DOI: 10.33741/0435-1991.41.06

ВПЛИВ УМОВ ГІПОТЕРМІЧНОГО ЗБЕРІГАННЯ НА МОРФОМЕТРИЧНІ ПОКАЗНИКИ ЕРИТРОЦИТІВ ДОНОРСЬКОЇ КРОВІ

Бортнік Г. А.

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України»,
Київ, Україна

Резюме

Вступ. Відомо, що гіпотермічне зберігання еритроцитів може негативно впливати на широкий спектр функцій цих клітин, що суттєво знижує якість еритроцитвмісних компонентів (ЕВК) донорської периферичної крові в цілому.

Мета. Вивчення морфометричних показників еритроцитів в процесі гіпотермічного зберігання ЕВК донорської периферичної крові.

Матеріали і методи. Площу еритроцитів визначали в 30 зразках ЕВК донорської периферичної крові, пофарбованих за Папенгеймом, при світловій мікроскопії з комп'ютерним аналізом зображень. Одночасно оцінювалась форма еритроцитів. При визначенні площі еритроцитів донорської крові були використані вбудовані функції вільно поширюваного програмного забезпечення ImageJ. Досліджували ЕВК, виготовлені за стандартною методикою з периферичної крові 30 здорових донорів, що заготовлена на консервантах, котрі застосовуються в закладах Служби крові України. Для аналізу даних використовували парний t-критерій Стьюдента для залежних вибірок.

Результати. До VI тижня зберігання спостерігалась статистично незначуща тенденція до зменшення площі еритроцитів. На останніх етапах зберігання (VII–VIII) відбулась відносна стабілізація показника, що досліджувався до параметрів, котрі спостерігались на початку зберігання. При порівнянні зразків ЕВК, що зберігались на консерванті CPD зі зразками на CPDA-1, не виявлено статистичної достовірності між змінами, що відбувались на різних етапах зберігання у зазначених консервантах. Під час зберігання ЕВК донорської крові відбуваються значні зміни в морфології еритроцитів. Мікроскопічне дослідження мазків крові протягом 49 діб зберігання показало зміни форми від нормальних дискоцитів до ехіноцитів і сфероцитів. У дослідженні не спостерігалось значних змін у формі еритроцитів протягом першого тижня зберігання, оскільки нормальні дискоцити домінували. На третьому тижні зберігання ми спостерігали значне збільшення кількості ехіноцитів в обох зразках. Максимальні зміни форми еритроцитів спостерігалась за останніх тижнях зберігання. На останньому, восьмому етапі, відбулось значне збільшення кількості сфероцитів, але в консерванті CPDA-1 таких клітин було менше, ніж в розчині з консервантом

CPD. Можливо, такі відмінності можна пояснити наявністю в консерванті CPDA-1 аденіну, котрий є складовою АТФ, оскільки загальновідомо, що утворення патологічних форм еритроцитів пов'язане з характерним для консервованих трансфузійних ЕВК збільшенням рН, зниженням запасів АТФ.

Висновки. В процесі гіпотермічного зберігання еритроцитвмісних компонентів донорської периферичної крові достовірної різниці в змінах площ еритроцитів не виявлено. Під час гіпотермічного зберігання еритроцитвмісних компонентів протягом 49 діб у консервуючих розчинах CPDA-1 та CPD відбуваються значні зміни форм еритроцитів з нормальних дискоцитів до сфероцитів. Консервуючий розчин, що містив у своєму складі аденін, завдає менше негативного впливу на ЕВК під час їхнього зберігання.

Ключові слова: гіпотермічне зберігання, компоненти донорської крові, еритроцити, морфометричні показники.

Фінансування: дослідження не мало спонсорської підтримки.

INFLUENCE OF HYPOTHERMIC STORAGE CONDITIONS ON MORPHOMETRIC PARAMETERS OF ERYTHROCYTES OF THE DONATED BLOOD

Bortnik H. A.

