Министерство здравоохранения Российской Федерации

Федеральное медико-биологическое агентство

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства»

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ТРАНСФУЗИОЛОГИИ, ОНКОГЕМАТОЛОГИИ И КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием

3-4 октября 2017 года

Киров – 2017

Овсепян В. А., Сарпова М. В., Зотина Е. Н., Минаева Н. В., Загоскина Т. П. **Прогностическое значение содержания клеток с изолированной интерстициальной делецией 13q14 при хроническом лимфолейкозе** 188

Сёмочкин С. В., Желнова Е. И., Юрова Е. В., Гаглоева Д. Э., Архипова Н. В., Толстых Т. Н., Мисюрина Е. Н. **Эффективность лечения впервые диагностированной множественной миеломы, осложненной диализ-зависимой почечной недостаточностью** 193

Сергеева Л. Г., Целоусова О. М., Васкина Е. А., Татаурова И. П. **Заболеваемость острыми лейкозами детского населения Кировской области за период 2002-2016 гг.** 197

Федоровская Н. С., Росин В. А., Дьяконов Д. А., Минаева Н. В., Лагунова О. Р., Самарина С. В., Целоусова О. М., Парамонов И. В. **Анализ структуры и частоты встречаемости неходжкинских лимфом в Кировской области** 206

Чеботкевич В. Н., Бессмельцев С. С., Киселева Е. Е., Кайтанджан Е. И., Стижак Н. П., Бурылев В. В. **Клинические и этиологические особенности вирусно-бактериальных инфекционных осложнений у больных гемобластозами** 211

Черепанова В. В, Курыщева М. А. **Острые порфирии** 216

Вопросы трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

Бутина Е. В., Зайцева Г. А., Зорина Н. А., Минаева Н. В., Хоробрых М. Н., Коряковцева Т. А. **Анализ посттрансплантационного химеризма на основании исследования антигенов эритроцитов** 224

Бутина Е. В., Зайцева Г. А., Зорина Н. А., Минаева Н. В., Хоробрых М. Н., Киселева А. Н. **Определение посттрансплантационного химеризма при анализе генов F2, F5, F7, F13, FGB, ITGA2, ITGB3, PAI-1, MTHFR: 677, MTHFR: 1298, MTR, MTRR** 229

Исаева Н. В., Утемов С. В., Минаева Н. В., Ветошкин К. А., Костяев А. А., Шерстнев Ф. С. **Результаты оценки жизнеспособности лейкоцитов в лейкоконцентратах, содержащих гемопоэтические стволовые клетки** 234

Логинова М. А., Парамонов И. В., Рылов А. В. **Новый аллель локуса HLA-C, HLA-C*06:02:48, выявленный у бурят** 241

Минаева Н. В., Ветошкин К. А., Исаева Н. В., Утемов С. В. **Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки: свойства, источники получения и перспективы применения в трансплантологии** 245

Хоробрых М. Н., Минаева Н. В., Зорина Н. А., Лучинин А. С., Лагунова О. Р., Докшина И. А., Исаева Н. В., Утемов С. В., Ветошкин К. А., Парамонов И. В. **Эффективность режима кондиционирования высокими дозами мелфалана с бортезомибом при аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у пациентов с множественной миеломой** 252

УДК 57.043: 616.155.1

НЕГАТИВНЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ПЕРЕЛИВАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ЗНАЧИТЕЛЬНОЙ КРОВОПОТЕРЕ И ВОЗМОЖНЫЕ ПОДХОДЫ К ИХ КОРРЕКЦИИ

Рамазанов В. В., Воловельская Е. Л., Бондаренко В. А.
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина
(Харьков.юХолодногорский район, Переяславская улица, 23)

THE NEGATIVE EFFECTS OF TRANSFUSION OF ERYTHROCYTES WITH SIGNIFICANT BLOOD LOSS AND POSSIBLE APPROACHES TO THEIR CORRECTION

Ramazanov V. V., Volovelskaya E. L., Bondarenko V. A.
Institute Problems for Cryobiology and Cryomedicine NAS of Ukraine, Kharkov, Ukraine
(Kharkov, Holodnogorsko district, Pereyaslavskaya street, 23)
E-mail: ramazanov.viktor@mail.ru

Разрабатывается способ криоконсервирования эритроцитов в среде с невысоким содержанием NaCl (0,3%), который может обеспечить сохранение морфо-трансформирующей функции клеток и их основных биохимических показателей (глутатион, АТФ и 2,3-ДФГ). Данный способ позволит получить криоконсервированные эритроциты, которые при массивной трансфузии не будут значительно разрушаться, что снизит вероятность развития системного воспаления.

