

Профилактика повреждения эритроцитарной массы при хранении: сравнение пяти различных добавок.

Йохан В. Лагерберг^{1,2}, Герберт Корстен¹, Питер Ф. ван дер Меер^{1,2}, Дирк де Корт^{1,2}

¹ Банк Крови Сенкуин, Отдел процессов проектирования и разработки; ² Сенкуин Рисерч, Лаборатория исследований клеток крови и Лаборатория Ландштайнер, Академический медицинский центр, г. Амстердам, Нидерланды.

Предпосылки. В Европе концентраты эритроцитов (КЭ) обычно хранятся в растворе SAGM (солевой раствор с аденином, глюкозой и маннитолом). Во время хранения качество эритроцитов *in vitro* снижается, также снижается энергетический статус, и повышается лизис клеток. Недавно было разработано несколько добавочных растворов (ДР), предназначенных для предотвращения снижения качества *in vitro* при хранении. Эти новые растворы в основном были разработаны для лучшего поддержания уровней 2,3-бисфосфоглицерата (2,3-БФГ) в эритроцитах и энергетического статуса во время хранения. Высокие уровни 2,3-БФГ позволяют лучше выделять кислород, в то время как высокий энергетический статус необходим для функционирования и выживания эритроцитов *in vivo*. В рамках парного исследования добавочные растворы для улучшения хранения эритроцитов сравнивали по их способности обеспечивать более высокое качество *in vitro* в ходе гипотермического хранения.

Материалы и методы. Для каждого эксперимента объединяли и разделяли на компоненты 5 единиц крови с хранением в течение ночи. Единицы цельной крови были обработаны методом лейкоцитарной пленки. Эритроциты ресуспендировали в SAGM, PAGGSM, PAG3M, E-Sol 5 или AS-7 и отфильтровывали лейкоциты. КЭ хранили в течение восьми недель при 2–6 °C и еженедельно отбирали образцы для анализа параметров качества *in vitro*.

Результаты. Концентраты эритроцитов, хранящихся в PAG3M, E-Sol 5 и AS-7, показали значительно более высокую продукцию лактата и более высокие уровни внутриклеточного аденозинтрифосфата (АТФ) и общего аденилата. Во время хранения в SAGM и PAGGSM быстро снижались уровни 2,3-БФГ. Во время хранения в E-Sol 5 и AS-7 снижение уровня 2,3-БФГ было ингибировано, в то время как в PAG3M уровень 2,3-БФГ повышался выше исходного уровня до 35-го дня и обнаруживался до 56-го дня. Гемолиз был сопоставим для всех ДР до 35-го дня. При длительном хранении гемолиз в SAGM был выше, чем для других ДР. По сравнению с SAGM, при хранении в PAGGSM, PAG3M, E-Sol 5 и AS-7 морфологические свойства сохранялись лучше.

Обсуждение. Хранение эритроцитов в ДР нового поколения дает эритроциты с более стабильными уровнями метаболитов и улучшенным общим качеством при хранении по сравнению с эритроцитами, хранящимися в SAGM.

Ключевые слова: эритроциты, добавочный раствор, гликолиз, АТФ, 2,3-БФГ.

Введение

При хранении в охлажденном состоянии эритроцит подвергается биофизическим и биохимическим изменениям, известным как повреждение при хранении. Такие изменения включают, помимо прочего, снижение стабильности эритроцитов, которое измеряется по высвобождению гемоглобина, и изменения в различных метаболитах и метаболическом статусе клетки, включая снижение внутриклеточного уровня аденозинтрифосфата (АТФ) и 2,3-бисфосфоглицерата (2,3-БФГ)¹⁻³. Уровни 2,3-БФГ важны для сродства гемоглобина (Hb) к кислороду и, следовательно, для доставки кислорода к тканям. АТФ как источник энергии важен для общего функционирования эритроцитов, например для поддержания гибкости цитоскелета и асимметрии фосфолипидов⁴. Данные, опубликованные авторами Nogman⁵ и Heaton⁶, показали корреляцию между энергетическим статусом эритроцитов и восстановлением функциональной способности эритроцитов после переливания крови и выживанием.

Повреждение при хранении зависит от обработки крови и от условий хранения. В Европе перед обработкой цельную кровь можно хранить при

комнатной температуре вплоть до 24 часов, в то время как в США данный срок составляет 8 часов⁷. Выдержка цельной крови в течение ночи при комнатной температуре имеет очевидные материально-технические преимущества, но может оказать потенциальное негативное воздействие на качество компонентов, в том числе снижение уровня АТФ и 2,3-БФГ в эритроцитах^{8,9}.

Помимо времени выдержки цельной крови, на свойства эритроцитов также влияют добавочные растворы (ДР), используемые для поддержания качества эритроцитов при хранении. Даже при хранении в охлажденном состоянии в ходе метаболизма эритроцитов вырабатывается молочная кислота, которая снижает внеклеточный pH, что приводит к снижению гликолитической активности. Следовательно, хранение в обычных ДР, таких как солевой раствор с аденином, глюкозой и маннитолом (SAGM), приводит к снижению уровня 2,3-БФГ и АТФ⁷. Было показано, что добавочные растворы нового поколения ограничивают негативные последствия хранения в течение ночи при комнатной температуре для биохимических параметров эритроцитов¹⁰⁻¹². Такие новые ДР для хранения эритроцитов, включая AS-7 (поставляемый на рынок под названием SOLX; «Гемонетикс Корпорейшн»

