

УДК 612.111+615.1/4

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ МОНООКСИДА АЗОТА В ЭРИТРОЦИТСОДЕРЖАЩИХ КОМПОНЕНТАХ КРОВИ ПРИ ЕЕ ХРАНЕНИИ И ИХ ОПТИКО-МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

© 2023 г. Н.В. Акулич^{*,#}, В.В. Зинчук^{**}

^{*}Национальная антидопинговая лаборатория, а/г Лесной, 31, Минский район, 223040, Беларусь

^{**}Гродненский государственный медицинский университет, ул. М. Горького, 80, Гродно, 230009, Беларусь

[#]E-mail: akulichn@gmail.com

Поступила в редакцию 15.01.2022 г.

После доработки 15.01.2022 г.

Принята к публикации 01.11.2022 г.

Методом проточной цитометрии изучено внутриклеточное содержания монооксида азота в эритроцит-содержащих компонентах крови при ее хранении с гемоконсервантом в течение четырех недель. Установлено, что хранение крови сопровождается ростом внутриклеточного содержания монооксида азота в эритроцитах и изменением оптико-морфометрических параметров красных кровяных телец. На ранних этапах хранения эритроцитсодержащие компоненты крови были представлены дискоцитами, на поздних этапах — преобладали сфероциты при возрастании количества микроцитов, накапливающих монооксид азота и имеющих сниженный уровень внутриклеточного гемоглобина.

Ключевые слова: монооксид азота, проточная цитометрия, эритроциты, консервация крови.

DOI: 10.31857/S0006302923010088, EDN: NZYGLR

В последнее время отмечается возрастание интереса к выяснению структурно-функциональных изменений эритроцитов при хранении, лимитирующим качеством эритроцитсодержащих компонентов донорской крови [1–3]. Это связано с пониманием того, что эти клетки периферической крови не только играют существенную роль в поддержании гомеостаза, обеспечивая газотранспортные и реологические свойства крови, но и оказывают влияние на кровоток на уровне микроциркуляторного русла и магистральных сосудов [3–5].

Согласно рекомендациям, жизнеспособность эритроцитов влияет на эффективность переливания крови [3]. В практике гемотрансфузиологов описаны негативные последствия таких процедур, возникающие как из-за индивидуальных различий следствием хранения эритроцитов [3, 7, 8]. Общеизвестно, что эритроциты для переливания хранят при 1–6°C до трех-семи недель, либо при температуре –65°C и ниже — более длительный период времени. Нахождение клеток в гемоконтейнере с гемоконсервантом в условиях гипотермии не полностью воспроизводит условия *in vivo*. Применяемые для хранения эритроцитов компоненты рас-

творов (аденин, гуанозин, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, маннитол) предназначены для уменьшения функциональных и метаболических изменений в эритроцитсодержащих компонентах крови за счет поддержания энергетического обмена эритроцитов, а также буферной и осмотической стабильности [3]. Несмотря на применяемые растворы, происходит постепенная деградация различных компонентов эритроцитов, в совокупности называемых повреждением при хранении, что приводит к ограничению срока хранения. Так, в работе [3] указывается, что «... в процессе хранения донорских эритроцитов отмечается снижение содержания NO, нарушающее регуляцию микроциркуляции». Поскольку активность L-аргинин-NO-системы эритроцитов может зависеть от морфофункциональных свойств красных кровяных телец, целью исследования является оценка оптико-морфометрических параметров и внутриклеточного содержания NO в эритроцитсодержащих компонентах крови при хранении крови в течение четырех недель.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на базе Национальной антидопинговой лаборатории (Минский

