



# Наноструктура мембран эритроцитов при интоксикации крови. Исследование с помощью атомной силовой микроскопии

Сергунова В.А.<sup>1</sup> • Черняев А.П.<sup>2</sup> • Козлов А.П.<sup>3</sup> • Близнюк У.А.<sup>2</sup> • Борщеговская П.Ю.<sup>2</sup> • Козлова Е.К.<sup>1,2,3</sup> • Черныш А.М.<sup>1,3</sup>

## Сергунова Виктория

Александровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаборатория биофизики мембран клеток при критических состояниях<sup>1</sup>

✉ 107031, г. Москва, ул. Петровка, 25/2, Российская Федерация.  
Тел.: +7 (985) 724 18 27.  
E-mail: orbf@mail.ru

Черняев Александр Петрович – д-р физ.-мат. наук, профессор, заведующий кафедрой физики ускорителей и радиационной медицины физического факультета<sup>2</sup>

Козлов Александр Павлович – канд. физ.-мат. наук, доцент кафедры медицинской и биологической физики<sup>3</sup>

Близнюк Ульяна Александровна – канд. физ.-мат. наук, ст. преподаватель кафедры физики ускорителей и радиационной медицины физического факультета<sup>2</sup>

Борщеговская Полина Юрьевна – канд. физ.-мат. наук, преподаватель кафедры физики ускорителей и радиационной медицины физического факультета<sup>2</sup>

Козлова Елена Карловна – д-р физ.-мат. наук, вед. науч. сотр., лаборатория биофизики мембран клеток при критических состояниях<sup>1</sup>; профессор кафедры физики ускорителей и радиационной медицины физического факультета<sup>2</sup>; профессор кафедры медицинской и биологической физики<sup>3</sup>

Черныш Александр Михайлович – д-р биол. наук, заведующий лабораторией биофизики мембран клеток при критических состояниях<sup>1</sup>; профессор кафедры медицинской и биологической физики<sup>3</sup>

**Актуальность.** Действие токсинов на наноструктуру мембран клеток крови – одна из ключевых проблем биофизики и медицины. Главными показателями качества крови признаны морфология и структура мембран эритроцитов. В этой связи актуальной задачей представляется анализ дефектов мембран при действии токсинов. **Цель** – выявить характерные особенности наноструктуры мембран и установить закономерности ее изменения, возникающие при интоксикации геминном и при длительном хранении эритроцитарной взвеси. **Материал и методы.** Исследования проводили *in vitro* на цельной крови человека, в которую добавляли гемин, и на эритроцитарной взвеси с гемоконсервантом CPD, которую хранили при 4 °С в течение 30 суток. Наноструктуру мембран эритроцитов изучали с помощью атомной силовой микроскопии. **Результаты.** Характерные размеры пространственных периодов между «зернами» составили 120–200 нм. Количество «зерен» в области топологического дефекта варьировало от 4–5 до нескольких десятков. Такие домены возникали практически на всех клетках эритроцитарной взвеси, а также при воздействии гемина на кровь. При повышении интоксикации геминном и при увеличении срока хранения возрастало количество эхиноцитов, которые

впоследствии трансформировались в сфероэхиноциты. При воздействии геминном и при хранении эритроцитарной взвеси на 9–12-е сутки наблюдалось специфическое изменение наноструктуры мембран красных клеток крови. Образовывались структурные кластеры – домены, в которых проявлялась зернистая структура. **Заключение.** Экспериментально установлено, что гемин и окислительные процессы в крови оказывают специфическое воздействие на наноструктуру мембран эритроцитов, образуя домены на поверхности. Характерный размер зернистых структур в доменах составляет 100–200 нм, что совпадает с характерным размером спектринового матрикса. Данные результаты можно применять в фундаментальной и практической медицине, при проведении гемотрансфузии, при анализе действия токсина на организм человека. Биофизические механизмы образования доменов могут лечь в основу изучения взаимодействия токсинов с мембранами.

**Ключевые слова:** мембраны эритроцитов, наноструктура, домены с зернистой структурой, атомная силовая микроскопия, гемин, эритроцитарная взвесь

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-234-241

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей реаниматологии имени В.А. Неговского»; 107031, г. Москва, ул. Петровка, 25/2, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; 119991, г. Москва, Ленинские горы, 1, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России; 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8/2, Российская Федерация



**В** физиологических условиях окислительные процессы сопровождаются образованием радикалов. Однако некоторые вещества (анилин и его производные), лекарства и яды (нитриты и нитраты, нафталин, окиси азота) способны окислять  $Fe^{2+}$  до  $Fe^{3+}$ , увеличивая количество производных гемоглобина.

Окисление гема может происходить также при выходе гемоглобина из клетки в кровеносное русло, острой кровопотере, хранении эритроцитарной взвеси. Окисленный гемоглобин не способен переносить кислород к тканям. Кроме того, производные гемоглобина могут нарушить структуру мембран эритроцитов. Так, гемин нарушает конформацию спектрина, белка band 4.1 и ослабляет связь между ними [1]. Изменения морфологии красных клеток крови и структуры их мембран могут быть вызваны окислительными процессами, развивающимися в объеме длительно сохраняемой эритроцитарной взвеси, и активацией свободнорадикальных процессов в самом эритроците [2, 3]. Поддержание стабильного состояния эритроцитов при длительном хранении эритроцитарной взвеси – одна из ключевых проблем трансфузиологии [4].

