

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ МУТАЦИОННОГО ПРОЦЕССА, ЧТО ПРИВОДИТ К МАЛИГНИЗАЦИИ КЛЕТОК

Т. Кочарова, В. Книгавко, М. Бондаренко, Л. Батюк

Харьковский национальный медицинский университет

пр. Ленина, 4, Харьков 61022, Украина,

e-mail: vknig@mail.ru

При решении задачи математического описания канцерогенеза предполагается, что ключевой причиной канцерогенеза является наличие повреждения в клетке некоторого количества (в разных источниках – от 6 до 8) определенных генов, отвечающих за репарацию поврежденных ДНК. На основе математического моделирования процесса малигнизации клеток были получены формулы расчета таких характеристик этого процесса, как плотность вероятности, функция распределения времени малигнизации, среднее и наиболее вероятное значение времени образования злокачественной опухоли.

Доказано, что вероятность времени образования опухоли существенно различается у людей, имеющих в генотипе различные значения количества неповрежденных генов в клетке при рождении.

Ключевые слова: канцерогенез, генотип, повреждение а-генов, время малигнизации клеток.

УДК 576.32.6

ВПЛИВ ЧАСУ ЗБЕРІГАННЯ ДОНОРСЬКОЇ КРОВІ ТА АНТИКОАГУЛЯНТІВ НА КИСЛОТНИЙ ГЕМОЛІЗ ЕРИТРОЦИТІВ І АГРЕГАЦІЮ ТРОМБОЦИТІВ

Т. Шаталова, О. Горобченко, О. Ніколов, С. Гаташ

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

пл. Свободи, 4, Харків 61022, Україна

e-mail: Shatalova_ta@mail.ru

У роботі досліджено вплив різних антикоагулянтів і часу зберігання донорської крові на кислотний гемолиз еритроцитів і індуковану агрегацію тромбоцитів. Встановлено, що кислотна резистентність еритроцитів, досліджених в день забору крові, не залежить від антикоагулянту, на відміну від показників агрегації тромбоцитів цієї ж крові. Швидкість агрегації тромбоцитів була меншою в разі використання в якості антикоагулянту глюгіциру. Під час зберігання зразків крові протягом тижня кислотна резистентність обох зразків зменшується відносно початкових показників і відмінність між антикоагулянтами стає більш помітною, що свідчить про їх різний вплив на цілісність мембран еритроцитів під час зберігання.

Ключові слова: кислотний гемолиз еритроцитів, еритрограма, агрегація тромбоцитів.

При підготовці до забору крові для дослідження слід враховувати той факт, що різні речовини, які використовуються в якості антикоагулянтів, можуть впливати на клітини крові і змінювати їх властивості. На якість зберігання крові може впливати механізм дії антикоагулянту і його складових, невідповідність його концентрації обсягу взятої для дослідження крові, недостатнє його змішування з кров'ю, тривалість зберігання зразків крові, а також вплив внутрішніх чинників, обумовлених гомеостатичними параметрами крові донора [5, 6, 24].

Оскільки у низці робіт виявлено залежність фізико-хімічних властивостей крові та її компонентів від фізичних та хімічних чинників [19, 21–23], вивчення впливу різних антикоагулянтів і тривалості зберігання крові на еритроцити і тромбоцити є актуальним. Наявність кореляції між зміною властивостей мембран еритроцитів і клітинних мембран внутрішніх органів [6, 8] дозволяє використовувати показник резистентності еритроцитів в якості інтегральної характеристики стану клітинних мембран організму в цілому [2]. Кислотна резистентність еритроцитів є одним з маркерів дестабілізації клітинної мембрани, тому часто використовується у наукових дослідженнях, особливо під час вивчення впливу лікарських препаратів на стан еритроцитів [12–14]. У стабілізованій різними антикоагулянтами донорській крові цей показник вивчений недостатньо. У зв'язку з цим, метою цього дослідження було проаналізувати вплив антикоагулянтів, що використовуються найбільш часто – глюгіциру і цитрату натрію, а також часу зберігання крові на кислотний гемоліз еритроцитів і індуквану агрегацію тромбоцитів.