(Haemonetics Corporation), США, шт. Массачусетс, г. Брейнтри)^{11,13,14}, фосфат-аденин-глюкоза-гуанозин-глюконат-маннитол (PAG3M)^{10,15} и Erythro-Sol (E-Sol)^{16,17} может также уменьшить ухудшение показателей качества эритроцитов *in vitro* и повысить безопасность и эффективность переливания^{14,18}. В отличие от традиционных безбуферных, гипертонических и слабокислых ДР, таких как SAGM, более новые растворы, такие как AS-7, E-Sol и PAG3M, представляют собой изо- или гипотонические щелочные растворы без фосфатов и буферов. Отсутствие внеклеточного хлорида приводит к так называемому «хлоридному сдвигу»¹⁹ — явлению, при котором внутриклеточный хлорид заменяется на гидроксильные анионы, что приводит к повышению внутриклеточного pH (pH_m). Гипотоническая природа современных ДР приводит к появлению слегка более набухших эритроцитам по сравнению с хранением в SAGM, что может предотвратить потерю фракций клеточной мембраны во время хранения²⁰. Поскольку большой объем клеток может отрицательно влиять на прохождение эритроцитов через фильтры для лейкоредукции, новые ДР, такие как AS-7 и E-Sol 5, в основном используются в сочетании с лейкоредукцией цельной крови^{11,17}.

Цель настоящего исследования заключалась в том, чтобы сравнить добавочные растворы SAGM, солевой раствор, содержащий фосфат-аденин-глюкоза-гуанозин-маннитол (PAGGSM), PAG3M, E-Sol 5 и AS-7 для 56-дневного хранения в охлажденных условиях лейкоредуцированных эритроцитов с удаленным лейкоцитарным слоем, полученных из цельной крови (ЦК), хранившихся при КТ в течение ночи. Для этого мы использовали 5 объединенных и разделенных на компоненты единиц цельной крови. Каждый день проводили анализы эритроцитов на *in vitro* маркеры качества красных кровяных телец.

Материалы и методы

Состав различных добавочных растворов показан в Таблице I. SAGM, PAGGSM и E-Sol 5 были закуплены у компании «Фрезениус Каби» (Fresenius Kabi) (Нидерланды, Эммер-Компаскуум), PAG3M и AS-7 были приготовлены на собственной базе и стерилизованы микрофильтрацией (фильтр с диаметром пор 0,2 мкм). Осмоляльность растворов измеряли с помощью осмометра Osmomat 030-D («Гонотек» (Gonotec), Германия, Берлин).

Сбор и обработка крови

Добровольные доноры крови не нумеровались. Все они соответствовали стандартным критериям для сдачи крови и дали письменное информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с руководящими принципами и практикой учреждения. Это исследование было одобрено комитетом по врачебной этике в соответствии со стандартами, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 года.

В общей сложности было собрано 20 единиц цельной крови (ЦК), 500 мл ± 2 %, при помощи системы для сбора «снизу-вверх» с четырьмя контейнерами для сбора, содержащими 70 мл консерванта ЦФГ (цитрат, фосфат, декстроза («Фрезениус Каби» (Fresenius Kabi), Нидерланды, Эммер-Компаскуум). Единицы цельной крови помещали на бутан-

Таблица I. Состав добавочных растворов для хранения эритроцитов.

Компоненты, ммоль/л	SAGM	PAGGSM	PAG3M	E-Sol 5	AS-7
NaCl	150	72	—	—	—
NaHCO ₃	—	—	—	—	26
Na ₂ HPO ₄	—	16	8	20	12
NaH ₂ PO ₄	—	8	8	—	—
Глюконат	—	—	40	—	—
Цитрат	—	—	—	25	—
Аденин	1,25	1,4	1,4	2	2
Гуанозин	—	1,4	1,4	—	—
Глюкоза	45	47	47	111	80
Маннитол	30	55	55	41	55
pH (при температуре 37 °C)	5,7	6,0	8,2	8,4	8,5
Осмоляльность, мосмоль/кг	376	287	278	301	228

SAGM: солевой раствор аденина, глюкозы и маннитола; PAGGSM: солевой раствор фосфата, аденина, глюкозы, гуанозина и маннитола; PAG3M: фосфат-аденин-глюкоза-гуанозин-глюконат-маннитол; E-Sol: Erythro-Sol; ДР: добавочный раствор.

1,4-диольные охлаждающие пластины (Comprocool, «Фрезениус Каби» (Fresenius Kabi)), чтобы отрегулировать температуру до 20–24 °C²¹. После хранения в течение ночи 5 АВО-совместимых единиц крови были объединены и разделены на компоненты (n=4). Для единиц, предназначенных для хранения в альтернативном добавочном растворе, SAGM из системы сбора был заменен на равный объем выбранного ДР. Единицы ЦК были обработаны в соответствии с обычной процедурой для удаления лейкоцитарной пленки, как описывалось ранее²². Вкратце, после сильного вращения (Sorvall RC12BP; «Сисмекс» (Sysmex), Нидерланды, Эттен-Леур) единицы ЦК были разделены на компоненты при помощи автоматического сепаратора компонентов крови (Comromat G5; «Фрезениус Каби» (Fresenius Kabi)). После разделения к эритроцитарной массе через фильтр добавляли 110 мл добавочного раствора. После тщательного перемешивания единицы хранили в течение 1 часа при комнатной температуре и затем удаляли лейкоциты при помощи встроенного фильтра для лейкоредукции (BioR; «Фрезениус Каби» (Fresenius Kabi)). На основании экспериментальных исследований этот 1-часовой период отстоя был добавлен для уменьшения воздействия на время фильтрации для некоторых из протестированных ДР. Лейкоредуцированные концентраты эритроцитов (КЭ) хранили при температуре 2–6 °C в стандартном холодильнике для банка крови в течение 56 дней. Пробы отбирали еженедельно.

