

*На правах рукописи*

**Ламзин Иван Михайлович**

**ДИНАМИКА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ  
ЭРИТРОЦИТОВ ТРАНСФУЗИОННОЙ СРЕДЫ В ПРОЦЕССЕ ХРАНЕНИЯ  
ПО ДАННЫМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ**

**03.01.02 – биофизика**

**Автореферат диссертации  
на соискание учёной степени кандидата медицинских наук**

**Саратов - 2017**

Работа выполнена на кафедре анатомии человека Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ульяновский государственный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации

**Научный руководитель:**

**Хайруллин Радик Магзинурович**, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет» Министерства образования и науки РФ, заведующий кафедрой анатомии человека

**Официальные оппоненты:**

**Каюмова Алия Фаритовна**, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России, заведующая кафедрой нормальной физиологии

**Приезжев Александр Васильевич**, кандидат физико-математических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» Министерства образования и науки РФ, руководитель лаборатории лазерной биомедицинской фотоники кафедры общей физики и волновых процессов

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Защита диссертации состоится «19» сентября 2017 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета Д 212.243.05 при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» Министерства образования и науки Российской Федерации по адресу г. Саратов, ул. Университетская 40, ауд. 34. Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

**Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор физико-математических наук,  
профессор**

**Симоненко Георгий Валентинович**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ.** Одним из эффективных современных высокоинформативных методов определения состояния мембран биологических объектов является атомно-силовая микроскопия [Simon, 2006; Гущина 2005]. Этот метод, наряду с построением изображения образца, позволяет измерять эластичность, шероховатость и ригидность поверхности различных типов клеток. Устойчивость мембраны эритроцитов к разрушению и способность к деформациям обусловлена наличием развитого примембранного цитоскелета [Малыш, 2009]. Ригидность эритроцитов крови человека претерпевает значительные изменения в процессе онтогенеза. По выраженности изменений биофизических свойств и формы эритроцитов в целом можно судить о процессах их старения. Для циркулирующих в кровяном русле эритроцитов из механизмов старения на первый план выходят свободно-радикальное повреждение мембраны эритроцитов, изменение их липидного состава, истощение ферментативных систем гликолиза и запасов аденозинтрифосфорной кислоты, замедление репаративных процессов цитоскелета и изменение ионного состава клетки в результате повышения проницаемости мембраны [Снегирёва, 2007; Follert, 2008]. Суммарным выражением этих процессов является изменение ригидности мембраны, которую можно характеризовать с помощью значений модуля Юнга. Установлено, что циркулирующие в кровяном русле эритроциты не являются однородной массой клеток, а образуют сложную систему, в которой сочетаются клетки разного возраста, морфологии и функционального состояния, что также может отражать процессы старения клеток [Леонова, 1987].

Эффективность контроля качества компонентов крови является одной из важнейших проблем в современной трансфузиологии. Стандартными методами определения пригодности трансфузионных сред, содержащих эритроциты, являются измерение уровня свободного гемоглобина,

определение гематокрита и ряд других методов [Технический регламент РФ, 2010]. С помощью указанных методов возможна только косвенная оценка состояния эритроцитов, не подвергшихся гемолизу, что не позволяет судить об их структурной и функциональной полноценности. Данных, посвящённых изучению изменений биофизических свойств эритроцитов, динамики возрастной гетерогенности популяции консервированных эритроцитов в процессе длительного хранения с помощью метода атомно-силовой микроскопии, в современной научной литературе нами не обнаружено.

### **ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Цель исследования - установить динамику изменений биофизических и морфометрических показателей эритроцитов образцов трансфузионной среды в процессе хранения с использованием атомно-силовой микроскопии.

### **ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ**

1. Провести анализ влияния процесса консервации на гематологические, морфометрические и биофизические показатели эритроцитов цельной крови.
2. Определить динамику гематологических показателей трансфузионной среды в процессе хранения с помощью автоматического анализатора.
3. Проанализировать динамику изменений модуля Юнга эритроцитов образцов трансфузионной среды в процессе хранения по данным атомно-силовой микроскопии.
4. Установить динамику структуры эритроцитарной популяции трансфузионной среды в процессе хранения по данным атомно-силовой микроскопии.
5. Выявить динамику морфометрических показателей эритроцитов трансфузионной среды в процессе хранения по данным атомно-силовой микроскопии.

### **НАУЧНАЯ НОВИЗНА**

В результате исследований консервированных эритроцитов с помощью атомно-силовой микроскопии выявлены значительные изменения модуля Юнга и структуры эритроцитарной популяции трансфузионной среды в

зависимости от срока хранения. Доказано значительное снижение модуля Юнга эритроцитов при добавлении антикоагулянта к цельной крови, её сепарации на компоненты, охлаждения от  $3,23 \pm 0,02$  КРа до  $1,81 \pm 0,02$  КРа и изменение структуры популяции по этому показателю. В то же время, хранение образцов трансфузионной среды в течение стандартного срока приводит к двукратному росту модуля Юнга эритроцитов. Обнаруженное явление свидетельствует о том, что процесс старения консервированных эритроцитов отличаются от онтогенеза эритроцитов, циркулирующих в сосудистом русле.

Установленная динамика распределения значений модуля Юнга свидетельствует о сохранении высокой степени гетерогенности эритроцитарной популяции трансфузионной среды от момента консервации до окончания срока хранения. Доказано, что использование атомно-силовой микроскопии позволяет проследить в динамике сопряжённые изменения модуля Юнга эритроцитов, морфометрических показателей и структуры эритроцитарной популяции трансфузионной среды. Обоснована возможность использования полученных данных в качестве референсных значений динамики модуля Юнга эритроцитов образцов трансфузионной среды. Приоритетность исследований подтверждена патентом РФ № 2542438 от 21.01.2015 г.

### **ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ**

Полученные данные об изменениях морфометрических и биофизических показателей эритроцитов в процессе консервации и хранения позволяют рассматривать их в качестве эффективных критериев дополнительного метода исследования образцов трансфузионной среды в службе крови. Приведенные в исследовании значения могут быть использованы в качестве референсных величин модуля Юнга, диаметра и толщины эритроцитов трансфузионной среды в процессе хранения. Анализ изученных параметров образцов эритроцитсодержащей среды даёт основания для оптимизации

сроков и условий хранения контейнеров в банках крови трансфузиологической службы.