Матеріали та методи

Перед проведенням дослідження нами були отримані еритрограми декількох практично здорових донорів. Незважаючи на те, що еритрограма здорових людей у нормі повинна бути стабільна і легко відтворювана [11], під час роботи з кров'ю донорів ми реєстрували значні відмінності, пов'язані, напевно, з індивідуальними особливостями організму людини. Тому, щоб уникнути похибок, пов'язаних з індивідуальними відмінностями донорів, ми відібрали одного практично здорового донора – чоловіка, основні показники еритрограми якого збігалися з показниками еритрограми здорової людини, наведеними в літературі [3, 4].

Дослідження проводилося безпосередньо у день забору крові, через добу і через тиждень. Кров стабілізувалася цитратом натрію і глюгіциром. Зразки крові зберігалися при температурі +4°C. Кожен приготований зразок вимірювали три рази. На рисунках представлена усереднена за трьома вимірюваннями еритрограма зі стандартними відхиленнями відповідно з рівнем значущості $p < 0,05$.

Агрегація тромбоцитів досліджувалася методом турбідиметрії [9]. Оптичну щільність (D) збагаченої тромбоцитами плазми (ЗТП) до і після додавання індуктора агрегації вимірювали за допомогою фотоелектроколориметра ФЕК-М з зеленим світлофільтром (максимум світлопропускання $\lambda = 540$ нм), а зміну D реєстрували автоматичним

потенціометром ЕПП-09М [17, 18]. ЗТП виділяли зі стабілізованої цитратом натрію і глюгіциром крові шляхом центрифугування протягом 10 хв при 167 g [9]. Агрегацію тромбоцитів викликали додаванням до 0,9 мл ЗТП 0,1 мл розчину індуктора. В якості індуктора використовувалася аденозин-5'-ди-фосфорної кислоти динатрієва сіль (АДФ) в концентрації 2×10^{-5} моль/л виробництва фірми «Реанал» (Угорщина) [1]. Кислотний гемоліз еритроцитів спричиняли додаванням соляної кислоти концентрації 0,004 N, розчиненої у 0,9% NaCl. Зміну D реєстрували за допомогою фотоелектроколориметра ФЕК-М з червоним світлофільтром (максимум світлопропускання $\lambda=740$ нм).

Розрахунок частки еритроцитів (%E), що розпалися за проміжок часу t, проводили за формулою:

$$\% E = \frac{D_i - D_{i-1}}{D_0 - D_\infty} \times 100 \%$$

де D_0 і D_∞ – початкові і кінцеві значення оптичної щільності, i – порядковий номер вимірювання. Для поліпшення умов взаємодії клітин одна з однією і запобігання їх седиментації суспензію рівномірно перемішували за допомогою механічної мішалки.

Результати і їхнє обговорення

Результати проведеного дослідження показали, що резистентність еритроцитів залежить як від тривалості зберігання крові, так і від застосованого в експерименті антикоагулянту.

Аналіз кислотних еритрограм проводився за наступними показниками: тривалість гемолізу, пік гемолізу, ширина інтервалу домінуючої групи еритроцитів у популяції.

У здорових донорів еритрограма легко відтворювана, одноверхова, відсутня суворасиметричність, яка свідчить про деяку гетерогенність популяції еритроцитів. Вершина еритрограм розташована на 3-ій хв. Тривалість гемолізу складає 6,5 хв. Розтягування і підйом

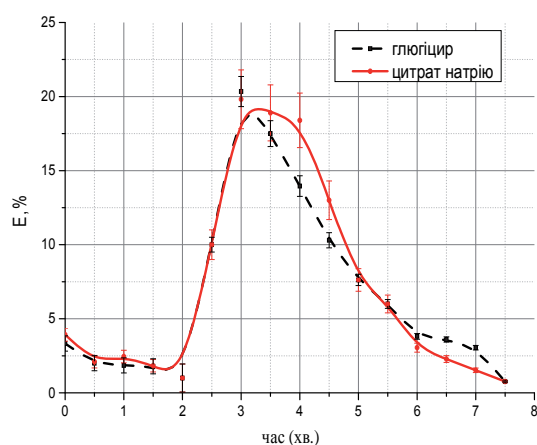


Рис. 1. Еритрограма суспензій еритроцитів крові, стабілізованої цитратом натрію і глюгіциром, отримана у день забору крові.

правої гілки еритрограми вказує на присутність у кров'яному руслі молодих форм еритроцитів, що є результатом помірного напруження еритропоезу [11, 15].

