



Оригинальная статья

Изменение морфологии эритроцитов после действия монооксида углерода на кровь *in vitro*

Козлова Е.К.^{1,2} • Сергунова В.А.² • Козлов А.П.¹ • Шерстюкова Е.А.^{1,2} • Гудкова О.Е.²

Козлова Елена Карловна – д-р физ.-мат. наук, профессор кафедры медицинской и биологической физики¹; вед. науч. сотр. лаборатории биофизики мембран клеток при критических состояниях²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1780-895X>. E-mail: waterlake@mail.ru

Сергунова Виктория

Александровна – канд. биол. наук, вед. науч. сотр., заведующая лабораторией биофизики мембран клеток при критических состояниях²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8425-0845>
✉ 107031, г. Москва, ул. Петровка, 25/2, Российская Федерация.
Тел.: +7 (985) 724 18 27.
E-mail: orbf@mail.ru

Козлов Александр Павлович

– канд. физ.-мат. наук, доцент кафедры медицинской и биологической физики¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3907-080X>. E-mail: fillnoise@mail.ru

Шерстюкова Екатерина

Александровна – преподаватель кафедры медицинской и биологической физики¹; науч. сотр. лаборатории биофизики мембран клеток при критических состояниях²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9962-6315>. E-mail: kmanchenko@yandex.ru

Гудкова Ольга Евгеньевна

– ст. науч. сотр. лаборатории биофизики мембран клеток при критических состояниях²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9220-0138>. E-mail: olkagood@yandex.ru

Актуальность. Одно из патологических действий монооксида углерода (СО) на кровь – образование карбоксигемоглобина. Поскольку карбоксигемоглобин полностью блокирует перенос кислорода, происходит суммарное снижение транспорта кислорода эритроцитами. В результате может возникнуть гипоксия в тканях. Воздействие СО на кровь может также вызвать повреждение клеточной мембраны. Метод атомной силовой микроскопии (АСМ) признан результативным для изучения механизмов структурных повреждений в мембранах эритроцитов. **Цель** – с помощью АСМ выявить особенности изменения морфологии и агрегации эритроцитов в результате действия СО *in vitro*. **Материал и методы.** Все эксперименты были проведены *in vitro*. Исследовали морфологию эритроцитов, их агрегаты с помощью АСМ. Забор крови (150 мкл) проводился в микроветы с ЭДТА (Sarstedt AG & Co., Германия) во время профилактического обследования 5 добровольцев. Для получения СО в пробирке смешивали в пропорции 1:1 муравьиную и серную кислоты. Для измерения концентрации карбоксигемоглобина в крови использовали спектрофотометрический метод, для вычисления концентраций производных гемоглобина в крови – метод “nonlinear fitting” экспериментальных спектров. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Origin (OriginLab Corporation, США). **Результаты.** После воздействия СО происходило смещение пиков. При времени воздействия $t_2 = 320$ с процентное содержание карбоксигемоглобина составило

$C_{\text{HbCO}} = 88 \pm 2\%$. При $t_1 = 160$ с 10% клеток имели форму, отличную от дискоцитов, при $t_2 = 320$ с – 38% клеток. При увеличении времени воздействия СО происходила агрегация эритроцитов и образование их больших конгломератов размером до 30 мкм. В контрольном мазке доля дискоцитов составляла $96 \pm 2\%$, а остальные $4 \pm 1\%$ имели форму эхиноцитов. Диаметр клеток был в диапазоне $D_{\text{контр}} = 7,5 \pm 0,8$ мкм. После воздействия СО $t_1 = 160$ с на кровь в монослое наблюдалось $28 \pm 5\%$ клеток с диаметром (D) < 5,7 мкм. После воздействия СО $t_2 = 320$ с процент клеток с размером D < 5,7 мкм увеличился до $72 \pm 11\%$. **Заключение.** Экспериментально показано, что воздействие СО на кровь вызывало изменение морфологии эритроцитов. Наблюдалось формирование связанных между собой эритроцитарных структур. При увеличении времени воздействия возникла агрегация эритроцитов и образование конгломератов.

Ключевые слова: эритроциты, монооксид углерода, атомная силовая микроскопия, агрегация

Для цитирования: Козлова ЕК, Сергунова ВА, Козлов АП, Шерстюкова ЕА, Гудкова ОЕ. Изменение морфологии эритроцитов после действия монооксида углерода на кровь *in vitro*. Альманах клинической медицины. 2019;47(7):669–75. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-068.

Поступила 23.10.2019; доработана 12.11.2019; принята к публикации 20.11.2019; опубликована онлайн 05.12.2019

¹ ФГАУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет); 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8/2, Российская Федерация

² Научно-исследовательский институт общей реаниматологии имени В.А. Неговского ФНЦ РР; 107031, г. Москва, ул. Петровка, 25/2, Российская Федерация

Моноксид углерода (СО) – газ без запаха, вкуса и цвета – образуется всякий раз, когда органические материалы сжигаются с недостаточным запасом кислорода, необходимого для полного сгорания. Источниками отравления угарным газом также становятся выхлопные газы автомобилей, плохо функционирующие системы отопления, табачный дым [1].

Наряду с экзогенными существуют эндогенные источники СО. Моноксид углерода участвует во многих физиологических процессах, включая регуляцию дыхания [2], передачу сигналов нейронов [3], регуляцию артериального давления [4] и сокращение матки во время беременности [5].