### **ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ**

1. Определение значений модуля Юнга, размеров, формы эритроцитов и гетерогенности эритроцитарной популяции позволяет повысить эффективность оценки состояния образцов трансфузионной среды в процессе их хранения.
2. Значения модуля Юнга эритроцитов цельной крови и трансфузионной среды значительно отличаются: при добавлении антикоагулянта к цельной крови, её сепарации на компоненты и охлаждении, значения модуля Юнга эритроцитов существенно снижаются, а в процессе хранения образцов трансфузионной среды двукратно увеличиваются.

### **АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ**

Основные результаты и положения диссертации были представлены, доложены и обсуждены с личным участием автора на 109-м ежегодном собрании немецкого анатомического общества Anatomische Gesellschaft (Зальцбург, Австрия, 2014); научно-практической конференции «Современные технологии в производственной и клинической трансфузиологии» (Пенза, 2014); на расширенном межкафедральном совещании коллективов кафедры анатомии человека, кафедры морфологии, кафедры нормальной и патологической физиологии, кафедры биологии и биоэкологии медицинского факультета им. Т.З. Биктимирова ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет» Минобрнауки РФ (Ульяновск, 2015).

### **ПУБЛИКАЦИИ**

По теме диссертации опубликовано 14 работ, из них две статьи - в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук. Одна статья опубликована в журнале, индексируемом PubMed (США), приравненном к тому же перечню

согласно письму о «Перечне рецензируемых научных изданий» от 01.12.2015 г. № 13-6518 Департамента аттестации научных и научно-педагогических работников Минобрнауки РФ. Получен патент РФ на изобретение RU 2542438°C1 от 2.01.2015 года «Способ оценки качественных показателей эритроцитсодержащих сред в процессе хранения».

### **ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ РАБОТЫ В ПРАКТИКУ**

Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре морфологии медицинского факультета ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет» Минобрнауки РФ в курсе гистологии для студентов специальности «Лечебное дело» и «Педиатрия». В отделе контроля качества ГУЗ «Ульяновская областная станция переливания крови» Минздрава Ульяновской области внедрены методы определения биофизических и морфометрических показателей эритроцитов проб эритроцитсодержащей среды с помощью атомно-силового микроскопа.

### **ОБЪЁМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ**

Диссертация изложена на 132 страницах машинописного текста, содержит 12 таблиц, 47 рисунков, включает введение, обзор литературы, главы: «Материалы и методы исследования», «Результаты собственных исследований», «Обсуждение результатов исследования», выводы и практические рекомендации. Список литературы состоит из 168 источников: 63 отечественных и 105 иностранных авторов.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Исследованные пробы эритроцитсодержащей среды были заготовлены и исследованы гематологическими и биохимическими методами в ГУЗ «Ульяновская областная станция переливания крови» Минздрава Ульяновской области. Биофизические исследования проведены на базе объединённой лаборатории Научно-исследовательского технологического института ФГБОУ ВО «УлГУ» Минобрнауки РФ. Объектом исследования были пробы цельной крови и эритроцитсодержащей среды. При определении репрезентативности необходимого количества объектов и объёма измерений использовались рекомендации Г.Г. Автандилова (1991). Исследование

проводилось с помощью случайного бесповторного метода. Для изучения качественных показателей эритроцитсодержащей среды на основе стандартных для современной службы крови методов, отражающих её состав и уровень гемолиза (УГ), были отобраны образцы трансфузионной среды с различными сроками хранения (0, 1, 7, 14, 21 и 35 суток) в объёме 5 мл в одноразовые пробирки. Для определения гематологических показателей трансфузионных сред в настоящей работе был использован автоматический анализатор «Elite 3» (Erba Lachema, Чехия). Для определения УГ использовались приборы «МиниГем-540» (Техномедика, Россия) и «НемоСие» (НемоСие АВ, Швеция).

Наряду с гематологическими исследованиями для оценки состояния эритроцитов из проб цельной крови и трансфузионной среды готовились цитологические препараты для сканирования с помощью атомно-силового микроскопа (далее - АСМ) [Патент РФ № 2542438, 2015]. Фиксация проводилась на предметном стекле методом высушивания в течение 20 минут при комнатной температуре. Для АСМ-сканирования клеток нами использована стеклянная подложка. Изучение фиксированных препаратов в воздушной среде позволяет отказаться от использования жестких методов фиксации [Плескова, 2011]. Цитологические препараты трансфузионной среды были разделены на 5 серий. В первую были сгруппированы препараты эритроцитов, приготовленные из эритроцитсодержащих сред в день получения образцов. Во 2, 3, 4 и 5 группы были включены препараты эритроцитов, приготовленные из эритроцитсодержащих сред, находящихся на хранении в банке крови при  $t=4^{\circ}\text{C}$  в течение 7, 14, 21 и 35 суток соответственно. Исследованию подверглась и серия мазков цельной крови. При сканировании цитологических препаратов эритроцитов с помощью АСМ руководствовались рекомендациями Takeuchi et al. (1998). В настоящей работе использовался АСМ фирмы «NT-MDT» (Россия), модель «SOLVER P47-Pro». Количественная оценка ригидности поверхности объекта производилась с помощью вычисления модуля упругости Юнга (далее - МЮ) с использованием модели Герца. Полученные данные



обрабатывались с помощью компьютерной программы «Nova». Для исследования динамики изменений состава эритроцитарной популяции вычислялись средние значения МЮ каждой из исследованных клеток. Далее полученные средние значения МЮ эритроцитов распределялись по сформированным интервалам с шагом в 0,4 килопаскаль (далее - КПа). Вычислялся процент значений МЮ клеток, попавших в каждый интервал из всего массива измерений, далее значение вносилось в таблицу. Для создания изображений образцов применялся резонансный режим сканирования с генерируемой частотой 300 kHz. С помощью виртуальных инструментов программного обеспечения NOVA измерялись размеры эритроцитов выбранного участка поверхности препарата.

