 4-й флаконы) служили контролем (группа образцов К). Вносили: в 4-й, 5-й, 6-й, 7-й, 8-й флаконы — по 0,2 мл 5% раствора пиридоксина гидрохлорида (группа образцов В); в 9-й, 10-й, 11-й, 12-й флаконы — по 8,3 мл 10 мг/мл раствора никотиновой кислоты (группа образцов Н). Использовали готовые лекарственные формы: пиридоксина гидрохлорид, раствор для инъекций 5% (ООО «Фармацевтическая компания «Здоровье», Харьков, Украина), никотиновая кислота, раствор для инъекций 10 мг/мл (ОВХФП «Биостимулятор», Одесса, Украина).

Консервированную кровь сохраняли при температуре от +40°C до +80°C в течение 42-х суток. Разделение крови на клеточную массу и плазму проводили с использованием центрифуги лабораторной T23D (Германия). Исследования цельной крови и плазмы проводили с временными промежутками в 7 суток.

Маркеры повреждения мембраны эритроцита. Концентрацию ионов Na^+ , K^+ в плазме определяли с использованием анализатора Easy Lite Na/K/Cl производства корпорации «Medica» (США). Контроль качества работы анализатора осуществляли при помощи пакета калибрующих растворов. Как опорные показатели при изучении концентрации электролитов использовали нормы, установленные для плазмы крови человека: содержание натрия —

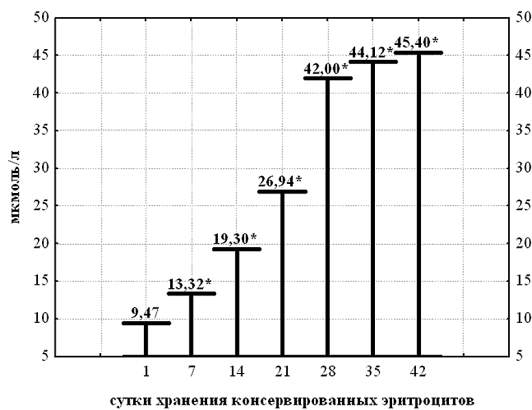


Рис. 1. Уровень МДА в плазме консервированной крови на этапах хранения.

Примечание: * — $<0,05$ в сравнении с 1-ми сутками наблюдения.

135-148 ммоль/л; содержание калия — 3,5-5,3 ммоль/л [21].

Определение малонового диальдегида выполняли методом, основанным на том, что тиобарбитуровая кислота, взаимодействуя в кислой среде с низкомолекулярными диальдегидами, образует окрашенный комплекс, имеющий максимум светопоглощения при длине волны 535 нм [10].

Уровень общего кальция в плазме консервированной крови определяли фотометрически при длине волны 580 нм с использованием «Набора реактивов для определения общего кальция в биологических жидкостях» производства фирмы «Филисит-диагностика» (г. Днепропетровск, Украина). Учитывая то, что наличие в составе гемоконсерванта «СРДА-1» неорганического фосфата может влиять на результаты детекции Ca^{2+} вследствие образования соединения Ca^{2+} с цитратом натрия/лимонной кислотой, использовали растворы сравнения — стандартный образец Ca^{2+} , обработанный «СРДА-1» смешиванием в соотношении 7:1. Результаты детекции Ca^{2+} учитывали с помощью анализатора биохимического фотомет-

Таблица 1

Содержание натрия в плазме, ммоль/л

Сутки хранения	Контроль, группа К	Добавка к гемоконсерванту	
		Вит. В ₆ , группа В	Вит. РР, группа Н
1	149,23±0,58	148,06 ±0,55	148,46±0,66
7	142,05±0,69*	143,01±0,36*	139,99±0,69*
14	136,55±0,84*	138,19±0,52*	134,82±0,95*
21	131,14±0,76*	134,36±0,82* **	130,41±0,83*
28	127,66±0,60*	130,21±0,69* **	127,12±0,65*
35	125,35±0,82*	128,29±1,20* **	124,56±0,72*
42	122,73±0,88*	125,54±1,25*	121,45±0,82*

Примечания: * — $p < 0,05$ в сравнении с показателем 1-х суток хранения; ** — $p < 0,05$ в сравнении с группами К и Н.