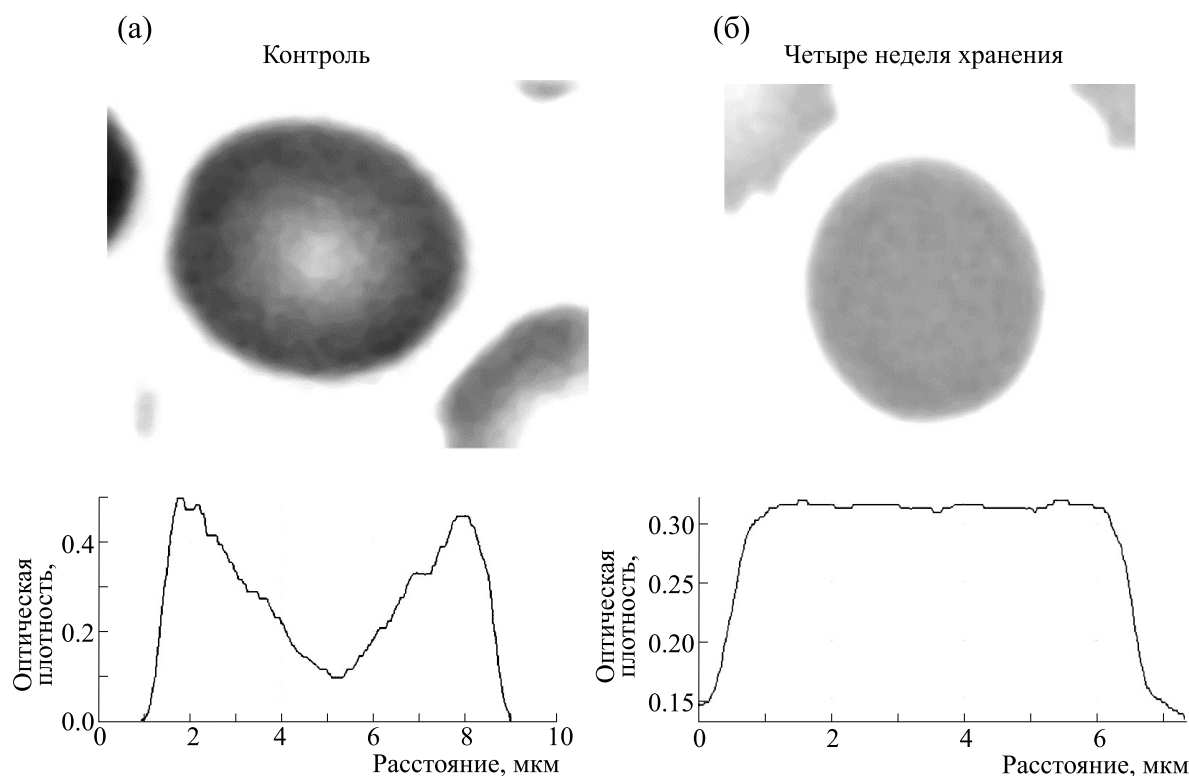


Рис. 1. Оптико-морфологические характеристики эритроцитов при хранении крови: (а) – контроль, (б) – после четырех недель хранения. Вверху – микрофотографии эритроцитов, внизу – соответствующие гистограммы распределения оптической плотности.

р-н, Беларусь). Каждая доза эритроцитов ($400 \text{ мл} \pm 5\%$, гематокрит 70%) на протяжении четырех недель хранилась в пластиковом пакете, предварительно заполненном гемоконсервантом PAGGSM (Фрезениус Каби АГ, Германия), в состав которого входят раствор хлорида натрия, аденин, глюкоза, гуанозин и маннитол. Забор крови добровольцев проводили с использованием $\text{K}_2\text{ЭДТА}$. Кровь была подвергнута лейкофилтрации при сборе, после чего были получены суспензии эритроцитов в соответствии со стандартными процедурами подготовки. Контролем служила кровь добровольцев до хранения. Всего проведено 14 серий исследований.

Оптико-морфометрический анализ фиксированных метанолом и окрашенных эозин метиленовым синим (по Май-Грюнвальду) препаратов крови проводили в течение четырех недель. В исследовании использовали микроскоп OLYMPUS BX-53, дополненный монохроматическим фильтром с длиной волны 540 нм для проведения денситометрических исследований клеток. Для анализа каждого препарата создавали архив, содержащий полутоновые (8-битные) изображения не менее 300 эритроцитов с разных (случайных) участков мазка, содержащих монослой эритроцитов. Микроскопический анализ изображений,

применяемый в исследовании, позволял количественно оценить денситометрические параметры красных кровяных телец (рис. 1). Для оценки площади поверхности эритроцитов (S_{area}) использовали алгоритмы программного обеспечения «Диаморф-ЦИТО» (Россия). Поскольку алгоритм подсчета S_{area} не учитывает выросты цитоплазматической мембраны, ее значения подсчитывали только для диско- и сфероцитов, исключая из анализа эхино- и сфероэхиноцитарные трансформации красных кровяных телец.

Концентрацию гемоглобина, средний объем эритроцита и показатель ширины распределения эритроцитов по объему определяли на гематологическом анализаторе ХТ 2000i (Sysmex, Япония).

