

СЕКЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

ВЛИЯНИЕ ХРАНЕНИЯ ЭРИТРОЦИТАРНОЙ МАССЫ НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭРИТРОЦИТОВ

П.А. Воробей¹, О.Н. Китаева¹, О.С. Лисовская¹, А.В. Русецкий¹,
А.И. Хоменко¹, А.В. Воробей²

¹ Национальная антидопинговая лаборатория, Минский район, vorobey@tut.by

² Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Введение. Исследование изменений структурно-функциональных характеристик эритроцитов при хранении эритроцитарной массы, в частности параметров, необратимо изменяющихся в ходе хранения, актуально в связи с необходимостью разработки методов определения гемотрансфузий при проведении допинг-контроля в спорте. Использование спортсменами допинга, т.е. запрещенных препаратов и методов, которые повышают спортивные результаты, с одной стороны снижает основной – состязательный смысл спортивных соревнований, с другой стороны – наносит значительный вред здоровью спортсменов, часто приводя к их инвалидизации.

К числу широко применяемых в спорте высоких достижений видов допинга относится кровяной допинг. Суть кровяного допинга состоит во введении спортсмену незадолго до соревнования дополнительных объемов крови, как правило, в виде трансфузии эритроцитарной массы. Находящийся в эритроцитах гемоглобин обеспечивает транспорт кислорода в организме, поэтому физиологический механизм эффектов кровяного допинга в спорте очевиден: с увеличением в крови концентрации эритроцитов и содержания гемоглобина возрастает способность крови доставлять к работающим мышцам большее количество кислорода. Применение кровяного допинга оказывает положительное влияние на показатели работоспособности особенно у тех спортсменов, для которых важно проявление аэробной выносливости, в частности, в таких видах спорта как лыжные гонки, биатлон, гребля, велоспорт и др.

Различают два основных вида кровяного допинга: при гомологичной гемотрансфузии спортсмену вводится эритроцитарная масса от донора, при аутогемотрансфузии спортсмену вводят его собственную кровь. В последнем случае предварительно забранную у спортсмена эритроцитарную массу хранят в течение около 2 месяцев (срок, необходимый для восстановления исходного уровня эритроцитов в организме). Эритроциты забранной крови осаждают центрифугированием, отделяют от плазмы и сохраняют при пониженной температуре. При реинфузии эритроцитарную массу смешивают с солевым раствором и вводят в кровяное русло.

Для определения использования спортсменами кровяного допинга требуются достоверные лабораторные методы выявления в крови субпопуляций эритроцитов переливаемой эритроцитарной массы. В 2003 году австралийскими специалистами был предложен способ определения гомологичных гемотрансфузий, основанный на разделении эритроцитов крови спортсмена на субпопуляции по составу антигенов минорных групп крови с использованием метода проточной цитофлуориметрии [1]. Однако такой подход не применим для определения аутогемотрансфузий, так как эритроциты крови в этом случае гомогенны по иммунологическим показателям. В настоящее время нет общепризнанных лабораторных методов доказательства фактов аутологичных гемотрансфузий.

Известно, что при длительном хранении эритроцитарной массы при пониженной температуре существенно изменяются ряд био- и физико-химические характеристики эритроцитов. В частности, происходят изменения метаболического статуса клеток, падает уровень 2,3-дифосфоглицерата и АТФ [2]. Отмечаются заметные изменения в цитоскелете и деформируемости клеток [3]. Наблюдаются выраженные изменения редокс-статуса, структурно-конформационного состояния гемоглобина [4]. Имеются сообщения об изменении трансмембранной асимметрии липидов и везикуляции клеток [5]. Вместе с тем, указанные изменения имеют, как правило, обратимый характер и частично или полностью восстанавливаются при реинфузии аутологичной крови в организм.

Для разработки методов определения аутологичных гемотрансфузий требуется выбрать показатели, которые можно определять для отдельно взятых клеток, и которые не

восстанавливаются до нормального физиологического значения после реинфузии, либо восстанавливаются медленно.

Целью настоящей работы являлось выявление изменений структурно-функциональных характеристик эритроцитов при длительном хранении эритроцитарной массы при пониженной температуре, которые могут быть использованы для разработки метода определения аутологичных гемотрансфузий при допинг-контроле.