Гематологические параметры определяли при

Blood Transfus DOI 10.2450/2017.0371-16

помощи гематологического анализатора (XT2000i; «Сисмекс» (Sysmex)). Гемолиз определяли, как было описано ранее¹⁰. Бесклеточные надосадочные жидкости получали центрифугированием КЭ при 2000 g в течение 10 минут с последующим дополнительным центрифугированием надосадочной жидкости при 12000 g в течение 5 минут. Свободный гемоглобин (Hb) определяли путем измерения абсорбции надосадочной жидкости при 415 или 514 нм с помощью спектрофотометра (спектрофотометр для прочтения планшетов Eop; «Био-Тек» (Bio Tek), Германия, Бад-Фридрихсхалль) с коррекцией на плазменное поглощение при необходимости. Гемолиз выражали в процентах от общего содержания Hb в эритроцитах после коррекции на гематокрит.

Внеклеточные калий, глюкозу, лактат и pH измеряли с помощью анализатора газов крови (ABL90 Flex; «Радиомитер Бенелюкс БВ» (Radiometer Benelux BV), Нидерланды, Зутермер).

Внутриклеточный pH (pH_{in}) и внутриклеточную концентрацию хлорида (Cl_{in}) измеряли, как описывалось ранее¹. Эритроциты осаждали центрифугированием и удаляли надосадочную жидкость. Эритроциты замораживали в жидком азоте и оттаивали. pH и концентрацию хлорида в лизате измеряли при помощи анализатора газов крови. Нуклеотиды аденина и гуанина и уровни 2,3-БФГ определяли в нейтрализованных экстрактах хлорной кислоты. Нуклеотиды аденина и гуанина анализировали методом ВЭЖХ²³. Общее содержание аденилата рассчитывали как сумму уровней АТФ, АДФ и АМФ. Уровень 2,3-БФГ анализировали при помощи набора для анализа 2,3-БФГ от «Роше» (Roche) (Германия, Мангейм).

Морфологию определяли после фиксации клеток метанолом и выражали в процентах эхиноцитов. Для количественного определения числа эритроцитов, экспонирующих фосфатидилсерин (ФС) на клеточной поверхности, клетки окрашивали FITC-меченным аннексином V, в целом, как было описано ранее⁴. Образцы красных клеток инкубировали с FITC-меченным аннексином V, («ВПС-Диагностикз» (VPS-Diagnostics), Нидерланды, Ховен) и анализировали на проточном

цитометре (FACSCalibur; «Бектон-Дикинсон», (Becton Dickinson), Нидерланды, Бреда). Процент аннексин-V-положительных клеток определяли путем сравнения с отрицательным контрольным образцом, который инкубировали с ЭГТК.

Статистическая оценка

Результаты, полученные при хранении в альтернативных добавочных растворах, сравнивались с результатами, полученными при хранении в SAGM. Результаты были проанализированы с помощью дисперсионного анализа повторных измерений с последующим тестом Даннетта для сравнения значений во время хранения в SAGM (Instat, v.3.06; GraphPad, Сан-Диего, Калифорния, США). Отличия от SAGM считались значимыми, когда значения p были менее 0,05.

Результаты

Клеточный состав был сопоставим для всех КЭ, что указывало на эффективную процедуру объединения и разделения. Время лейкоредукционной фильтрации для КЭ, ресуспендированных в SAGM, составляло приблизительно 25 минут (см. Таблица II). За исключением PAG3M, время фильтрации было значительно выше при использовании альтернативных ДР. Время фильтрации было наибольшим для КЭ в AS-7 (больше часа).

Метаболические параметры в процессе хранения

Ресуспендирование эритроцитов в добавочных растворах без хлоридов PAG3M, E-Sol 5 и AS-7 привело к более низкой внутриклеточной концентрации хлорида (Cl_{in}) по сравнению с SAGM (Рис. 1А). Величина Cl_{in} оставалась ниже в течение всего периода хранения. PAGGSM, который имеет более низкую концентрацию хлоридов по сравнению с SAGM показал средние значения Cl_{in} . Более низкий показатель Cl_{in} , наблюдаемый в средах без хлоридов, сопровождался повышением pH_{in} по сравнению с SAGM и PAGGSM (Рис. 1В). показатель pH_{in} оставался выше в течение всего периода хранения в E-Sol 5 и AS-7, в то время как при хранении в PAG3M pH_{in} был выше только в течение первых двух недель хранения.

Таблица II. Характеристика красных кровяных телец в добавочных растворах.

Параметр	SAGM	PAGGSM	PAG3M	E-Sol 5	AS-7
Время фильтрации, мин	25±4	35±4#	33±4	41±6#	72±26#
<i>День 1</i>					
MCV, фл	88±0,7	87±0,7	83±0,8	85±0,9	85±1,4
Гематокрит, л/л	0,57±0,02	0,56±0,01	0,54±0,01	0,55±0,01	0,56±0,02
Эхиноциты, %	9±5	7±5	6±4	6±4	4±2
Анексин А5 + клетки, %	1,3±0,8	1,6±0,4	1,7±0,1	1,6±0,2	1,9±0,5
<i>День 56</i>					
MCV, фл	92±2,6	84±2,3#	80±1,9#	81±1,7#	82±1,4#
Гематокрит, л/л	0,60±0,02	0,55±0,01#	0,54±0,01#	0,54±0,01#	0,54±0,01#
Эхиноциты, %	44±5	35±4#	37±2#	36±3#	32±4#
Анексин А5 + клетки, %	6,8±0,9	7,2±0,3	7,5±0,5	7,0±0,5	6,6±0,9
Выработка лактата, ммоль 10 ¹² клеток/день	0,07±0,01	0,07±0,01	0,11±0,01#	0,08±0,01#	0,09±0,01#

Показанные результаты обозначают среднее значение±СО (n=4). # p<0,05 по сравнению с хранением в SAGM.