Ключевые слова: *криоконсервирование, эритроциты, морфология, биохимические показатели*

A method for cryopreservation of erythrocytes in a medium with a low content of NaCl (0,3%) is developed, which can ensure preservation of the morpho-transforming function of cells and their basic biochemical parameters (glutathione, ATP and 2,3-DPG). This method will allow obtaining cryopreserved erythrocytes, which will not be significantly destroyed during massive transfusion. This will reduce the likelihood of developing systemic inflammation.

Keywords: *cryopreservation, erythrocytes, morphology, biochemical indices*

У пациентов с тяжелой травмой или пациентов, перенесших операцию на сердце, при массивной трансфузии эритроцитов, хранившихся в гипотермических условиях при 4°С (ГТХ-эритроциты), отмечаются негативные последствия и летальный исход, связанные с развитием посттрансфузионного системного воспаления [11]. Было высказано предположение о том, что освобождение ионов железа при разрушении ГТХ-эритроцитов макрофагами селезенки и печени инициирует воспалительный процесс посредством действия активных форм кислорода. Кроме того, повышение уровня циркулирующего несвязанного железа при разрушении эритроцитов способствует развитию «феррофильных» грамотрицательных бактерий, и это является недооцененным фактором неблагоприятных последствий переливания ГТХ-эритроцитов [10].

Подходом к ослаблению посттрансфузионного воспалительного ответа может быть использование хелатора ионов железа дефероксамина. На мышах было показано, что введение данного средства приводит к ингиби-

рованию развития воспалительного процесса, индуцированного переливанием ГТХ-эритроцитов [4]. Для предотвращения тяжелых последствий переливания эритроцитов было рекомендовано их хранение при 4°С в специальных растворах не более 2 недель. Замораживание и хранение эритроцитов в жидком азоте (–196°С) позволяет исключить длительное гипотермическое хранение и предотвратить серьезные побочные реакции, включая развитие воспаления. Однако даже при аутотрансфузии эритроцитов после их замораживания глицериновым методом с последующим кратковременным гипотермическим хранением (3 суток) среднее посттрансфузионное значение выживаемости клеток в течение последующих 24 часов составляло 75% [11]. Значительная часть ГТХ-эритроцитов (25%) после переливания разрушается в ретикулоэндотелиальной системе селезенки и печени. Возможно, данный внесосудистый гемолиз эритроцитов определяется их повреждением при использовании криоконсерванта на основе глицерина, так как при замораживании-оттаивании эритроцитов в данной среде отмечается потеря АТФ более чем на 50% [7].

Решение вопроса сохранения уровня АТФ при замораживании может быть связано с использованием комбинированных криоконсервантов, содержащих непроникающие и проникающие криопротекторы. Показано, что замораживание в среде с декстраном приводит к потере АТФ до 44,8%. В то же время использование среды, содержащей декстран и 1,2-пропандиол (1,2-ПД), обеспечивает сохранение АТФ на уровне 74,6% [2]. Установлено, что использование среды с сахарозой и проникающим криопротектором (ДМСО или 1,2-ПД) с невысоким содержанием NaCl (0,3%) при замораживании эритроцитов обеспечивает устойчивость клеток к действию осмотического стресса на стадии оттаивания. Замораживание в подобных средах обеспечивает сохранение осмотических характеристик эритроцитов [1].

В настоящей работе определяли морфологию и содержание главных биохимических соединений эритроцитов после замораживания в среде с 1,2-ПД, сахарозой и невысоким содержанием NaCl.