На рис. 1 представлені криві гемолізу еритроцитів крові, стабілізованої різними антикоагулянтами, у день забору крові. Спадання на еритрограмі (рис. 1) протягом перших 2 хв відповідає процесу сферуляції, тобто переходу еритроцитів з двояковигнутої в сферичну форму в результаті набухання, що передуює їх руйнуванню [3, 11]. Еритрограми

гемолізу, незалежно від антикоагулянту, що використовувався, мають один пік; ширина інтервалу, точки початку і кінця гемолізу в межах похибки збігаються, що свідчить про те, що за минулий період антикоагулянт не вплинув на клітини крові, і мембрани еритроцитів піддавалися впливу тільки гемолітика [4]. З цього можна припустити, що при дослідженні резистентності еритроцитів до кислотного гемолізу допустимо порівнювати результати, отримані на зразках крові, стабілізованій різними антикоагулянтами, за умови дотримання

всіх інших умов проведення експерименту.

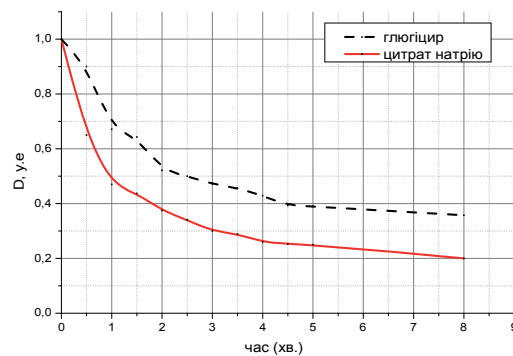


Рис. 2. Агрегація ЗТП крові, стабілізованої цитратом натрію і глюгіцином.

Паралельно, для порівняння впливу антикоагулянту на здатність консервантів до збереження функціональної повноцінності клітин проводилася індукована агрегація тромбоцитів тієї ж крові (рис. 2). Як видно з рис. 2, криві агрегації тромбоцитів зразків крові, стабілізованої різними антикоагулянтами, відрізняються, на

відміну від кривих гемолізу еритроцитів тих же зразків. При активації тромбоцитів АДФ відбувається утворення кальцієвих іонофорів і зміна регуляції рівня циклічного аденозинмонофосфату і проникності плазматичної мембрани, що призводить до збільшення в цитоплазмі концентрації вільних іонів Ca_2^+ [7, 9, 20, 25]. Фармакологічна дія глюгіциру заснована на зв'язуванні Ca_2^+ та запобіганні гемо коагуляції *in vitro*. Декстроза, що міститься в препараті, служить енергетичним субстратом. Оскільки швидкість агрегації тромбоцитів вище у ЗТП, отриманої з крові, стабілізованої цитратом натрію, можна припустити, що глюкоза, яка міститься у зразку стабілізованої глюгіциром крові, уповільнює процес агрегації тромбоцитів.

На рис. 3. представлені еритрограми суспензій еритроцитів після добового зберігання крові, стабілізованої цитратом натрію і глюгіциром. З рис. 3 видно, що добове зберігання крові призводить до появи двох максимумів, які свідчать про наявність двох груп еритроцитів, різних за стійкістю. Найімовірніше, зберігання сприяє появі невеликої кількості еритроцитів зі зниженою стійкістю, що призводить до їх розпаду протягом перших трьох хвилин.

Відмінності на еритрограмах перевищують межі відхилень, характерні для середньої

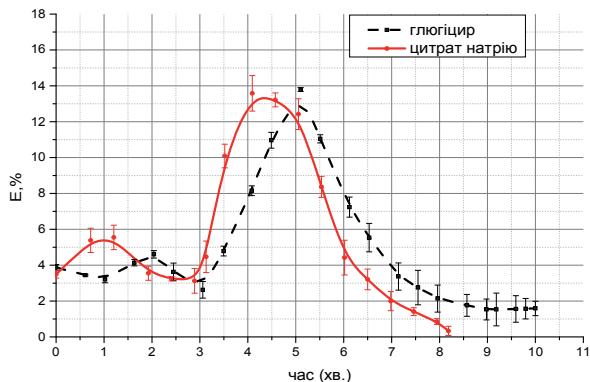


Рис. 3. Еритрограми суспензій еритроцитів крові, стабілізованої цитратом натрію і гліюглицером, після зберігання крові протягом доби.