Одним из патологических действий СО на кровь является образование карбоксигемоглобина (НbСО) – продукта присоединения СО к гемоглобину. Одна из основных характеристик СО – его высокое сродство к гемоглобину, оно в 200–250 раз выше по сравнению с кислородом. При повышенной концентрации НbСО в организме могут возникнуть патологические изменения. Разрушение эритроцитов (гемолиз) приводит к увеличению катаболизма гема и, следовательно, к повышенной выработке СО [6]. В целом увеличение НbСО вследствие гемолиза составляет порядка 2–3%, но может быть и больше. Существуют доказательства того, что некоторые эритроцитарные взвеси для

переливания могут иметь уровни НbСО до 12% [7]. Карбоксигемоглобин полностью блокирует перенос кислорода, поэтому происходит суммарное снижение транспорта кислорода эритроцитами. В результате может возникнуть гипоксия в тканях [8].

Наряду с этим воздействие СО на кровь вызывает повреждение клеточной мембраны, изменяется поверхностный заряд эритроцитов [9]. К важным патогенным эффектам воздействия СО на кровь относится повышенная склонность к тромбозам [10]. При участии СО могут возникать и гетерогенные изменения в популяции эритроцитов [11]. Подобные явления наблюдаются и при действии других физико-химических факторов на кровь [12, 13]. Отравление СО диагностируют на основании клинической картины [14] и показателей СО в крови [15]. Изучение влияния СО на морфологию и агрегацию эритроцитов – весьма актуальная задача, так как ее решение позволит предположить клинические проявления симптомов отравления и, возможно, предоставить новые объективные методы исследования. Одним из современных методов диагностики, с помощью которого можно изучать механизмы структурных повреждений в мембранах эритроцитов, признан метод атомной силовой микроскопии (АСМ) [16–19].

Цель – с помощью АСМ выявить особенности изменения морфологии и агрегации эритроцитов в результате действия СО *in vitro*.

Материал и методы

Все эксперименты были проведены *in vitro*. Схема эксперимента отражена на рис. 1. Приготавливали контрольный и исследуемый образцы крови. После воздействия СО на кровь получали монослой клеток на предметном стекле. Исследовали морфологию эритроцитов, их агрегаты с помощью АСМ.

Подготовка образцов крови. Забор крови (150 мкл) в микроветку с ЭДТА (Sarstedt AG & Co., Германия), проводили во время профилактического обследования 5 добровольцев (25–40 лет, двух женщин и трех мужчин). Информированное согласие было получено от каждого донора. Работа выполнена в соответствии с этическими принципами проведения биомедицинских исследований, отраженными в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

Воздействие СО на кровь. Для получения СО в пробирке смешивали в пропорции 1:1 4,5 мл муравьиной (99,7%) и 4,5 мл серной (ОС.Ч.) кислоты [20]. Время активного выделения СО составляло 25–50 с. Для изменения времени воздействия на кровь процесс повторяли несколько раз. Газ подавался в микроветку с кровью через систему

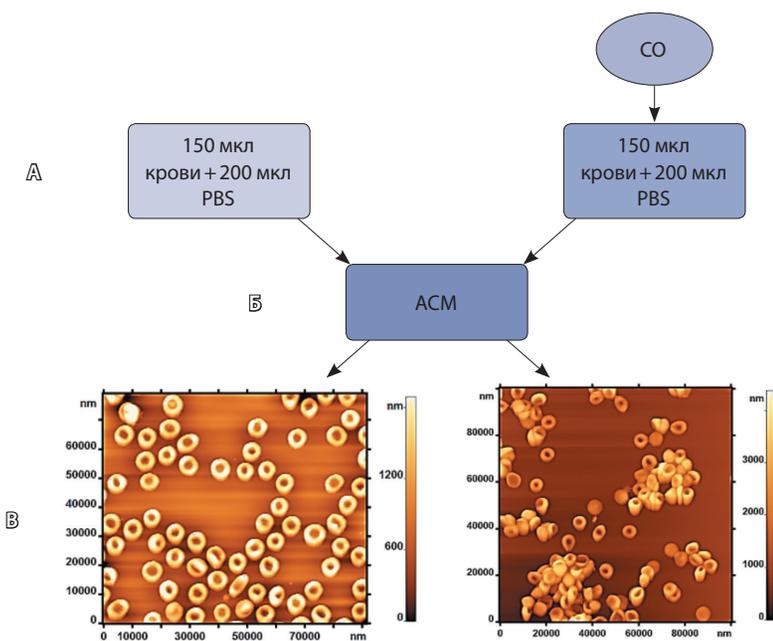


Рис. 1. Схема эксперимента: **А** – образцы крови, **Б** – исследование методом атомной силовой микроскопии (АСМ), **В** – АСМ-изображения; СО – моноксид углерода, PBS – забуференный фосфатом физиологический раствор



стеклянных трубок, конец которой опускали на расстоянии 2–4 мм от дна. Для равномерного воздействия СО на кровь использовали магнитную мешалку. Таким образом, весь объем крови подвергался воздействию газа. В исследовании время воздействия составило $t_1 = 160$ с, $t_2 = 320$ с. В результате полученные образцы крови сравнивали с контрольным (см. рис. 1).