Определения внутриклеточного NO проводили методом проточной цитометрии (цитофлуориметр-сортер FACS ARIA, США). Для этого пробы крови окрашивали моноклональными антителами к линейному маркеру эритроцитов (гликофоруину А, CD 235 а) и диацетильным производным 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлуоресцеина (DAF-FM DA) (Molecular Probes, США). Уровень внутриклеточного содержания NO коррелирует с интенсивностью флуоресценции DAF-FM [9].

Для пробоподготовки использовали фосфатный буфер FACS Flow (BD Bioscience, США). В

Таблица 1. Содержание монооксида азота и оптико-морфометрические характеристики эритроцитов при хранении крови (Ме (25, 75))

Параметр	До хранения (контроль)	Срок хранения (недели)			
		1-я	2-я	3-я	4-я
Площадь поверхности, мкм ²	139.0 (133.3–141.2)	141.6 (138.7–143.9)	132.0 (128.8–134.0)	114.2 (112.4–115.6)*	109.3 (107.4–110.9)*
Средний объем эритроцита, фл	88.2 (83.0–92.0)	95.4 (91.2–99.1)	114.4 (109.0–119.6)*	108.7 (102.6–111.2)*	105.9 (100.4–107.8)*
Показатель ширины распределения эритроцитов по объему, %	12.3 (12.0–12.8)	13.9 (13.6–14.3)*	16.9 (15.9–17.3)*	19.1* (18.4–19.8)*	17.0 (16.1–17.5)*
Интенсивность флуоресценции нормоцитов, (о.е.)	242.0 (240.0–248.0)	234.7 (233.3–236.8)	307.0 (289.2–315.0)*	327.6 (313.2–337.0)*	310.0 (300.7–315.0)*
Интенсивность флуоресценции микроцитов, (о.е.)	0	0	554.0 (512.0–560.0)*	617.4 (599.0–632.0)*	783.8 (772.7–801.1)*
Значение малоуглового рассеяния луча лазера нормоцитами, (о.е.)	1821.0 (1668.0–1962.0)	1853.5 (1763.0–1978.1)	1805.0 (1713.0–1868.0)*	1895.3 (1788.0–1961.4)*	1636.8 (1612.0–1740.9)*
Значение малоуглового рассеяния луча лазера микроцитами, (о.е.)	0	0	1142.0 (1136.0–1157.0)*	1342.1 (1321.2–1377.0)*	1224.0 (1217.6–1240.1)*

Примечание. * – Достоверные изменения в сравнении с контролем.

каждой пробе анализировали не менее 40000 клеток. Кроме того, на проточном цитофлуориметре определяли содержание гемоглобина в отдельном эритроците. Для этого использовали значения малоуглового лазерного рассеяния, которые коррелируют с концентрацией гемоглобина в клетке [10]. Для исключения влияния двояковогнутой формы эритроцитов на определение клеточного гемоглобина эритроциты превращали в правильный сфероид, обрабатывая клетки додецилсульфатом натрия после их предварительной фиксации глютаровым альдегидом.

Полученные данные были обработаны методами вариационной статистики с использованием программы для персонального компьютера Statistica 10.0. Полученные значения представлены в виде медианы, 25-й и 75-й процентиля. Величина p рассчитана с учетом поправки Бонферрони–Холма. Все показатели проверяли на соответствие признака закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка. Достоверность дисперсионного анализа множественных сравнений оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Корреляционный

анализ проводили с использованием коэффициента корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ микроскопических препаратов показал, что в течение первой недели хранения эритроциты характеризовались наличием впадины в центре клетки (пэллор) и выраженным возвышением на периферии (тор), особенности морфологии не выявлены – большинство клеток представлено нормоцитами.

Площадь поверхности эритроцитов контрольных образцов составляла 139.0 (133.3–141.2) мкм², а, хранящихся в течение недели – 141.6 (138.7–143.9) мкм² (табл. 1). Таким образом, различия в величинах площади поверхности зарегистрированы не были. Дальнейшее хранение (в течение двух и более недель) приводило к постепенному превращению нормоцитов в сфероциты, при этом площадь поверхности значительно снижалась – до 114.2 (112.4–115.6) ($p < 0.05$) и 109.3 (107.4–110.9) мкм² ($p < 0.05$) на третьей и четвер-