SAGM: солевой раствор аденина, глюкозы и маннитола; PAGGSM: солевой раствор фосфата, аденина, глюкозы, гуанозина и маннитола; PAG3M: фосфат-аденин-глюкоза-гуанозин-глюконат-маннитол; E-Sol: Erythro-Sol; ДР: добавочный раствор; MCV: средний корпускулярный объем; Нт:

гематокрит.

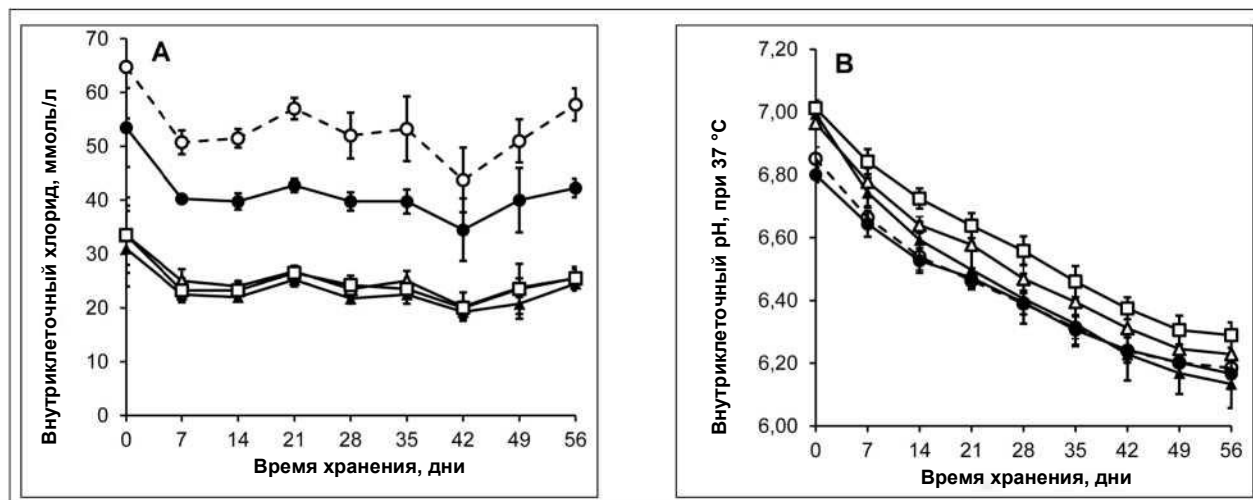


Рис. 1 — Внутриклеточный хлорид (А) и внутриклеточный pH эритроцитов, хранящиеся при температуре 2–6 °С в солевом растворе с аденином, глюкозой и маннитолом (SAGM) (○), ПАГСМ (●), ПАГСМ (▲), E-Sol 5 (□) и AS-7 (□). Показанные результаты обозначают среднее значение±СО (n=4). SAGM: солевой раствор аденина, глюкозы и маннитолола; ПАГСМ: солевой раствор фосфата, аденина, глюкозы, гуанозина и маннитолола; ПАГ3М: фосфат-аденин-глюкоза-гуанозин-глюконат-маннитол; E-Sol: Erythro-Sol; ДР: добавочный раствор.

Гликолитическая активность, измеренная на основании образования лактата, была повышена в растворах без хлоридов по сравнению с SAGM и ПАГСМ (см. Таблицу II). Повышение уровня лактата сопровождалось сопутствующим снижением уровня глюкозы (данные не показаны). Исходные уровни АТФ были схожими для всех ДР (Рис. 2А). В течение первых трех недель хранения содержание АТФ оставалось относительно постоянным для SAGM и ПАГСМ и незначительно увеличилось для ПАГ3М, E-Sol 5 и AS-7, причем увеличение было наиболее выраженным с ПАГ3М. При длительном хранении уровни АТФ постепенно снижались во всех КЭ. Начиная с 21-го дня, уровни АТФ в КЭ при хранении в SAGM были значительно ниже по сравнению с другими ДР. Начиная с 42-го дня, никаких различий в содержании АТФ между другими ДР обнаружено не было. После первоначального повышения общие уровни аденилата постепенно снижались во время хранения (Рис. 2В). После 56 дней хранения в SAGM уровень общего аденилата снизился до $78\pm 4\%$ от исходного значения. При использовании альтернативных ДР уровни общего аденилата оставались выше 100 % от исходных значений в течение всего периода хранения без существенных различий между различными ДР. Уровни гуанозин-5'-трифосфата (ГТФ), которые также добавляют в метаболический пул эритроцитов, были сильно повышены при хранении в растворах, содержащих гуанозин (ПАГСМ и ПАГ3М) по сравнению с хранением в других ДР (Рис. 2С).

В плане уровня 2,3-БФГ, в ходе хранения были обнаружены значительные отличия. Уровни 2,3-БФГ быстро снижались во время хранения в SAGM и ПАГСМ (Рис. 2D). Снижение уровней 2,3-БФГ было несколько сдержано при хранении в E-Sol 5, тогда как в AS-7 уровни 2,3-БФГ поддерживались на

исходном уровне до 14-го дня хранения. При хранении в ПАГ3М уровни 2,3-БФГ повышались выше исходного уровня до 35-го дня и были выше предела обнаружения до 56-го дня.