Атомная силовая микроскопия. Изображения эритроцитов получали с помощью АСМ (NTEGRA Prima, NT-MDT Co., Зеленоград, Россия) в полуконтактном режиме. Использовали кантилеверы NSG01 (TipsNano, Россия) со следующими характеристиками: коэффициент жесткости 5 Н/м, радиус иглы 10 нм. Количество точек сканирования: 512, 1024. Поля сканирования: 100×100 мкм², 30×30 мкм², 10×10 мкм². Получали АСМ-изображения клеток в монослое. Монослой эритроцитов формировали с помощью прибора V-sampler (Vision Microscopy, Австрия).

Спектрофотометрия. Для измерения концентрации НbСО в крови использовали спектрофотометрический метод. Измеряли спектр поглощения суспензии эритроцитов (20 мкл эритроцитов + 2,4 буфера) с помощью цифрового спектрофотометра Unico 2800 (United Products & Instruments Inc., США). Для вычисления концентрации производной гемоглобина в крови использовали метод “nonlinear fitting” экспериментальных спектров [18].

Обработка данных и статистический анализ. Были проанализированы следующие группы эритроцитов: контрольная группа – кровь 5 доноров (без воздействия СО), исследуемая группа – кровь тех же 5 доноров, но после воздействия на нее СО *in vitro*. Было сделано по 3 мазка для каждого образца крови. В результате было получено 15 мазков для контрольной группы, 15 мазков после воздействия СО $t_1 = 160$ с, 15 мазков после воздействия СО $t_2 = 320$ с. Получали АСМ-изображения клеток на 3 участках на каждом мазке указанных групп. Статистический анализ данных проводили с помощью программы Origin (OriginLab Corporation, США). Для количественных переменных рассчитывали средние арифметические значения и стандартные отклонения ($m \pm \sigma$). Для проверки значимости различия между средними в разных группах использовали программу ANOVA. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,01$.

Результаты

Спектры поглощения контрольной суспензии имели пики $\lambda = 542$ нм и $\lambda = 577$ нм (рис. 2). После воздействия СО происходило смещение пиков.

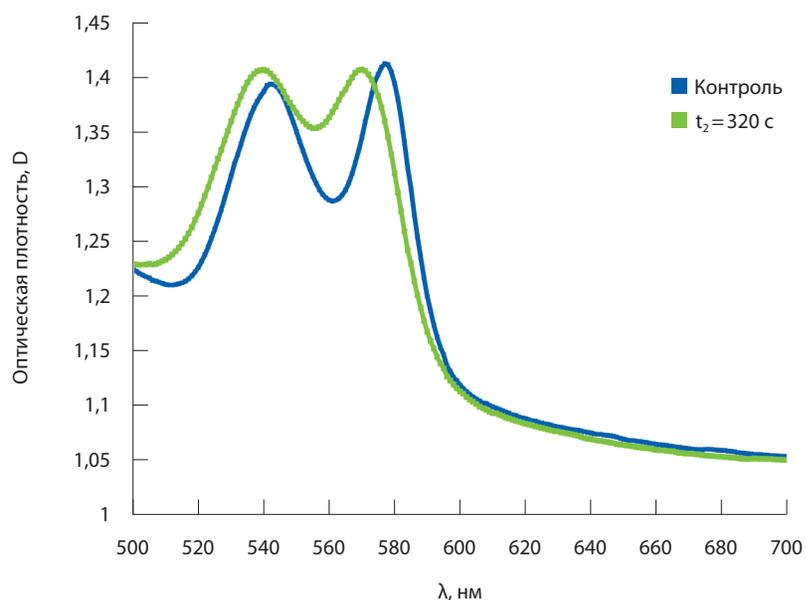


Рис. 2. Спектры поглощения: контрольный образец; после воздействия монооксида углерода на кровь в течение $t_2 = 320$ с

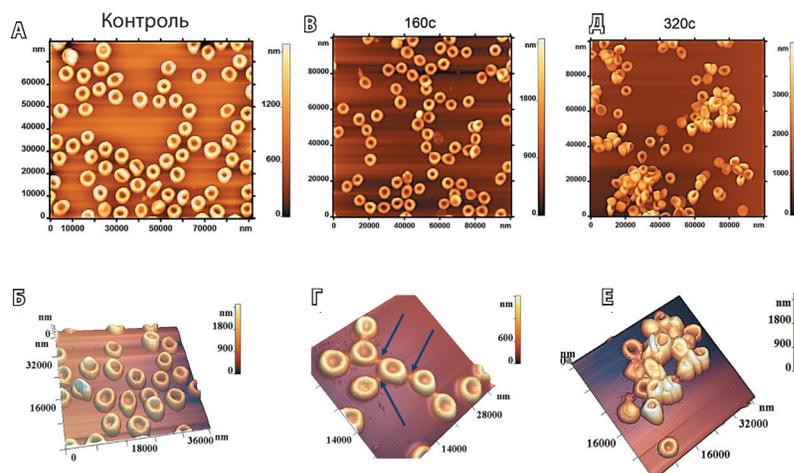


Рис. 3. Изображение эритроцитов в поле атомного силового микроскопа (АСМ): А – контроль $t = 0$ с, АСМ-изображение 80×80 мкм; Б – контроль $t = 0$ с, 3D АСМ-изображение 40×40 мкм; В – воздействие монооксида углерода (СО) $t_1 = 160$ с, АСМ-изображение 100×100 мкм; Г – воздействие СО $t_1 = 160$ с, 3D АСМ-изображение 30×30 мкм; Д – воздействие СО $t_2 = 320$ с, АСМ-изображение 100×100 мкм; Е – воздействие СО $t_2 = 320$ с, 3D АСМ-изображение 30×30 мкм

