

УДК 612.111

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ СТАРЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ДОНОРСКОЙ КРОВИ

Н. В. АКУЛИЧ

биолог, Национальная антидопинговая лаборатория (Беларусь)

Е. А. ТАРАСОВА

студент, Могилевский государственный университет имени А. А. Кулешова

А. В. СОРОКА

кандидат биологических наук, доцент,

Могилевский государственный университет имени А. А. Кулешова

В. Э. СЯХОВИЧ

начальник отдела, Национальная антидопинговая лаборатория (Беларусь)

С. А. БЕЛЯЕВ

директор Национальной антидопинговой лаборатории (Беларусь)

В статье изучены изменения, происходящие при хранении крови. С использованием световой микроскопии и проточной цитометрии дается характеристика изменений на протяжении 6 недель хранения крови. Исследованы опико-морфологические признаки старения эритроцитов.

Ключевые слова: эритроцит, световая микроскопия, мембрана, проточная цитометрия.

Введение

В Республике Беларусь проводятся высокотехнологичные оперативные вмешательства, которые требуют адекватной гематологической поддержки. Срок хранения донорской крови и ее компонентов определяется периодом времени, в течение которого кровь (компоненты крови) сохраняет биологическую полноценность, лечебную эффективность и пригодна для использования по назначению [1; 2]. Эритроцитарную массу для проведения гемотрансфузий в настоящее время консервируют во взвешивающих растворах (ADSOL, SAGM и др.), которые позволяют сохранять ее в течение 35–42 дней [1; 2; 3; 4].

Несмотря на принимаемые меры (снижение температуры, давление консервантов и т. д.) в крови происходят необратимые процессы, снижающие физиологическую полноценность эритроцитов; в первую очередь страдает их кислородно-транспортная функция. Спонтанный гемолиз эритроцитов начинается с третьей недели хранения [2; 4]. Поэтому кровь, заготовленную с помощью гемоконсервантов, рекомендуется использовать в течение 3 недель; в некоторых случаях (использование полимерных контейнеров) – до 42 дней хранения [2].

© Акулич Н. В., 2017

© Тарасова Е. А., 2017

© Сорока А. В., 2017

© Сяхович В. Э., 2017

© Беляев С. А., 2017

В процессе хранения консервированная кровь претерпевает морфологические изменения: диско-сфероцитарную трансформацию. Одновременно меняются биохимические и физико-химические свойства эритроцитов [2].

Биохимическая полноценность консервированной крови определяется уровнем в ней макроэргических фосфатов. Поэтому гемоконсерванты, которые способны поддерживать уровни АТФ и 2,3-ДФГ и, соответственно, поддерживать жизнеспособность эритроцитов и обеспечивать кислородно-транспортную функцию крови, являются предпочтительными.

Поскольку на сегодняшний день основными общепринятыми критериями качества консервированной крови являются апостериорные критерии [2; 3]: степень гемолиза эритроцитов и отсутствие осложнений при проведении трансфузий, то для повышения эффективности оказания трансфузиологической помощи требуется разработка метода оценки качества крови перед ее переливанием.

Таким образом, целью исследования является установление морфологических маркеров качества хранящейся эритроцитарной массы.

Материалы и методы. Исследования проводились в 2015–2017 гг. на базе ресурсного центра МГУ имени А.А. Кулешова и Национальной антидопинговой лаборатории. Поставлено 23 серии исследований с использованием цельной крови I и II групп и с консервирующим раствором глүглицир.

Забор донорской крови производился у пациентов, которым проводилось оперативное вмешательство на базе УЗ “Могилевская областная больница”, антикоагулянт – гепарин и цитрат натрия или ЭДТА К2. В течение не менее 42 дней еженедельно анализировались мазки и пробы крови. Мазки крови фиксировались метанолом и окрашивались по Романовскому; пробы крови окрашивались моноклональными антителами.