Методы. В работе использовали отмытые эритроциты донорской крови, хранившиеся при 4 °С. Гематологические исследования (определение объема эритроцитов и содержания в них гемоглобина) проводили на автоматическом анализаторе Sysmex XT-2000i. Субпопуляционный состав эритроцитов по параметрам прямого и бокового светорассеяния, а также по экстернализации мембранного фосфатидилсерина, исследовали на проточном цитофлуориметр-сортере BD FACSAria. Для определения появления фосфатидилсерина на наружной стороне мембран эритроцитов использовали меченый флуоресцеином белок аннексин V, селективно связывающийся с фосфатидилсеринем.

Результаты исследования и их обсуждение

На рисунке 1 приведены зависимости среднего объема эритроцитов (MCV) и ширины распределения эритроцитов, коэффициент вариации (RDW-CV) от времени хранения эритроцитарной массы. Как видно, при хранении эритроцитарной массы до 2 недель наблюдается увеличение среднего объема эритроцитов с ~85 фл до ~105 фл. При этом было отмечено, что количество гемоглобина в эритроците остается неизменным, соответственно, концентрация гемоглобина в эритроците за счет увеличения объема клетки снижается. При сроках хранения более 2 недель наблюдается обратный процесс – уменьшение среднего объема эритроцитов до ~90 фл через 75 дней хранения. На протяжении всего периода хранения (до 75 дней) происходит увеличение ширины распределения эритроцитов – показателя, который характеризует гетерогенность популяции эритроцитов по объему клеток. Эти результаты коррелируют с зарегистрированным нами с использованием метода проточной цитофлуориметрии ростом гетерогенности популяции эритроцитов по параметрам прямого и бокового светорассеяния.

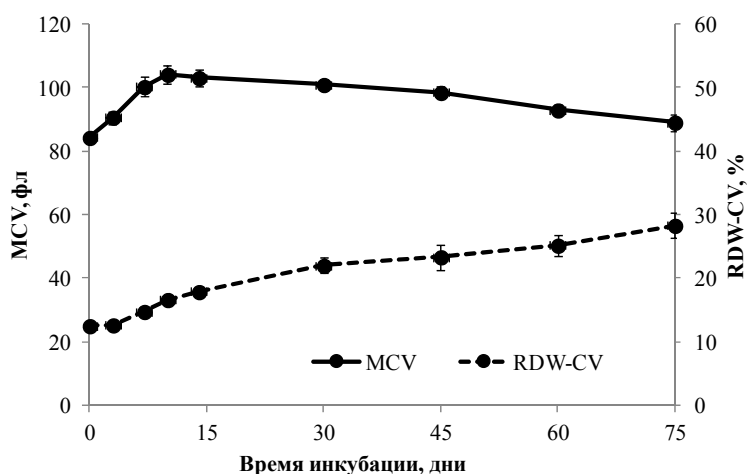


Рисунок 1 – Зависимости среднего объема эритроцитов (MCV) и ширины распределения эритроцитов, коэффициент вариации (RDW-CV) от времени хранения эритроцитарной массы.

Нормальные физиологические значения среднего объема эритроцитов находятся в пределах 79,0– 94,8 фл. Из сопоставления этих значений с полученными нами для хранившейся эритроцитарной массы результатами и учитывая то, что вводимый спортсменам при гемотрансфузиях объем эритроцитов не превышает 20 % от объема эритроцитов в крови, измерение данного гематологического показателя при допинг-контроле может давать лишь дополнительную информацию о возможном использовании гемотрансфузии. Кроме того, наблюдаемое в первые 2 недели хранения эритроцитарной массы увеличение среднего объема эритроцитов вероятно обусловлено нарушениями ионного баланса в условиях хранения, которые обратимы при возвращении клеток в физиологические условия.

Большой интерес для целей допинг-контроля может представлять анализ ширины распределения эритроцитов. Референсный диапазон для данного показателя – 11,6–14,4 %.