Пик, который был на длине волны $\lambda = 542$ нм, смещался на длину волны $\lambda = 540$ нм, и пик, который был на длине волны $\lambda = 577$ нм, смещался на длину волны $\lambda = 574$ нм. Действие СО на кровь оценивали по концентрации НbСО в крови. При времени воздействия $t_1 = 160$ с процентное содержание карбоксигемоглобина составило $C_{\text{НbСО}} = 84 \pm 2\%$, при $t_2 = 320$ с оно было равно $88 \pm 2\%$ ($p < 0,01$ по сравнению с t_1).

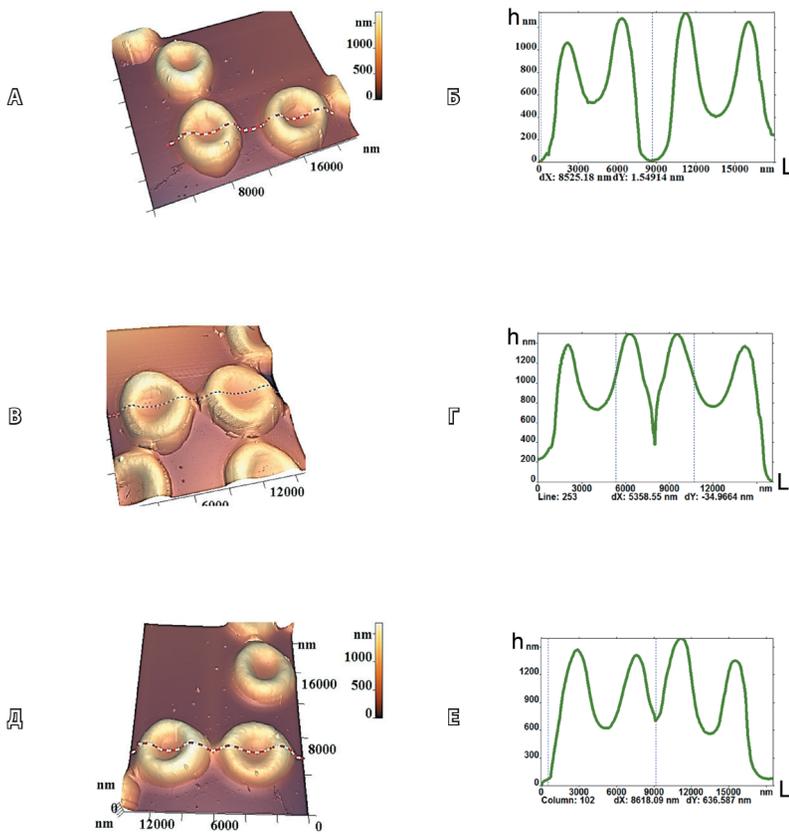


Рис. 4. Эритроциты в поле атомного силового микроскопа и их профили: **А** – контроль; **Б** – профиль контрольных клеток; **В** – зарождение области взаимодействия после действия монооксида углерода (СО) на кровь; **Г** – профиль клеток с зарождением области взаимодействия после действия СО на кровь; **Д** – взаимодействие клеток после действия СО на кровь; **Е** – профиль взаимодействия клеток после действия СО на кровь

Изменение морфологии клеток. Дислоциты, кодоциты, сфероциты

На рис. 3 даны АСМ-изображения эритроцитов в поле атомного силового микроскопа. При воздействии СО на кровь происходило изменение формы и размеров эритроцитов. Эффект зависел от времени воздействия.

В контрольном мазке доля дискоцитов составила $96 \pm 2\%$, а остальные $4 \pm 1\%$ имели форму эхиноцитов. Диаметр клеток был в диапазоне $D_{\text{контр}} = 7,5 \pm 0,8$ мкм.

После воздействия СО на кровь $t_1 = 160$ с в монослое наблюдалось $6 \pm 1\%$ сфероцитов ($p < 0,01$). У $28 \pm 5\%$ диаметр клеток (D) был $< 5,7$ мкм ($p < 0,01$). Отличительной особенностью клеток после воздействия СО было объединение их в цепочки. Между клетками возникали мостики связей (указаны стрелками на рис. 3Г), длина которых $L = 1 \pm 0,5$ мкм, ширина – $10,5 \pm 0,2$ мкм.

В результате воздействия СО $t_2 = 320$ с на кровь в монослое увеличилось количество сфероцитов до $28 \pm 7\%$ ($p < 0,01$) и появились мишеневидные клетки, доля которых составила $10 \pm 2\%$. Процент клеток с размером $D < 5,7$ мкм увеличился до $72 \pm 11\%$ ($p < 0,01$). Повышенная концентрация СО привела к агрегации эритроцитов.

Процесс агрегации показан на рис. 4. В контрольном образце (рис. 4А) клетки находились на большом расстоянии друг от друга (500–1000 нм) и не связывались между собой. Из рисунка 4Б следует, что клетки не взаимодействуют друг с другом, между ними существует пространство по горизонтали $L_{\text{контр}} = 500$ –1000 нм. В результате действия СО развивается процесс взаимодействия клеток (рис. 4В, Г, Д, Е). На рис. 4В, Г видно появление области взаимодействия $L_{\text{со}} = 0$ с общей высотой 500–600 нм. На рис. 4Д, Е проиллюстрировано касание двух эритроцитов в результате их взаимодействия.