Переливание компонентов крови рассматривается как операция трансплантации ткани организма с возможным последующим развитием жизненно опасных реакций. Качество трансфузионных сред считается первостепенным в обеспечении эффективности трансфузий и профилактики подавляющего большинства тяжелых посттрансфузионных реакций [5]. Качество сохраняемой эритроцитарной взвеси во многом определяется формой эритроцитов и структурой их мембран [6, 7]. Нарушение этих параметров может приводить к снижению деформируемости эритроцитов, ослаблению или вовсе прекращению их газотранспортной функции, к ухудшению реологических свойств крови [8].

К эффективным методам изучения морфологии и структуры мембран клеток относят атомную силовую микроскопию [9]. Этот метод не требует предварительной фиксации объекта, а предел разрешения атомных силовых микроскопов составляет менее одного нанометра, что позволяет детально изучать структуру мембран клеток.

Цель работы – выявить характерные особенности наноструктуры мембран и установить закономерности ее изменения, возникающие при интоксикации гемом и при длительном хранении эритроцитарной взвеси.

## Материал и методы

Кровь и растворы

Забор крови производили у пяти доноров в микроветты с ЭДТА (Sarstedt AG and Co., Германия) при профилактических осмотрах. В соответствии с требованиями этического комитета ФГБНУ «НИИОР» было получено согласие всех доноров на проведение исследований.

Интоксикация крови гемом производилась *in vitro*. Для приготовления рабочего раствора использовали сухой гемин (Sigma, США). Сначала растворяли 200 мг NaOH в 10 мл дистиллированной воды. Затем 50 мг сухого гемина растворяли в 1 мл этого раствора и добавляли 5 мл дистиллированной воды. Рабочий раствор вводили в различных объемах в микроветты с кровью для получения различных концентраций гемина. Конечная концентрация гемина в крови составляла в наших опытах от 0,3 до 1,8 мМ. Время воздействия варьировало от 2 до 60 минут.

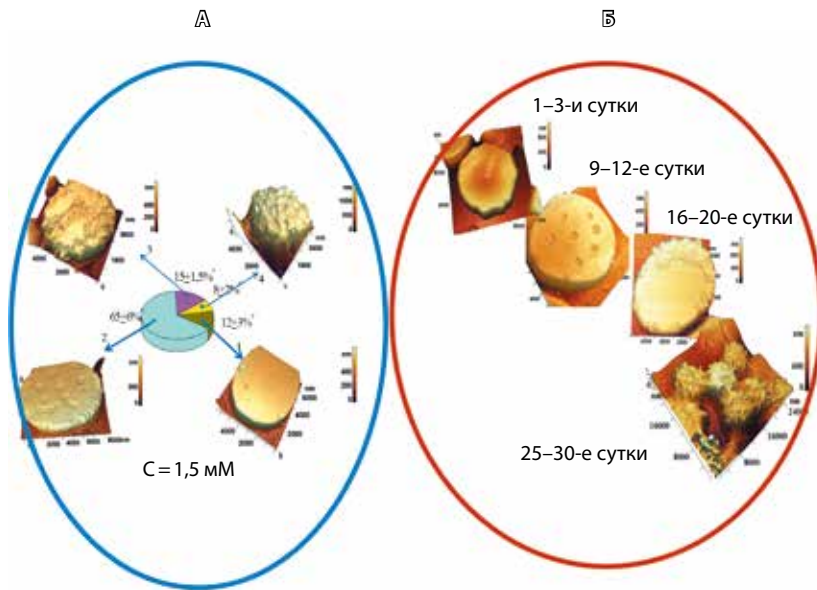
Эритроцитарная взвесь

Эритроцитарную взвесь, запечатанную в герметичные контейнеры (400 мл) с гемоконсервантом CPD, получали от двух независимых источников: Станция переливания крови Департамента здравоохранения г. Москвы – 4 контейнера с группами крови А(II), В(III), О(I), О(I) и учреждение службы крови МО РФ – 5 контейнеров с группами крови О(I), АВ (IV), А(II), А(II), В(III). На станциях кровь исследовали на возбудителей инфекционных заболеваний, центрифугировали, фильтровали в соответствии с существующими инструкциями. Гематокрит эритроцитарной взвеси составлял 50–55%.

Эритроцитарную взвесь хранили в течение 30 суток при температуре 4 °С в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения [10]. В день проведения опыта отбирали пробу 15 мл крови без нарушения герметичности контейнера и разбавляли физиологическим раствором до нормального гематокрита (34–40%). Пробы крови отбирали на 2-, 5-, 9-, 16-, 23- и 30-е сутки хранения. Измерения проводили при 20 °С.

Общий анализ крови проводили на гематологическом анализаторе “ADVIA 60” (Германия), биохимический анализ – на анализаторе “Miura One” (I.S.E. Group, Италия).