Степень повреждения эритроцитов, отмытых изотоническим раствором (0,9% NaCl), после замораживания в среде, содержащей 22% 1,2-ПД, 10% сахарозы и 0,3% NaCl составляла 5%. Замороженные эритроциты по осмотической хрупкости незначительно отличаются от интактных клеток. Морфологический анализ показал, что в изотонической среде (0,9% NaCl), интактные эритроциты представлены в основном стоматоцитами, а замороженные клетки – эхиноцитами и сфероэхиноцитами. Включение в среду альбумина (2%) вызывает изменение формы интактных клеток на дискоциты (нормоциты), а замороженных – на дискоцитоподобные (70%), стоматоциты (20%) и сфероэхиноциты (10%) (рис). Следовательно, морфо-трансформирующая функция замороженных эритроцитов, которая особенно необходима в условиях микроциркуляции в тканях, сохраняется в удовлетворительном состоянии. Возможно, при включении таких эритроцитов в

систему циркуляции крови клетки восстановят свои функции.

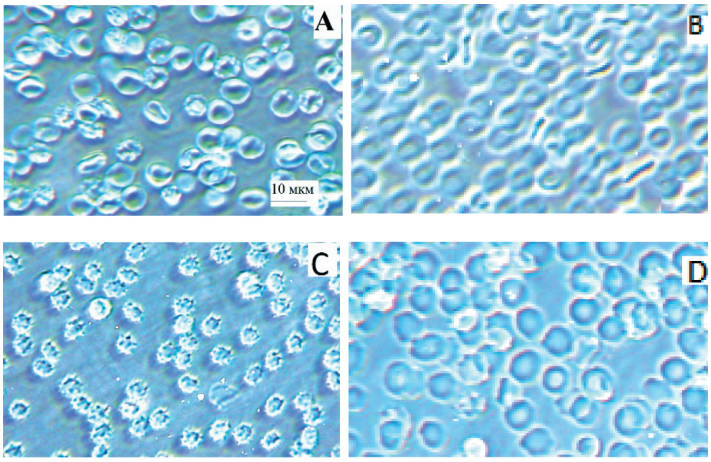


Рисунок. Морфология эритроцитов в среде, содержащей 0,9% NaCl:
A, B – интактные клетки; C, D – замороженные клетки.
B, D – в среду добавлен альбумин (2%)

Содержание глутатиона (GSH) в отмытых после замораживания-оттаивания эритроцитах существенно не изменяется по сравнению с интактными клетками (табл.). После замораживания-оттаивания эритроцитов (без отмывания) отмечается незначительное снижение содержания главных фосфоорганических соединений (АТФ, 2,3-ДФГ) (табл.).

У больных с неотложным состоянием при переливании ГТХ-эритроцитов не всегда нормализуется гемодинамика и поставка кислорода в ткани [8], что может быть связано с потерей 2,3-ДФГ или со снижением уровня АТФ в клетках при хранении [5, 8]. В системе микроциркуляции в тканях из эритроцитов высвобождается АТФ, связывается с рецепторами на эндотелиальных клетках и стимулирует повышение уровня оксида азота (NO). Это способствует дилатации микрососудов и поставке кислорода в ткани [8]. До 10% GSH в эритроцитах находится в состоянии нитрозоглутатиона, посредством которого происходит образование других нитрозотиолов, в том числе нитрозогемоглобина. GSH может регенерировать NO и тем самым выполнять буферную функцию в качестве резервного источника NO. При низком давлении кислорода нитрозогемоглобин посредством реакции транснитрозилирования передает молекулу NO на SH-группу белка полосы 3 с последующим высвобождением в плазму. Кроме того, белок полосы 3 опосредует высвобождение в плазму нитрозотиолов, которые поставляют NO в эндотелиальные клетки и, таким образом, система нитрозотиолов эритроцитов обеспечивает значительный вклад в механизм дилатации микрососудов тканей в условиях микроциркуляции [6]. Потеря GSH при хранении эритроцитов приводит к уменьшению уровня нитрозогемоглобина. Такие эритроциты теряют способность к релаксации сосудов [9]. Весомая доля осложнений, которые возникают при переливании ГТХ-эритроцитов при нормальном уровне АТФ и 2,3-ДФГ, может быть связана с нарушением в системе нитрозотиолов из-за недостатка GSH [3].

Таблица.