Гематологические и морфологические параметры

Хранение в SAGM привело к легкому набуханию клеток, что было определено за счет увеличенного среднего корпускулярного объема (MCV) и гематокрита (Таблица II). При использовании других добавочных растворов такое набухание не наблюдалось. Гемолизис в ходе хранения постепенно снижался. Вплоть до 35-го дня хранения гемолиз был сопоставим для всех ДР и значительно ниже текущего требования в 0,8 % (Рис. 3). При длительном хранении различия в гемолизе стали очевидными, будучи самыми высокими для SAGM (0,8 % на 56-й день), средними для AS-7 и ПАГСМ (0,65 % гемолиза) и самыми низкими для ПАГ3М и E-Sol 5 (0,4 % гемолиза). Количество эритроцитов постепенно увеличивалось при хранении и было наиболее выраженным при хранении в SAGM (Таблица II). Между другими ДР различий не наблюдалось. На 56-й день хранения процент аннексин-V-положительных клеток был ниже 10 % для всех КЭ без какой-либо существенной разницы между различными добавочными растворами (таблица II).

Обсуждение

Это исследование было проведено для определения того, могут ли альтернативные добавочные растворы (ПАГСМ, ПАГ3М, E-Sol 5 и AS-7) лучше поддерживать *in vitro* качество компонентов КЭ, полученных из цельной крови после хранения в течение ночи при комнатной температуре перед обработкой, по сравнению с

хранением в стандартном растворе SAGM. В этом исследовании мы провели лейкоредукцию КЭ в добавочном растворе, в отличие от предыдущих

исследований с E-Sol 5 и AS-7, в которых использовались КЭ, полученные из лейкоредуцированной цельной крови^{11,17}.

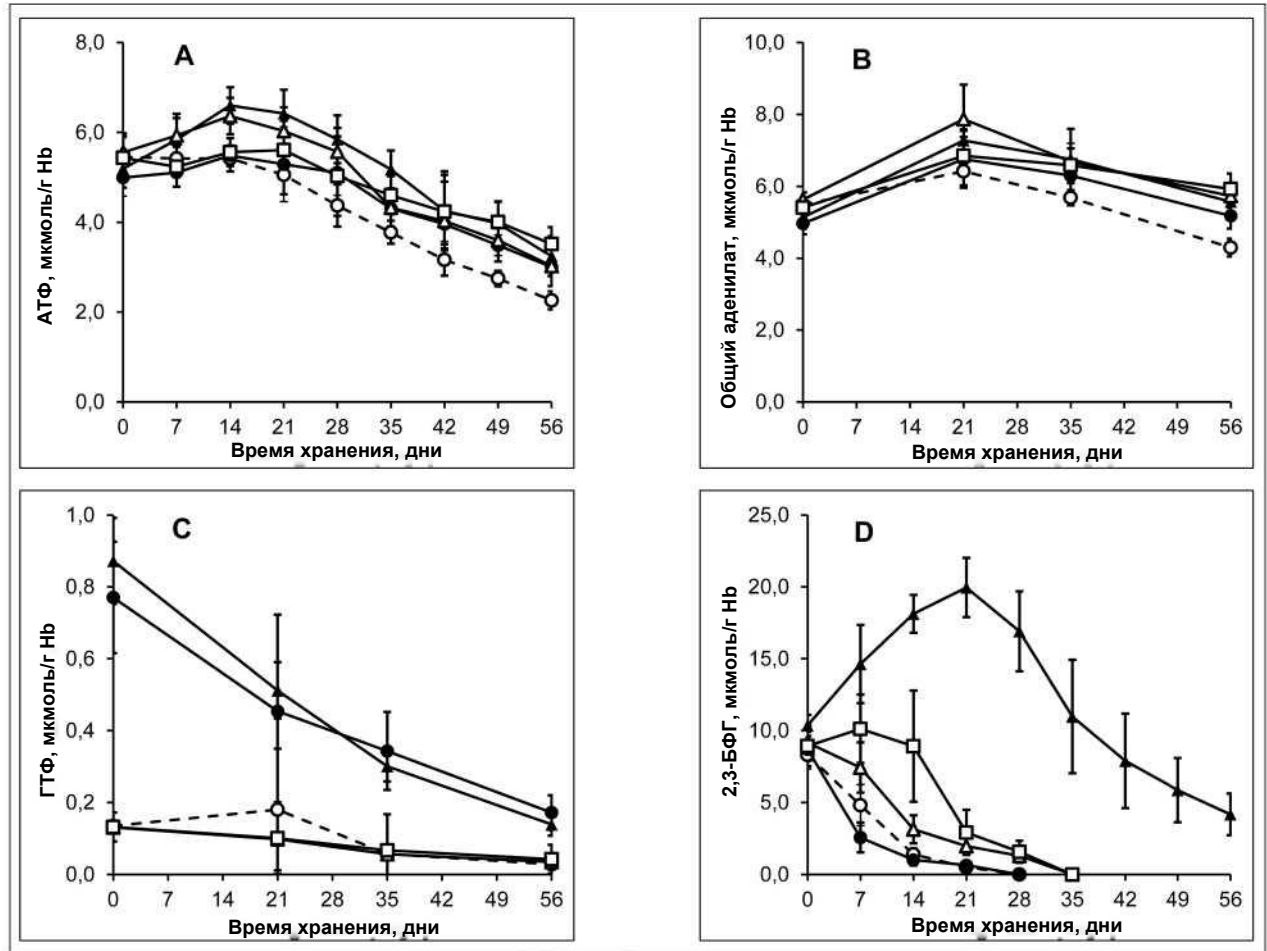


Рис. 2 — Концентрации метаболитов эритроцитов при хранении при температуре 2–6 °С в солевом растворе с аденином, глюкозой и маннитолом

(SAGM) (○), PAGSM (●), PAG3M (▲), E-Sol 5 (□) и AS-7 (□).