Анализ кислотно-основного состояния проводили с помощью ионометрического преобразователя «И-510» (Россия). Для измерения pH использовали электроды ЭС-10603 с электродом



**Рис. 1.** Статистическое распределение морфологии клеток: **А** – при воздействии на кровь гемина в концентрации  $C = 1,5 \text{ мМ}$ , \* $p < 0,05$  по сравнению с контрольным мазком; цифрами обозначены формы эритроцитов: 1 – дискоцит, 2 – дискоциты с зернистыми доменами, 3 – эхиноцит, 4 – сфероэхиноцит; **Б** – при интоксикации в результате хранения эритроцитарной взвеси: 1–3-и сутки – дискоцит, 9–12-е сутки – дискоцит с зернистыми доменами, 16–20-е сутки – эхиноцит, 25–30-е сутки – сфероэхиноциты

сравнения ЭСр-10103. Концентрацию ионов калия измеряли калий-селективным электродом ХС-К-001.

Выход гемоглобина в раствор гемоконсерванта определяли спектрофотометрическим методом, используя спектрофотометр “Unico 2800” (США). Для этого 2 раза центрифугировали эритроцитарную взвесь (2500 об/мин, 5 минут), отбирали надосадочную жидкость, регистрировали оптическую плотность  $D$  на длину волн в диапазоне 500–760 нм. Исходя из соотношения  $D = \epsilon Cl$  ( $\epsilon$  – молярный показатель поглощения,  $C$  – концентрация гемоглобина,  $l$  – толщина слоя) и расчетных формул [7], вычисляли показатели выхода гемоглобина в раствор.

Получение изображений с помощью атомного силового микроскопа

Изображения клеток и их мембран получали с помощью атомного силового микроскопа “NTEGRA Prima” (NT-MDT, Россия) в полуконтактном режиме на монослоях, приготовленных с помощью прибора “V-Sampler, Vision Microscopy” (Австрия). Использовали кантилеверы NSG01 (force constant 5 N/m). Число точек сканирования составило 512, 1024, поля сканирования –  $100 \times 100 \text{ мкм}$ ,  $10 \times 10 \text{ мкм}$ ,  $3 \times 3 \text{ мкм}$ .

Анализировали изображения и их профили в плоском и 3D форматах. Подробно методика получения и анализа наноизображений мембран эритроцитов описана нами ранее [9]. Анализ форм клеток для каждого образца проводили по 5 сканам  $100 \times 100 \text{ мкм}$  ( $> 500$  клеток).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения “Origin” (Origin Lab Corporation, США). Получали статистические распределения по форме клеток, проводили интервальную оценку ошибок измерений. Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-Way ANOVA).

## Результаты

Ниже приведены результаты, описывающие нарушения наноструктуры мембран эритроцитов при действии гемина и возникающие при длительном хранении эритроцитарной взвеси.

Наноструктура мембран эритроцитов при действии гемина

### *Изменение морфологии при действии гемина на кровь*

При малых концентрациях гемина (0,5–1 мМ) в монослое преобладали стоматоциты и плоские клетки. Их форма близка к контрольным дискоцитам. При концентрациях гемина от 1,3 до 1,7 мМ в монослое наблюдались клетки с выраженными характерными структурами на их поверхности – доменами. При больших концентрациях гемина происходило зарождение эхиноцитов и образование мелких сфероэхиноцитов.

Данные получены для времени воздействия раствора гемина 20 минут. В опытах установлено, что в одном монослое не могут присутствовать клетки только одного вида. Так, даже в контрольном мазке 75% клеток представлены дискоцитами, а 25% – клетками с глубокой впадиной. При концентрации 0,3 мМ большинство (80%) клеток были с глубокой впадиной, 15% составляли стоматоциты, в 5% случаев появлялись плоские клетки. При концентрации 1,5 мМ плоских клеток становилось больше – 12%, основную долю (65%) составляли клетки с характерными доменами – наноструктуры в виде зерен, 15% клеток – зарождающиеся эхиноциты, 8% клеток – сфероэхиноциты (рис. 1А). С ростом концентрации гемина и времени его воздействия один вид клеток переходил в другой – происходила трансформация от дискоцитов до сфероэхиноцитов.

**Таблица 1.** Усредненные по всем образцам биохимические показатели эритроцитарной взвеси

Показатель	Сутки хранения				
	2-е	9-е	16-е	23-и	30-е
Лактат, мМ	8,7±0,5	16,0±2,9*	24,9±6,6*	27,3±8,4*	30,5±10*
Глюкоза, мМ	30,1±2,6	26,4±2,9	20,4±5	19,5±6,5*	16,7±6,6*
Выход гемоглобина в раствор (D×10), отн. ед.	0,14±0,04	0,17±0,06	0,23±0,06*	0,28±0,09*	0,39±0,12*
Калий, мМ	1,2±0,1	5,4±1,2*	9,3±1,3*	15,6±3,4*	19,1±3,7*
pH	7,06±0,02	6,95±0,08*	6,79±0,06*	6,70±0,08*	6,62±0,08*

\* p &lt; 0,05 – достоверное различие биохимических показателей в сравнении с первым днем хранения

**Нарушение наноструктуры мембран**

Установлено, что образование на поверхности мембран доменов с «зернами» внутри (рис. 2А) – пороговый эффект. При отклонении от концентрации на 20% появление таких наноструктур не наблюдалось.

Для более детального представления структур был проанализирован фрагмент с доменом. На рис. 2А показана клетка с доменом и фрагмент ее мембраны с регулярной наноструктурой в виде зерен, на рис. 2В – профиль участка с доменами.