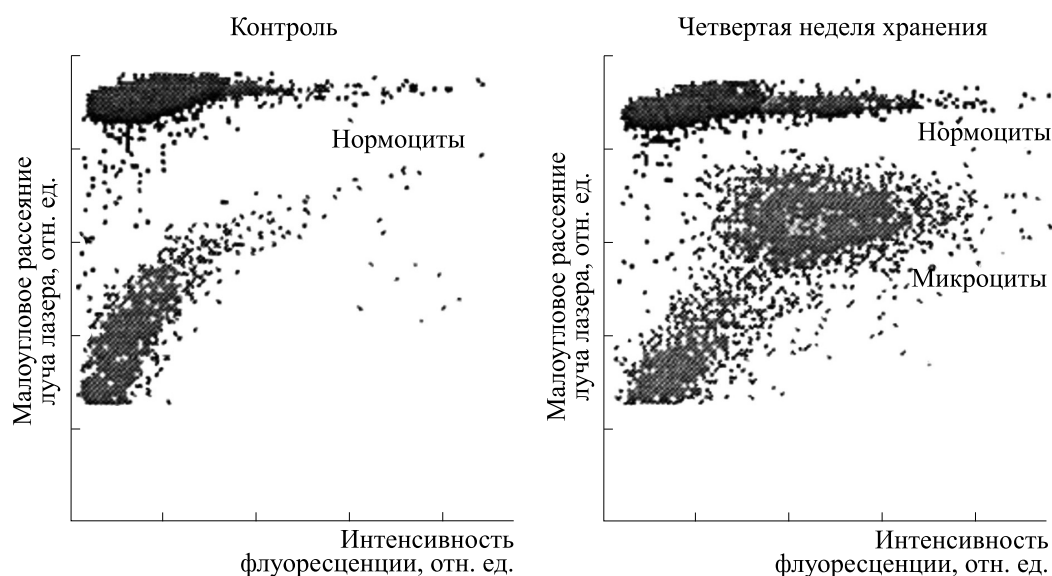


Рис. 2. Внутриклеточное содержание гемоглобина клеток — контроль и хранящейся крови по данным гематологического анализатора ХТ 2000i: гистограмма рассеяния клеток по малоугловому рассеянию луча лазера (FSC) и интенсивности флуоресценции (SFL).

той неделях соответственно. Все эритроциты были представлены сфероцитами, с сохранением высоких значений ширины полувысоты гистограммы распределения эритроцитов по объему.

Величина среднего объема эритроцита, измеренная волюметрическим методом на автоматическом гематологическом анализаторе, наоборот повышалась — с 88.2 (83.0–92.0) до 114.4 (109.0–119.6) фл ($p < 0.05$) — и превышала контрольные значения со второй по четвертую недели наблюдения. При этом и на первой неделе исследования отмечалась тенденция к росту среднего объема, составлявшего 95.4 (91.2–99.1) фл ($p > 0.05$).

К концу первой недели наблюдения для эритроцитов был характерен рост гетерогенности эритроцитов по объему — 13.9 (13.6–14.3) % ($p < 0.05$), хотя значение анизоцитоза не превышало нормы. Более 80% красных кровяных телец было представлено сфероцитами, у части эритроцитов регистрировался участок пэллора. В мазке отсутствовали агрегаты, что предполагает наличие нормальных значений дзета-потенциала.

Хранение крови в течение двух недель с использованием PAGGSM сопровождалось появлением микроцитов, их количество составляло 17%. Выявлено увеличение среднего объема эритроцитов с 88.2 до 114.4 фл ($p < 0.05$). На некоторых эритроцитах визуализировались спикюлы. Отмечался рост анизоцитоза, показатель ширины распределения эритроцитов по объему достиг наибольших значений к концу третьей недели хранения — 19.1 (18.4–19.8) % ($p < 0.05$), превышая нормальные значения.

Для получения дополнительной информации были проанализированы гистограммы распределения неядерных клеток (эритроцитов и тромбоцитов) образцов по значениям прямого светорассеяния и флуоресценции гематологического анализатора (рис. 2), которые предоставляют вспомогательную информацию. Проведенный анализ позволил выявить среди проб хранящейся более двух недель крови дополнительную популяцию клеток, имеющую меньшее значения прямого светорассеяния. Согласно данным работы [9], такие клетки имеют меньшие линейные размеры и содержание гемоглобина, что коррелирует с микроцитарной группой красных кровяных телец.