(А) АТФ. (В) Общий аденилат. (С) ГТФ. (D) 2,3 БФГ. Показанные результаты обозначают среднее значение±CO (n=4). SAGM: солевой раствор аденина, глюкозы и манникола; PAGGSM: солевой раствор фосфата, аденина, глюкозы, гуанозина и манникола; PAG3M: фосфат-аденин-глюкоза-гуанозин-глюконат-маннитол; E-Sol: Erythro-Sol; ДР: добавочный раствор.

Сохранено в связи с политикой журнала, спасибо.

Время лейкоредукционной фильтрации увеличилось с выходом ДР нового поколения, скорее всего, из-за более низкой осмоляльности растворов и последующего набухания эритроцитов. Несмотря на различия в составе PAG3M, E-Sol 5 и AS-7, растворы предназначены для поддержания более высоких скоростей метаболизма эритроцитов путем поддержания рН_{in} на более высоких уровнях во время хранения. Сбор цельной крови в антикоагулянтном консерванте ЦФГ (рН 5,6) и использование современных растворов добавок с рН около 6 приводит к относительно низкому исходному рН_{in}. Во время хранения эритроциты вырабатывают лактат из-за метаболизма глюкозы, что приводит к дальнейшему снижению рН_{in}. Чтобы лучше поддерживать рН во время хранения эритроцитов, ДР нового поколения не только являются щелочными, но также имеют более высокую буферную емкость благодаря добавлению фосфата (PAGGSM, PAG3M, E-Sol 5, AS-7) и бикарбоната

(AS-7). Кроме того, новые ДР не содержат хлоридов, что приводит к более высокому значению рН_{in} из-за сдвига хлоридов. Низкая концентрация хлорида в ДР и пассивная диффузия хлорида из клеток приводят к полной потере внутриклеточного хлорида. Чтобы поддерживать электрическую нейтральность, гидроксильные анионы будут диффузировать в клетку пропорционально потере хлоридов, где они увеличат внутриклеточный рН^{10,19}.

Сохранение энергетического статуса эритроцитов крайне важно для функции эритроцитов и их выживания *in vivo*. Содержание АТФ косвенно связано с выживанием после переливания крови, потому что нормальные уровни АТФ необходимы для предотвращения потери мембраны в результате микровезикуляции, а также для поддержания активного, внешнего переноса фосфолипидов, таких как фосфатидилсерин (ФС), что тем самым предотвращает преждевременный клиренс из

кровотока реципиента макрофагами^{4, 24}. Во время гипотермического хранения уровни АТФ постепенно снижались, что сопровождалось повышением уровней АДФ и АМФ. В гликолитическом пути и АМФ, и АДФ могут быть преобразованы обратно в АТФ, поэтому оба эти вещества могут по-прежнему вносить вклад в энергетический статус клетки, выраженный в виде общего содержания аденилата.

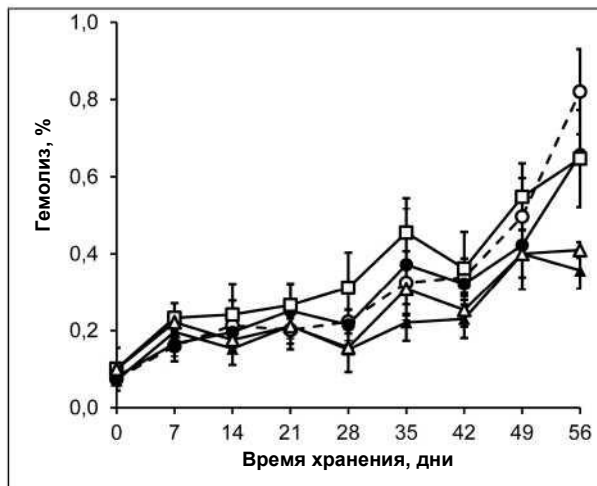


Рис. 3 — Гемолиз эритроцитов при хранении при температуре 2–6 °С в солевом растворе с аденином, глюкозой и маннитолом (SAGM) (o), PAGSM (•), PAG3M (▲), E-Sol 5 (△) и AS-7 (□). Показанные результаты обозначают среднее значение ± CO (n=4). SAGM: солевой раствор аденина, глюкозы и маннитола; PAGGSM: солевой раствор фосфата, аденина, глюкозы, гуанозина и маннитола; PAG3M: фосфат-аденин-глюкоза-гуанозин-глюконат-маннитол; E-Sol: Erythro-Sol; ДР: добавочный раствор.

Руководящие принципы, используемые в США и Европе, требуют 75 %-ное выживание клеток в течение 24 часов после переливания крови *in vivo*.²⁵⁻²⁷ В качестве суррогатного маркера выживания *in vivo* может быть использовано общее содержание аденилата. Ногман и др.⁵ обнаружили не только хорошую корреляцию между общим содержанием аденилата и восстановлением функциональной способности эритроцитов после переливания крови, но и то, что минимальное общее содержание аденилата, необходимое для удовлетворения этого требования, составляло 82 % от исходного уровня. Хотя эритроциты, хранящиеся в SAGM, не удовлетворяли этому требованию после 35 дней хранения, растворы, не содержащие хлора, и PAGGSM смогли поддерживать этот уровень до 56-го дня хранения. Недавно было высказано предположение относительно эритроцитов мышей о том, что перекисное окисление липидов может быть связано с плохим восстановлением функциональной способности через 24 часа²⁸. Следовательно, представляет интерес изучение влияния различных добавочных растворов на окисление липидов во время хранения.