Для профиля с доменами характерна периодичность в пространстве. Характерное расстояние на профиле составило  $140 \pm 60$  нм. Высота структур достигла  $12 \pm 4$  нм. При этом на остальной поверхности мембраны без доменов также наблюдались повторяющиеся структуры, типичные для контрольных клеток без воздействия гемина. Но их высота была намного меньше и равнялась  $1,7 \pm 0,7$  нм.

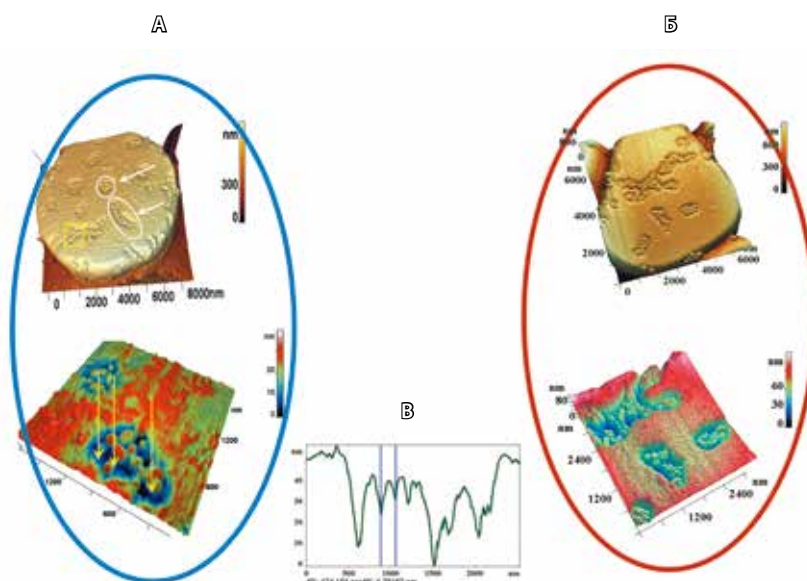
В зависимости от концентрации гемина в крови изменялось количество зерен в одном домене. При концентрации 1,3 мМ количество «зерен» в одном домене составляло  $3 \pm 1$ , при концентрации 1,5 мМ –  $10 \pm 6$ .

При малых концентрациях гемина число доменов на мембране составляло  $4 \pm 2$ . При концентрации 1,5 мМ этот показатель увеличивался до  $14 \pm 4$ . Размеры доменов были от 200 до 1500 нм, при больших размерах доменов происходило их слияние (рис. 3А).

Экспериментально установлено, что с ростом концентрации гемина происходило слияние доменов и «зерен» внутри них. Это в конечном счете приводило к образованию спикул и к формированию эхиноцитов и сфероэхиноцитов.

Наноструктура мембран эритроцитов по мере хранения эритроцитарной взвеси

По мере хранения эритроцитарной взвеси pH уменьшался. В норме pH плазмы находится в пределах от 7,35 до 7,45. В начале периода хранения pH эритроцитарной взвеси разных доноров был снижен по сравнению с нормальными показателями в плазме и был равен  $7,06 \pm 0,02$ . На 9-е сутки хранения pH составил  $6,95 \pm 0,08$ , на 30-е –  $6,62 \pm 0,08$ , что указывает на нарушения окислительно-восстановительных процессов [11].



**Рис. 2.** Зарождение доменов на мембране эритроцитов: **А** – при воздействии гемина на кровь (овалами выделены домены с характерной регулярной наноструктурой в виде зерен, стрелками – домены и зерна в них); **Б** – при хранении эритроцитарной взвеси на 9–12-е сутки; **В** – профиль структур в домене

**Таблица 2.** Трансформация форм эритроцитов в течение срока хранения

Содержание клеток разной формы, %	Сутки хранения					
	2-е	5-е	9-е	16-е	23-и	30-е
Дискоциты	43 ± 13	42 ± 12	36 ± 9	12 ± 2	6 ± 16	0
Овалоциты	27 ± 3	16 ± 2	12 ± 3	28 ± 7	15 ± 2	0
Планоциты	16 ± 2	25 ± 3	24 ± 4	13 ± 3	0	2 ± 1
Эхиноциты	14 ± 4	17 ± 2	28 ± 2	47 ± 11	32 ± 8	15 ± 4
Сфероэхиноциты	0		0	0	47 ± 12	83 ± 16

В процессе хранения эритроцитарной взвеси существенно изменялись концентрации лактата, глюкозы и показатели выхода гемоглобина. Остальные биохимические показатели находились в пределах нормы. В табл. 1 приведены биохимические показатели, которые изменялись на протяжении всего периода хранения.

Увеличение лактата в гемоконсерванте в 2 и более раз вызвано процессом гликолиза – расщеплением глюкозы. В результате содержание глюкозы уменьшилось к 30-м суткам в 1,5–2 раза в среднем по всем донорам по сравнению с первым днем хранения.

Важнейшим показателем нарушения структуры мембран эритроцитов является выход

гемоглобина в раствор гемоконсерванта. На 30-е сутки хранения этот показатель в среднем для всех доноров увеличился втрое по сравнению с первым днем хранения. Различия показателей для разных групп крови на 2-е сутки хранения не достоверны.