*SI «Institute of Haematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine»,
Kyiv, Ukraine*

Abstract

Introduction. Hypothermic storage of red blood cells (RBCs) is known to adversely affect a wide range of functions of these cells that significantly reduces the quality of RBC components of donor peripheral blood as a whole.

Aim. The study of RBCs morphometric parameters in the process of hypothermic storage of RBC components of donated blood.

Materials and methods. RBCs size was determined in Pappenheim-stained smears by light microscopy with computer image analysis. The built-in functions of the freely distributed ImageJ software were used to determine the area of RBCs in the donated blood. RBC components, made according to the standard method from peripheral blood of healthy donors, prepared on preservatives used in the Blood Service of Ukraine, were examined. Student's paired t-test for dependent samples was used to analyze the data.

Results. By week VI of storage, there was a statistically insignificant tendency to decrease the area of RBCs. In the last stages of storage (VII-VIII), there was a relative stabilization of the indicator under study to the parameters observed at the beginning. Comparing the RBC examples stored on the CPD preservative with the samples on the CPDA-1, found no statistical reliability between the changes that occurred at different stages of storage in these preservatives. During the storage of RBC components of

donor blood, there were significant changes in the morphology of the RBCs. Microscopic examination of blood smears during 49 days of storage showed shape changes, from normal discocytes to echinocytes, and spherocytes. The study did not show notable changes in RBCs shape during the first week of storage as normal discocytes dominated. In week III of storage, we observed a remarkable increase in the number of echinocytes in both samples. The maximum change of RBCs shape was observed during last weeks. In the last, eighth stage, there was an outstanding growth of spherocytes, but in the preservative CPDA-1, there were fewer such cells than in the solution with the preservative CPD. Perhaps these differences can be explained by the presence of adenine in the preservative CPDA-1, which is a component of ATP. It is well known that the formation of pathological forms of RBCs is associated with pH increase and ATP decrease appropriate for preserved transfused RBC components.

Conclusion. *The obtained results showed that during 49-days of hypothermic storage of RBC components in the preservative solutions CPDA-1 and CPD, significant changes in RBCs shape from normal discocytes to spherocytes took place.*

The preservative solution containing adenine had a less negative effect on RBC components during their storage.

Keywords: *hypothermic storage, donor blood components, red blood cells, morphometric parameters.*

Вступ

Зміна фізико-хімічних параметрів і фізіологічних властивостей клітин під впливом різних речовин і умов навколишнього середовища завжди супроводжується зміною їх морфометричних характеристик. Водночас часто відбувається підвищення або зниження чутливості клітин до дії різних стресових чинників.

Відомо, що гіпотермічне зберігання еритроцитів може негативно впливати на широкий спектр функцій цих клітин, що суттєво знижує якість еритроцитвмісних компонентів (ЕВК) донорської периферичної крові в цілому. Такі зміни виникають як на ранніх стадіях зберігання (протягом перших 7 днів), так і пізніше [1]. До сьогодні немає чіткого розуміння, що відбувається з пошкодженими еритроцитами після їхнього переливання. Дослідження демонструють, що частина клітин (до 10 % еритроцитів, що мають високий ступінь пошкодження) видаляється з кровотоку відразу ж після переливання. Решта клітин відновлюють свою функціональність в організмі реципієнта [2].

Оскільки до основних показників стану донорських еритроцитів відносяться їхні морфологічні характеристики, метою роботи було вивчення морфометричного показника – площі еритроцитів в процесі гіпотермічного зберігання ЕВК донорської периферичної крові.

Матеріали і методи

Морфометричний показник – площу еритроцитів визначали в мазках периферичної крові, пофарбованих за Папенгеймом, при світловій мікроскопії з комп'ютерним аналізом зображень. Використовували світловий мікроскоп Leica DME (Німеччина), оснащений мікрофотонасадкою з 8-ми мегапіксельною цифровою фотокамерою CanonPowerShot S80. Поля зору, що містять еритроцити, фотографували через об'єктив з масляною імерсією кратністю 100 (при загальному збільшенні $\times 1000$). Отримані цифрові мікрофотографії зберігали у файлах формату JPEG. Параметри зйомки та кольорова корекція встановлювались автоматично. При визначенні площі еритроцитів донорської крові були використані вбудовані функції вільно поширюваного програмного забезпечення ImageJ (Image Processing and Data Analysis in Java), що використовується для роботи з графічними файлами при біомедичних дослідженнях. Програмне забезпечення ImageJ створене співробітниками National Institutes of Health і розповсюджується без ліцензійних обмежень як суспільне надбання [3].