Изменение параметров клеток

При воздействии СО происходило изменение формы клеток, вызванное нарушением молекулярной структуры мембран эритроцитов.

Контрольный эритроцит имеет двояковогнутую форму (рис. 5А). АСМ-измерения показали высоту тора дискоцитов $1,2 \pm 0,2$ мкм, глубину впадины – $0,57 \pm 0,04$ мкм (рис. 5А, Б). Воздействие СО на кровь *in vitro* вызвало изменение морфологии клеток и их размеров. Типичные формы клеток, которые появлялись в результате воздействия СО, – это кодоциты (рис. 5В) и сфероциты (рис. 5Д). Основное отличие кодоцита (мишеневидной клетки) от сфероцита в том, что в середине клетки не пэллор, а выпуклость (мишень). Ее диаметр $D_{\text{миш}} = 3 \pm 0,5$ мкм, что составило почти половину диаметра клетки. Высота мишеневидной структуры равна $h_{\text{миш}} = 0,4 \pm 0,01$ мкм (рис. 5В, Г), что соизмеримо с высотой остальной части клетки. Высота купола сфероцита составила $1,8 \pm 0,2$ мкм. Его диаметр равен $D = 5700 \pm 300$ нм. Характеристики сфероцитов отличаются от параметров контрольных клеток.

Обсуждение

Действие СО на кровь может оказать влияние на организм. Продолжительное присутствие в крови СО вызывает серьезные повреждения миокарда и центральной нервной системы. Избыточная эндогенная продукция СО и избыточное образование НbСО могут играть значительную роль



в тканевом повреждении и формировании полиорганной дисфункции [8].

Можно выделить два механизма влияния СО на кровь: 1) изменение морфологии клеток, как следствие – существенное изменение реологии, 2) образование НbСО в эритроцитах, что приводит к нарушениям окислительно-восстановительных процессов как в самих эритроцитах, так и в окружающих тканях.

Сильные последствия могут возникнуть в связи с нарушениями не только газообмена, но и формы и размеров клеток. Появление НbСО может повредить основные метаболические пути, которые отвечают за нормальную функцию гемоглобина и целостность клеточной мембраны [9]. В результате это может стать причиной сближения эритроцитов и образования агрегатов (см. рис. 3Д, Е).

Эритроциты – клетки крови, основной функцией которой является перенос кислорода в ткани. В норме это дискоциты. При влиянии физико-химических факторов форма клеток может измениться [21, 22]. В нашем эксперименте после воздействия СО на кровь в течение 160 с форму, отличную от дискоцитов, имели 10% клеток, а в течение 320 с – 38% клеток. При действии СО отмечено сближение эритроцитов и образование специфических мостиков. При увеличении времени воздействия СО происходила агрегация эритроцитов и образование их больших конгломератов размером до 30 мкм.

Появление клеток, отличных от дискоцитов (см. рис. 5), повышенная агрегация (см. рис. 3Д, Е и 4В, Д) эритроцитов могут ухудшить реологические свойства крови [23]. С помощью метода АСМ мы показали слияние эритроцитов, вплоть до образования конгломератов. Этот процесс может лежать в основе механизма появления микротромбов и изменения динамики в зоне микроциркуляции после действия СО на организм [24, 25].

Отметим, что на территории Российской Федерации подобные исследования ранее не проводились. Выявленные нами структурные изменения эритроцитов на микро- и наноровнях дополняют имеющиеся в мировой литературе данные о токсическом действии СО на организм.

Заключение

Методом АСМ показано, что воздействие СО на кровь наряду с образованием НbСО вызывало изменение морфологии эритроцитов – появление кодоцитов и сфероцитов. С помощью