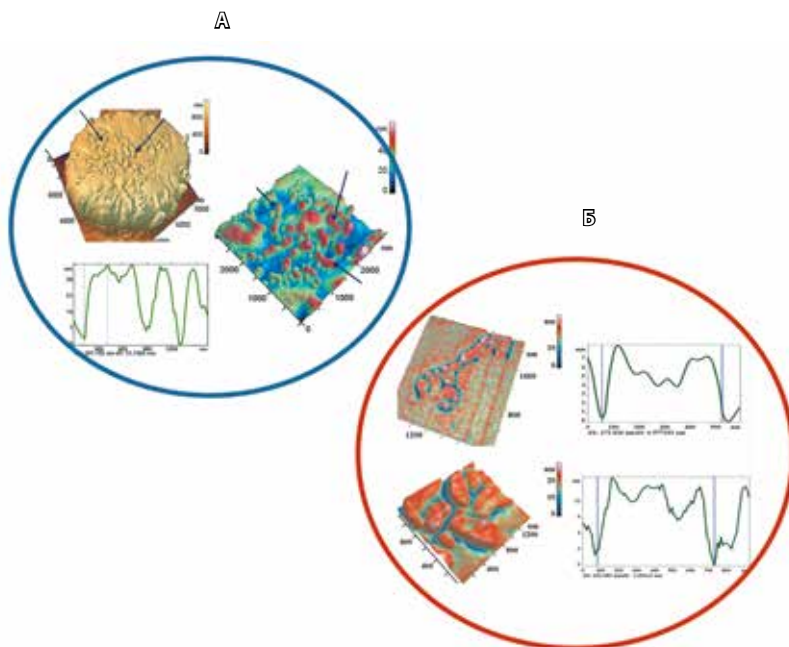
#### *Изменение морфологии эритроцитов при хранении эритроцитарной взвеси*

Одновременно с биохимическими показателями происходили изменения форм эритроцитов и структуры их мембран. В работе анализировали трансформацию дискоцитов в иные основные формы: планоциты, эхиноциты, сфероэхиноциты (рис. 1Б).

На всех полученных образцах наблюдался пойкилоцитоз. Разброс процентных соотношений тех или иных форм клеток для разных образцов и для разных доноров был значительным и составлял от 25 до 36%.

В табл. 2 дано процентное соотношение клеток разной формы на протяжении всего срока хранения эритроцитов. Количество анализируемых клеток для каждого суток хранения составляло не менее 1200. На 2-е сутки хранения в мазках эритроцитарной взвеси преобладали дискоциты – 43 ± 13%. Дискоциты имели диаметр 7,6–8,1 мкм и впадину 200–300 нм. Их поверхность практически не имела повреждений, а глубина шероховатости не превышала 4 нм. К 16-м суткам хранения их процентное соотношение падало до 12 ± 2%, а к 30-м суткам снижалось до 0.

Овалоциты – клетки вытянутой формы с максимальной длиной 13–13,5 мкм. Глубина впадины 350–400 нм. Форма овалоцитов в период хранения претерпевала трансформацию. Вначале это были эритроциты овальной и эллипсоидной формы. Такие формы могли


**Рис. 3.** Агрегация доменов: **А** – при воздействии на клетку гемина; **Б** – при хранении эритроцитарной взвеси



определяться механическим эффектом центрифугирования. На 16-е сутки хранения овалоциты деформировались и приобретали форму лимона с заостренными концами. Такие формы эритроцитов могли возникать в результате изменения окислительно-восстановительных процессов в эритроците [8] и полимеризации гемоглобина внутри клеток [12].

Средний диаметр эхиноцитов равнялся 7895–8645 нм. Глубина впадины – 294 нм. Количество эхиноцитов возрастало по мере хранения от  $14 \pm 4\%$  на 2-е сутки до  $47 \pm 11\%$  к 16-м суткам хранения. На 23-и сутки хранения общая конфигурация клеток претерпевала деструктивные изменения. После этого эхиноциты частично трансформировались в сфероэхиноциты. Их процентное соотношение уменьшалось до  $15 \pm 4\%$  к 30-м суткам хранения, а количество сфероэхиноцитов к этому времени достигало  $83 \pm 16\%$ .

Морфология эритроцитов не зависела от группы крови. Во всех группах крови независимо от того, на какой станции производился ее забор, наблюдались одинаковые тенденции трансформации морфологии и структуры мембран эритроцитов по мере их хранения.

#### Нарушения наноструктуры мембран

На 9–12-е сутки хранения эритроциты становились плоскими и на поверхности появлялись топологические дефекты в виде зернистой наноструктуры – домены (рис. 2Б). Характерные размеры пространственных периодов между «зернами» варьировали от 120 до 200 нм. Количество «зерен» в области топологического дефекта колебалось от 4–5 до нескольких десятков. Такие домены возникают практически на всех клетках эритроцитарной взвеси, а также при воздействии гемина на кровь [13]. Домены на поверхности мембран эритроцитов характерны и при воздействии гемина на кровь. К 20-м суткам происходила агрегация доменов (рис. 3Б), которые превращались в выросты. На поверхности мембраны эритроцита выросты достигали размера 2000–2500 нм и высоты до 600 нм.

