

R

BỘ Y TẾ

BÁO CÁO KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ĐỀ TÀI CẤP BỘ

TÊN ĐỀ TÀI:
NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM CHUYỂN HOÁ
GLUCOSE HỒNG CẦU, KHẢ NĂNG CHỐNG
OXY HOÁ Ở NGƯỜI NHIỄM CHÌ, BỆNH NHÂN
TAN MÁU VÀ MÁU BẢO QUẢN

CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI: PGS.TS. VŨ THỊ PHƯƠNG
CƠ QUAN CHỦ TRÌ ĐỀ TÀI: TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI
CẤP QUẢN LÝ: BỘ Y TẾ

THỜI GIAN THỰC HIỆN: 2002 – 2004
TỔNG KINH PHÍ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI: 150 TRIỆU ĐỒNG

NĂM 2004

5454
1818105

CHỮ VIẾT TẮT

ACD	: Acid citric dextrose
AS	: Additive solution
ATP	: Adenosin triphosphat
CAT	: Catalase
CPD	: Citrat phosphat dextrose
2,3-DPG	: 2,3- Diphosphoglycerat
G6PD	: Glucose 6 phosphat dehydrogenase
GPx	: Glutathion peroxidase
GR	: Glutathion reductase
HCT	: Hồng cầu lưới
Hct	: Hematocrit
Hb	: Hemoglobin
HVĐTQ	: Hiển vi điện tử quét
HVQH	: Hiển vi quang học
KHC	: Khối hồng cầu
LDH	: Lactat dehydrogenase
MDA	: Malonyldialdehyd
MTP	: Máu toàn phần
NADH	: Nicotinamid adenin dinucleotid dạng khử
NADPH	: Nicotinamid adenin dinucleotid phosphat dạng khử
PK	: Pyruvat kinase
SAGM	: Salin adenin glucose manitol
SLHC	: Số lượng hồng cầu
SOD	: Superoxid dismutase
TAS	: Total antioxidant status

MỤC LỤC

Phần A: Tóm tắt các kết quả nổi bật của đề tài

1. Tóm tắt kết quả của đề tài.
2. Đánh giá việc thực hiện đề tài, đối chiếu với đề cương được duyệt.
3. Các ý kiến đề xuất.

Phần B: Nội dung báo cáo chi tiết kết quả nghiên cứu

Đặt vấn đề.....	1
Chương 1: Tổng quan.....	4
1.1. Hồng cầu, chuyển hóa glucosse và chống oxy hóa trong hồng cầu.....	4
1.2. Chì và sự tác động của chì trên cơ thể con người.....	13
1.3. Thiếu máu tan máu.....	18
1.4. Máu bảo quản.....	22
Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu.....	31
2.1. Đối tượng và chất liệu nghiên cứu.....	31
2.2. Trang thiết bị và hóa chất.....	32
2.3. Phương pháp và kỹ thuật nghiên cứu.....	33
2.4. Nghiên cứu hình ảnh hồng cầu.....	39
2.5. Xử lý kết quả nghiên cứu.....	39
Chương 3: Kết quả nghiên cứu.....	40
3.1. Kết quả nghiên cứu phần 1	40
3.2. Kết quả nghiên cứu phần 2	42
3.3. Kết quả nghiên cứu phần 3	46
Chương 4: Bàn luận.....	65
4.1. Bàn luận về kết quả nghiên cứu trên những trường hợp nhiễm chì máu....	65
4.2. Bàn luận về kết quả nghiên cứu trên các trường hợp thiếu máu tan máu....	68
4.3. Bàn luận về các kết quả nghiên cứu trên máu bảo quản.....	73
Kết luận.....	85

PHẦN A

Tóm tắt các kết quả nổi bật của đề tài.

1. Tóm tắt kết quả của đề tài:

Đề tài được tiến hành trong 3 phần khác nhau.

Phần 1: Nghiên cứu trên những trường hợp nhiễm chì máu.

Nghiên cứu tiến hành trên 58 công nhân tiếp xúc trực tiếp với xăng chì ở Tổng kho xăng Đức Giang, có thời gian tiếp xúc từ 10-30 năm. Qua định lượng nồng độ chì chúng tôi thu được kết quả nồng độ chì máu từ 8 $\mu\text{g}\%$ -121,2 $\mu\text{g}\%$,

Chúng tôi tiến hành nghiên cứu trên các nhóm với các thông số: Các thông số về huyết học được nghiên cứu như SLHC, nồng độ Hb và Hct cho thấy có sự giảm SLHC phụ thuộc vào nồng độ chì máu và thấy có mối tương quan nghịch biến giữa nồng độ chì máu với SLHC. Điều này cũng phù hợp với lâm sàng ở những người nồng độ máu cao thì thiếu máu và xạm da. Đồng thời ở những người nồng độ chì máu cao có sự giảm nhẹ nồng độ Hb và Hct. Nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước cho thấy trong hồng cầu non, trong tủy xương, chì ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp Hb. Chì ức chế các enzym sinh tổng hợp Hem và làm tăng sinh gốc tự do, chính vì vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu nhóm thông số thứ hai là xác định hoạt độ các enzym chống oxy hóa trong hồng cầu và kết quả cho thấy: có sự giảm hoạt độ các enzym chống oxy hóa của hồng cầu (GPx,GR). Chúng tôi thấy có tương quan nghịch giữa hoạt độ GPx,GR hồng cầu với nồng độ chì máu. Chúng tôi cũng tiến hành xác định TAS của huyết thanh ở các nhóm nghiên cứu trên thấy có sự giảm nhẹ TAS huyết thanh ở nhóm có nồng độ chì máu cao.

Các kết quả nghiên cứu của các tác giả khác về ảnh hưởng của chì đến hệ thống tạo huyết cho thấy chì làm giảm các yếu tố cần thiết cho quá trình tạo hồng cầu; chì tác động lên quá trình sinh ra gốc tự do và tác động lên màng hồng cầu. Một số nghiên cứu cũng cho thấy có ảnh hưởng của nồng độ chì máu lên nồng độ MDA huyết thanh, chì có hiệp đồng tác dụng độc khi cơ thể uống rượu và hút thuốc lá.

Qua kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy rằng nồng độ chì máu ảnh hưởng đến khả năng chống oxy hóa của hồng cầu. Qua nghiên cứu của chúng tôi, chúng tôi thấy rằng cần phải thải chì trong máu những người có nồng độ chì máu trên 20 $\mu\text{g}\%$ và cần phải cho thêm các chất chống oxy hóa trong quá trình điều trị cho các bệnh nhân nhiễm chì. Để hạn chế tác dụng độc của chì chúng tôi thấy cần khuyến cáo những người nhiễm chì không nên uống rượu bia và hút thuốc lá vì có tác dụng hiệp đồng tăng độc tính của chì.

Trên thực tế, qua nghiên cứu của chúng tôi các công nhân tiếp xúc với xăng chì ở tổng kho xăng Đức Giang khi định lượng nồng độ chì máu nếu có nồng độ chì máu cao đều được đi thải chì. Chúng tôi tiến hành định lượng chì máu lại ở những người đã được thải chì sau 1 năm không còn trường hợp nào có nồng độ chì máu trên 40 $\mu\text{g}\%$.

Phần 2: Nghiên cứu trên những trường hợp thiếu máu tan máu.

Thiếu máu, tan máu là một trong những bệnh lý về máu gây ra do sự phá huỷ hồng cầu vượt quá mức bình thường; đời sống hồng cầu ngắn lại, hồng cầu non lưu hành nhiều trong máu ngoại vi do tủy xương tăng sinh bù. Tan máu do nhiều nguyên nhân khác nhau, trong nghiên cứu của chúng tôi, chúng tôi thấy có các nhóm nguyên nhân tan máu như: tan máu tự miễn, do bệnh lý Hb (HbH, β thalassemia), tan máu do thiếu hụt enzym chuyển hóa (G6PD, PK hồng cầu) và có những trường hợp tan máu không rõ nguyên nhân.

Qua kết quả nghiên cứu của chúng tôi thấy ở các bệnh nhân tan máu đều biểu hiện thiếu máu qua giảm SLHC, giảm nồng độ Hb và giảm Hct rõ rệt ($p < 0,01$). Tỷ lệ HCL trong các trường hợp tan máu rất cao chiếm từ 10 - 30% (bình thường chỉ từ 0,5-1,5%).

Ở các bệnh nhân thiếu máu tan máu ngoại trừ nhóm thiếu hụt G6PD (hoạt độ G6PD trung bình của nhóm này là 46,61%) có hoạt độ G6PD cao một cách rõ rệt ($p < 0,01$). G6PD xúc tác phản ứng đầu tiên của chu trình pentose và cũng là enzym quan trọng của quá trình chống oxy hóa của hồng cầu. Sự tăng hoạt độ G6PD hồng cầu ở các trường hợp tan máu có thể là do phản ứng thích nghi của hồng cầu giúp hồng cầu tăng khả năng bảo vệ chống lại quá trình tan máu.

Hoạt độ PK hồng cầu của các trường hợp tan máu do các nguyên nhân khác nhau (trừ hai trường hợp thiếu hụt PK hồng cầu) có hoạt độ PK hồng cầu tăng một cách có ý nghĩa ($p < 0,01$ và $p < 0,001$). Hoạt độ PK hồng cầu tăng chứng tỏ hồng cầu cần tăng nhu cầu sử dụng ATP vì có lẽ trong các trường hợp thiếu máu tan máu hồng cầu cần nhiều ATP giúp cho quá trình bảo vệ màng hồng cầu và các hoạt động chức năng của màng hồng cầu như hoạt động của bơm Na^+K^+ ATPase, Ca^{++} ATPase.

Nồng độ 2,3-DPG máu các trường hợp tan máu do các nguyên nhân khác nhau đều tăng trừ tan máu do thiếu hụt G6PD hồng cầu. Nồng độ 2,3-DPG tham gia điều hòa ái lực của Hb với oxy. Sự tăng Nồng độ 2,3-DPG ở các trường hợp tan máu chứng tỏ có sự thích ứng của hồng cầu nhằm nâng cao hiệu suất cung cấp oxy cho cơ thể trong các trường hợp này.

Nồng độ MDA huyết thanh ở những trường hợp tan máu do các nguyên nhân khác nhau đều tăng so với nhóm chứng trừ nhóm bệnh nhân tan máu tự miễn. Sự tăng nồng độ MDA huyết thanh phải chăng do sự tăng Fe^{++} huyết thanh do hồng cầu bị vỡ, vì Fe^{++} khơi mào cho phản ứng peroxi hóa

lipid huyết thanh và cũng có thể trong các trường hợp tan máu tăng nồng độ oxy nguyên tử và gốc tự do làm tăng quá trình peroxi hóa lipid.

Hoạt độ enzym SOD và GPx hồng cầu ở các nhóm tan máu có tăng nhưng giao động rất lớn, có lẽ hồng cầu thích nghi để tăng khả năng bảo vệ chống lại các tác nhân oxy hóa và cũng có thể tăng sinh gốc tự do gây cảm ứng tăng hoạt độ các enzym này.

Trạng thái chống oxy hóa huyết thanh (TAS) ở các trường hợp nghiên cứu cho thấy không có sự khác biệt; điều này càng chứng tỏ cơ thể tự bù trừ.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi thấy rằng các trường hợp thiếu máu tan máu do các nguyên nhân khác nhau đều có sự tăng hoạt độ các enzym chống oxy hóa của hồng cầu, tăng nồng độ MDA huyết thanh, phải chăng điều này có thể cho thấy ở những trường hợp bệnh lý này có sự tăng sinh gốc tự do. Sự tăng sinh gốc tự do có thể gây tăng hoạt độ các enzym chống oxy hóa theo cơ chế cảm ứng. Sự tăng gốc tự do cũng có thể làm tăng quá trình peroxi hóa lipid trong đó có lipid màng hồng cầu. Chính điều đó làm tổn thương màng, sức bền hồng cầu giảm, đời sống hồng cầu ngắn lại, làm hồng cầu dễ vỡ gây ra tan máu.

Chuyển hóa glucose trong các trường hợp tam máu cũng đều tăng để bù trừ (trừ thiếu hụt G6PD và PK hồng cầu). Cũng qua kết quả nghiên cứu của chúng tôi, chúng tôi nghĩ rằng có thể hạn chế sự peroxi hóa lipid và tăng sức bền cho hồng cầu trong các trường hợp tan máu bằng cách cho thêm các chất chống oxy hóa trong phác đồ điều trị.

Đặc biệt trong nghiên cứu của chúng tôi, chúng tôi đã phát hiện được hai trường hợp thiếu máu tan máu do thiếu hụt enzym PK hồng cầu. Thiếu máu do thiếu hụt enzym chuyển hóa được mô tả nhiều trong y văn của nhiều tác giả ngoài nước, trong nước đây là những trường hợp đầu tiên được mô tả.

Phần 3: Nghiên cứu trên máu bảo quản.

Trong điều kiện của Viện huyết học Truyền máu Trung ương, máu được bảo quản theo tiêu chuẩn quốc tế. Chất lượng máu bảo quản được đánh giá qua tỷ lệ phần trăm tan máu, pH, nồng độ các chất trong dịch bảo quản hoặc huyết tương. Với ý đồ tìm hiểu thực trạng quá trình chuyển hóa glucose, tình trạng chống oxy hóa của hồng cầu, mức độ phá huỷ hồng cầu và hình ảnh hồng cầu, máu bảo quản trong điều kiện của Viện huyết học Truyền máu Trung ương; từ đó làm cơ sở để nghiên cứu tiếp nhằm tăng sức bền của hồng cầu, kéo dài tuổi thọ cho hồng cầu, tăng chất lượng hồng cầu bảo quản góp phần vào công tác an toàn truyền máu. Hồng cầu trong máu bảo quản vẫn phải sống để chờ truyền cho người bệnh, cho nên vẫn chuyển hóa đặc biệt là chuyển hóa glucose. Môi trường bảo quản hồng cầu trong KHC không hoàn toàn giống với huyết tương, điều kiện bảo quản cũng không giống như trong cơ thể sống. Vì vậy hồng cầu phải thích nghi và sử dụng năng lượng cho duy trì sự sống. Trong quá trình bảo quản hồng cầu chịu nhiều tác động nhất là các tác nhân oxy hóa; có thể trong quá trình bảo quản màng hồng cầu dễ bị tấn công bởi các gốc tự do vì vậy màng hồng cầu dễ bị tổn thương và hình dạng hồng cầu có thể thay đổi trong quá trình bảo quản. Tất cả điều đó, gợi ý cho chúng tôi tiến hành nghiên cứu phần 3 này.

Nghiên cứu các thông số đánh giá thoái hóa glucose của hồng cầu KHC và MTP bảo quản qua xác định hoạt độ enzym G6PD, PK hồng cầu. Kết quả cho thấy có sự giảm mạnh hoạt độ G6PD, PK hồng cầu; nồng độ lactat, pH dịch bảo quản và huyết tương tăng mạnh; nồng độ 2,3-DPG máu giảm mạnh theo thời gian và nồng độ glucose dịch bảo quản giảm. Như vậy chuyển hóa glucose giảm, ATP và NADPH giảm, hoạt động sống của hồng cầu sẽ bị ảnh hưởng.

Nghiên cứu xác định hoạt độ các enzym chống oxy hóa của KHC bảo quản bằng dung dịch bảo quản SAGM, và MTP.

Hoạt độ SOD, GPx hồng cầu giảm rõ rệt trong quá trình bảo quản, sự giảm hoạt độ các enzym này hậu quả có thể gây ra quá trình peroxi hóa lipid màng.

Xác định nồng độ MDA dịch huyết tán và dịch bảo quản, huyết tương để xác định mức peroxi hóa lipid màng hồng. Kết quả cho thấy có sự tăng nồng độ MDA ngay từ những ngày đầu bảo quản.

Sự giảm hoạt độ các enzym chống oxy hóa làm tăng mức peroxy hóa lipid màng dẫn đến tăng nồng độ sản phẩm của quá trình peroxi hóa là MDA. Vì vậy, màng hồng cầu máu bảo quản sẽ bị tổn thương. Mức tổn thương màng hồng cầu trong quá trình bảo quản được xác định thông qua nồng độ Hb, nồng độ sắt, K^+ , Na^+ , Cl^- , canxi và hoạt độ LDH dịch bảo quản và huyết tương. Kết quả cho thấy có sự tổn thương màng ngay từ những ngày đầu của quá trình bảo quản cả ở KHC và MTP, tuy nhiên mức tổn thương nhẹ hơn ở những ngày đầu của MTP.

Chúng tôi tìm thấy mối tương quan nghịch giữa hoạt độ các enzym chống oxy hóa với nồng độ MDA dịch bảo quản, huyết tương và dịch huyết tán, mối tương quan nghịch giữa hoạt độ G6PD, PK hồng cầu với nồng độ K^+ . Như vậy trong thời gian bảo quản hồng cầu trong KHC chịu tác động của các yếu tố oxy hóa, gốc tự do và khả năng chống oxy hóa bị giảm dần bên cạnh đó chuyển hóa glucose cũng giảm dẫn đến thiếu ATP và NADPH cho hoạt động sống của hồng cầu. Hồng cầu vừa giảm khả năng chống oxy hóa vừa thiếu ATP vì vậy màng dễ bị tổn thương tăng tính thấm dẫn đến hồng cầu bị vỡ.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với các kết quả của các tác giả trong và ngoài nước. Theo nghiên cứu của chúng tôi, theo thời gian bảo quản, hồng cầu biến đổi hình dạng dần và số lượng vỡ ngày càng tăng, tuy nhiên cả KHC và MTP bảo quản đến ngày thứ 42 vẫn còn nằm trong giới hạn cho phép về an toàn truyền máu của WHO, nhưng độ an toàn tốt nhất là bảo

quản dưới 35 ngày. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi còn cho thấy môi trường bảo quản là huyết tương (MTP) làm bình ổn hồng cầu ở những ngày đầu của quá trình bảo quản hơn KHC, điều đó gợi ý cho chúng tôi nghiên cứu tiếp.

Bên cạnh nghiên cứu về khả năng chống oxy hóa, mức peroxi hóa lipid màng hồng cầu, chuyển hóa glucose hồng cầu và các yếu tố chỉ điểm tổn thương màng hồng cầu, chúng tôi song song tiến hành nghiên cứu hình ảnh hồng cầu trên kính hiển vi điện tử quét.

Qua nghiên cứu hình ảnh hồng cầu chúng tôi thấy trong quá trình bảo quản, hình dạng hồng cầu bị biến đổi, mức độ thay đổi hình dạng theo các thời điểm nghiên cứu phù hợp với mức tổn thương màng qua các thông số hóa sinh.

Như vậy, qua các kết quả nghiên cứu của chúng tôi, chúng tôi đã thu được những số liệu về thực trạng về hồng cầu được bảo quản dưới dạng KHC với dịch bảo quản SAGM và MTP. Từ thực trạng này chúng tôi thấy cần phải nghiên cứu tiếp để có thể nghiên cứu bổ sung những thành phần nào đó vào dịch bảo quản nhằm hạn chế tổn thương màng hồng cầu, làm tăng sức bền của chúng góp phần công tác an toàn truyền máu.

Ý nghĩa thực tiễn của đề tài:

1. Các công nhân của Công ty xăng dầu Đức Giang có nồng độ chì máu trên 40 $\mu\text{g}\%$, sau nghiên cứu đã được thải chì và đã được bổ sung vitamin C trong phác đồ điều trị, sau hai năm liên tiếp, hiện tại không còn người bị chì máu cao.

2. Đã ra khuyến cáo cho các bác sỹ lâm sàng điều trị thiếu máu tan máu nên bổ sung các chất chống oxy hóa trong phác đồ điều trị để hạn chế tác hại của quá trình oxy hóa, tăng sức bền màng hồng cầu.

3. Cung cấp thực trạng về thoái hóa glucose, khả năng chống oxy hóa, mức peroxi hóa lipid màng hồng cầu và hình ảnh hồng cầu máu bảo quản dưới dạng KHC và MTP.

Ý nghĩa khoa học của đề tài:

1. Cung cấp thông tin để tìm hiểu nguyên nhân gây thiếu máu trong các trường hợp tiếp xúc xăng chì; tìm hiểu thêm về cơ chế gây tan máu do bệnh lý Hb, thiếu hụt enzym chuyển hóa, miễn dịch...; tìm hiểu nguyên nhân gây tổn thương màng hồng cầu, thay đổi hình dạng hồng cầu và giảm tuổi thọ hồng cầu máu bảo quản (KHC và MTP),

2. Triển khai và áp dụng nhiều kỹ thuật tiên tiến, trang bị cho nhiều học viên sau đại học phương pháp và kỹ thuật nghiên cứu hiện đại.

3. Hướng dẫn 4 luận văn cao học, 1 luận văn CKCI, 2 luận văn tốt nghiệp Bác sĩ đa khoa và 5 sinh viên NCKH.

*** Trần Văn Bảo – Cao học**

Đề tài: Nghiên cứu ảnh hưởng của sự nhiễm chì đến trạng thái chống oxy hóa toàn phần huyết tương và hoạt độ một số enzym chống oxy hóa hồng cầu của người.

Bảo vệ năm 2001 với điểm số 9,5.

*** Trần Thị Ngọc Anh – Cao học**

Đề tài: Nghiên cứu hoạt độ một số enzym chuyển hóa Glucose và enzym chống oxy hóa hồng cầu bệnh nhân thiếu máu tan máu.

Bảo vệ năm 2002 với điểm số là 9,1.

*** Nguyễn Như Phấn – Cao học**

Đề tài: Nghiên cứu thực trạng khả năng chống oxy hóa và hình dạng hồng cầu của khối hồng cầu bảo quản tại Viện Huyết học và truyền máu TW.

Bảo vệ năm 2003 với điểm số 9,7

Đề tài này được Hội đồng đánh giá cao, tiếp tục phát triển thành Luận án Tiến sĩ.

*** Đào Phương Dung – Chuyên khoa cấp II**

Đề tài: Nghiên cứu chuyển hóa Glucose hồng cầu theo thời gian bảo quản trong KHC lưu trữ tại Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương.

Bảo vệ năm 2003 với điểm số 9,3.

*** Nguyễn Phương Hạnh – Bác sỹ.**

Đề tài: Tìm hiểu nồng độ Hb, các chất điện giải và hoạt độ LDH huyết tương của MTP bảo quản tại Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương.

Bảo vệ năm 2004 với điểm số 9.0.

*** Vũ Ngọc Thắng – Bác sỹ**

Đề tài: Nghiên cứu một số chỉ số về thoái hóa glucose hồng cầu MTP bảo quản tại Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương.

Bảo vệ năm 2004 với điểm số 8,5

*** Lưu Văn Dưỡng – Cao học**

Đề tài: Nghiên cứu khả năng chống oxy hóa và hình dạng hồng cầu của MTP bảo quản tại Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương.

Bảo vệ năm 2004 với điểm số 10,0

+ Đã công bố 3 công trình trên báo Y học thực hành, một công trình tham dự hội nghị khoa học cơ bản tại Huế, 1 công trình hướng dẫn sinh viên làm NCKH được giải khuyến khích của Bộ Giáo dục và đào tạo.

2. Đánh giá việc thực hiện đề tài đối chiếu với đề cương được duyệt.

a. Tiến độ

Đúng tiến độ	X
Rút ngắn thời gian NC	
Kéo dài thời gian NC	

b. Thực hiện các mục tiêu nghiên cứu đề ra:

Thực hiện đầy đủ các mục tiêu đề ra	X
Thực hiện đầy đủ các mục tiêu nhưng không hoàn chỉnh	
Chỉ thực hiện được một số mục tiêu đề ra	
Những mục tiêu không thực hiện được	

c. Các sản phẩm tạo ra so với dự kiến trong bản đề cương.

Tạo ra đầy đủ các sản phẩm đã dự kiến trong đề tài	X
Chất lượng các sản phẩm đạt yêu cầu như đã ghi trong đề cương	
Tạo ra đầy đủ các sản phẩm nhưng chất lượng các sản phẩm chưa đạt	
Tạo ra đầy đủ các sản phẩm nhưng chất lượng tất cả các sản phẩm chưa đạt chất lượng	
Tạo ra được một số sản phẩm đạt chất lượng	
Những sản phẩm chưa thực hiện được	

d. Đánh giá việc sử dụng kinh phí

Tổng kinh phí thực hiện đề tài 130 triệu đồng.

Trong đó kinh phí sự nghiệp khoa học 150 triệu đồng.

Kinh phí từ nguồn khác không có

Trang thiết bị Không

Toàn bộ kinh phí được đã được quyết toán

3. Các ý kiến đề xuất:

Đề nghị Bộ Y tế cho nhóm tác giả được nghiên cứu tiếp.

PHẦN B

(NỘI DUNG BÁO CÁO CHI TIẾT KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU)

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hồng cầu trưởng thành là tế bào đặc biệt làm nhiệm vụ vận chuyển oxy cho cơ thể. Hồng cầu thường xuyên có nguy cơ bị oxy hóa cao. Vì thế, chuyển hóa trong hồng cầu diễn ra rất mạnh với cơ chất chính là glucose nhằm cung cấp năng lượng dưới dạng ATP, coenzym NADH, NADPH, các sản phẩm trung gian cần thiết để duy trì hoạt động chức năng của hồng cầu và bảo vệ hồng cầu chống lại các tác nhân oxy hóa.

Trong hồng cầu, glucose thoái hóa theo hai con đường: Embden Meyerhoff và hexosemonophosphat mà enzym then chốt là G-6-PD, PK nhằm cung cấp ATP, NADPH, NADH cho quá trình chống oxy hóa của hồng cầu. Có sự liên quan chặt chẽ giữa chuyển hóa glucose và quá trình chống oxy hóa trong hồng cầu. Chuyển hóa cần nhiều enzym mà sự thiếu hụt một trong các enzym hoặc sẽ gây rối loạn chuyển hóa glucose, làm giảm tổng hợp ATP, NADPH, thay đổi nồng độ 2,3-DPG, do đó ảnh hưởng đến chức năng màng hồng cầu hoặc làm giảm khả năng chống oxy hóa của hồng cầu. Hậu quả là hồng cầu dễ bị các chất oxy hóa tác động làm giảm đời sống hồng cầu. Sự giảm hoạt độ các enzym chuyển hóa glucose và enzym chống oxy hóa có thể gặp ở người nhiễm độc chì, bệnh nhân tan máu và khối máu bảo quản [44, 45, 64, 93].

Hiện nay, chì là kim loại nặng được sử dụng trong các ngành công nghiệp như: in, luyện thép, điện, chế tạo ắc quy, chế tạo vũ khí... Trong cuộc sống hàng ngày, chì là thành phần có trong nhiều sản phẩm như sơn, các chất nhuộm màu, thuốc vẽ, men, đồ gốm, diêm, ắc quy... [79]. Trong y dược, một số thuốc có chứa chì được sử dụng như: Thuốc giảm đau, thuốc dưỡng da, thuốc chống viêm, thuốc chữa bỏng... Xăng pha chì được sử dụng rộng rãi để phục vụ đời sống ở một số nước, trong đó có nước ta mà gần đây ở nước ta mới hạn chế [30, 31]. Như vậy, chì được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp, quốc phòng, y tế và trong đời sống hàng ngày... Những người tiếp xúc, sử dụng những chế phẩm có chì có thể bị nhiễm chì gây ảnh hưởng đến chức năng nhiều cơ quan trong cơ thể, gây thiếu máu và ảnh hưởng đến chức năng tổng hợp Hb...[12, 40, 41, 64, 103]

Thiếu máu tan máu là bệnh khá phổ biến và thường gặp nhiều ở nước ta. Nguyên nhân gây tan máu dẫn đến thiếu máu có thể có nhiều như: bệnh lý màng hồng cầu, bệnh lý Hb, thiếu hụt enzym chuyển hóa, nhiễm độc, tự miễn và nhiều nguyên nhân khác [35, 45, 51, 75, 104]. Vì sao các nguyên nhân trên có thể gây vỡ hồng cầu trước tuổi của chúng, phải chăng các nguyên nhân trên có các yếu tố gây tổn thương màng hồng cầu và làm hồng cầu vỡ. Tìm hiểu cơ chế gây tổn thương màng hồng cầu ở các trường hợp thiếu máu tan máu là điều cần thiết.

Bảo quản máu là công tác hết sức quan trọng vì nhu cầu truyền máu trong phẫu thuật, ghép cơ quan, điều trị bệnh máu ngày càng tăng. Hơn nữa, việc truyền máu cần được đảm bảo an toàn phòng lây nhiễm các bệnh nhiễm trùng, các hậu quả miễn dịch sau truyền máu [1]. Truyền MTP được áp dụng khá rộng rãi vì nhiều cơ sở có thể thực hiện được và chỉ định truyền loại máu này cũng khá rộng, tuy nhiên truyền MTP kém an toàn hơn truyền KHC. KHC giảm bạch cầu được sử dụng nhiều trong truyền máu với các ưu điểm như hạn chế các bệnh lây truyền như HIV, CMV ...giảm nguy cơ gây bệnh ghép chống chủ ở bệnh nhân ghép tuỷ [23, 24]. Trong quá trình bảo quản, thoái hóa glucose hồng cầu vẫn xảy ra để đảm bảo duy trì hoạt động sống của hồng cầu và quá trình chống oxy hóa nhằm duy trì hình dạng và chức năng của hồng cầu [98]. Nghiên cứu thực trạng chuyển hóa glucose và khả năng chống oxy hóa hồng cầu cũng như sự thay đổi hình dạng hồng cầu trong máu lưu trữ theo thời gian là rất cần thiết ở nước ta hiện nay.

Vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài: "Nghiên cứu chuyển hóa glucose hồng cầu, khả năng chống oxy hóa máu trường hợp tiếp xúc với xăng chì, bệnh lý thiếu máu tan máu và máu bảo quản với mục đích: "Thông qua các thông số huyết học và hóa sinh tìm hiểu nguyên nhân làm đời sống hồng cầu ngắn, hồng cầu dễ vỡ gây thiếu máu, giảm SLHC, giảm nồng độ Hb trong các trường hợp nhiễm chì, thiếu máu tan máu; nguyên nhân gây tổn thương, giảm sức bền màng làm hồng cầu dễ vỡ trong máu bảo quản theo thời gian", từ đó có những khuyến cáo kịp thời trong điều trị các trường hợp nhiễm chì, thiếu máu tan máu và có cơ sở nghiên cứu can thiệp tiếp để tăng sức bền màng hồng cầu máu bảo quản nhằm nâng cao chất lượng máu bảo quản góp phần vào công tác an toàn truyền máu.

Để thực hiện mục đích trên, chúng tôi tiến hành các nội dung sau:

Phần 1: Nghiên cứu các trường hợp tiếp xúc với xăng chì

1. Định lượng nồng độ chì trong máu ở các đối tượng nghiên cứu.
2. Xác định một số thông số huyết học: SLHC, nồng độ Hb, tỷ lệ Hct.
3. Xác định hoạt độ một số enzym chống oxy hóa của hồng cầu SOD, GPx và GR, TAS huyết tương.
4. Tìm mối tương quan giữa các thông số thu được.

Phần 2: Nghiên cứu các trường hợp thiếu máu tan máu

1. Xác định một số thông số huyết học: SLHC, nồng độ Hb, tỷ lệ Hct và tỷ lệ HCL ở các đối tượng nghiên cứu.
2. Xác định hoạt độ G-6-PD, PK hồng cầu và nồng độ 2,3-DPG máu.
3. Xác định hoạt độ một số enzym chống oxy hóa của hồng cầu SOD, GPx và TAS huyết tương.
4. Tìm mối tương quan giữa các thông số thu được.

Phần 3: Nghiên cứu về máu bảo quản

1. Xác định nồng độ glucose, lactat, pH dịch bảo quản, huyết tương bảo quản; xác định hoạt độ PK, G6PD hồng cầu và nồng độ 2,3-DPG máu bảo quản.
2. Xác định hoạt độ SOD, GPx hồng cầu, hàm lượng MDA dịch bảo quản, huyết tương và dịch huyết tán.
3. Xác định nồng độ Na^+ , K^+ , Cl^- , Hb tự do, sắt, canxi và hoạt độ LDH huyết tương và dịch bảo quản.
4. Tìm mối tương quan giữa các thông số thu được.
5. Quan sát hình ảnh hồng cầu theo thời gian bảo quản trên kính hiển vi quang học và kính hiển vi điện tử quét.

Xử lý các thông số thu được và tìm mối tương quan giữa các thông số theo từng phần nghiên cứu.

CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN

1.1. HỒNG CẦU, CHUYỂN HÓA GLUCOSE VÀ CHỐNG OXY HÓA TRONG HỒNG CẦU

1.1.1. Hồng cầu: Đặc điểm và cấu trúc.

Hồng cầu được hình thành từ tế bào gốc trong tuỷ xương và trải qua các giai đoạn biệt hóa tại tuỷ xương từ nguyên hồng cầu qua tiền hồng cầu, hồng cầu lưới và cuối cùng là hồng cầu trưởng thành. Hồng cầu trưởng thành được đưa ra máu ngoại vi làm nhiệm vụ vận chuyển oxy cho cơ thể là tế bào hình đĩa lõm hai mặt, đường kính khoảng 7,2 μm , chỗ lõm dày 2-3 μm . Hồng cầu trưởng thành không còn nhân, ty thể, ribosom nên không có khả năng tổng hợp ADN, protein và các enzym cần thiết cho quá trình chuyển hóa của hồng cầu. Với lượng protein và enzym dự trữ hồng cầu không có khả năng đổi mới những chất đó và sẽ chết khi cạn dự trữ. Thời sống trung bình của hồng cầu trong máu ngoại vi khoảng 120 ngày [84].

Cấu trúc và chức năng màng HC

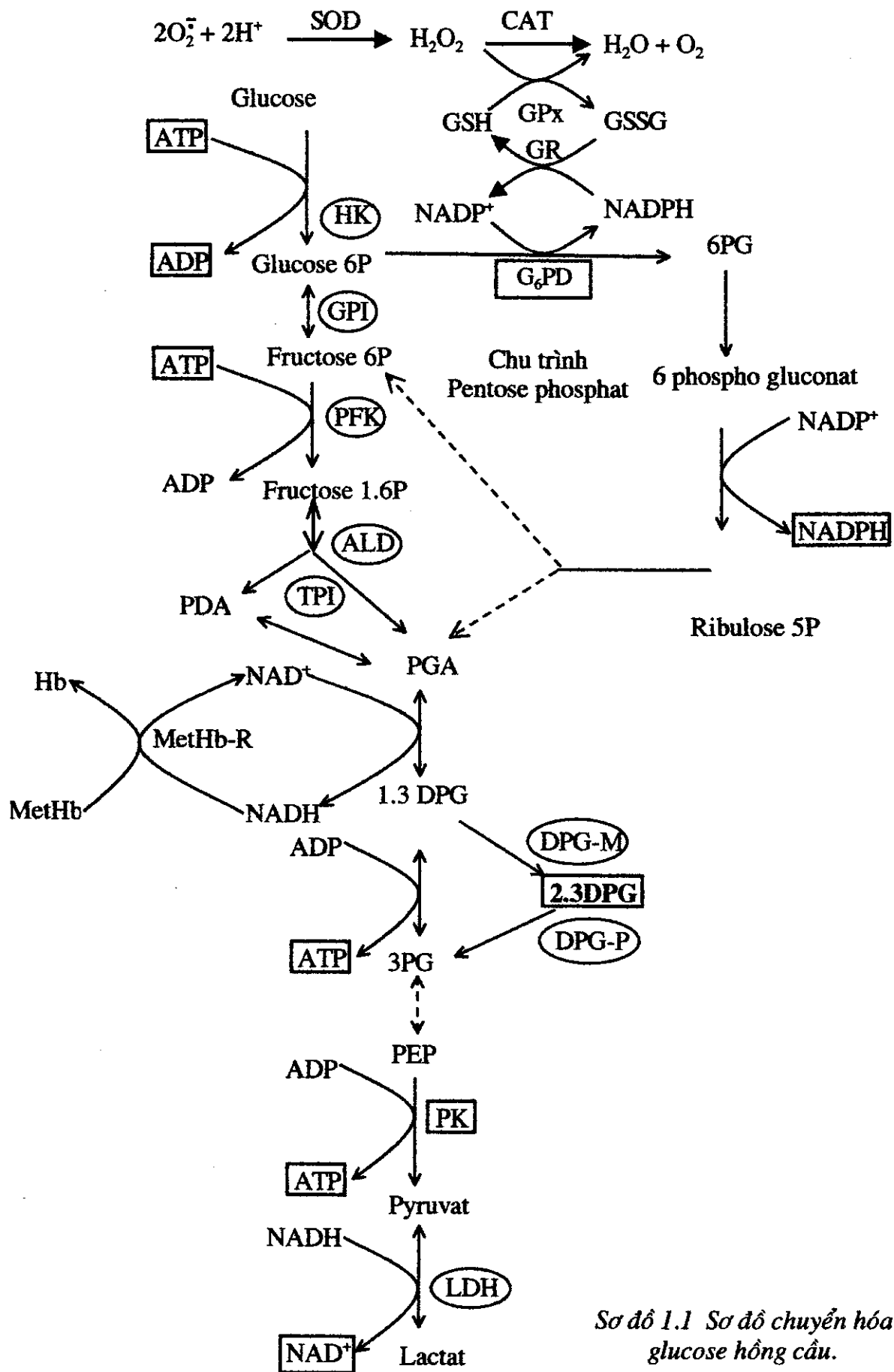
Màng HC dày khoảng 10 nm, được cấu tạo bởi lớp phospholipid kép, các phân tử protein và cholesterol được khảm vào lớp lipid màng tạo nên nền tảng cấu trúc cơ bản của màng. Mặt ngoài của màng có các phân tử carbohydrat liên kết với các phân tử protein hoặc liên kết với lớp lipid màng tạo nên lớp áo ngoài HC, lớp này có vai trò trong quyết định nhóm máu trên bề mặt HC. Mặt trong của màng HC có các protein rìa màng như spectrin, alkryn, actin, protein band 4.1 làm thành một mạng lưới lát bên trong đảm bảo tính bền và dạng lõm hai mặt của HC [28, 49].