Исследования при помощи проточной цитометрии показали (рис. 3), что CD 235-позитивные клетки проб крови до второй недели хранения были представлены нормоцитами, микроциты в образцах отсутствовали. Нормоциты контрольных образцов характеризовались высокой неоднородностью сигнала бокового светорассеяния, после второй недели хранения, популяция этих клеток становилась более однородной. Поскольку для пробоподготовки использовали додецилсульфат натрия, превращающий эритроциты в правильный сфероид, вариации бокового светорассеяния не связаны с ориентацией клеток в потоке проточного цитометра при проведении анализа.

Уровень монооксида азота нормоцитов, измеренный по интенсивности флуоресценции DAF-FM, до первой недели хранения не различался и составлял соответственно 242.0 (240.0–248.0) и

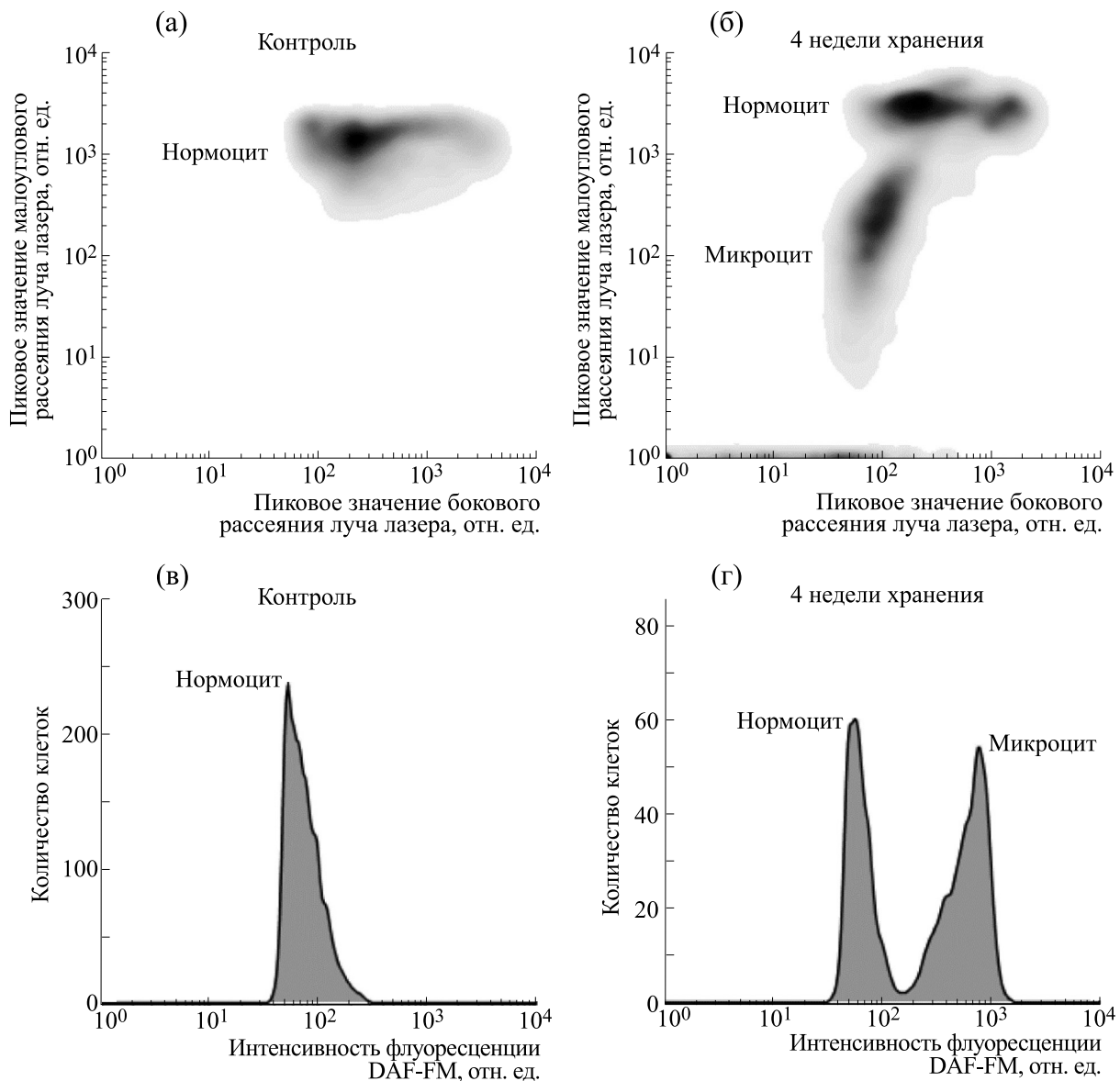


Рис. 3. Сравнительный анализ содержания монооксида азота в эритроцитах крови в процессе хранения (четыре недели): (а) и (б) – гистограмма рассеяния клеток по малоугловому (FSC) и боковому (SSC) рассеянию луча лазера; (в) и (г) – распределение клеток по содержанию монооксида азота (DAF-FM).