Биохимические показатели эритроцитов после замораживания-оттаивания в среде, содержащей 22% 1,2-ПД, 10% сахарозы и 0,3% NaCl

Образцы эритроцитов	GSH, мкмоль/г Hb	АТФ, мкмоль/г Hb	2,3-ДФГ, мкмоль/г Hb
Интактные	8,78±1,25 (100%)	3,47±0,55 (100%)	10,42±1,32 (100%)
Замороженные	7,88±1,13[1] (89,7%)	2,68±0,41[2] (77,2%)	8,16±1,052 (78,3%)

[1] – с отмыванием, [2] – без отмывания от криоконсерванта.

Таким образом, замораживание эритроцитов в среде с 1,2-ПД и сахарозой при невысоком содержании NaCl (0,3%) обеспечивает удовлетворительное сохранение морфо-трансформирующей функции клеток на действие альбумина, который является дискоцит-стабилизирующим белком плазмы. Сохраняется удовлетворительный уровень главных соединений (GSH, АТФ и 2,3-ДФГ), которые необходимы для осуществления эритроцитами функций регуляции сосудистого тонуса и поставки кислорода тканям. Можно предположить, что использование эритроцитов, замороженных в указанной среде позволит избежать значительного разрушения клеток при переливании и, соответственно, уменьшить вероятность развития системного воспаления. В настоящей работе использовалось отмывание размороженных клеточных образцов с 0,9% NaCl при их 10-кратном разведении. Очевидно, данный подход отмывания может создавать осмотический стресс на эритроциты. В следующей экспериментальной работе предполагается модифицировать способ отмывания, возможно с использованием сахарозо-солевого гипертонического раствора с целью получения лучших морфологических показателей клеток.

Список литературы

1. Рамазанов, В.В. Влияние комбинированных сред на повреждение эритроцитов, замороженных с различным гематокритом / В.В. Рамазанов // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, № 2. – С. 155–163.

2. Рамазанов, В.В. Определение содержания аденозинтрифосфата и 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах донорской крови при замораживании / В.В. Рамазанов, В.А. Бондаренко. // Актуальні проблеми сучасної медицини. – 2016. – Т. 16, Вип. 1 (53) – С. 233–237.

3. Metabolomics of AS-5 RBC supernatants following routine storage / A. D'Alessandro, K.C. Hansen, C.C. Silliman [et al.] // Vox Sang. – 2015, – Vol. 108, №2 – P. 131-140. doi: 10.1111/vox.12193.

4. Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation / E. A. Hod, N. Zhang, S. A. Sokol [et al.] // Blood. – 2010 – Vol. 115, №21 – P. 4284–4292. doi: 10.1182/blood-2009-10-245001.

5. Högman CF, Löf H, Meryman HT. Storage of red blood cells with improved maintenance of 2,3-bisphosphoglycerate // Transfusion. – 2006. – Vol. 46, №9 – P.1543-1552.

6. Pawloski, J.R. Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity / J.R. Pawloski, D.T. Hess,

J.S. Stamler // Nature. – 2001. – Vol. 409, № 6820. – P. 622–626.

7. In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen / C. Pellerin-Mendes, L. Million, M. Marchand-Arvier [et al.] // Cryobiology. – 1997. – Vol. 35, №2. – P.173–186.

8. Qu, L. Clinical effects of red blood cell storage / L. Qu, D. J. Triulzi // Cancer Control. – 2015. – Vol. 22, №1. – P.26–37.

9. S-nitrosohemoglobin deficiency: a mechanism for loss of physiological activity in banked blood / J.D. Reynolds, G.S. Ahearn, M. Angelo [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007 – Vol. 104, № 43. – P. 17058–17062.

10. Spitalnik, S.L. Stored red blood cell transfusions: iron, inflammation, immunity, and infection / S.L. Spitalnik // Transfusion. – 2014. – Vol. 54, №10. – P. 2365–2371. doi: 10.1111/trf.12848.

11. Valeri, C.R. An approach to prevent the severe adverse events associated with transfusion of FDA-approved blood products / C.R. Valeri, G. Ragno // Transfus Apher Sci. – 2010. Vol. 42, №3. – P. 223–233. doi: 10.1016/j.transci.2009.08.001.