



Каменская Т.В.✉, Гончарова Н.В., Клименкова О.В., Игнацкая А.Ю., Карпенко Ф.Н.
Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских
биотехнологий, Минск, Беларусь

Показатели эриптоза донорских эритроцитов на разных сроках хранения и при различных методах заготовки

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – Гончарова Н.В., Каменская Т.В., Карпенко Ф.Н.; сбор и обработка материала – Каменская Т.В., Гончарова Н.В., Клименкова О.В., Игнацкая А.Ю.; написание текста – Каменская Т.В., Гончарова Н.В.; редактирование – Карпенко Ф.Н.

Подана: 08.02.2025

Принята: 12.03.2025

Контакты: kamenskaya@blood.by

Резюме

В статье представлены результаты исследования явлений эриптоза в эритроцитных компонентах крови на разных сроках хранения и при различных методах заготовки. Показано, что донорские эритроциты, заготовленные методом автоматического афереза, имеют достоверно более высокий уровень экспрессии CD95 ($p < 0,001$) и экспозиции фосфатидилсерина ($p < 0,05$) на внешней стороне мембраны по сравнению с донорскими эритроцитами, заготовленными мануальным методом. При увеличении срока хранения все донорские эритроциты демонстрируют явления нарастающего эриптоза, достоверно более выраженные в донорских эритроцитах, заготовленных методом автоматического афереза, по сравнению с донорскими эритроцитами, заготовленными мануальным методом ($p < 0,005$).

Ключевые слова: донорские эритроциты, автоматический аферез, экспрессия антигенов эритроцитов, эриптоз

Kamenskaya T. ✉, Goncharova N., Klimenkova O., Ihnatskaya A., Karpenko F.
Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical
Biotechnologies, Minsk, Belarus

Eryptosis Indicators of Donor Erythrocytes at Different Storage Periods and Types of Blood Component Collection

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: study concept and design – Goncharova N., Kamenskaya T., Karpenko F.; data collection and processing – Kamenskaya T., Goncharova N., Klimenkova O., Ihnatskaya A.; article writing – Kamenskaya T., Goncharova N.; article editing – Karpenko F.

Submitted: 08.02.2025

Accepted: 12.03.2025

Contacts: kamenskaya@blood.by

Abstract

The article presents the results of the eryptosis phenomena study in red cell components at different storage periods and types of blood component collection. It has been shown that donor erythrocytes prepared by automatic apheresis have a significantly higher level of CD95 expression ($p < 0.001$) and phosphatidylserine exposure ($p < 0.05$) on the outer membrane side compared to donor erythrocytes prepared manually. With increasing storage time, all donor erythrocytes demonstrate the phenomena of increasing eryptosis, which is significantly more pronounced in donor erythrocytes prepared by automatic apheresis compared to donor erythrocytes prepared by the manual method ($p < 0.005$).

Keywords: donor erythrocytes, automatic apheresis, erythrocyte antigens expression, eryptosis

■ ВВЕДЕНИЕ

Одним из интенсивно изучаемых физиологических процессов в современной биологии и медицине является апоптоз – процесс, который в широком смысле понимают как запрограммированную гибель ядросодержащих клеток. Для обозначения апоптоза эритроцитов с 2005 г. введен термин «эриптоз». Физиологически эриптоз предназначен для быстрого устранения стареющих и поврежденных эритроцитов с целью предотвращения их преждевременного гемолиза в сосудистом русле и накопления внеклеточного гемоглобина в циркулирующей крови.

Эриптоз вызывается различными патофизиологическими стрессорами клетки и представляет собой сложный механизм, включающий ионные каналы, мембранные белки и клеточные ферменты. Именно наличие либо отсутствие ранних маркеров эриптоза, таких как уменьшение объема эритроцитов, микровезикуляция мембраны, расстройство мембранной асимметрии фосфолипидов, приводящее к экспонированию фосфатидилсерина – основного рецептора для фагоцитов, изменение экспрессии ряда мембранных рецепторов и др., в настоящее время считаются наиболее значимыми показателями жизнеспособности эритроцитов, обуславливающими их клиническую эффективность [1, 2].