1.1.2. Chuyển hóa glucose của hồng cầu

Hồng cầu trưởng thành có một số đặc điểm chuyển hóa riêng, trong đó chuyển hóa glucose giữ vai trò rất quan trọng nhằm cung cấp năng lượng, chất chuyển hóa trung gian và những coenzym cần thiết để duy trì hoạt động chức năng của hồng cầu và bảo vệ hồng cầu chống lại sự oxy hóa.

Chuyển hóa glucose trong hồng cầu được thực hiện theo hai con đường chính: con đường Embden Meyerhof và con đường hexose monophosphat, phần lớn

glucose được phân giải trực tiếp đến pyruvat hoặc lactat theo con đường Embden Meyerhof [53]. Con đường này cung cấp ATP cho hồng cầu sử dụng, một nhánh tạo ra 2,3-DPG một sản phẩm chuyển hóa trung gian quan trọng, là yếu tố dị lập thể âm điều hòa ái lực hemoglobin với oxy [6]. Khoảng 5-10% glucose của hồng cầu thoái hóa trong chu trình pentose phosphat [6, 61]. Mặc dù con đường này không trực tiếp cung cấp năng lượng nhưng nó cung cấp NADPH cho nhiều quá trình sinh học của hồng cầu trong đó có quá trình chống oxy hóa. Trong số những enzym tham gia chuyển hóa glucose hồng cầu có một số enzym giữ vị trí then chốt, có tác dụng điều hòa chuyển hóa glucose trong hồng cầu. Sự thiếu hụt những enzym này gây rối loạn chuyển hóa glucose trong hồng cầu mà thường gặp nhất là enzym G-6-PD của con đường hexose monophosphat và pyruvat kinase của con đường Embden Meyerhof [51, 101, 104]. Ngoài ra, bệnh lý enzym của hồng cầu có thể gặp khi thiếu hụt các enzym chuyển hóa glucose và tất cả đều có liên quan đến thiếu máu [150].



Sơ đồ 1.1 Sơ đồ chuyển hóa glucose hồng cầu.

1.1.2.1. Glucose-6-phosphat dehydrogenase (G-6-PD: EC 1.1.1.49)

G-6-PD là enzym xúc tác cho phản ứng mở đầu chu trình pentose phosphat, chuyển glucose 6 phosphat thành 6 phosphogluconolacton cùng với sự tham gia của một phân tử NADP^+ để tạo ra NADPH. NADPH có vai trò quan trọng trong cơ chế bảo vệ của hồng cầu thông qua hệ thống enzym chống oxy hóa methemoglobin reductase, glutathion peroxidase, glutathion reductase [5, 101]. Đồng thời, NADPH còn cần thiết cho sự ổn định của enzym catalase, một enzym quan trọng trong hệ thống enzym chống oxy hóa của hồng cầu [51].

Gen qui định tổng hợp nên G-6-PD nằm trên cánh dài của nhiễm sắc thể X (Xq28), dài 18 Kb, gồm có 13 exon và 12 intron nhưng exon đầu tiên không mã hóa. G-6-PD là một polymer gồm nhiều monomer, G-6-PD có thể tồn tại dưới nhiều dạng: monomer, dimer, trimer, tetramer, hexamer. Dạng monomer có 515 acid amin, với trọng lượng là 59.265 dalton. Trong tế bào, G-6-PD thường tồn tại dưới dạng dimer và tetramer, đây là hai dạng có hoạt tính xúc tác của G-6-PD. Dạng dimer của G-6-PD có hai phân tử NADP gắn vào giữ cho hình dạng của G-6-PD ổn định bền vững [51, 101, 104, 149].

Việc giải mã gen qui định G-6-PD là cơ sở để phát hiện ngày càng nhiều đột biến của enzym này. Đến năm 1995 đã có 310 variant của G-6-PD được công bố [101]. Nhiều variant mới của G-6-PD vẫn tiếp tục được phát hiện [124].

Hoạt độ G-6-PD dưới 60% so với người bình thường được coi là thiếu hụt G-6-PD hồng cầu [101].

Thiếu hụt G-6-PD là bệnh phổ biến nhất trong nhóm bệnh lý enzym hồng cầu gây thiếu máu tan máu di truyền HNSHA. Lần đầu tiên HNSHA đã được mô tả bởi Crosby vào năm 1950, HNSHA khi đó chia làm 2 type, sau này người ta xác định type 1 liên quan đến thiếu hụt G-6-PD lớp I, type 2 liên quan đến thiếu hụt PK hồng cầu. Đến nay, trên thế giới có khoảng 400 triệu người có thiếu hụt G-6-PD hồng cầu [101, 105], có thể là thiếu hụt số lượng protein enzym hoặc suy giảm chức năng enzym. Thiếu hụt G-6-PD là bệnh di truyền liên kết giới tính nên có sự khác biệt về mức độ biểu hiện giữa nam và nữ.

Thiếu hụt G-6-PD là một nguyên nhân gây thiếu máu tan máu di truyền. Thông thường ở những người thiếu hụt G-6-PD hồng cầu chỉ gây ra thiếu máu tan

máu mạn tính, hội chứng thiếu máu tan máu cấp xuất hiện khi có tác động của các tác nhân gây oxy hóa mạnh, đặc biệt là thuốc chống sốt rét (quinine, primaquine, pamaquine, pentaquine...), một số thuốc kháng sinh (sulfanilamide, sulfacetamide, sulfamethoxazole, nitrofurantoin, sulfapyridine, diaminodiaphenylsulphole - DDS...), thuốc chống trầm cảm (acetanilid) hoặc một số thuốc và hóa chất khác như: nalidixic acid, naphtalone, phenylhydrazine, toluidine blue, methylen blue, trinitrotoluen...[101, 144].

1.1.2.2. Pyruvat kinase (PK-EC.2.7.1.40).

Enzym PK là enzym then chốt trên con đường Embden Meyerhof xúc tác phản ứng chuyển một nhóm phosphat từ phospho enolpyruvat sang ADP tạo thành pyruvat và tạo ra 1 ATP. Đây là một trong hai khâu trực tiếp tạo ra ATP của quá trình chuyển hóa glucose theo con đường đường phân trong hồng cầu. ATP cần thiết cho nhiều hoạt động của hồng cầu cũng như để duy trì hoạt động của bơm $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ ở màng hồng cầu giữ cho cấu trúc của hồng cầu có dạng hình đĩa lõm hai mặt, giúp hồng cầu lách qua mao mạch dễ dàng khi chuyển giao oxy cho cơ thể [68, 147].

Hoạt độ PK hồng cầu liên quan đến tuổi và giới tính. Hoạt độ PK hồng cầu ở nữ cao hơn nam, PK hồng cầu của trẻ em cao hơn người trưởng thành là nhận xét của Chi Sun Feng [63]. Hoạt độ PK hồng cầu có liên quan với tỷ lệ hồng cầu lưới, nồng độ hemoglobin, tuổi hồng cầu...[80, 116]. Hoạt độ PK bạch cầu cao gấp khoảng 300 lần trong hồng cầu [155].

Lần đầu tiên thiếu hụt PK hồng cầu được mô tả bởi Valentine vào năm 1961 [60, 84]. Thiếu hụt PK hồng cầu là bệnh thiếu hụt enzym của con đường glycolytic thường gặp nhất liên quan với thiếu máu tan máu mạn tính, chiếm khoảng 80% các trường hợp thiếu hụt enzym của con đường glycolytic. Thiếu hụt PK là bệnh di truyền gen lặn trên nhiễm sắc thể thường. Cùng với giảm G-6-PD thì giảm PK là hai nguyên nhân thường gặp nhất trong nhóm bệnh lý enzym hồng cầu gây HNSHA [104]. Đến nay, có hơn 400 trường hợp thiếu hụt PK hồng cầu được mô tả trong các y văn thế giới [155].

Thiếu hụt PK hồng cầu khi hoạt độ PK hồng cầu thấp hơn 85% so với hoạt độ PK hồng cầu của người bình thường. Mức độ PK hồng cầu được Tổ chức y tế thế giới (WHO) phân loại [155].

Thiếu hụt PK hồng cầu gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến chuyển hóa glucose vì PK có vai trò trung tâm trong chuyển hóa tế bào, sản phẩm của phản ứng này là pyruvat có liên quan đến một số con đường chuyển hóa khác. Khi thiếu hụt PK hồng cầu sẽ giảm tổng hợp ATP, tăng nồng độ các sản phẩm chuyển hóa trước đó trong hồng cầu: 2,3-DPG, glucose-6-phosphat, 3-phosphoglycerat [97, 100, 155].

Bệnh nhân thiếu hụt PK hồng cầu bẩm sinh ở trạng thái đồng hợp tử thường có biểu hiện thiếu máu tan máu nặng ngay từ nhỏ và phải truyền máu. Thiếu hụt PK hồng cầu thể dị hợp tử có biểu hiện rất nhẹ với các triệu chứng: thiếu máu, vàng da, lách to, nhiều trường hợp bình thường không biểu hiện và thiếu hụt PK hồng cầu thường được phát hiện khi dùng thử nghiệm sàng lọc hay khi đo hoạt độ PK hồng cầu [155].

1.1.2.3. 2,3 Diphosphoglycerat (2,3-DPG)

2,3- DPG là một sản phẩm chuyển hóa trung gian của glucose trong con đường Embden-Mayerhof, ở hồng cầu nồng độ 2,3-DPG cao hơn nhiều lần so với các tế bào khác trong cơ thể. 2,3-DPG gắn vào hốc trung tâm tạo bởi 4 chuỗi globin của hemoglobin khi hemoglobin chưa gắn oxy. 2,3-DPG có vai trò như một yếu tố dị lập thể âm tính đối với ái lực hemoglobin và oxy, tham gia điều hòa ái lực hemoglobin với oxy.

Ở máu lưu trữ nồng độ 2,3 DPG giảm rất nhanh [6, 74, 106, 111] do vậy ái lực của Hb với O₂ tăng ở những bệnh nhân được truyền máu lưu trữ, máu này chưa thể cung cấp oxy ngay cho mô được. Điều này rất quan trọng đối với những bệnh nhân cần truyền một khối lượng máu lớn (bệnh nhân chảy máu ồ ạt, phẫu thuật). Nồng độ 2,3-DPG giảm nhanh chóng bởi các quá trình chuyển hóa ở HC và 2,3-DPG cũng nhanh chóng được tạo thành từ các hợp chất có phosphat như 1,3-DPG, 3-PG, 2-PG.

1.1.3. Các dạng oxy hoạt động, sự peroxi hóa lipid và hệ thống chống oxy hóa.

1.1.3.1. Các dạng oxy hoạt động

Các dạng oxy hoạt động có vai trò quan trọng gây oxy hóa hemoglobin, oxy hóa nhóm - SH của protein và gây peroxi hóa lipid. Trong hoạt động sống của tế bào như trong chuyển hóa, hô hấp đã sản sinh ra các gốc tự do và nhiều dạng oxy hoạt động như $O_2^{\cdot-}$, $HO^{\cdot}$, 1O_2 , H_2O_2 , trong đó $O_2^{\cdot-}$ và $HO^{\cdot}$ có hoạt tính mạnh. Tuy nhiên, các dạng oxy hoạt động được sinh ra thường xuyên và cũng thường xuyên bị phá huỷ nên chúng tồn tại với nồng độ rất thấp trong tế bào. Từ các dạng oxy hoạt động, phản ứng dây chuyền làm cho các gốc tự do mới được tạo ra, các gốc tự do có thể oxy hóa các hợp chất cao phân tử như protein, ADN, lipid làm mất hoạt tính sinh học, làm biến đổi cấu trúc các thành phần của tế bào [14, 148].

Hồng cầu làm nhiệm vụ vận chuyển oxy cho cơ thể nên có nồng độ oxy tự do cao và có nhiều sắt dưới dạng Fe^{2+} là điều kiện thuận lợi cho phản ứng gốc tự do tự khơi mào và lan truyền mạnh gây oxy hóa chuỗi globin, peroxi hóa lipid màng tế bào, polyme hóa các phân tử protein. Tuy nhiên, trong hồng cầu có hệ thống chống oxy hóa nhằm dập tắt các phản ứng dây chuyền để hạn chế sự sản sinh ra các gốc tự do, trong đó phân chia làm 2 loại:

+ Chất chống oxy hóa có bản chất không phải là enzym gồm: Nhóm các polyphenol, nhóm các thiol và nhóm các phối tử của sắt và đồng.

+ Chất chống oxy hóa có bản chất enzym.

Hệ thống enzym chống oxy hóa rất quan trọng, chủ yếu tập trung trong tế bào đó là catalase, G6PD, SOD, GPx, GR.

1.1.3.2. Sự peroxi hóa lipid

Màng tế bào được cấu tạo bởi lớp phospholipid kép, các phân tử protein được khảm vào lớp lipid màng. Đó là thành phần cơ bản cấu tạo nên màng bào tương và các bào quan của mọi tế bào trong đó có hồng cầu. Các acid béo tham gia cấu tạo lipid màng có thể là acid béo không no nhiều liên kết đôi như acid arachidonic: $20C. 4\Delta (5,8,11,14)$. Các acid béo không no nhiều liên kết đôi rất dễ bị oxy hóa ở vị trí nhóm methylen $-CH_2-$ nằm giữa hai nguyên tử C có liên kết đôi trên chuỗi acyl. Đó là quá trình peroxi hóa lipid. Đặc biệt trong hồng cầu có các điều kiện

thuận lợi cho quá trình này như nồng độ oxy tự do cao, có mặt Fe^{2+} là kim loại chuyển tiếp xúc tác nên màng hồng cầu dễ bị peroxi hóa acid béo không no.

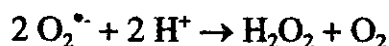
MDA là sản phẩm cuối cùng của quá trình peroxi hóa các acid béo không bão hòa có nhiều liên kết đôi. Nồng độ của MDA tương ứng với mức độ peroxi hóa lipid màng nên nồng độ MDA được dùng để đánh giá mức độ peroxi hóa lipid màng tế bào. Nồng độ MDA được xác định trong huyết tương hoặc máu toàn phần dựa vào phản ứng màu với thiobarbituric acid. Nồng độ MDA tăng tuyến tính với mức độ peroxi hóa lipid.

Trong tế bào có sẵn hệ thống chống oxy hóa làm mất tác dụng của các gốc tự do, hạn chế tác hại của quá trình peroxi hóa. Đó là hệ thống enzym chống oxy hóa như CAT, GSH-Px, GR, SOD và các chất chống oxy hóa không có bản chất enzym như vitamin C, vitamin E, vitamin A, CoQ...

1.1.3.3. Các enzym chống oxy hóa trong hồng cầu

Superoxid dismutase (SOD-EC 1.15.1.1)

SOD là enzym oxy hóa khử, còn gọi là enzym superoxid oxydoreductase, SOD có mặt trong tất cả các tế bào có chuyển hóa oxy. SOD xúc tác phản ứng phân huỷ anion superoxid.



Người ta đã tìm thấy 4 dạng khác nhau của SOD:

Cu/Zn SOD được thấy trong bào tương và khoảng giữa hai màng ty thể của các tế bào người.

Mn SOD có trong matrix của tế bào người.

Mn SOD tìm thấy ở matrix tế bào E. coli.

Fe SOD tìm thấy ở bào tương tế bào E. coli.

Cu/Zn SOD tồn tại ở dạng dimer, gen mã hóa cho Cu/Zn SOD ở người nằm trên nhiễm sắc thể 21 [9]. Hoạt tính SOD trong hồng cầu thay đổi ở bệnh nhân bị hội chứng Down và các bệnh thiếu máu bất sản, rối loạn sinh tủy, đa u tủy xương, u lympho, leukemia dòng tủy mạn tính [109].

Glutathion peroxidase (GPx, EC1.11.1.9)

Glutathion peroxidase là enzym oxy hóa khử xúc tác phản ứng loại bỏ các peroxid vô cơ và hữu cơ.



Có hai loại GPx:

- GPx phụ thuộc selen và GPx không phụ thuộc selen.

GPx chỉ có hoạt tính phân huỷ H_2O_2 ở nồng độ thấp, bị ức chế bởi H_2O_2 ở nồng độ cao, nhưng khi đó catalase được hoạt hóa để phân huỷ H_2O_2 . GPx hoạt động xúc tác cần GSH, nên cần GR tái tổng hợp GSH từ GS-SG, đồng thời cần G-6-PD để tạo ra NADPH cung cấp cho quá trình chuyển GS-SG thành GSH. Do đó, cơ thể cần 3 enzym GR, GPx, G-6-PD tạo thành hệ thống enzym phòng thủ chống lại quá trình oxy hóa [9, 119].

GPx hồng cầu giảm trong thiếu máu hồng cầu hình liềm, Hb Lepore [68]. Giảm hoạt tính GPx là một trong những nguyên nhân gây tan máu vì sự tích lũy các chất độc hại trong tế bào và gây tổn thương tế bào. Tại Việt Nam, nghiên cứu GPx bắt đầu được chú ý trên bệnh nhân HbE/ β thalassemia [22]. Giảm hoạt tính GPx được coi là thường gặp trong số những bệnh lý enzym hồng cầu, bệnh di truyền nhiễm sắc thể thường [150]. Tuy nhiên, giảm hoạt độ GPx có thể mắc phải do dinh dưỡng như thiếu cung cấp selen [105].

Glutathion reductase (GR-EC 1.6.4.2)

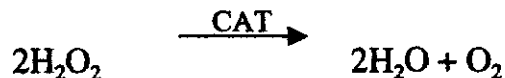
Là enzym tái tổng hợp nên glutathion dạng khử từ dạng oxy hóa với cơ chất cho hydro là NADPH, cơ chế phản ứng như sau:



Nhờ có GR mà GSH thường xuyên được bổ sung, tái tạo. GSH không thể thiếu trong hoạt động xúc tác của GPx nhằm loại bỏ các hydroxid vô cơ và hữu cơ. Trong hồng cầu, chống lại quá trình oxy hóa, đó là hệ thống enzym chống oxy hóa cần NADPH, do chuyển hóa glucose cung cấp. Vì vậy, khi giảm G6PD làm giảm tổng hợp NADPH gây hạn chế quá trình chống oxy hóa hồng cầu.

Catalase (CAT)

Là enzym oxy hóa khử, xúc tác phản ứng phân hủy peroxid vô cơ thành nước và giải phóng oxy.



Là enzym chống oxy hóa được biết đến đầu tiên. Tuy nhiên CAT không phân hủy được các peroxid hữu cơ và peroxid vô cơ ở nồng độ thấp.

Hệ thống enzym chống oxy hóa hoạt động trong tế bào của các mô, dịch của cơ thể, nhưng hoạt động mạnh nhất ở hồng cầu, do hồng cầu thường xuyên có nguy cơ bị các chất oxy hóa tấn công gây tổn hại.

1.1.3.4. Hệ thống các chất chống oxy hóa không có bản chất enzym

♦ Nhóm các polyphenol

Trong nhóm này có vitamin E, vitamin C, vitamin A, coenzym Q, bioflavonoid.

♦ Nhóm các thiol gồm có: glutathion dạng khử, mercaptopropionyl glycin, N-acetylcystein.

♦ Nhóm các phối tử của sắt và đồng:

Ion sắt và đồng (chủ yếu là sắt) xúc tác phản ứng Fenton tạo nên hai dạng oxy hoạt động rất độc hại cho cơ thể HO^* và $^1\text{O}_2$. Các phối tử của sắt và đồng bao gồm: transferrin, lactoferrin, ceruloplasmin có khả năng tạo phức với sắt và đồng nên có khả năng ngăn ngừa phản ứng Fenton xảy ra.

1.2. CHÌ VÀ SỰ TÁC ĐỘNG CỦA CHÌ TRÊN CƠ THỂ CON NGƯỜI

1.2.1. Chì và tình hình sử dụng các chế phẩm có chì gây ô nhiễm môi trường.

Chì (Pb) là một kim loại nặng, mềm, dễ kéo dài và dát mỏng, màu xám nhạt, trọng lượng phân tử 207,2, tỷ trọng 11,3, điện tích hạt nhân là 82. Chì nóng chảy ở nhiệt độ 327°C , sôi ở 1740°C ; ở nhiệt độ $550-600^\circ\text{C}$ chì bắt đầu bốc hơi ra môi trường xung quanh. Chì có khả năng rất đặc biệt là tạo liên kết với nitơ, lưu huỳnh, cacbon thành phức hợp hữu cơ - kim loại và do vậy, trong những trường hợp này, chì có thể có hóa trị 2 hoặc hóa trị 4 [78]. Phức hợp chì-hữu cơ hay dùng hơn cả là: tetraethyl-Pb, tetraethyl-Pb được pha trong xăng dầu (xăng pha chì) để tránh hiện

tượng nổ sớm của động cơ [2]. Chì và các hợp chất của chì được sử dụng nhiều trong công nghiệp chế tạo ắc quy điện, các hợp kim để hàn, vỏ dây cáp điện, lá kim loại, sơn, đạn, chất màu, công nghệ ép đúc... Ngoài ra, trong nông nghiệp, chì cùng asen được dùng để chế thuốc trừ sâu; ngành y được dùng chì chế tạo một số loại thuốc.

Các hoạt động trong công nghiệp, nông nghiệp, giao thông...có sử dụng chế phẩm chứa chì là nguyên nhân gây ô nhiễm chì trong môi trường sống. Hoạt động sống của con người luôn luôn gắn liền với môi trường thông qua không khí, đất, nước, thực phẩm; môi trường bị ô nhiễm có thể ảnh hưởng tới sức khỏe con người.

Những người luôn tiếp xúc với chì và hợp chất có chì trong quá trình lao động sản xuất có thể bị nhiễm chì. Theo Linda Rosenstock, các ngành nghề có sự tiếp xúc trực tiếp với chì ở mức độ cao là: thợ ắc quy, công nhân sửa chữa đồng thau, thợ đồng thiếc, thợ nấu chì, thợ mài đốt tinh chế kim loại, thợ sơn, thợ sản xuất dây cáp điện, thợ đúc, thợ sắt, thợ hàn bằng súng, thợ nhuộm, thợ gốm, thợ in, thợ hàn [trích dẫn từ 2].

Ở Việt Nam, theo Trần Đức Bình (1977), trong số công nhân được điều tra có 47% nhiễm chì, gặp nhiều nhất là ở các công nhân luyện chì, chế tạo bột chì của nhà máy ắc quy Hải Phòng [4]. Hầu hết số công nhân tiếp xúc nghề nghiệp lâu năm với xăng dầu, có tình trạng sức khỏe giảm sút do bị nhiễm chì [11, 12, 13, 17, 30, 31, 33].

Kết quả điều tra cho thấy tỷ lệ người tiếp xúc nghề nghiệp lâu năm với xăng chì có nguy cơ thâm nhiễm vào vào khoảng 15-20% [40].

Trong không khí, chì tồn tại dưới dạng hơi và bụi. Hàm lượng chì được thấy cao nhất trong không khí ở nơi có mật độ giao thông cao, đặc biệt trong thành phố lúc giờ cao điểm. Ở Việt Nam, theo điều tra của Quốc Anh (1999), hàm lượng chì trung bình trong không khí tại nội thành Hà Nội là $2,94 \pm 2,62 \mu\text{g}/\text{m}^3$, mức độ chì này cao hơn tiêu chuẩn hàm lượng chì tối đa trong không khí ở khu vực dân cư của WHO (1978) ($1\mu\text{g}/\text{m}^3$ không khí) và cao hơn nhiều lần tiêu chuẩn năm 1993 ($0,7-1\mu\text{g}/\text{m}^3$) cho phép tại khu dân cư Việt Nam[2].

Chì trong đất là do bụi chì trong không khí lắng xuống và một phần chất thải công nghiệp tồn lưu. Hoạt động giao thông đã gây ra một phần quan trọng trong ô nhiễm chì đất, lượng chì này giảm dần theo khoảng cách so với đường giao thông. Kết quả xác định hàm lượng chì trong đất của Weitzman và cộng sự (1993), đã tiến hành tại các thành phố lớn ở Mỹ cho thấy hàm lượng chì trung bình là 2075 ppm [145].

Sự liên quan giữa lượng chì trong bụi không khí, đất và lượng chì máu ở trẻ em đã được nhiều người nghiên cứu [2, 46, 47, 77]. Tại Việt Nam, còn ít các nghiên cứu đánh giá về mức độ ô nhiễm chì trong đất do vậy cần nghiên cứu sự tồn lưu chì trong đất ở nước ta.

Nước bị ô nhiễm chì thường liên quan tới việc sử dụng dụng cụ đựng nước, đặc biệt đường ống dẫn nước có sử dụng các mối hàn chì. Potula và cộng sự (1999), trong quá trình điều tra mối quan hệ giữa hàm lượng chì trong nước với nồng độ chì xương sau 20 năm đã thấy có sự thâm nhiễm chì và coi hàm lượng chì vôi nước qua đem là một dấu hiệu quan trọng để định lượng chì xương sau này [125]. Tại Mỹ, việc giám sát hàm lượng chì trong nước cho thấy ít khi vượt quá 50 $\mu\text{g/l}$ nước. Ở Việt Nam, tiêu chuẩn hàm lượng chì tối đa cho phép trong nước dùng sinh hoạt không vượt quá 50 $\mu\text{g/l}$ nước [trích dẫn từ 2].

Hàm lượng chì trong thực phẩm và đồ uống dao động nhiều, phần lớn thực phẩm bị nhiễm chì xảy ra do chế biến và bảo quản. Các loại rau thân mềm đời sống ngắn ngày có hàm lượng chì cao hơn, tiếp theo là các loại củ. Chì có trong thịt, cá, trứng với một hàm lượng đáng kể [trích dẫn từ 2]. Quá trình tích lũy chì trong đất, nước và thực phẩm biến đổi theo những điều kiện của vùng địa lý.

1.2.2. Đường xâm nhập, sự tích lũy và đào thải chì.

Chì thâm nhập vào cơ thể người thông qua ba đường chính là hô hấp, tiêu hóa và qua da.

Chì trong không khí ở dạng hơi, bụi cho nên sự xâm nhập của chì qua đường hô hấp xảy ra dễ dàng. Chì có thể vào cơ thể theo đường tiêu hóa qua thức ăn và đồ uống, điều này liên quan tới thói quen vệ sinh trước khi ăn và hút thuốc. Chì được hấp thu ở đường tiêu hóa ít hơn so với đường hô hấp và khả năng hấp thu phụ

thuộc vào độ hòa tan của các hợp chất chì. Chì qua đường tiêu hóa: 10% bị hấp thu, 90% còn lại được đào thải theo phân. Mức độ hấp thu và độc tính của chì phụ thuộc vào độ acid của dịch vị. Dịch vị có khả năng hòa tan các hợp chất chứa chì và tạo phản ứng sinh clorua chì, dạng hòa tan này dễ hấp thu và làm tăng độc tính của chì. Sự hấp thu chì ở đường tiêu hóa còn chịu tác động của dịch mật. Chu trình gan ruột làm tăng vòng lưu chuyển của chì, muối mật cũng hòa tan chì, điều này tạo điều kiện cho hấp thu chì tăng. Nếu lượng chì trong thức ăn ít nhưng được ăn liên tục kéo dài vẫn có thể ảnh hưởng đến chức năng khử độc của gan, làm suy giảm chức năng cố định và thải trừ chì của gan, dẫn đến tăng chì máu [trích dẫn từ 18]. Simon J A, đã cho rằng có mối liên quan giữa nồng độ ascorbic acid với nồng độ chì máu [134]. Silbergeld E K, Symanski E, thấy hàm lượng chì máu tăng cao trong các trường hợp tiền mãn kinh, mang thai, cho con bú và hút thuốc lá [139].

Chì vào cơ thể được phân bố ở ba khu vực chính: xương, mô mềm và máu. Trong hồng cầu, chì kết hợp với 4 loại protein khác nhau. Chì gắn nhiều nhất vào enzym δ -aminolevulinic acid dehydratase (35-85% trường hợp có chì máu cao). Người ta chứng minh rằng khả năng gắn tối đa của enzym này với chì ở nồng độ 850 $\mu\text{g/l}$ và độ ly giải ở nồng độ 1,5 $\mu\text{g/l}$. Protein có trọng lượng phân tử là 45 kDa gắn 12-26 % các trường hợp có chì máu cao, protein trọng lượng phân tử nhỏ hơn 10 kDa gắn dưới 1%, có protein gắn chì không phân giải chiếm 2- 45 %; Không tìm thấy hemoglobin gắn chì [46].

Sau khi vào cơ thể qua đường tiêu hóa, một phần nhỏ chì được hấp thu vào máu, phần lớn còn lại đào thải ra ngoài theo phân, nước tiểu, nước bọt và tóc.

Các con đường thải chì có tác dụng tránh độc hại do chì gây ra cho cơ thể. Trường hợp tăng hấp thu, tăng tích lũy, các mô sẽ bị chì tác động dần dần và rồi những rối loạn chức năng sẽ xuất hiện.

Tóm lại, có thể thấy rằng, chì với lĩnh vực ô nhiễm môi trường đã được nhiều tác giả ngoài nước nghiên cứu khá đầy đủ. Tuy vậy, ở Việt Nam mới chỉ có một số công trình điều tra về vấn đề này dưới góc độ tìm hiểu sự thâm nhiễm chì tại một số cơ sở có nguy cơ thâm nhiễm cao như nhà máy in, nhà máy đúc quỳ, ngành xăng dầu... Gần đây, cũng có một vài đề tài điều tra trên cộng đồng dân cư

nhưng với quý mô nhỏ, chủ yếu ở trẻ em [2, 4, 12, 17, 30, 31], ít người nghiên cứu độ độc của chì ở mức độ phân tử.

1.2.3. Độ độc và cơ chế gây độc của chì

Những nghiên cứu về cơ chế gây độc của chì đã được thực hiện từ những năm đầu của thế kỷ XX. Fischer H. và một số tác giả, đã có những nghiên cứu về porphyrin niệu và coproporphyrin niệu tăng như là hậu quả của nhiễm độc chì.

Từ những năm 1960, cơ chế tác động của chì lên các thông số huyết học đã được Gajdos (1957), Haeger Aronsen (1960), Weil E. (1970), Duhamel G. (1971) nghiên cứu. Họ thấy rằng: chì tác động lên nhiều chặng của quá trình tổng hợp hemoglobin [*trích dẫn từ 29*].

Tác động của chì lên quá trình sinh tổng hợp hemoglobin chủ yếu làm giảm hoạt độ enzym δ ALA dehydratase và một số enzym khác của con đường tổng hợp, có sự tích lũy và tăng thải qua đường nước tiểu ALA và coproporphyrin, làm giảm nồng độ hemoglobin của hồng cầu, giảm số lượng hồng cầu, tăng số lượng hồng cầu hạt kiềm, tăng sắt huyết thanh [46, 128].

Ảnh hưởng của chì đối với hệ tạo huyết gây thiếu máu là biểu hiện rõ rệt nhất của nhiễm độc chì, nó được coi là một dấu hiệu để chẩn đoán lâm sàng. Chì ức chế hoạt động và phá huỷ enzym pyrimidine-5'-nucleotidase, gây xuất hiện nhiều hồng cầu hạt kiềm do tích tụ pyrimidin nucleotit [10, 103].

Ảnh hưởng của chì đối với hệ thần kinh, chì tác động tới thần kinh trung ương, gây viêm thần kinh khu trú và tổn thương các tế bào não, gây viêm não chì kiểu Parkinson và có nguy cơ ung thư thần kinh [40].

Ảnh hưởng của chì đối với chức năng thận, chì có thể gây tổn thương ống lượn gần, làm thay đổi cấu trúc tế bào đáy ống lượn gần, thay đổi về hình thái và chức năng thận, tế bào ống thận, làm tăng ure máu, giảm độ thanh lọc creatinin ở những người có thời gian thâm nhiễm chì kéo dài và có nồng độ chì máu cao [129].

Ảnh hưởng của chì đối với hệ tim mạch, nhiễm chì là một yếu tố nguy cơ gây tăng huyết áp ở nam giới.

Ảnh hưởng của chì đối với hệ tiêu hóa:

Đau bụng là một triệu chứng dễ nhận thấy ở công nhân bị nhiễm độc chì, thường kèm các biểu hiện như: chuột rút, buồn nôn, nôn, chán ăn, giảm trọng lượng.

Ảnh hưởng của chì lên chức năng gan

Chì được cố định trong gan và thải trừ dần. Vì vậy, khi tích lũy trong gan chì phát huy độc tính của nó đối với các tế bào gan, chì gây tổn thương tế bào gan và làm giảm chức năng gan .

Ảnh hưởng của chì lên chức năng sinh sản, làm giảm số lượng và khả năng sống của tinh trùng, làm tinh trùng biến dạng.

Ngoài ra, người ta còn thấy chì có ảnh hưởng với hệ thống miễn dịch, hệ thống chống oxy hóa và có khả năng gây ung thư [40, 41].

Chì tác động lên enzym chứa nhóm SH và các protein có nhóm SH. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng chì cũng như một số kim loại nặng có ái lực cao với các trung tâm hoạt động là nhóm SH của nhiều enzym với cơ chế tạo phức và làm mất chức năng của nhóm SH [42, 64].

Các nghiên cứu về mức peroxi hóa lipid huyết thanh và hoạt độ các enzym chống oxy hóa (SOD, GPx, GR) trong máu của công nhân thâm nhiễm chì đã được nhiều tác giả đề cập đến [64]. Thuốc lá và rượu làm tăng stress oxy hóa trong công nhân tiếp xúc với chì .

Như vậy, chì ảnh hưởng lên nhiều chức năng của nhiều cơ quan trong cơ thể. Nghiên cứu về những tác động do chì gây nên là những vấn đề đang được thế giới quan tâm.

Cho đến nay, những nghiên cứu trong nước ta mới chỉ đề cập đến các điều tra dịch tễ học, phát hiện các trường hợp nhiễm chì để cho thải chì, ảnh hưởng của chì máu lên chức năng gan, thận [2, 17, 30, 31]. Những công trình trong nước đề cập đến độc tính của chì trên quá trình tạo huyết, tuy nhiên mối tương quan giữa nồng độ chì máu với hoạt độ một số enzym chống oxy hóa của hồng cầu và tình trạng chống oxy hóa toàn phần của huyết thanh chưa nhiều. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này, để có thể rút ra những kết luận bổ ích cho lâm sàng trong điều trị bệnh nhiễm chì nghề nghiệp.