Общее количество параметров, исследованных в процессе проведённой работы, составило 19, общее число отобранных образцов – 235, общее количество измерений, включая измерение МЮ в 9 точках каждой сканируемой клетки, составило 3371. Статистическая обработка данных проводилась с использованием лицензионной программы «Statistica 8.0» (StatSoft Inc, США).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Проведённое исследование позволило на первом этапе получить ряд данных об изменениях ригидности мембран эритроцитов крови человека, связанных с добавлением антикоагулянта, фракционированием и охлаждением компонентов крови до +4°C. Было выявлено статистически значимое снижение средних арифметических значений МЮ эритроцитов образцов цельной крови человека с  $3,23 \pm 0,02$  КПа до  $1,81 \pm 0,02$  КПа. Полученные данные ригидности эритроцитов сходны с результатами, полученными группой исследователей во главе с М. Lekka (Lekka et al., 2005), которая установила значения МЮ эритроцитов крови здоровых людей с помощью АСМ, используя метод Герца. Полученные этими авторами значения МЮ составили  $3,6 \pm 0,4$  КПа. Кроме того, отмечено смещение границ и ширины интервала значений МЮ. Типичные для консервированной крови эритроциты со значениями МЮ в диапазоне от 2,4 КПа до 4,4 КПа не

встречаются в образцах трансфузионной среды, эритроциты которых имеют интервал распределения значений МЮ от 0,8 КРа до 2,4 КРа. Снижение МЮ эритроцитов цельной крови после консервации и фракционирования можно объяснить воздействием антикоагулянта CPDA-1 на мембрану. Невозможно исключить и влияние жесткого режима центрифугирования контейнеров с консервированной кровью, дальнейшего фракционирования с сепарацией жидкой части – плазмы, отделения лейкоцитарно-тромбоцитарного слоя (далее – ЛТС) и охлаждения до +4°C.

Перечисленные факторы оказывают влияние и на динамику гематологических показателей образцов цельной крови. Результаты настоящего исследования демонстрируют статистически значимое увеличение средних арифметических значений концентрации эритроцитов от  $5,28 \pm 0,4 \times 10^{12}/\text{л}$  до  $7,19 \pm 0,9 \times 10^{12}/\text{л}$ , концентрации гемоглобина в среде от  $149,7 \pm 0,5$  г/л до  $192,1 \pm 1,7$  г/л, гематокрита с  $45 \pm 0,2\%$  до  $61,7 \pm 0,5\%$ , широты распределения популяций эритроцитов по измеряемым параметрам от  $12,55 \pm 0,08\%$  до  $13,9 \pm 0,05\%$ . При этом отмечено снижение средней концентрации гемоглобина от  $331,7 \pm 0,9$  г/л до  $313,91 \pm 0,75$  г/л и средних значений содержания гемоглобина в эритроците от  $28,25 \pm 0,3$  пг до  $26,9 \pm 0,2$  пг. Это можно объяснить разрушением части эритроцитов и выходом гемоглобина в межклеточное пространство трансфузионной среды во время центрифугирования и фракционирования.

Процедура фракционирования включает в себя тромбо- и лейкодеплецию, что направлено на минимизацию разрушительного действия активных ферментов тромбоцитов и лейкоцитов на мембраны хранящихся эритроцитов [Хапман, Ламзин, Брыляева, 2011]. Однако, согласно показаниям гематологического анализатора, полного удаления ЛТС не происходит, и, более того, некоторое число клеток лейкоцитарного ряда персистирует в среде вплоть до последних дней хранения. Средние арифметические значения концентрации тромбоцитов, согласно полученным результатам, снизились от  $208,8 \pm 16,3 \times 10^9/\text{л}$  до  $0,8 \pm 0,4 \times 10^9/\text{л}$ , лейкоцитов от  $6,02 \pm 0,31 \times 10^9/\text{л}$  до  $2,84 \pm 0,66 \times 10^9/\text{л}$ , лимфоцитов от  $2,1 \pm 0,12 \times 10^9/\text{л}$  до

$0,5\pm 0,13\times 10^9/\text{л}$ , моноцитов от  $0,61\pm 0,03\times 10^9/\text{л}$  до  $0,28\pm 0,05\times 10^9/\text{л}$ . Процентная концентрация этих показателей также снижалась.

На этом этапе исследования проводилась также сравнительная оценка формы эритроцитов, измерения их диаметра и толщины с помощью АСМ. На изображениях препаратов образцов цельной крови и трансфузионной среды в первые сутки хранения подавляющее большинство клеток – дискоциты типичной двояковогнутой формы. Установлено, что процесс получения трансфузионной среды не оказывает существенного влияния на форму эритроцитов. Средние арифметические значения диаметра незначительно возрастают от  $9,23\pm 0,48$  мкм до  $9,67\pm 0,55$  мкм, а средние значения толщины эритроцитов не подвергаются существенным изменениям. Это косвенно подтверждают результаты работ Т.Л. Verezhina и соавторов (2002), которые показали, что значительные изменения формы эритроцитов выявляются только через 2 недели хранения образцов цельной крови.

На втором этапе было исследовано 5 серий образцов трансфузионной среды, отобранных из банка крови с интервалом срока хранения 7 суток. В отделах контроля качества станций заготовки и переливания крови РФ обязательными для измерения в исследуемых образцах являются уровень гемоглобина, гематокрит, концентрация эритроцитов, лейкоцитов, лимфоцитов и тромбоцитов. Средние арифметические значения концентрации лейкоцитов в дозе трансфузионной среды постепенно снижались в процессе хранения образцов в банке крови в течение 35 суток от  $2,84\pm 0,66\times 10^9/\text{л}$  в первой серии образцов и до  $1,4\pm 0,28\times 10^9/\text{л}$  в пятой серии образцов, соответственно. Средние арифметические значения концентрации и относительной концентрации лимфоцитов в трансфузионной среде также постепенно снижались в процессе хранения от  $0,5\pm 0,13\times 10^9/\text{л}$  (9%) в первой серии образцов и до  $0,02\pm 0,08\times 10^9/\text{л}$  (7,8%) в пятой серии образцов, соответственно. Однофакторный дисперсионный анализ этих показателей в настоящем исследовании не выявил статистически значимой динамики.