■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить показатели эриптоза в донорских эритроцитах, заготовленных разными методами, на разных сроках хранения.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Заготовку эритроцитов для проведения исследования осуществляли двумя способами: мануальным и автоматическим. Автоматический аферез двух доз эритроцитов от одного донора в добавочном растворе SAG-M проводили на автоматическом сепараторе крови MCS+ (Haemonetics, USA) и на сепараторе крови Trima Accel (Terumo BCT, INC., USA). При мануальном способе эритроциты получали из единицы (дозы) крови цельной с последующим центрифугированием, экстракцией плазмы и добавлением взвешивающего раствора SAG-M. При всех способах заготовки получали компонент крови «эритроциты, обедненные лейкоцитами, в добавочном растворе» (ЭОЛДР).

Показатели эриптоза были изучены в 10 дозах эритроцитов из единицы (дозы) крови цельной (ЭОЛДР КЦ) и в 21 дозе эритроцитов, полученных методом двойного автоматического афереза (ЭОЛДР а/а). Контролем служили эритроциты периферической крови доноров, взятые до начала процедуры донации.

Фенотипический профиль эритроцитов определяли методом прямой иммунофлуоресценции. Для идентификации популяций эритроцитов применяли меченные флуорохромами поверхностные антигенспецифичные моноклональные антитела к CD235a, CD147, CD9, CD95, CD47, CD69, CD71, CD36, CD55, CD59, CD44, CD38 и CD63. Экспозицию фосфатидилсерина (ФС) на поверхности эритроцитов выявляли по степени связывания с Annexin V. В качестве контроля аутофлуоресценции использовали неокрашенные эритроциты. Рабочие титры антител устанавливались опытным путем.

Аналитическую цитометрию производили на лазерном проточном цитофлуориметре FACScanto II (длина возбуждения 488 нм и 630 нм) с использованием программного обеспечения FACSDiva 7.0. Полученные данные обрабатывались с использованием статистических пакетов FACSDiva v7.0, Statistica 7 и BioStat. За критический уровень статистической значимости принимали 95%-ную вероятность безошибочного прогноза ($p < 0,05$).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процессы эриптоза в эритроцитных компонентах крови были нами изучены по экспрессии молекул CD95, CD47 и экспозиции фосфатидилсерина на поверхности мембраны эритроцита. Антиген CD95 (Fas или APO-1) является трансмембранным гликопротеином, принадлежит к суперсемейству рецепторов фактора некроза опухоли (ФНО) и опосредует апоптоз (запрограммированную клеточную гибель). Фосфатидилсерин входит в состав билипидного слоя мембраны эритроцита, имеет внутримембранное расположение и поддерживает градиент концентрации ионов по обе стороны мембраны эритроцита. Экспозиция ФС на поверхности мембраны эритроцита приводит к активации функции макрофагов по захвату старых и поврежденных клеток и является сигналом к эриптозу. Антиген CD47 – трансмембранный белок (IAP), имеющий высокое сродство к тромбоспондину (TSP) и сигнальному

регуляторному альфа-белку (SIRPα) на мембране макрофагов. Он предотвращает захват нормальных эритроцитов макрофагами ретикулоэндотелиальной системы путем взаимодействия с ингибирующим иммунорецептором SIRP макрофагов. Эритроциты, которые не имеют CD47, быстро выводятся из кровообращения макрофагами красной пульпы селезенки [3–7].

Величина экспрессии антигенов CD95, CD47 и экспозиции фосфатидилсерина на поверхности мембраны эритроцитов периферической крови человека и донорских эритроцитов, заготовленных разными методами, представлены в табл. 1 и на рис. 1.

Таблица 1
Показатели эритроптоза эритроцитов периферической крови человека и донорских эритроцитов, заготовленных мануальным и автоматическим методами, 1-е сутки хранения
Table 1
Eryptosis indicators of human peripheral red blood cells and donor erythrocytes prepared by manual and automatic methods, 1st day of storage

Антиген	Относительное количество положительных клеток (%)		
	ПК, n=22	ЭОЛДР КЦ, n=10	ЭОЛДР а/а, n=21
CD95, %	4,55±0,87	5,45±1,67	11,68±1,59***##
CD47, %	99,16±0,24	99,31±0,22	99,13±0,23
ФС, %	0,40±0,05	0,28±0,06	1,52±0,56*

Примечания: * критический уровень статистической значимости между показателями нативных эритроцитов периферической крови человека и донорских эритроцитов по критерию Стьюдента: * p<0,05, *** p<0,001; # критический уровень статистической значимости между показателями ЭОЛДР КЦ и ЭОЛДР а/а: ## p<0,01; % – процент положительных клеток.

