

УДК 612.111

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИКОГЕМОГЛОБИНА ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ХРАНЕНИИ КРОВИ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

**Н. В. Акулич<sup>1,3</sup>, В. Э. Сяхович<sup>1</sup>, А. В. Сорока<sup>2</sup>,  
А. С. Доронькина<sup>2</sup>, С. А. Беляев<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Национальная антидопинговая лаборатория, а/г Лесной, Беларусь,

<sup>2</sup>Могилевский государственный университет имени А. А. Кулешова

<sup>3</sup>Гродненский государственный медицинский университет

*Статья посвящена разработке методики определения гликированного гемоглобина эритроцитов методом проточной цитометрии. Исследовано содержание гликогемоглобина при хранении эритроцитов с использованием карбоксифлуоресцеина.*

**Ключевые слова:** гликогемоглобин, хранение крови, проточная цитометрия.

### Введение

В Республике Беларусь достигнуты большие успехи в области кардиохирургии и трансплантологии. Для гематологического сопровождения этих направлений современной медицины необходимы качественные компоненты крови, которые бы не вызывали посттрансфузионных осложнений.

Общезвестно, что продолжительность жизни эритроцитов (RBC) человека составляет *in vivo* около 120 дней, а в условиях станций переливания крови – около 42 суток. Для хранения крови наиболее часто используются следующие консервирующие растворы: PAGGS-M и SAGM, содержащие в качестве основных компонентов физиологический раствор, аденин, глюкозу и маннит.

В зависимости от вида гемоконсерванта, можно обеспечить хранение крови в течение 35±10 дней. Содержание глюкозы в хранящейся крови очень высоко. Так, например, в надосадочной жидкости контейнеров с SAGM концентрация глюкозы выше, чем у пациентов с диабетом [1].

Во всем мире диагностировано более 220 миллионов человек с диабетом, хотя фактическое число людей с диабетом, вероятно, будет выше, поскольку оно не учитывает довольно большое количество людей с нарушенной толерантностью к глюкозе [2]. Следует отметить, что нарушение толерантности к глюкозе не является противопоказанием для доноров крови.

Переливание одной или двух единиц хранящейся крови не приведет к значительному превышению уровня гликогемоглобина, поскольку процент перелитых клеток (10%) будет не высоким из-за их разведения в общей массе, содержащей нормальный уровень гемоглобина A1c (HbA1c). Но эти донорские эритроциты будут иметь иные

© Акулич Н. В., 2020

© Сяхович В. Э., 2020

© Сорока А. В., 2020

© Доронькина А. С., 2020

© Беляев С. А., 2020

физиологические свойства, которые существенно ухудшат тканевую (или органную) гемодинамику, что может оказаться критичным в периоперационный период [1; 2; 3; 4].

Поскольку количество HbA<sub>1c</sub> – это результат гликирования гемоглобина на протяжении всей жизни эритроцита, а эритроциты крови и, особенно, хранящиеся эритроциты имеют ее иную продолжительность, то биохимические методы исследования, которые дают среднее содержание HbA<sub>1c</sub> в объеме крови, *a priori* не могут дать точных сведений о значении HbA<sub>1c</sub> в отдельной клетке. Следовательно, необходима методика, позволяющая оценить содержание гликогемоглобина в отдельном эритроците компонентов крови.

Актуальность исследования связана с необходимостью выяснения молекулярных процессов, определяющих продолжительность жизни клеток крови, а также интервалы, в пределах которых возможно проведение трансфузиологических процедур.

Поскольку повышение HbA<sub>1c</sub> в хранящейся крови может оказать влияние на качество хранящейся крови, то целью исследования является разработка метода оценки содержания гликогемоглобина эритроцитов при хранении крови.

**Анализ данных литературы.** Гликирование представляет собой многостадийную реакцию, и она происходит с ускоренной скоростью в условиях гипергликемии, что приводит к модификации свободных аминогрупп в белках, а также к развитию окислительного стресса.

Известно, что около 90% общего гемоглобина является негликозилированным. Основная фракция негликозилированного гемоглобина представляет собой негликозилированный HbA, называемый HbAO (также к этой фракции относится HbA, гликированный без модификации изоэлектрической точки (молекул).

Гликированный гемоглобин относится к ряду минорных компонентов гемоглобина, которые образуются в результате присоединения различных сахаров к молекуле гемоглобина. Эритроцит человека свободно проницаем для глюкозы. В каждом эритроците гликированный гемоглобин образуется со скоростью, которая прямо пропорциональна окружающей концентрации глюкозы [3].