1.3. THIẾU MÁU TAN MÁU

Thiếu máu là tình trạng giảm nồng độ Hb lưu hành trong máu ngoại vi dưới mức bình thường so với người cùng tuổi, cùng giới, cùng điều kiện sống. Thiếu máu gặp với tỷ lệ lớn trong cộng đồng đặc biệt ở các nước đang phát triển.

Tan máu là một nguyên nhân gây thiếu máu do sự phá huỷ hồng cầu vượt quá mức bình thường. Đời sống hồng cầu rút ngắn hơn so với bình thường, vì vậy tủy xương tăng sinh nhằm bù lại lượng máu mất đi do vỡ hồng cầu. Trung bình đời sống hồng cầu ở người bình thường là 100 đến 120 ngày, nếu đời sống hồng cầu chỉ còn 50-70 ngày thì sự sản sinh hồng cầu không đủ bù đắp sự phá huỷ hồng cầu gây thiếu máu [84].

Thiếu máu tan máu có thể do nhiều nguyên nhân khác nhau:

1.3.1. Thiếu máu tan máu do nguyên nhân tại hồng cầu.

Do bệnh lý màng hồng cầu: gây bệnh hồng cầu hình cầu, hình elip, hình gai di truyền. Hồng cầu mất cấu trúc hình đĩa lõm hai mặt, trở nên hình cầu, elip, hình gai nên khi đi qua mao mạch hồng cầu khó biến dạng và dễ vỡ trong mao mạch.

Do bệnh lý Hb: những thay đổi về cấu trúc hoặc số lượng chuỗi globin của Hb làm ảnh hưởng tới cấu trúc và chức năng của Hb gây bệnh lý Hb. Bất thường cấu trúc Hb như: HbS, HbC, HbE... Bất thường số lượng chuỗi globin: giảm hoặc mất tổng hợp chuỗi α gây α thalassemia; giảm hoặc mất tổng hợp chuỗi β gây β -thalassemia [16, 18, 81].

Do bệnh lý enzym hồng cầu: thiếu hụt các enzym chuyển hóa glucose trong hồng cầu như thiếu hụt G-6-PD, PK, thiếu hụt aldolase, hexokinase... [21, 26, 44, 45, 51, 91]. Hoặc như thiếu các enzym chuyển hóa glutathion: glutathion reductase [60], glutathion peroxidase, glutathion synthetase, glutathion S transferase... [149, 150]. Thiếu hụt các enzym chuyển hóa nucleotid: pyrimidin 5' nucleotidase... [91] là những nguyên nhân gây tan máu.

1.3.2. Thiếu máu tan máu do những bất thường ngoài hồng cầu.

Thiếu máu tan máu miễn dịch: tan máu do cơ chế đồng miễn dịch, tự miễn dịch, do dị ứng mà thường gặp tan máu do bất đồng nhóm máu mẹ và con về hệ

thống Rh, ABO hoặc do truyền máu khác nhóm. Do cơ thể xuất hiện kháng thể tự miễn chống lại kháng nguyên hồng cầu, cùng với sự có mặt của bổ thể gây ly giải hồng cầu.

Thiếu máu tan máu do nguyên nhân cơ học: như tuần hoàn ngoài cơ thể, sử dụng van tim nhân tạo gây tan máu nhưng những nguyên nhân này thì ít gặp.

Thiếu máu tan máu do nhiễm trùng, ký sinh trùng như tan máu do nhiễm tụ cầu, trực khuẩn mủ xanh, liên cầu hay khi nhiễm ký sinh trùng sốt rét.

Thiếu máu tan máu do nhiễm độc hóa chất, do bỏng như nhiễm độc benzen, toluen, thủy ngân, nấm độc hoặc do bỏng nóng hay lạnh đều có thể gây tan máu.

Thiếu máu có thể mạn tính, không có triệu chứng lâm sàng rõ rệt, cũng có thể có cơn tan máu cấp đặc biệt khi dùng một số thuốc gây oxy hóa mạnh, khi nhiễm trùng. Ngoài ra thiếu máu có thể do thiếu dinh dưỡng, thiếu sắt, thiếu vitamin, do bệnh lý tuỷ xương trong các bệnh lý ung thư, suy gan, suy thận. Tuy nhiên, cho dù vì nguyên nhân nào thì các bệnh nhân thiếu máu tan máu đều có đặc điểm chung đó là tình trạng thiếu máu do sự phá huỷ hồng cầu quá mức, sự xuất hiện của hồng cầu chưa trưởng thành trong máu ngoại vi, quá tải sắt do vỡ hồng cầu hoặc do truyền máu. Vì vậy, hồng cầu tăng nguy cơ bị oxy hóa gây tổn thương màng hồng cầu, đặc biệt khi có tác nhân oxy hóa tác động, hồng cầu vỡ hàng loạt gây cơn tan máu cấp. Trên các bệnh nhân tan máu, hồng cầu tăng cường chuyển hóa, chống oxy hóa góp phần bảo vệ hồng cầu. Do đó có sự thay đổi hoạt độ các enzym chuyển hóa cũng như các enzym chống oxy hóa trong hồng cầu.

Tan máu tự miễn dịch: Tan máu tự miễn dịch là nguyên nhân hay gặp nhất trong nhóm nguyên nhân gây tan máu mắc phải. Có sự hình thành tự kháng thể chống lại kháng nguyên hồng cầu. Tan máu do cơ chế miễn dịch gây nên khi có sự kết hợp kháng nguyên và kháng thể đặc hiệu làm hoạt hóa bổ thể gây ly giải hồng cầu. Trong tan máu tự miễn hồng cầu bình thường về cấu trúc và hệ thống enzym.

1.3.3. Mối liên quan giữa chuyển hóa glucose, khả năng chống oxy hóa và thiếu máu tan máu.

Các chuyển hóa trong hồng cầu, phần lớn có xu hướng bảo vệ các cấu tử hồng cầu chống lại sự oxy hóa. Hồng cầu là một tế bào có chứa nhiều oxy cho nên các

cấu trúc của nó thường xuyên có nguy cơ bị oxy hóa và rất nhạy cảm với quá trình oxy hóa. Vì vậy, rất dễ bị huỷ hoại và sẽ chết. Để tránh hiện tượng này, hồng cầu có cả một bộ máy để thực hiện cơ chế khử. Các cơ chế khử của hồng cầu được thực hiện bằng một loạt phản ứng xúc tác bởi các enzym mà tác dụng thông thường của chúng là sự vận chuyển hydro đến những chất cần được khử thông qua vai trò trung gian của các coenzym. Hai coenzym vận chuyển hydro có vai trò đặc biệt quan trọng trong hồng cầu là NADH được tạo thành trên con đường Embden-Meyerhoff và NADPH được sản sinh trên con đường hexosemonophosphat trong những phản ứng xúc tác bởi G6PD và 6-phosphogluconat dehydrogenase. G6PD là enzym mở đầu chu trình hexosemonophosphat. NADPH có tác dụng duy trì glutathion và Hb ở trạng thái khử, nó cũng bảo vệ sự toàn vẹn của màng hồng cầu, các nhóm SH của protein, các enzym của hồng cầu và chống lại các tác nhân oxy hóa trong hồng cầu.

Chuyển hóa glucose cung cấp năng lượng chính cho hoạt động sống của hồng cầu trong đó có quá trình chống oxy hóa bảo vệ hồng cầu. Thoái hóa glucose theo hai con đường Embden-Meyerhof và hexose monophosphat đã sản sinh ra ATP và nhiều NADH, NADPH. Nguồn năng lượng này đảm bảo cho hồng cầu có cấu trúc và chức năng bình thường sống được khoảng 120 ngày. Chính ATP cần thiết để duy trì sắt của Hb ở dạng Fe^{2+} , duy trì nồng độ K^+ cao, Ca^{2+} thấp, Na^+ thấp ở trong hồng cầu so với ngoài huyết tương. Để duy trì gradient nồng độ giữa hồng cầu và huyết tương thì cần hoạt động của bơm $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, bơm canxi, những bơm này cần ATP. Ngoài ra ATP còn cần thiết để duy trì nhóm sulfhydryl của các enzym cũng như Hb ở dạng hoạt động- dạng khử. Vì vậy, ATP cần thiết để duy trì cấu trúc hai mặt lõm của hồng cầu [105].

Khi thiếu nguồn năng lượng cung cấp, hồng cầu bị ứ đọng Na^+ và Ca^{++} nhưng lại thiếu K^+ , hồng cầu không duy trì được hình đĩa lõm hai mặt mà trở thành hình cầu, khi đó hồng cầu bị giữ lại khi đi qua gan, lách và bị thực bào, đời sống hồng cầu giảm rõ rệt. Đồng thời với thiếu ATP là thiếu NADH, NADPH khi giảm chuyển hóa glucose gây ra MetHb không khử được thành Hb. Vì vậy, MetHb không còn khả năng vận chuyển oxy và CO_2 , Hb bị oxy hóa làm xuất hiện thể Heinz trong hồng cầu.

Rối loạn chuyển hóa glucose do thiếu enzym G-6-PD, PK hồng cầu làm cho ATP, NADH, NADPH giảm trong hồng cầu, 2,3-DPG tăng, ái lực Hb với oxy giảm, khả năng chống oxy hóa của hồng cầu giảm do các enzym chống oxy hóa cần NADH, NADPH là những chất cho hydro. Do vậy khi gặp tác nhân oxy hóa hồng cầu bị vỡ hàng loạt gây thiếu máu tan máu.

Ngược lại, trong các trường thiếu máu tan máu có bất thường Hb, thalassemia hay thiếu máu tan máu chưa rõ nguyên nhân thì có thể thấy thay đổi hoạt độ các enzym chuyển hóa glucose như G-6-PD, PK, nồng độ 2,3-DPG và hoạt độ các enzym chống oxy hóa GPx, GR, SOD, khả năng chống oxy hóa toàn phần TAS, nồng độ MDA [22, 25, 58]. Do đó có mối quan hệ chặt chẽ giữa chuyển hóa glucose, khả năng chống oxy hóa trong hồng cầu với thiếu máu tan máu. Tuy có rất nhiều nguyên nhân gây thiếu máu tan máu, nhưng vì bất cứ nguyên nhân gì thì bệnh nhân thiếu máu tan máu thường có tình trạng quá tải sắt ở các mức độ khác nhau, nguy cơ tăng tình trạng peroxi hóa lipid, đời sống hồng cầu rút ngắn hơn so với bình thường. Vì vậy, phần nghiên cứu này nhằm tìm hiểu hoạt độ một số enzym chuyển hóa glucose, tình trạng peroxi hóa lipid và khả năng chống oxy hóa ở những bệnh nhân tan máu do các căn nguyên thường gặp.

1.4. MÁU BẢO QUẢN

1.4.1. Lịch sử truyền máu.

Năm 1628 Harvey W. người Anh phát hiện ra bộ máy tuần hoàn, sự khám phá này đã kích thích việc lấy máu truyền. Năm 1665, Lower R. người Mỹ đã thành công trong việc truyền máu súc vật với nhau: giữa một con chó này với một con chó khác.

Năm 1667, áp dụng thí nghiệm của Lower L., Denis J. giáo sư triết học và toán học Pari, cố vấn và là thầy thuốc của Louis XIV đã truyền máu 2 lần cho một bệnh nhân trẻ tuổi suy nhược và đã thành công, gây một tiếng vang lớn ở châu Âu nhưng đến lần truyền thứ 3 thì bệnh nhân tử vong, từ đó giáo hoàng ra sắc lệnh cấm truyền máu.

Đến thế kỷ XVIII, truyền máu được thực hiện trở lại. Năm 1818, Blundell J., lần đầu tiên thực hiện truyền máu của người cho bệnh nhân kết quả: bệnh nhân tử vong sau hai ngày, bệnh nhân thứ hai bị bệnh thiếu máu được truyền máu và đã thành công. Ông đã tiến hành truyền máu cho 10 bệnh nhân thì 5 bệnh nhân thành công, có thể do ngẫu nhiên phù hợp nhóm máu. Từ đó, việc truyền máu trở nên thông dụng hơn nhưng vẫn còn nhiều tai biến. Phương pháp truyền máu thời kỳ này là truyền trực tiếp; nối một ống thông giữa tĩnh mạch người cho và tĩnh mạch bệnh nhân. Sau đó, Blundell J. đã sử dụng biện pháp dùng bơm tiêm để lấy máu sau đó truyền cho bệnh nhân, vì vậy việc truyền máu đỡ phiền phức hơn.

Năm 1901, Landsteiner phát hiện ra hệ thống nhóm máu hệ ABO. Từ đó, việc truyền máu được thực hiện trên sự lựa chọn nhóm máu hòa hợp giữa người cho và người nhận nên tránh được tai biến nguy hiểm đã gặp trước đây.

Bộ dụng cụ truyền máu trực tiếp bằng bơm tiêm tuy đã được cải tiến nhưng vẫn không trở nên thông dụng. Cho tới năm 1914, chất chống đông đầu tiên natri citrat được Lewisohn người Bỉ tìm ra và việc bảo quản máu chống đông trong chai thủy tinh trong điều kiện lạnh ra đời. Phương pháp này được sử dụng trong suốt chiến tranh thế giới thứ I, thay thế cho phương pháp truyền máu trực tiếp.

Cho tới chiến tranh thế giới thứ II năm 1993, Loutit J. và Mollison P. phát hiện ra dung dịch chống đông acit citrat dextrose làm kéo dài thời hạn bảo quản máu trong điều kiện lạnh lên 3-4 tuần. Từ đó, việc truyền máu trở nên rộng rãi và thuận tiện ở hầu khắp các nước, nhiều triệu lít máu đã được gom phục vụ cho điều trị bệnh nhân.

Năm 1952, Gibson đưa túi dẻo vào sử dụng để chứa máu thay thế cho chai thủy tinh làm cho qui trình lấy máu được thực hiện trong hệ thống kín, bảo đảm vô trùng. Năm 1957, Gibson và các cộng sự đã tìm ra chất chống đông citrat - phosphat - dextrose (CPD), sau đó là CPD có thêm Adenin (CPD-A1 hoặc CPD-A2). Những dung dịch CPD và CPD -A hơn hẳn ACD do duy trì chức năng hô hấp HC, bảo vệ màng HC, duy trì áp lực thẩm thấu nên khi truyền máu, đặc biệt trong truyền máu khối lượng lớn an toàn hơn và thời gian lưu trữ máu dài hơn [98]. Các

dung dịch nuôi dưỡng hồng cầu như: SAGM, AS-3, AS-5... được các tác giả nghiên cứu và đưa vào sử dụng nhằm kéo dài đời sống HC [37, 54, 65, 99].

Việc sản xuất các thành phần máu cũng ngày càng phát triển. Vào những năm 1940, ở Mỹ và các nước châu Âu, người ta đã tách huyết tương từ máu toàn phần, huyết tương được lưu trữ trong điều kiện lạnh âm sẽ bảo quản được dài ngày hơn máu và sử dụng vào những trường hợp thích hợp.

Năm 1958, Jane Dausset - người Pháp phát hiện hệ thống kháng nguyên trên bạch cầu người (HLA). Điều này giải thích được những phản ứng miễn dịch ở bệnh nhân truyền máu còn bạch cầu, đặc biệt bệnh nhân truyền máu toàn phần, khối hồng cầu không được loại bỏ bạch tiểu cầu nhiều lần.

Từ những năm 1970 việc sản xuất các thành phần máu ngày càng phát triển do nhu cầu về truyền các thành phần máu như: tua lạnh yếu tố VIII, albumin, γ -globulin ngày càng tăng.

Máu và các thành phần máu đang được sử dụng rộng rãi, góp phần vào việc cứu sống bệnh nhân thì đồng thời các nhà khoa học đã phát hiện ra nhiều bệnh lây qua đường truyền máu nguy hiểm như: HCV, HIV, CMV ... [23, 24]. Vì vậy, vấn đề an toàn truyền máu được đặt ra. Bên cạnh việc xét nghiệm sàng lọc các bệnh lây truyền, các đơn vị máu trước truyền cần sử dụng một cách hợp lý, an toàn, tiết kiệm, để hạn chế tối đa tác dụng phụ của truyền máu. Quan điểm truyền máu hiện đại được đưa ra là "lấy máu tối thiểu, sử dụng tối đa", "bệnh nhân cần gì truyền nấy, không cần không truyền" [1, 3, 24].

1.4.2. Tình hình sử dụng máu và sản phẩm máu:

Thế giới: Nhiều nước trên thế giới đã vận động được toàn dân hiến máu nhân đạo không lấy tiền. Chính vì vậy, lượng máu được cung cấp đủ cho nhu cầu điều trị.

Ở các nước phát triển, hầu như 100% các đơn vị máu toàn phần được tách các thành phần máu. Ở Mỹ, từ năm 1985, bắt đầu sản xuất khối hồng cầu tách bạch tiểu cầu. Ở Pháp, từ năm 1998, tất cả các đơn vị máu toàn phần và khối hồng cầu

đều được loại bỏ bạch cầu bằng màng lọc [59]. Ở Thụy Sĩ, từ tháng 6/1999, 100% các đơn vị máu được loại bạch cầu bằng màng lọc. Ở Anh, từ tháng 10/1999 tất cả các đơn vị máu cũng đều được loại bạch cầu bằng màng lọc [*Trích theo 19*].

Những năm gần đây, các nước đang phát triển cũng đã và đang áp dụng kỹ thuật tách các thành phần máu để thực hiện truyền máu từng phần, nâng cao chất lượng an toàn truyền máu.

Việt Nam: Trước cuộc vận động hiến máu nhân đạo năm 1995, lượng máu chỉ đạt khoảng 4% so với nhu cầu. Trên 90% là máu của người cho chuyên nghiệp [23]. Cũng từ năm 1995, cả nước thay thế chai thủy tinh chứa máu bằng túi chất dẻo nhưng phần lớn mới chỉ dùng túi đơn 250ml, không thuận tiện cho việc sản xuất sản phẩm máu.

Đến năm 1998, lượng máu cả nước tăng lên đạt khoảng 15% so với nhu cầu, lượng máu do hiến máu nhân đạo chiếm khoảng 30%. Tại Viện Huyết học - Truyền máu, lượng máu nhân đạo chiếm khoảng 63% [23, 24].

Việc tách các thành phần máu chủ yếu được thực hiện ở một số trung tâm lớn như Viện Huyết học - Truyền máu, Trung tâm truyền máu thành phố Hồ Chí Minh. Tại Viện Huyết học - Truyền máu trên 70% đơn vị máu toàn phần được tách thành các thành phần máu, các khối hồng cầu đều được giảm bớt bạch cầu.

Năm 1999, trong chương trình vận động hiến máu nhân đạo, một số khoa truyền máu các tỉnh có thành phố được trang bị máy ly tâm lạnh và một số trang thiết bị khác cho việc sản xuất các thành phần máu. Các trung tâm này đang bắt đầu tiến hành sản xuất một số thành phần máu.

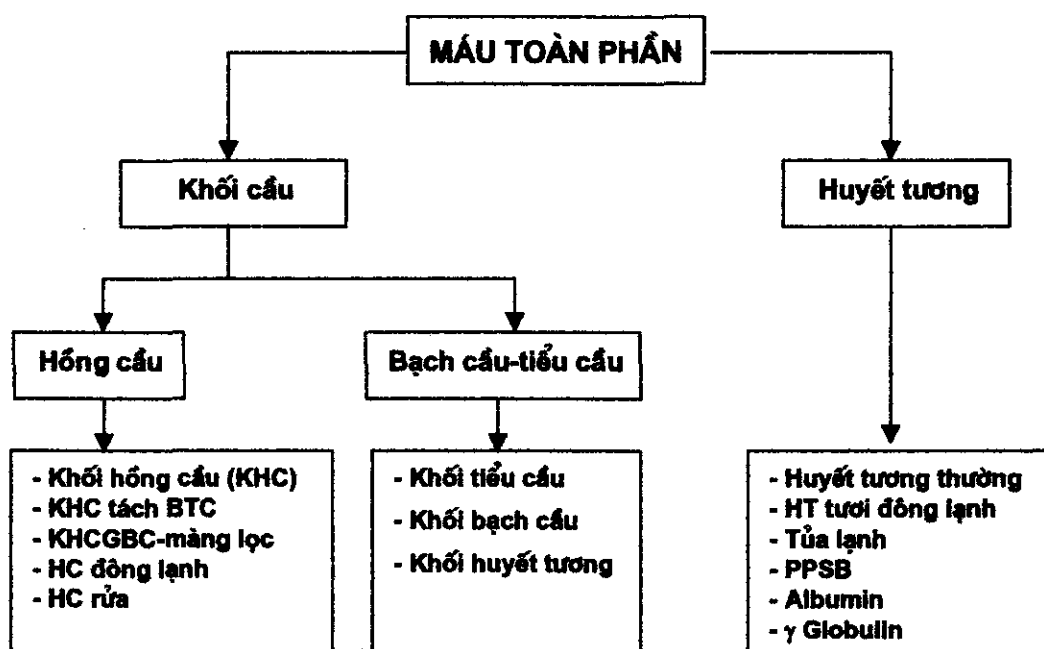
1.4.3. Các chế phẩm máu lưu trữ:

Máu toàn phần: Máu toàn phần là máu nguyên vẹn có Hct khoảng 0,34 - 0,44, chứa hồng cầu, huyết tương, bạch cầu và tiểu cầu. Huyết tương có albumin, immunoglobulin và các protein huyết tương khác trong đó có các yếu tố đông máu. Tuy nhiên các yếu tố đông máu dễ bị hủy như yếu tố V và VIII sẽ bị giảm trong

quá trình bảo quản. Tiểu cầu, bạch cầu hạt bị giảm khả năng sống trong máu bảo quản trên 24 giờ.

Một đơn vị máu toàn phần có khoảng 250ml, 350ml hoặc 450ml máu (tùy từng nước quy định) và dung dịch chống đông hoặc dung dịch bảo quản với tỷ lệ chất chống đông máu 1,4 : 10.

Từ đơn vị máu toàn phần ta có thể tạo ra các chế phẩm máu khác nhau, sơ đồ hóa như sau:



1.2. Các chế phẩm máu được sản xuất

Khối hồng cầu còn bạch cầu - tiểu cầu

Khối hồng cầu được điều chế từ máu toàn phần có thể tích khoảng 250-350ml và Hct khoảng 55-65% tùy thuộc vào lượng chất bảo quản sử dụng.

Khối hồng cầu tách bạch tiểu cầu

Là khối hồng cầu được tách huyết tương, loại bỏ bớt bạch cầu bằng phương pháp ly tâm máu toàn phần tách lớp bạch tiểu cầu (lớp buffy coat), số lượng bạch cầu còn lại dưới 30% tức là khoảng $(1,2 \times 10^9/\text{đv})$, với khối hồng cầu được tách ra từ đơn vị máu 450ml. Với khối hồng cầu tách từ đơn vị máu 350ml, tính theo tỷ lệ thuận từ số lượng bạch cầu trong một đơn vị khối hồng cầu 450ml thì số lượng bạch cầu $< 0,94 \times 10^9/\text{đv}$ [36,39].

Chỉ định loại máu này cho bệnh nhân thiếu hồng cầu.

Ưu điểm khi truyền loại máu này: Tránh được phản ứng sốt, rét run; Giảm nguy cơ phản ứng miễn dịch HLA, phản ứng thải ghép, bệnh lý ghép chống chủ, lây nhiễm các bệnh lây qua đường máu: HIV, CMV, HTLV [23, 24].

Khối hồng cầu giảm bạch cầu bằng màng lọc:

Là khối hồng cầu được loại bỏ bạch cầu bằng màng lọc và có số lượng bạch cầu $< 5 \times 10^6$ hoặc $< 1 \times 10^6/\text{đv}$ 450ml [19].

Hồng cầu rửa:

Hồng cầu rửa là khối hồng cầu được rửa trong dung dịch đẳng trương. Nó được loại bỏ hết huyết tương, bạch cầu, tiểu cầu để truyền cho bệnh nhân tan máu tự miễn.

Khối tiểu cầu

Khối tiểu cầu được tách từ máu toàn phần (trong vòng 6 giờ kể từ khi lấy máu) bằng phương pháp ly tâm hoặc tách tiểu cầu bằng máy tách tế bào chế tự động từ một người cho.

Một đơn vị khối tiểu cầu điều chế từ máu toàn phần chứa $45-85 \times 10^9$ tiểu cầu và có từ 40-70ml huyết tương.

Huyết tương:

Huyết tương là sản phẩm được điều chế từ máu toàn phần, thành phần của huyết tương bao gồm: nước, điện giải, albumin, globulin, các yếu tố đông máu...

- Huyết tương thường:

Là huyết tương được tách từ máu toàn phần chưa quá 5 ngày sau khi hết hạn huyết tương sản xuất bằng cách ly tâm hoặc để lắng máu toàn phần, được dự trữ trong tủ lạnh $2-6^{\circ}\text{C}$, chỉ sử dụng trong thời gian 30 ngày, có các yếu tố đông máu bền vững: như yếu tố II, VII, X...

- Huyết tương tươi đông lạnh:

Là huyết tương được điều chế từ máu toàn phần trong vòng 6 giờ kể từ khi lấy máu hoặc điều chế từ máy chiết tách tự động.

Đông lạnh -18°C đến -30°C hay thấp hơn ngay sau khi điều chế, chức năng các yếu tố đông máu còn gần như nguyên vẹn.

Tủa lạnh:

Tủa lạnh là phần cặn của huyết tương được điều chế từ huyết tương tươi đông lạnh sau khi giải đông và ly tâm ở tốc độ cao, tủa lạnh chứa phần lớn yếu tố VIII, fibrinogen.

1.4.4. Các chất chống đông và bảo quản hồng cầu.

♦ **Các dung dịch chống đông, bảo quản máu**

Ngày càng nhiều dung dịch chống đông, bảo quản máu được sử dụng nhằm nâng cao chất lượng máu bảo quản.

Bảng 1.1. Thành phần và tác dụng các dung dịch chống đông [37, 54, 65]:

Thành phần (gr/l)	ACD	CPD	CPD-A ₁	CPD-A ₂
Acid citric	8,00	3,27	3,27	3,27
Trisodium citrat	22,00	26,3	26,3	26,3
Dextrose	24,5	25,5	25,5	44,0
Phosphat	0	2,51	2,51	2,51
Adenin	0	0	0,27	0,54
Thời hạn bảo quản	21 ngày	28 ngày	35 ngày	35 ngày
Tác dụng ngoài chống đông	Nuôi dưỡng HC	Nuôi dưỡng HC, duy trì pH và chức năng hô hấp HC	Nuôi dưỡng HC, duy trì áp lực thẩm thấu, duy trì chức năng hô hấp và bảo vệ màng HC	

♦ **Một số dung dịch bảo quản HC:**

Bảng 1.2. Thành phần và thời hạn bảo quản của một số dung dịch bảo quản HC

Thành phần (mmol/l)	SAGM	AS-1 (Adsol)	AS-3 (Nutricel)	AS-5 (Optisol)	Erythrosol	AS-T
NaCl	150,0	154	70,00	150,0	0	150
Phosphat	0	0	23,0	0	0	0
Adenin	1,25	2,0	2,22	2,22	1,5	0
Dextrose	45,0	110,0	55,51	45,41	45,51	45,0
Manitol	30,0	41,2	0	28,82	40,0	30,0
Thời hạn	35 ngày	42 ngày	42 ngày	42 ngày	49 ngày	35 ngày

1.4.5. Những thay đổi về sinh lý, hóa sinh của hồng cầu trong máu lưu trữ:

Mặc dù được bảo quản trong nhiệt độ lạnh, nhưng sự thay đổi sinh lý và hóa sinh trong hồng cầu vẫn xảy ra. Các chuyển hóa trong hồng cầu vẫn diễn ra để tạo năng lượng nhằm duy trì hình dạng và cấu trúc [48, 54, 70].

♦ **Những thay đổi sinh lý**

Trong thời gian bảo quản, thể tích hồng cầu thay đổi rất ít nhưng hình dạng biến đổi từ hình đĩa sang hình gai, rồi hình cầu. Trong dung dịch bảo quản hồng cầu tổn thương nhanh hơn trong huyết tương.

Trong quá trình lưu trữ, hồng cầu phân giải glucose để lấy năng lượng cho nên tích lũy lactat - sản phẩm chuyển hóa cuối cùng của glucose. Lactat được đào thải ra một cách chậm chạp nên hồng cầu dần dần căng lên, bị vỡ trong dung dịch nuôi dưỡng mặc dù áp lực thẩm thấu vẫn gần như bình thường [48, 142].

♦ **Những thay đổi hóa sinh:**

Acid lactic và acid pyruvic là những sản phẩm chuyển hóa glucose của hồng cầu trong thời gian bảo quản làm cho pH máu giảm dần, các enzym chuyển hóa đường là hexokinase và phosphofructokinase hoạt động tốt hơn ở môi trường pH

cao nên khi pH giảm, tốc độ chuyển hóa glucose chậm lại, mức ATP trong hồng cầu giảm nhanh [48, 54].

Vào tuần thứ 2, 3 của quá trình bảo quản, hồng cầu mất K^+ và thu vào Na^+ . Bình thường qua màng hồng cầu, Na^+ được bơm ra ngoài và K^+ được đưa vào trong tế bào. Trong hồng cầu thành phần các chất điện giải khác với huyết tương, K^+ là hồng cầu cation chủ yếu 100-150mmol/L trong khi Na^+ chỉ có 20mmol/L [35]. Mặt khác trong thời gian lưu trữ, hồng cầu bị phân hủy dần nên K^+ trong dịch bảo quản tăng.

1.4.6. Các nghiên cứu về khả năng chống oxy hóa hồng cầu và hình dạng hồng cầu máu bảo quản

Trong những năm qua hệ thống enzym chống oxy hóa hồng cầu đã được nhiều nhà nghiên cứu trên thế giới quan tâm. Những công trình nghiên cứu về sự liên quan giữa hệ thống enzym chống oxy hóa với các bệnh tim mạch, đái đường, ung thư... đã được nhiều tác giả đề cập đến. Cấu trúc cũng như cơ chế tác dụng của các enzym này đã được biết khá rõ. Gần đây có nhiều công trình nghiên cứu về hệ thống enzym chống oxy hóa trong máu bảo quản. Năm 1993 Chernitskii E.A và cộng sự đã nghiên cứu sự thay đổi hình dạng hồng cầu máu bảo quản đã chỉ ra rằng sự thay đổi hình dạng hồng cầu có sự liên quan đến quá trình peroxi hóa lipid màng và sự suy yếu hệ thống enzym chống oxy hóa hồng cầu [62]. Vào năm 1997 Jozwik M. và cộng sự đã nghiên cứu về hoạt độ các enzym chống oxy hóa hồng cầu và khả năng chống oxy hóa toàn phần (TAS) huyết tương trên 8 túi máu toàn phần được bảo quản bằng dung dịch CPD-A1 (citrate, phosphate, dextrose adenine). Cho thấy hoạt độ các enzym chống oxy hóa và khả năng chống oxy hóa toàn phần TAS giảm theo thời gian bảo quản [93]. Cũng trong năm này, Aslan R. và cộng sự đã nghiên cứu hoạt độ enzym chống oxy hóa hồng cầu (SOD, GPx) và nồng độ MDA dịch huyết tán và dịch bảo quản trên 15 túi máu toàn phần được bảo quản bằng dung dịch CPD-A1 cho thấy hoạt độ enzym chống oxy hóa giảm và nồng độ MDA dịch huyết tán và dịch bảo quản tăng trong quá trình bảo quản. Chúng có mối tương quan chặt chẽ và liên quan sự phá huỷ hồng cầu [43].

Các nghiên cứu trong nước

Ở Việt Nam đã có một số tác giả nghiên cứu về máu lưu trữ nhưng mới chỉ nghiên cứu về sự thay đổi một số chỉ số hóa sinh, huyết học và hình dạng hồng cầu dưới kính hiển vi quang học có gắn máy chụp ảnh [15, 19, 20]. Gần đây những nghiên cứu về sự liên quan giữa hệ thống enzym chống oxy hóa với một số bệnh máu, ung thư....cũng đã được các nhà khoa học Việt Nam đề cập đến.

Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu về máu lưu trữ trong nhưng chưa có tác giả nào nghiên cứu về khả năng chống oxy hóa hồng cầu cũng như sự biến đổi cấu trúc màng hồng cầu trong thời gian bảo quản. Có mối liên quan nào giữa khả năng chống oxy hóa với quá trình peroxi hóa lipid màng hồng cầu máu bảo quản? Có mối liên quan nào giữa quá trình peroxi hóa lipid màng hồng cầu với tổn thương hồng cầu trong máu bảo quản trong điều kiện Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương đó cũng là ý tưởng của chúng tôi khi tiến hành phần nghiên cứu này.

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG VÀ CHẤT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1.1 Đối tượng nghiên cứu.

Phần 1: 58 công nhân được chọn trong số 1000 công nhân của Công ty xăng dầu khu vực I tiếp xúc với xăng pha chì, lứa tuổi 28-55. Điều kiện chọn đối tượng dựa trên tuổi nghề (số năm tiếp xúc với xăng chì) từ 10-30 năm và không mắc các bệnh mạn tính nào khác.

Phần 2: gồm nhóm chứng gồm 14 người khỏe mạnh và nhóm nghiên cứu gồm 43 bệnh nhân thiếu máu tan máu được chẩn đoán và điều trị tại Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương trong thời gian từ tháng 5/2002 đến tháng 10/2002. Bệnh nhân được lấy máu làm xét nghiệm khi chưa truyền máu hoặc sau khi truyền máu ít nhất 3 tuần.

Phần 3: 12 đơn vị máu bảo quản tại Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương được lấy từ 12 người cho máu tự nguyện: có tuổi từ 19 đến 30, nam, cân nặng ≥ 55 Kg, nhóm máu O, có Hb ≥ 130 g/l. Đạt các tiêu chuẩn sàng lọc khác của Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương.

2.1.2. Chất liệu nghiên cứu.

- Máu tĩnh mạch chống đông bằng heparin (30 IU/ml) 5ml máu/người, máu được lấy vào lúc đói, tránh làm vỡ hồng cầu được xử lý theo yêu cầu của từng kỹ thuật.
- Lấy 350 ml máu tĩnh mạch/ 1 người từ 12 người cho máu vào các túi chất dẻo chứa sẵn chất chống đông. Mỗi đơn vị máu được chia làm 2 phần:

Phần 1 là máu toàn phần, trong đó 6 đơn vị được bảo quản, mỗi đơn vị trong 1 túi. Tại mỗi thời điểm nghiên cứu, lắc đều túi máu để lấy ra 10 ml. 6 đơn vị khác mỗi đơn vị tách thành 7 túi nhỏ, tại mỗi thời điểm nghiên cứu lấy ra 1 túi.

Phần 2 là khối hồng cầu được sản xuất từ 12 đơn vị máu toàn phần bằng phương pháp ly tâm. 6 đơn vị khối hồng cầu được bảo quản 1 túi/ 1 đơn vị máu. Tại mỗi thời điểm nghiên cứu, lắc đều túi máu để lấy ra 10 ml, 6 đơn vị khác được bảo quản 7 túi/ 1 đơn vị, tại mỗi thời điểm nghiên cứu lấy ra 1 túi.

2.2. TRANG THIẾT BỊ VÀ HÓA CHẤT

2.2.1. Máy móc và dụng cụ dùng trong nghiên cứu.

Máy đếm tế bào tự động SF 3000-Symex (Nhật Bản).

Máy sinh hóa tự động Express Plus của hãng CIBA Corning (Thụy sỹ), máy Keysis của hãng Boehringer Mannheim (Đức).

Máy ly tâm lạnh Beckman Avanti 30 (Mỹ).

Quang phổ kế 4010 của hãng Boehringer Mannheim (Đức).

Máy quang kế UV Spectrophotometer của Shimazu (Nhật Bản).

Máy điện giải 644 của hãng Chiron (Nhật)

Máy đo pH của AVL.

Máy compact 1 AVL của Thụy Sĩ.

Kính hiển vi điện tử quét JSM - 5410 LV (Jeol).

Máy vô cơ hóa Microwave (Mỹ).

Máy đo phổ hấp thụ nguyên tử IL-151, PE 3300 của hãng Perkin-Elmer (Mỹ).

Kính hiển vi Olympus (Nhật).

Dụng cụ thủy tinh.

Pipet tự động các loại.

Tủ lạnh 2 - 6°C Electrolux.