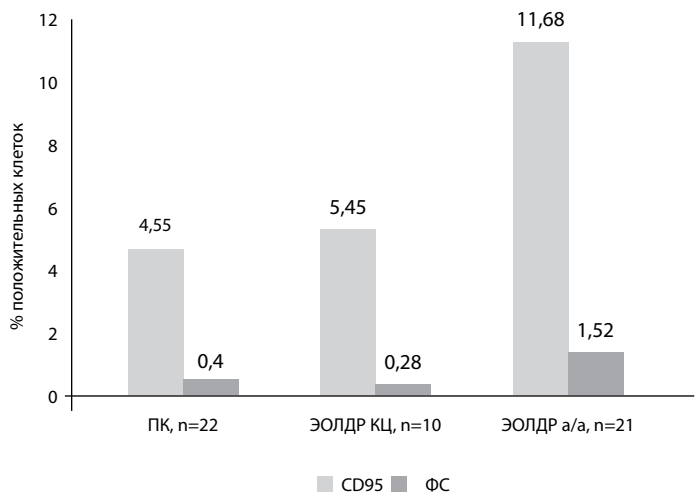


Рис. 1. Относительное количество эритроцитов, экспрессирующих CD95 и фосфатидилсерин (ФС) на внешней поверхности мембраны в образцах эритроцитов периферической крови (ПК) и донорских эритроцитов, заготовленных мануальным (ЭОЛДР КЦ) и автоматическим (ЭОЛДР а/а) методами
Fig. 1. Relative number of erythrocytes expressing CD95 and phosphatidylserine on the outer membrane surface in samples of peripheral blood erythrocytes and donor erythrocytes collected by manual and automatic methods



Как видно из табл. 1, у эритроцитов, заготовленных автоматическим методом, наблюдается значимое увеличение экспрессии CD95 ($p<0,001$) относительно эритроцитов периферической крови и эритроцитов, заготовленных мануальным методом, а также значимое увеличение экспозиции фосфатидилсерина на внешней стороне мембраны ($p<0,05$).

Динамика изменения экспрессии антигенов CD95, CD47 и экспозиции фосфатидилсерина на поверхности мембраны донорских эритроцитов на разных сроках хранения представлена в табл. 2, 3.

Сравнительная характеристика экспрессии CD95, CD47 и экспозиции фосфатидилсерина на поверхности мембраны эритроцитов, заготовленных мануальным и автоматическим методом, на различных сроках хранения приведена в табл. 4 и на рис. 2–4.

Таблица 2

Динамика изменения показателей эриптоза в эритроцитах, заготовленных мануальным методом, на разных сроках хранения

Table 2

Dynamics of eryptosis indicators changes in donor erythrocytes collected manually at different storage periods

Антиген	Относительное количество положительных клеток (%)			
	Периферическая кровь, n=22	1-е сутки, n=10	21-е сутки, n=8	42-е сутки, n=10
CD95, %	4,55±0,87	5,45±1,67	18,92±1,82***###	39,99±3,47***###
CD47, %	99,16±0,24	99,31±0,22	98,06±1,24	99,30±0,39
ФС, %	0,40±0,05	0,28±0,06	2,82±1,18*#	9,69±2,55***###

Примечания: * критический уровень статистической значимости между показателями нативных эритроцитов периферической крови человека и ЭОЛДР КЦ по критерию Стьюдента: * $p<0,05$, *** $p<0,001$; # критический уровень статистической значимости между показателями свежезаготовленных ЭОЛДР КЦ и ЭОЛДР КЦ на 21-й и 42-й день хранения: # $p<0,05$, ### $p<0,001$; % – процент положительных клеток.