рического кинетического АБхФк-02-«НПП-ТМ» БиАн (Россия).

Статистическая обработка материала произведена с использованием IBM PC. Результаты обработаны с помощью программы Statistica v.8. Для оценки достоверности различий в сравниваемых показателях использовали t-критерий Стьюдента-Фишера. Статистическую связь между рядами признаков определяли при помощи коэффициента ранговой корреляции Спирмена по Л.Е.Полякову (1971). Условные обозначения статистических параметров в тексте и таблицах представили следующим образом: М — средняя арифметическая, m — ошибка репрезентативности (средняя ошибка для средних или относительных величин), r — коэффициент корреляции, p — доверительная вероятность.

Результаты исследования и их обсуждение

Ряд авторов утверждают, что в процессе хранения гемотрансфузионных сред усиливается перекисидация липидов мембраны, сопровождающаяся накоплением малонового диальдегида (МДА) [7, 12, 15, 16, 18]. Установлено, что при «старении» консервированного эритроцита нарушается упаковка липидного бислоя клеточной мембраны: фосфолипиды внутреннего монослоя элюируют в плазму [11]. Изменяется вязкость микроокружения встроенной в мембрану Na/K-АТФазы, что, нарушая взаимодействие между белками в олигомерных комплексах фермента, снижает его активность [3].

Изучив посредством определения МДА признаки перекисидации липидов мембраны консервированных эритроцитов, мы установили, что по отношению к базовому уровню концентрация МДА в плазме достоверно увеличилась на 7-е сутки хранения консервированной «СРДА-1» крови. К концу срока наблюдения данный показатель возрос в 4,8 раза (рис. 1).

Таким образом, окислительные изменения мембраны эритроцитов очевидны. Поэтому ожидаемым было снижение активности встроенной в мембрану Ca^{2+} -АТФазы, переносящей Ca^{2+} из цитозоля в плазму, с одновременной активацией кальциевых каналов, направляющих поток Ca^{2+} из плазмы в цитозоль, а также инактивация Na/K-АТФазы с последующим нарушением натрий-калиевого гомеостаза в консервированной крови. Изменение электрохимического градиента указанных катионов существенно влияет на устойчивость метаболизма в живой ткани [1, 4, 8]. В связи с этим нами были прослежены изменения содержания Na^+ ,

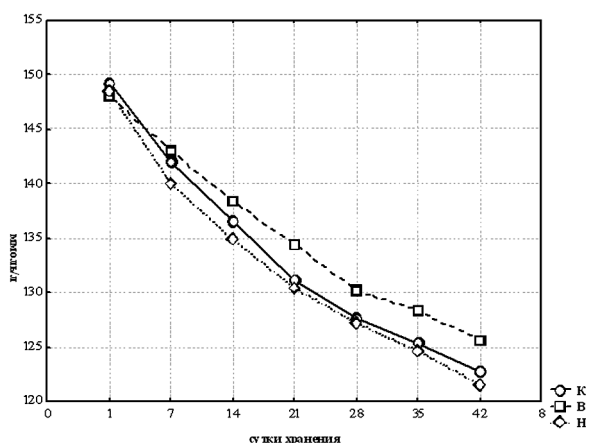


Рис. 2. Концентрация катионов натрия (ммоль/л) в плазме консервированной крови на этапах хранения.

K⁺ и Ca²⁺ на этапах хранения консервированной крови, как цельной, так и модифицированной, введением пиридоксина гидрохлорида и никотиновой кислоты.

В первые сутки после заготовки содержание Na⁺ в плазме всех групп образцов незначительно превышало установленную норму (табл. 1).

Это можно объяснить наличием в гемоконсерванте «CPDA-1» цитрата и дигидрофосфата натрия (190,78±2,71 ммоль/л Na⁺), что добавляет 12,02 ммоль Na⁺ на дозу консервированной крови, или 1 ммоль на одну аликвоту.