Рис. 1. Образование гликогемоглобина эритроцитов

Реакция глюкозы с гемоглобином является неферментативной, необратимой и медленной (рис. 1), так что только часть общего гемоглобина гликируется в течение жизненного цикла эритроцита (120 дней).

В результате измерение гликированного гемоглобина дает взвешенное “скользящее” среднее значение уровней глюкозы в крови, которое можно использовать для мониторинга долгосрочных уровней глюкозы в крови, обеспечивая индекс средней концентрации глюкозы в крови за предшествующие 2–3 месяца. Наиболее важным клиническим применением этого является оценка гликемического контроля у пациента с диабетом [4; 7].

Кроме того, гликирование гемоглобина индуцирует свободно-радикальные процессы, вызывая окислительное повреждение эндогенных молекул. Нарушение обмена углеводов приводит к изменению концентрации 2,3-ДФГ в эритроцитах, что в свою очередь, влияет на сродство гемоглобина крови реципиента к кислороду. Красные кровяные тельца подвергаются гликозилированию при старении и/или хранении при температуре выше 0°C. По мере хранения эритроцитов гликирование гемоглобина нарастает, поскольку этот процесс необратим.

**Методы оценка гликогемоглобина.** Гемоглобин A1c – представляет собой один из специфических подтипов гликированного гемоглобина. HbA1c составляет приблизительно от 3 до 6% общего гемоглобина у здорового человека и 20% или более при диабете, который плохо поддается контролю [6; 7].

Поскольку определение концентрации HbA1c необходимо при диагностике и мониторинге сахарного диабета, то в последние несколько десятилетий были разработаны стандартные методы анализа HbA1c, одним из которых является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), являющийся референсным [6; 8] в большинстве лабораторий.

Еще один метод анализа HbA1c основан на иммунотурбидиметрии с использованием антител к HbA1c. Процентное содержание HbA1c в образце рассчитывается с использованием подсчета общего гемоглобина и концентрации HbA1c.

Эти стандартные методы анализа HbA1c представляют собой анализ средней концентрации гемоглобина всей пробы и процентного содержания HbA1c гемолизата, полученного из всех лизированных клеток эритрона, включая как зрелые эритроциты, так и ретикулоциты. Этот результат можно использовать только в качестве показателя средней концентрации глюкозы в крови за предыдущие 2–3 месяца, он не отражает процентное содержание HbA1c в клетках отдельных эритроцитов и не дает информацию о процентном содержании HbA1c между зрелыми эритроцитами и незрелыми. Следовательно, эти стандартные методы не дают своевременной информации о реакции пациента на лечение.

#### Разработка методики

Наиболее распространенным прибором для количественной цитометрии является проточный цитофлуориметр, в некоторых случаях используют клеточный цитофлуориметр-сортер. С ограничениями – можно использовать гематологический или мочевой анализатор. Все вышеперечисленные приборы позволяют получать сопоставимые результаты, оценивая значения электропроводности, оптической плотности, сигналов рассеяния света и флуоресценции [9; 10].

Проведение прободготовки образца возможно как “на борту” анализатора, так и вне прибора с использованием специальных реагентов, которые могут лизировать, пермеабиллизировать и окрашивать клетку и ее клеточные компоненты. Таким способом окрашивают ретикулоциты в гемоанализаторе Sysmex с использованием встроенной в

прибор емкости с реагентом полиметин, а для проточного цитофлуориметра применяют, например, тиазол оранжевый, которым окрашивают пробу на преаналитическом этапе до ее помещения в цитофлуориметр. Для разработки методики определения гликогемоглобина при хранении крови эритроцитов требуется подбор красителя, способного выявлять HbA1c.

В нашем исследовании использовался сукцинимидный эфир карбоксифлуоресцеина (CFSE), который является липофильным красителем. Ферментативные реакции с клеточными эстеразами расщепляют ацетатные группы, что приводит к получению флуоресцентной формы CFSE, способного связываться с первичными аминами эритроцитов. Для нашей методики было важным, что гликирование гемоглобина при хранении крови сопровождается изменением доступности первичных аминогрупп для карбоксифлуоресцеина [9], что, в конечном счете, сопровождается ростом флуоресценции CFSE.