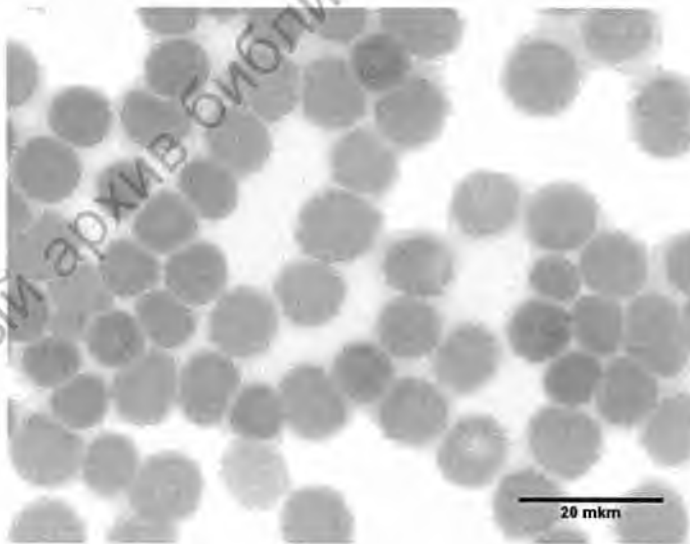


Рисунок 1. Микрофотография эритроцитов

Исследовалась как цельная кровь, которая хранилась без использования консервирующего раствора, так и эритроцитарная масса с консервантом глюцигер в соотношении: 1 объем раствора к 4 объемам крови.

Метод световой микроскопии – исследование препарата мазка крови [3]. В исследовании использовался микроскоп Axio Imager A1, Германия, объектив Plan-Neofluar 100×1.3 Oil, монохроматический фильтр с длиной волны 540 нм, видеокамера “AxioCam MrC5” (Германия), программное обеспечение “Диаморф-ЦИТО” (Россия).

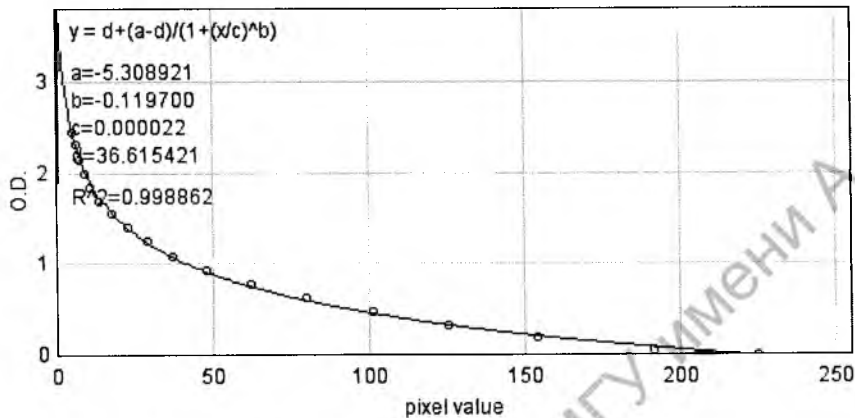


Рисунок 2. График калибровки оптической плотности

С каждого препарата создавали архив изображений эритроцитов с разных (случайных) участков мазка, содержащих монослой эритроцитов.

Проточная цитометрия. В ходе анализа на проточном цитофлуориметре Cell Lab Quanta SC, Beckman Coulter (США) и FACSARIA, BD Bioscience (США) определяли параметры бокового светорассеяния (SSc) и электронный объем, интенсивность флуоресценции CD 235a.

Пробоподготовка состояла в разбавлении 1 мкл цельной крови фосфатным буфером (соотношение 1:2000). Эритроциты на гистограммах гейтировали по CD 235a.

Статистический анализ состоял из описательной статистики с расчетом моды, среднего значения, определения характера распределения. Учитывая характер распределения, мы остановились на непараметрических методах анализа. Изменения считались значимыми при $p < 0,05$. Все статистические методики реализованы с помощью программы Statistica (StatSoft, США).

Результаты исследований. На препаратах свежей крови выявлялись единичные эритроциты с выростами эритроцитарной мембраны, средний диаметр клеток составлял 8,5 мкм.

Хранение крови в течение первой недели, характеризовалось появлением спикул и шипиков на некоторых эритроцитах. Для мазка характерно отсутствие патологических форм. Для части эритроцитов характерна дисковидная форма, поскольку визуализировался участок пэллора.

В мазке отсутствовали агрегаты, что указывает на наличие нормальных значений дзета-потенциала. Отсутствие гемолиза подтверждалось графиком оптической плотности мазка, поскольку участки фона имели значение оптической плотности близкой к нулю. Встречались как гиперхромные эритроциты, так и клетки с меньшей оптической плотностью.