Досліджували ЕВК, виготовлені за стандартною методикою з периферичної крові 30 здорових донорів, заготовленої на консервантах CPDA-1 (склад: Цитрат-Фосфат-Декстроза-Аденін-1) – 15 зразків та CPD (склад: Цитрат-Фосфат-Декстроза) – 15 зразків з ресуспендуєм розчином SAGM (склад: Натрію хлорид-Аденін-Глюкоза-Маніт). Аліквоти зберігали в умовах гіпотермії (температура (2–6)°C) та досліджували на 1, 8, 15, 21, 28, 36, 42 та 49-у добу (попередньо I–VIII етапи спостереження). Вивчали розмірну стабільність еритроцитів в залежності від умов і термінів зберігання. Аналіз цифрових зображень еритроцитів представляли у формі двовимірного масиву точок (пікселів). Площу фігури вираховували як рівну сумі пікселів нульової і близької до нульової яскравості. В кожному зразку крові аналізували від 100 до 180 площинних розмірів еритроцитів. При цьому вираховували середнє арифметичне значення площ еритроцитів. Одночасно оцінювалась форма еритроцитів.

Для аналізу даних використовували парний t-критерій Стюдента для залежних вибірок.

Результати та їх обговорення

В таблиці 1 наведені показники площі еритроцитів на етапах гіпотезмічного зберігання ЕВК донорської крові, стабілізованих двома стандартними розчинами, що застосовуються у Службі крові України.

Наведені в таблиці дані свідчать, що до VI тижня зберігання спостігалась статистично незначуща тенденція до зменшення площі

еритроцитів. На останніх етапах зберігання (VII–VIII) відбулась відносна стабілізація показника, що досліджувався до параметрів, котрі спостерігались на початку зберігання.

Таблиця 1. Площа еритроцитів* на етапах зберігання з використанням різних консервантів (М ± m)

Етап	Консервант		p
	CPD n=15	CPDA-1 n=15	
I	7261,02 ± 631,90	6677,34 ± 1020,36	> 0,05
II	6933,53 ± 849,89	7000,98 ± 848,63	> 0,05
III	6468,25 ± 823,54	6659,13 ± 632,07	> 0,05
IV	6530,69 ± 969,21	6308,98 ± 483,40	> 0,05
V	6395,26 ± 637,32	6980,59 ± 1358,93	> 0,05
VI	6543,46 ± 952,40	6503,23 ± 1079,40	> 0,05
VII	6936,35 ± 1050,28	6678,86 ± 995,62	> 0,05
VIII	7221,25 ± 875,70 ¹	7455,56 ± 1136,82 ²	> 0,05

Примітка: * – виражена у пікселях; ¹ – статистичних відмінностей між зразками в консерванті CPD на I і VIII етапах не виявлено; ² – статистичних відмінностей між зразками в консерванті CPDA-1 на I і VIII етапах не виявлено

При порівнянні зразків ЕВК, що зберігались на консерванті CPD зі зразками на CPDA-1, не виявлено статистичної достовірності між змінами, що відбувались на різних етапах зберігання у зазначених консервантах.

Під час виконання досліджень нашу увагу привернули морфологічні зміни еритроцитів в процесі зберігання, що відображені на представлених нижче мікрофотографіях зразків ЕВК.

Як видно з рисунка, під час зберігання ЕВК донорської крові відбуваються зміни морфології еритроцитів. В зразках спостерігались змінені форми, відсотковий вміст яких наведено в таблиці 2.