При разработке методики требуется учет содержания гемоглобина в эритроците, поскольку эта величина напрямую влияет на количество гликированного гемоглобина. Поскольку гемоглобин эритроцитов является важным параметром для клинической диагностики, то методика его подсчета в гематологических анализаторах разработана довольно давно [9]. Концентрацию общего гемоглобина в пробе крови получают путем лизиса эритроцитов в пробе крови с помощью литического реагента и спектрофотометрического измерения содержания хромогена, образованного высвобожденными молекулами гемоглобина, с использованием.

Золотым стандартом определения гемоглобина является лизис красных клеток крови с помощью цианида калия с последующим формированием стабильного цианметгемоглобина или гемоглобинцианида.

Железо гемоглобина окисляется из двухвалентного ( $Fe^{2+}$ ) в трехвалентное ( $Fe^{3+}$ ), формируя метгемоглобин, который реагирует с цианидом калия (KCN) с образованием стабильного цианметгемоглобина. Затем концентрация гемоглобина измеряется фотометрически при длине волны 550 нм. Коэффициент светопоглощения разведенного образца сравнивается с коэффициентом светопоглощения реагента без образца.

Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH) образца крови определяется по концентрации гемоглобина (Hb)/количество эритроцитов (RBC). MCH – это среднее значения измерения всех эритроцитов, оно не отражает содержание гемоглобина в отдельных эритроцитах. MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах, отражает степень насыщения эритроцита гемоглобином. Это наиболее стабильный гематологический показатель, поскольку он не зависит от размера эритроцита. Этот параметр можно использовать как индикатор ошибки прибора или ошибки, допущенной при подготовке пробы к исследованию.

Измерение клеточного гемоглобина на проточном цитометре является измерением в каждой клетке, что позволяет предоставить важную диагностическую информацию. Важно отметить, что хотя в большинстве современных гематологических анализаторов 5 Diff используется принцип проточной цитометрии, подсчет MCH производится расчетным способом: MCH/RBC.

В работе [8] был выполнен анализ гемоглобина методом проточной цитометрии в отдельных эритроцитах с использованием антител с флуоресцентной меткой к антигемоглобину А.

В другом исследовании [4] провели анализ гемоглобина с использованием проточной цитометрии и антител к анти-пангемоглобину. Особенностью данной работы является использование большого количества флуоресцентно-меченных антител, поскольку эритроциты имеют высокую концентрацию гемоглобина. Кроме того, существуют по-

тенциальные артефакты из-за помех связывания антител или угасания флуоресценции, вызванной высокой плотностью гемоглобина в эритроците. Используемый нами краситель (CFSE), лишен многих вышеперечисленных недостатков, что позволит измерять гликогемоглобин без использования антител.

### Выбор контролей

Ряд контролей HbA<sub>1c</sub> коммерчески доступен. Большинство из этих контролей представлены в форме порошков лиофилизированного белка или гемолизированных жидких растворов [11]. Они пригодны для аффинной хроматографии и иммунологического детектирования. Контрольный материал стабилен в течение 300 дней при 6°C, и может быть использован для различных методов, включая ВЭЖХ и иммунотурбидиметрию. Но они не пригодны для проточной цитометрии, поскольку для анализа необходимо обеспечить, с одной стороны, сохранение клетки, а с другой – создать условие для ее окрашивания.

Исходя из вышеизложенного, к числу требований к контрольным материалам относится способность к проникновению через клеточную мембрану для анализа HbA<sub>1c</sub> клетки, а также других вариантов гемоглобина и/или других клеточных компонентов. Кроме того, необходимо учесть отличные от эритроцитов клетки. Контрольный материал должен сохранять свойства при замораживании/размораживании при хранении.

При разработке методики необходимо обратить внимание, что на точное соотношение выходного сигнала анализатора исследуемому клеточному содержимому могут влиять различные физические или химические факторы. Например, лизирующий раствор в гемоанализаторах 3 Diff не только лизирует эритроциты, но и удаляет часть содержимого цитоплазмы лейкоцитов. В общем случае это не является препятствием для последующего анализа лейкоцитов, поскольку эта особенность носит систематический характер.

Поэтому для точного количественного измерения компонентов клетки необходимо использование контрольных материалов в качестве внешнего или внутреннего контроля. В последнем случае контрольные материалы (антитела к HbA<sub>1c</sub>) добавляются в каждый измеряемый образец в качестве контроля. Они используются в качестве контрольного материала для настройки цитометра.