Таким образом, большая часть клеток сохранила нормальную форму, только единичные клетки имеют спиккулы. Чаще спиккулы выявлялись у более гипохромных эритроцитов. При проведении морфометрии установлено, что средний диаметр эритроцитов составил 8,6 мкм, что соответствует норме.

На второй неделе наблюдения уменьшалось количество эхиноцитов и между клетками начинают формироваться мостики. Оптический профиль, построенный по изображению мазка, выявил отсутствие гемолиза и более низкое значение оптической плотности эритроцитов. Размеры эритроцитов на второй неделе составили в среднем 9,1 мкм.

Таким образом, по сравнению с эритроцитами на первой неделе хранения, для второй недели наблюдения характерен макроцитоз и снижение оптической плотности эритроцитов.

На третьей неделе наблюдения преобладающей формой клеток становятся сфероциты. Так же заметно формирование монетных столбиков. Размеры эритроцитов 7,0 мкм, что в сочетании со значениями оптической плотности свидетельствует о деструкции гемоглобина.

На четвертой неделе изменения, начавшиеся на третьей, проявляются еще заметнее. Выход гемоглобина из клеток усиливается, отмечено возрастание сфероцитоза. Размеры клеток на четвертой неделе остались практически неизменными – 7,2 мкм.

Особенностью хранящейся крови на четвертой неделе хранения – наличие в мазках палочкоядерных бактерий. На пятой неделе продолжается дальнейший выход гемоглобина из сфероцитов. Некоторые из эритроцитов имеют вид гемолизированных клеток. Среднее значение диаметра эритроцитов – 7,1 мкм. На шестой неделе гемолиз заметно нарастает. На снимке много эритроцитарных мембран, а гемоглобин находится в плазме крови. Размер клеток составил 6,52 мкм.

Таким образом, на основании наблюдения за препаратами крови можно проследить следующую закономерность: по мере хранения происходит постепенное уменьшение размеров с выходом гемоглобина в плазму крови. При сравнении образцов крови I и II групп данным методом исследований различий не выявлено. Следовательно, наличие/отсутствие клинически значимых антигенов групп крови на эритроцитах не влияет на сроки хранения эритроцитов.