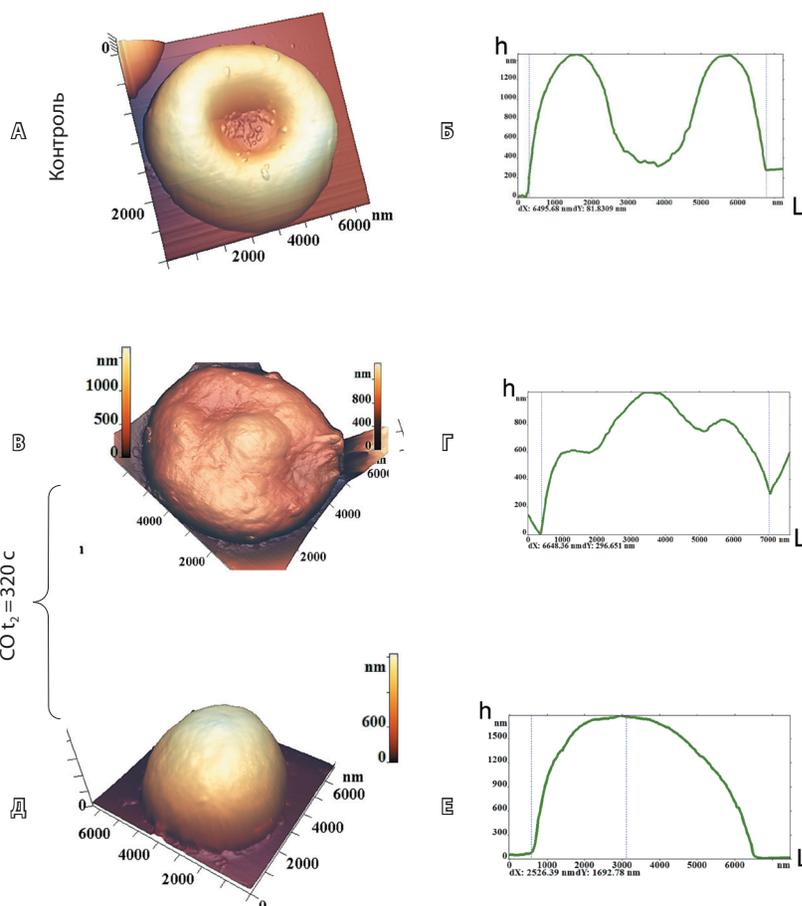


Рис. 5. Формы клеток при воздействии монооксида углерода (СО) в течение 320 с – 3D изображения, полученные с помощью атомного силового микроскопа: дискоцит (А) и его профиль (Б), кодоцит (В) и его профиль (Г), сфероцит (Д) и его профиль (Е)

АСМ-изображений выявлены стадии взаимодействия эритроцитов. При этом наблюдалось формирование связанных между собой эритроцитарных структур. При увеличении времени воздействия СО происходили агрегация эритроцитов и образование конгломератов. Таким образом, действие СО на кровь может вызывать не только появление НbСО, который полностью блокирует перенос кислорода, но и патологические изменения на мембранном и клеточном уровнях. Данные эффекты следует учитывать при разработке тактики лечения пациентов после отравления угарным газом. Количество и качество этих нарушений в перспективе могут быть рассмотрены как диагностический и прогностический биомаркер патологии организма. Для получения дальнейших результатов, которые могут быть использованы в клинической практике, представляется целесообразным продолжить исследование. ©



Дополнительная информация

Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации и “Russian Academic Excellence Project 5-100”.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

Е.К. Козлова – концепция и дизайн исследования, участие в эксперименте, анализ полученных данных, написание текста, редактирование рукописи; В.А. Сергунова – выполнение экспериментального исследования, получение изображений с помощью атомного силового микроскопа

и их обработка, статистическая обработка данных, написание текста, редактирование рукописи; А.П. Козлов – выполнение экспериментального исследования, измерение карбоксигемоглобина спектрофотометрическим методом, использование метода “nonlinear fitting” для вычисления производных гемоглобина, анализ и интерпретация результатов исследования, редактирование рукописи; Е.А. Шерстюкова – выполнение экспериментального исследования, измерение карбоксигемоглобина спектрофотометрическим методом, использование метода “nonlinear fitting” для вычисления производных гемоглобина, участие в эксперименте, статистическая обработка данных; О.Е. Гудкова – выполнение экспериментального исследования, анализ результатов, редактирование рукописи. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Литература / References