2.2.2. Hóa chất.

Perchloric acide, HNO_3 , HCl , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 .

Hydrogen peroxide Pa (Abbott Diagnostics - Mỹ).

Sodium sulfate anhydrous (Abbott Diagnostics- Mỹ).

Polyoxyethylene (Abbott Diagnostics - Mỹ).

Postassium cyanide (Abbott Diagnostics - Mỹ).

Muối quaternary amonium (Abbott Diagnostics - Mỹ).

NaCl 0,9%.

Heparin 2500 IU/5ml.

Dung dịch KCl 1,2 g/l.

Dung dịch ascorbic 0,4352 g/l.

Dung dịch trichloroacetic 40%.

Dung dịch acid thiobacbituric.

Kit xác định hoạt độ PK hồng cầu, nồng độ 2,3-DPG của hãng Boehringer Mannheim (Đức).

Kit xác định hoạt độ SOD, GPx, G-6-PD hồng cầu, nồng độ TAS của hãng Randox.

Kit xác định nồng độ sắt, canxi của hãng Human (Mỹ).

Thuốc thử Drabkin của hãng Boehringer Mannheim (Đức).

2.3. PHƯƠNG PHÁP VÀ KỸ THUẬT NGHIÊN CỨU

Sử dụng phương pháp nghiên cứu ngang mô tả ở người nhiễm chì và bệnh nhân thiếu máu tan máu.

Nghiên cứu dọc theo thời gian bảo quản của KHC và MTP lưu trữ.

2.3.1. Phương pháp xác định nồng độ chì máu.

Gồm 2 quá trình kỹ thuật: Kỹ thuật vô cơ hóa máu toàn phần dựa trên nguyên lý oxy hóa và đốt cháy các chất hữu cơ trong máu toàn phần bằng acid nitric, acid perchloric, hydrogen peroxid và nhiệt độ. Thực hiện trên máy vô cơ hóa Microwave và Roto. Sau đó xác định hàm lượng chì trong dịch vô cơ hóa trên máy đo phổ hấp thụ nguyên tử.

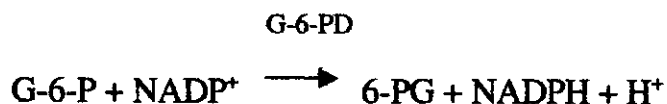
2.3.2. Xác định các chỉ số huyết học bằng máy đếm tế bào tự động Symex của Nhật Bản.

2.3.3. Kỹ thuật xác định tỷ lệ hồng cầu lưới.

Hồng cầu lưới được xác định theo phương pháp Perls (nhuộm sống). Máu toàn phần chống đông, ủ với xanh Cresyl trong vòng 1 giờ sau đó dàn trên lam kính để khô, đọc trên kính hiển vi quang học. Tính tỷ lệ hồng cầu lưới theo tổng số lượng hồng cầu.

2.3.4. Xác định hoạt độ G-6-PD hồng cầu theo kit của Randox.

G-6-PD xúc tác phản ứng chuyển glucose-6-phosphat thành gluconat-6-phosphat đồng thời chuyển NADP^+ thành NADPH.

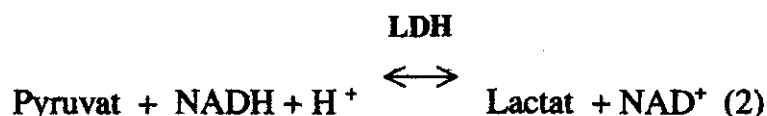
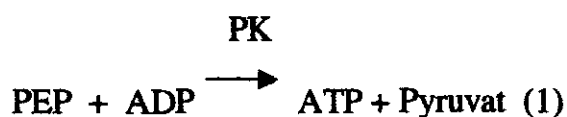


Hoạt độ G-6-PD tăng tuyến tính với sự tăng quang phổ hấp thụ của NADPH tạo thành ở bước sóng 340nm.

2.3.5. Kỹ thuật xác định hoạt độ PK hồng cầu theo kit của Boehringer Mannheim:

Hoạt độ PK hồng cầu xác định bằng phương pháp đo quang phổ hấp thụ giảm dần ở bước sóng 340nm của coenzym NADH do sự tạo thành NAD^+ trong chuỗi phản ứng:

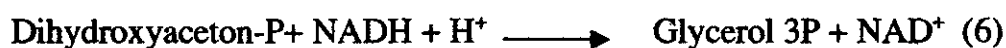
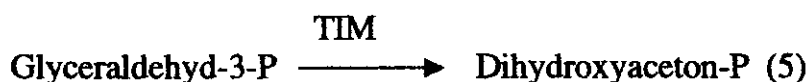
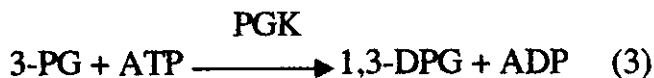
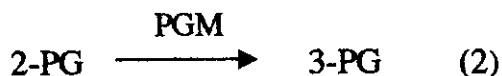
Trước hết PK xúc tác phản ứng chuyển phosphat từ phosphoenolpyruvat (PEP) sang pyruvat (1). Sau đó dưới sự xúc tác của lactat dehydrogenase (LDH), pyruvat được khử tạo thành lactat và NAD^+ .



Hoạt độ PK tăng tuyến tính với sự giảm quang phổ hấp phụ của NADH.

2.3.6. Kỹ thuật xác định nồng độ 2,3-DPG theo kit của Boehringer Mannheim.

2,3-DPG được tách ra 1 gốc phosphat (Pi) để tạo thành phospho glycerat (PG) do tác dụng của phosphoglycerat mutase (PGM) tác dụng này được hoạt hóa bởi glycolat 2 phosphat (1). Phản ứng (1) có thể tạo ra cả 2 chất 2-PG và 3-PG. 2-PG được đồng phân hóa thành 3-PG (2). 3-PG được biến đổi tiếp theo dưới tác dụng của các enzym phospho glycerat kinase (PGK) (3). Glyceraldehyd 3 phosphat dehydrogenase (GAP-DH) (4). Triosephosphat isomerase (TIM) (5). Glycerol 3 phosphat dehydrogenase (GDH) (6). Trong quá trình này 2 mol NADH được oxy hóa theo 1 mol 2,3-DPG.



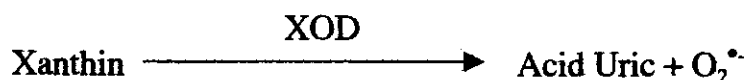
Những phản ứng từ (2) đến (6) được thực hiện, trước hết đã loại bỏ những chất có mặt trong hỗn dịch phản ứng, còn lượng PGM thì quá ít cho nên trên thực tế phản ứng (1) coi như chưa xảy ra. Nồng độ 2,3-DPG được xác định thông qua đo độ giảm quang phổ hấp thụ của NADH ở bước sóng 340 nm.

Đo nồng độ 2,3-DPG trên máy UV spectrophotometer, $\lambda=340\text{nm}$, nhiệt độ 20-25° C. Giá trị bình thường: người lớn $4,83 \pm 0,15 \text{ mmol/l}$ hồng cầu.

2.3.7. Xác định hoạt độ enzym SOD hồng cầu theo kit của Randox.

Hoạt độ SOD được xác định dựa trên phản ứng:

Xanthin dưới tác dụng của xanthin oxidase (XOD) tạo thành acid uric và tạo gốc superoxid $\text{O}_2^{\bullet-}$.



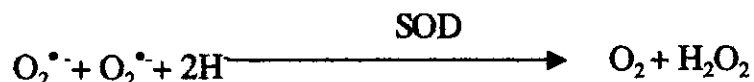
Gốc $\text{O}_2^{\bullet-}$ sinh ra phản ứng với muối INT (để tạo thành chất formazan màu đỏ).

INT [2-(4-(iodophenyl) 3-(4nitrophenol -5phenyl tetrazolium chlorid)]



Cường độ màu formazan được đo ở bước sóng 505nm

SOD ức chế sự tạo thành chất màu formazan do SOD xúc tác phản ứng:

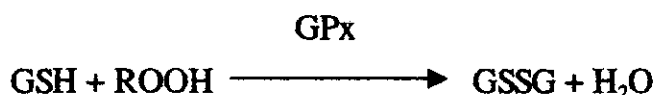


Hoạt độ SOD được xác định bởi phần trăm ức chế sự tạo thành formazan.

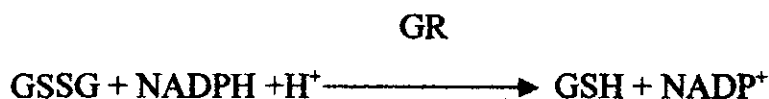
Từ % ức chế của các ống thử ta đọc được tương ứng đơn vị SOD trên đường chuẩn.

2.3.8. Xác định hoạt độ GPx hồng cầu theo kit của Randox.

Hoạt độ glutathion peroxidase được xác định dựa trên nguyên tắc phương pháp của Paglia và Valentine đề xuất năm 1967.

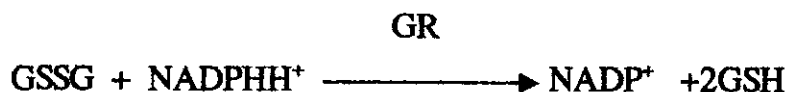


Với sự có mặt của glutathion reductase (GR) và NADPH chuyển GS-SG (dạng oxy hóa) trở thành dạng khử GSH theo phản ứng.



Hoạt độ GSH-Px tăng làm tăng GS-SG do đó làm giảm NADPH, hoạt độ GSH-Px được đo bằng sự giảm độ hấp thụ phổ của NADPH ở bước sóng $\lambda=340\text{nm}$.

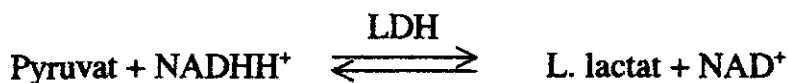
2.3.9. Phương pháp xác định hoạt độ glutathion reductase (GR) ở hồng cầu sử dụng kit của hãng Randox.



Đo sự giảm độ hấp thụ của NADPH ở λ 340nm theo thời gian, từ đó suy ra hoạt độ của GR.

2.3.10. Kỹ thuật xác định hoạt độ LDH theo kit của Roche.

Phương pháp động học enzym sử dụng kit của hãng Boehringer Mannheim.



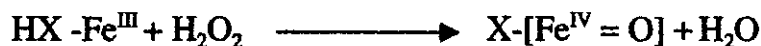
Hoạt độ LDH được xác định qua sự giảm độ hấp thụ quang của NADHH^+ ở λ 340 nm theo thời gian.

2.3.11. Xác định khả năng chống oxy hóa toàn phần huyết tương (TAS) theo kit của Randox.

ABTS[®] [2,2 Arino -di (3-ethybenz thiazoline sulphanat)]

ABTS[®] được ủ với Metmyoglobine và H_2O_2 để tạo ra gốc ABTS^{®+} chất này cho màu xanh da trời và được đo ở bước sóng 600nm.

Các chất chống oxy hóa trong huyết tương là nguyên nhân ức chế sự tạo thành ABTS^{®+} và độ ức chế tỷ lệ với chất màu được tạo ra.



Trong đó: $\text{HX-Fe}^{\text{III}}$: Metmyoglobin

$\text{X-[Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]$: Feryl myoglobin

2.3.12. Kỹ thuật xác định nồng độ MDA huyết tương và dịch bảo quản khối hồng cầu.

Định lượng MDA dịch huyết tán và dịch bảo quản theo phương pháp so màu của Jadwiga Robax.

Malonyldialdehyd phản ứng với thiobarbituric acid tạo thành hợp chất có màu hồng. Nồng độ MDA trong mẫu thử tỷ lệ với đậm độ màu ở bước sóng 532 nm.

Tiến hành định lượng nồng độ MDA ở các nồng độ của bộ chuẩn trên theo phương pháp Jadwiga Robax, vẽ biểu đồ mẫu và tính ra hệ số MDA.

2.3.13. Kỹ thuật xác định nồng độ Hb tự do bằng dung dịch Drabkin.

Dưới tác dụng của protasium ferricyanide [$\text{K}_3\text{Fe}_2(\text{CN})_6$], Fe^{2+} của Hb được oxy hóa thành Fe^{3+} dưới dạng MetHb, MetHb phản ứng với cyanid tạo ra cyanmetHb và được đo trên máy quang phổ Express Plus ở bước sóng 540 nm.

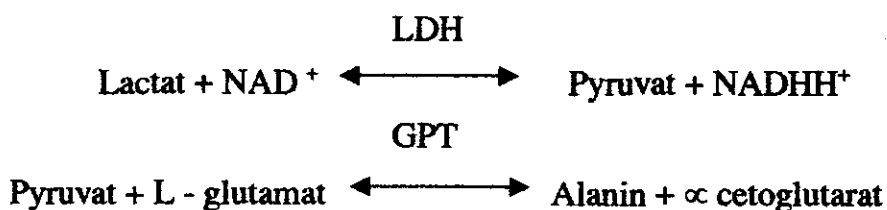
2.3.14. Kỹ thuật định lượng sắt dịch bảo quản.

Trong môi trường acid trung tính, với sự có mặt của guanidin, liên kết Fe - transferin bị phá vỡ. Với tác dụng của hydroxyladin tạo phức màu với ferrozine định hấp thụ cực đại ở bước sóng 560 nm. Độ đậm màu tỷ lệ thuận với nồng độ sắt có trong dịch bảo quản và được đo trên máy Express Plus.

2.3.15.. Kỹ thuật xác định nồng độ canxi

Canxi trong môi trường kiềm tạo thành phức chất màu tím với cresolphthalein. Độ đậm màu tỷ lệ thuận với nồng độ canxi và được đo ở bước sóng 570 nm trên máy quang phổ Express Plus.

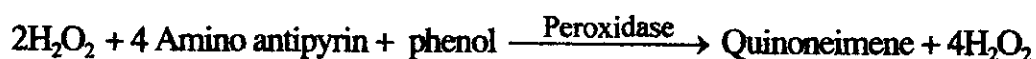
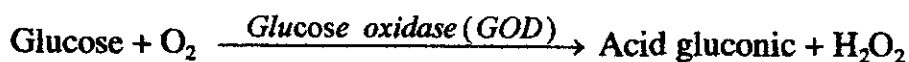
2.3.16. Kỹ thuật xác định nồng độ lactat theo kit của Boehringer Mannheim.



Nồng độ lactat được xác định bằng sự tăng độ hấp thụ quang của NADHH^+ ở bước sóng 340nm

2.3.17. Xác định nồng độ glucose.

Glucose trong dung dịch bảo quản khối hồng cầu được định lượng trên nguyên tắc phản ứng enzym, sử dụng kit của hãng Roche, đo trên máy sinh hóa tự động Express Plus ở bước sóng 546 nm.



Quinoneimine có màu hồng, phổ hấp phụ cực đại là 546 nm .

Độ đậm này tỷ lệ thuận với nồng độ glucose.

2.3.18. Xác định pH dịch bảo quản trực tiếp trên máy AVL.

2.3.19. Xác định nồng độ ion K^+ , Cl^- , Na^+ bằng phương pháp đo điện giải sử dụng điện cực chọn lọc trên máy Chiron-644 (Nhật).

2.4. KỸ THUẬT XÁC ĐỊNH HÌNH ẢNH TẾ BÀO HỌC

2.4.1. Kỹ thuật xác định hình ảnh tế bào học trên kính hiển vi điện tử quét.

Nguyên lý: Dùng chùm tia điện tử chiếu xuống bề mặt mẫu. Sự tương tác giữa chùm tia điện tử và các nguyên tử trên bề mặt mẫu sẽ phát ra điện tử thứ cấp, chúng được một đầu dò chuyên dụng thu lại sau đó tái tạo lại hình ảnh ban đầu.

2.4.2. Kỹ thuật xác định hình ảnh tế bào trên kính hiển vi quang học có chụp ảnh.

2.5. XỬ LÝ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

- Các số liệu được xử lý theo thuật toán thống kê y sinh học, sử dụng chương trình Epi-Info 6.04 của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO - 1994). STATA 7.0.

- Tính hệ số tương quan giữa các kết quả thu được.

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

**KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ĐƯỢC TRÌNH BÀY LÀM 3 PHẦN LỚN DƯỚI
DẠNG BẢNG VÀ BIỂU ĐỒ.**

Phần 1: Kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của nồng độ chì máu lên một số thông số nghiên cứu.

Phần 2: Kết quả nghiên cứu về các trường hợp thiếu máu tan máu.

Phần 3: Kết quả nghiên cứu về máu bảo quản.

3.1. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU PHẦN 1

Kết quả được thể hiện qua các nội dung:

- Nồng độ chì máu.
- Ảnh hưởng của nồng độ chì máu lên các thông số huyết học.
- Ảnh hưởng của nồng độ chì máu lên hoạt độ enzym SOD, GPx, GR hồng cầu.
- Ảnh hưởng của nồng độ chì máu lên nồng độ TAS huyết tương.
- Tương quan giữa các thông số nghiên cứu.

3.1.1. Nồng độ chì máu.

Trên cỡ mẫu $n = 58$. Kết quả nồng độ chì phân bố từ $8 \mu\text{g}\%$ đến $121,2\mu\text{g}\%$.

Với kết quả này chia làm 3 nhóm:

Nhóm 1: Có nồng độ chì máu dưới $20\mu\text{g}\%$ với $n = 27$.

Nhóm 2: Có nồng độ chì từ trên $20\mu\text{g}\%$ đến dưới hoặc bằng $40 \mu\text{g}\%$ với $n = 22$.

Nhóm 3: Có nồng độ chì máu trên $40\mu\text{g}\%$ với $n = 9$.

3.1.2. Ảnh hưởng của chì trên các thông số huyết học.

Chúng tôi tiến hành khảo sát 3 thông số là số lượng hồng cầu, nồng độ hemoglobin và hematocrit các trường hợp nghiên cứu.

Bảng 3.1: Ảnh hưởng của chì trên các thông số huyết học của các nhóm nghiên cứu

	Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3
Pb ($\mu\text{g}\%$)	$14,66 \pm 3,36$	$28,72 \pm 5,59$	$57,88 \pm 24,75$
Số lượng HC (T/L)	$5,33 \pm 0,59$	$5,21 \pm 0,49$	*** $4,56 \pm 0,53$
Hct (l/l)	$0,483 \pm 0,053$	$0,486 \pm 0,069$	$0,471 \pm 0,066$
Hb (g/l)	$160,2 \pm 18,1$	$153,3 \pm 12,0$	* $145,4 \pm 15,0$

* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

Nhận xét: Kết quả bảng 3.1 cho thấy SLHC và nồng độ Hb ở nhóm 2 thấp hơn nhóm 1 nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Trong khi SLHC và nồng độ Hb ở nhóm 3 thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm 1 ($p < 0,001$, $p < 0,05$). Có tương quan nghịch giữa SLHC với nồng độ chì máu với: $r = -0,4307$
 $y = 5,5501 - 0,0141.x$ ($p < 0,05$).

Hct thay đổi không có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm nghiên cứu. Mối tương quan giữa Hct với nồng độ chì máu là rất thấp.

Có tương quan nghịch giữa nồng độ Hb máu với nồng độ chì máu với:

$$r = -0,3217, y = 163,00 - 0,2886.x \text{ (} p < 0,05 \text{)}$$

3.1.3. Ảnh hưởng của chì lên hoạt độ một số enzym chống oxy hóa hồng cầu.

Bảng 3.2: Ảnh hưởng của nồng độ chì lên hoạt độ SOD, GPx, GR hồng cầu.

	Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3
Pb ($\mu\text{g}\%$)	$14,66 \pm 3,36$	$28,72 \pm 5,59$	$57,88 \pm 24,75$
SOD (U/gHb)	$1470,6 \pm 298,2$	$1607,1 \pm 328,3$	$1724,2 \pm 461,4$
GPx (U/gHb)	$54,1 \pm 12,6$	*** $41,0 \pm 6,1$	** $41,1 \pm 7,9$
GR (U/gHb)	$6,6 \pm 0,8$	*** $4,9 \pm 1,0$	*** $4,6 \pm 1,3$

** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Nhận xét: Hoạt độ SOD hồng cầu của nhóm 2 và 3 cao hơn nhóm 1 nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Không có tương quan giữa hoạt độ SOD hồng cầu với nồng độ chì máu.

Có sự giảm hoạt độ GR, GPx hồng cầu ở các nhóm 2 và nhóm 3 so với nhóm 1, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.

Có tương quan nghịch giữa hoạt độ GPx hồng cầu với nồng độ chì máu với:

$$y = 8490,2 - 50,08.x \quad r = -0,5724, \quad (p < 0,05)$$

Có tương quan nghịch giữa hoạt độ GR hồng cầu với nồng độ chì máu với:

$$y = 1051,9 - 6,233.x \quad r = -0,5113, \quad (p < 0,05)$$

3.1.4. Ảnh hưởng của nồng độ chì lên TAS huyết tương.

Bảng 3.3: Hàm lượng TAS của huyết tương của các nhóm nghiên cứu.

	Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3
Pb ($\mu\text{g}\%$)	$14,66 \pm 3,36$	$28,72 \pm 5,59$	$57,88 \pm 24,75$
TAS (mmol/l)	$1,32 \pm 0,21$	$1,29 \pm 0,22$	$1,23 \pm 0,08$

Nhận xét: Kết quả nghiên cứu cho thấy có sự giảm nồng độ TAS ở nhóm 2 và 3 so với nhóm 1 không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)

3.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU PHẦN 2

Qua nghiên cứu hoạt độ một số enzym chuyển hóa glucose, khả năng chống oxy hóa của hồng cầu cùng với nồng độ 2,3-DPG, MDA, TAS huyết tương ở các trường hợp thiếu máu tan máu do các nguyên nhân, kết quả nghiên cứu được trình bày qua các nội dung:

- ✓ Một số thông số huyết học.
- ✓ Hoạt độ các enzym G6PD, PK hồng cầu, nồng độ 2,3-DPG.
- ✓ Hoạt độ enzym SOD, GPx hồng cầu, nồng độ MDA, TAS huyết tương.

3.2.1. Một số thông số huyết học.

Bảng 3.4: Các thông số huyết học SLHC, nồng độ Hb, tỷ lệ Hct và tỷ lệ HCL.

Thông số nghiên cứu	Nhóm chứng n =14	Nhóm NC n = 41
SLHC (T/l)	4,45 ± 0,42	***3,06 ± 1,10
Hb (g/l)	136,1 ± 14,0	***78,7 ± 27,4
Hct (l/l)	0,40 ± 0,04	**0,25 ± 0,08
HCL (%)	0,49 ± 0,32	***9,13 ± 7,32

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Nhận xét: Nhóm nghiên cứu có SLHC, nồng độ Hb, tỷ lệ Hct thấp hơn nhóm chứng ($p < 0,001$, $p < 0,01$) và tỷ lệ HCL cao hơn nhóm chứng ($p < 0,001$).

3.2.2. Hoạt độ enzym G6PD, PK hồng cầu, nồng độ 2,3-DPG

Kết quả nghiên cứu về hoạt độ enzym G6PD, PK và nồng độ 2,3-DPG được tổng kết ngoại trừ nhóm thiếu hụt enzym chuyển hóa.

Bảng 3.5: Hoạt độ G-6-PD, PK hồng cầu và nồng độ 2,3-DPG máu.

Thông số nghiên cứu	Nhóm chứng n =14	Nhóm nghiên cứu n = 35
Hoạt độ G6PD (U/gHb)	6,93 ± 1,16	***16,29 ± 5.86
Hoạt độ PK (U/gHb)	16,67 ± 2,14	***30,08 ± 12,31
Nồng độ 2,3-DPG (mmol/l)	4,09 ± 1,19	*5,28 ± 2,25

* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

Ngoại trừ 6 bệnh nhân thiếu hụt G-6-PD hồng cầu, 2 bệnh nhân thiếu hụt PK hồng cầu, các trường hợp thiếu máu tan máu do các nguyên nhân khác đều cao hơn nhóm chứng một cách rõ rệt với $p < 0,001$ và nồng độ 2,3-DPG cao hơn nhóm chứng với $p < 0,05$.

3.2.3. Hoạt độ SOD và GPx hồng cầu; nồng độ MDA và TAS huyết tương.

Bảng 3.6: Hoạt độ SOD và GPx hồng cầu; nồng độ MDA và TAS huyết tương

Thông số nghiên cứu	Nhóm chứng n = 14	Nhóm nghiên cứu n = 41
Hoạt độ SOD (U/gHb)	1314 ± 212	**1820 ± 455
Hoạt độ GPx (U/gHb)	54,06 ± 21,05	* *137,87 ± 72,72
Nồng độ MDA (mmol/l)	3,10 ± 1,37	*5,73 ± 4,03
Nồng độ TAS (mmol/l)	1,30 ± 0,14	*1,22 ± 0,34

* p<0,05, ** p<0,01

Nhận xét: Hoạt độ SOD và GPx hồng cầu nhóm thiếu máu tan máu cao hơn so với nhóm chứng (p < 0,01).

Nồng độ TAS huyết tương ở nhóm thiếu máu tan máu thấp hơn so với nhóm chứng p < 0,05.

3.2.4. Kết quả nhóm thiếu máu tan máu do thiếu hụt G6PD hồng cầu.

6 trong số 42 bệnh nhân thiếu máu được nghiên cứu có hoạt độ G6PD hồng cầu thấp hơn 60% so với nhóm chứng. Hoạt độ enzyme G6PD, PK hồng cầu và nồng độ 2,3-DPG máu toàn phần thể hiện trong bảng sau.

Bảng 3.7: Hoạt độ G6PD, PK, nồng độ 2,3-DPG ở bệnh nhân thiếu hụt G6PD

Thông số NC	Nhóm chứng n = 14	Thiếu G6PD n = 6
G6PD (U/gHb)	6,93 ± 1,16	***3,23 ± 0,57
PK (U/gHb)	16,67 ± 2,14	**31,93 ± 16,21
2,3- DPG (mmol/l)	4,09 ± 1,19	*3,00 ± 1,55

* p < 0,05, **p < 0,01.

Hoạt độ PK hồng cầu ở bệnh nhân thiếu máu cao hơn nhóm chứng (p < 0,01) trong khi nồng độ 2,3-DPG thấp hơn nhóm chứng (p < 0,05).

Kết quả hai trường hợp thiếu hụt PK hồng cầu:*Bảng 3.8: Một số thông số trên hai trường hợp thiếu hụt PK hồng cầu.*

Thông số	Nhóm chứng (n = 14)	Trường hợp 1	Trường hợp 2
PK (U/gHb)	16,67 ± 2,14	5,31	10,85
G-6-PD(U/gHb)	6,93 ± 1,16	18,9	11,8
2,3-DPG (mmol/lhc)	4,09 ± 1,19	4,12	3,12
GSH-Px (U/gHb)	54,06 ± 21,05	73,5	46,1
SOD (U/gHb)	1314 ± 212	1560	1254
TAS (mmol/l)	1,30 ± 0,14	1,21	1,32
MDA (nmol/ml)	3,10 ± 1,37	4,10	2,50

Tương quan giữa các thông số nghiên cứu ở bệnh nhân thiếu máu tan máu như sau:

- Có tương quan nghịch giữa hoạt độ G-6-PD hồng cầu với nồng độ Hb

$$y = 21,28 - 0,08.x, \quad r = -0,340, \quad p < 0,05.$$

- Có quan giữa hoạt độ G-6-PD hồng cầu với tỷ lệ HCL

$$y = 9,59 + 0,55.x, \quad r = 0,535, \quad p < 0,001.$$

- Có tương quan giữa hoạt độ PK hồng cầu SLHC

$$y = 49,15 - 5,00.x, \quad r = 0,370, \quad p < 0,05.$$

- Có quan nghịch giữa hoạt độ PK hồng cầu (IU/gHb) với nồng độ Hb

$$y = 55,38 - 0,27.x, \quad r = -0,514, \quad p < 0,001.$$

- Có tương quan giữa hoạt độ PK hồng cầu (U/gHb) với tỷ lệ % HCL

$$y = 27,01 + 0,74.x, \quad r = 0,340, \quad p < 0,05.$$

- Có tương quan nghịch giữa hoạt độ GPx (IU/gHb) với SLHC

$$y = 263,28 - 35,94.x, \quad r = -0,564, \quad p < 0,001.$$

- Có tương quan nghịch giữa hoạt độ GPx hồng cầu với nồng độ Hb

$$y = 275,24 - 1,54.x, \quad r = -0,619, \quad p < 0,001.$$

3.3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU PHẦN 3

Kết quả nghiên cứu phần 3 trên máu bảo quản được trình bày qua các nội dung:

+ Kết quả về thoái hóa glucose của hồng cầu gồm hoạt độ enzym G6PD, PK hồng cầu, nồng độ 2,3-DPG máu, nồng độ glucose, lactat và pH dịch bảo quản-huyết tương máu bảo quản theo thời gian.

+ Kết quả về khả năng chống oxy hóa của hồng cầu gồm hoạt độ enzym SOD, GPx hồng cầu máu bảo quản theo thời gian.

+ Kết quả đánh giá mức peroxi hóa lipid màng hồng cầu gồm nồng độ MDA dịch bảo quản-huyết tương và dịch huyết tán theo thời gian bảo quản.

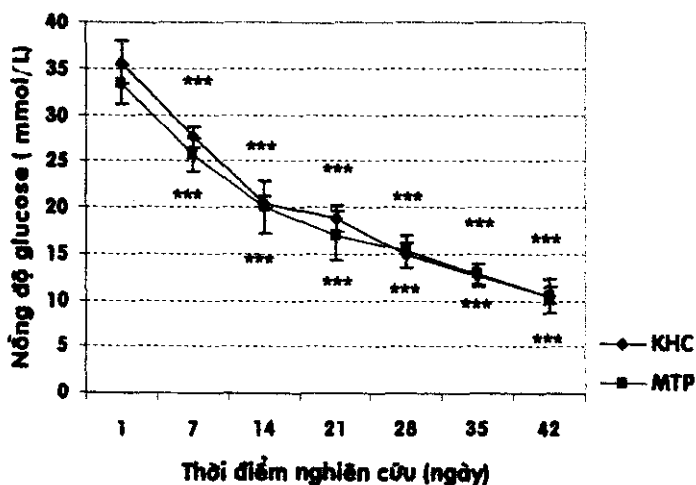
+ Kết quả về các thông số đánh giá tổn thương màng gồm nồng độ Hb, K^+ , Na^+ , Cl^- , canxi, sắt và hoạt độ LDH dịch bảo quản-huyết tương

+ Kết quả về hình ảnh tế bào học.

3.3.1. Kết quả về thoái hóa glucose của hồng cầu gồm hoạt độ enzym G6PD, PK hồng cầu, nồng độ 2,3-DPG máu, nồng độ glucose, lactat và pH dịch bảo quản, huyết tương máu bảo quản theo thời gian.

+ Các thông số nghiên cứu đánh giá thoái hóa glucose theo con đường đường phân qua các thông số hoạt độ enzym PK hồng cầu, nồng độ 2,3-DPG máu, nồng độ glucose, lactat và pH dịch bảo quản- huyết tương.

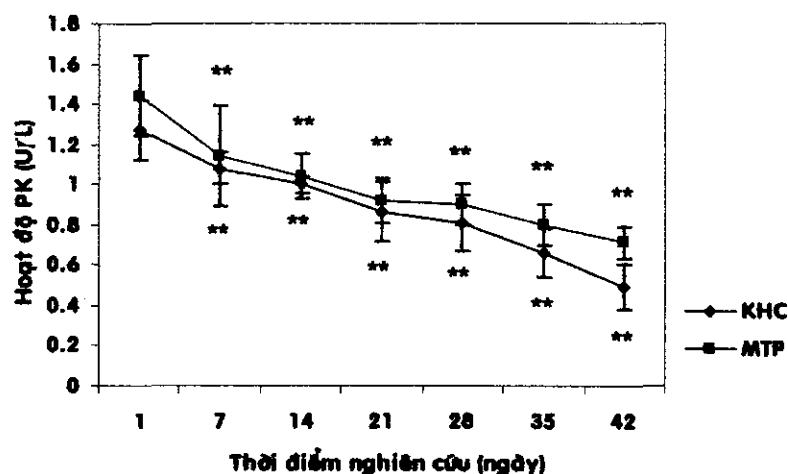
- Nồng độ glucose dịch bảo quản KHC và huyết tương MTP:



Biểu đồ 3.3.1: Nồng độ glucose dịch bảo quản KHC và huyết tương MTP.

Nhận xét: Nồng độ glucose dịch bảo quản KHC và huyết tương MTP giảm mạnh theo thời gian bảo quản, giảm mạnh nhất vào những ngày đầu bảo quản ở ngày thứ 7, 14. Sự giảm nồng độ glucose ở các thời điểm nghiên cứu so với ngày thứ nhất khác biệt có ý nghĩa ở cả KHC và MTP với $p < 0,001$. Mức giảm nồng độ glucose giữa KHC và MTP ở các thời điểm nghiên cứu không khác biệt ($p > 0,05$).

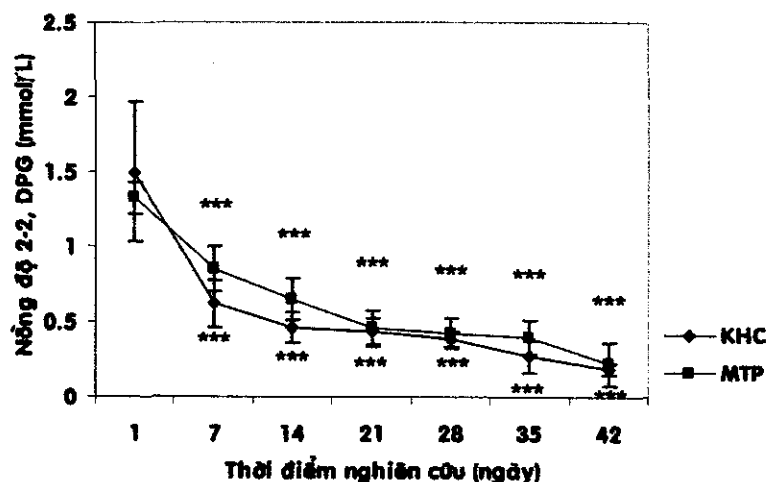
- Hoạt độ PK hồng cầu máu bảo quản:



Biểu đồ 3.3.2: Hoạt độ PK hồng cầu KHC và MTP theo thời gian bảo quản.

Nhận xét: Có sự giảm hoạt độ PK hồng cầu máu bảo quản theo thời gian ($p < 0,01$), so sánh mức giảm hoạt độ PK giữa KHC và MTP cho thấy ở thời điểm nghiên cứu ngày thứ 28, 35 và 42 KHC mức giảm nhiều hơn MTP.

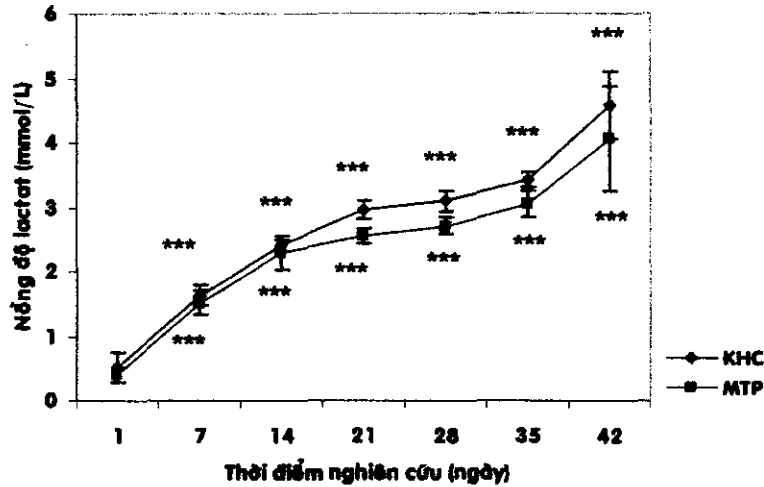
- Nồng độ 2,3-DPG máu bảo quản:



Biểu đồ 3.3.3: Nồng độ 2,3-DPG máu bảo quản KHC và MTP theo thời gian.