Во время хранения эритроцитов в стандартном добавочном растворе SAGM уровень 2,3-БФГ быстро снижается и истощается в течение двух недель после хранения. Растворы, не содержащие хлора, а именно E-Sol 5 и AS-7, ингибировали снижение уровней 2,3-БФГ в течение приблизительно двух недель, в то время как в PAG3M уровни 2,3-БФГ увеличивались в течение первых трех недель хранения выше исходного уровня, за которыми следовало постепенное снижение при дальнейшем хранении. Более медленное снижение 2,3-БФГ в растворах, не содержащих хлоридов, можно объяснить более высоким рН_{in}, что приводит к более высокой гликолитической активности^{10,15}. Дополнительное влияние PAG3M на образование 2,3-БФГ может быть объяснено описанным влиянием гуанозина на активность ключевого аллостерического регуляторного фермента фосфофруктокиназы (ФФК) в гликолитическом пути, таким образом повышая уровни как АТФ, так и 2,3-БФГ^{1,29,30}.

Во всех добавочных растворах, не содержащих хлорид, уровни АТФ и 2,3-БФГ (оба наиболее выражены в PAG3M) демонстрируют нелинейную тенденцию при хранении и, похоже, следуют многостадийной тенденции: за начальным повышением (выработка) следует стадия плато и последующее снижение (потребление). Этот фенотип согласуется с предыдущими данными метаболических исследований, которые показали, что во время хранения в холодильнике можно выделить три различные метаболические фазы, происходящие в дни 0–10, дни 10–18 и после 18 дней^{31,32}. PAG3M продлевает начальную метаболическую фазу (выработку) по меньшей мере до 21-го дня, что указывает на улучшение качества и меньший метаболический возраст клеток, хранящихся в PAG3M, по сравнению с другими добавочными растворами³¹.

В настоящем исследовании для сбора цельной крови и хранения эритроцитов использовались системы из ПВХ, пластифицированного с помощью 2-диэтилгексилфталата (ДЭГФ). Использование ДЭГФ в контейнерах для крови в настоящее время обсуждается из-за проблем с токсичностью^{33,34}. Некоторые литературные источники указывают на то, что доступные на данный момент растворы добавок для хранения эритроцитов могут представлять собой не самый лучший вариант для использования в сочетании с пластиком без ДЭГФ. Недавнее исследование при помощи систем сбора, полностью изготовленных из ПВХ, пластифицированного ди(изонил) циклогексан-1,2-дикарбоксилатом (Hexamol® DINCH; BASF SE, Германия, Людвигсхафен), показало, что если раствор для хранения эритроцитов SAGM был заменен на PAGGSM или PAG3M, то показатели гемолиза были сохранены лучше³⁵. Представляет интерес исследование того, демонстрируют ли E-Sol 5 и AS-7 такой же положительный эффект на целостность эритроцитов во время хранения в системах, не содержащих ДЭГФ.

Blood Transfus DOI 10.2450/2017.0371-16

Выводы

Концентраты эритроцитов, приготовленные из ЦК, выдержанные в течение ночи при комнатной температуре и хранящиеся в недавно разработанных растворах PAG3M, E-Sol-5 и AS-7, не содержащих хлорид, имели значительно повышенные уровни основных метаболитов АТФ, общего аденилата и 2,3-БФГ по сравнению с контрольными эритроцитами в SAGM. В частности, PAG3M показал эффективность в плане предотвращения истощения 2,3-БФГ. Эти результаты указывают на то, что хранение эритроцитов в ДР нового поколения дает эритроциты с более стабильными уровнями метаболитов и улучшенным общим качеством при хранении по сравнению с эритроцитами, хранящимися в SAGM.

Участие авторов

Все авторы внесли свой вклад в замысел и дизайн исследования, а также анализировали и интерпретировали данные. Все авторы провели критический анализ важного интеллектуального содержания рукописи и утвердили окончательный вариант, представленный для публикации. Х.К. собрал данные и провел статистический анализ. Дж.Л. написал манускрипт. ПвдМ. и ДдК. помогли интерпретировать результаты и рецензировали рукопись.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