Зарегистрированное нами значение для эритроцитов, хранившихся 2 месяца (не менее такого срока обычно хранят эритроцитарную массу спортсменов до аутогемотрансфузии), составило ~25 %. Для эритроцитов, хранившихся 75 дней, значение ширины распределения эритроцитов возрастает до ~28 %. Для смесей в соотношении 1:5 хранившейся в течение 75 дней эритроцитарной массы со свежеполученной кровью тех же доноров, в том числе после инкубации этих смесей при 37 °С, были зарегистрированы значения ширины распределения эритроцитов 14,9–20,0 %.

Гистограммы распределения по объему эритроцитов одного из доноров представлены на рисунке 2. Как видно, увеличение ширины распределения эритроцитов при их хранении связано с появлением клеток как с увеличенным, так и с уменьшенным объемом. Сравнение гистограмм (б) и (в) подтверждает высказанное выше предположение об обусловленности появления при хранении эритроцитарной массы клеток с увеличенным объемом обратимыми нарушениями ионного баланса в условиях хранения. В то же время наибольшие различия между гистограммами для свежеполученной крови (а) и смеси свежеполученной крови с хранившейся эритроцитарной массой (г) наблюдаются в области небольших объемов клеток.

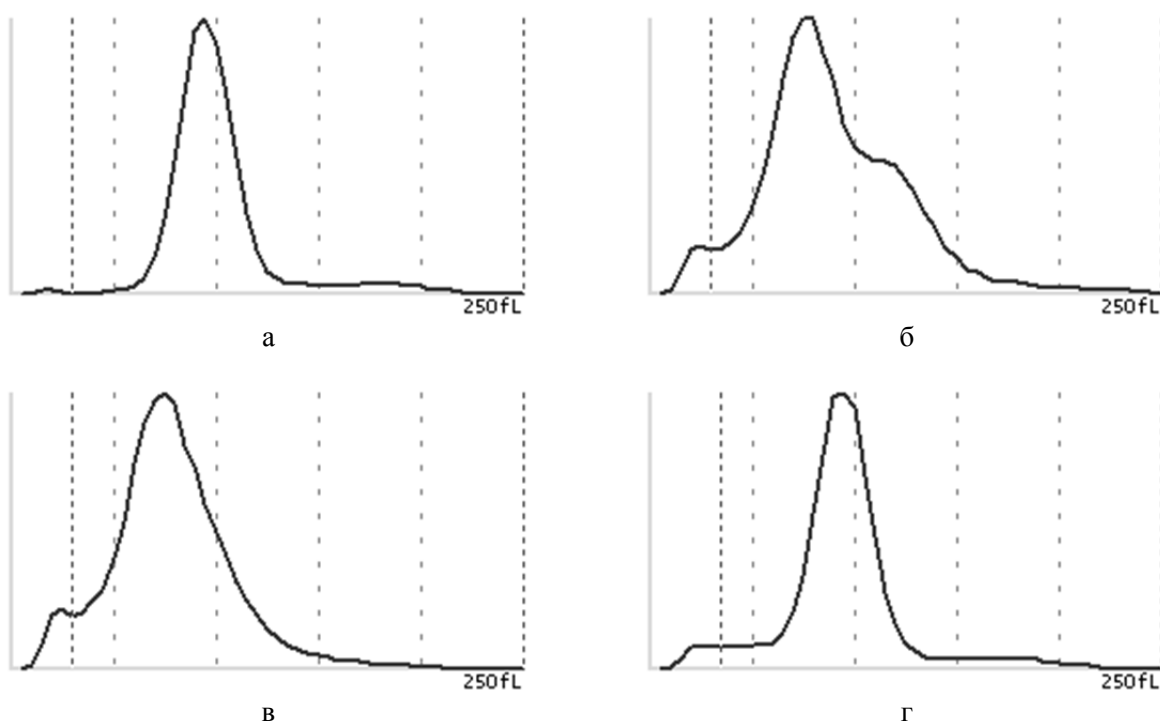


Рисунок 2. Гистограммы распределения по объему эритроцитов: свежеполученной донорской крови (а); хранившейся в течение 75 дней эритроцитарной массы (б); хранившейся в течение 75 дней эритроцитарной массы после инкубации в течение 24 ч в питательной среде при 37 °С (в); смеси 1:5 хранившейся в течение 75 дней эритроцитарной массы со свежеполученной кровью того же донора (г).