Nhận xét: Có sự giảm mạnh nồng độ 2,3-DPG ở cả hai loại máu KHC, MTP ngay ở thời điểm nghiên cứu đầu tiên và giảm dần, đến thời điểm nghiên cứu ngày thứ 42 mức giảm trên 70% so với thời điểm nghiên cứu đầu ($p < 0,01$). So sánh giữa hai loại máu KHC và MTP cho thấy mức giảm 2,3-DPG KHC nhiều hơn MTP, điều này kéo dài tới ngày thứ 35 của quá trình bảo quản.

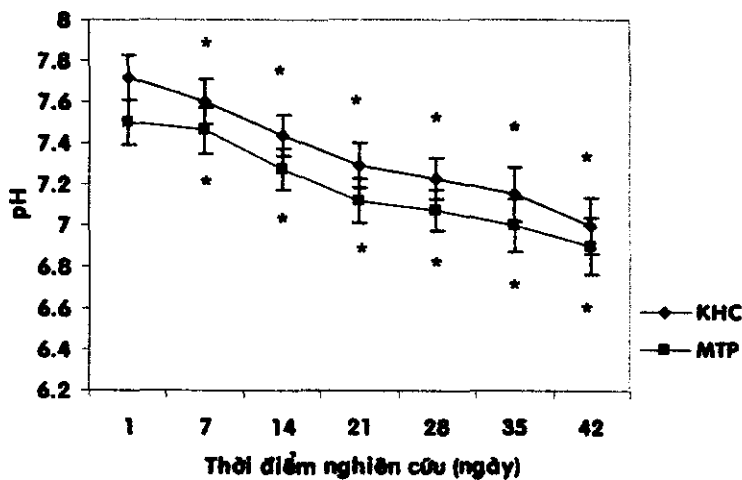
- Nồng độ lactat dịch bảo quản KHC và huyết tương MTP:



Biểu đồ: 3.3.4: Nồng độ lactat dịch bảo quản và huyết tương theo thời gian.

Nhận xét: Có sự tăng nồng độ lactat ngay ở thời điểm nghiên cứu đầu tiên ($p < 0,001$) ở cả dịch bảo quản và huyết tương. Nhìn chung mức tăng lactat KHC nhiều hơn MTP ở mọi thời điểm nghiên cứu.

- pH dịch bảo quản KHC và huyết tương MTP:



Biểu đồ 3.3.5: pH dịch bảo quản và huyết tương theo thời gian.

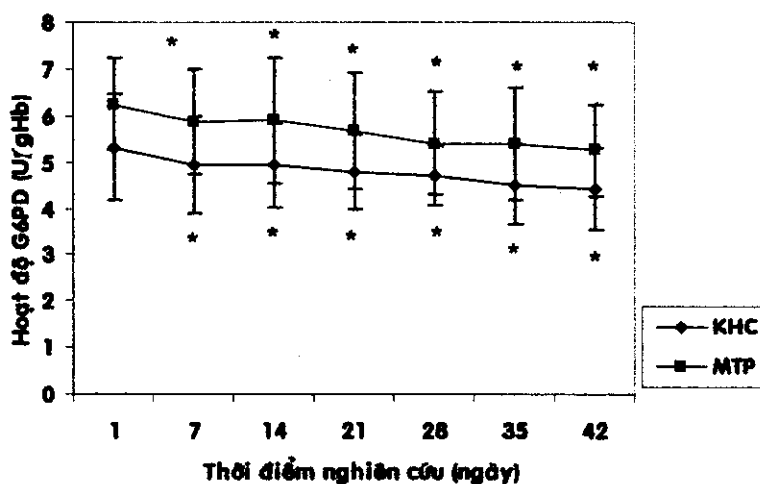
Nhận xét: Có sự giảm pH theo thời gian ($p < 0,05$) ở cả hai loại máu bảo quản, Không có khác biệt nhiều về mức giảm pH giữa hai loại máu bảo quản

Về tương quan giữa các thông số thu được chúng tôi thấy có tương quan nghịch chặt chẽ giữa hoạt độ PK hồng cầu với nồng độ lactat của KHC

$$Y = 1,3381 - 0,1760.x \quad r = -0,83 \quad p < 0,01$$

+ **Kết quả về thoái hóa glucose theo con đường hexose monophosphat thông qua hoạt độ G6PD.**

- **Hoạt độ G6PD hồng cầu KHC & MTP bảo quản:**

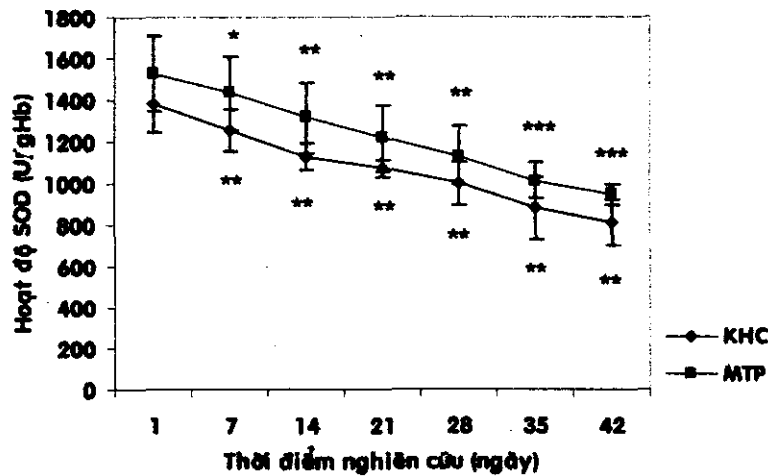


Biểu đồ 3.3.6: Hoạt độ G6PD hồng cầu máu bảo quản theo thời gian.

Nhận xét: Có sự giảm hoạt độ G6PD hồng cầu ($p < 0,05$) ở cả hai loại máu bảo quản, không thấy sự khác biệt về mức giảm hoạt độ G6PD giữa KHC và MTP.

3.3.2. Kết quả về khả năng chống oxy hóa của hồng cầu gồm hoạt độ enzym SOD, GPx hồng cầu máu bảo quản theo thời gian.

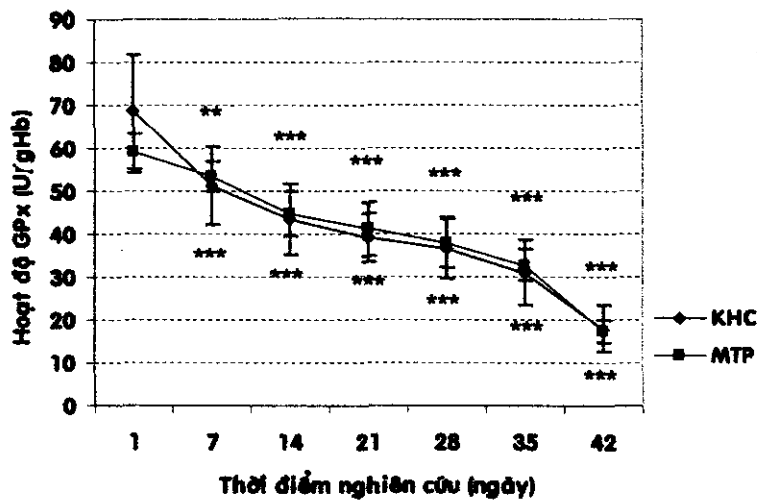
- Hoạt độ SOD hồng cầu KHC và MTP bảo quản:



Biểu đồ 3.3.7: Hoạt độ SOD hồng cầu máu bảo quản theo thời gian.

Nhận xét: Có sự giảm hoạt độ SOD hồng cầu ($p < 0,05$; $0,01$; $0,001$) ở cả hai loại máu bảo quản, không thấy sự khác biệt về mức giảm hoạt độ SOD giữa KHC và MTP ở tất cả các thời điểm nghiên cứu.

- Hoạt độ GPx hồng cầu máu bảo quản:

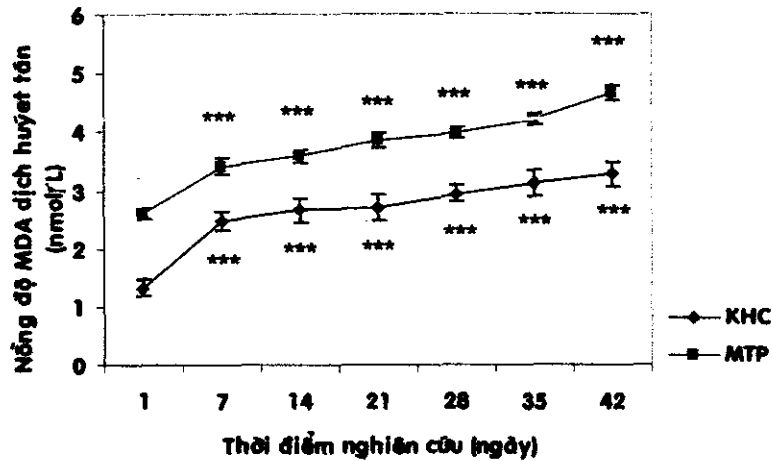


Biểu đồ 3.3.8: Hoạt độ GPx hồng cầu máu bảo quản theo thời gian.

Nhận xét: Có sự giảm hoạt độ GPx hồng cầu ($p < 0,01$; $p < 0,001$) ở cả hai loại máu bảo quản, có sự khác biệt về mức giảm hoạt độ GPx giữa KHC và MTP ở các thời điểm nghiên cứu đầu, mức giảm hoạt độ GPx hồng cầu KHC nhiều hơn MTP.

3.3.3. Kết quả về nồng độ MDA dịch huyết tán và dịch bảo quản, huyết tương theo thời gian.

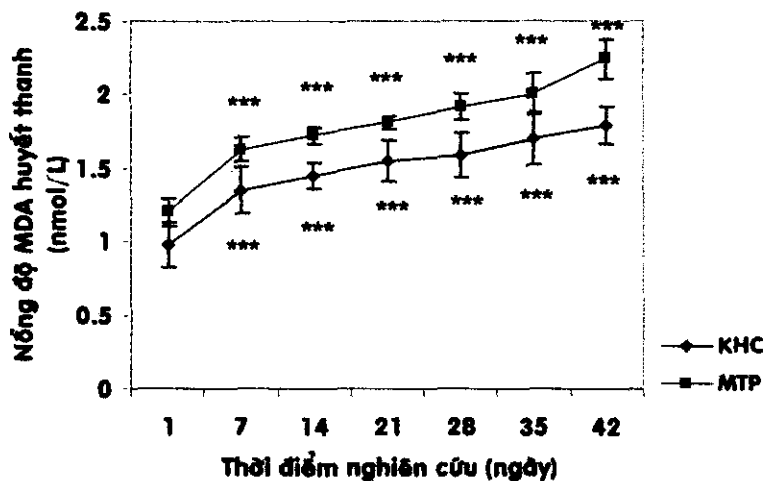
- Nồng độ MDA dịch huyết tán:



Biểu đồ 3.3.9: Nồng độ MDA dịch huyết tán KHC và MTP theo thời gian.

Nhận xét: Có sự tăng nồng độ MDA dịch huyết tán ($p < 0,001$) ở cả hai loại máu bảo quản, không có sự khác biệt về mức tăng nồng độ MDA giữa KHC và MTP ở các thời điểm nghiên cứu.

- Nồng độ MDA dịch bảo quản KHC và huyết tương MTP:



Biểu đồ 3.3.10: Nồng độ MDA dịch bảo quản và huyết tương theo thời gian.

Nhận xét: Có sự tăng nồng độ MDA dịch bảo quản và huyết tương ($p < 0,001$) ở cả hai loại máu bảo quản, có sự khác biệt về mức tăng nồng độ MDA giữa dịch bảo quản và huyết tương ở các thời điểm nghiên cứu, mức tăng nồng độ MDA dịch bảo quản nhiều hơn huyết tương.

Về tương quan giữa các thông số thu được chúng tôi thấy:

- Có tương quan nghịch chặt chẽ giữa hoạt độ SOD hồng cầu với mức MDA dịch huyết tán KHC

$$Y = 2033,7 - 651,2x \quad r = -0,87 \quad p < 0,05$$

- Có tương quan nghịch chặt chẽ giữa hoạt độ SOD hồng cầu với mức MDA dịch huyết tán MTP

$$Y = 2208,4 - 638,2x \quad r = -0,83 \quad p < 0,01$$

- Có tương quan nghịch chặt chẽ giữa hoạt độ GPx hồng cầu với mức MDA dịch huyết tán KHC

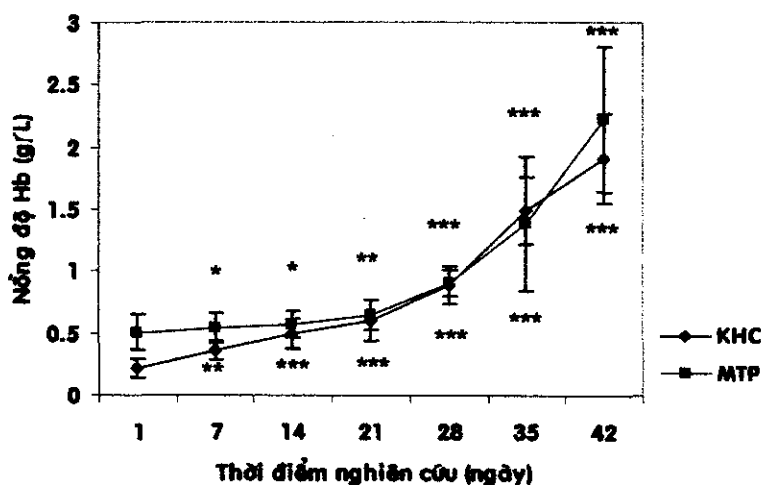
$$Y = 110,35 - 47,03x \quad r = -0,85 \quad p < 0,05$$

- Có tương quan nghịch chặt chẽ giữa hoạt độ GPX hồng cầu với mức MDA dịch huyết tán MTP

$$Y = 97,48 - 36,13x \quad r = -0,88 \quad p < 0,01$$

3.3.4. Kết quả về các thông số đánh giá tổn thương màng gồm nồng độ Hb, K⁺, Na⁺, Cl⁻, Ca⁺⁺, sắt và hoạt độ LDH dịch bảo quản-huyết tương.

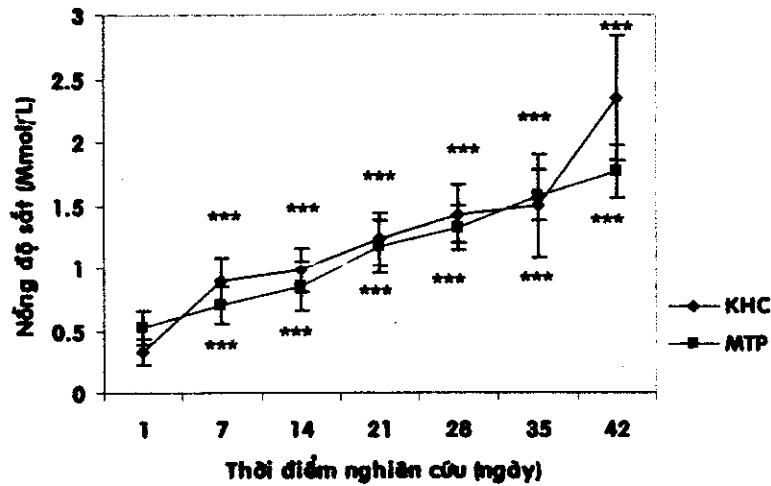
- Nồng độ Hb dịch bảo quản KHC và huyết tương MTP:



Biểu đồ 3.3.11: Nồng độ Hb dịch bảo quản và huyết tương theo thời gian.

Nhận xét: Có sự tăng nồng độ Hb dịch bảo quản và huyết tương (0,05; 0,01; 0,001) ở cả hai loại máu bảo quản, có sự khác biệt về mức tăng nồng độ Hb giữa KHC và MTP ở các thời điểm nghiên cứu đầu (ngày thứ 7,14,21,28 và 35), mức tăng nồng độ Hb KHC nhiều hơn MTP.

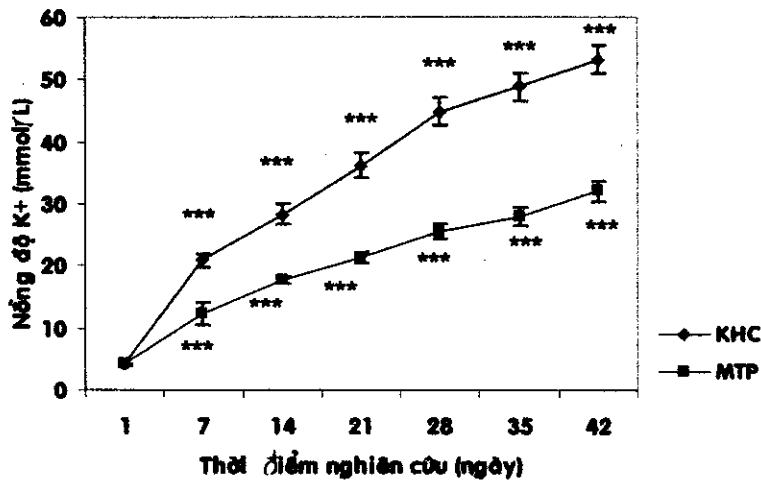
- Nồng độ sắt dịch bảo quản KHC và huyết tương MTP:



Biểu đồ 3.3.12: Nồng độ sắt dịch bảo quản và huyết tương theo thời gian.

Nhận xét: Có sự tăng nồng độ sắt dịch bảo quản và huyết tương (0,001) ở cả hai loại máu bảo quản, có sự khác biệt về mức tăng nồng độ sắt giữa KHC và MTP ở các thời điểm nghiên cứu, mức tăng nồng độ sắt KHC nhiều hơn MTP.

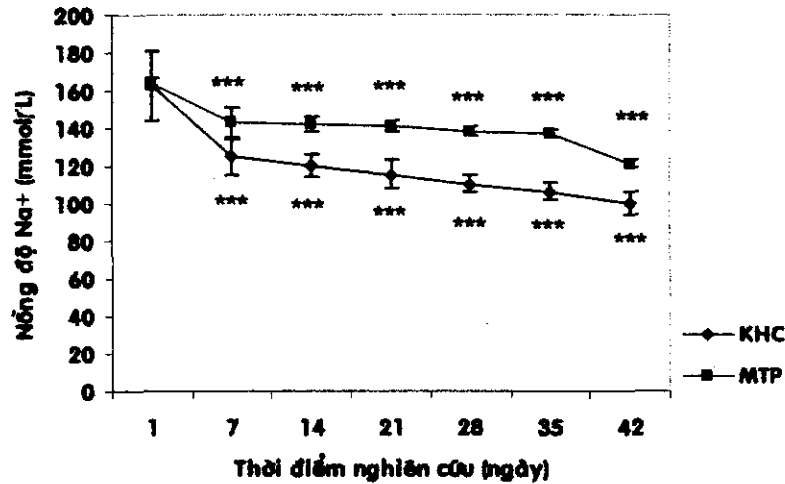
- Nồng độ K^+ dịch bảo quản KHC và huyết tương MTP:



Biểu đồ 3.3.13: Nồng độ K^+ dịch bảo quản và huyết tương theo thời gian.

Nhận xét: Có sự tăng nồng độ K^+ dịch bảo quản và huyết tương (0,001) ở cả hai loại máu bảo quản, có sự khác biệt về mức tăng nồng độ K^+ giữa KHC và MTP ở các thời điểm nghiên cứu, mức tăng nồng độ K^+ KHC nhiều hơn MTP.

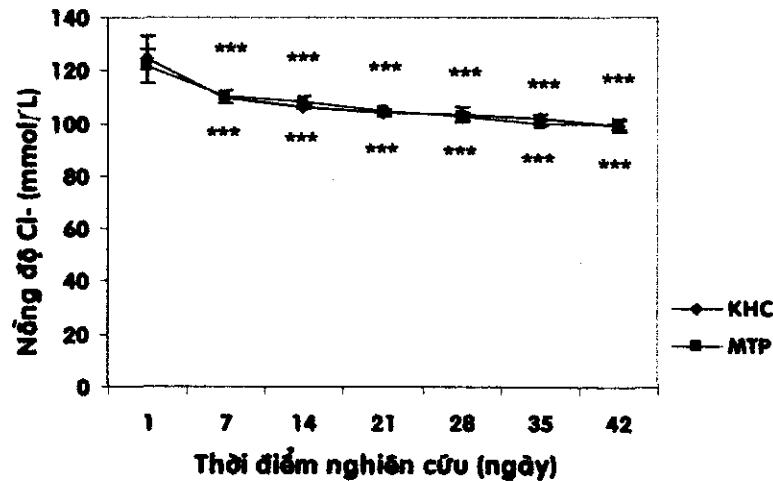
- Nồng độ Na^+ dịch bảo quản KHC và huyết tương MTP:



Biểu đồ 3.3.14: Nồng độ Na^+ dịch bảo quản và huyết tương theo thời gian.

Nhận xét: Có sự giảm nồng độ Na^+ dịch bảo quản và huyết tương ($p < 0,001$) ở cả hai loại máu bảo quản, có sự khác biệt về mức giảm nồng độ Na^+ giữa KHC và MTP ở các thời điểm nghiên cứu, mức giảm nồng độ Na^+ KHC nhiều hơn MTP.

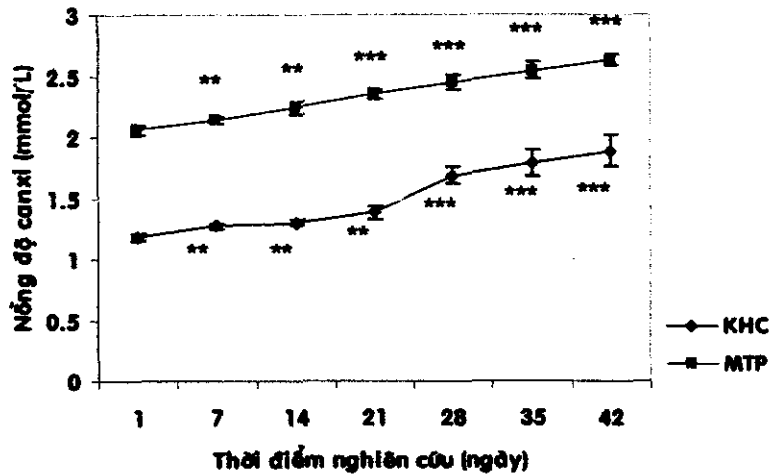
- Nồng độ Cl^- dịch bảo quản KHC và huyết tương MTP:



Biểu đồ 3.3.15: Nồng độ Cl^- dịch bảo quản và huyết tương theo thời gian.

Nhận xét: Có sự giảm nồng độ Cl^- dịch bảo quản và huyết tương ($p < 0,001$) và không thấy khác biệt mức giảm nồng độ Cl^- ở hai loại máu bảo quản.

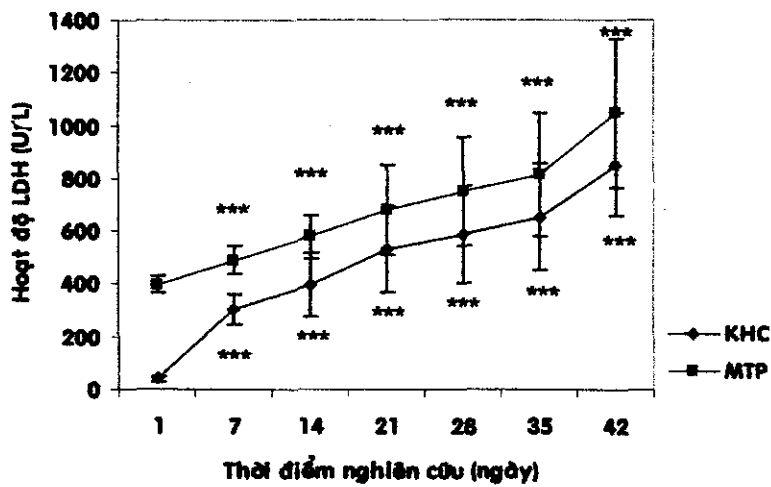
- Nồng độ canxi dịch bảo quản KHC và huyết tương MTP:



Biểu đồ 3.3.16: Nồng độ canxi dịch bảo quản và huyết tương theo thời gian.

Nhận xét: Có sự tăng nồng độ canxi dịch bảo quản và huyết tương ($p < 0,01$; $p < 0,001$) ở cả hai loại máu bảo quản, không có sự khác biệt về mức tăng nồng độ canxi giữa KHC và MTP ở các thời điểm nghiên cứu.

- Hoạt độ LDH dịch bảo quản KHC và huyết tương MTP:



Biểu đồ 3.3.17: Hoạt độ LDH dịch bảo quản và huyết tương theo thời gian.

Nhận xét: Có sự tăng hoạt độ LDH dịch bảo quản và huyết tương ($p < 0,001$) ở cả hai loại máu bảo quản, có sự khác biệt về mức tăng hoạt độ LDH giữa KHC và MTP ở thời điểm nghiên cứu đầu tiên, mức tăng hoạt độ LDH dịch bảo quản nhiều hơn huyết tương.

Về tương quan giữa các thông số thu được chúng tôi thấy:

- Có tương quan nghịch chặt chẽ giữa hoạt độ PK hồng cầu với nồng độ K^+ dịch bảo quản KHC

$$Y = 1,351 - 0,176x \quad r = -0,86 \quad p < 0,01$$

- Có tương quan thuận chặt chẽ giữa mức MDA huyết tán với nồng độ Hb dịch bảo quản KHC

$$Y = 1,2147 + 0,3137x \quad r = 0,70 \quad p < 0,05$$

- Có tương quan thuận chặt chẽ giữa nồng độ K^+ với nồng độ Hb dịch bảo quản KHC

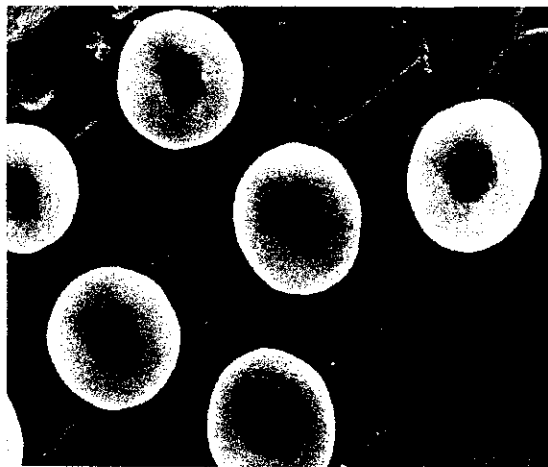
$$Y = 15,618 + 212,01x \quad r = -0,82 \quad p < 0,01$$

3.3.6. Hình ảnh hồng cầu ở các thời điểm nghiên cứu.

3.3.5.1. Hình ảnh hồng cầu trên kính hiển vi điện tử quét.

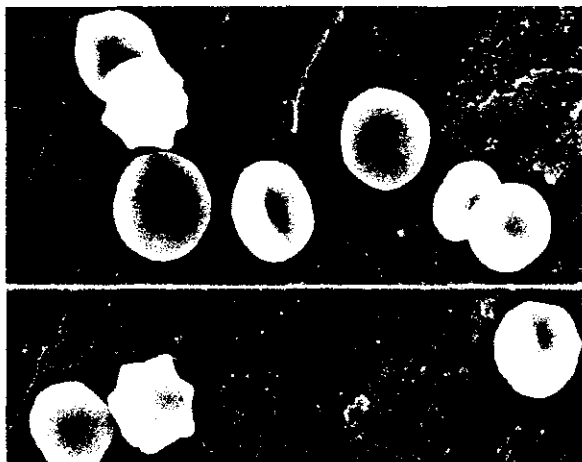
Qua kính hiển vi điện tử quét chúng tôi đã ghi được hình ảnh hồng cầu ở các thời điểm nghiên cứu:

- Hồng cầu ngày bảo quản đầu tiên có hình đĩa lõm 2 mặt đặc trưng của hình dạng hồng cầu bình thường (ảnh 3. 1).



Ảnh 3.1: Hồng cầu bảo quản ngày thứ 1 (HVĐTQ X 5.000)

- Hồng cầu sau 7 ngày được bảo quản trong dung dịch bảo quản, đã xuất hiện gai thô, thấp trên bề mặt màng của một vài hồng cầu, xen lẫn với những hồng cầu bình thường (ảnh 3.2).



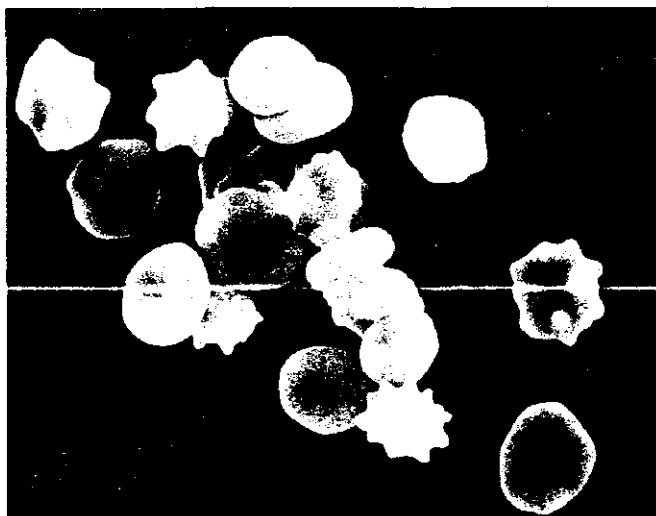
Ảnh 3.2: Hồng cầu sau bảo quản 7 ngày (KHVĐTQ x 3.500)

- Hồng cầu sau 14 ngày bảo quản, mật độ hồng cầu có hình gai tăng lên, số gai thô thấp trên bề mặt hồng cầu nhiều lên, xen lẫn với những hồng cầu bình thường (ảnh 3.3).



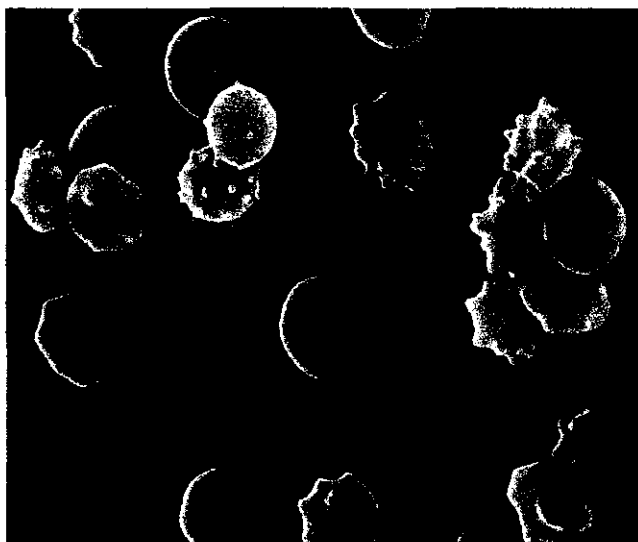
Ảnh 3.3: Hồng cầu sau 14 ngày bảo quản (HVĐTQ x 3.500)

- Hồng cầu sau 21 ngày bảo quản, mật độ hồng cầu gai tăng hơn, số lượng gai trên bề mặt hồng cầu nhiều, xuất hiện các gai cao chân nhỏ, còn rất ít hồng cầu có hình dạng bình thường (ảnh 3.4).



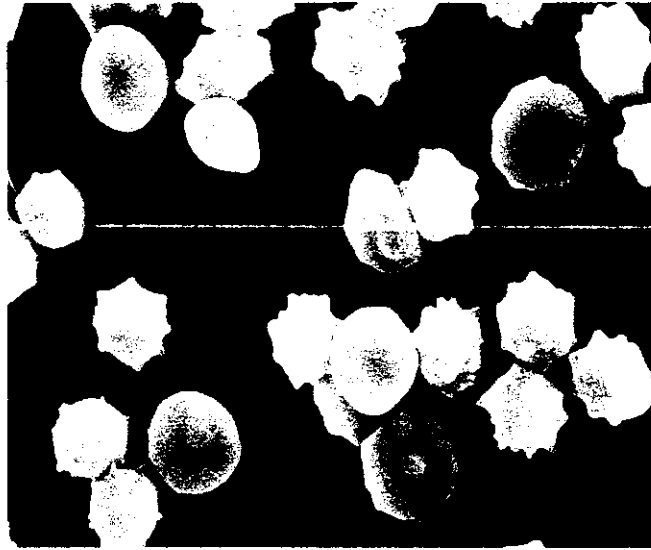
Ảnh 3.4: Hồng cầu sau 21 ngày bảo quản (HVĐTQ x 3.500)

- Hồng cầu sau 28 ngày bảo quản, mật độ hồng cầu có gai cao, chân nhỏ tăng lên, xen lẫn với những hồng cầu có gai thô thấp, chân rộng, xuất hiện hồng cầu có gai thấp chân nhỏ, lác đác còn một vài hồng cầu bình thường (ảnh 3.5)



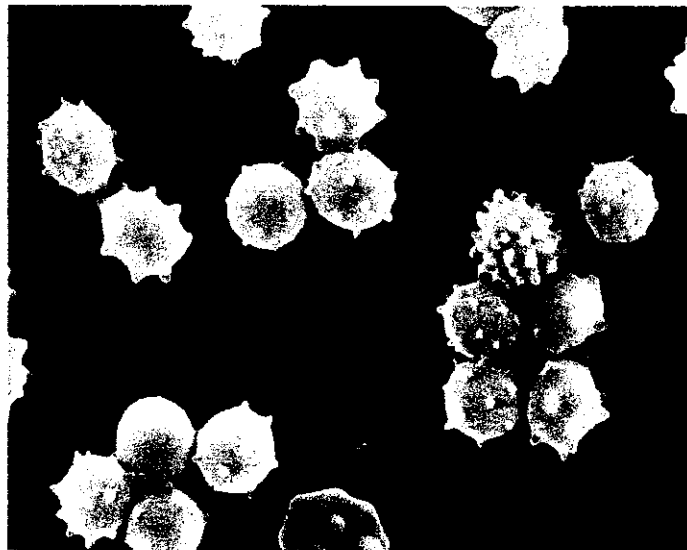
Ảnh 3. 5: Hồng cầu sau 28 ngày bảo quản (HVĐTQ x 3.500)

- Hồng cầu sau 35 ngày bảo quản hầu như biến dạng thành hồng cầu gai, số gai trên bề mặt hồng cầu tăng hơn (ảnh 3. 6).



Ảnh 3. 6: Hồng cầu sau 35 ngày bảo quản (HVĐTQ x 3.500)

- Hồng cầu sau 42 ngày bảo quản, biến dạng hoàn toàn thành hồng cầu gai, trên bề mặt hồng cầu toàn gai với các hình thái gai thô thấp chân rộng, gai cao chân nhỏ, gai ngắn chân nhỏ (ảnh 3.7).

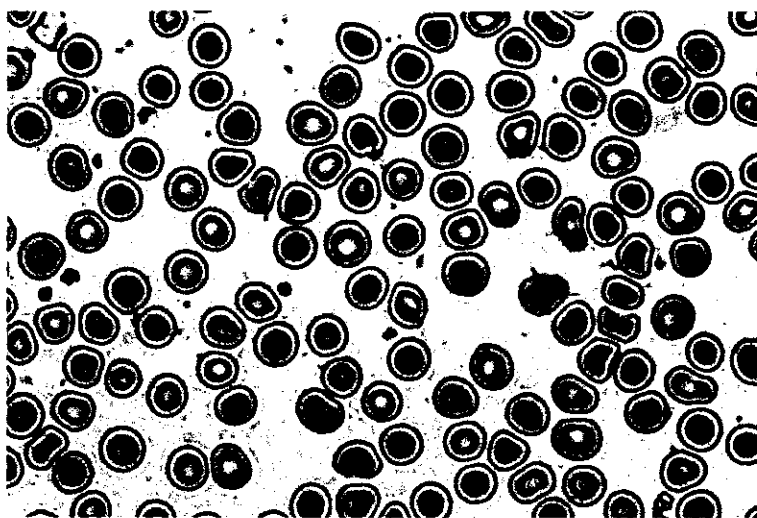


Ảnh 3.7: Hình ảnh hồng cầu bảo quản ngày thứ 42 (HVĐTQ x 3.500).

3.3.5.2. Hình ảnh hồng cầu qua kính hiển vi quang học.

Dưới kính hiển vi quang học chúng tôi đã ghi được hình dạng hồng cầu biến đổi theo thời gian bảo quản như sau:

♦ Hình dạng hồng cầu trong máu toàn phần ngày đầu bảo quản bằng dung dịch CPD-A1 (ảnh 3.8).