Изменения средних арифметических значений концентрации эритроцитов в образцах трансфузионной среды в процессе их хранения

отражались в постепенном статистически значимом снижении уровня рассматриваемого параметра в течение всего срока хранения от  $7,18 \pm 0,1 \times 10^{12}/\text{л}$  до  $6,21 \pm 0,21 \times 10^{12}/\text{л}$ . Средние арифметические значения гематокрита в первые сутки составили  $61,3 \pm 0,5\%$ . Далее наблюдалось постепенное снижение этого показателя в течение последующего хранения в течение 35 суток до  $54,9 \pm 1,8\%$ . Однофакторный дисперсионный анализ значений гематокрита на разных сроках хранения эритроцитсодержащей среды не продемонстрировал статистически значимой общей динамики. Средние арифметические значения концентрации гемоглобина в образцах трансфузионной среды в процессе хранения демонстрировали статистически значимое изменение этого показателя от  $192,1 \pm 1,7 \text{ г/л}$  в первые сутки хранения до  $162,5 \pm 4,2 \text{ г/л}$  к концу срока хранения. Это явление, по-видимому, связано с тем, что при нарастании необратимых и критических повреждений плазмалеммы эритроцитов происходит её разрушение и лизис.

В целом использование гематологического анализатора, работа которого основана на методе кондуктометрии клеток, для исследования качественных параметров трансфузионной среды различного срока хранения, оценки функциональных и морфометрических показателей её эритроцитов демонстрирует ряд проблем. Во-первых, это трудности в толковании полученных результатов с учётом факта, что соответствующие приборы предназначены для анализа проб цельной крови, которая как по составу, так и по свойствам существенно отличается от эритроцитсодержащих среды. Во-вторых, несмотря на изменения значений основных гематологических показателей, результаты ANOVA-однофакторного дисперсионного анализа с тестом Бонферрони не выявляют статистической значимости этих изменений. Необходимость применения микроскопии при наличии в образце большого количества изменённых клеток отмечается в работе Э.М. Шакировой и Э.И. Земляковой (2011). Другим стандартным методом оценки качества образцов трансфузионной среды является определение уровня гемолиза (далее – УГ). Этот показатель косвенно, на основе значений концентрации «внеэритроцитарного» гемоглобина в образце трансфузионной

среды, позволяет судить о процентном соотношении гемолизированных и сохранивших свою целостность эритроцитов. Полученные результаты продемонстрировали рост средних арифметических значений уровня гемолиза образцов трансфузионной среды в процессе хранения от  $0,07 \pm 0,10\%$  в первой серии образцов до  $0,47 \pm 0,22\%$  в пятой серии образцов ( $p < 0,000$ ). Значения уровня гемолиза объективно демонстрируют количество гемолизированных эритроцитов *in vitro*, но не позволяют непосредственно судить о состоянии эритроцитов, сохранивших свою целостность.

Для непосредственной характеристики состояния эритроцитов образцов трансфузионной среды во время их хранения был выбран биофизический параметр – модуль Юнга. В процессе хранения образцов трансфузионной среды в течение 35 суток отмечался почти двукратный рост МЮ эритроцитов от  $1,81 \pm 0,02$  КПа до  $3,23 \pm 0,02$  КПа,  $F=442$  при  $p < 0,000$  [Ламзин, Хайруллин, 2014] (см. рис. 1). Группой авторов во главе с Н.И. Николаевым [Nikolaev et al., 2013] на примере стволовых клеток показана аналогичная тенденция динамики МЮ с выраженным ростом значений этого показателя в процессе хранения клеточных культур. Для характеристики корреляции динамики значений биофизического показателя эритроцитов - МЮ и стандартного показателя качества трансфузионной среды - УГ был рассчитан коэффициент корреляции по Пирсону. Выявлена слабая корреляция значений МЮ и УГ  $r=0,4$  при  $p < 0,000$ .

Используя значения МЮ, полученные с помощью АСМ, в качестве критерия разнородности (гетерогенности), эритроцитную взвесь в среде можно рассматривать как соотношение разных эритроцитарных субпопуляций. Значения МЮ эритроцитов каждой из серий образцов были распределены по интервалам с шагом в  $0,4$  КПа. Было установлено, что эритроцитарная популяция как в день консервации, так и на всём протяжении стандартного срока хранения сохраняет высокую степень разнородности [Ламзин, Хайруллин, Хапман, 2014] (рис. 2). В первый день хранения 20% сканированных эритроцитов имели значения МЮ в интервале  $0,8 - 1,6$  КПа. Эритроциты со значениями МЮ от  $0,8$  до  $1,6$  КПа были характерны

исключительно для первой серии образцов среды и не встречались в других сериях образцов. Во второй серии образцов происходило постепенное смещение значений МЮ с появлением 12% клеток, не встречающихся в первой серии образцов, значения МЮ которых попадали в интервал 2,4 – 2,8 КРа. Через 14 суток хранения менялось распределение популяций эритроцитов по сформированным интервалам без появления новых значений МЮ. На 21 сутки хранения уже 20% эритроцитов попадали в ранее не встречавшийся интервал значений МЮ от 2,8 до 3,2 КРа. Отличительной особенностью пятой серии проб (35 суток хранения) от других серий явилось появление 55,3% эритроцитов, находящихся в интервале значений МЮ от 3,2 КРа до 4,4 КРа и не встречающихся в других сериях проб. В качестве критерия гетерогенности эритроцитарных популяций, значения МЮ в интервале от 3,2 КРа до 4,4 КРа следует рассматривать как маркер старения эритроцитов трансфузионных сред.

Гетерогенность эритроцитарных популяций, выявленная в настоящей работе, наблюдается во всех сериях исследованных образцов. Это явление, по-видимому, обусловлено тем, что изначально в кровотоке и после консервации в трансфузионных средах присутствуют клетки различного возраста и состояния. Подобные результаты высокой разнородности эритроцитарной популяции находят своё подтверждение в работах, впервые проведённых В.Г. Леоновой В.Г. (1987).