**Ход анализа.** Забор крови производили у добровольцев, антикоагулянт – ЭДТА K<sub>2</sub>. Пробы крови окрашивали моноклональными антителами к гликофору А (CD 235 а), фиксировали, проводили пермеабиллизацию эритроцитарной мембраны и затем вносили CFSE. Для хранения крови использовался консервант SAGM, пробы крови анализировались еженедельно в течение 42 дней.

Определяли параметры прямого и бокового светорассеяния, интенсивность флуоресценции CD 235 а и CFSE на приборе FACS ARIA, (BD Bioscience, США). Для прободготовки использовали фосфатный буфер, эритроциты на гистограммах гейгировали по CD 235а. Для статистического анализа использовались непараметрические методы. Изменения считались значимыми при  $p < 0.05$ .

При использовании функций логического ограничения, в пределах области регистрации клеток проточного цитометра выделяли субпопуляцию, позитивную по CD 235а. Далее проводили анализ клеток, различающихся по значению флуоресценции CFSE.

При регистрации флуоресценции CFSE в популяции эритроцитов удастся выделить популяцию микрочастиц (40% позитивны по CD 235а) и тромбоцитов, имеющих небольшие линейные размеры и невысокое значение бокового светорассеяния [9].

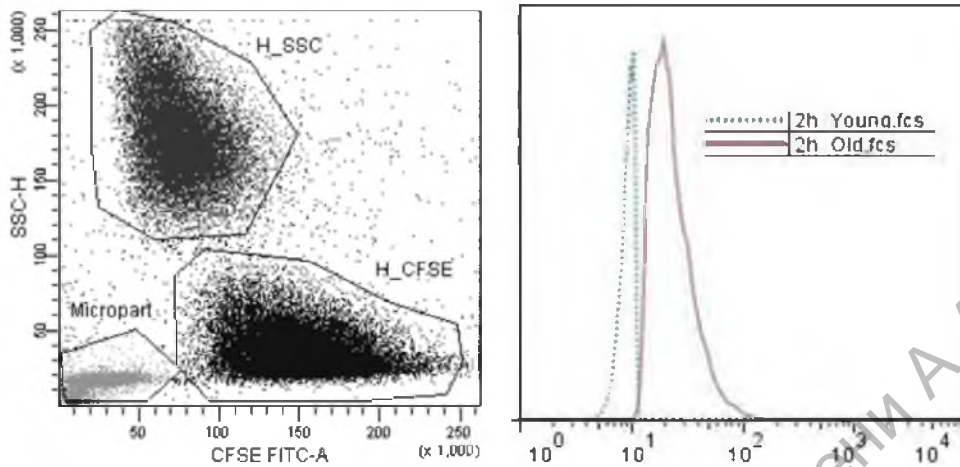


Рис. 2. Анализ эритроцитов хранящейся крови, окрашенных CFSE

Они характеризовались фоновыми значениями флуоресценции CFSE. Красные кровяные тельца образовывали неперекрывающиеся клеточные популяции, отличающиеся разными значениями флуоресценции зонда, которые неоднородны по дифрактометрическим параметрам – предположительно эритроциты, имеющие разные степени зрелости и/или различную упаковку гемоглобина [9].

При дальнейшем анализе этих популяций установлено, что морфологически (по размерам) они не имеют четких отличий и соотносятся – 60/40.

Для разработки методики важно выяснить зависимость между уровнем флуоресценции CFSE и продолжительностью хранения эритроцитов. Для этого с суточным интервалом исследовали интенсивность флуоресценции CFSE в образцах крови.

Полученные данные содержания гликогемоглобина при хранении крови представлены на рисунке 3. Значение CFSE имеет прямо пропорциональную зависимость с экспозицией хранения, которая близка к линейной. Ее можно удовлетворительно аппроксимировать полиномом 2 степени (рис. 3).