еритрограми крові здорової людини [3, 4, 11]. При використанні гліюглицеру процес гемолізу еритроцитів на 1-ій хвилині, представлений на еритрограмі спаданням, відповідає перехідному стану суспензії (сферуляції), коли клітини вже придбали сферичну форму, але руйнування мембран еритроцитів ще не відбулося, тоді як еритроцити крові, стабілізованої цитратом натрію, розпадаються

відразу. Повний гемоліз обох зразків починається з третьої хвилини, однак ширина інтервалу і зрушення положення максимуму праворуч свідчить про те, що еритроцити крові, стабілізованої гліюглицером, мають більш високу резистентність.

На рис. 4 представлені еритрограми суспензій еритроцитів крові, стабілізованої цитратом натрію і гліюглицером після зберігання крові протягом тижня. Перш за все, слід

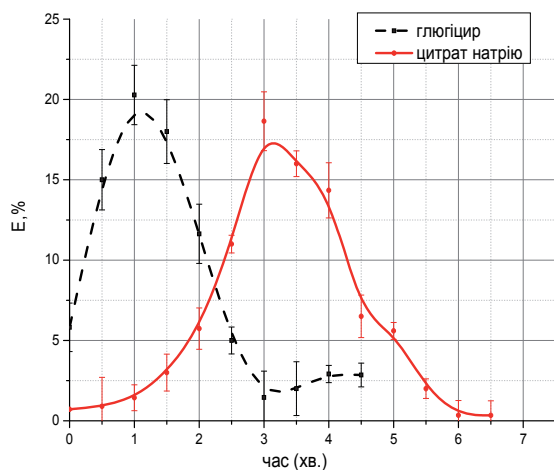


Рис. 4. Еритрограми суспензій еритроцитів крові, стабілізованої цитратом натрію і гліюглицером, після зберігання крові протягом 7 діб.

відзначити посилення відмінностей на еритрограмах у порівнянні з рис. 3. З рис. 4 видно, що точки початку і кінця гемолізу еритроцитів крові, стабілізованої гліюглицером, зміщені ліворуч, що свідчить про посилення розпаду еритроцитів. Відсутність спадання на початковому етапі часу, що характеризує процес сферуляції, на еритрограмі крові, стабілізованій гліюглицером, може свідчити про порушення клітинної геометрії, що підтверджується даними [5, 6]. Передчасне закінчення гемолізу (менше 6,5 хв) означає відсутність або

зменшення кількості еритроцитів високої стійкості. Зсув праворуч точок початку і кінця гемолізу, а також положення максимуму еритрограми крові, стабілізованої цитратом натрію

в порівнянні з аналогічними показниками еритрограми суспензій еритроцитів крові, стабілізованої глюгіциром, свідчить про їх більш високу резистентність.

Відомо, що дестабілізуючий вплив на мембрану консервованого еритроцита надає транслокація фосфоліпідів (ФЛ) внутрішнього моношару в зовнішній [10]. У роботах [5, 6] встановлено прогресуюче збільшення показників елюювання фосфатидилетаноламіну (ФЕ) і фосфатидилсерину (ФС) з мембрани еритроцита в плазму після тижневого зберігання крові, консервованої глюгіциром. Очевидно, в ході «старіння» еритроцитів відбувається транслокація ФЕ і ФС з внутрішнього моношару в зовнішній, що створює умови для втрати мембраною зазначених ФЛ, і проявляється у скороченні часу гемолізу. Зберігання крові протягом 7 діб призводить до істотних змін стану і форми еритроцитів, про що свідчить зміна форми еритрограм крові, стабілізованої обома консервантами.

Таким чином, проведені дослідження дозволяють зробити висновок, що при вивченні резистентності еритроцитів до кислотного гемолізу допустимо порівнювати результати, отримані на зразках крові, стабілізованої різними антикоагулянтами за умови їх зберігання не більше доби і дотриманні всіх інших умов проведення експерименту. Зберігання крові призводить до розпаду частини еритроцитів, що може привести до неправильного трактування отриманих результатів і викривлення кінцевого результату при порівнянні даних, отриманих на зразках, що зберігалися протягом різного періоду часу. Криві агрегації тромбоцитів, виділених з крові, стабілізованої різними антикоагулянтами, суттєво відрізнялися між собою. Швидкість агрегації тромбоцитів була меншою в разі використання в якості антикоагулянту глюгіциру.