- 1) Burger P, Korsten H, de Korte, et al. An improved red blood cell additive solution maintains 2,3-diphosphoglycerate and adenosine triphosphate levels by an enhancing effect on phosphofructokinase activity during cold storage. *Transfusion* 2010; **50**: 2386-92.
- 2) Gevi F, D'Alessandro A, Rinalducci S, Zolla L. Alterations of red blood cell metabolome during cold liquid storage of erythrocyte concentrates in CPD-SAGM. *J Proteomics*. 2012; **76**: 168-80.
- 3) Bordbar A, Johansson PI, Paglia G, et al. Identified metabolic signature for assessing red blood cell unit quality is associated with endothelial damage markers and clinical outcomes. *Transfusion* 2016; **56**: 852-62.
- 4) Verhoeven AJ, Hilarius PM, Dekkers DW, et al. Prolonged storage of red blood cells affects aminophospholipid translocase activity. *Vox Sang* 2006; **91**: 244-51.
- 5) Hogman CF, de Verdier CH, Ericson A, et al. Studies on the mechanism of human red cell loss of viability during storage at +4 degrees C in vitro. I. Cell shape and total adenylate concentration as determinant factors for posttransfusion survival. *Vox Sang* 1985; **48**: 257-68.
- 6) Heaton WA. Evaluation of posttransfusion recovery and survival of transfused cells. *Transfus Med Rev* 1992; **6**: 153-69.
- 7) Roback JD, Combs MR, Grossman BJ, et al., editors. *Technical manual*. 16th ed. Bethesda, MD: AABB; 2008.
- 8) Hughes JD, Macdonald VW, Hess JR. Warm storage of whole blood for 72 hours. *Transfusion* 2007; **47**: 2050-6.
- 9) Van der Meer PF, Cancelas JA, Cardigan R, et al. Evaluation of overnight hold of whole blood at room temperature before component processing: effect of red blood cell (RBC) additive solutions on in vitro RBC measures. *Transfusion* 2011; **51**: 15S-24S.
- 10) de Korte D, Kleine M, Korsten HG, et al. Prolonged maintenance of 2,3-diphosphoglycerate acid and adenosine triphosphate in red blood cells during storage. *Transfusion* 2008; **48**: 1081-9.
- 11) Dumont LJ, Cancelas JA, Maes LA, et al. Overnight, room temperature hold of whole blood followed by 42-day storage of red blood cells in additive solution-7. *Transfusion* 2015; **55**: 485-90.
- 12) Veale MF, Healey G, Sran A, et al. AS-7 improved in vitro quality of red blood cells prepared from whole blood held overnight at room temperature. *Transfusion* 2015; **55**: 108-14.
- 13) Hess J. An update on solutions for red cell storage. *Vox Sang* 2006; **91**: 13-9.
- 14) D'Alessandro A, Nemkov T, Hansen KC, et al. Red blood cell storage in additive solution-7 preserves energy and redox metabolism: a metabolomics approach. *Transfusion* 2015; **55**: 2955-66.
- 15) Burger P, Korsten H, Verhoeven AJ, et al. Collection and storage of red blood cells with anticoagulant and additive solution with a physiologic pH. *Transfusion* 2012; **52**: 1245-52.
- 16) Hogman CF, Knutson, F, Loof H, et al. Improved maintenance of 2,3-DPG and ATP in RBCs stored in a modified additive solution. *Transfusion* 2002; **42**: 824-9.
- 17) Radwanski K, Thill M, Min K. Red cell storage in E-Sol 5 and Adsol additive solutions: paired comparison using mixed and non-mixed study design. *Vox Sang* 2014; **106**: 322-9.
- 18) Cancelas JA, Dumont LJ, Maes LA, et al. Additive solution-7 reduces the red blood cell storage lesion. *Transfusion* 2015; **55**: 491-8.
- 19) Meryman HT, Hornblower M. Manipulating red cell intra- and extracellular pH by washing. *Vox Sang* 1991; **60**: 99-104.
- 20) Veale MF, Healey G, Sparrow RL. Effect of additive solutions on red blood cell (RBC) membrane properties of stored RBCs prepared from whole blood held for 24 hours at room temperature. *Transfusion* 2011; **51**: 25S-33S.
- 21) Pietersz R, de Korte D, Reesink HW, et al. Storage of whole blood for up to 24 hours at ambient temperature prior to component preparation. *Vox Sang* 1989; **56**: 145-50.
- 22) Bontekoe IJ, van der Meer PF, Mast G, de Korte D. Separation of centrifuged whole blood and pooled buffy coats using the new CompoMat G5: 3 years experience. *Vox Sang* 2014; **107**: 140-7.
- 23) de Korte D, Haverkort WA, van Gennip AH, et al. Nucleotide profiles of normal human blood cells determined by highperformance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1985; **147**: 197-209.
- 24) Kamp D, Sieberg T, Haest CW. Inhibition and stimulation of phospholipid scrambling activity. Consequences for lipid asymmetry, echinocytosis, and microvesiculation of erythrocytes. *Biochemistry* 2001; **40**: 9438-46.
- 25) AABB. *Standards for Blood Banks and Transfusion Services*. 30th ed. Bethesda, MD: AABB; 2016.
- 26) Council of Europe. European Directorate for the Quality of Medicine and Health Care. *Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components*. 18th ed. Strasbourg: Council of Europe Publishing; 2015.
- 27) Dumont LJ, AuBuchon JP. Evaluation of proposed FDA criteria for the evaluation of radiolabeled red cell recovery trials. *Transfusion* 2008; **48**: 1053-60.
- 28) De Wolski K, Fu X, Dumont LJ, et al. Metabolic pathways that correlate with post-transfusion circulation of stored murine red blood cells. *Haematologica* 2016; **101**: 578-86.
- 29) Nishino T, Yachie-Kinoshita A, Hirayama A, et al. Dynamic simulation and metabolome analysis of long-term erythrocyte storage in adenine-guanosine solution. *PLoS ONE* 2013; **8**: e71060.
- 30) Nemkov T, Hansen KC, Dumont LJ, D'Alessandro A. Metabolomics in transfusion medicine. *Transfusion* 2016; **56**: 980-93.
- 31) Paglia G, D'Alessandro A, Rolfsson O, et al. Biomarkers defining the metabolic age of red blood cells during cold storage. *Blood* 2016; **128**: e43-50.
- 32) D'Alessandro A, Nemkov T, Kelher M, et al. Routine storage of red blood cell (RBC) units in additive solution-3: a comprehensive investigation of the RBC metabolome. *Transfusion* 2015; **55**: 1155-68.
- 33) Sampson J, de Korte D. DEHP-plasticised PVC: relevance to blood services. *Transfus Med*. 2011; **21**: 73-83.
- 34) van der Meer PF, Reesink HW, Panzer S, et al. Should DEHP be eliminated in blood bags? *Vox Sang* 2014; **106**: 176-95.
- 35) Lagerberg JW, Gouwerok E, Vlaar R, et al. In vitro evaluation of the quality of blood products collected and stored in systems completely free of di(2-ethylhexyl)phthalate-plasticized materials. *Transfusion* 2015; **55**: 522-31.

Получено: 28 декабря 2016 года. Редакция принята: 31 января 2017 года.

Адрес для корреспонденции: Йохан В. Лагерберг

Отдел исследований клеток крови

«Санкуин Рисерч» (Sanquin Research)

Нидерланды, Амстердам, 1066 CX,

Плесмалаан, 125

Эл. почта: j.lagerberg@sanquin.nl