

which treated from August till October 2007, long-term (more than 96 hours) mechanical ventilation and weaning from the respirator using the technique of T-piece device. Given the complexity and duration criteria for weaning, the first group (successful weaning) included 29 (61,7%) patients, a group of difficult weaning (second team) — 10 (21,3%) in group long-term weaning — 8 (17,0%) patients. Among patients II and III of excommunication was no significant difference in duration of mechanical ventilation, but the lethality of prolonged weaning patients (group III) is almost double that in patients with difficult weaning group (group II) — 20,0% and 37,5%, respectively ($p < 0,001$). The frequency of successful weaning in patients enrolled in this study, was 53,2%, the need for reintubation the resumption of mechanical ventilation occurred in 31,9% of patients. The main factor influencing the mortality rates of patients were duration of mechanical ventilation and failed weaning.

Надійшла до редакції 22.09.2011 р.

© Український журнал екстремальної медицини імені Г.О.Можасєва, 2011
УДК 591.11.01: 664.162

Консервированный тромбоцит: метаболизм глюкозы

П.Н.Малыш, Е.В.Фролова, С.А.Кондрашев,
Н.Б.Щеголева, С.В.Коваленко

ГЗ «Луганский государственный медицинский университет» (ректор — профессор В.К.Ивченко),
КП «Луганская станция переливания крови —
областной центр службы крови» (главный врач — Е.В.Фролова)
Луганск, Украина

В обмене углеводов консервированного тромбоцита возможен такой метаболический путь, как неоглюкогенез, интенсифицирующийся при введении во взвешивающую тромбоциты среду (плазму, дополнительный раствор) глюкогенных аминокислот.

Ключевые слова: тромбоцит, глюкоза, лактат, неоглюкогенез, гликогенолиз.

Введение

Установлено, что тромбоциты способны к размножению [3, 19]. Исследователи наблюдали процессы образования цепочек тромбоцитов в компонентах донорской крови, где клетки сохраняли способность к размножению в течение нескольких суток после заготовки [19]. Наши исследования подтвердили возможность размножения тромбоцитов *in vitro* [4]. Известно, что тромбоцитам присущ активный метаболизм углеводов. Доказано наличие у них таких метаболических путей, как гликолиз, пентозный цикл, цикл Кребса [1, 2, 12, 17]. Изучен метаболизм гликогена тромбоцитов — гликогенез и гликогенолиз [13]. В отношении же глюконеогенеза в доступных для ознакомления литературных источниках приведены разноречивые данные — как об активном осуществлении тромбоцитами его механизмов [14-16], так

и об их незначительности и отсутствии сходства с механизмами глюконеогенеза в клетках печени (почек, скелетной мускулатуры) [18].

Целью исследования было оценить состояние метаболизма углеводов, размножающихся *ex vivo* тромбоцитов посредством изучения потребления ими глюкозы и образования лактата.

Материалы и методы исследования

Исследовали тромбоконцентрат, выделенный из венозной крови группы 0(I) 25 доноров-мужчин в возрасте 20-36 лет. Использованы контейнеры из поливинилхлорида с гемоконсервантом «CPDA-1» производства ZPSM «RAVIMED», Польша; суспендирующий раствор SSP+ производства «MacoPharma Mouvaux», Франция; изготовленные из поли-

Амінокислоти, внесені в образці 2 і 4 груп досліджуваних тромбоцитів

Найменування амінокислоти	Содержание в растворе «Нефротект», г/л	Содержание в образцах тромбоцитов групп 2 и 4, г/л
L-аланин	6,20	0,124
L-аргинин	8,20	0,164
L-цистеин	0,40	0,008
L-валин	8,70	0,174
L-гистидин	9,80	0,196
Глицин	5,305	0,106
Глицил-L-тирозин	3,155	0,063
L-изолейцин	5,80	0,116
L-лейцин	12,80	0,256
L-лизин	12,00	0,240
L-метионин	2,00	0,040
L-пролин	3,00	0,060
L-серин	7,60	0,152
L-тирозин	0,60	0,012
L-треонин	8,20	0,164
L-триптофан	3,00	0,060
L-фенилаланин	3,50	0,070

стирала стерилизованні радіаційним методом пробирки (Spektar, Сербія) і наконечники к мікродозаторам (Thermo Electron Oy, Фінляндія).