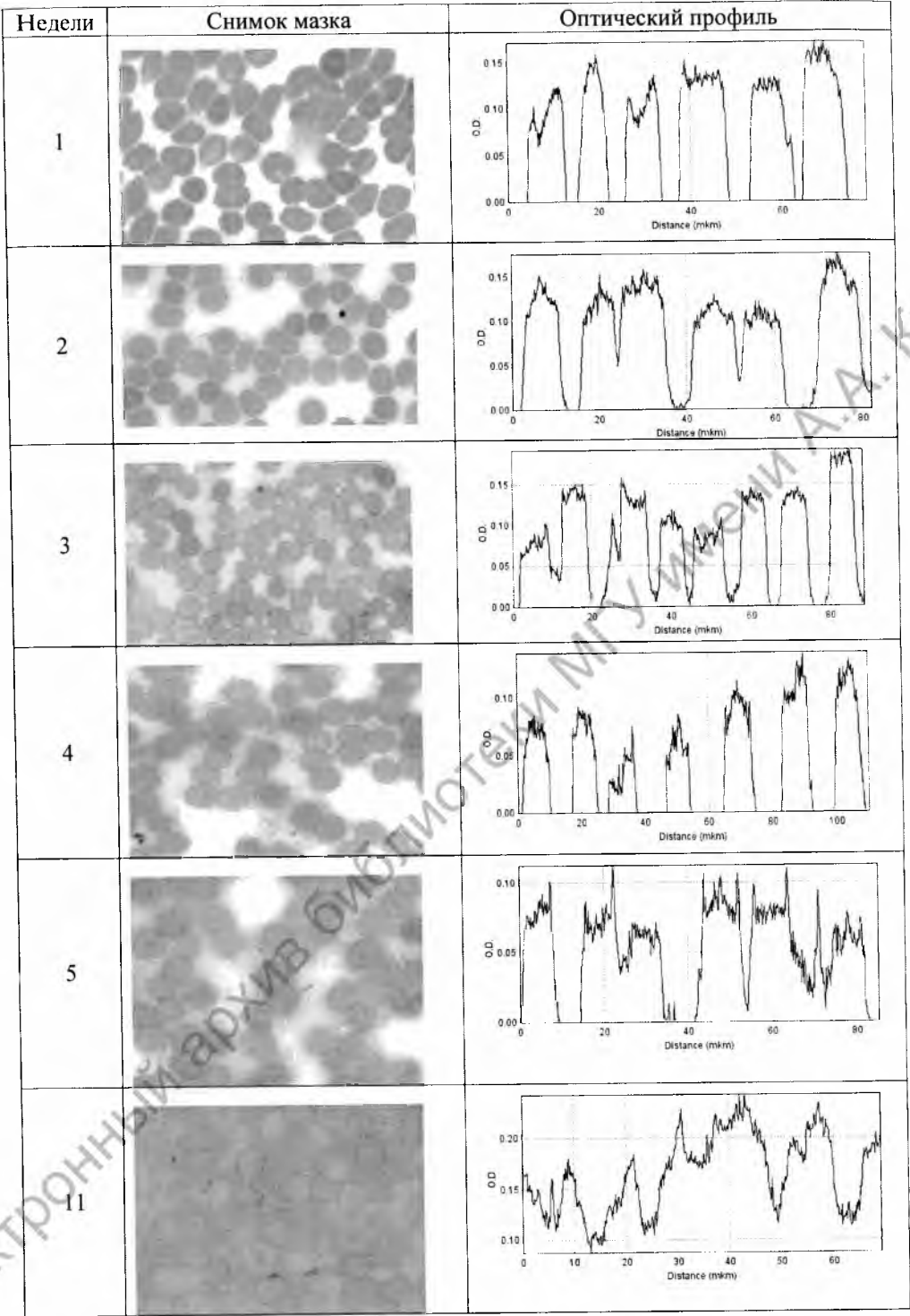


Рисунок 3. Микрофотографии и оптический профиль эритроцитов

Анализ данных световой микроскопии позволяет сделать вывод о том, что хранение крови более четырех недель как с консервантом, так и без него сопровождается процессами деструкции с массивным гемолизом.

Анализ проб крови методом проточной цитометрии. В наших исследованиях нами производилось гейтирование и разделение популяции эритроцитов. Гейтирование осуществлялось по Glycophorin A (CD 235a), а по параметрам электронного объема и бокового светорассеяния можно было корректно выделить не менее двух популяций эритроцитов, различающихся в основном своими размерами. В таблице они обозначаются как “крупные” – Big RBC, так и “небольшие” – Small RBC красные кровяные тельца.

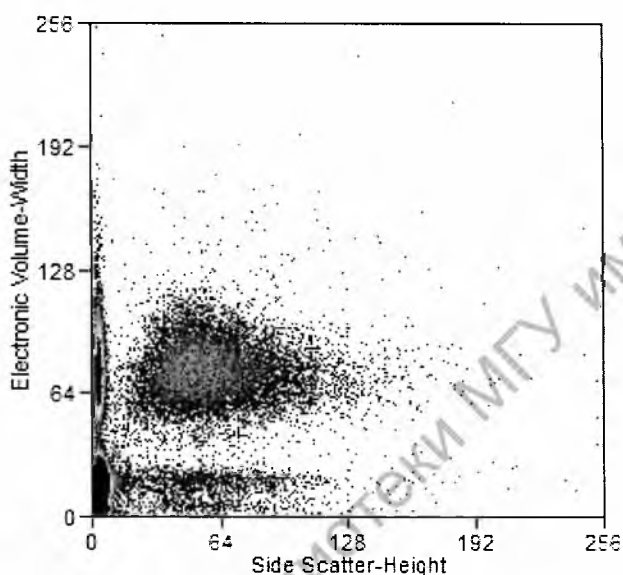


Рисунок 4. Пример скаттерогаммы эритроцитроцитов

Для свежей крови были характерны следующие признаки: наличие двух субпопуляций с меньшим и большим размером соответственно. Обе популяции имели примерно сходные характеристики по боковому светорассеянию. Клетки с большими размерами характеризовались (каплевидным) по форме распределением, что означает: большинство клеток – дискоциты, имели небольшие величины бокового светорассеяния, и лишь небольшая часть представлена сфероцитами.