Таблица 3

Динамика изменения показателей эриптоза в эритроцитах, заготовленных автоматическим методом, на разных сроках хранения

Table 3

Dynamics of eryptosis indicators changes in erythrocytes collected automatically at different storage periods

Антиген	Относительное количество положительных клеток (%)			
	Периферическая кровь, n=22	1-е сутки, n=21	21-е сутки, n=19	42-е сутки, n=19
CD95, %	4,55±0,87	11,68±1,59***	28,98±3,31***###	34,71±4,29***###
CD47, %	99,16±0,24	99,13±0,23	92,55±2,89*#	89,24±2,90***###
ФС, %	0,40±0,05	1,52±0,56*	2,61±0,73**	7,28±1,95***###

Примечания: * критический уровень статистической значимости между показателями нативных эритроцитов периферической крови человека и ЭОЛДР а/а по критерию Стьюдента: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$; # критический уровень статистической значимости между показателями свежезаготовленных ЭОЛДР а/а и ЭОЛДР а/а на 21-й и 42-й день хранения: # $p<0,05$, ## $p<0,01$, ### $p<0,001$; % – процент положительных клеток.

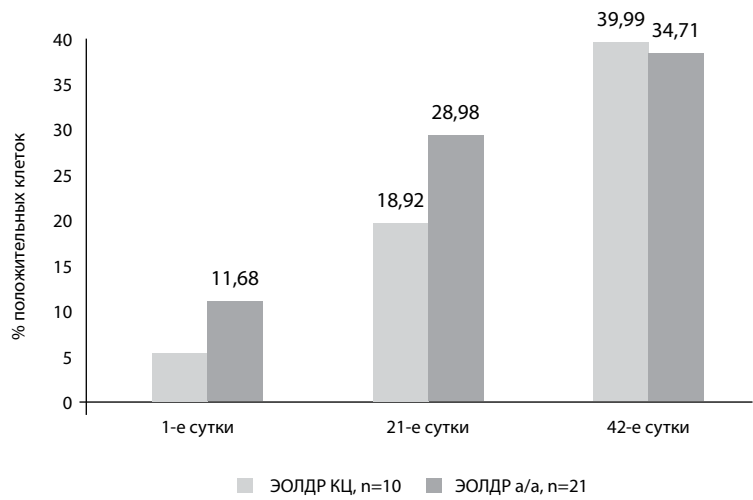


Рис. 2. Динамика экспрессии CD95 на поверхности мембраны донорских эритроцитов, заготовленных мануальным (ЭОЛДР КЦ) и автоматическим (ЭОЛДР а/а) методами, в зависимости от сроков хранения
Fig. 2. Dynamics of CD95 expression on the membrane surface of donor erythrocytes prepared manually and automatically at different storage periods

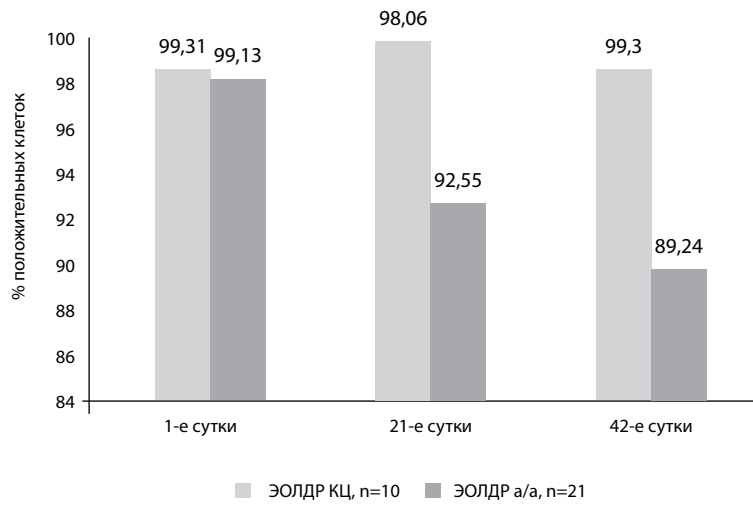


Рис. 3. Динамика экспрессии CD47 на поверхности мембраны донорских эритроцитов, заготовленных мануальным (ЭОЛДР КЦ) и автоматическим (ЭОЛДР а/а) методами, в зависимости от сроков хранения
Fig. 3. Dynamics of CD47 expression on the membrane surface of donor erythrocytes prepared manually and automatically at different storage periods

Из табл. 2 и 3 видно, что с увеличением сроков хранения в донорских эритроцитах нарастают явления эритроптоза в виде увеличения экспрессии CD95, уменьшения



Таблица 4
Динамика изменения показателей эритроптоза в донорских эритроцитах на разных сроках хранения
Table 4
Dynamics of eryptosis indicators changes in donor erythrocytes at different storage periods