Мікроскопічне дослідження мазків крові протягом 49 діб зберігання показало зміни форми від нормальних дискоцитів до ехіноцитів і сфероцитів. У дослідженні не спостерігалось значних змін у формі еритроцитів протягом першого тижня зберігання, оскільки нормальні дискоцити домінували. На третьому тижні зберігання ми спостерігали значне збільшення кількості ехіноцитів в обох зразках. Максимальні зміна форми еритроцитів спостерігалася за останніх тижнях зберігання. На останньому, восьмому етапі, відбулось значне збільшення кількості сфероцитів, але в

Рисунок. Мікрофотографії еритроцитів на різних етапах гіпотермічного зберігання з розчином CPD і CPDA-1 ($\times 1000$)

консерванті CPDA-1 таких клітин було менше, ніж в розчині з консервантом CPD. Можливо, такі відмінності можна пояснити наявністю в консерванті CPDA-1 аденіну, котрий є складовою АТФ, оскільки загальновідомо, що утворення патологічних форм еритроцитів пов'язане з характерним для консервованих трансфузійних ЕВК збільшенням рН, зниженням запасів АТФ (Lim H.W.G., et al., цит. по [4]) тощо. Такі форми накопичуються з подовженням терміну зберігання, що підтверджує дані щодо динаміки біомеханічних властивостей мембрани фільтрованих еритроцитів при тривалому гіпотермічному зберіганні [4]. Добре відомо,

Таблиця 2. Морфологічні зміни еритроцитів (%)

Консервуючий розчин	Форма клітин	I етап	III етап	VI етап	VIII етап
CPD	Дискоцити	82,8	34,1	11,4	4,6
	Ехіноцити	14,6	61,3	70,7	12,2
	Сфероцити	1,3	3,5	14,3	75,3
	Інші	1,3	1,1	3,6	7,9
CPDA-1	Дискоцити	85,8	34,5	6,9	5,3
	Ехіноцити	11,6	61,5	87,3	34,2
	Сфероцити	1,7	2,6	3,2	45,9
	Інші	0,83	1,4	2,6	6,4

що подібні ушкодження мембран свідчать про зниження пластичних якостей клітини, її стійкості до деформацій [5]. Серед причин нестабільності форми еритроцитів при їхньому зберіганні є здатність втрачати або поглинати рідину та електроліти із консервантів [6]. Збереження форми і розмірів еритроцитів є вкрай важливим для подальшої ефективності трансфузій консервованих ЕВК, в тому числі і для зменшення внутрішньосудинного гемолізу [7, 8]. Іншими біохімічними ознаками патофізіологічних змін еритроцитів при їхньому тривалому зберіганні, що корелюють зі стійкістю мембран еритроцитів, є значна активація процесів окислення [9].

Висновки

В процесі гіпотермічного зберігання еритроцитвмісних компонентів донорської периферичної крові достовірної різниці в змінах площ еритроцитів не виявлено. Під час гіпотермічного зберігання еритроцитвмісних компонентів протягом 49 діб у консервуючих розчинах CPDA-1 та CPD відбуваються значні зміни форм еритроцитів з нормальних дискоцитів до сфероцитів. Консервуючий розчин, що містив у своєму складі аденін, завдає менше негативного впливу на ЕВК під час їхнього зберігання.

Література

1. Prudent M., Tissot J. D., Lion, N. In vitro assays and clinical trials in red blood cell aging: Lost in translation. Transfus. Apher. Sci. 2015; 52: 270–6. doi: 10.1016/j.transci.2015. 04.006.

References

1. Prudent M., Tissot J. D., Lion, N. In vitro assays and clinical trials in red blood cell aging: Lost in translation. Transfus. Apher. Sci. 2015; 52: 270–6. doi: 10.1016/j.transci.2015.04.006.

