

## ХРАНЕНИЕ КРОВИ СОПРОВОЖДАЕТСЯ ИЗМЕНЕНИЯМИ МОРФОДИФРАКТОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КРАСНЫХ КРОВЯНЫХ ТЕЛЕЦ И НАКОПЛЕНИЕМ NO В ЭРИТРОЦИТАХ

Акулич Н.В., Сяхович В.Э., Беляев С. А.

УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория», а. г. Лесной, Беларусь  
*n.akulich@antidoping.by*

Для достижения высоких результатов спортсмены используют запрещенные соединения и методы, в том числе кровяной допинг [1]. К его разновидностям относится переливание крови, применение препаратов, стимулирующих эритропоэз, искусственные переносчики кислорода. Использование всех разновидностей кровяного допинга, включая аутогемотрансфузию, запрещено как в соревновательный, так и в несоревновательный периоды.

Считается, что конечным результатом трансфузии предварительно отобранной крови является повышение содержания гемоглобина, увеличение кислородной емкости и улучшение снабжения мышечной ткани кислородом, что в итоге приводит к повышению выносливости спортсмена. Существует и другая точка зрения, согласно которой особых преимуществ спортсменам переливание крови (с целью роста уровня гемоглобина) предоставлять не должно, поскольку такая манипуляция приводит к росту вязкости крови. Поскольку факт многолетнего использования гемотрансфузии – косвенное доказательство ее эффективности, нами выдвинуто предположение, согласно которому достижение допингового преимущества, обусловленного переливанием крови, вероятно, связано с процессами, происходящими при ее хранении.

В доступной нам литературе приводятся сведения, согласно которым хранение эритроцитов сопровождается различными изменениями (снижение  $\zeta$ -потенциала, сферо- и нарастающий микроцитоз, образование шизоцитов и другие), которые, на первый взгляд, не могут оказать позитивного влияния на кислородтранспортные функции крови. С другой стороны, в последние годы все больше внимания обращается на NO-синтазную активность эритроцитов, роль которой обсуждается в связи с различными физиологическими функциями организма. Поскольку NO-синтазная активность эритроцитов может оказать влияние на адаптацию к спортивным нагрузкам, то целью исследования является оценка структурно-функциональных параметров и содержание NO в эритроцитах при хранении крови.

**Материалы и методы.** Забор крови производился у добровольцев, антикоагулянт – ЭДТА К2. Мазки крови фиксировались метанолом и окрашивались по Романовскому. Пробы крови окрашивались моноклональными антителами к гликофору А (CD 235 а) и реагентом для выявления внутриклеточного NO (DAF-FM Diacetate). Для хранения крови использовался консервант глюгицир, пробы крови анализировались еженедельно в течение 42 дней.

*Световая микроскопия.* При исследовании препарата мазка крови использовался микроскоп Olympus IX 71 (Olympus, Япония). Для анализа

каждого препарата создавали архив изображений эритроцитов с разных (случайных) участков мазка, содержащих монослой эритроцитов.

*Проточная цитометрия.* Определяли параметры прямого и бокового светорассеяния, интенсивность флуоресценции CD 235 а и DAF-FM на приборе FACS ARIA, (BD Bioscience, США). Для пробоподготовки использовали фосфатный буфер, эритроциты на гистограммах гейтировали по CD 235а. Для статистического анализа использовались непараметрические методы. Изменения считались значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Общеизвестно, что кровь, помещенная в искусственную среду гемоконсерванта, претерпевает целый ряд биохимических, морфологических, физико-химических и реологических изменений, связанных в основном с обменными процессами, происходящими в клетках.

На основании данных световой микроскопии фиксированных и окрашенных препаратов крови установлена следующая закономерность: по мере хранения происходит постепенное уменьшение размеров эритроцитов, нарастание сфероцитоза, снижение оптической плотности клеток с выходом гемоглобина в плазму крови [2]. Дальнейший анализ проводился методом проточной цитометрии.

Для ограничения области анализа эритроцитами использовали CD 235 а, а по параметрам прямого и бокового светорассеяния в свежей крови можно было корректно выделить не менее двух популяций эритроцитов, различающихся в основном своими размерами. Для клеток с большими размерами (дискоцитов) характерно небольшое значение величины бокового светорассеяния; часть клеток (менее 20%) представлена сфероцитами, имеющими меньшие линейные размеры, более высокие значения бокового светорассеяния и повышенный уровень внутриклеточного NO.

При хранении крови статистически значимые изменения обнаруживаются после 3 недель. В частности, клетки с небольшими значениями прямого светорассеяния (микроциты) не детектировались, и для большинства клеток был характерен макроцитоз. Дальнейшее хранение (4-я неделя) приводит к появлению популяции эритроцитов, имеющей сниженные значения бокового светорассеяния и признаки анизоцитоза. В этот период наблюдения в эритроцитах нарастала интенсивность флуоресценции DAF-FM, что свидетельствует о росте монооксида азота в клетках. Увеличение экспозиции приводит к снижению этого показателя. В интервале 5-6 недель хранения крови анизоцитоз практически нивелируется, постепенно снижается как среднее значение, так и мода бокового светорассеяния, а к концу наблюдения остаются только «тени» эритроцитов.

Таким образом, в ходе проведенного исследования установлено, что хранение крови приводит к изменению структурно-функциональных параметров эритроцитов, которые сопровождаются фазными колебаниями уровня внутриклеточного монооксида азота красных кровяных телец.

#### Литература

1. Giraud S. Scientific and forensic standards for homologous blood transfusion antidoping analyses // Forensic Science International. – 2008. – Vol. 179. – P. 23-33.
2. Акулич Н.В. и др. Морфологические маркеры старения эритроцитов донорской крови // Вестник МГУ им. А.А. Кулешова. – 2017. – № 1. – С. 75-83.