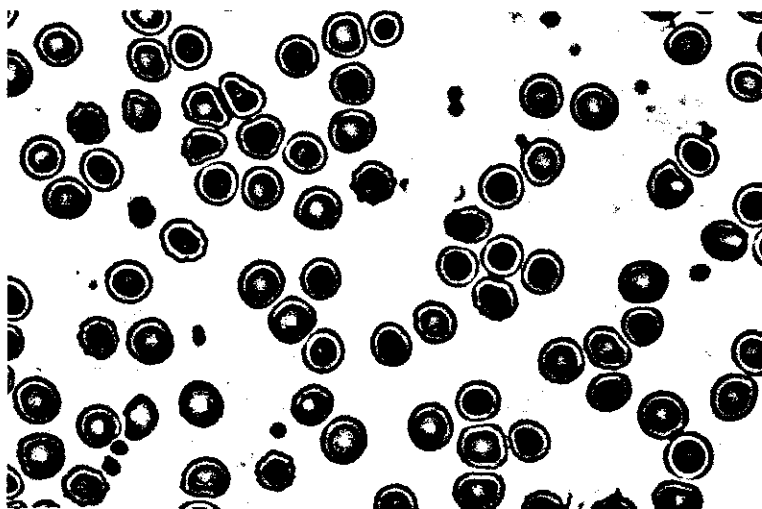


Ảnh 3.8: Hồng cầu ngày đầu bảo quản (HVQH x 800)

+ Hồng cầu có kích thước đồng đều, hồng cầu có hình đĩa lõm 2 mặt đặc trưng của hình dạng hồng cầu bình thường.

+ Ranh giới các hồng cầu nhận rõ, không thấy có hồng cầu gai.

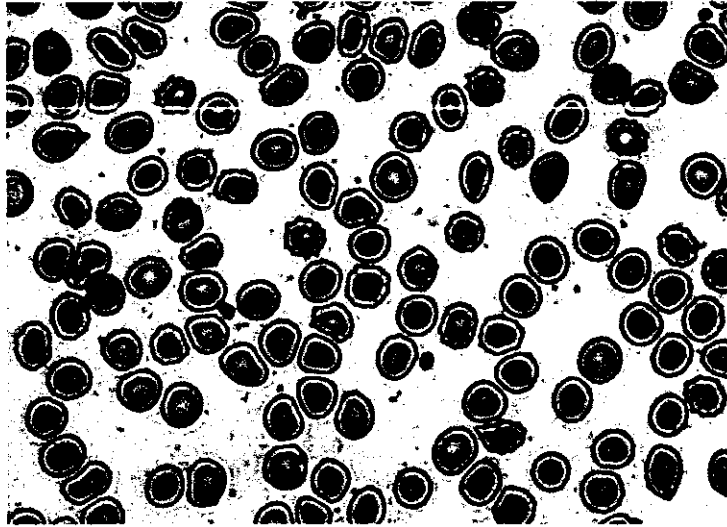
♦ Hình dạng hồng cầu trong máu toàn phần ngày thứ 7 sau bảo quản (ảnh 3.9)



Ảnh 3.9: Hồng cầu ngày thứ 7 sau bảo quản (HVQH x 800)

- + Phần lớn hồng cầu vẫn có hình dạng kích thước bình thường.
- + Xuất hiện một số ít hồng cầu có đường kính nhỏ hơn bình thường và một vài hồng cầu có gai thấp ở màng.

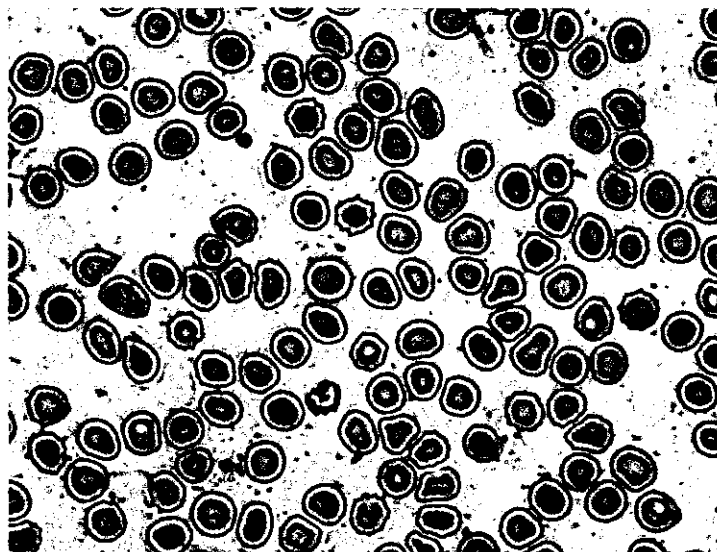
♦ *Hồng cầu ngày thứ 14 sau bảo quản (ảnh 3.10)*



Ảnh 3.10: Hồng cầu ngày thứ 14 sau bảo quản (HVQH x 800)

- + Đa số hồng cầu vẫn có hình dạng kích thước bình thường
- + Số hồng cầu có gai thấp đường kính nhỏ xuất hiện tăng lên xen lẫn với những hồng cầu bình thường nhưng không thấy hồng cầu bị vỡ hoặc xác hồng cầu.

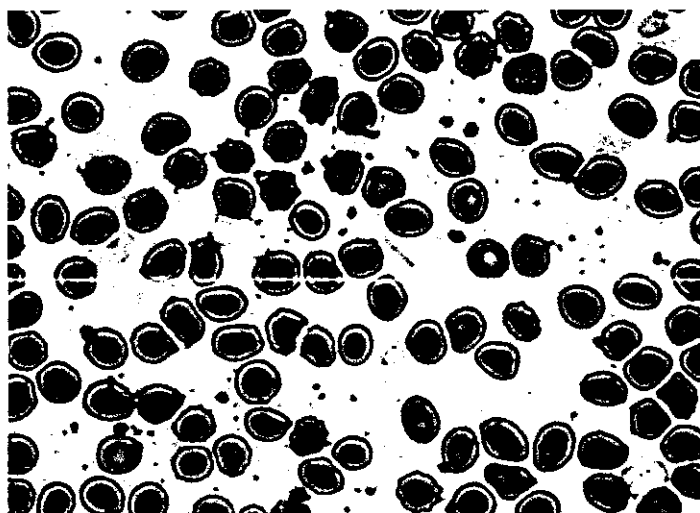
♦ *Hồng cầu ngày thứ 21 sau bảo quản (ảnh 3.11)*



Ảnh 3.11: Hồng cầu ngày thứ 21 sau bảo quản (HVQH x 800)

Bên cạnh những hồng cầu bình thường, xuất hiện nhiều hồng cầu gai đường kính nhỏ, gai cao; một số hồng cầu biến dạng méo mó.

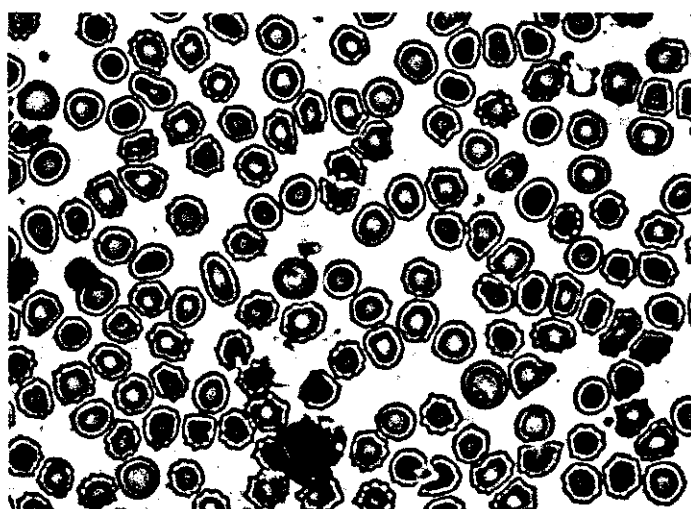
♦ **Hồng cầu ngày thứ 28 sau bảo quản (ảnh 3.12)**



Ảnh 3.12: Hồng cầu ngày thứ 28 sau bảo quản (HVQH x 800).

- + Số lượng hồng cầu có gai cao chân nhỏ tăng lên, xen lẫn với những hồng cầu có gai thấp chân rộng.
- + Bên cạnh hồng cầu có hình dạng bình thường có một số hồng cầu méo mó biến dạng.

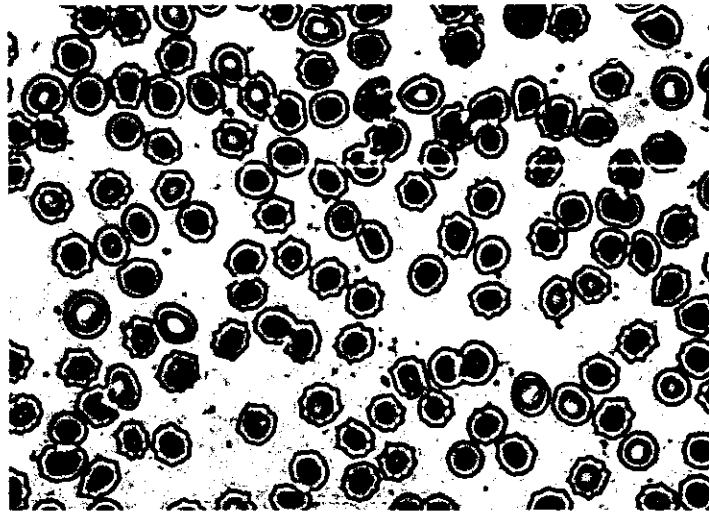
♦ **Hồng cầu ngày thứ 35 sau bảo quản (ảnh 3.13).**



Ảnh 3.13: Hồng cầu ngày thứ 35 sau bảo quản (HVQH x 800)

- + Số lượng hồng cầu bình thường giảm hẳn.
- + Số lượng hồng cầu có gai cao đường kính nhỏ xuất hiện nhiều.
- + Xen kẽ HC bình thường là một số hồng cầu gai biến dạng hoặc bị vỡ.

♦ *Hồng cầu ngày thứ 42 sau bảo quản (ảnh 3.14)*



Ảnh 3.14: Hồng cầu ngày thứ 42 sau bảo quản (HVQH x 800)

- + Số lượng hồng cầu gai có kích thước nhỏ, biến dạng chiếm đa số.
- + Rải rác có một ít hồng cầu hình dạng bình thường.

*** Nhận xét chung:**

Hồng cầu gai xuất hiện nhiều dần từ giai đoạn ngày thứ 21 sau bảo quản, xu hướng xuất hiện hồng cầu gai mức độ vừa phải cho đến ngày thứ 28 sau bảo quản. Từ ngày thứ 35 sau bảo quản, số hồng cầu gai tăng mạnh trong khi số hồng cầu bình thường giảm hẳn.

Kết quả xác định sự biến đổi hình thái HC dưới kính hiển vi Axioplan 2.

Chỉ tiêu số lượng hình thái: tỷ lệ % của tổng số hồng cầu bình thường / tổng số (hình cầu bình thường + hồng cầu gai) ở mỗi mẫu và trị số trung bình % ở mỗi nhóm mẫu theo thời gian bảo quản. 7 nhóm nghiên cứu tại ngày 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, mỗi nhóm gồm 6 mẫu, mỗi mẫu đo trên 3 tiêu bản, vậy số n được khảo sát của mỗi mẫu được xác định là $(6 \times 3) = 18$.

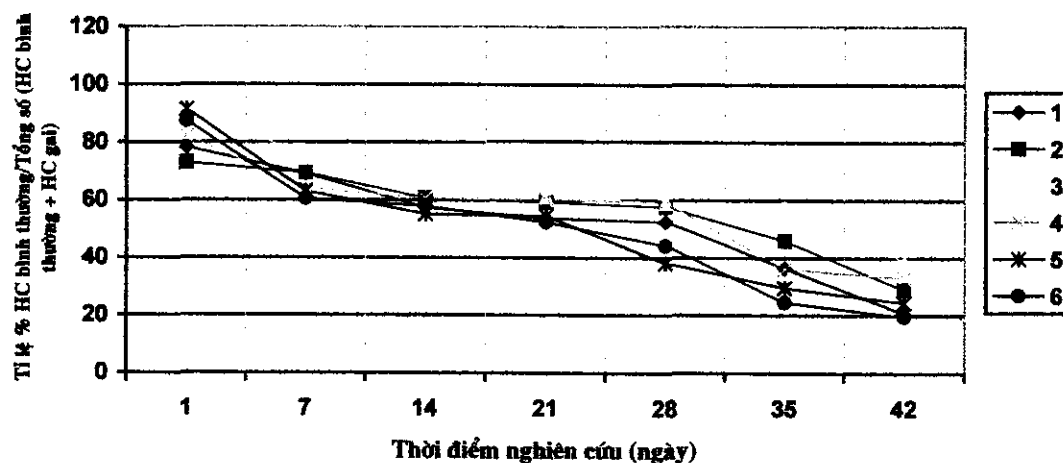
Bảng 3.9. Tỷ lệ % hỏng cầu bình thường/(Hỏng cầu bình thường + Hỏng cầu gai) theo thời gian bảo quản; (n = 18)

Ngày Tỷ lệ %HC	1	7	14	21	28	35	42
$\bar{X}$	83,7	67,0	60,1	56,8	51,8	38,4	27,6
SD	7,30	5,59	4,83	3,82	8,83	11,87	7,52
Tỷ lệ %	100	80,04	71,80	67,86	61,88	45,87	32,97
P		< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,001	< 0,001	< 0,001

* Nhận xét chung:

- Kết quả bảng 3.9 cho thấy tỷ lệ % hỏng cầu bình thường giảm dần theo thời gian bảo quản.

- Tỷ lệ % hỏng cầu bình thường có xu hướng giảm dần theo thời gian bảo quản ở tất cả các mẫu nghiên cứu. Sự sụt giảm tỷ lệ % hỏng cầu bình thường ở ngày thứ 35 sau bảo quản là nhiều hơn so với các thời điểm trước và được trình bày ở biểu đồ sau:



Biểu đồ 3.18. Tỷ lệ % hỏng cầu bình thường/(HC bình thường + HC gai) của các mẫu nghiên cứu theo thời gian bảo quản

CHƯƠNG 4

BÀN LUẬN

4.1. BÀN LUẬN VỀ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TRÊN CÁC TRƯỜNG HỢP NHIỄM CHÌ MÁU

Các thông số huyết học.

Các nghiên cứu về nhiễm độc chì thực nghiệm của nhiều tác giả đã cho thấy tác dụng độc của chì lên hệ thống tạo huyết. Trong nhiễm độc chì có biểu hiện thiếu máu giảm số lượng hồng cầu, hồng cầu bất thường, đa hình dạng, giảm nồng độ Hb, giảm Hct, giảm thể tích trung bình của hồng cầu trên thực nghiệm [77, 87, 88]. Nghiên cứu trên những công nhân thâm nhiễm chì, Hu H, và cộng sự thấy rằng, ở những người có mức chì máu dưới $8,3 \mu\text{g} \%$ không có sự thay đổi nồng độ Hb và các thông số huyết học khác [85]. Trong một nghiên cứu khác, người ta đã xác định hàm lượng chì trong xương bánh chè và thấy có sự tương quan nghịch với nồng độ Hb, Hct, mặc dù hàm lượng chì máu không cao [87].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như của một số tác giả trên. Sự tương quan giữa nồng độ chì máu và số lượng hồng cầu, nồng độ Hb ở những công nhân tiếp xúc với xăng chì là tương quan nghịch với $r = -0,43$ và $r = -0,32$ với $p < 0,05$. Riêng hàm lượng chì và Hct có tương quan rất ít. Kết quả chúng tôi thu được đã chia theo nhóm và so sánh sự khác biệt giữa các nhóm. Chúng tôi nhận thấy rằng, các chỉ số huyết học SLHC và nồng độ Hb nhóm 2 thấp hơn nhóm 1 không có ý nghĩa thống kê. Trong khi, có sự khác biệt giữa nhóm 1 và nhóm 3, điều này có thể lý giải rằng: nhóm 2 là nhóm có nồng độ chì máu từ trên $20 \mu\text{g} \%$ đến dưới $40 \mu\text{g} \%$ (trung bình là $28,72 \pm 5,59 \mu\text{g} \%$) chưa phải là nhóm nhiễm độc chì mà là thâm nhiễm chì. Do vậy, hệ thống tạo huyết ở những trường hợp của nhóm 2 đã bị ảnh hưởng nhưng có biểu hiện bù trừ. Có hiện tượng tăng hồng cầu hạt kiểm trong các trường hợp nhiễm chì vì các hồng cầu non trong tuỷ xương còn chứa các base purin và pyrimidin, các nucleotid, các polynucleotit chưa bị thoái hóa hết do enzym 5' pyrimidin nuclease giảm hoạt tính. Các hồng cầu hạt kiểm bị huy động ra máu ngoại vi sớm để bù trừ cho chức năng của hồng cầu trong nhiễm chì [88, 103]. Bàn luận về tác động của chì lên hệ thống tạo huyết đã được

nhiều nghiên cứu đề cập ở các khía cạnh khác nhau và đã kết luận rằng có sự tương quan thuận giữa nồng độ chì máu với nồng độ ALA máu và nước tiểu. Nồng độ ALA được coi như là một dấu hiệu của nhiễm chì [90, 102].

Một nguyên nhân khác dẫn đến thiếu máu trong nhiễm độc chì do chì làm giảm các yếu tố cần thiết cho quá trình tạo hồng cầu của một số tế bào. Tổn thương thận trong nhiễm độc chì cũng dẫn đến thiếu yếu tố tạo hồng cầu erythropoietin [115, 129]. Chì tác động lên các protein màng hồng cầu, làm giảm hoạt tính của Na^+/K^+ -ATPase dẫn đến giảm tính bền vững của màng hồng cầu [79].

Hoạt độ các enzym chống oxy hóa.

Về ảnh hưởng của chì lên hoạt độ một số enzym chống oxy hóa đã được nhiều tác giả nghiên cứu. Các tác giả chủ yếu đã đi sâu nghiên cứu cơ chế tác động của chì đến quá trình sản sinh ra gốc tự do (oxy hoạt động) [42, 152].

Nhiều nghiên cứu *in vivo*, *in vitro* đã công bố về tác dụng độc của chì lên sức bền của màng hồng cầu do liên quan đến quá trình peroxi hóa lipid màng [135]. Các nghiên cứu trên hồng cầu người nhiễm chì cũng cho thấy có biểu hiện tăng peroxi hóa lipid màng thông qua tăng malonyl dialdehyt (MDA) huyết thanh [42, 136, 152].

Vai trò tiền oxy hóa của ALA cũng được minh chứng qua nghiên cứu *in vitro*: người ta tiêm phúc mạc chuột với liều 40mg ALA/kg cân nặng trong 15 ngày. Kết quả nghiên cứu cho thấy giai đoạn đầu có sự tăng hoạt độ của Cu-Zn - SOD bào tương và Mn-SOD ty thể của tế bào một số mô [89].

Một số nghiên cứu khác lại có kết luận rằng có sự tăng mức peoxi hóa lipid máu làm giảm hoạt độ SOD huyết thanh khi nồng độ chì máu tăng [79, 136]. Có thể nghĩ rằng, trong các trường hợp nhiễm chì do phản ứng tự oxy hóa của ALA làm sản sinh oxy hoạt động. Oxy hoạt động sẽ làm tăng peoxi hóa acid béo chưa no của huyết thanh và của màng tế bào của các mô, lượng oxy hoạt động giảm dẫn đến hoạt độ SOD giảm. Vì vậy, quá trình peoxi hóa lipid làm giảm oxy hoạt động sẽ ức chế enzym SOD. Nhiều tác giả đề nghị mức peoxi hóa lipid là một trong những dấu hiệu theo dõi sức khỏe của những công nhân làm việc trong điều kiện tiếp xúc với chì [89].

Sự giảm hoạt độ SOD trong nhiễm chì còn có thể do chì thay thế các ion kim loại như Cu, Zn, Mn, trong khi các ion kim loại này rất cần cho hoạt động xúc tác của SOD. Sự giảm hoạt độ SOD và sự giảm hoạt độ GPx hồng cầu khi nồng độ chì máu cao cũng đã được công bố [89, 136]. Sự giảm hoạt độ của GPx có thể là do giảm selen máu khi chì máu tăng, vì selen là thành phần cấu tạo của enzym GPx. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy sự tương quan nghịch giữa hoạt độ GPx hồng cầu với nồng độ chì máu với hệ số tương quan $r = -0,57$ và $r = -0,46$ với $p < 0,05$.

Trong quá trình đáp ứng của tế bào máu chống lại stress oxy hóa gây ra do chì có sự tham gia tích cực của enzym G6PD. Chuyển hóa glucose của hồng cầu theo con đường hexose monophosphat mà khởi đầu là phản ứng xúc tác của G6PD nhằm cung cấp NADPH cho các quá trình chống oxy hóa gây nên do chì. Vì vậy, trong nhiễm độc chì hoạt độ G6PD tăng lên, bên cạnh đó hoạt độ GR lại giảm. Hoạt độ GR giảm do thiếu NADPH vì NADPH phải dùng để trung hòa oxy hoạt động sinh ra bởi sự ứ ALA do chì [46, 89].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho hình ảnh tương tự. Đó là có tương quan nghịch giữa hoạt độ GR hồng cầu (tính theo U/gHb) và nồng độ chì máu với hệ số tương quan $r = -0,43$ với $p < 0,05$.

Nhiều nghiên cứu cho thấy sự tăng có ý nghĩa MDA huyết thanh ở những con vật nhiễm chì là do oxy hoạt động đã gây peroxi hóa lipid dẫn đến hình thành sản phẩm aldehyd. Sản phẩm aldehyd này sẽ làm giảm glutathion dạng khử (GSH). GSH được coi như là yếu tố quan trọng của hệ thống chống oxy hóa ở tế bào động vật có vú, tỷ số GSH/GSSG được coi như là yếu tố đặc trưng đánh giá stress oxy hóa [79, 136].

Chì khơi mào phản ứng sinh gốc tự do ngoài cơ chế thông qua sự ứ ALA còn do quá trình tự oxy hóa Hb thành MetHb. Người ta nhận thấy, nồng độ MetHb tăng ở những trường hợp nhiễm chì [90].

4.2. BÀN LUẬN VỀ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TRÊN CÁC TRƯỜNG HỢP THIẾU MÁU TAN MÁU

Một số thông số huyết học.

Kết quả bảng 3.4, chúng tôi nhận thấy nhóm bệnh tan máu do thiếu hụt enzym G-6-PD, PK hồng cầu, HbH, β -thalassemia, tan máu miễn dịch hay do các nguyên nhân khác đều có tình trạng thiếu máu. Biểu hiện thiếu máu qua các thông số huyết học là giảm: số lượng hồng cầu, nồng độ HB, tỷ lệ Hct so với nhóm chứng rõ rệt ($p < 0,01$). Vì các bệnh nhân tan máu đều có sự phá huỷ hồng cầu quá mức bình thường, đời sống hồng cầu rút ngắn nên mặc dù tủy xương có tăng sinh cũng không bù lại được mức độ tan máu.

Tỷ lệ HCL trên các nhóm tan máu đều cao hơn nhóm chứng một cách rõ rệt ($p < 0,001$) có liên quan đến sự phá huỷ hồng cầu quá mức bình thường nên gây ra tình trạng thiếu máu. Cơ thể phản ứng lại bằng cách tăng sinh hồng cầu tại tủy xương nhằm bù lại lượng hồng cầu đã vỡ, vì thế tỷ lệ hồng cầu lưới tăng trong máu ngoại vi của tất cả các bệnh nhân thiếu máu tan máu. Bình thường, tỷ lệ hồng cầu lưới trong máu ngoại vi chỉ 0,5-1,5%, nhưng trong tan máu tỷ lệ hồng cầu lưới có thể tăng lên đến 10-30% [84].

Như vậy, ở bệnh nhân tan máu chúng tôi thấy có tình trạng thiếu máu từ nhẹ đến nặng, tăng tỷ lệ hồng cầu lưới.

Hoạt độ G-6-PD hồng cầu.

Kết quả trong bảng 3.5, cho thấy hoạt độ G-6-PD hồng cầu ở nhóm nghiên cứu cao hơn nhóm chứng. Vì G-6-PD xúc tác phản ứng mở đầu chu trình pentose phosphat, trong chu trình này nhiều NADPH được tạo ra để cung cấp cho các enzym chống oxy hóa của hồng cầu. Khi tỷ lệ NADPH/NADP thấp sẽ hoạt hóa G-6-PD làm tăng cường chuyển hóa glucose theo con đường này để cung cấp NADPH cho hồng cầu. Trên các bệnh nhân tan máu, trong cơn tan máu nhu cầu NADPH cao hơn để cung cấp cho quá trình chống oxy hóa, bảo vệ hồng cầu chống lại các tác stress oxy hóa, vì vậy chuyển hóa glucose theo con đường hexose monophosphat được tăng cường, hoạt độ G-6-PD hồng cầu tăng lên nhằm đáp ứng nhu cầu của hồng cầu. Hoàng Hạnh Phúc nghiên cứu trên trẻ bệnh Hb (HbH,

HbE/ β thalassemia) nhận thấy hoạt độ G-6-PD hồng cầu (9,52 IU/gHb) cao hơn so với nhóm chứng (4,86 IU/gHb) có ý nghĩa thống kê [25].

Hoạt độ PK hồng cầu.

Hoạt độ PK hồng cầu của nhóm nghiên cứu được thể hiện trong bảng 3.5, Hoạt độ PK thấp chỉ gặp ở 2 bệnh nhân, các bệnh nhân tan máu có hoạt độ PK hồng cầu cao hơn nhóm chứng một cách rõ rệt ($p < 0,01$ và $p < 0,001$).

Hoạt độ PK hồng cầu tăng cao trên các nhóm bệnh nhân tan máu: thiếu hụt G-6-PD, HbH, β thalassemia, tan máu miễn dịch hay tan máu do các nguyên nhân khác. Khi PK hồng cầu cao thì chuyển hóa glucose theo con đường Embden Meyerhof tăng lên để tạo ra nhiều ATP cho hồng cầu sử dụng.

Trên bệnh nhi HbE/ β thalassemia, Hoàng Hạnh Phúc nhận thấy hoạt độ PK hồng cầu cao gấp 3 lần nhóm chứng [25]. Nguyễn Hữu Chấn và cộng sự nghiên cứu trên bệnh nhân HbH nhận thấy hoạt độ PK hồng cầu là $382,42 \pm 68,00$ mU/ 10^9 HC cao hơn 1,7 lần so với nhóm chứng ($226,14 \pm 47,24$ mU/ 10^9 HC) [7].

Nồng độ 2,3-DPG máu.

Theo kết quả nghiên cứu bảng 3.5, nồng độ 2,3-DPG máu toàn phần cao ở các bệnh nhân tan máu so với nhóm chứng.

2,3-DPG là một sản phẩm chuyển hóa trung gian của glucose theo con đường phân, 2,3-DPG tham gia điều hòa ái lực hemoglobin với oxy, nên có vai trò đặc biệt quan trọng trong hồng cầu. Nồng độ 2,3-DPG trong hồng cầu cao gấp nhiều lần trong các tế bào khác của cơ thể. Nồng độ 2,3-DPG trong hồng cầu được điều chỉnh bởi hoạt độ các enzym tham gia chuyển hóa glucose nhằm điều hòa ái lực Hb với oxy sao cho việc cung cấp oxy cho cơ thể được thuận lợi.

Trong các nhóm nguyên nhân khác nhau gây ra tan máu ngoại trừ thiếu hụt G-6-PD chúng tôi nhận thấy hoạt độ G-6-PD, PK hồng cầu đều tăng cao hơn nhóm chứng nên chuyển hóa glucose được tăng cường ở cả hai con đường nhằm tạo ra nhiều ATP, NADH, NADPH cho hoạt động chức năng và chống oxy hóa của hồng cầu. Do vậy, nồng độ 2,3-DPG cũng cao hơn so với nhóm chứng. Trên bệnh nhân thalassemia có tăng tỷ lệ HbF, HbA₂ làm tăng ái lực giữa hemoglobin với oxy gây

cản trở cho sự vận chuyển, giải phóng oxy cho cơ thể. Vì vậy, tăng nồng độ 2,3-DPG ở những bệnh nhân này góp phần làm giảm ái lực của hemoglobin với oxy, tăng cường giải phóng oxy cho cơ thể, đây là cơ chế thích nghi của cơ thể. Trước đó, Nguyễn Hữu Chấn, Hoàng Hạnh Phúc nghiên cứu về nồng độ 2,3-DPG trên bệnh nhân Hb (HbH, HbE/ β thalassemia) cũng cho kết quả tương tự, nồng độ 2,3-DPG ở nhóm bệnh nhân Hb tăng 2,15 lần so với nhóm chứng [7, 25].

Nồng độ MDA huyết tương.

MDA là sản phẩm cuối cùng của quá trình peroxi hóa lipid, nó được dùng để gián tiếp đánh giá tình trạng peroxi hóa. Có thể định lượng nồng độ MDA trong huyết tương hoặc trong máu toàn phần bằng phản ứng màu với thiobarbituric acid. Nồng độ MDA huyết tương tăng tuyến tính với mức độ peroxi hóa lipid, do vậy để đánh giá mức peroxi hóa lipid trong đó có lipid màng hồng cầu, chúng tôi định lượng nồng độ MDA huyết tương của các nhóm bệnh nhân tan máu. Kết quả bảng 3.6 cho thấy nồng độ MDA huyết tương của nhóm bệnh nhân tan máu cao hơn so với nhóm chứng.

Theo nghiên cứu trên những bệnh nhân thiếu máu thiếu sắt, nồng độ sắt huyết tương thấp, mức peroxi hóa lipid thấp hơn ở hồng cầu bình thường và thấp hơn rõ rệt mức peroxi hóa lipid trên bệnh nhân thalassemia có nồng độ sắt huyết thanh cao. Nồng độ MDA, huyết tương bệnh nhân beta thalassemia thể nặng cao hơn trên hồng cầu bình thường [137]. Tương tự như vậy, Adamet Meral nhận thấy nồng độ MDA huyết tương ở bệnh nhân beta thalassemia cao hơn so với nhóm chứng và nhóm thiếu máu thiếu sắt [109]. Trong khi đó, nồng độ vitamin E ở các bệnh nhân beta thalassemia theo nghiên cứu một số tác giả thấp hơn bình thường nên có thể vì thế khả năng bảo vệ đối với quá trình peroxi hóa trên bệnh nhân này giảm. Như vậy sắt huyết thanh có ảnh hưởng rất lớn đến quá trình peroxi hóa lipid. Việc điều trị thải sắt trên bệnh nhân tan máu có thể phần nào hạn chế quá trình peroxi hóa lipid? Vì vậy có thể sử dụng nồng độ MDA để đánh giá tình trạng peroxi hóa lipid cũng như theo dõi quá trình điều trị?

Hoạt độ GPx hồng cầu.

Trên những bệnh nhân β -thalassemia người ta nhận thấy có sự giảm nồng độ selen huyết thanh và tăng hoạt độ GPx so với hồng cầu bình thường, việc bổ sung selen làm tăng nồng độ selen huyết tương, đồng thời làm giảm hoạt độ GPx so với trước khi bổ sung [137]. Như vậy trong β -thalassemia có sự thiếu selen, vì thế góp phần làm tăng hoạt độ GPx. Nghiên cứu này chúng tôi chỉ đo hoạt độ GPx mà chưa xác định nồng độ selen trên các nhóm nguyên nhân tan máu khác nhau nên không thể biết có sự thiếu hụt Se trên các bệnh nhân hay không ?

Hoạt độ SOD hồng cầu.

Trong cơ chế chống oxy hóa trong hồng cầu thì SOD có vai trò mở màn quan trọng, chuyển superoxid anion thành hydroperoxid để tiếp tục phân giải đến khi không còn độc hại cho cơ thể.

Bảng 3.6, cho thấy hoạt độ SOD hồng cầu ở nhóm bệnh tan máu cao hơn nhóm chứng. Phải chăng vì sự tăng quá trình oxy hóa ở hồng cầu bệnh nhân tan máu do tác động của stress oxy hóa nên hồng cầu tăng cường hoạt động chống oxy hóa, tăng hoạt độ enzym SOD giúp hồng cầu chống oxy hóa, bảo vệ màng hồng cầu trước các tác nhân oxy hóa. Hoạt độ SOD hồng cầu trung bình trên bệnh nhân β -thalassemia cao hơn nhóm chứng cũng là nhận xét của Adamet Meral trên bệnh nhi β -thalassemia thể nặng (2420 IU/gHb so với 1660 IU/gHb) [109]. Nghiên cứu của tác giả Đặng Thị Tuyết Minh trên trẻ HbE/ β -thalassemia cũng có cùng nhận xét, hoạt độ SOD hồng cầu tăng gấp 3,5 lần nhóm chứng (3892 ± 1812 IU/gHb so với 1040 ± 327 IU/gHb nhóm chứng) [22]. Hoạt độ SOD hồng cầu tăng cao nhằm loại bỏ gốc $O_2^{\cdot -}$ trong hồng cầu, bảo vệ hồng cầu. Có thể tan máu do các nguyên nhân khác nồng độ $O_2^{\cdot -}$ trong hồng cầu cũng tăng cao, làm cho hoạt độ SOD hồng cầu tăng. Tuy nhiên, chưa có kết quả nghiên cứu về nồng độ $O_2^{\cdot -}$ ở các bệnh nhân tan máu do nguyên nhân khác, nên đây chỉ là một giả thiết có thể xảy ra.

Khả năng chống oxy hóa toàn phần huyết tương (TAS).

Một trong những thông số đánh giá khả năng chống oxy hóa trên các đối tượng nghiên cứu là TAS. TAS phụ thuộc vào các chất chống oxy hóa hòa tan trong huyết tương như GSH, vitamin A, vitamin E, vitamin B2...các polyphenol.

Bảng 3.6 cho thấy TAS giảm trên bệnh nhân thiếu máu tan máu so với nhóm chứng.

Khả năng chống oxy hóa toàn phần quan trọng, góp phần bảo vệ hồng cầu chống lại các stress oxy hóa thường xuyên tác động. TAS giảm nhẹ trên bệnh nhân thiếu hụt G-6-PD phải chăng vì NADPH ít được tạo ra do chu trình pentose phosphat bị ức chế một phần do thiếu hụt G-6-PD? NADPH duy nhất được tạo ra trong chu trình pentose phosphat ở tế bào, khi giảm hoạt độ G-6-PD, NADPH được tạo ra ít hơn nên tái tạo GSH từ GS-SG giảm từ đó ảnh hưởng đến TAS. Tuy nhiên TAS còn giảm trên bệnh nhân HbH, tan máu miễn dịch có thể do nhu cầu các chất chống oxy hóa không có bản chất enzym trên những bệnh nhân này tăng do có sự tăng tình trạng peroxi hóa lipid. Nếu còn khả năng bù trừ thì nồng độ của TAS bình thường hoặc giảm nhẹ, nhưng khi không còn khả năng bù trừ thì nồng độ TAS sẽ giảm so với nhóm chứng. Nồng độ TAS trên bệnh nhân β -thalassemia không khác biệt so với nhóm chứng cũng là nhận xét của tác giả Đặng Thị Tuyết Minh ($1,14 \pm 0,31$ mmol/l so với $1,18 \pm 0,33$ mmol/l) [22].

Sự khác biệt này có thể do một cơ chế chung với tất cả các bệnh nhân thiếu máu tan máu. Đó là việc tăng tỷ lệ hồng cầu lưới gây ra tăng hoạt độ các enzym có mối tương quan đồng biến với nó như PK. Sự giảm nồng độ hemoglobin làm tăng hoạt độ các enzym có mối tương quan nghịch biến với nó như SOD, Gx, G-6-PD hồng cầu. Đồng thời với sự tăng hoạt độ G-6-PD, PK là sự tăng nồng độ 2,3-DPG do chuyển hóa glucose trong hồng cầu tăng, hoặc để đáp ứng nhu cầu cơ thể. Mức độ peroxi hóa lipid màng hồng cầu tăng trên tất cả các nhóm nguyên nhân gây tan máu vì có các điều kiện thuận lợi như quá tải sắt, tăng nồng độ oxy tự do, bất thường có sẵn về hemoglobin, enzym, màng hồng cầu gây tổn thương màng, làm cho hồng cầu trở nên dễ vỡ khi có tác nhân oxy hóa tác động. Hoạt độ các enzym chống oxy hóa SOD, GPx hồng cầu tăng có tác dụng bảo vệ hồng cầu góp phần loại bỏ tác hại của các tác nhân oxy hóa. TAS thường giảm trên các bệnh nhân so

với người bình thường có thể do hệ thống chống oxy hóa phải thường xuyên tăng cường hoạt động trong khi các chất chống oxy hóa không được bổ sung thường xuyên gây thiếu hụt mắc phải.