К 7-м суткам в плазме групп К, В и Н количество Na⁺ уменьшилось (p=0,0001). Очевидно, натрий по градиенту концентрации поступал в клетку, причиной чего были прогрессирующие в процессе хранения крови альтерационные изменения мембраны, следовательно, нарушения в ее функционировании (в частности, активного транспорта катионов) [3, 4]. На 21-е сутки впервые установлено, что проникновение Na⁺ в клетку в группе образцов В менее интенсивно, чем в группах К и Н; до 35-х суток достоверные различия сохранялись. На 42-е сутки достоверные различия по данному показателю между группами образцов К и В не

Таблица 2

Достоверность различий в концентрации внеэритроцитарного Na⁺ при применении витаминов в качестве добавок к консервированной крови

Пары сравнения	Доверительная вероятность		
	21-е сутки хранения крови	28-е сутки хранения крови	35-е сутки хранения крови
К-В	p=0,0066	p=0,0085	p=0,0316
Н-В	p=0,0014	p=0,0020	p=0,0092

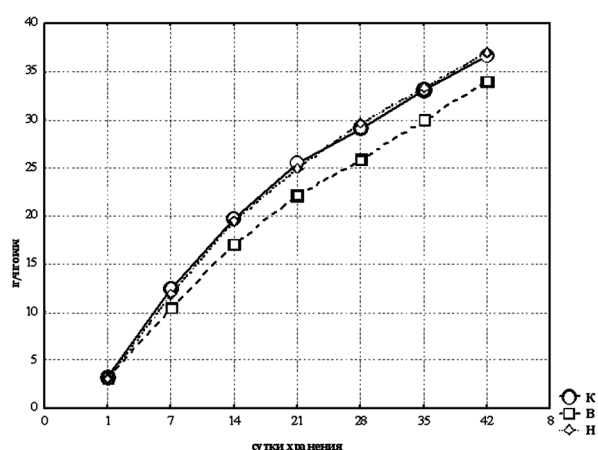


Рис. 3. Концентрация катионов калия (ммоль/л) в плазме консервированной крови на этапах хранения.

выявлены; в группе Н концентрация катионов натрия в плазме ниже, чем в группе образцов В; p=0,0080 (рис. 2, табл. 2).

Таким образом, витамин В₆ в период 21-28-е сутки оказывал на мембрану консервированного эритроцита стабилизирующее действие, снижая интенсивность поступления катионов натрия из плазмы в клетку.

В 1-е сутки наблюдения уровень катионов калия во всех исследуемых был образцах ниже нормы, установленной для крови человека. Это можно объяснить тем, что кровь разведена консервантом «CPDA-1», не содержащим калия (в 513 мл консервированной крови содержится 63 мл консерванта).

Уже к 7-м суткам установили повышение уровня катионов калия в плазме консервированной крови всех групп образцов. В последующем процесс прогрессировал, однако в плазме группы В в меньшей степени (табл. 3).

Таблица 3

Содержание калия в плазме, ммоль/л

Сутки хранения	Контроль, группа К	Добавка к гемоконсерванту	
		Вит. В ₆ , группа В	Вит. РР, группа Н
1	3,16±0,079	3,16±0,082	3,07±0,088*
7	12,36±0,613*	10,37±0,383* **	11,87±0,612*
14	19,63±0,860*	17,04±0,620* **	19,46±0,912*
21	25,48±1,104*	22,18±1,011* **	24,87±1,169*
28	29,00±0,962*	25,76±0,961* **	29,56±1,131*
35	33,04±1,020*	29,94±1,128* **	33,25±1,365*
42	36,68±0,963*	33,98±1,149*	37,03±1,169*

Примечания: * — p<0,05 в сравнении с показателем 1-х суток хранения; ** — p<0,05 в сравнении с группами К и Н.

Таблиця 4

Содержание кальция в плазме, ммоль/л

Сутки хранения	Контроль, группа К		Добавка к гемоконсерванту			
	M±m	p*	Вит. В ₆ , группа В		Вит. РР, группа Н	
			M±m	p*	M±m	p*
1	2,08±0,067		2,07±0,031		2,10±0,048	
7	2,06±0,027	0,8182	1,98±0,043	0,0938	2,01±0,020	0,1406
14	1,91±0,048	0,1009	2,00±0,013	0,0720	1,92±0,047	0,0236
21	1,43±0,178	0,0017	1,98±0,030	0,0587**	1,93±0,063	0,0405
28	2,00±0,029	0,3955	2,01±0,014	0,1219	2,00±0,076	0,2562
35	2,05±0,027	0,7924	2,02±0,033	0,2505	2,05±0,011	0,4090
42	2,17±0,051	0,3230	2,09±0,014	0,6601	2,22±0,026	0,0948

Примечания: * — в сравнении с показателем 1-х суток хранения; ** — $p < 0,05$ в сравнении с группами К и Н.