При постановці експерименту, в якому використовуються еритроцити, проведення дослідження протягом доби після забору крові дозволяє уникнути помилок при підрахунку кількості та концентрації формених елементів крові у зразку і зменшити ймовірність спотворення кінцевого результату. При цьому в якості антикоагулянту можуть використовуватися як глюгіцир, так і цитрат натрію. При дослідженні фізико-хімічних характеристик еритроцитів, коли проведення експерименту припускає зберігання крові протягом 7 діб і більше, використання у якості антикоагулянту цитрату натрію є кращим у порівнянні з використанням глюгіциру. При постановці експерименту, в якому використовуються тромбоцити, доцільно вибирати якийсь один антикоагулянт.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Берест В. П., Гаташ С. В. Залежність агрегації тромбоцитів від температури // Фізіол. журнал. 1998. Т. 44. № 5–6. С. 89–94.
2. Галенок В. А., Гостинская Е. В., Диккер В. Е. Гемореология при нарушениях углеводного обмена. Новосибирск: Наука, 1987. 86 с.
3. Гительзон И. И. Состав красной крови в норме и патологии. Томск: Изд.Том.Ун-ту., 1960. 187 с.
4. Иванов И. Т. Сравнение механизмов кислотного и щелочного гемолиза эритроцитов человека // Биофизика. 2001. Т. 46. № 2. С. 281–290.
5. Малыш П. Н., Письменная Т. В., Гусакова В. Я. Механическая резистентность консервированных эритроцитов как показатель дестабилизации клеточной мембраны в процессе хранения // Укр. журнал екстремальної медицини імені Г.О. Можаяєва. 2009. Т. 10. № 1. С. 45–49.
6. Малыш П. Н. Некоторые показатели естественной защиты эритроцитов консервированной крови в условиях хранения при позитивной температуре // Укр. журнал екстремальної медицини імені Г.О. Можаяєва. 2008. Т. 9. № 4. С. 53–58.
7. Медведев И. Н., Савченко А. П. Механизмы функционирования тромбоцитарного гемостаза // Фундаментальные исследования. 2009. № 10. С. 28–30.
8. Покровский А. А., Черенкевич С. Н., Хмар Н. Ф. Липиды. Структура, биосинтез. Превращения и функции. М.:Наука, 1977. 118 с.
9. Самаль А. Б. Агрегация тромбоцитов: Методы изучения и механизмы. Минск: Университетское, 1990. 104 с.
10. Соловьев А. А., Юдицкий А. Д. Резистентность эритроцитов при действии инсулина и гидролитических ферментов. Современные научные исследования и инновации. – Ноябрь. 2012. – № 11 [Электронный ресурс]. URL: <http://web.snauka.ru/issues/2012/11/18169> (дата обращения: 18. 09. 2013).
11. Терсков И. А., Гительзон И. И. Метод химических (кислотных) эритрограмм // Биофизика. 1957. Т. 2. № 2. С. 259–266.
12. Федорова Т. Н., Беляев М. С., Трунова О. А. и др. Нейропептидкарнозин увеличивает устойчивость липопротеинов и эритроцитов крови и эффективность иммунокомпетентной системы у пациентов с хронической дисциркуляторной энцефалопатией // Биологические мембраны. 2008. Т. 25. № 6. С. 458–462.
13. Холодов Д. Б., Николаевский В. А., Резван С. Г. Изучение структурно-функциональных свойств мембран эритроцитов, модифицированных кеторолакаторометамином // Вестн. ВГУ. Химия. Биология. Фармация. 2009. № 1. С. 129–135.