- Satran D, Henry CR, Adkinson C, Nicholson CI, Bracha Y, Henry TD. Cardiovascular manifestations of moderate to severe carbon monoxide poisoning. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(9):1513–6. doi: 10.1016/j.jacc.2005.01.044.
- Prabhakar NR, Peng YJ, Nanduri J. Recent advances in understanding the physiology of hypoxic sensing by the carotid body. *F1000Res*. 2018;7. pii: F1000 Faculty Rev-1900. doi: 10.12688/f1000research.16247.1.
- Boehning D, Moon C, Sharma S, Hurt KJ, Hester LD, Ronnett GV, Shugar D, Snyder SH. Carbon monoxide neurotransmission activated by CK2 phosphorylation of heme oxygenase-2. *Neuron*. 2003;40(1):129–37. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00596-8.
- Johnson RA, Johnson FK. Heme oxygenase-derived endogenous carbon monoxide impairs flow-induced dilation in resistance vessels. *Shock*. 2008;29(4):526–30. doi: 10.1097/shk.0b013e31815076e3.
- Ahmed A, Rezai H, Broadway-Stringer S. Evidence-based revised view of the pathophysiology of preeclampsia. *Adv Exp Med Biol*. 2017;956:355–74. doi: 10.1007/5584_2016_168.
- Sears DA, Udden MM, Thomas LJ. Carboxyhemoglobin levels in patients with sickle-cell anemia: relationship to hemolytic and vasoocclusive severity. *Am J Med Sci*. 2001;322(6):345–8. doi: 10.1097/00000441-200112000-00007.
- Ehlers M, McCloskey D, Devejian NS. Alarming levels of carboxyhemoglobin in a unit of banked blood. *Anesth Analg*. 2003;97(1):289–90. doi: 10.1213/01.ane.0000066261.57368.0c.
- Курсов СВ, Белецкий АВ, Лизогуб КИ, Лизогуб МВ. Мониторинг содержания в крови карбоксигемоглобина для оценки тяжести травматического шока и реперфузионных повреждений (аналитический обзор с результатами собственных наблюдений). *Медицина неотложных состояний*. 2017;(1):32–8. doi: 10.22141/2224-0586.1.80.2017.94449. [Kursov SV, Beletskiy OV, Lyzogub KI, Lyzogub MV. Blood carboxyhemoglobin monitoring for evaluation of severity of traumatic shock and reperfusion injuries (analytical review with results of our own observations). *Emergency Medicine*. 2017;(1):32–8. Russian. doi: 10.22141/2224-0586.1.80.2017.94449.]
- Szeremeta M, Petelska AD, Kotyńska J, Niemcunowicz-Janica A, Figaszewski ZA. The effect of fatal carbon monoxide poisoning on the surface charge of blood cells. *J Membr Biol*. 2013;246(9):717–22. doi: 10.1007/s00232-013-9591-2.
- Dileo PA, Tucciarone M, Castro ER, Guerrero M. Late stent thrombosis secondary to carbon monoxide poisoning. *Cardiovasc Res*. 2011;92(1):56–8. doi: 10.1016/j.carres.2009.06.002.
- Tyunina OI, Artyukhov VG. Carbon monoxide (CO) modulates surface architectonics and energy metabolism of human blood erythrocytes. *Bull Exp Biol Med*. 2018;165(6):803–7. doi: 10.1007/s10517-018-4269-5.
- Díaz-Marrero AR, Rodríguez González MC, Hernández Creus A, Rodríguez Hernández A, Fernández JJ. Damages at the nanoscale on red blood cells promoted by fire corals. *Sci Rep*. 2019;9(1):14298. doi: 10.1038/s41598-019-50744-6.
- Kozlova E, Chernysh A, Moroz V, Sergunova V, Gudkova O, Manchenko E. Morphology, membrane nanostructure and stiffness for quality assessment of packed red blood cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):7846. doi: 10.1038/s41598-017-08255-9.
- Eichhorn L, Thudium M, Jüttner B. The Diagnosis and Treatment of Carbon Monoxide Poisoning. *Dtsch Arztebl Int*. 2018;115(51–2):863–70. doi: 10.3238/arztebl.2018.0863.
- Widdop V. Analysis of carbon monoxide. *Ann Clin Biochem*. 2002;39(Pt 4):378–91. doi: 10.1258/000456302760042146.
- Kozlova E, Chernysh A, Sergunova V, Gudkova O, Manchenko E, Kozlov A. Atomic force microscopy study of red blood cell membrane nanostructure during oxidation-reduction processes. *J Mol Recognit*. 2018;31(10):e2724. doi: 10.1002/jmr.2724.
- Черныш АМ, Козлова ЕК, Мороз ВВ, Сергунова ВА, Гудкова ОЕ, Манченко ЕА, Козлов АП. Влияние антиоксиданта на основе янтарной кислоты на превращение метгемоглобина в оксигемоглобин in vitro. *Общая реаниматология*. 2018;14(2):46–59. doi: 10.15360/1813-9779-2018-2-46-59. [Chernysh AM, Kozlova EK, Moroz VV, Sergunova VA, Gudkova OE, Manchenko EA, Kozlov AP. Effects of succinate-based antioxidant on in vitro conversion of methemoglobin in oxyhemoglobin. *General Reanimatology*. 2018;14(2):46–59. Russian. doi: 10.15360/1813-9779-2018-2-46-59.]
- Kozlova E, Chernysh A, Manchenko E, Sergunova V, Moroz V. Nonlinear biomechanical characteristics of deep deformation of native RBC membranes in normal state and under modifier action. *Scanning*. 2018;2018:1810585. doi: 10.1155/2018/1810585.
- Ruggeri FS, Marcott C, Dinarelli S, Longo G, Girasole M, Dietler G, Knowles TPJ. Identification of oxidative stress in red blood cells with nanoscale chemical resolution by infrared nanospectroscopy. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9). pii: E2582. doi: 10.3390/ijms19092582.
- Yang CC, Ger J, Li CF. Formic acid: a rare but deadly source of carbon monoxide poisoning. *Clin Toxicol (Phila)*. 2008;46(4):287–9. doi: 10.1080/15563650701378746.
- Carrelli-Alinovi C, Dinarelli S, Sampaiole B, Misiti F, Girasole M. Morphological changes induced in erythrocyte by amyloid beta peptide and glucose depletion: A combined atomic force microscopy and biochemical study. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2019;1861(1):236–44. doi: 10.1016/j.bbmem.2018.07.009.
- Kozlova E, Chernysh A, Moroz V, Gudkova O, Sergunova V, Kuzovlev A. Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action. *Sci Rep*. 2014;4:6033. doi: 10.1038/srep06033.
- Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. *Clin Chem*. 2000;46(8 Pt 2):1284–90.
- Baskurt OK, Meiselman HJ. RBC aggregation: more important than RBC adhesion to endothelial cells as a determinant of in vivo blood flow in health and disease. *Microcirculation*. 2008;15(7):585–90. doi: 10.1080/10739680802107447.



25. Лысенко ВИ, Голянищев МА. Диагностика и неотложная помощь при отравлении монооксидом углерода. Медицина неотложных

состояний. 2016;(5):18–24. doi: 10.22141/2224-0586.5.76.2016.76429. [Lysenko VI, Golyanischev MA. Diagnosing and emergency care

at poisoning with carbon monoxide. Emergency Medicine. 2016;(5):18–24. Russian. doi: 10.22141/2224-0586.5.76.2016.76429.]