Взяті в опыт: 1 група образців — тромбоконцентрат в 100%-й аутологічній плазмі; 2 група образців — тромбоконцентрат в 100%-й аутологічній плазмі з додаванням амінокислот, входять в склад розчину для інфузій «Нефротект» (FRESENIUS KABI, Австрія) (табл. 1); 3 група образців — тромбоконцентрат во взвешиваючому розчині SSP+ з 20%-й аутологічній плазмі; 4 група образців — во взвешиваючому розчині SSP+ з 20%-й аутологічній плазмі з додаванням вказанного в таблиці кількості амінокислот.

Розрахунок вмісту тромбоцитів в образцях, приготуєних для порівняльного дослідження, показав, що виборочне середнє значення PLT в обох групах образців становило $(379,54 \pm 21,26 * 495,92 \pm 33,70) * 10^9/л$, що відповідає параметрам тромбоконцентрата, заготовленого з використанням сепаратора кліток крові, а саме від $200 * 10^9$ до $800 * 10^9$ тромбоцитів [7].

Поскольку описан процесс включения амінокислот в контрактильні білки тромбоцитів [9], вказані вище амінокислоти були додані в інкубат з метою надання «будівельного матеріалу» для білкових компонентів нових кліток.

Образці в течение 5 суток інкубували при температурі $+22 \pm 0,2^\circ C$ в настільному пристрої встряхивания пластинок HELMER систе-

ми хранения тромбоцитів PC100 (HELMER LABS, USA and CANADA). Тестирование образцов осуществляли ежедневно.

Контроль количества тромбоцитів в образцах осуществляли на основании показателей автоматического гематологического анализатора HB-7021 (SINNOWA Medical Science & Technology Co., LTD, Китай).

Уровень глюкозы во взвешивающей тромбоциты среде определяли с использованием диагностического набора «Глюкоза-Ф» (Филисит-диагностика, Україна).

Уровень лактата в инкубате определяли с использованием диагностического набора «Lactate mono» (AUDIT DIAGNOSTICS, Ирландия).

Морфологические исследования тромбоцитів осуществлялись с использованием мик-

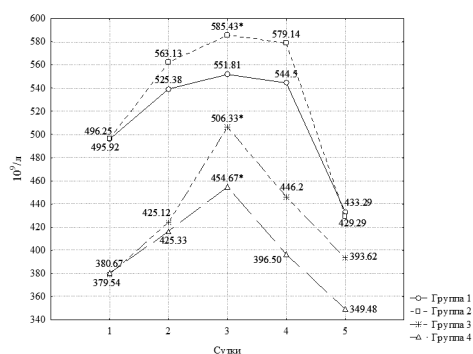


Рис. 1. PLT в испытываемых образцах.

Примечание: * — $p < 0,05$ в сравнении с показателем 1 суток наблюдения.

Таблиця 2

Содержание глюкозы во взвешивающей тромбоциты среде, ммоль/л

Сутки наблюдения	Группы образцов			
	1	2	3	4
1	23,630±0,587	22,120±0,937	7,408±0,447	6,596±0,746
2	23,468±0,689	22,059±0,637	6,824±0,288	5,835±0,567
3	22,266±0,872	21,161±0,772	6,675±0,381	5,406±0,674
4	21,929±0,697	21,025±0,808	6,277±0,593	4,722±0,873
5	20,565±0,753*	19,126±0,998*	5,698±0,755*	4,192±0,903*

Примечание: * — $p < 0,05$ в сравнении с показателем 1-х суток наблюдения.