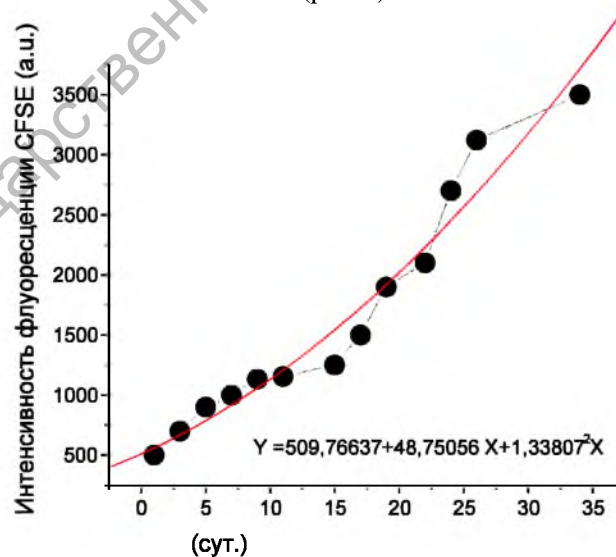


Рис. 3. Образование гликогемоглобина эритроцитов

Между 10–15 сутками наблюдения выявлено снижение прироста флуоресценции CFSE. Наши предыдущие данные показали [10], что этот период хранения характеризуется ростом гемолиза эритроцитов проб крови, а также снижением оптической плотности клеток по данным морфоденситометрического анализа. Рост флуоресценции CFSE, выявленный нами при хранении крови, основанный на изменении доступности первичных аминогрупп специфической и возрастании реакционной способности CFSE с первичными аминогруппами, свидетельствует об увеличении содержания гликогемоглобина при хранении крови.

### Выводы

1. Разработан метод определения гликогемоглобина эритроцитов методом проточной цитометрии без использования антител.
2. Хранящаяся с гемоконсервантом кровь характеризуется наличием двух популяций эритроцитов, отличающихся по содержанию гликогемоглобина и неоднородны по дифрактометрическим параметрам.
3. Содержание гликогемоглобина эритроцитов имеет прямо пропорциональную зависимость от продолжительности хранения красных кровяных телец с гемоконсервантом.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus / R. Koenig [et al.] // *N Engl J Med.* – 1976 – Vol. 295. – № 8. – P. 417–420.
2. **Little R.R.** Glycated hemoglobin standardization-National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) perspective. // *Clin Chem Lab Med.* – 2003. – Vol. 41. – № 9. – P. 1191–1198.
3. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association / S. M. Grundy [et al.] // *Circulation.* – 1999. – Vol. 100. – № 10. – P. 1134–1146.
4. **Reynolds T. M., Smellie W. S., Twomey P. J.** Glycated haemoglobin (HbA1c) monitoring // *BM.* – 2006. – Vol. 333. – № 7568. – P. 586–588.
5. **Luthra M., Balasubramanian D.** Nonenzymatic glycation alters protein structure and stability. A study of two eye lens crystallins // *J Biol Chem.* – 1993. – Vol. 268. – № 24. – P. 18119–18127.
6. Candidate reference methods for hemoglobin A1c based on peptide mapping / U. Kobold [et al.] // *Clin Chem.* – 1997. – Vol. 43. – P. 1944–1951.
7. **Koval D., Kasicka V., Cottet H.** Analysis of glycated hemoglobin A1c by capillary electrophoresis and capillary isoelectric focusing // *Anal Biochem.* – 2011. – Vol. 413. – № 1. – P. 8–15.
8. **Miedema, K.** Standardization of HbA1c and Optimal Range of Monitoring // – *Clin Lab Invest Scand* – 2005. – 240. – P. 61–72.
9. Detection of microparticles from human red blood cells by multiparametric flow cytometry / G. Grisendi [et al.] // *Blood Transfus.* – 2015. – Vol. 13. – P. 274–280.
10. Морфологические маркеры старения эритроцитов донорской крови / Н. В. Акулич [и др.] // *Вестник МГУ имени А. А. Кулешова.* – 2017. – № 1. – С. 75–83.
11. What is hemoglobin A1c? An analysis of glycated hemoglobins by electrospray ionization mass spectrometry / Peterson K. P. [et al.] // *Clin Chem.* – 1998 – Vol. 44. – № 9. – P. 1951–1958.

Поступила в редакцию 12.01.2020 г.

Контакты: akulich\_n@antidoping.by (Акулич Николай Васильевич)

### Akulich N., Syakhovich V., Soroka A., Doronkina A., Belyaev S. DETERMINATION OF ERYTHROCYTE GLYCOHEMOGLOBIN IN THE BLOOD STORAGE BY FLOW CYTOMETRY.

*The article is devoted to the development of a method for the determination of glycated hemoglobin of red blood cells by flow cytometry. Using carboxyfluorescein, the content of glycohemoglobin during storage of red blood cells has been studied.*

**Keywords:** glycohemoglobin, blood storage, flow cytometry.