#### Обсуждение

При добавлении в кровь гемина в опытах *in vitro* и при хранении эритроцитарной взвеси изменялась морфология клеток. При усилении интоксикации гемом и увеличении срока хранения возрастало количество эхиноцитов, которые впоследствии трансформировались в сфероэхиноциты. При воздействии гемом и при хранении

эритроцитарной взвеси на 9–12-е сутки наблюдалось специфическое изменение наноструктуры мембран красных клеток крови. Образовывались структурные кластеры – домены, в которых проявлялась зернистая структура.

Пространственный период наблюдаемых структур соизмерим с размером ячеек спектринового матрикса. Мембрана красных клеток крови состоит из бислоя липидов, мембранных белков и спектринового матрикса, размер ячейки которого варьирует от 80 до 200 нм [14–16]. Липидный бислой связан со спектриновым матриксом в определенных местах соединения с помощью белков band 3, band 4.1, анкирина, актина и др. Связь липидного бислоя и спектринового матрикса может нарушаться при окислительных процессах в крови, воздействии фармацевтических и химических препаратов, ионизирующего излучения [17]. В работах I. Solar и соавт. [3], А.М. Черныша и соавт. [18] показано, что гемин может разрушать спектрин, влиять на band 4.1, ослаблять связь «спектрин – band 4.1», снижать стабильность мембранного цитоскелета. Такие же изменения происходят и при длительном хранении эритроцитарной взвеси.

В опытах, представленных в данной статье, нам удалось без нарушения целостности клетки наглядно показать результат воздействия гемина и окислительных процессов при хранении эритроцитов на конформацию соединительного комплекса «спектрин – белки band 4.1, band 3», что проявилось в локальных нарушениях наноструктуры мембран эритроцитов. В опытах также установлено, что появление типичных кластеров на поверхности мембраны при воздействии гемина и на 9–12-е сутки хранения эритроцитарной взвеси стало пусковым механизмом изменения формы клетки – постепенно формировались эхиноциты, а затем и сфероэхиноциты. При этом происходило значительное уменьшение диаметра клетки и увеличение ее высоты. Так, если в контрольном мазке диаметр эритроцита составлял около 7,5 мкм, то у сфероэхиноцита он уменьшался до 5,5 мкм.

#### Заключение

В статье показаны нарушения наноструктуры мембран эритроцитов при интоксикации эритроцитов агентами различной природы. При этом характеристики этих нарушений были близки между собой. По-видимому, механизмы, вызывающие такие нарушения, определяются одними и теми же закономерностями. ©



## Литература

1. Girasole M, Pompeo G, Cricenti A, Longo G, Boumis G, Bellelli A, Amiconi S. The how, when, and why of the aging signals appearing on the human erythrocyte membrane: an atomic force microscopy study of surface roughness. *Nanomedicine*. 2010;6(6):760–8. doi: 10.1016/j.nano.2010.06.004.
2. Umbreit J. Methemoglobin – it's not just blue: a concise review. *Am J Hematol*. 2007;82(2):134–44. doi: 10.1002/ajh.20738.
3. Solar I, Muller-Eberhard U, Shviro Y, Shaklai N. Long-term intercalation of residual hemin in erythrocyte membranes distorts the cell. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1062(1):51–8.
4. Kozlova E, Chernysh A, Moroz V, Sergunova V, Gudkova O, Kuzovlev A. Nanodefects of membranes cause destruction of packed red blood cells during long-term storage. *Exp Cell Res*. 2015;337(2):192–201. doi: 10.1016/0005-2736(91)90334-5.
5. Костин АИ, Майорова ОА, Ложкин АВ, Почтарь МЕ, Демичева МИ, Кузмичев ВА, Луговская СА, Наумова ЕВ, Кисиличина ДГ, Андрейцева ЭВ, Долгов ВВ. К вопросу о контроле качества эритроцитсодержащих компонентов крови, обедненных лейкоцитами. *Трансфузиология*. 2011;12(2):12–33.
6. Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, Deitch EA, Machiedo GW. Influence of storage on red blood cell rheological properties. *J Surg Res*. 2002;102(1):6–12. doi: 10.1006/jsre.2001.6306.
7. Moroz VV, Chernysh AM, Kozlova EK, Sergunova VA, Gudkova OE, Khoroshilov SE, Onufrievich AD, Kostin AI. Disorders in the Morphology and Nanostructure of Erythrocyte Membranes after Long-term Storage of Erythrocyte Suspension: Atomic Force Microscopy Study. *Bull Exp Biol Med*. 2015;159(3):406–10. doi: 10.1007/s10517-015-2975-9.
8. Ciccoli L, De Felice C, Paccagnini E, Leoncini S, Pecorelli A, Signorini C, Belmonte G, Valacchi G, Rossi M, Hayek J. Morphological changes and oxidative damage in Rett Syndrome erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(4):511–20. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.12.002.
9. Kozlova EK, Chernysh AM, Moroz VV, Kuzovlev AN. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *Micron*. 2013;44:218–27. doi: 10.1016/j.micron.2012.06.012.
10. World Health Organization: Department of Blood Safety and Clinical Technology. The blood cold chain. Guide to the selection and procurement of equipment and accessories. Geneva: World Health Organization; 2002. 61 p.
11. Karon BS, van Buskirk CM, Jaben EA, Hoyer JD, Thomas DD. Temporal sequence of major biochemical events during blood bank storage of packed red blood cells. *Blood Transfus*. 2012;10(4):453–61. doi: 10.2450/2012.0099-11.
12. Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. *J Cell Mol Med*. 2007;11(1):148–55. doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00008.x.
13. 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.
14. Moroz VV, Kirsanova AK, Novodergkina IS, Alexandrin VV, Chernysh AM, Kozlova EK. Macro- and microstructure of erythrocyte membranes under acute massive hemorrhage and subsequent blood reinfusion. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*. 2010;14(4):248–55. doi: 10.1177/1089253210388518.
15. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*. 2008;112(10):3939–48. doi: 10.1182/blood-2008-07-161166.
16. Kodippili GC, Spector J, Sullivan C, Kuypers FA, Labotka R, Gallagher PG, Ritchie K, Low PS. Imaging of the diffusion of single band 3 molecules on normal and mutant erythrocytes. *Blood*. 2009;113(24):6237–45. doi: 10.1182/blood-2009-02-205450.
17. Козлова ЕК, Черняев АП, Алексеева ПЮ, Близнюк УА, Черныш АМ, Назарова МА. Диагностика состояния биологических мембран после воздействия  $\gamma$ -излучения в малых дозах. *Радиационная биология, радиэкология*. 2005;45(6):653–6.
18. Chernysh AM, Kozlova EK, Moroz VV. Nanostructure of red blood cell membrane under critical state. Atomic force microscopy and calibrated electroporation. Proceedings of European Summit for Clinical Nanomedicine, 07–09 May 2012, Basel, Switzerland. Basel; 2012. p. 112–3.