При исследовании крови, хранившейся без использования консерванта мы получили следующие данные. В обеих субпопуляциях к завершению периода наблюдения выявлялся макроцитоз: диаметр эритроцитов возрастал с 7,46 до 8,01, и с 4,52 до 4,79 мкм, в то время как по данным микроскопии, наоборот, диаметр эритроцитов становился меньше. Размер эритроцитов возвращался к исходным значениям.

Таблица 1 – Морфометрия цельной крови без консерванта

Регион	$\bar{X}$ SSc (о.е.)	Диаметр (мкм)	SS Мода (о.е.)
До хранения			
Big RBC	141,9	7,46	23,0
Small RBC	26,2	7,52	24,0
Третья неделя хранения			
Big RBC	122,0	7,53	34,0
Small RBC	34,5	7,57	32,0
Шестая неделя хранения			
Big RBC	77,5	8,01	25,0
Small RBC	25,7	4,79	25,0

Среднее значение бокового светорассеивания в консервированной крови последовательно снижалось, а мода – к середине наблюдения возрастала, а к шестой неделе наблюдения – соответствовала начальным значениям.

Далее мы исследовали консервированную кровь, хранившуюся с использованием консерванта глюгидир. Продолжительность наблюдения увеличена до 10 недель, поскольку, с высокой долей вероятности, консервант позволяет лучше сохранять жизнеспособность эритроцитов.

После первой недели хранения на графике не выявляются различия по сравнению с исходным состоянием.

На третьей неделе изменения становятся заметными. В частности, происходит значительное увеличение по размеру клеток, относящихся к той части, которая до исследования имела меньший размер.

После четвертой недели изменения в хранящейся крови становятся очень отчетливы. Исчезает популяция, которая до хранения имела меньший размер. С другой стороны – появляется дополнительная популяция с небольшими значениями по боковому светорассеянию и вариабельная по размерам.

Таким образом, можно утверждать, что и при применении консерванта не удастся существенно продлить срок жизни эритроцитов, и после четвертой недели они имеют отличные от свежей крови параметры.

Таблица 2 – Морфометрия эритроцитарной массы с консервантом

	$\bar{X}$ SSc (о.е.)	Диаметр (мкм)	SS Мода (о.е.)
До хранения	141,2	7,41	63,0
1 неделя хранения	143,3	7,26	98,0
3 -//- хранения	152,3	7,37	98,0
4 -//- хранения	165,3	7,33	115,0
5 -//- хранения	141,2	7,41	63,0
6 -//- хранения	185,2	7,45	61,0

Негативные тенденции после четвертой недели продолжают нарастать и в интервале 4–6 недель хранения крови с консервантом глюгидир можно отметить следующие закономерности: популяция эритроцитов становится более однородной; постепенно снижается как среднее значение, так и мода бокового

светорассеяния, и к концу наблюдения остаются только “тени” эритроцитов.

Боковое светорассеяние (SSc) в середине эксперимента, особенно значение моды, – растет, затем мода снижается, а среднее значение SSc на шестой неделе снова возрастает.

Заключение

Эритроциты – одни из наиболее многочисленных клеток организма, и количественно они составляют почти 10% от всего объема клеток взрослого человека [5]. Постепенно, по мере наступления физиологического “старения” эритроциты подвергаются распознаванию и удалению из циркуляции.

Старение эритроцитов – естественный процесс, исследованию которого посвящено много работ, последние достижения в этой области отражены в обзорах [5; 6]. Следует отметить, что на последних стадиях старения эритроцитов происходит связывание гемихрома с интегральным мембранным белком полосы 3, кластеризация белка полосы 3, образование фрагментов C3 системы комплемента и аутологических иммуноглобулинов к белку полосы 3 [5].

Однако до наступления физиологического старения эритроциты могут подвергаться повреждениям, которые нарушают их целостность и таким образом запускают их запрограммированную гибель – эриптоз [4; 5; 7].