234.7 (233.3–236.8) о.е. ($p > 0.05$) в контроле и в крови, хранящейся одну неделю. Значение прямого светорассеяния, свидетельствующее о внутриклеточном содержании гемоглобина, составляло 1821.0 (1668.0–1962.0) о.е. в контроле и 1853.5 (1763.0–1978.1) о.е. ($p > 0.05$) у крови, хранящейся одну неделю.

При увеличении продолжительности хранения эритроцитсодержащих компонентов донорской крови в пробах увеличилось количество микроцитов. Так, доля клеток с низкими значениями прямого светорассеяния постепенно нарастает с 17 до 26% ($p < 0.05$) со второй по третью неделю наблюдения, а затем к четвертой неделе

достигает 70% ($p < 0.05$). Содержание монооксида азота в нормоцитах продолжало постепенно нарастать, увеличиваясь к третьей неделе наблюдения на 35% ($p < 0.05$). Затем уровень NO несколько снизился и превышал значения контроля на 28% ($p < 0.05$).

Наибольшее содержание монооксида азота выявлено в микроцитах. Эти клетки экспрессируют на цитоплазматической мембране линейный маркер эритроцитов (CD 235a) и регистрируются в виде компактного облака на гистограмме при анализе цельной крови на гематологическом анализаторе. Для микроцитов было характерно сниженное количество внутриклеточного гемогло-

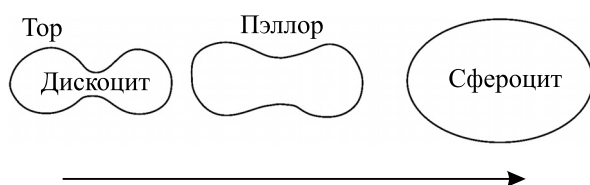


Рис. 4. Трансформация эритроцита в процессе хранения (четыре недели) крови по данным оптико-морфометрического анализа.

бина 1142.0 (1136.0–1157.0) о.е. ($p < 0.05$), на второй неделе наблюдения по сравнению с контролем $p < 0.05$, и этот уровень продолжал сохраняться до завершения периода наблюдения. Принимая во внимание, что доля таких клеток к четвертой неделе хранения значительно (более чем в 20 раз) выросла, а интенсивность флуоресценции DAF-FM превышала как уровень флуоресценции нормоцитов на второй неделе хранения ($p < 0.05$), так и интенсивность флуоресценции DAF-FM дискоцитов в контроле, можно констатировать значительный суммарный рост внутриклеточного содержания монооксида азота эритроцитсодержащих компонентов донорской крови при хранении. На основании полученных данных можно предположить, что снижение значений малоуглового рассеяния луча лазера связано с деструкцией и выходом гемоглобина из клеток (рис. 4), т.е. постепенным превращением дискоцита в сфероцит и формированием «теней эритроцитов», содержащих мембранносвязанный гемоглобин и большое количество NO.

Известно, что жизнеспособность красных кровяных телец эритроцитсодержащих компонентов крови не удается поддерживать длительное время, несмотря на низкую температуру хранения, применение консерванта и лейкоредукцию/лейкодеплецию [3]. С использованием метода проточной цитометрии нами была установлена взаимосвязь (рис. 5) между оптико-морфометрическими параметрами эритроцитов и внутриклеточным содержанием монооксида азота: на ранних этапах хранения эритроцитсодержащие компоненты крови были представлены нормоцитами, содержащими меньшее количество монооксида азота, на поздних этапах – преобладали сфероциты с повышенным содержанием NO.

В частности, было установлено, что между средним объемом эритроцита и внутриклеточным содержанием NO существует прямо пропорциональная корреляционная связь ($r = 0.63$, $p < 0.001$). Между площадью поверхности эритроцита и внутриклеточным содержанием NO существует еще более тесная отрицательная корреляционная зависимость ($r = -0.83$, $p < 0.001$), которая свидетельствует о снижении диффузионной поверхности по мере роста внутриклеточного NO. Следует обратить внимание на то, что самый значительный рост монооксида азота отмечен в микроцитарной фракции красных кровяных телец.