Расширение интервала распределения эритроцитарных популяций с течением времени можно объяснить неравномерным распределением энергетических резервов межклеточной среды вследствие оседания клеток на дно пластикового контейнера при его хранении в банке крови, а также критическим нарушением адаптационных свойств наиболее старых эритроцитов. Приведённое объяснение соотносится с данными М. Foller и соавторов [Foller et al., 2008], демонстрирующими, что снижение уровня АТФ приводит к замедлению активности  $Ca^{2+}$ -активируемых калиевых каналов, вследствие чего происходит поляризация мембраны, образование выростов и гибель клетки.

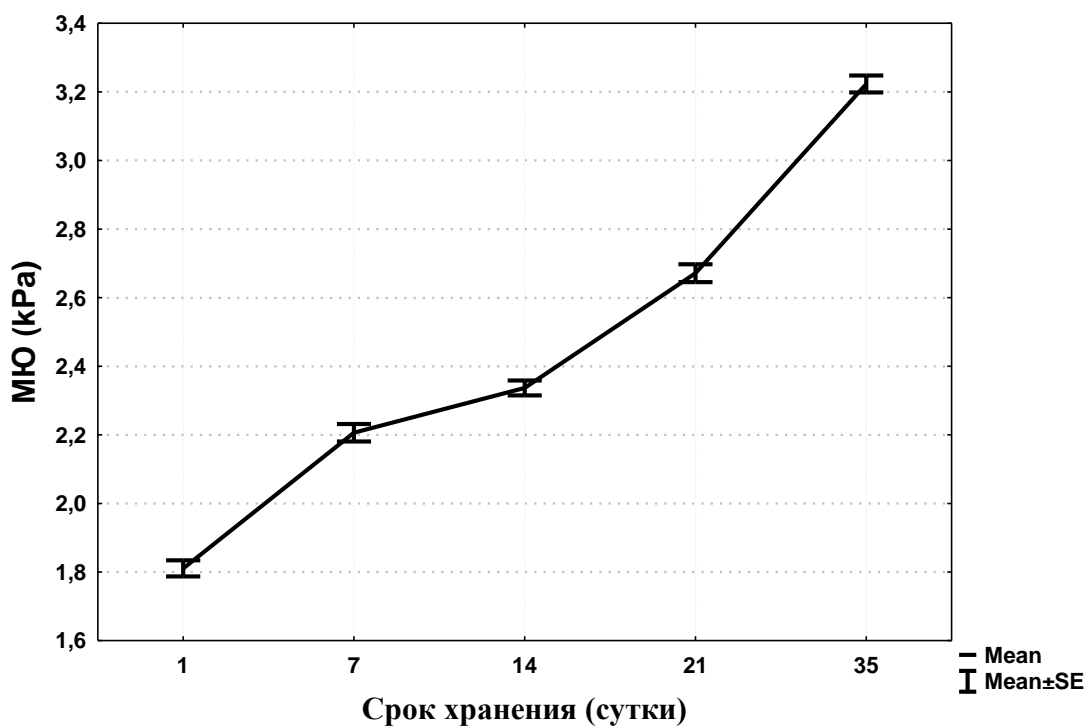


Рис. 1. Диаграмма динамики значений МЮ эритроцитов образцов трансфузионной среды в процессе их хранения (Mean – среднее арифметическое значение, SE – стандартная ошибка).

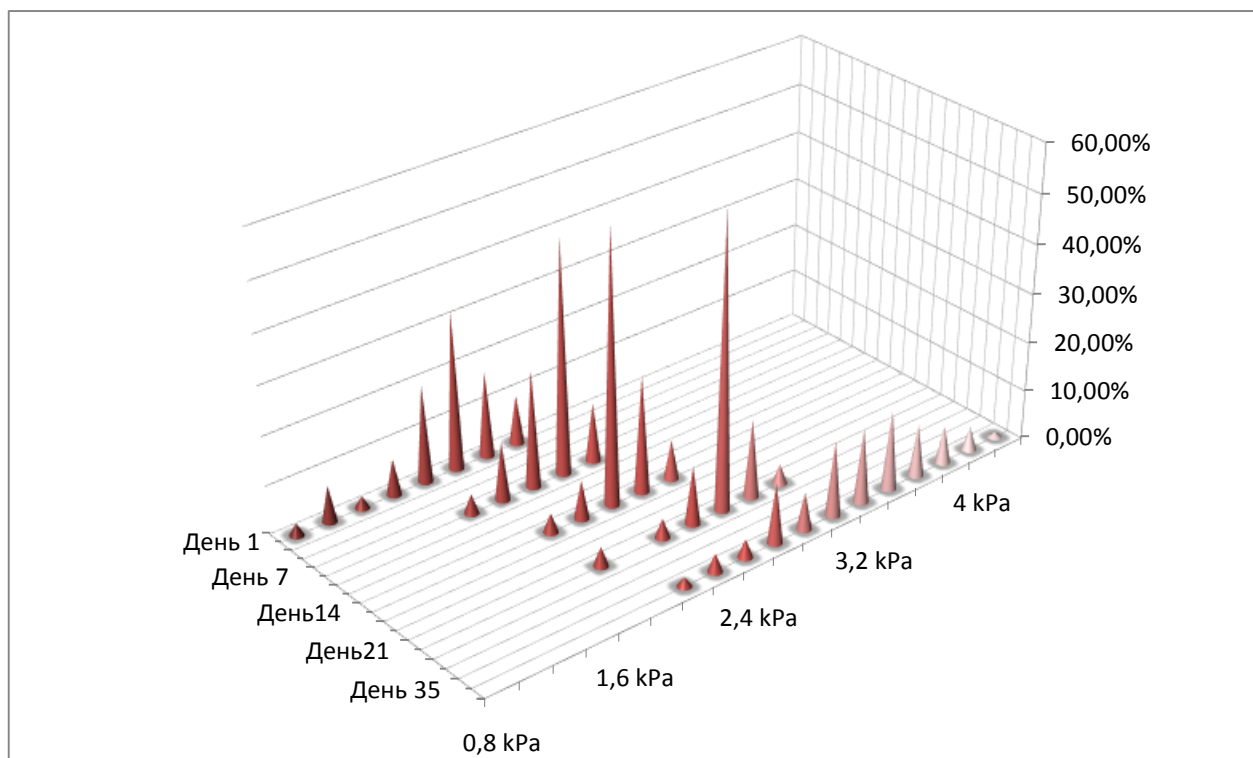


Рис. 2. Сводная диаграмма структуры эритроцитарных популяций проб трансфузионной среды по значениям МЮ на различных сроках хранения.