Антиген		Относительное количество положительных клеток (%)		
		1-е сутки	21-е сутки	42-е сутки
CD95	из дозы, n=10	5,45±1,67	18,92±1,82	39,99±3,47
	аферез, n=21	11,68±1,59*	28,98±3,31*	34,71±4,29
CD47	из дозы, n=10	99,31±0,22	98,06±1,24	99,30±0,39
	аферез, n=21	99,13±0,23	92,55±2,89	89,24±2,90*
ФС	из дозы, n=10	0,28±0,06	2,82±1,18	9,69±2,55
	аферез, n=21	1,52±0,56	2,61±0,73	7,28±1,95

Примечания: значения показателей приводятся как среднее значение ± стандартная ошибка среднего; * критический уровень статистической значимости между показателями ЭОЛДР КЦ и ЭОЛДР а/а по критерию Стьюдента: * p<0,05; % – процент положительных клеток.

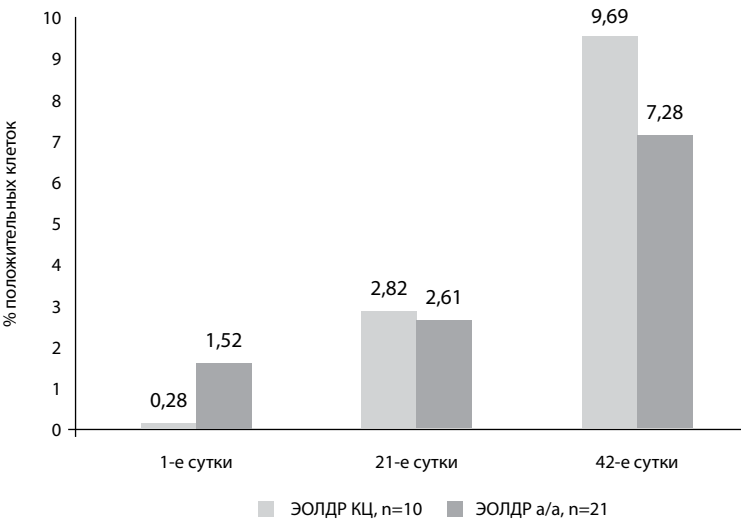


Рис. 4. Динамика экспозиции фосфатидилсерина на поверхности мембраны донорских эритроцитов, заготовленных мануальным (ЭОЛДР КЦ) и автоматическим (ЭОЛДР а/а) методами, в зависимости от сроков хранения
Fig. 4. Dynamics of phosphatidylserine exposure on the membrane surface of donor erythrocytes prepared manually and automatically at different storage periods

количества эритроцитов, несущих молекулу CD47, и увеличения экспозиции фосфатидилсерина на мембранах эритроцитов. При этом в эритроцитах, заготовленных автоматическим методом, изменения экспрессии CD95 и CD47 достоверно более выражены, чем в эритроцитах, заготовленных мануальным методом (p<0,005).

ВЫВОДЫ

1. Процесс заготовки эритроцитных компонентов крови воздействует на состояние мембран донорских эритроцитов в виде усиления экспрессии на их поверхности

антигенов, ассоциированных с активацией эриптоза – запрограммированной гибели эритроцитов.

Увеличение срока хранения донорских эритроцитов сопровождается нарастанием явлений эриптоза. Данные изменения становятся достоверными уже на 21-е сутки при обоих методах заготовки. При этом явления эриптоза более выражены в донорских эритроцитах, заготовленных методом автоматического афереза, по сравнению с донорскими эритроцитами, заготовленными мануальным методом.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Lang F., Qadri S.M. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes. *Blood Purif.* 2012;33(1–3):125–130.
2. Vashchenko V., Vil'yaninov V. Human erythrocyte eryptosis (quasi-apoptosis) and its role in drug therapy. *Reviews on clinical pharmacology and drug therapy*, 2019;17(3):5–38. (in Russian)
3. Kagan V.E., Fabisiak J.P., Shvedova A.A. Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. *FEBS Letters*, 2000;477(1–2):1–7.
4. Burger P. et al. CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis. *Blood*, 2012;119(23):5512–5520.
5. Oldenborg P. et al. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science*, 2000;288:2051–2054.
6. Krammer P.H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 2000;407:789–795.
7. Levoin N., Jean M., Legembre P. CD95 structure, aggregation and cell signaling. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:314. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00314>