Changes in the morphology of erythrocytes after *in vitro* exposure of blood to carbon monoxide

E.K. Kozlova^{1,2} • V.A. Sergunova² • A.P. Kozlov¹ • E.A. Sherstyukova^{1,2} • O.E. Gudkova²

Background: One of the pathological effects of carbon monoxide (CO) on blood is the formation of carboxyhemoglobin. Carboxyhemoglobin completely blocks oxygen transfer; therefore, there is a net decrease in oxygen transport by red blood cells potentially resulting in tissue hypoxia. The effects of CO on blood can also damage cell membranes. Atomic force microscopy (AFM) has been recognized as effective for investigation into the mechanisms of structural damage in erythrocyte membranes. **Aim:** By means of AFM, to identify characteristics of changes in morphology and aggregation of erythrocytes exposed to CO *in vitro*. **Materials and methods:** All experiments were performed *in vitro*. We studied the morphology of erythrocytes and their aggregates with AFM. Blood sampling (150 µl) in microvettes with EDTA (Sarstedt AG & Co., Germany) was carried out during a prophylactic work-up of 5 volunteers. To obtain CO in a test tube, formic acid was mixed with sulfuric acid 1:1. Blood levels of carboxyhemoglobin were measured by spectrophotometry. A nonlinear fitting method of the experimental spectra was used to calculate the concentrations of hemoglobin derivatives in blood. Statistical analysis was done with the Origin software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). **Results:** After CO exposure, a shift in peaks was observed. At exposure time $t_2 = 320$ s, the percentage of carboxyhemoglobin (C_{HbCO}) was $88 \pm 2\%$. As a result of blood exposure to CO, at $t_1 = 160$ s 10% of the cells differed in their shape from discocytes, whereas at

$t_2 = 320$ s their proportion was 38%. With increasing duration of exposure to CO, erythrocyte aggregation occurred with formation of their large conglomerates up to 30 µm in size. In the control smear, the proportion of discocytes was $96 \pm 2\%$, and the remaining $4 \pm 1\%$ of the cells had the form of echinocytes. The cell diameter (D_{cont}) was in the range 7.5 ± 0.8 µm. After blood exposure to CO at $t_1 = 160$ s in the monolayer, $28 \pm 5\%$ of cells had a diameter less than < 5.7 µm. After CO exposure at $t_2 = 320$ s, the proportion of cells with a diameter of less than < 5.7 µm increased to $72 \pm 11\%$.

Conclusion: The experiments have shown that blood exposure to CO changed the morphology of erythrocytes. The formation of interconnected structures made of red blood cells was observed. With increased time of exposure, erythrocytes demonstrated aggregation with conglomerate formation.

Key words: red blood cells, carbon monoxide, atomic force microscopy, aggregation

For citation: Kozlova EK, Sergunova VA, Kozlov AP, Sherstyukova EA, Gudkova OE. Changes in the morphology of erythrocytes after *in vitro* exposure of blood to carbon monoxide. Almanac of Clinical Medicine. 2019;47(7):669–75. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-068.

Received 23 October 2019; revised 12 November 2019; accepted 20 November 2019; published online 5 December 2019

Funding

The study was performed with a financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation and the "Russian Academic Excellence Project 5-100".

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Authors' contributions

E.K. Kozlova, the study design and concept, participation in the experiments, data analysis, text writing and editing of the manuscript; V.A. Sergunova, performance of the experiments, imaging with atomic force microscope and their processing, statistical analysis, text writing, editing of the manuscript; A.P. Kozlov, performance of the experiments, measurement of carboxyhemoglobin by spectrophotometry, calculation of hemoglobin derivatives by a nonlinear fitting model, analysis and interpretation of the study results, editing of the manuscript; E.A. Sherstyukova, performance of the experiments, measurement of carboxyhemoglobin by spectrophotometry, calculation of hemoglobin derivatives by a nonlinear fitting model, statistical analysis; O.E. Gudkova, performance of the experiments, analysis of the study results, editing of the manuscript. All the authors have contributed significantly to the study conduct and preparation of the paper, have read and approved its final version before the publication.

Elena K. Kozlova – Doctor of Phys. and Math. Sci., Professor, Chair of Medical and Biological Physics¹; Leading Research Fellow, Laboratory of Biophysics of Cells Membranes in Critical States²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1780-895X>. E-mail: waterlake@mail.ru

Viktoriya A. Sergunova – PhD (in Biol.), Leading Research Fellow, Chief of Laboratory of Biophysics of Cells Membranes in Critical States²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8425-0845> ✉ 25/2 Petrovka ul., Moscow, 107031, Russian Federation. Tel.: +7 (985) 724 18 27. E-mail: orbf@mail.ru

Aleksandr P. Kozlov – PhD (in Phys. and Math.), Associate Professor, Chair of Medical and Biological Physics¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3907-080X>. E-mail: fillnoise@mail.ru

Ekaterina A. Sherstyukova – Assistant, Chair of Medical and Biological Physics¹; Research Fellow, Laboratory of Biophysics of Cells Membranes in Critical States²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9962-6315>. E-mail: kmanchenko@yandex.ru

Olga E. Gudkova – Senior Research Fellow, Laboratory of Biophysics of Cells Membranes in Critical States²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9220-0138>. E-mail: olkagood@yandex.ru

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8/2 Trubetskaya ul., Moscow, 119991, Russian Federation

²V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology; 25/2 Petrovka ul., Moscow, 107031, Russian Federation