На этапах исследования различия между группами К и Н по уровню K^+ в плазме не выявлены, в то время как между группами К и В они достоверны (рис. 3).

Поскольку по показателю концентрации внеэритроцитарного калия можно судить об интактности мембраны консервированных эритроцитов [5, 6], можно утверждать, что витамин В₆, в отличие от витамина РР, в большей степени сохранял целостность клеток в период 7-е — 35-е сутки.

При изучении уровня катионов кальция в плазме сравниваемых образцов крови установили, что в группах К и Н в период 1-е — 21-е сутки концентрация Ca^{2+} снижалась (не исключено, что это связано с уменьшением трансмембранного градиента катионов Na^+ , способствующим входу Ca^{2+} в клетку) [17], в то время как в группе образцов В она имела тенденцию к снижению (табл. 4).

В дальнейшем (28-42-е сутки наблюдения) в плазме крови всех сравниваемых групп образцов концентрация Ca^{2+} имела тенденцию к повышению, что можно объяснить деструкцией клеток на поздних сроках хранения, а также на-

растающим по мере хранения консервированной крови разрушением связи «кальций — белок плазмы» [11].

Суммируя полученные данные, можно предположить, что пероксидация липидов мембраны дестабилизировала катионный гомеостаз в живой ткани, которой является консервированная кровь, а именно: нарушив функционирование мембраноассоциированных калий-натриевого и кальциевого насосов и активировав каналы, обусловила потерю консервированными эритроцитами калия с одновременным накоплением натрия и кальция.

Выводы

Пиридоксина гидрохлорид, в отличие от никотиновой кислоты, оказывает стабилизирующее действие на мембрану консервированного эритроцита, препятствуя нарушению баланса активного и пассивного транспорта катионов натрия, калия и кальция.

Введение пиридоксина в рецептуру гемоконсервантов могло бы повысить их качество, так как была бы усилена антиоксидантная защита клеток консервированной крови.

Литература

1. Антонов В.Ф. Мембранный транспорт // СОЖ. — 1997. — №6. — С. 14-20.
2. Белай И.М. Фармакодинамические эффекты никотиновой кислоты при гиперлипидемии в гериатрической практике // Украинский медицинский часопис. — 2000. — №3. — С. 102-104.
3. Болдырев А.А. Регуляция активности мембранных ферментов // СОЖ. — 1997. — №6. — С. 21-27.
4. Болдырев А.А. Na/K-АТФаза — свойства и биологическая роль // СОЖ. — 1998. — №4. — С. 2-9.
5. Варганов В.Я., Шифман Е.М., Линева О.И., Хуторская Н.Н. Интенсивная терапия при острой кровопотере в акушерской практике. — Тольятти, 1997. — 41 с.
6. Винарчик М.Й., Кондрацкий Б.О., Лотоцкий Р.М. та співавт. Морфофункціональна повноцінність крові, заготовленої на гемоконсерванті «Адглюоцит» // Гематологія і переливання крові. — 2004. — №32, ч.1. — С. 13-18.
7. Кармен Н.Б., Милютин Н.П., Орлов А.А. и соавт. Влияние плеторического введения перфторана на параметры структурно-функционального состояния мембран эритроцитов // Российский биомедицинский журнал. — 2004. — Т. 5. — С. 128-129.
8. Курята А.В., Гейченко В.П. Влияние возрастного фактора на состояние мембран эритроцитов и гормональный профиль у пациентов с гипертонической болезнью пожилого возраста // Укр. кардиол. журн. — 2002. — №1. — С. 53-57.