Для биологии и медицины в последнее время актуальными становятся направления, связанные с клеточными технологиями. Это связано с развитием трансплантологии, онкологии, фармакологии (той ее части, которая касается оценки токсичности тестируемых фармпрепаратов), трансфузиологии и т. д.

Для всех этих направлений одним из важнейших оцениваемых параметров является апоптоз, процесс запрограммированной смерти. В некоторых случаях его необходимо отсрочить, а в других – например в онкологии, – ускорить, или даже вообще сделать возможным, поскольку опухолевые клетки представляют собой клон с незавершенной дифференцировкой и повышенной способностью к пролиферации.

Продолжительность жизни эритроцитов человека составляет от 100 до 120 дней [1; 2; 3; 8]. Старение эритроцитов – естественный процесс, и управление им (в основном речь идет о продлении их свойств), может быть перспективным в ряде областей, в том числе – обороноспособности страны [7].

В нашей работе с использованием современных методик проанализированы этапы старения эритроцитов в условиях, приближенных к условиям станций переливания крови, где осуществляется хранение компонентов крови. Принято считать, что гибель эритроцитов (эриптоз) связана с воздействием следующих факторов: окислительный стресс, осмотический шок и энергетическое истощение клеток. Эриптоз проявляется разнообразными признаками, и в наших исследованиях мы остановились на морфологических изменениях эритроцитов, поскольку эти характеристики могут быть легко обнаружены, а используемая методика может быть воспроизведена без использования сложного оборудования.

На основании проведенного исследования мы можем сделать следующие выводы:

1. Гарантированный срок хранения эритроцитов, основанный на данных световой микроскопии и проточной цитометрии, составляет 4 недели. На более поздних этапах происходит нарастание гемолиза как при использовании консерванта, так и без него. Начиная с четвертой недели, на препаратах крови обнаруживаются бактерии, численность которых прогрессивно нарастает по мере хранения крови.
2. Хранение эритроцитов сопровождается закономерными изменениями морфодифрактометрических параметров: постепенное нарастание микроцитоза, трансформация дискоцитов в сфероциты, двухфазное изменение бокового светорассеяния.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Инструкция о порядке осуществления организациями переливания крови, заготовки, переработки, хранения, реализации крови и ее компонентов на территории РБ: Постановление Минздрав РБ 63 30.04.2015 “О внесении изменений и дополнений в постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 19 мая 2011 г. № 38”.
2. Румянцев, А. Г. Клиническая трансфузиология / А. Г. Румянцев, В. А. Аграненко. – М. : Геотар Медицина, 1987. – 575 с.
3. База знаний: Микроскопия мазка крови // Лабораторная служба Хеликс [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.helix.ru/kb/item/43>. – Дата доступа: 25.04.2016.
4. Kay, M. M. Localization of senescent cell antigen on band 3 / M. M. Kay // Proc Natl Acad Sci USA. – 1984. – Vol. 81. – P. 5753–5757.
5. Lang, F. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes / F. Lang, S. M. Qadri // Blood Purify. – 2012. – V. 33, № 1–3. – P. 125–130.
6. Bosman, G. J. Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: structural aspects and implications for transfusion / G. J. Bosman [et al.] // Transfus. Med. – 2008. – V. 18. – № 6. – P. 335–347.
7. Clark, M. R. Senescence of red blood cells: Progress and problems / M. R. Clark // Physiol Rev. – 1988. – Vol. 68. – P. 503–554.
8. Мокеев, И. Н. Инфузионно-трансфузионная терапия : справочник [Электронный ресурс]. – 1998. – Режим доступа: http://xn--80ahc0abogjs.com/gematologiya_741/infuzionno-transfuzionnaya-terapiya.html. – Дата доступа: 15.04.2016.

Поступила в редакцию 27.01.2017 г.

Контакты: akulichn@gmail.com (Акулич Николай Васильевич)

AKulich N.V., Tarasova E.A., Soroka A.V., Syakhovich V.E., Beliaev S.A. MORPHOLOGICAL MARKERS OF AGING IN DONORS' BLOOD ERYTHROCYTES.

The article reveals the changes that occur in blood storage. By using light microscopy and flow cytometry the blood changes taking place during 6 weeks of its storage are characterized. Optical and morphological characteristics of aging red blood cells are defined.

Keywords: erythrocyte, light microscopy, membrane, flow cytometry.