Показано, что в хранящейся крови парциальное давление кислорода выше чем в контроле, особенно высоко его значение в супернатанте [12] и верхнем слое клеток. Сатурация гемоглобина

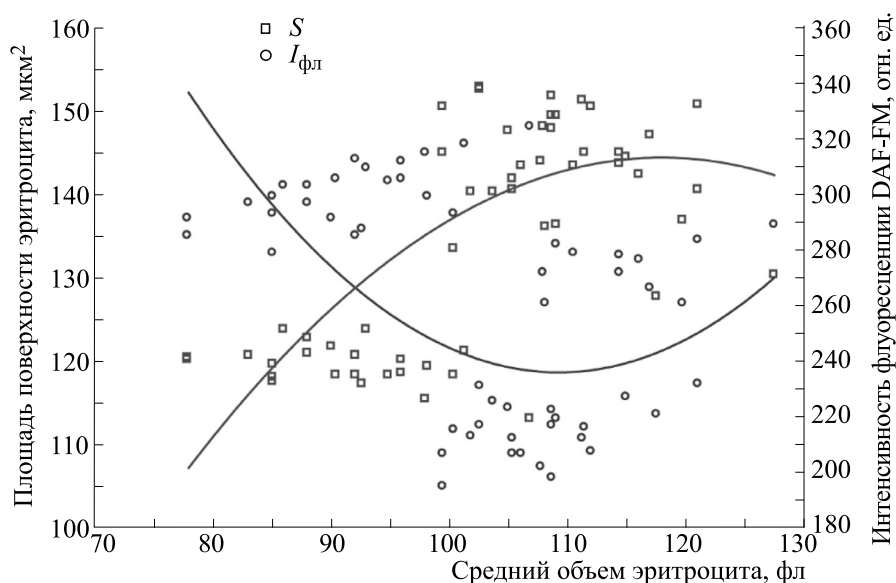


Рис. 5. Зависимость между площадью поверхности эритроцита (левая ось ординат) и внутриклеточным содержанием монооксида азота (правая ось ординат) от объема эритроцита (ось абсцисс).

различается от 41 до 57%, наименьшие значения были характерны для средних по расположению в мешке для хранения слоев клеток. Следовательно, в зависимости от кислородного обеспечения клеток в пакете хранящейся крови в эритроцитах могут происходить как процессы образования NO из L-аргинина, так и скавенжирования монооксида азота. Другим возможным механизмом регулирования уровня внутриклеточного NO при хранении крови является нитритредуктазная реакция [11].

Как следует из полученных данных, в поддержании постоянства внутренней среды организма, и, в частности, в обеспечении кислородтранспортной функции крови в условиях, создаваемых при ее хранении, принимает участие L-аргинин-NO-система эритроцитов [2]. С использованием спектроскопии электронного парамагнитного резонанса и абсорбционной спектроскопии установлено [13], что хранящиеся эритроциты обладают более высокой способностью к скавенжированию монооксида азота, чем в контроле, при этом наилучшей способностью обладают дискоциты. В то же время установлена обратно пропорциональная зависимость между средней концентрацией гемоглобина в эритроците и его способностью к скавенжированию NO [14].

Проведена оценка продукции NO эритроцитами у пациентов с серповидноклеточной анемией, вызванной механическим воздействием (напряжением сдвига) [15]. Исходный уровень продукции монооксида азота у данных пациентов был выше (особенно в субпопуляции дискоцитов пациентов с этим заболеванием по сравнению с контролем. В ответ на это воздействие регистрировали рост NO во всех исследуемых группах наблюдения. Этот выявленный феномен позволяет высказать предположение о влиянии аминокислотного состава и структуры гемоглобина на функционирование NO-системы эритроцитов.

Возможным объяснением описанных в литературе гемодинамических нарушений, связанных с гемотрансфузией, является рост количества микрочастиц эритроцитов (внеклеточных везикул) при хранении крови [11, 16]. При помощи хемолюминесцентного метода показано, что фосфолипидные везикулы имеют большую способность к скавенжированию монооксида азота [17], чем эритроциты. Отмечаемый нами рост микроцитов, экспрессирующих линейный эритроцитарный маркер при хранении крови и содержащих большее, чем эритроциты, количество NO, несомненно вносит вклад в свойства эритроцитсодержащих компонентов консервированной крови.