роскопа для морфологических исследований MICROmed XS-3330 (Ningbo Shenghend Optics & Electronics Co., LTD, Китай), цветной цифровой видеокамеры SAMSUNG SCC-B1011 (Samsung Electronics, Корея), увеличение в 1600 крат. Окраска тромбоцитов в мазках производилась по А. Фонио [6]. Снимки сделаны на 3-и сутки наблюдения.

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета программы Statistica v.8. Для оценки достоверности различий в сравниваемых показателях использовали 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: M — средняя арифметическая, m — ошибка репрезентативности (средняя ошибка для средних или относительных величин), r — коэффициент корреляции, p — доверительная вероятность.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенные исследования показали рост числа тромбоцитов (PLT) в первые 3 суток наблюдения (рис. 1).

В 1 группе образцов отмечалась тенденция к увеличению показателя PLT, во 2, 3, 4 группах—

достоверный рост числа тромбоцитов ($p=0,0463$, $0,0280$ и $0,0344$ соответственно). Следовательно, имела место репродукция тромбоцитов.

На 4-е сутки появилась тенденция к снижению PLT. К 5-м суткам в образцах 1, 2 и 4 групп количество тромбоцитов было ниже по отношению к исходному на 14,7%, 17,42% и 6,03% соответственно, а в образцах 3 группы— на 1,92% выше, хотя статистически достоверность различий не установлена.

Поскольку данные литературы свидетельствуют о том, что новые пластинки идентичны родительским по морфологии и функциональной активности [3, 19, 20], было ожидаемым, что «потомкам» присущ активный метаболизм углеводов. Изучили изменения уровня глюкозы во взвешивающей тромбоциты среде, которая изначально содержала большое количество данного углевода, поскольку гемоконсервант, на котором заготавливалась донорская плазма со взвешенными в ней тромбоцитами, содержал 161 ммоль/л глюкозы, что создавало ее избыточное количество (10,1 ммоль) в дозе донорской крови, обеспечивающее поддержание эффективных концентраций интермедиатов углеводного метаболизма клеток крови.

Установили, что с 1-х по 4-е сутки уровень глюкозы во всех группах образцов имел тенденцию к снижению и лишь на 5-е сутки снизился достоверно (табл. 2).

Очевидно, глюкоза окружающей среды была включена клетками в метаболический пул уг-

Таблиця 3

Содержание лактата во взвешивающей тромбоциты среде, ммоль/л

Сутки наблюдения	Группы образцов			
	1	2	3	4
1	2,671±0,180	2,171±0,218	1,419±0,113	1,255±0,179
2	3,471±0,256*	2,739±0,450	2,084±0,273*	1,606±0,330
3	4,682±0,627*	3,181±0,898	3,412±0,948*	2,641±1,028
4	5,457±0,466*	3,692±0,573*	3,964±0,414*	3,047±0,521*
5	6,708±0,981*	5,587±1,321*	6,081±1,309*	4,870±1,527*

Примечание: * — $p < 0,05$ в сравнении с показателем 1-х суток наблюдения.

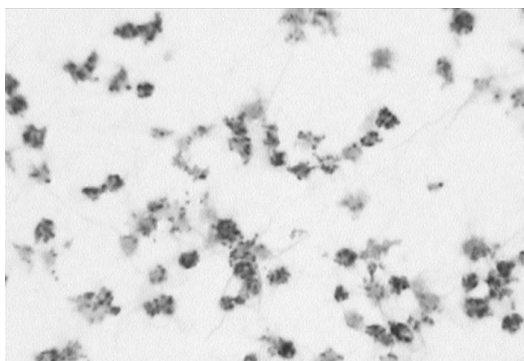


Рис. 2. Тромбоциты в цепочке из 10-ти клеток.