Thiếu hụt G6PD hồng cầu là bệnh lý enzym được mô tả và nghiên cứu nhiều trên thế giới nhưng ở nước ta đây là những trường hợp ít được công bố. Nghiên cứu cho thấy hoạt độ PK hồng cầu tăng cao nhưng nồng độ 2,3-DPG giảm thấp so với nhóm chứng. Mức độ thiếu hụt G6PD ở mức độ trung bình phù hợp với kết quả nghiên cứu của các tác giả trong nước khác [5].

Lần đầu tiên 2 trường hợp thiếu hụt PK hồng cầu được phát hiện ở nước ta. Kết quả nghiên cứu còn hạn chế, nhưng có cùng quy luật thay đổi chỉ số sinh hóa như bệnh nhân tan máu.

Tóm lại nghiên cứu trên các bệnh nhân thiếu máu tan máu chúng tôi nhận thấy có sự tăng cường hoạt động chuyển hóa glucose và chống oxy hóa trên bệnh nhân này song song với tình trạng tăng mức peroxi hóa lipid.

4.3. BÀN LUẬN VỀ CÁC KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TRÊN MÁU LƯU TRỮ

4.3.1. Về thoái hóa glucose hồng cầu.

Cho dù máu bảo quản dưới các dạng khác nhau như KHC, MTP hồng cầu trong đó phải sống để chờ truyền vào cho người bệnh. Để duy trì chức năng và bảo vệ hồng cầu, các chuyển hóa vẫn diễn ra trong hồng cầu, đặc biệt là thoái hóa glucose, glucose hồng cầu thoái hóa theo cả hai con đường con đường đường phân và con đường pentose phosphat. Để có thông tin về thoái hóa glucose chúng tôi tiến hành xác định nồng độ glucose dịch bảo quản KHC, huyết tương MTP; hoạt độ PK hồng cầu; nồng độ 2,3-DPG máu; nồng độ lactat, pH dịch bảo quản KHC và huyết tương MTP theo thời gian bảo quản và hoạt độ G6PD hồng cầu.

- Nồng độ glucose dịch bảo quản KHC và huyết tương MTP:

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi thu được cho thấy nồng độ glucose dịch bảo quản KHC và huyết tương MTP giảm mạnh theo thời gian bảo quản. Kết quả này chúng tôi thấy rằng hồng cầu lưu trữ tiêu thụ glucose khá mạnh. Mức giảm nồng độ glucose nhiều nhất ở thời điểm nghiên cứu ngày thứ 7 và 14, các thời điểm nghiên

cứu sau mức giảm ít hơn. Điều này có thể nghĩ rằng sau khi đã thích nghi trong điều kiện bảo quản hồng cầu giảm chuyển hóa vì chỉ cần duy trì sự sống chứ không phải hoạt động chức năng.

Nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với kết quả nghiên cứu của Latham J.T. [98] và Trần Thị Liên [19].

- Hoạt độ pyruvat kinase:

Kết quả nghiên cứu cho thấy hoạt độ enzym PK hồng cầu của máu bảo quản giảm mạnh theo thời gian. Ở các mẫu nghiên cứu hoạt độ PK hồng cầu giảm gần như có quy luật giống nhau kể cả KHC và MTP,

Nghiên cứu về hoạt độ PK hồng cầu máu lưu trữ chưa được nghiên cứu ở Việt Nam. Tuy vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Hematol A.J. [82] theo tác giả này thì sự giảm hoạt độ PK hồng cầu trong quá trình bảo quản là do mất phosphat hữu cơ và ông cũng đặt ra những câu hỏi liệu sự giảm hoạt độ PK hồng cầu có đóng vai trò quan trọng trong truyền máu hay không. Chúng tôi cho rằng sự giảm hoạt độ PK hồng cầu trong quá trình bảo quản sẽ dẫn đến thiếu ATP, làm giảm hoạt động của bơm $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ màng hồng cầu. Điều này chắc sẽ dẫn đến thay đổi tính thấm của màng và sẽ thay đổi nồng độ ion trong hồng cầu và ảnh hưởng cấu hình đặc thù của hồng cầu và chắc rằng sẽ ảnh hưởng đến chất lượng máu bảo quản.

So sánh mức giảm hoạt độ PK hồng cầu KHC và MTP ở cùng thời điểm nghiên cứu ngày thứ 7, 14, 21, 28 không có khác biệt nhưng đến ngày nghiên cứu thứ 35 và 42 mức giảm hoạt độ PK hồng cầu KHC nhiều hơn mức giảm hoạt độ PK hồng cầu MTP. Như vậy, có lẽ hồng cầu trong MTP thoái hóa glucose tốt hơn trong KHC.

- Nồng độ 2-3 DPG:

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi về nồng độ 2-3 DPG máu KHC và MTP lưu trữ giảm nhanh theo thời gian bảo quản. Sự giảm đột ngột nồng độ 2-3 DPG máu bảo quản ở ngày thứ 7 có thể là do ở những ngày đầu sau khi hồng cầu tách khỏi người cho máu và được bảo quản sẽ không vận chuyển oxy nữa và những phân tử HbO_2 cũng sẽ phân ly oxy và thu 2-3 DPG, bên cạnh đó chuyển

hóa glucose giảm mạnh vì vậy ít rẽ sang nhánh 2-3 DPG, các phân tử 2-3 DPG lại bị chuyển hóa nhanh.

Sự giảm 2-3 DPG máu lưu trữ có thể do nhu cầu năng lượng của hồng cầu tăng, nhu cầu về 2-3 DPG của hồng cầu không vận chuyển oxy ít, những 2-3 DPG có sẵn không dùng đến sẽ nhanh chóng chuyển thành các sản phẩm chuyển hóa tiếp. Nồng độ 2-3 DPG còn phụ thuộc vào pH môi trường. Trong quá trình bảo quản khối hồng cầu, pH của dịch nuôi giảm dần vì vậy cũng ảnh hưởng đến nồng độ 2-3 DPG. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với một số tác giả trên thế giới như Hess J.R., Hill. H.R. [83], Leonart MS., Nascimento A.J. [99] Các tác giả nghiên cứu nồng độ 2-3 DPG đều bàn luận rằng sự giảm đột ngột 2-3 DPG ở những ngày đầu bảo quản và giảm dần theo thời gian bảo quản máu phản ánh chất lượng máu bảo quản. Mọi tác giả đều cho rằng cần phải dùng những chất cho thêm vào dịch bảo quản để hạn chế sự giảm nồng độ 2-3 DPG để góp phần nâng cao chất lượng máu bảo quản [83, 99].

Nhiều nghiên cứu của các tác giả về nồng độ 2-3 DPG máu bảo quản. Người ta đã kết luận rằng nồng độ 2-3 DPG giảm nhanh trong những ngày 7 bảo quản. Độ pH ảnh hưởng rất lớn đến nồng độ 2-3 DPG. pH giảm sẽ làm giảm nồng độ 2-3 DPG. Người ta đã nghiên cứu các dung dịch bảo quản có độ pH kiềm và cho thêm chất giữ cho 2-3 DPG không bị phân hủy để nâng cao chất lượng máu bảo quản [106].

Trong nghiên cứu của chúng tôi kết quả cho thấy nếu so sánh giữa mức giảm nồng độ 2,3-DPG máu KHC với MTP có sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) ở những thời điểm nghiên cứu ngày thứ 7, 14. ở những ngày đầu bảo quản mức giảm nồng độ 2,3-DPG máu của KHC nhiều hơn mức giảm nồng độ 2,3-DPG của MTP. Như vậy, Có thể thấy chất lượng máu bảo quản dưới dạng MTP tốt hơn KHC ở những ngày đầu bảo quản.

Một nghiên cứu khác dùng chất bảo quản là ADSOL cho thấy: nồng độ 2-3 PDG và ATP giảm mạnh ở những ngày đầu và gần như giảm hết ở ngày 35 [99].

- Nồng độ lactat, pH dịch bảo quản và huyết tương máu:

Kết quả nghiên cứu cho thấy theo thời gian bảo quản nồng độ lactat dịch bảo quản KHC, huyết tương MTP tăng nhanh ngay vào ngày thứ 7 bảo quản. Sự tiêu thụ glucose theo con đường glycolysis đã sản sinh lactat; lactat khuếch tán từ hồng cầu ra dịch bảo quản và huyết tương. Sự tăng lactat dẫn đến pH dịch bảo quản và huyết tương acid dần, điều này ảnh hưởng đến hoạt độ các enzym chuyển hóa và nồng độ 2-3 DPG máu. Sự tăng lactat và giảm pH dịch nuôi là hậu quả của sự chuyển hóa glucose trong thời gian bảo quản: kết quả của chúng tôi phù hợp với tác giả Trần Thị Liên [19, 20] và Latham J.T. [98].

- Về thoái hóa glucose theo con đường pentose phosphat thông qua xác định hoạt độ enzym then chốt G6PD hồng cầu máu bảo quản theo thời gian:

Nghiên cứu hoạt độ enzym G6PD, kết quả cho thấy hoạt độ G6PD hồng cầu giảm dần theo thời gian bảo quản cả ở KHC và MTP. So sánh mức giảm hoạt độ G6PD hồng cầu giữa KHC với MTP không có sự khác biệt ở mọi thời điểm nghiên cứu.

Sự giảm hoạt độ G6PD hồng cầu theo thời gian bảo quản sẽ thiếu NADP làm quá trình tái tạo GSH chậm lại và quá trình chống oxy hóa sẽ bị ảnh hưởng, điều này có thể ảnh hưởng đến tính bền của màng làm tổn thương màng và ảnh hưởng đến chất lượng máu lưu trữ .

Sự giảm hoạt độ G6PD có thể do lượng enzym phân hủy theo thời gian bảo quản hoặc hoạt tính của chúng bị ảnh hưởng, cũng có thể do nồng độ cơ chất giảm ảnh hưởng đến hoạt độ của enzym này. Cho dù vậy, theo thời gian bảo quản hoạt độ G6PD giảm dần và gây ra những hậu quả do thiếu NADPH. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Leonart MS., Nascimento AJ. [99]

Như vậy, về thoái hóa glucose hồng cầu máu bảo quản chúng tôi thấy rằng có sự giảm thoái hóa theo cả hai con đường. Các sản phẩm của thoái hóa glucose như ATP, NADPH đều thiếu và sẽ dẫn đến khả năng bảo vệ hồng cầu kém, hồng cầu dễ bị tổn thương theo thời gian bảo quản.

4.3.2. Về khả năng chống oxy hóa và mức peroxi hóa lipid màng hồng cầu máu bảo quản theo thời gian.

- Hoạt độ SOD hồng cầu máu bảo quản:

Với kết quả thu được chúng tôi thấy hoạt độ enzym SOD hồng cầu giảm rõ rệt trong suốt quá trình bảo quản từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 42 cả ở KHC và MTP.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như các tác giả nước ngoài khi nghiên cứu về máu lưu trữ. Theo Aslan. R và cộng sự, khi nghiên cứu về sự hình thành MDA và hệ thống enzym chống oxy hóa HC máu bảo quản ở 6 túi máu toàn phần được bảo quản bằng dung dịch CPD-A1, kết quả cho thấy hoạt độ enzym SOD giảm dần trong suốt quá trình bảo quản, từ ngày 3 đến ngày 31. Vào ngày thứ 13 của bảo quản hoạt độ SOD giảm khoảng 10% so với ngày đầu bảo quản ($p < 0,01$), đến ngày thứ 15 giảm khoảng 20%. Ở cuối thời kỳ bảo quản (ngày thứ 31) hoạt độ enzym SOD giảm khoảng 30% so với ngày đầu bảo quản ($p < 0,01$) [43].

Một nghiên cứu khác của Jozwik. M và cộng sự về ảnh hưởng của enzym chống oxy hóa lên chất lượng máu bảo quản trên 8 túi máu toàn phần được bảo quản bằng dung dịch CPD-A1 cho thấy hoạt độ enzym SOD giảm trong suốt quá trình bảo quản từ ngày thứ 3 đến ngày 26. Từ ngày thứ 20 của bảo quản hoạt độ enzym SOD giảm trên 10% so với ngày đầu bảo quản ($p < 0,01$) [93].

- Hoạt độ GPx hồng cầu máu bảo quản:

Glutathion peroxidase là enzym chống oxy hóa, chiếm vị trí quan trọng thứ hai trong hệ thống chống oxy hóa của hồng cầu, sau SOD.

Chúng tôi thấy hoạt độ enzym GPx hồng cầu giảm dần theo thời gian bảo quản, từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 42. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả người Thổ Nhĩ Kỳ trên máu toàn phần bảo quản bằng dung dịch CPD-A1 [98]. Hoạt độ enzym GPx hồng cầu giảm dần theo thời gian bảo quản từ ngày thứ 9 đến ngày thứ 31 ($p < 0,05$). Vào ngày thứ 15 của bảo quản hoạt độ GPx hồng cầu giảm 25% so với ngày đầu bảo quản, đến ngày thứ 31 giảm khoảng 37% [98]. Các nghiên cứu của một số tác giả khác về hoạt độ enzym chống oxy hóa HC máu bảo quản cũng cho kết quả tương tự [93, 98, 99].

Glutathion peroxidase (GPx) là enzym chống oxy hóa hoạt động cần thiết sự có mặt của glutathion dạng khử (GSH) trong quá trình loại bỏ gốc peroxid hydro (H_2O_2), lipidperoxid. Trong phản ứng xúc tác của GPx gốc H_2O_2 , lipidperoxid được khử hoạt tính và GSH dạng khử chuyển thành dạng oxy hóa.

Hoạt độ enzym SOD, GPx hồng cầu máu bảo quản giảm dần theo thời có thể là do số lượng các enzym trong hồng cầu giảm trong quá trình bảo quản, hoặc số lượng enzym không giảm mà hoạt tính của chúng giảm. Hoạt tính enzym SOD, GPx hồng cầu giảm trong quá trình bảo quản có thể do hậu quả quá trình tấn công của gốc tự do làm tổn thương protein enzym và gây bất hoạt chúng, cũng có thể do lượng GSH có sẵn trong hồng cầu giảm theo thời gian. Bình thường nồng độ glutathion trong hồng cầu là 0,5 - 10 mol/l, trong đó khoảng 5% là glutathion dạng oxy hóa (GS-SG) [49]. Lượng GSH trong hồng cầu giảm có thể do quá trình chuyển hóa glucose trong HC giảm nên cung cấp thiếu coenzym NADPH dẫn đến quá trình tái tổng hợp glutathion dạng khử từ dạng oxy hóa giảm. Nghiên cứu về máu lưu trữ, Jozwik.M và cộng sự cho thấy nồng độ GSH giảm khoảng 30% vào ngày thứ 13 của bảo quản. Sự giảm nồng độ GSH có liên quan đến sự giảm hoạt độ enzym GR, GPx và chuyển hóa của chu trình pentose.

- Nồng độ MDA dịch huyết tán và dịch bảo quản KHC, huyết tương MTP theo thời gian:

Malonyldialdehyd (MDA) là sản phẩm của quá trình peroxi hóa lipid gây ra bởi quá trình oxy hóa dưới tác dụng của các gốc tự do. Nồng độ MDA dịch bảo quản KHC, huyết tương MTP và dịch huyết tán phản ánh gián tiếp hoạt động của gốc tự do trong máu bảo quản theo thời gian.

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng MDA như một chỉ điểm đối với quá trình peroxi hóa lipid của màng hồng cầu.

Với kết quả thu được chúng tôi thấy nồng độ MDA dịch huyết tán tăng song song với nồng độ MDA dịch bảo quản KHC, huyết tương MTP và tăng rõ rệt theo thời gian bảo quản ($p < 0,001$).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như các tác giả nước ngoài khi nghiên cứu trên máu lưu trữ. Aslan. R và cộng sự đã cho thấy nồng độ MDA tăng

dần theo thời gian bảo quản từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 31 ($p < 0,01$). Vào ngày thứ 7 của bảo quản nồng độ MDA dịch huyết tán tăng 35%, ở cuối thời kỳ bảo quản tăng khoảng 70% so với ngày đầu bảo quản [43].

Hoạt độ enzym chống oxy hóa SOD, GPx hồng cầu giảm theo thời gian bảo quản đã được trình bày ở trên làm cho nồng độ các gốc tự do tăng cao trong nội bào và là nguyên nhân gây ra quá trình peroxi hóa lipid. Quá trình peroxi hóa lipid tăng dẫn đến tăng sản phẩm MDA, do đó hàm lượng MDA trong dịch huyết tán tăng theo thời gian bảo quản, đồng thời sau các chuỗi phản ứng của quá trình peroxi hóa lipid là sự phá hủy hồng cầu, thông qua sự thay đổi cấu trúc và chức năng sinh học của màng và tổn thương hệ thống enzym trong HC dẫn đến sự biến dạng và ly giải HC.

Theo nghiên cứu của nhóm tác giả người Thổ Nhĩ Kỳ trên máu toàn phần bảo quản 31 ngày bằng dung dịch CPD-A1 cho thấy nồng độ MDA dịch bảo quản tăng dần theo thời gian bảo quản từ ngày thứ 5 đến ngày thứ 31. Vào ngày thứ 7 nồng độ MDA tăng khoảng 25%, đến cuối thời kỳ bảo quản nồng độ MDA tăng 119% so với ngày đầu bảo quản [98].

Như vậy quá trình peroxi hóa lipid tăng là hậu quả của sự mất cân bằng giữa hoạt độ các enzym chống oxy hóa và nồng độ gốc tự do. Quá trình peroxi hóa lipid xảy ra ở cả phía trong và phía ngoài của màng HC, qua nồng độ MDA dịch huyết tán, dịch bảo quản, huyết tương tăng và mức độ tổn thương HC ngày một nặng hơn.

4.3.3. Về tổn thương màng hồng cầu thông qua kết quả về nồng độ Hb, sắt, K^+ , Na^+ , Cl^- , canxi và hoạt độ LDH dịch bảo quản-huyết tương máu bảo quản.

Sự tổn thương HC trong máu bảo quản có thể do nhiều nguyên nhân, song nguyên nhân hàng đầu gây tổn thương HC máu bảo quản là do sự hình thành gốc tự do. Gốc tự do trở lên rất độc hại khi nó sinh ra quá trình vượt khả năng bảo vệ của hệ thống enzym chống oxy hóa hồng cầu, gây ra quá trình peroxi hóa lipid. Quá trình peroxi hóa lipid làm xuất hiện các đám phân tử lipidperoxid, đó là những đường thấm nước qua màng, làm thay đổi tính thấm của màng. Các lipidperoxid phản ứng với các nhóm serin (-SH) các enzym gây khóa hoạt động các enzym

chuyển hóa năng lượng màng, làm thay đổi quá trình phosphoryl hóa. Hậu quả bơm Na^+ , K^+ -ATPase, bơm canxi không hoạt động dẫn đến rối loạn hàng định nội môi tích tụ canxi ở bào tương và màng. Khi đó chức năng của màng bị biến đổi theo, ion K^+ chuyển dời từ trong hồng cầu ra ngoài dịch bảo quản và ngược lại ion Na^+ được chuyển dịch từ ngoài dịch bảo quản vào trong hồng cầu, chúng kéo theo nước làm cho thể tích hồng cầu tăng, tiếp đến là sự chuyển dời Ca^{++} và Fe^{++} ra dịch bảo quản [112].

- *Nồng độ Hb dịch bảo quản KHC và huyết tương MTP:*

Hemoglobin là thành phần cấu tạo của hồng cầu, chúng nằm trong hồng cầu và được giải phóng từ sự ly giải của hồng cầu, khi vào trong cơ thể người bệnh Hb được các đại thực bào phân huỷ, qua các giai đoạn chuyển hóa hình thành bilirubin làm cho bilirubin trong máu người bệnh tăng, gây độc hại cho cơ thể người bệnh, cũng có thể bị đào thải qua thận làm giảm chức năng thận người được truyền máu. Máu bảo quản càng lâu thì sự tổn thương hồng cầu càng nhiều.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy nồng độ Hb trong dịch bảo quản KHC và huyết tương MTP tăng dần theo thời gian, ở những thời điểm nghiên cứu đầu từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 7, 14, 21 và 28 của quá trình bảo quản mức tăng nồng độ Hb chậm, điều này cho thấy ở thời gian đầu khi máu vừa tách ra khỏi cơ thể để bảo quản màng hồng cầu chưa tổn thương đến mức phải vỡ nhiều cho nên nồng độ Hb chưa tăng cao. So sánh mức tăng nồng độ Hb của hai dạng máu bảo quản cho thấy mức tăng nồng độ Hb của dịch nuôi KHC nhiều hơn mức tăng nồng độ Hb huyết tương MTP ở những thời điểm nghiên cứu đầu. Điều này chứng tỏ ở những thời điểm bảo quản đầu (từ ngày 1 đến 28 ngày) màng hồng cầu MTP bình ổn hơn màng hồng cầu KHC bảo quản.

Nồng độ Hb dịch bảo quản, huyết tương của máu bảo quản phản ánh trực tiếp mức ly giải hồng cầu trong thời gian bảo quản. Khi màng hồng cầu tổn thương sẽ làm hồng cầu biến dạng và sau đó sẽ bị vỡ. Ở ngày 28 trở đi của thời gian bảo quản nồng độ Hb tự do trong dịch nuôi tăng cao. Tuy vậy nồng độ Hb ở ngày thứ 42 của quá trình bảo quản vẫn còn nằm trong giới hạn cho phép. Kết quả của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Trần Thị Liên (2001) [19], Racek J. [126, 127].

Kết quả về nồng độ sắt dịch bảo quản KHC và huyết tương MTP cho thấy nồng độ sắt tăng dần theo thời gian bảo quản và phù hợp với kết quả về nồng độ Hb trong các dịch. Tuy nhiên nồng độ sắt tăng trong các dịch sẽ là nguyên nhân tăng phản ứng oxi hóa.

- Nồng độ K^+ , Na^+ , Cl^- dịch bảo quản KHC và huyết tương MTP:

Về nồng độ K^+ kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ K^+ dịch bảo quản và huyết tương tăng dần theo thời gian bảo quản máu. Ngay sau 7 ngày bảo quản nồng độ K^+ đã tăng lên khá cao so với thời điểm đầu tiên cả KHC và MTP, sau đó mức K^+ dịch bảo quản tăng dần đến ngày 42 nồng độ K^+ dịch bảo quản tăng trên 10 lần (53,24 mmol/L), nồng độ K^+ huyết tương tăng trên 8 lần (32,00 mmol/L). Sự tăng nồng độ K^+ các dịch chứng tỏ có sự không bình thường của sự vận chuyển ion qua màng hồng cầu máu bảo quản và hồng cầu trong máu bảo quản vỡ giải thoát K^+ ra dịch bảo quản và huyết tương. Sự tăng đột ngột nồng độ K^+ các dịch ngay ở những ngày đầu bảo quản chứng tỏ ngay từ khi được tách khỏi cơ thể để bảo quản màng hồng cầu đã tổn thương làm tăng tính thấm và giải thoát các chất trong hồng cầu ra dịch bảo quản hoặc huyết tương. Điều này khá phù hợp với kết quả về mức tăng nồng độ MDA và nồng độ Hb các dịch đã thu được ở phần bàn luận trên.

So sánh về mức tăng nồng độ K^+ trong dịch nuôi với mức tăng K^+ trong huyết tương cùng thời điểm nghiên cứu cho thấy mức tăng nồng độ K^+ trong dịch nuôi nhiều hơn mức tăng K^+ trong huyết tương, điều này chứng tỏ rằng mức tổn thương màng hồng cầu ở MTP có lẽ ít hơn ở KHC.

Về nồng độ Na^+ theo kết quả thu được chúng tôi thấy theo thời gian bảo quản nồng độ Na^+ dịch bảo quản, huyết tương giảm dần, điều này chứng tỏ rằng Na^+ không được chuyển từ trong hồng cầu ra ngoài dịch bảo quản và huyết tương mà chúng tự khuếch tán từ ngoài vào trong lòng hồng cầu.

Kết quả về nồng độ Cl^- dịch bảo quản và huyết tương cũng tương tự như nồng độ Na^+ , tuy nhiên nồng độ Cl^- các dịch không có ý nghĩa nhiều.

Như vậy, nồng độ điện giải trong hồng cầu sẽ thay đổi theo thời gian bảo quản K^+ đi ra, Na^+ và Cl^- đi vào hồng cầu sẽ kéo theo nước và làm cho hình dạng hồng cầu thay đổi và dễ vỡ trong quá trình bảo quản.

Về hoạt độ LDH các dịch cho thấy hoạt độ LDH dịch bảo quản KHC tăng dần theo thời gian bảo quản, ở ngày đầu hoạt độ LDH dịch bảo quản hầu như không đáng kể, hoạt độ LDH huyết tương ở mức của người bình thường nhưng sau 7 ngày bảo quản hoạt độ LDH tăng mạnh và tăng theo thời gian bảo quản, điều này chứng tỏ LDH trong hồng cầu bị thoát ra dịch nuôi do màng hồng cầu tổn thương hoặc do ly giải hồng cầu, LDH trong hồng cầu giải phóng vào dịch bảo quản hoặc huyết tương.

LDH là một enzym nằm trong hồng cầu, cần thiết cho sự chuyển hóa glucose tạo năng lượng cho tế bào. Bình thường trong huyết tương cũng có LDH với hoạt độ thấp, sự tăng lên của hoạt độ LDH trong dịch nuôi hồng cầu là biểu hiện của sự mất toàn vẹn của hồng cầu.

Theo kết quả nghiên cứu của Latham J.T. [98] hoạt độ LDH huyết tương của máu toàn phần ngày đầu là 296 U/L đến ngày thứ 35 bảo quản, hoạt động LDH tăng lên 1816 U/L. Kết quả của Lê Thị Thanh Huyền cũng cho thấy LDH huyết tương của máu toàn phần cũng tăng nhanh trong thời gian bảo quản [15]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với kết quả của nhiều tác giả trong và ngoài nước.

Mức LDH dịch nuôi trong nghiên cứu này chứng tỏ có sự ly giải hồng cầu và mức độ ly giải tăng theo thời gian bảo quản.

Về nồng độ canxi các dịch của máu bảo quản cho kết quả là theo thời gian bảo quản nồng độ canxi tăng dần, sự tăng canxi có thể do màng hồng cầu tổn thương và tăng tính thấm màng làm canxi thoát ra dịch bảo quản hoặc huyết tương.

Hồng cầu trong dung dịch nuôi dưỡng luôn luôn phải đấu tranh chống lại hai mối nguy hiểm, đó là sự oxy hóa các thành phần cấu tạo của nó và sự giữ nước trong hồng cầu, để đảm bảo được chức năng và duy trì hình dạng của mình. Khi quá trình chống oxy hóa và chuyển hóa glucose trong hồng cầu bị suy giảm thì màng hồng cầu sẽ tổn thương, hình dạng hồng cầu bị thay đổi, khi vào trong cơ thể người bệnh sẽ không đảm nhận được chức năng của mình. Vì vậy sự biến dạng hồng cầu ảnh hưởng rất lớn đến chất lượng, hiệu quả và an toàn trong truyền máu.

- Hình dạng hồng cầu theo thời gian bảo quản dưới kính hiển vi điện tử:

Qua kết quả nghiên cứu hình dạng HC trên kính hiển vi điện tử quét ở các thời điểm lưu trữ cho thấy HC bị biến dạng trong suốt thời gian bảo quản với 4 hình ảnh: HC có hình đĩa lõm hai mặt, hình đa diện, hình gai và hình cầu. Vào thời điểm bắt đầu bảo quản, trên vi trường HC có hình đĩa lõm hai mặt, là hình dạng đặc thù của hồng cầu. Sau 7 đến 14 ngày bảo quản, HC có 3 hình dạng hình đĩa lõm hai mặt, hình đa diện và hình gai trong đó HC có hình dạng bình thường chiếm phần lớn trên vi trường. Đến ngày thứ 28 bảo quản trên vi trường hầu hết là HC hình gai, HC hình đa diện còn rất ít HC có hình dạng bình thường. Ở ngày 35, HC hình gai, hình đa diện chiếm phần lớn trên vi trường và xuất hiện HC hình cầu, HC có hình dạng bình thường chỉ còn lác đác trên vi trường. Đến ngày thứ 42 thì HC bị biến dạng hoàn toàn với 4 hình ảnh HC hình gai, hình đa diện, hình cầu và những mảnh vỡ HC, trong đó HC hình cầu, hình gai chiếm phần lớn vi trường.

Sự biến dạng hồng cầu trong quá trình bảo quản có thể do màng hồng cầu bị tổn thương trong quá trình peroxi hóa lipid, làm tích tụ các đám phân tử polyme sinh học không có hoạt tính, nhưng háo nước, tạo nên các mụn nước trên màng hồng cầu. Bên cạnh đó lipid màng trao đổi với dịch bảo quản làm thất thoát cholesterol ra ngoài và màng trở nên quá linh động tạo thành các gai.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi về hình ảnh hồng cầu cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của tác giả trên thế giới khi nghiên cứu về hình ảnh HC máu lưu trữ. Nghiên cứu sự thay đổi chỉ số tế bào và sinh hóa ở máu toàn phần lưu trữ, Lê Thị Thanh Huyền cho thấy tỷ lệ % HC biến dạng tăng dần theo thời gian bảo quản, ở thời điểm bắt đầu lưu trữ, tỷ lệ % HC biến dạng là $6,8 \pm 1,79\%$ sau 7 ngày bảo quản tỷ lệ này là $27,8 \pm 4,32\%$ ($p < 0,001$), sau 42 ngày lưu trữ tỷ lệ % HC biến dạng là $87,7 \pm 1,92\%$ [15].

Sự biến dạng của hồng cầu tăng dần theo thời gian bảo quản về số lượng cũng như mức độ biến dạng phù hợp với sự giảm hoạt độ của hệ thống enzym chống oxy hóa và sự tăng quá trình peroxi hóa lipid màng cũng như sự tăng mức độ tổn thương HC trong quá trình bảo quản. Những HC biến dạng không còn tính mềm dẻo, khi vào trong cơ thể người bệnh HC không còn khả năng vận chuyển oxy, mặt

khác chúng rất dễ bị ly giải khi đi qua các mao mạch nhỏ. Hồng cầu ly giả sẽ giải phóng Hb, kali, canxi, sắt ... ra ngoài huyết tương, làm cho nồng độ của chúng tăng cao gây nguy hiểm cho người bệnh.

Tóm lại, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy có sự mất cân bằng giữa quá trình oxy hóa và quá trình chống oxy hóa của HC trong thời gian bảo quản. Hoạt độ các enzym chống oxy hóa SOD, GPx HC giảm dần theo thời gian bảo quản, sự giảm hoạt độ các enzym này có mối tương quan chặt chẽ với sự tăng quá trình peroxi hóa lipid. Quá trình peroxi hóa lipid có tương quan thuận khá chặt với sự tăng mức độ tổn thương hồng cầu.

Như vậy KHC và bảo quản càng lâu thì hoạt độ các enzym chống oxy hóa trong HC càng giảm, quá trình peroxi hóa lipid càng lan rộng trên bề mặt màng làm mức độ tổn thương hồng cầu càng nặng và sự biến dạng hồng cầu càng lớn. Từ nghiên cứu của chúng tôi cho thấy giai đoạn 14 ngày có thể xem là giới hạn bảo quản an toàn của khối HC. Có một số tác giả đưa ra giai đoạn bảo quản an toàn là 10, 14, 20 ngày. Thời gian bảo quản sau 14 ngày vẫn còn an toàn song chất lượng hồng cầu không còn đảm bảo và có thể chúng vào trong cơ thể không hoặc ít thực hiện được nhiệm vụ vận chuyển oxy. Chúng tôi thấy rằng cần nghiên cứu tiếp, làm thế nào để hạn chế mức peroxi hóa lipid màng hồng cầu máu lưu trữ, để tăng chất lượng máu bảo quản, góp phần vào công tác an toàn truyền máu. Trong nghiên cứu này còn cho thấy rằng nếu bảo quản trong môi trường huyết tương hồng cầu sẽ bình ổn hơn, như vậy khi nghiên cứu dung dịch bảo quản hồng cầu cần tạo môi trường giống huyết tương và có nhiều chất chống oxy hóa sẽ giúp cho màng hồng cầu bình ổn hơn, và điều này cũng là ý tưởng nghiên cứu tiếp theo của chúng tôi.

KẾT LUẬN

Phần 1: Nghiên cứu các trường hợp tiếp xúc với xăng chì chúng tôi thấy rằng mức độ nhiễm chì không phụ thuộc vào thời gian tiếp xúc. Nồng độ chì máu cao ảnh hưởng đến chức năng tạo máu và khả năng chống oxy hóa của hồng cầu. Kết luận chi tiết được thể hiện qua:

1. 58 công nhân tiếp xúc với xăng chì từ 10-30 năm được xác định nồng độ chì máu kết quả từ 8-121,2 $\mu\text{g}\%$. Có 46% chì máu dưới 20 $\mu\text{g}\%$, 38% nồng độ từ trên 20- dưới 40 $\mu\text{g}\%$ và 16% chì máu trên 40 $\mu\text{g}\%$.
2. Có sự giảm có ý nghĩa ($p<0,001$) SLHC, nồng độ Hb ở các trường hợp chì máu trên 40 $\mu\text{g}\%$.
3. Có sự giảm có ý nghĩa ($p<0,001$) hoạt độ GPx, GR hồng cầu ở các trường hợp chì máu trên 20 $\mu\text{g}\%$.
4. Có tương quan nghịch giữa nồng độ chì máu với SLHC, Hb, hoạt độ GPx và GR hồng cầu với :

$$r = - 0,43; - 0,32; - 0,57; - 0,51; p<0,05$$

Phần 2: Nghiên cứu trên các bệnh nhân thiếu máu tan máu do các nguyên nhân như: thiếu hụt enzym G6PD, PK; bệnh lý Hb; tự miễn...có sự tăng thoái hóa glucose (trừ nhóm thiếu hụt enzym), tăng hoạt độ các enzym chống oxy hóa nhưng mức peroxy hóa lipid tăng. Như vậy, hồng cầu các trường hợp thiếu máu tan máu tuy có tăng chuyển hóa, tăng khả năng chống oxy hóa nhưng mức peroxy hóa tăng chứng tỏ màng hồng cầu bị ảnh hưởng dẫn đến đời sống hồng cầu ngắn và hồng cầu dễ vỡ gây tan máu, điều này được thể hiện ở các kết luận chi tiết sau:

1. Hoạt độ G6PD, PK hồng cầu cao có ý nghĩa ($p<0,001$) ở nhóm thiếu máu do các nguyên nhân trừ thiếu hụt G6PD và PK.
2. Nồng độ 2,3- DPG không khác biệt ở nhóm thiếu máu do các nguyên nhân so với nhóm chứng ($p>0,05$).
3. Hoạt độ SOD, GPx cao ở các trường hợp thiếu máu tan máu so với nhóm chứng $p<0,001$. Nồng độ TAS thấp ở các trường hợp thiếu máu tan máu không có ý nghĩa ($p>0,05$).
4. Nồng độ MDA cao có ý nghĩa ($p>0,05$) ở bệnh nhân thiếu máu tan máu.

Phần 3: về máu bảo quản

1. Có sự giảm thoái hóa glucose của hồng cầu máu bảo quản (KHC, MTP) theo thời gian thể hiện:

+ Hoạt độ G6PD, PK hồng cầu giảm; nồng độ 2,3-DPG giảm theo thời gian bảo quản ($p < 0,001$).

+ Nồng độ glucose giảm; lactat tăng và pH giảm ở dịch bảo quản, huyết tương theo thời gian ($p < 0,001$).

2. Có sự giảm khả năng chống oxy hóa và tăng mức peroxi hóa lipid màng hồng cầu KHC và MTP bảo quản theo thời gian qua:

+ Hoạt độ SOD và GPx hồng cầu giảm mạnh theo thời gian ($p < 0,001$).