ВЫВОДЫ

Хранение крови с использованием гемоконсерванта на протяжении четырех недель сопровождается ростом содержания монооксида азота в эритроцитах, определяемого методом проточной цитометрии.

Выявлены закономерности оптико-морфометрических характеристик эритроцитов на различных этапах хранения крови с гемоконсервантом PAGGSM: на первой-второй неделе хранения эритроцитсодержащие компоненты были представлены дискоцитами, на третьей-четвертой неделе преобладали сфероциты.

Установлена взаимосвязь между оптико-морфометрическими параметрами эритроцитов и внутриклеточным содержанием NO на различных этапах хранения крови. Между средним объемом эритроцита и внутриклеточным содержанием NO существует прямо пропорциональная корреляционная связь, а между площадью поверхности эритроцита и внутриклеточным содержанием данного газотрансммиттера — более тесная обратная пропорциональная корреляционная зависимость.

При хранении эритроцитсодержащих компонентов крови происходит рост количества микроцитов, несущих на своей поверхности линейный эритроидный маркер CD 235 а, имеющих сниженный уровень внутриклеточного гемоглобина и накапливающих монооксид азота.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено комитетом по этике УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория». От участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. K. Thangaraju, S. Neerukonda, U. Katneni, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 153 (2021).
2. V.V. Zinchuk, D. D. Zhadko, *Nitric Oxide* **1** (84) 45 (2019).
3. А. И. Костин, О. А. Майорова, А. В. Ложкин и др., *Трансфузиология*, **12** (2), 12 (2011).
4. В. В. Зинчук и Е. С. Билецкая, *Биофизика*, **65**, 915 (2020).
5. C. Donadee, N. J. Raat, T. Kaniyas, et al., *Circulation*, **124** (4), 465 (2011).
6. M. García-Roa, M. Del Carmen Vicente-Ayuso, A. M. Bobes, et al., *Blood Transfus.*, **15** (3), 22 (2017).

7. R. Stapley, B. Y. Owusu, and A. Brandon, *Biochem. J.*, **446** (3), 499 (2012).
8. F. J. Willekens, J. M. Werre, Y. A. Groenen-Döpp, et al., *Br. J. Haematol.*, **141** (4), 549 (2008).
9. N. Li, J. Sul, and P. Haydon, *Neuroscitnce*, **23**, 10302 (2003).
10. C. Briggs, R. Rogers, B. Tompson, et al., *Sysmex J. Int.*, **11** (2), 63 (2001).
11. J. T. Alexander, A. M. El-Ali, J. L. Newman, et al., *Transfusion*, **53** (11), 2619 (2013).
12. B. Sandhagen, C. F. Hogman, C-H de Verdier, et al., *Vox Sang*, **55**, 139 (1988).
13. C. Liu, X. Liu, J. Janes, et al., *Redox Biol.*, **2**, 211 (2014).
14. В. П. Реутов, *Успехи биол. наук*, 35, 189 (1995).
15. S. Suriany, I. Xub H. Liu, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, **171**, 143 (2021).
16. A. H. Tayer, N. Amirizadeh, M. Ahmadinejad, et al., *Transfus. Med. Hemother.*, **46** (4), 224 (2019).
17. C. Donadee, N. J. Raat, T. Kaniyas, et al., *Circulation*, **124**, 465 (2011).

Comparative Analysis of the Nitrogen Monoxide Content and Optical-Morphometric Characteristics of Erythrocyte-Containing Blood Components during Storage

N. V. Akulich* and V.V. Zinchuk**

*National Antidoping Laboratory, Lesnoi 31, Minsk Region, 223040 Belarus

**Grodno State Medical University, ul. M. Gorkogo 80, Grodno, 230009 Belarus

Flow cytometry was used to analyze the content of intracellular nitrogen monoxide in erythrocyte-containing blood components during blood storage with hemopreservative for 4 weeks. It was found that storing of blood is accompanied by increased levels of intracellular nitrogen monoxide in erythrocytes and thus by a change in optical and morphometric parameters of red blood cells. In the early stages of storage, erythrocytes were represented by discocytes, and during long storage erythrocytes became more spherical (spherocytes) as the percentage of microcytes that accumulated nitrogen monoxide increased and their intracellular hemoglobin levels were decreased.

Keywords: nitrogen monoxide, flow cytometry, erythrocytes, blood storage