## References

1. Girasole M, Pompeo G, Cricenti A, Longo G, Boumis G, Bellelli A, Amiconi S. The how, when, and why of the aging signals appearing on the human erythrocyte membrane: an atomic force microscopy study of surface roughness. *Nanomedicine*. 2010;6(6):760–8. doi: 10.1016/j.nano.2010.06.004.
2. Umbreit J. Methemoglobin – it's not just blue: a concise review. *Am J Hematol*. 2007;82(2):134–44. doi: 10.1002/ajh.20738.
3. Solar I, Muller-Eberhard U, Shviro Y, Shaklai N. Long-term intercalation of residual hemin in erythrocyte membranes distorts the cell. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1062(1):51–8.
4. Kozlova E, Chernysh A, Moroz V, Sergunova V, Gudkova O, Kuzovlev A. Nanodefects of membranes cause destruction of packed red blood cells during long-term storage. *Exp Cell Res*. 2015;337(2):192–201. doi: 10.1016/0005-2736(91)90334-5.
5. Kostin AI, Mayorova OA, Lozhkin AV, Pochtar' ME, Demicheva MI, Kuzmichev VA, Lugovskaya SA, Naumova EV, Ksilichina DG, Andreytseva EV, Dolgov VV. K voprosu o kontrole kachestva eritrotsitsozderzhashchikh komponentov krovi, obednennykh leykotsitami [Anent the quality control of leukodepleted blood components containing RBC]. *Transfuziologiya*. 2011;12(2):12–33 (in Russian).
6. Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, Deitch EA, Machiedo GW. Influence of storage on red blood cell rheological properties. *J Surg Res*. 2002;102(1):6–12. doi: 10.1006/jsre.2001.6306.
7. Moroz VV, Chernysh AM, Kozlova EK, Sergunova VA, Gudkova OE, Khoroshilov SE, Onufrievich AD, Kostin AI. Disorders in the Morphology and Nanostructure of Erythrocyte Membranes after Long-term Storage of Erythrocyte Suspension: Atomic Force Microscopy Study. *Bull Exp Biol Med*. 2015;159(3):406–10. doi: 10.1007/s10517-015-2975-9.
8. Ciccoli L, De Felice C, Paccagnini E, Leoncini S, Pecorelli A, Signorini C, Belmonte G, Valacchi G, Rossi M, Hayek J. Morphological changes and oxidative damage in Rett Syndrome erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(4):511–20. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.12.002.
9. Kozlova EK, Chernysh AM, Moroz VV, Kuzovlev AN. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *Micron*. 2013;44:218–27. doi: 10.1016/j.micron.2012.06.012.
10. World Health Organization: Department of Blood Safety and Clinical Technology. The blood cold chain. Guide to the selection and procurement of equipment and accessories. Geneva: World Health Organization; 2002. 61 p.
11. Karon BS, van Buskirk CM, Jaben EA, Hoyer JD, Thomas DD. Temporal sequence of major biochemical events during blood bank storage of packed red blood cells. *Blood Transfus*. 2012;10(4):453–61. doi: 10.2450/2012.0099-11.
12. Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Progressive oxidation of cytoskele-



- tal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. *J Cell Mol Med.* 2007;11(1):148–55. doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00008.x.
13. 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.
14. Moroz VV, Kirsanova AK, Novodergkina IS, Alexandrin VV, Chernysh AM, Kozlova EK. Macro- and microstructure of erythrocyte membranes under acute massive hemorrhage and subsequent blood reinfusion. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* 2010;14(4):248–55. doi: 10.1177/1089253210388518.
15. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood.* 2008;112(10):3939–48. doi: 10.1182/blood-2008-07-161166.
16. Kodippili GC, Spector J, Sullivan C, Kuypers FA, Labotka R, Gallagher PG, Ritchie K, Low PS. Imaging of the diffusion of single band 3 molecules on normal and mutant erythrocytes. *Blood.* 2009;113(24):6237–45. doi: 10.1182/blood-2009-02-205450.