Использование АСМ в проведённом исследовании позволило также оценить и динамику изменений формы эритроцитов в образцах трансфузионной среды различного срока хранения. Установлено, что форма консервированных эритроцитов в процессе длительного хранения по данным АСМ претерпевает изменения, аналогичные изменениям, выявляемым при оптической микроскопии. На препарате трансфузионной среды, полученном в первые сутки хранения, форма эритроцитов типичная, дисковидная, с характерной впадиной в центре (рис. 3). Форма основной части эритроцитов второй серии образцов также типичная, дисковидная, однако, часть эритроцитов утрачивает двояковогнутость (планоциты). Эритроциты образцов трансфузионной среды после 14 суток хранения теряют двояковогнутую форму, отмечается появление планоцитов, стоматоцитов и отдельных эхиноцитов. Форма эритроцитов четвертой серии образцов трансфузионной среды (21 сутки хранения) – эхиноциты и сфероциты. Форма всех наблюдаемых эритроцитов после 35 суток хранения существенно изменена, на препарате представлены исключительно эхиноциты и сферозехиноциты (рис. 4). В.В. Мороз и соавт. [Мороз и др., 2012] в своей работе исследовали с помощью АСМ динамику морфологических изменений эритроцитов консервированной крови в процессе хранения её при 4°C, и отметили тотальный эхиноцитоз на 14 сутки. Разница в полученных результатах может быть связана с различиями в составе исследованных сред. В настоящем исследовании использована не консервированная кровь, а эритроцитсодержащая среда.

Учитывая дискообразную форму эритроцитов, для характеристики её изменений нами были выбраны 2 морфометрических параметра – диаметр и толщина. Измерения морфометрических показателей эритроцитов показали постепенное статистически значимое снижение средних арифметических значений их диаметра от  $9,67 \pm 0,55$  мкм до  $7,59 \pm 1,07$  мкм и рост средних арифметических значений толщины эритроцитов от  $0,49 \pm 0,09$  мкм



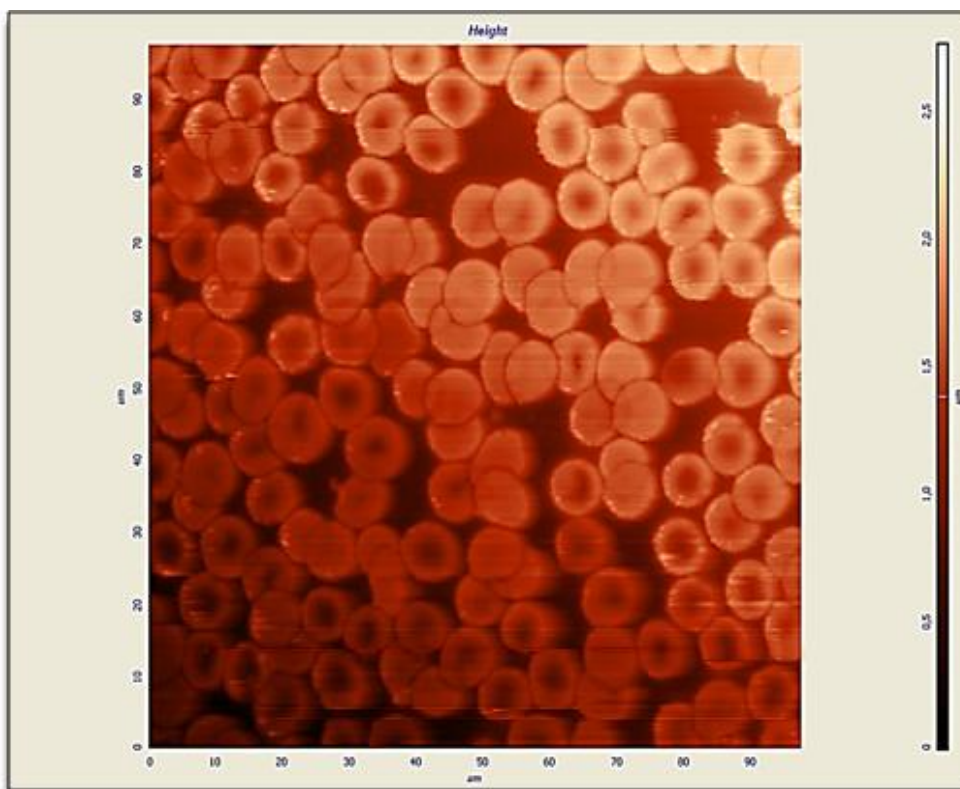


Рис. 3. АСМ изображение сухого препарата образца трансфузионной среды в первые сутки хранения.

