

Структура поверхности мембран эритроцитов при длительном хранении донорской крови

А.М. ЧЕРНЫШ, А.М. ГОЛУБЕВ, Е.К. КОЗЛОВА, В.А. СЕРГУНОВА
Научно-исследовательский институт общей реаниматологии
им. В.А. Неговского РАМН, г. Москва

Surface Structure of Erythrocyte Membranes Under Long-Term Storage of Donor's Blood

A.M. CHERNYSH, A.M. GOLUBEV, E.K. KOZLOVA, V.A. SERGUNOVA
V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology
of the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

При длительном хранении донорской крови эритроциты, помещённые в искусственную среду гемоконсерванта, изменяют свое функциональное состояние. При этом изменяется их морфология. Для изучения механизмов повреждения клеток крови необходимо исследовать изменение наноструктуры поверхности мембран.

Цель работы – изучить изменения наноструктуры поверхности мембран эритроцитов при хранении донорской крови в течение 30 суток.

Забор крови осуществили на базе городской клинической больницы им. С.П. Боткина у 4 здоровых доноров в возрасте от 27 до 35 лет и хранили в контейнерах с консервантом ЦФДА-1 в течение 30 суток при температуре 4°C в соответствии с рекомендациями ВОЗ. Все доноры дали добровольное согласие на исследование своей крови в соответствии с нормами этического комитета НИИОР. В день проведения опыта (1, 6, 12, 19 и 30-е сутки хранения) отбирали пробу (10 мл). Опыты проводили при температуре 19°C. Изображения клеток и мембран получали с помощью атомного силового микроскопа (АСМ), «NTEGRA prima» («NT-MDT», Россия). Для исследования изменения наноструктуры использовали метод калиброванной электропорации. Проводили анализы крови.

АСМ-изображения ансамбля клеток в поле 100×100 мкм показали, что в 1-е сутки хранения преобладали дискоциты 85 ± 7%, на 6-е сутки количество эхиноцитов увеличилось до 38 ± 5%, а на 30-е сутки – до 96 ± 3% (в основном сфероэхиноцитов). АСМ-изображения в поле 10×10 мкм позволили выявить структурные особенности отдельных клеток. АСМ-изображения в поле 1×1 мкм показали, что в процессе хранения возникали нарушения наноструктуры мембран красных клеток крови. На 6-е сутки появлялись дефекты в мембране ($D = 80\text{--}100$ нм, $h = 6\text{--}10$ нм). На 19-е сутки появлялись многоуровневые выросты ($D = 500\text{--}800$ нм, $h = 50\text{--}120$ нм), при этом существенно изменялась морфология клеток. Изменение параметров наноструктуры мембран хорошо коррелировало с изменением константы скорости гемолиза при калиброванной электропорации. Во время хранения одновременно с изменением наноструктуры мембран клеток происходило и изменение параметров крови: уменьшение восстановленного глутатиона, концентрации глюкозы, рН, гематокрита; увеличение содержания ионов K^+ и гемоглобина в плазме; достоверных изменений активности каталазы и спектра оксигемоглобина не зафиксировано.

Длительное (до 30 суток) хранение цельной крови при 4°C сопровождается изменением наноструктуры мембран эритроцитов, что хорошо коррелирует с динамикой изменения морфологии клеток и результатами анализов крови.

During donor's blood long-term storage the erythrocytes, placed into an artificial medium of hemopreservative, change their functional state. In this case their morphology alters as well. In order to study the injury mechanisms of blood cells of necessity is to investigate a changed nanostructure of membrane surface. This research was aimed to study a change in nanostructure of erythrocyte membrane surface during donor's blood storage within 30 days. Blood sampling was implemented at S.P. Botkin City Clinical Hospital in 4 healthy donors aged from 27 to 35 years and stored into the containers with CPDA-1 preservative for 30 days at 4°C in accordance with the WHO guidelines. All donors gave a voluntary consent for their blood study according to the statements of Ethics Committee of V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology of the Russian Academy of Sciences. On the day of experiment performance (1, 6, 12, 19 and 30 day of storage), a sample (10 ml) was collected. The experiments were carried-out at 19°C. The images of cells and membranes were obtained using the atomic force microscope (AFM), NTEGRA prima (NT-MDT, Russia). The method of calibrated electroporation was applied to investigate the change in nanostructure. Blood tests were done.

The AFM images of cells ensemble in 100×100 μm field showed diskocytes of 85 ± 7% as predominating in the 1st day of storage, to the 6th and 30th days a number of echinocytes increased up to 38 ± 5 and 96 ± 3% (mostly spheroechinocytes), correspondingly. The AFM images in 10×10 μm field enabled the revealing of structural peculiarities of certain cells. Those in 1×1 μm showed the disorders in erythrocyte membrane nanostructure as occurring during storage. To the 6th day the defects in membrane ($D = 80\text{--}100$ nm, $h = 6\text{--}10$ nm) occurred. To the 19th day the multilayered processes ($D = 500\text{--}800$ nm, $h = 50\text{--}120$ nm) occurred, herewith there was a significant change in cell morphology. The altered parameters in membrane nanostructure correlated well with a change in hemolysis rate constant under calibrated electroporation. During storage, simultaneously with an alteration in cell membrane nanostructure the blood parameters changed as well: decrease in reduced glutathione, glucose concentration, pH, hematocrit, increase in K^+ ions and hemoglobin content in plasma; no statistically significant changes in catalase activity and oxyhemoglobin spectrum were recorded.

A long-term (up to 30 days) storage of the whole blood at 4°C is accompanied by change in erythrocyte membranes nanostructure, correlating well with the dynamics of change in cell morphology and blood test results.