2. Hunsicker O., Hessler K., Krannich A., Boemke W., Braicu I., Sehoul J., et al. Duration of storage influences the hemoglobin rising effect of red blood cells in patients undergoing major abdominal surgery. *Transfusion*. 2018; 1870-80. doi: 10.1111/trf.14627 (online).
3. Collins T. J. ImageJ for microscopy. *BioTechniques*. 2007; 43, (1 Suppl): 25-30. doi 10.2144/000112517.
4. Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Манченко Е.А., Козлова Е.К., Бобринская И.Г., Черныш А.М. и др. Влияние температуры эритроцитарной взвеси на морфологию и наноструктуру мембран клеток. *Общая реаниматология*. 2017; 13(4): 30-7. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2017-4-30-37>
5. Park H., Lee S., Ji M. Measuring cell surface area and deformability of individual human red blood cells over blood storage using quantitative phase imaging. *Sci Rep*. 2016; 6:34257. <https://doi.org/10.1038/srep34257>
6. Ratull P., Yuyuan Z., Mehdi N., Meghdad R., Yaling L. Quantitative absorption imaging of red blood cells to determine physical and mechanical properties. *RSC Adv*. 2020; 10(64): 38923-36. doi: 10.1039/d0ra05421f
7. Karon B.S., Hoyer J.D., Stubbs J.R. Changes in band 3 oligomeric state precede cell membrane phospholipid loss during blood bank storage of red blood cells. *Transfusion*. 2009; 49(7): 1435-42.
2. Hunsicker O., Hessler K., Krannich A., Boemke W., Braicu I., Sehoul J., et al. Duration of storage influences the hemoglobin rising effect of red blood cells in patients undergoing major abdominal surgery. *Transfusion*. 2018; 1870-80. doi: 10.1111/trf.14627 (online).
3. Collins T. J. ImageJ for microscopy. *BioTechniques*. 2007; 43, (1 Suppl): 25-30. doi 10.2144/000112517.
4. Sergunova V.A., Gudkova O.E., Manchenko E.A., Kozlova E.K., Bobrinskaya I.G., Chernysh A.M., et al. The Effect of the Erythrocyte Suspension Temperature on the Morphology and Nanostructure of Cell Membranes. *General Reanimatology*. 2017; 13(4): 30-7 (in Russian) <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2017-4-30-37>
5. Park H., Lee S., Ji M. Measuring cell surface area and deformability of individual human red blood cells over blood storage using quantitative phase imaging. *Sci Rep*. 2016; 6: 34257. <https://doi.org/10.1038/srep34257>
6. Ratull P., Yuyuan Z., Mehdi N., Meghdad R., Yaling L. Quantitative absorption imaging of red blood cells to determine physical and mechanical properties. *RSC Adv*. 2020; 10(64): 38923-36. doi: 10.1039/d0ra05421f
7. Karon B.S., Hoyer J.D., Stubbs J.R. Changes in band 3 oligomeric state precede cell membrane phospholipid loss during blood bank storage of red blood cells. *Transfusion*. 2009; 49(7): 1435-42.

8. Gupta P., Goyal R., Pantola C., Amit S. To Study The Morphological Changes Seen In Stored Blood In A Blood Bank. Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences. 2016; 5(77): 5705-9
doi: 10.14260/jemds/ 2016/1287/
9. Аношина М.Ю. Активність перекисного окислення ліпідів як індикатор збереженості еритроцитів пуповинної крові в процесі криоконсервування / Аношина М.Ю., Калиниченко Т.О. // Гематологія і переливання крові : міжвідомчий збірник. – 2015. – Вип. 38. – С. 41–49.
8. Gupta P., Goyal R., Pantola C., Amit S. To Study The Morphological Changes Seen In Stored Blood In A Blood Bank. Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences. 2016; 5(77): 5705-9
doi: 10.14260/jemds/ 2016/1287/
9. Anoshina M. Yu., Kalynyuchenko T. O. The lipid peroxidation activities as an indicator of the red cord blood cell safety during the cryopreservation process. Hematology & blood transfusion: interdepartmental collection. 2015; 38: 41-9 (in Ukrainian).

Стаття надійшла 12.08.2021

Контакти: bortnikanna2006@gmail.com