леводов к 5-м суткам, а на протяжении предшествующего периода практически не расходовалась. Очевидно, в это время катаболизм глюкозы обеспечивался внутриклеточным ее пулом, а также гликогеном, содержащимся в тромбоцитах в виде в-гранул [1, 2].

Предполагалось, что между показателями потребления глюкозы и образования лактата (как конечного продукта анаэробного гликолиза, присущего тромбоцитам) будет выявлена корреляционная связь. Однако динамика уровня лактата в инкубате оказалась иной (табл. 3).

В 1-й и 3-й группах образцов содержание лактата достоверно увеличилось уже на 2-е сутки наблюдения, что свидетельствовало об активно протекающем гликолизе. Во 2 и 4 группах образцов уровень лактата возрос лишь к 4-м суткам. Поскольку в последние две группы образцов были добавлены аминокислоты, можно было предположить, что образовавшийся в ходе гликолиза

лактат использовался в метаболизме тромбоцитов, возможно, в ходе глюконеогенеза (известно, что лактат, наряду с глюконеогенными аминокислотами, относится к главным субстратам данного метаболического пути [5]). Это предположение косвенно объясняет незначительный расход глюкозы в период с 1-х по 4-е сутки.

Поскольку известна способность лактата индуцировать клеточную пролиферацию [8, 10, 11, 21], мы не исключаем вклад данной регуляторной молекулы в процесс репродукции тромбоцитов, который описан в литературе [3, 19, 20], и который мы наблюдали в ходе исследования (рис. 2).

Приведенный в статье снимок, сделанный на 3-и сутки хранения тромбоконцентрата, подтверждает данные Н. Schwertz., А. S. Weyrich (2010) об образовании цепочек («бус») [20] в процессе размножения тромбоцитов.

Выводы

Консервированный тромбоцит — самодостаточная клетка донорской крови, способная к репродукции и эффективному осуществлению метаболизма углеводов за счет внутриклеточных пулов глюкозы и гликогена в течение 3-х суток. В обмене углеводов консервированного тромбоцита не исключен такой метаболический путь, как неоглюкогенез, по своему механизму, возможно, отличающийся от такового в печени, почках, мышечных клетках, интенсифицирующийся при введении во взвешивающую тромбоциты среду (плазму/суспендирующий раствор) глюконеогенных аминокислот.

Литература

1. Вашкинел В.К., М.Н. Петров. Ультраструктура и функция тромбоцитов человека. — Ленинград: Наука, Ленинградское отделение, 1982. — 88 с.
2. Коркушко О.В., Лишневецкая В.Ю. Тромбоциты: физиология, морфология, возрастные и патологические особенности, антитромбоцитарная терапия. — Киев: Медкнига, 2011. — 240 с.
3. Лифановский М.В., Ульман В.А. Размножение тромбоцитов. — Калининград: Калинингр. кн. изд-во, 1994. — 71 с.
4. Малыш П.Н., Кондрашев С.А., Фролова Е.В. и соавт. Размножаются ли тромбоциты in vitro? // Світ медицини та біології. — 2011. — №3. — С. 16-21.
5. Марри Р., Греннер Д., Мейес П. и соавт. Биохимия человека. В 2-х т. — М.: Мир, 1993. — 795 с.
6. Медицинские лабораторные технологии: [Справочник] / Под ред. А.И. Карпищенко. — Санкт-Петербург: Интермедика, 1998. — Т.1. — 407 с.
7. Чугрієв А.М., Терещук Т.О. Контроль якості концентрату тромбоцитів, отриманого методом переривчастого аферезу / Гемостаз — проблеми та перспективи: Мат. II Між нар. симпозіуму (8-9 листопада 2006 р.). Київ, 2006 // Гематологія і переливання крові. — 2006. — №33. — С. 148.
8. Шатова О.П., Трунова О.А. Зинкович И.И. Влияние лактата на миграционную активность лейкоцитов периферической крови // Університетська клініка. — 2010. — Т.6, №1-2. — С. 49-51.
9. Vooyse F, Rafelson ME Jr. In vitro incorporation of amino-acids into the contractile protein of human blood platelets // Nature. — 1967. — Vol. 215. — №98. — P. 283-284.
10. Gladden L. B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium // The Journal of Physiology. — Vol. 558. — №1. — P. 5-30.
11. Hunt T.K., Aslam R.S., Beckert S. Aerobically derived lactate stimulates revascularization and tissue repair via redox mechanisms // Antioxid. Redox. Signal. — 2007. — Vol. 9. — №8. — P. 1115-1124.