+ Mức MDA dịch huyết tán, dịch bảo quản, huyết tương tăng mạnh theo thời gian bảo quản ($p < 0,001$) và tăng ngay từ thời điểm nghiên cứu đầu (sau ngày thứ 7, 14).

3. Màng HC tổn thương tăng dần theo thời gian bảo quản thông qua:

+ Nồng độ Hb dịch bảo quản, huyết tương tăng dần theo thời gian. Tuy nhiên nồng độ Hb tăng mạnh sau ngày thứ 28, 35 và 42.

+ Nồng độ K^+ dịch bảo quản, huyết tương tăng ngay ở ngày thứ 7.

+ Nồng độ sắt, canxi tăng; Na^+ , Cl^- dịch bảo quản, huyết tương giảm; hoạt độ LDH tăng theo thời gian bảo quản.

4. Hình dạng hồng cầu thay đổi theo thời gian bảo quản:

+ Hình dạng hồng cầu qua kính hiển vi điện tử quét cho thấy có sự biến đổi màng ngay từ sau 7 ngày bảo quản, mức độ biến đổi hình dạng hồng cầu tăng theo thời gian bảo quản.

+ Qua kính hiển vi quang học số lượng hồng cầu bình thường giảm dần đến ngày thứ 42 chỉ còn 27,2 %.

5. Qua kết quả nghiên cứu cho thấy máu bảo quản bằng môi trường huyết tương hồng cầu bền vững hơn trong những tuần đầu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Nguyễn Thị Minh An
“Chỉ định truyền máu và chế phẩm máu”, *Tài liệu tập huấn chuyên ngành huyết học - truyền máu 1995*.
2. Nguyễn Quốc Anh
Ô nhiễm chì do khí thải giao thông và mức độ thâm nhiễm chì ở trẻ em Hà Nội. *Luận án thạc sĩ y học*. Hà Nội 1999.
3. Trần Văn Bé
“Tiêu chuẩn kiểm tra chất lượng trong truyền máu” *Huyết học*. Nxb y học TP HCM, 1999, tr: 24 - 81.
4. Trần Đức Bình
Góp phần nghiên cứu nhiễm độc chì. Công trình tốt nghiệp dược sĩ đại học. Hà Nội 1978, tr: 34 - 38.
5. Nguyễn Hữu Chấn
“Một số hiểu biết về glucose 6 phosphat dehydrogenase hồng cầu”, *Một số chuyên đề về hóa sinh học tập 1*, Nxb y học, 1992, tr: 19-22.
6. Nguyễn Hữu Chấn, Hoàng Thị Bích Ngọc, Nguyễn Thị Hà, Nguyễn Nghiễm Luật, Vũ Thị Phương
“Chuyển hóa glucid”, *Hóa sinh*, Nxb y học, 2001, tr: 273-317.
7. Nguyễn Hữu Chấn, Vũ Thị Phương, Hoàng Hạnh Phúc, Đỗ Thị Thu, Phạm Thị Lý
“Mối tương quan của một số enzym then chốt và chất chuyển hóa trung gian 2,3 DPG trong chuyển hóa hồng cầu”, *Đề tài nghiên cứu khoa học*, 2000 tr: 23-51.
8. Trần Hữu Chi, Tạ Thanh Hà, Đàm Anh Thư, Nguyễn Đình Thái
Một phương pháp nhạy để phát hiện thâm nhiễm chì: Đo hoạt độ men ALA dehydratase trong hồng cầu.
Tập san y học lao động Số 1 (16) 1998.

9. Nguyễn Thị Hà
"Phản ứng gốc tự do và chất chống oxy hóa trong sinh y học", *Những chuyên đề hóa sinh học hiện đại*, Nxb y học, 1998, tr: 49-70.
10. Bạch Vọng Hải
"Tương tác của kim loại nặng với một số thành phần hóa sinh hồng cầu và hiện tượng dung huyết". *Y học quân sự*. Số 3, 1990.
11. Lại Văn Hòa
"Nghiên cứu hàm lượng chì và một số kim loại (cadimi, mangan, đồng, kẽm, sắt, can xi, magie) trong máu, trong tóc của công nhân luyện gang và công nhân in".
Luận án phó tiến sĩ khoa học y dược. Hà Nội, 1996.
12. Phan Thị Hồng
"Nghiên cứu hàm lượng chì trong máu và một số chỉ số hóa sinh gan của công nhân xăng dầu trên địa bàn Hà Nội". *Luận án thạc sĩ y học*. Hà Nội, 1998.
13. Dương Thu Hương
"Môi trường lao động tiếp xúc với chì." *Dịch tễ học môi trường và lao động (Một số chuyên đề về phương pháp nghiên cứu)*.
Bộ y tế. 1992, tr: 44 - 49.
14. Hoàng Tích Huyền
"Gốc tự do trong dược lý học và độc chất học". *Một số chuyên đề về hóa sinh học tập 1*, Nxb y học, 1992, tr: 70-82.
15. Lê Thị Thanh Huyền
"Một số thay đổi chỉ số tế bào và sinh hóa máu toàn phần lưu trữ",
Luận tốt nghiệp bác sĩ y khoa, Trường Đại học Y Hà Nội 2000.
16. Nguyễn Công Khanh
"Một số đặc điểm lâm sàng và huyết học bệnh Bêta thalassemia ở người Việt Nam (chủ yếu ở người miền Bắc Việt Nam)", *Luận án phó tiến sĩ y học*, 1985, tr: 52-73.

17. Hà Trung Kỳ
"Tình hình nhiễm chì qua 5 năm điều tra trên các đối tượng tiếp xúc".
Dịch tễ học môi trường lao động. Bộ y tế. 1992, tr: 38 - 43.
18. Nguyễn Đắc Lai
"Bước đầu tìm hiểu sự lưu hành bệnh huyết sắc tố ở một số dân tộc ít người miền Bắc và miền Trung Việt Nam", *Luận văn tốt nghiệp chuyên khoa cấp I*, 1984, tr: 17-37.
19. Trần Thị Liên
"Chuẩn hóa kỹ thuật tách KHC giảm bạch cầu, theo dõi, theo dõi một số chỉ hóa sinh và hóa học trong thời gian bảo quản", *Luận văn thạc sỹ y học*, 2001, tr: 79-83.
20. Trần Thị Liên, Đỗ Trung Phấn, Thái Quý, Nguyễn Chí Tuyển, Phạm Tuấn Dương và cộng sự
"Thay đổi một số chỉ số hóa sinh và huyết học của KHC bảo quản bằng dung dịch SAGM" 1997.
21. Phạm Thị Lý
"Nghiên cứu so sánh hoạt độ G-6-PD hồng cầu người, thỏ, chuột", *Luận án tiến sỹ y học*, 1999, tr: 48-60.
22. Đặng Thị Tuyết Minh
"Nghiên cứu hoạt độ một số enzym chống oxy hóa của hồng cầu và khả năng chống oxy hóa toàn phần ở bệnh nhân HbE/ β thalassemia", *Luận văn thạc sỹ y học*, 2001, tr: 42-54.
23. Đỗ Trung Phấn
"Cung cấp và an toàn truyền máu: hai nhiệm vụ khẩn cấp hiện nay", *Y học Việt Nam*, 190(9), 1995, tr: 2-6.
24. Đỗ Trung Phấn
An toàn truyền máu.
Nhà xuất bản Y học – Hà Nội, 1999, tr: 185-221.
25. Hoàng Hạnh Phúc
"Một số biến đổi hóa sinh trong bệnh Thalassemia và HbE", *Luận án tiến sỹ y học*, 1999, tr: 40-64.

26. Vũ Thị Phương
"Nghiên cứu mối tương quan giữa các enzym chuyển hóa glucose của hồng cầu với chất chuyển hóa 2,3-Diphosphoglycerat của máu người, thỏ và chuột", *Tạp chí y học thực hành* 3(417), 2002, tr: 34-36.
27. Nguyễn Trường Sơn, Đỗ Trung Phấn, Phạm Mạnh Hùng
"Những biến đổi về số lượng tiểu cầu, số lượng bạch cầu, pH và nồng độ glucose khi bảo quản khối tiểu cầu trong thời gian 4 ngày", *Y học Việt Nam*, 231(1), 1999, tr: 22-25.
28. Nguyễn Xuân Thắng
"Những nét cơ bản sinh học màng tế bào", *Màng tế bào và tác dụng của thuốc*, Nxb y học, 2002, tr: 13 - 22.
29. Nguyễn Xuân Thuỷ
"Nghiên cứu khả năng thải chì của Ethambutol trên người tiếp xúc và nhiễm chì". *Tập san y học lao động - vệ sinh môi trường*.
Số 4, 1992. tr: 39-41.
30. Đàm Anh Thư, Lê Trung, Hà Huy Kỳ và cộng sự
"Tình hình nhiễm độc chì hữu cơ ở công nhân xăng dầu trong cả nước". *Tập san y học lao động*. Số 2.1989, tr: 14-27.
31. Đàm Anh Thư, Lê Trung, Hà Huy Kỳ và cộng sự
"Tình hình nhiễm độc chì hữu cơ ở một số kho xăng dầu các tỉnh phía bắc". *Tập san y học lao động*. Số 1.1988, tr: 208-221
32. Lê Đức Trình
"Vai trò của các gốc tự do trong sinh học và bệnh lý", *Một số chuyên đề hóa sinh học tập I*, 1992, tr: 59-69.
33. Lê Trung
"Bệnh nhiễm độc chì vô cơ - 21 bệnh nghề nghiệp được bảo hiểm". *Viện y học lao động và vệ sinh môi trường*. 1997, tr: 320-348.
34. Dương Bá Trục
"Đặc điểm lâm sàng và huyết học bệnh HbH ở trẻ em Việt Nam, bước đầu tìm hiểu tần xuất anpha thalassemia ở Hà nội", *Luận án phó tiến sĩ khoa học y dược*, 1996, tr: 60-72.

35. Bạch Quốc Tuyên
“ Bệnh huyết cầu tố di truyền”, *Bài giảng Huyết học- Truyền máu*, 1991, tr: 30-50.
36. Nguyễn Chí Tuyển
“Kỹ thuật ly tâm tách các thành phần máu”, *Tài liệu tập huấn chuyên ngành Huyết học - Truyền máu*, 1995.
37. Nguyễn Chí Tuyển
“Các dung dịch chống đông nuôi dưỡng máu và các phương pháp bảo quản máu”, *Tài liệu tập huấn chuyên ngành huyết học - truyền máu*, 1995.

Tiếng Anh

38. "Specimen preparation methods for scanning electron microscopes", Joel, 1993
39. AABB
"Standards for Blood Banks and Transfusion services", 17th Edition, 1996, pp: 12-13.
40. Anttila A, Heikkila P, Nykiry E, Kauppinen T, Pukkala E, Hernberg S, Hemminki K.
"Risk of nervous system cancer among workers exposed to lead". *J. Occup. Environ. Med.* Feb; 38 (2), 1996, pp: 131- 136.
41. Anttila A, Heikkila P, Pukkala E, Nykyri E, Kauppinen T, Hernberg S, Hemminki K.
"Excess lung cancer among workers exposed to lead". *Scand. J. Work Environ. Health.* Dec; 21 (6), 1995, pp: 460 - 469.
42. Ariza M E, Bijur G N, Williams M V,
"Lead and mercury mutagenesis: role of H₂O₂, superoxide dismutase, and xanthine oxidase".
Environ. Mol. Mutagen; 31 (4), 1998, pp: 352 - 361.
43. Aslan R, Sekeroglu MR, Tarakcioglu M, Koylu H.
" Investigation of malonyldialdehyd fomatation and antioxidant enzyme activity in stored blood", *Hematology*, 28, 1997, pp: 233-237.

44. Baronciani L.
"Study of the molecular defects in pyruvate kinase deficient patients affected by nonspherocytic hemolytic anemia", *Blood cell molecules and diseases*, 21(6) Mar, 1995, pp: 49-55.
45. Baronciani L., Beutler E.
"Analysis of pyruvate kinase deficiency mutations that produce nonspherocytic hemolytic anemia", *Medical sciences*, 90, May, 1993, pp: 4324-4327.
46. Bergdahl I A, Vahter M, Schutz A, Artamonova V G, Skerfving S,
"Plasma and blood lead in humans: capacity-limited binding to delta - aminolevulinic acid dehydratase and other lead-binding components". *Toxicol. Sci.* Dec. 46 (2), 1998, pp: 247 - 253.
47. Bergdahl I A, Vahter M, Counter S A, Schutz A, Buchanan L H, Ortega F, Laurell G, Skerfving S,
"Lead in plasma and whole blood from lead-exposed children". *Environ. Res.* 80 (1), 1999, pp: 25 - 33.
48. Beutler E.
"Red cell metabolism", *Principles of Transfusion medicine*, Baltimore, USA, 1996 , pp: 51-58.
49. Beutler E.
"Composition of the erythrocyte", *William Hematology*, fifth edition, 1995, pp: 364-367.
50. Beutler E.
"Energy metabolism and maintenance of erythrocytes", *Hematology*, fourth edition, Mc Graw-Hill, Inc, 1995, pp: 355-365.
51. Beutler E.
"Glucose 6 phosphat dehydrogenase deficiency and other enzym abnormaliites", *William Hematology*, fifth edition, 1995, pp: 564-576.
52. Beutler E., Forman L.
"Elevated pyruvate kinase activity in patients with hemolytic anemia due to red cell pyruvate kinase deficiency", *The American journal of medecine*, 83, 1987, pp: 899-904.

53. Beutler E., Gelbart.T.
"Estimating the prevalence of pyruvate kinase deficiency from the gen frequency in the general white population", *Blood*, Jun 1, 95(11), 2000, pp: 3585-3588.
54. Beutler E.
"Liquid preservation of Red cells", *Principles of Transfusion medicine*, Baltimore, USA, 1996, pp: 51-58.
55. Cao G, Russell R M, Lischner N, Prior R L.
" Serum antioxidant capacity is increased by consumption on strawberrieres, spinach, red wine or vitamin C in elderly women", *J, Nutr*, 128 (120), 1998, pp 2383-2390.
56. Cappadoro M., Giriliana G., O'Brien E., Turrini F., et al.
"Early phagocytosis of G-6-PD (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by Plasmodium falciparum may explain malaria protection in G6PD deficiency", *Blood*, vol 92, No 7, 1998, pp: 2527-2534.
57. Capriazi P., Bozzi A., Ferroni L. et al.
"Membrane alterations in G-6-PD and PK deficiency erythrocytes exposed to oxidizing agents", *Biochemical medecine and metabolic biology*, 45, 1991, pp: 16-27.
58. Chakraborty D., Bhattacharya M.
"Antioxidant defense status of red blood cell of patients with β -thalassemia and E β -thalassemia", *Clinical Chimica Acta*, 305, 2001, pp: 123-129.
59. Chamfly V. Vo Mai M.P., Douay L. Cosson A.
"Generalization of Blood product leucodepletion in France", *Vox Sanguinis*, 74(S1), 1998, pp: 1285.
60. Chaves M., Viven Corron JL., Saenz GF., Pujades MA.
"Chronic non-spherocytic hemolytic anemia caused by pyruvate kinase deficiency in a Costa Rica family carring hemoglobin C disease", *Sangre-Barc*, Apr,35 (2), 1990, pp: 128-133.

61. Cheeseman K.H, Slater T.F.
"An introduction to free radical biochemistry", *Free radicals in medecine*, British Medical Bulletin, 49 (3), 1993, pp: 481-493.
62. Chernitskii EA, Fedorovich IE, Slovozhanina EI.
"Vesiculation and change of erythrocyte membrane proteins in storage of preserved blood and erythrocyte mass at 4 degrees C", *Hematol transfusion*, 38(8), 1993, pp: 18-21.
63. Chi Shun Feng, Sophia S. Tsang, Ying Tat Mak.
"Prevalence of pyruvate kinase deficiency among the Chinesse: Determination by the quantitative assay", *Amer J, Hematol* 43, 1993, pp: 271-273.
64. Chiba M, Shinohara A, Matsushita K, Watanabe H, Inaba Y.
"Indices of lead-exposure in blood and urine of lead-exposed workers and concentrations of major and trace elements and activities of SOD, GPx and catalase in their blood". *Tohoku. J. Exp. Med.* Jan. 178 (1), 1996, pp: 49 - 62.
65. Cles.F.Hogman.
"Liquid - Stored Red Blood cells for Transfusion". *Vos Sanguinis* 76 (2), 1999, pp: 67 - 77.
66. Council of Eroppe Puplishiny.
"Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. Workshop of the council of Europe, Germany", 2001, pp: 95 - 130.
67. Dawson E B, Evans D R, Harris W A, Teter M C, McGanity W J.
"The effect of ascorbic acid supplementation on the blood lead levels of smokers". *J. Am. Coll. Nutr.* Apr. 18 (2), 1999, pp: 166 -170.
68. Donald E. Paglia.
"Enzymopathies", *Hematology basic principles and pratice*, Churchill livingstone, 1991, pp: 504-512.
69. Douset A., Pittet V., Michanel M.
"Use of leucoflex LCR5 and plasmaflex PLSA4 intergrated into one collection system", *Tranfusion clinique Et Biologique*, Vol 8(S1), 2001, pp. 219-220.

70. Ennio C., Rossio, Toby L. Simon, Gerald S. Moss, Steven A. Gould.
"Transfusion into the next millenium", *Principles of Transfusion medicine*, Baltimore, USA, 1996, pp: 1-10.
71. Feny.C.S., Sophia S.T., Mak Y.T.
"Prevalence of PK deficiency among the Chinese : Determination by the quantitative assay". *American Journal of Hematology* 43, 1993, pp 271 - 273.
72. Fujii S., Kaneko T.
"Selenium, glutathione peroxydase and oxydative hemolysis in sickle cell disease", *Acta Hematol*, 87, 1994, pp: 105-106.
73. Garel M.C., Arous N., Calvin M.C. et al.
"Arecombinant bisphospho glycerat mutase variant with acid phosphatase honvology degrades 2,3-DPG", *Proceeeding of the National Academy of Sciences of USA*, 91, 1994, pp: 3593-3597.
74. Glavind J, Hartman S, Clemmenson J, et al,
"Studies on the role of liporeroxides in human pathology" *Acta Pathol. Microbiol. Scand*, 30, 1992, pp: 1-6.
75. Gert R., Anjo J.P. Veerman, Gerda P.M. et al.
"Diagnostis of pyruvate kinase deficiency in a tranfusion dependent patient with severe hemolytic anemia", *American journal of Hematology* 35, 1990, pp: 187-193.
76. Goodman A K, Shultz H, Klitzman S, Kimmelblatt M, Spadaro W.
"Preventing lead poisoning in New York City: priorities for lead abatement in housing". *Bull N Y Acad. Med.* Winter. 71 (3), 1993, pp: 236 - 250.
77. Gottlieb K, Koehler J R.
"Blood lead levels in children from lower socioeconomic communities in Denver, Colorado". *Arch. Environ Health.* Jun-Aug. 49 (4), 1994, pp: 260 – 266.

78. Grabowska M, Guminska M.
"The effect of lead on lactate formation, ATP levels and membrane ATPase activities in human erythrocytes in vitro". *Int. J. Occup. Met. Environ. Health.* 9 (3), 1996, pp: 265 - 274.
79. Hasan J, Vihko V, Hernberg S.
"Deficient red cell membrane Na⁺K⁺-ATPase in lead poisoning". *Arch. Environ. Health.* Feb. 14 (2), 1967, pp: 313-318.
80. Hazmi M.A., Warsy A.S. et al.
"Correlation between red cell pyruvate kinase activity and haematological parameters", *Med-Lab-Sci*, Apr, 47(2), 1990, pp: 80-84.
81. Helen M.Raney., Sharma.V.
"Structure and function of hemoglobin", *Hematology*, fourth edition, Mc Graw-Hill, Inc, 1995, pp: 377-387.
82. Hematol A.J.
"Red cell enzyme activity during blood storage and reactivation of phosphofructokinase", 13(1), 1982, pp: 1-8.
83. Hess I.R., Hill H.R., Oliver C.K., Lippert L.E., Greenwalt T.J.
"Alkaline CPD and the preservation of RBC 2,3-DPG", *Blood research detachment Walter Reed Army Institute of Research*, Silver Spring, MD 20307, *Transfusion*, 42(6), 2002, pp: 747-752.
84. Hoffbrand A.V., Pettit J.E.
"Erythropoiesis and general aspects of anemia", *Essential haematology*, Blackwell scientific publication, third edition, 1993, pp: 12-35.
85. Hu H.
"Bone lead as a new biologic marker of lead dose: recent findings and implications for public health". *Environ. Health. Perspect.* Aug. 106 (4), 1998, pp: 961-967.
86. Hu H, Hashimoto D, Besser M.
"Levels of lead in blood and bone of women giving birth in a Boston hospital". *Arch. Environ. Health.* Jan-Feb. 51 (1), 1996, pp: 52 -58.

87. Hu H, Rabinowitz M, Smith D.
"Bone lead as a biological marker in epidemiologic studies of chronic toxicity". *Environ. Health Perspect.* Jan. 106 (1), 1998, pp: 1- 8.
88. Hu H, Watanabe H, Payton M, Korrick S, Rotnizky A.
"The relationship between bone lead and hemoglobin". *JAMA.* Nov. 16. 272 (19), 1994.
89. Hunaiti A A, Soud M.
" Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione-S-transferase, reductase and peroxidase in human blood". *Sci. Total Environ.* Mar 29. 248 (1), 2000, pp: 45 - 50.
90. Ingvar A, Bergdahl et al.
"Plasma and blood lead in humans capacity-limited binding to 5-Aminolevulinic acid dehydratase and other lead-binding components". *Toxicological sciences.* 46, 1998, pp: 247-253.
91. James H. Jandl.
"Metabolic disorders of red cell", *Hemolytic anemia, Blood, Pathophysiology*, 1991, pp: 174-180.
92. Johnson M.L., Jones D.P., Freeman J.M., Wang W.
"Biochemical and molecular characterization of variant pyruvate kinase enzymes and genes from three patients with red blood cell pyruvate kinase deficiency", *Acta Haematol*, 86, 1992, pp: 79-85.
93. Jozwik M., Gajewska J., Szczypka M. et al.
"Antioxidant defence of red blood cells and plasma in stored human blood", *Clin Chim Acta*, 267(2), 1997, pp: 129-142.
94. Kanno H., Ballas S.K., Miwas S. et al.
"Molecular abnormality of erythrocyte pyruvate kinase deficiency in the Amish", *Blood* 83, 1994, pp: 2311-2316.
95. Kumerova A, Lece A, Skesters A, Silova A, Petuhovs V.
"Anaemia and antioxidant defence of the red blood cells". *Mater-Med-Pol.* Jan-Jun. 30 (1-2), 1998, pp: 12-15.
96. Kuptamethi S., Tantiniti P., Wanachiwanawin W. et al.
"Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase and pyruvate kinase activities in hemoglobin H disease", *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 23 (1), 1992, pp: 64-70.

97. Lakomex M., Neubauer B., Andreas von Luhe., Hoch G. et al.
"Erythrocyte pyruvate kinase deficiency: Relations of residual enzyme activity, altered regulation of defective enzymes and concentrations of high energy phosphates with the severity of clinical manifestation", *Eur.J.Haematol*, 49, 1992, pp: 82-92.
98. Latham J.T., Bore J.R.
"Chemical and hematology changes in stored CPD-A1 blood", *Transfusion 1st* edition, (22), 1992, pp: 158-159.
99. Leonart M.S., Nascimento A.J., Nonoyama K., Pelissari C.B., Barretto O.C. "Enzymes and membrane proteins of ADSOL-preserved red blood cells", *Sao. Paulo. Med. J.*, Divisao de saude, Universidade Federal do parana, curitiba, Brazil, 118(2), 2002, pp: 41-45.
100. Lestas A.N., Kay.L.A., Bellinghan A.J.
"Red cell 3-phospho glycerate level as a diagnostic aid in pyruvate kinase deficiency", *Journal of haematol* 67, 1987, pp: 485-488.
101. Luzzatto L., Mehta A.
"Glucose 6 phosphat dehydrogenase deficiency", *The metabolic basis of inherited disease,II*, sixth edition, Mc Graw-Hill Inc, 1989, pp: 2237-2254.
102. Machartova V, Racek J, Kohout J, Holecek V, Krejcova I, Senft V.
"Indicators of effects of free radicals in workers at risk of lead exposure". *Vnitr. Lek.* Feb. 44 (2), 1998, pp: 83-85.
103. Makino S, Shimizu Y, Takata T.
"A study on the relationship between blood lead levels and anemia indicators in workers exposed to low levels of lead". *Ind. Health.* Oct. 35 (4), 1997, pp: 537- 541.
104. Martinov M.V., Plotnikov A.G. et al.
"Deficiency of glycolytic enzymes as a possible cause of hemolytic anemia", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1474, 2000, pp: 75-87.
105. Mary F. Mc Mulin.
"The molecular basis of disorders of red cell enzymes", *J-Clin-Pathol* 52, 1999, pp: 241-244.

106. Mather G., Strunk S., Scienas W. et al.
 "Postransfusional changes of 2, 3 diphosphoglycerate and nucleotides in CPD-SAGM - Preserved erythrocytes". *Infusion therapie* 20, 1993, pp: 89-90
107. Melha A.M. Abu, Ahmed M.A.M, Macaulay.H.Knox et al.
 "Erythrocyte pyruvate kinase deficiency in newborns of Eastern Saudi Arabia", *Acta Haematol* 85, 1991, pp: 192-194.
108. Menhel M.Al-Naaman, Lamia M. Al Naaman, Taghredd A.Al.Sadoon .
 "Glucose 6 phosphat dehydrogenase, hexokinase and pyruvate kinase activities in erythrocytes of neonates and adults in Basrah", *Annals of tropical Paediatrics*, 14, 1994, pp: 195-200.
109. Meral A., Tuncel P., Surmen-Gun. E et al.
 "Lipid peroxidation and antioxidant status in β -Thalassemia", *Pediatric Hematology and Oncology*, 17, 2000, pp: 687-693.
110. Miwa S., Fujii H.
 "Pyruvate kinase deficiency", *Clin-Biochem-Apr* 23(2), 1990, pp: 155-157.
111. Moriyama R., Lombardo C.R., Workman R.F., et al.
 "Regulation of linkages between the erythrocyte membrane and its skeleton by 2,3 diphosphoglycerate". *Journal of Biological Chemistry* 260, 1993, pp: 10990 - 10996.
112. Nancy A. Noble Kouichi R. Tanaka, Byron A. Myhre and Delores E. Johnson.
 "Red cell enzyme activity during blood storage and reactivation of phosphofructokinase", *Harbor-UCLA Medical center, UCLA school of medicine, Torrance California*. 1982.
113. Osman K, Schuts A, Akesson B, Maciag A, Vahter M.
 "Interactions between essential and toxic elements in lead exposed children in Katowice Poland". *Clin. Biochem.* Nov. 31 (8), 1998, pp: 657- 665.

114. Osterode W, Ulberth F.
"Increased concentration of arachidonic acid in erythrocyte membranes in chronically lead-exposed men". *J Toxicol. Environ. Health.* Jan 28. 59 (2) , 2000, pp: 87-95.
115. Osterode W, Barnas U, Geissler K.
"Dose dependent reduction of erythroid progenitor cells and inappropriate erythropoietin response in exposure to lead : new aspects of anaemia induced by lead". *Occup. Environ. Med.* Feb. 56 (2), 1990, pp: 106-109.
116. Ouwerkerk P., Damen P., Hannetal K.
"Hexose monophosphate shunt activity in erythrocytes related to cell age", *Eur-J - Haematol* 43, 1989, pp: 441-447.
117. Ouwerkerk R., Van Echteld CJA, Staal O.E.J et al.
"Intracellular free magnesium and phosphorylated metabolites in hexokinase and pyruvate kinase deficient red cells measured using ³¹P NMR spectroscopy". *Biochimica et biophysica acta* 1010, 1989, pp: 294 - 303.
118. Palma A., Dietrapertosa A., Campanale D.V
"Genotype and phenotype correlation in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency", *Haematologica*-Jan 86(1), 2001, pp: 30-35.
119. Pamela C.C., Richard AH.
"Hexose monophosphate pathway", *Lippincott's illustrated reviews: Biochemistry*, JB Lippincott company 2 nd edition, 1994, pp: 111-117.
120. Patra R C, Swarup D.
"Effect of lead on erythrocytic antioxidant defence, lipid peroxide level and thiol groups in calves". *Res. Vet. Sci.* Feb. 68 (1), 2000, pp: 71-74.
121. Perry G.M., Andersin B.B.
"Utilisation of red cell FAD by methaemoglobin reductases at the expense of glutathione reductases in heterozygous β thalassemia", *Eur J Haematol* 46, 1991, pp: 290-295.

122. Petmit S., Wilaira P., Kownko.J. et al.
 "Molecular basic of thalassemia/HbE disease in Thailand. Biochemical and biophysical research communications", 162 (2), 1989, pp 846 – 851.
123. Pinkerton L E, Biagini R E, Ward E M, Hull R D, Deddens J A, et al.
 "Immunologic findings among lead-exposed workers".
Am. J. Ind.Med. Apr. 33 (40): 1998, pp: 400-408.
124. Poggi V.,Town. M.
 " Identification of a single base change in a new human mutant G-6-PD gene by PCR amplication of the entine coding region from genomic DNA", *Biochem J* –Oct 271(1), 1990, pp: 157-160.
125. Potula V, Serrano J, Sparrow D, Hu H.
 "Relationship of lead in drinking water to bone lead levels twenty years later in Boston men": *J. Occup. Environ. Med.* 41 (5), 1999, pp: 349-355.
126. Racek J, Herynkova R, Holecek V et al.
 "What id the sourse of free radicals causing hemolysis in stored blood", *Physiol Res*, 50, 2001, pp: 383-388.
127. Racek J, Herynkova R, Holecek V, Jerabek Z, Slama V.
 "Influence of antioxidant on the quality of stored blood", *Vox Sang*, 72(1), 1997, pp: 16-19.
128. Ratkajec T.
 "Lead in the blood and protoporphyrin levels in erythrocytes in glass workers exposed to lead". *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* Dec. 48 (4), 1997,
 pp: 383-389.
129. Restek-Samarzija N , Momcilovic B, Turk R, Samarzija M.
 "Contribution of lead poisoning to renal impairment". *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* Dec. 48 (4), 1997, pp: 355-364.
130. Saad. STO, Salles.SI, Velho.PE.
 "Decreased reduced glutathione and glutathione reductase activity in subjects with hemoglobin C", *Nouv Rev Fr Hematol* 33, 1991,
 pp: 11-14.

131. Said El., Sherbin El.
"Biochemical changes on storage of blood, Increase in oxygen affinity and decrease in level of some organic phosphate of blood", *Cinical Chemistry*, 4, 1992, pp: 379-384 (F).
132. Sibbison L B.
"Lead in soil". *The lanset* Vol. 339. Aprill. 11. 1992, pp: 921-922.
133. Siggaard Andersen O., Andersen N.F., Gothgen I.H. et al.
"Oxygen status of arterial and mixed venous blood", *Critical care med*, 1995, pp: 1284-1293 (F).
134. Simon J A, Hudes E S.
" Relationship of ascorbic acid to blood lead levels". *JAMA*. Jun 23-30. 281 (24), 1999, pp: 2289-2293.
135. Stohs S, Bagchi D.
"Oxidative machanisms in the toxicity of metal ions". *Free Radical Biol. Med*. 18, 1995, pp: 321-336.
136. Sugawara E, Nakamura K, Miyake T, Fukumura A, Seki Y.
"Lipid peroxidation and concentration of glutathione in erythrocytes from workers exposed to lead". *Br. J. Ind. Med* . Apr. 48 (4), 1991, pp: 239-242.
137. Suthutvoravut U., Hathirat P., Sirichakwal.P. et al.
"Vitamine E status, glutathione peroxidase activity and the effect of vitamine E supplementation in children with thalassemia", *Journal of the medical association of Thailand*, 76(2), 1993, pp: 146-152.
138. Sweeney J.
"Quality accurance and standars for red cells and platelets". *Vox Somguinis*, 74 (82), 1998, pp: 201 - 205.
139. Symanski E, Hertz-Picciotto I.
"Blood lead levels in relation to menopause, smoking, and pregnancy history". *J. Am. Epidemiol*. Jun 1. 141 (11), 1995, pp: 1047-1058.
140. Tani K., Tsutsumi H., Takanashi K. et al.
"Two homozygous cases of erythrocyte pyruvate kinase (PK) deficiency in Japan: PK Sendai and PK Shinshu", *American Journal of Hematology*, 28, 1988, pp: 186-190.

141. Tegos C., Anagnostoulis G.
"Biochemical characterization of four new erythrocyte pyruvate kinase variants", *Acta Haematol*, 92, 1994, pp: 91-96.
142. Truter E.J., Murray P.W.
"Morphological classification by scanning electron microscopy of erythrocytes stored at 4° C in citrate-phosphate -dextrose anticoagulant", *Me. Lab. Sci*, (47), 1990, pp: 113-119.
143. Umaporn S., Hathirat P., Sirichakwal P.
"Vitamin E status, glutathione peroxidase activity and the effect of vitamin E supplementation in children with thalassemia", *Journal of the medical association of Thailand*, 76 (2), 1993, pp: 146-152.
144. Usanga EA., Ameen R.
"Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Kuwait, Syria, Egypt, Iran, Jordan and Lebanon", *Human Heredity*, 50, 2000, pp: 158-161.
145. Weitzman M, Aschengrau A, Bellinger D, Joners R, Hamlin J S, Beiser A "Lead- contaminated soil abatement and urban children's blood lead levels". *JAMA*. Apr 7. 269 (13), 1993, pp: 1647-1654.
146. WHO
"Inorganic lead". *Environmental Health Criteria* 165, 1995.
147. William N.Valentine, Kowichi R. Tanaka.
"PK and other enzym deficiency disorders of the erythrocyte", *The metabolic basic of inherited disease*,II, sixth edition, Mc Graw-Hill Inc, 1989, pp: 2341-2357.
148. Winrow V.R, Winyard P.G, Morris C.J, Blake D.R.
" Free radicals in inflammation, pp: second messengers and mediators of tissue destruction", *Free radicals in medecine*, British Medical Bulletin, 49 (3), 1993, pp: 506-522.
149. Wintrobe M.M., Richard Lee. G, Dane R. Boggs.
"Glucose-6- phosphate dehydrogenase deficiency and related deficiencies involving the pentose phosphate pathway and glutathione metabolism", *Clinical hematology*, seventh sdition, Lea Febiger Philadelphia, 1986, pp: 779-791.

150. Wintrobe M.M., Richard Lee. G, Dane R. Boggs.
"Hereditary hemolytic anemias associated mainly with abnormalities in the glycolytic metabolic pathway of erythrocytes", *Clinical hematology*, seventh edition, Lea Febiger Philadelphia, 1986, pp: 769-778.
151. Wintrobe M.M., Richard Lee. G, Dane R. Boggs.
"The hemoglobinopathies: structural abnormalities in globin general principles. Unstable hemoglobin disease", *Clinical hematology*, seventh edition , Lea Febiger Philadelphia, 1986, pp: 794-847.
152. Ye X B, Fu H, Zhu J L, Ni W M, Lu Y M, et al.
"A study on oxidative stress in lead- exposed workers". *J. Toxicol. Environ Heath.* Jun11. 57 (3), 1999, pp: 161-172.
153. Yetgin S., Hincal F., Basaran N. et al.
"Serum selenium status in children with iron deficiency anemia", *Acta Haematol*, 88, 1992, pp: 185-188.
154. Zanella A., Bianchi P.
"Red cell pyruvate kinase deficiency: from genetics to clinical manifestations", *Hematol-Mar* 13(1), 2000, pp: 57-81.
155. Zanella A., Colombo M.B., Miniero R. et a.
"Erythrocyte pyruvate kinase deficiency: 11 new cases", *British Journal of Haematology*, 69, 1988, pp: 399-404.
156. Zarza R. , Moscardo M., Alvarez R., Garcia J. et al.
"Co-existence of hereditart spherocytosis and a new red cell pyruvate kinase variant:PK Malorca", *Haematologyca* Mar 85(3),2000, pp: 227-232.