17. Kozlova EK, Cherniaev AP, Alekseeva Plu, Bliznyuk UA, Chernysh AM, Nazarova MA. The diagnostic of membranes' state after exposure of gamma-radiation of small doses. *Radiats Biol Radioecol.* 2005;45(6):653–6.
18. Chernysh AM, Kozlova EK, Moroz VV. Nanostructure of red blood cell membrane under critical state. Atomic force microscopy and calibrated electroporation. *Proceedings of European Summit for Clinical Nanomedicine, 07–09 May 2012, Basel, Switzerland.* Basel; 2012. p. 112–3.

## The nanostructure of erythrocyte membranes under blood intoxication: an atomic force microscopy study

Sergunova V.A.<sup>1</sup> • Chernyaev A.P.<sup>2</sup> • Kozlov A.P.<sup>3</sup> • Bliznyuk U.A.<sup>2</sup> • Borshchegovskaya P.Yu.<sup>2</sup> • Kozlova E.K.<sup>1,2,3</sup> • Chernysh A.M.<sup>1,3</sup>

**Background:** The effects of toxins on nanostructure of blood cells are one of the key problems of biophysics and medicine. Erythrocyte morphology and membrane structure are recognized as the main parameters of blood quality. Therefore, analysis of membrane defects under toxin effects seems an urgent issue. **Aim:** To identify characteristic features and patterns of changes in membrane nanostructure under hemin intoxication and during extended storage of erythrocyte suspension. **Materials and methods:** The study was done *in vitro* in human whole blood with addition of hemin, and in erythrocyte suspension with a CPD blood preservative stored at 4 °C for 30 days. The nanostructure of erythrocyte membrane was assessed by atomic force microscopy. **Results:** Characteristic size of space periods between “granules” was from 120 to 200 nm. “Granule” numbers within a topological defect varied from 4 to 5 and to several dozens. Such domains arose virtually on all cells in erythrocyte suspension, as well as after hemin addition to the blood. An increase in hemin intoxication and an increase in a storage time were associated by increases in echinocyte numbers

that subsequently transformed into spherical echinocytes. Both under hemin and during the storage of erythrocyte suspension for 9 to 12 days, a specific abnormality in nanostructure of erythrocyte membrane was observed: structural clusters, i.e., domains with granular structure, were formed. **Conclusion:** The experiments showed that both hemin and oxidative processes in the blood can specifically affect the nanostructure of erythrocyte membranes with formation of domains on their surface. The specific size of granular structures in the domains is from 100 to 200 nm that coincides with a specific size of spectrin matrix. These results can be used in basic and applied medicine, in blood transfusion, for the analysis of a toxin effects in the human body. The biophysical mechanisms of domain formation can become a basis for the study on a toxin – membrane cross-talk.

**Key words:** erythrocyte membrane, nanostructure, granular structure domain, atomic force microscopy, hemin, erythrocyte suspension

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-234-241

**Sergunova Viktoriya A.** – PhD (in Biology), Senior Research Fellow, Laboratory of Biophysics of Cells Membranes in Critical States<sup>1</sup>

✉ 25/2 Petrovka ul., Moscow, 107031, Russian Federation. Tel.: +7 (985) 724 18 27. E-mail: orbf@mail.ru

**Chernyaev Aleksandr P.** – PhD (in Physics and Mathematics), Professor, Head of the Chair of Physics of Accelerators and Radiation Medicine, Faculty of Physics<sup>2</sup>

**Kozlov Aleksandr P.** – PhD (in Physics and Mathematics), Associate Professor, Chair of Medical and Biological Physics<sup>3</sup>

**Bliznyuk Ul'yana A.** – PhD (in Physics and Mathematics), Senior Lecturer, Chair of Physics of Accelerators and Radiation Medicine, Faculty of Physics<sup>2</sup>

**Borshchegovskaya Polina Yu.** – PhD (in Physics and Mathematics), Lecturer, Chair of Physics of Accelerators and Radiation Medicine, Faculty of Physics<sup>2</sup>

**Kozlova Elena K.** – PhD (in Physics and Mathematics), Leading Research Fellow, Laboratory of Biophysics of Cells Membranes in Critical States<sup>1</sup>; Professor, Chair of Physics of Accelerators and Radiation Medicine, Faculty of Physics<sup>2</sup>; Professor, Chair of Medical and Biological Physics<sup>3</sup>

**Chernysh Aleksandr M.** – PhD (in Biology), Head of Laboratory of Biophysics of Cells Membranes in Critical States<sup>1</sup>; Professor, Chair of Medical and Biological Physics<sup>3</sup>

<sup>1</sup>V.A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology; 25/2 Petrovka ul., Moscow, 107031, Russian Federation

<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie gory, Moscow, 119991, Russian Federation

<sup>3</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8/2 Trubetskaya ul., Moscow, 119991, Russian Federation