14. Холодов Д. Б., Николаевский В. А., Шамарин С. Н. Молекулярные и клеточные механизмы действия натрия 2-[(2, 6-дихлор-фенил) амино] фенилсалицилат на клеточные мембраны // Сорбционные и хроматографические процессы. 2009. Т. 9. № 1. С. 137–146.
15. Черкесова Д. У., Рабаданова А. И. Сравнительное изучение кислотной резистентности эритроцитов при анемии и нитритной гипоксии // Известия Самарского науч. центра РАН. Влияние экологии на внутренние болезни. 2009. Т. 11. № 1(5). С. 1057–1059.
16. Черницкий Е. А., Воробей А. В. Структура и функции эритроцитарных мембран. Минск: Наука и техника, 1981. 216 с.
17. А. с. 663384 СССР, МКИ А 61 В 10/00, G 01 N 33/16. Способ определения функциональной активности тромбоцитов / С. В. Гаташ, К. М. Лакин, О. Т. Николов, Л. Д. Степин, Л. Н. Лебидь, Ю. Ф. Крылов, В. А. Макаров (СССР). – № 2583351/28; Заявлено 09. 03. 78; опубл. 25. 05. 79, Бюл. № 19. 2 с.
18. А. с. 874033 СССР, МКИ А 61 В 10/00. Способ определения агрегационной способности тромбоцитов / О. Т. Николов, С. В. Гаташ, К. М. Лакин, Л. Н. Лебидь (СССР). – № 2896639/28; Заявлено 27. 12. 79; опубл. 23. 10. 81, Бюл. № 39. 2 с.
19. Chien S., Jan K. M. Red cell aggregation by macromolecules: roles of surface adsorption and electrostatic repulsion // J. Supramolec. Struct. 1973. Vol. 1. N 4/5. P. 385–409.
20. Kalb M. L., Potura L., Scharbert G., Kozek-Langenecker S. A. The effect of *ex vivo* anticoagulants on whole blood platelet aggregation // Platelets. 2009. Vol. 20. P. 7–11.
21. Litt M., Korn R. E., Litt S. E. Theory and design of disposable clinical blood viscometer // Biorheology. 1988. Vol. 25. P. 697–712.
22. Maeda N., Suzuki Y., Tanaka J. et al. Erythrocyte flow and elasticity of microvessels evaluated by marginal cell free layer and resistance // Am. J. Physiol. 1996. Vol. 271. P. 2454–2461.
23. Marszalek P., Zielinsky J. J., Fikus M. et al. Determination of electric parameters of cell membranes by a dielectrophoresis method // Biophys. J. 1991. Vol. 59. P. 982–987.
24. O'Brien J. R., Shoobridge S. M., Finch W. J. Comparison of the effect of heparin and citrate on platelet aggregation // J. Clin. Path. 1969. Vol. 22. P. 28–31.
25. Schroit A. J., Zwaa R. F. A. Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes // Biochim. Biophys. Acta. 1991. Vol. 1071. P. 313–329.

Стаття: надійшла до редакції 03.06.14

доопрацьована 21.09.14

прийнята до друку 22.09.14

**EFFECT OF STORAGE TIME BLOOD AND ANTICOAGULANT ON ACID
ERYTHROCYTE HEMOLYSIS AND PLATELET AGGREGATION**

T. Shatalov, A. Gorobchenko, O. Nikolov, S. Gatash

V. N. Karazina Kharkiv National University

4, Svobody Sq., Kharkiv 61022, Ukraine

e-mail: Shatalova_ta@mail.ru

This paper covers the influence of different anticoagulants and blood storage time on the acid hemolysis of erythrocytes and induced platelet aggregation. It has been established that the acid resistance of erythrocytes examined daily blood sampling is independent on the anticoagulant unlike indexes of platelet aggregation of the same blood. Speed of platelet aggregation was lower in the case of use of glucicir as the anticoagulant. When the blood samples were stored for the week, the acid resistance of both samples are reduced relative to their original values, and the difference between the anticoagulant more noticeable, indicating that the integrity of the erythrocyte inappropriate storage.

Keywords: acid hemolysis, erythrogramma, platelet aggregation.

**ВЛИЯНИЕ ВРЕМЕНИ ХРАНЕНИЕ ДОНОРСКОЙ КРОВИ И АНТИКОАГУЛЯНТОВ
НА КИСЛОТНЫЙ ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ И АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ**

Т. Шаталова, О. Горобченко, О. Ніколов, С. Гаташ

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина

пл. Свободы, 4, Харьков 61022, Украина

e-mail: Shatalova_ta@mail.ru

В работе исследовано влияние различных антикоагулянтов и времени хранения донорской крови на кислотный гемолиз эритроцитов и индуцированную агрегацию тромбоцитов. Установлено, что кислотная резистентность эритроцитов, исследуемых в день забора крови, не зависит от антикоагулянта, в отличие от показателей агрегации тромбоцитов этой же крови. Скорость агрегации тромбоцитов была меньше в случае использования в качестве антикоагулянта глюгицира. При хранении образцов крови в течение недели кислотная резистентность обоих образцов уменьшается относительно первоначальных значений и различия между антикоагулянтами более заметны, что свидетельствует о различном влиянии их на целостность мембран эритроцитов при хранении.

Ключевые слова: кислотный гемолиз эритроцитов, эритрограмма, агрегация тромбоцитов.