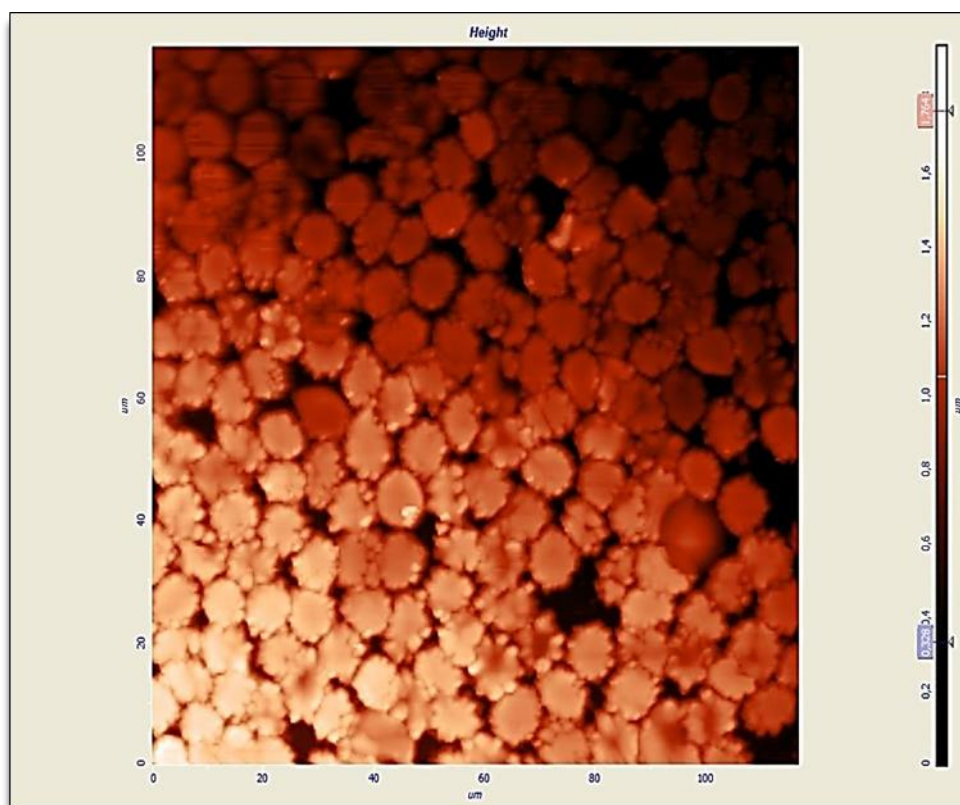


Рис. 4. АСМ изображение сухого препарата образца трансфузионной среды после 35 суток хранения.

до  $0,65 \pm 0,13$  мкм в процессе их хранения, что демонстрирует типичные изменения формы с нарастанием сферичности.

Выявленное отрицательное значение коэффициента корреляции МЮ и диаметра эритроцитов ( $r = -0,52$ ) свидетельствует об обратной зависимости между этими параметрами, в то время как динамика толщины эритроцитов и их МЮ имеет прямую зависимость ( $r = 0,29$ ). Корреляция непосредственно измеряемых морфометрических показателей эритроцитов с МЮ, отражает как влияние формы эритроцита (нарастание сферичности) на результаты контактного АСМ-сканирования объекта вследствие изменения угла нажатия кантилевера, так и то, что обе эти характеристики являются проявлениями общих процессов старения эритроцитов. Таким образом, по выраженности изменений формы эритроцитов и их биофизических свойств можно объективно судить о деструктивных процессах старения мембраны и цитоскелета, которые ещё не приводят к гемолизу эритроцитов. Таким образом, в результате проведенного АСМ-сканирования получены статистически достоверные результаты изменения МЮ эритроцитов, хранящихся в виде клеточной взвеси, состав которой значительно отличается от состава цельной крови. Заготовка, консервация крови, охлаждение трансфузионной среды и её хранение в течение 35 суток приводят к статистически значимым изменениям показателей состояния эритроцитов. Проведённое исследование демонстрирует, что измерение МЮ эритроцитов и их морфометрических показателей с помощью АСМ может служить дополнительным методом оценки состояния образцов трансфузионных сред.

## **ВЫВОДЫ**

1. В процессе консервации крови, её фракционирования и охлаждения полученной трансфузионной среды до  $4^{\circ}\text{C}$  выявлено статистически значимое снижение значений модуля Юнга эритроцитов от  $3,23 \pm 0,02$  КПа до  $1,81 \pm 0,02$  КПа и изменение структуры эритроцитарной популяции по этому показателю.

2. С помощью атомно-силовой микроскопии установлено статистически значимое увеличение значений модуля Юнга эритроцитов трансфузионной среды в течение 35 суток хранения от  $1,81 \pm 0,02$  КПа до  $3,23 \pm 0,02$  КПа.

3. Выявлено выраженное нарастание неоднородности структуры эритроцитарной популяции в процессе хранения трансфузионной среды в течение 35 суток и смещение интервалов значений модуля Юнга эритроцитов от 0,8 КПа - 2,4 КПа в первый день хранения до 2,0 КПа - 4,4 КПа в последний день хранения.

4. В процессе исследования установлено статистически значимое уменьшение средних арифметических значений диаметра эритроцитов от  $9,67 \pm 0,55$  мкм до  $7,59 \pm 1,07$  мкм и увеличение средних значений толщины эритроцитов от  $0,49 \pm 0,09$  мкм до  $0,65 \pm 0,13$  мкм в образцах трансфузионной среды в процессе хранения в течение 35 суток.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. В качестве дополнительного метода оценки состояния эритроцитов образцов эритроцитсодержащей трансфузионной среды в процессе её хранения рекомендуется использовать метод атомно-силовой микроскопии с определением модуля Юнга эритроцитов, оценкой их формы и морфометрических показателей.

2. Для оценки динамики показателей эритроцитов трансфузионной среды в процессе её хранения в течение 35 суток рекомендуются следующие референсные величины: увеличение модуля Юнга эритроцитов на 78,5% и их толщины на 32,6% от исходных значений первых суток хранения, а также снижение значения диаметра эритроцитов на 21,5%.

3. Полученные данные о динамике биофизических и морфометрических показателей эритроцитов дают основания для пересмотра и оптимизации условий и сроков хранения контейнеров эритроцитсодержащей трансфузионной среды в банке крови учреждений трансфузиологической службы.

## СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Брыляева Е.В., Хапман М.Э., **Ламзин И.М.**, Курамшин А.В. Криоконсервация эритроцитов как один из методов обеспечения иммунологической и инфекционной безопасности гемотрансфузий/ Е.В. Брыляева, М.Э. Хапман, И.М. Ламзин, А.В. Курамшин// Вестник гематологии.- Т. 7.- № 4.- 2011.- С. 55–56.
2. Хапман М.Э., Брыляева Е.В., **Ламзин И.М.**, Курамшин А.В. Вирусинактивация как метод обеспечения безопасных трансфузий отдельных компонентов крови как альтернатива вирусдиагностики/ М.Э. Хапман, Е.В. Брыляева, И.М. Ламзин, А.В. Курамшин// Вестник гематологии.- Т. 7.- № 4.- 2011.- С. 66.
3. Хапман М.Э., **Ламзин И.М.**, Брыляева Е.В. Лейкофилтрация как метод повышения безопасности трансфузии эритроцитсодержащей среды/ М.Э. Хапман, И.М. Ламзин, Е.В. Брыляева// Вестник гематологии. - Т.7.- №4. - 2011. - С. 66–67.
4. Дементьева Ю.Н., Кусельман А.И., Светухин В.В., Нагорнов Ю.С., Костишко Б.Б., **Ламзин И.М.** Морфология эритроцитов при гипоксических состояниях у новорожденных/ Ю.Н. Дементьева, А.И. Кусельман, В.В. Светухин, Ю.С. Нагорнов, Б.Б. Костишко, И.М. Ламзин// В кн.: Матер. VII Росс. науч.-практ. конф. с элемент. науч. шк. для молодёжи «Модниковские чтения». Онкология сегодня: пациент, государство, медицинское сообщество.- Ульяновск: УлГУ, 2011.- С. 91-94.
5. Курамшин А.В., Хапман М.Э., Брыляева Е.В., **Ламзин И.М.** Заготовка донорской крови в выездных условиях СПК/ А.В. Курамшин, М.Э. Хапман, Е.В. Брыляева, И.М. Ламзин// В кн.: Матер. Всеросс. науч.-практ. конф. по клин. разд. в трансфузиологии: «Трансфузиология 21 века: проблемы, задачи, перспективы развития». «День трансфузиолога», г. Казань, 2012 г.- Казань, 2012.- С. 19-21.
6. Брыляева Е.В., Хапман М.Э., Курамшин А.В., **Ламзин И.М.** Криоконсервация клеток крови/ Е.В. Брыляева, М.Э. Хапман, А.В.

Курамшин, И.М. Ламзин// В кн.: Матер. Всеросс. науч.-практ. конф. по клин. разд. в трансфузиологии: «Трансфузиология 21 века: проблемы, задачи, перспективы развития». «День трансфузиолога», г. Казань, 2012 г.- Казань, 2012.- С. 60-62.

7. **Ламзин И.М.,** Хапман М.Э., Брыляева Е.В. О повышении качества эритроцитсодержащих сред/ И.М. Ламзин, М.Э. Хапман, Е.В. Брыляева// В кн.: Матер. Всеросс. науч.-практ. конф. по клин. разд. в трансфузиологии: «Трансфузиология 21 века: проблемы, задачи, перспективы развития». «День трансфузиолога», г. Казань, 2012 г.- Казань, 2012.- С.62-64.

8. Брыляева Е.В., Крюков Н.Н., Жестков А.В., Хапман М.Э., Курамшин А.В., **Ламзин И.М.** Возможность прогнозирования предрасположенности/ резистентности к обструктивным заболеваниям легких на основании иммуногенетических исследований/ Е.В. Брыляева, Н.Н. Крюков, А.В. Жестков, М.Э. Хапман, А.В. Курамшин, И.М. Ламзин// В кн.: Матер. Всеросс. науч.-практ. конф. по клин. разд. в трансфузиологии: «Трансфузиология 21 века: проблемы, задачи, перспективы развития». «День трансфузиолога», г. Казань, 2012 г.- Казань, 2012.- С. 162-163.

9. **Ламзин И.М.,** Хайруллин Р.М. Изменение биофизических свойств эритроцитов эритроцитсодержащих сред в процессе хранения по данным атомно-силовой микроскопии/ **И.М. Ламзин,** Р.М. Хайруллин// Саратовский научно-медицинский журнал.- Т. 10.- № 1.- 2014.- С. 44–48.

10. **Ламзин И.М.,** Хайруллин Р.М., Хапман М.Э. Оценка структуры популяции эритроцитсодержащих сред, находящихся на хранении в банке крови, по данным атомно-силовой микроскопии/ **И.М. Ламзин,** Р.М. Хайруллин, М.Э. Хапман// Вестник современной клинической медицины.- Т. 7.- № 5.- 2014.- С. 16–20.

11. Khayrullin R., **Lamzin I.** The heterogeneity of the erythrocyte population of stored red blood cells probed using atomic force microscopy. In:

109<sup>th</sup> Annual Meeting Deutsche Anatomische Gesellschaft, September 24–27. Salzburg, Austria, 2014: Abstract 79.

12. **Ламзин И.М.**, Хайруллин Р. М, Хапман М.Э. Сравнительная характеристика методов оценки качества эритроцитсодержащих сред/ И.М. Ламзин, Р.М. Хайруллин, М.Э. Хапман// Матер. научн.-практ. конф. «Современные технологии в производственной и клинической трансфузиологии» г. Пенза, 14 ноября, 2014 г.– Пенза, 2014.- С. 40-42.

13. **Lamzin I, Khayrullin R. The quality assessment of stored red blood cells probed using atomic force microscopy. Anatomical Research International. 2014; Article ID 869683, 5pp. doi:10.1155/2014/869683. PUBMED ID: 25610651**

14. **Ламзин И.М.**, Хайруллин Р.М., Костишко Б.Б. Способ оценки качественных показателей эритроцитсодержащих сред в процессе их хранения. Патент РФ № 2542438 от 21.01.2015 г.

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ**

**АСМ** – атомно-силовой микроскоп(ия)

**АТФ** – аденозинтрифосфорная кислота

**ЛТС** - лейкоцитарно-тромбоцитарный слой

**МЮ** – модуль Юнга

**УГ** – уровень гемолиза

**Трансфузионная среда** – эритроцитсодержащая среда, в частности, эритроцитная масса с удалённым лейкоцитарно-тромбоцитарным слоем