Более достоверный для целей допинг-контроля результат может быть получен с использованием методов оценки изменений субпопуляционного состава эритроцитов по параметрам, характеризующим необратимое переключение клеток в новое функциональное состояние. Одним из таких параметров может служить асимметрия распределения фосфатидилсерина в клеточных мембранах, которая имеет важное физиологическое значение. Ее нарушение является ранним признаком развития необратимого процесса гибели клеток при помещении их в неблагоприятные условия.

Проведенные нами цитофлуориметрические исследования показали, что при хранении эритроцитарной массы наблюдается экстернализация фосфатидилсерина в мембранах клеток, регистрируемая по росту количества связывающегося с клетками FITC-меченого аннексина V (рисунок 3). Выраженные изменения наблюдаются уже через 4 дня хранения клеток: если в

свежевыделенной массе от разных доноров аннексин V связывают только 2–4 % эритроцитов, то через 4 дня связывание происходит уже с 30–40 % клеток. Через 75 дней хранения фосфатидилсерин присутствует в наружном слое мембран уже 80–95 % эритроцитов. Наблюдаемые при хранении изменения трансмембранного распределения фосфатидилсерина сохраняются на протяжении не менее 6 ч после помещения клеток в условия, приближенные к физиологическим (питательная среда, 37 °С).

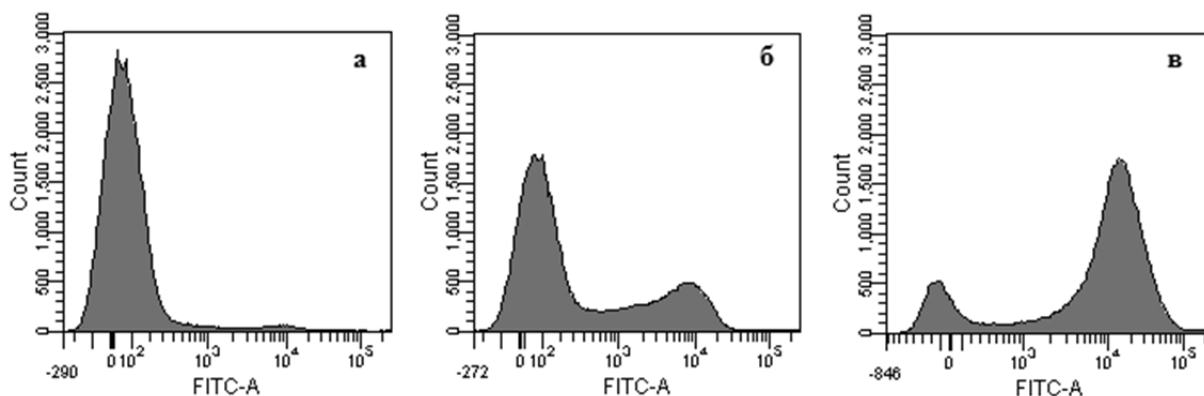


Рисунок 3. Гистограммы распределения свежевыделенных (а) и хранившихся в течение 4 дней (б) и 75 дней (в) эритроцитов по интенсивности флуоресценции связанного с ними FITC-меченого аннексина V.

Выводы

Полученные результаты о наличии необратимых изменений в ширине распределения эритроцитов по объему и трансмембранном распределении фосфатидилсерина в хранившихся эритроцитах открывают возможность использования данных параметров для разработки метода определения аутологических гемотрансфузий у спортсменов.

Литература:

1. Nelson M., Popp H., Sharpe K., Ashenden M. // Haematologica. -2003. -V. 88 (11). -P. 1284–1295.
2. Elliott S. // Br J Pharmacol. -2008. -V. 154 (3). –P. 529–541.
3. Nikolovski Z., De La Torre C., Chiva C., Borrás E., Andreu D., Ventura R., Segura J. // Drug Test Anal. -2012. -V. 4 (11). -P. 882–890.
4. Jelkmann W., Lundby <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/118/9/2395.long> - aff-2 C. // Blood. -2011. –V. 118 (9). -P. 2395–2404.
5. Nguyen D.B., Wagner-Britz L., Maia S., Steffen P., Wagner C., Kaestner L., Bernhardt I. // Cellular Physiology and Biochemistry. -2011. -V. 28 (5). -P. 847–852.