9. Лукина А.Н., Короткова Е.И., Карбаинов Ю.А. Исследование антиоксидантных свойств некоторых аскорбатов и смесей на их основе // *Материалы Международной научн. конф. «Химия и химическая технология на рубеже тысячелетий»*. — Томск, 2006. — С. 91-93.
10. *Медицинские лабораторные технологии: [Справочник] / Под ред. А.И.Карпищенко*. — С.-Пб.: Интермедика, 1998. — Т. 1. — 654 с.
11. Малыш П.Н. Биохимические, структурно-функциональные и метаболические изменения консервированной крови человека в процессе хранения при позитивной температуре. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Луганск, 2008. — 38 с.
12. Харьков А.Л. Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы после классических, мини-инвазивных и комбинированных пластических операций // *Український медичний часопис*. — 2006. — №3(53). — С. 102-105.
13. Тимен Л.Я., Шерцингер А.Г., Мачнева Т.В. и соавт. Аскорбиновая кислота и глюкоза в коррекции процессов свободнорадикального окисления. (Экспериментальное исследование. Ч. 2) // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. — 2006. — №2. — С. 52-58.
14. Arun P., Padmakumaran Nair K.G., Manojkumar V. Decreased hemolysis and lipid peroxidation in blood during storage in the presence of nicotinic acid // *Vox Sang.* — 1999. — №76. — P. 220-225.
15. Aslan R., Sekeroğlu M.R., Tarakçıoğlu M. et al. Investigation of malondialdehyde formation and antioxidant enzyme activity in stored blood // *Haematologia (Budap)*. — 1997. — №28. — P. 233-237.
16. Dumaswala U.J., Zhuo L., Jacobsen D.W. et al. Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: role of glutathione // *Free Radic. Biol. Med.* — 1999. — №27. — P. 1041-1049.
17. Frank J.S., Mottino, G., Reid, D., Molday, R., and Philipson, K.D. Distribution of the Na⁺/Ca⁺⁺ exchange protein in mammalian cardiac myocytes: an immuno-fluorescence and immuno-colloidal gold-labeling study // *J. Cell. Biol.* — 1992. — №117. — P. 337-345.
18. Korgun D.K., Bilmen S., Yesilkaya A. Alterations in the erythrocyte antioxidant system of blood stored in blood bags // *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* — 2001. — Vol. 109. — №5-6. — P. 357-363.
19. Lesgards J.F., Lehucher-Michel M.P., Vidal N. et al. Assessment of antioxidative activity of lipid- and water-soluble vitamins in human whole blood. Comparative analysis between a biological test and chemical methods // *Int J Vitam Nutr Res.* — 2005. — №75. — P. 11-18.
20. Suliman M.E., Filho J.C.D., Barány P. Effects of High-Dose Folic Acid and Pyridoxine on Plasma and Erythrocyte Sulfur Amino Acids in Hemodialysis Patients // *J Am Soc Nephrol.* — 1999. — №10. — P. 1287-1296.
21. Tietz N.W. (ed.) *Fundamentals of Clinical Chemistry*. 2nd ed. — Philadelphia: WB. Saunders, 1976. — P. 875-877.

П.М.Малиш, О.В.Фролова, С.В.Коваленко, О.Л.Торопцева, Ю.Г.Джевага, В.Я.Гусакова. Вітаміни-антиоксиданти: чи можуть вони подовжити строк життя консервованого еритроцита? Луганськ, Україна.

Ключові слова: консервована кров, еритроцит, піридоксину гідрохлорид, ніотинова кислота, антиоксидант.

Досліджено вплив вітамінів на здатність консервованого еритроцита до здійснення трансмембранного переносу катіонів по мірі «старіння». Встановлено, що піридоксину гідрохлорид, на відміну від ніотинової кислоти, справляє стабілізуючу дію на мембрану консервованого еритроцита, перешкоджаючи порушенню балансу активного й пасивного транспорту катіонів натрію, калію та кальцію.

P.N.Malysh, E.V.Frolova, S.V.Kovalenko, E.L.Toroptseva, Yu.G.Dzhevaga, V.Ya.Gusakova. The vitamins-antioxidants: can they prolong the period of life of conserved erythrocyte? Lugansk, Ukraine.

Key words: conserved blood, erythrocyte, pyridoxine hydrochloride, nicotine acid, antioxidant.

Vitamin's influence on ability of stored erythrocytes to realization of cationic transmembrane transport with aging has been researched. It has been fixed, that pyridoxine hydrochloride, in contrast to nicotine acid, make stable effect on stored erythrocytes membrane, preventing disorders of active and passive transport balance of sodium, potassium and calcium cations.

Надійшла до редакції 01.03.2010 р.