12. Karpatkin S. Studies on human platelet glycolysis. Effect of glucose, cyanide, insulin, citrate, and agglutination and contraction on platelet glycolysis // Journal of Clinical Investigation. — 1967. — Vol. 46. — №3. — P. 409-417.
13. Karpatkin S., Charmatz A. Heterogeneity of Human Platelets III. Glycogen metabolism in platelets of different sizes // British Journal of Haematology. — 1970. — Vol. 19. — №2. — P. 135-143.
14. Karpatkin S., Charmatz A., Langer R.M. Glycogenesis and Glyconeogenesis in Human Platelets. Incorporation of glucose, pyruvate, and citrate into platelet glycogen; glycogen synthetase and fructose-1,6-diphosphatase activity // Journal of Clinical Investigation. — 1970. — Vol. 49. — P. 140-149.
15. Karpatkin S., Strick N. Heterogeneity of Human Platelets. V. differences in glycolytic and related enzymes with possible relation to platelet age // Journal of Clinical Investigation. — 1972. — Vol. 51. — P. 1235-1243.
16. Levinthal G.N., Tavill A.S. Liver disease and diabetes mellitus // Clinical diabetes. — 1999. — Vol. 17. — №2. — P. 1-20.
17. Lisovskaya I.L., Volkova R.I., Markosyan R.A. Effect of high concentrations of glucose on platelet aggregation // Bulletin of Exp. Biol. Med. — 1974. — Vol. 78. — №4. — P. 1114-1117.
18. Schrijver J. Insignificance of gluconeogenesis in human blood platelets // Eur.J.Clin.Invest. — 1975. — Vol. 5. — №1. — P. 7-14.
19. Schwertz H., Blaylock R.C., Kraiss L. W. et al. Terminally-differentiated anucleate platelet progeny: Режим доступа: <http://www.sumobrain.com/patents/wipo/Terminally-differentiated-anucleate-platelet-progeny/WO2010042179A1.pdf>
20. Schwertz H., Kuster S., Kahr W. H. A. et al. Anucleate platelets generate progeny // Blood. — 2010. — №115. — P. 3801-3809.
21. Sola-Penna M. Metabolic regulation by lactate // Life. — 2008. — Vol. 60. — №9. — P. 605-608.

П.М.Малиш, О.В.Фролова, С.О.Кондрашев, Н.Б.Щоголева, С.В.Коваленко. Тромбоконцентрат: метаболізм глюкози. Луганськ, Україна.

Ключові слова: тромбоцит, глюкоза, лактат, неоглюкогенез, глікогеноліз.

В обміні вуглеводів консервованого тромбоцита можливий такий метаболічний шлях, як неоглюкогенез, що інтенсифікується при введенні в зв'язуючи тромбоцити середовище (плазму, додатковий розчин) глюкогенних амінокислот.

P.N.Malysh, E.V.Frolova, S.A.Kondrashev, N.B.Shchogoleva, S.V.Kovalenko. Conservated platelet: glucose metabolism. Lugansk, Ukraine.

Key words: platelet, glucose, lactate, neoglucogenesis, glycogenolysis.

It is possible in carbohydrate metabolism of conservated platelet such metabolic way as neoglucogenesis, which intensify when to environment of platelets (the plasma, additive solution) glucogenic amino acids are introduced.

Надійшла до редакції 03.11.2011 р.