

## Влияние температуры эритроцитарной взвеси на морфологию и наноструктуру мембран клеток

В. А. Сергунова<sup>1</sup>, О. Е. Гудкова<sup>1</sup>, Е. А. Манченко<sup>1,2</sup>,  
Е. К. Козлова<sup>1,2,3</sup>, И. Г. Бобринская<sup>1,4</sup>, А. М. Черныш<sup>1,3</sup>, А. П. Козлов<sup>3</sup>

<sup>1</sup> НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского, ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии,  
Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
Россия, 119234, г. Москва, Университетская пл., д. 1

<sup>3</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России,  
Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

<sup>4</sup> Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова Минздрава России,  
Россия, 127473, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

## The Effect of the Erythrocyte Suspension Temperature on the Morphology and Nanostructure of Cell Membranes

Viktoria A. Sergunova<sup>1</sup>, Olga E. Gudkova<sup>1</sup>, Ekaterina A. Manchenko<sup>1,2</sup>, Elena K. Kozlova<sup>1,2,3</sup>,  
Irina G. Bobrinskaya<sup>1,4</sup>, Alexander M. Chernysh<sup>1,3</sup>, Alexander P. Kozlov<sup>3</sup>

<sup>1</sup> V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,  
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation,  
25 Petrovka Str., Build. 2, Moscow 107031, Russia

<sup>2</sup> M. V. Lomonosov Moscow State University,  
1, Universitetskaya Plaza, Moscow 119234, Russia

<sup>3</sup> I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia,  
8, Trubetskaya Str., Build. 2, Moscow 119991, Russia

<sup>4</sup> A. I. Evdokimov Moscow State University of medicine and dentistry, Ministry of Health of Russia,  
20 Delegatskaya Str., Build 1, Moscow 127473, Russia

Проблема непреднамеренной гипотермии в периоперационном периоде остается актуальной.

**Цель работы:** оценить влияние температуры *in vitro* на морфологию и наноструктуру мембран эритроцитов.

**Материал и методы.** Использовали 4 контейнера эритроцитарной взвеси (ЭВ) с разными группами крови, запакрованную в герметичные контейнеры (400 мл) с гемоконсервантом СРД. ЭВ хранили при 4°C. Пробы (15мл) помещали в термостат на 20°C и 37°C и устанавливали на ротатор (6–8 об/мин) BioRS-24 Mini-Rotator Bioscan (EU). Анализ кислотно-основного состояния проводили с помощью ионометрического преобразователя «И-510» (РФ). Анализ морфологии и наноструктуры мембран эритроцитов клеток проводили с помощью атомного силового микроскопа (АСМ) «NTEGRA Prima», (NT-MDT, РФ) в контактном режиме на монослоях приготовленных с помощью метода оседания в жидкости и на воздухе.

**Результаты.** На 19-е сутки хранения ЭВ при исследовании крови, сохранявшейся при температуре 20°C, через 1 час и 12 часов ротации в монослоях крови присутствовали дискоциты (12±3%). Количество эхиноцитов после 1 часа ротации составляло 14±2%, после 12 часов ротации — 40±7%. Количество сфероэхиноцитов после 1 часа ротации составляло 74±2%, после 12 часов ротации — 42±8%. При 37°C после 1 часа ротации в монослоях присутствовало четыре вида форм эритроцитов, такие как дискоциты, эхиноциты, сфероэхиноциты, овалциты. После 12 часов ротации распределение форм клеток изменилось, клетки восстановили свою форму до дискоцитов (97±2%).

**Заключение.** Полученные результаты доказывают влияние охлаждения при консервировании эритроцитов. Изменяется форма эритроцитов. Восстановление морфологической структуры замороженных эритроцитов происходит медленно — в течение 12 часов. Это означает, что трансфузия эритроцитов, температура которых ниже 37°C, не может быть эффективной в течение, по крайней мере, 12 часов и требуется согреть трансфузионной среды, чтобы уменьшить риск трансфузии препаратов крови.

**Ключевые слова:** эритроциты; морфология; температура; атомная силовая микроскопия

The problem of unintentional hypothermia in the postoperative period is still an urgent one.

**The purpose of the work:** to assess the effect of the *in vitro* temperature on the morphology and nanostructure of erythrocyte membranes.

**Material and methods.** 4 containers with erythrocyte suspensions with different blood groups were used; the suspension was packed in sealed containers (400 mL) with CPD blood preservative. The erythrocyte suspension

Адрес для корреспонденции:

Виктория Сергунова  
E-mail: orbf@mail.ru

Correspondence to:

Viktoria Sergunova  
E-mail: orbf@mail.ru

was kept at 4°C. Samples (15 ml) were placed in a thermostat at 20°C and 37°C; then they were placed on the BioRS-24 Mini-Rotator Bioscan (EU) rotator (6–8 rpm). The analysis of the acid-base balance was carried out using the I-510 ionometric converter (Russian Federation). The morphology and nanostructure of erythrocyte membranes were analyzed using an atomic force microscope (AFM) «NTEGRA Prima» (NT-MDT, Russian Federation), in a contact mode, on monolayers prepared using a method of sedimentation in liquid and air.

**Results.** Discocytes were present in monolayers of blood after 1-hour and 12-hour rotation ( $12\pm 3\%$ ) on Day 19 of ES storage at temperature 20°C. The number of echinocytes was  $14\pm 2\%$  after a 1-hour rotation and  $40\pm 7\%$  after a 12-hour rotation. The number of spherocytocytes was  $74\pm 2\%$  after a 1-hour rotation and  $42\pm 8\%$  after a 12-hour rotation. At a temperature of 37°C, after a 1-hour rotation, four forms of erythrocytes were present in a monolayer: discocytes, echinocytes, spherocytocytes, and ovalocytes. The distribution of cell forms changed after a 12-hour rotation, and the cells recovered their shapes to discocytes ( $97\pm 2\%$ ).

**Conclusion.** The obtained findings confirm the effect of cooling during erythrocyte preservation. The shape of erythrocytes was changed. The morphological structure of frozen erythrocytes recovers slowly, within 12 hours. It means that the transfusion of red blood cells whose temperature is below 37°C may not be effective for at least 12 hours and the transfusion medium should be warmed to reduce the risk of transfusion of blood products.

**Keywords:** erythrocytes; morphology; temperature; atomic force microscopy

DOI:10.15360/1813-9779-2017-4-30-37

## Введение

Структурные изменения эритроцитов играют важную роль в развитии нарушений газообмена [1, 2]. Проблема непреднамеренной гипотермии в периоперационном периоде и в настоящее время остается актуальной и широко обсуждается в научной литературе. В исследованиях проводится оценка влияния различных способов согревания (активных и пассивных) на функциональные, метаболические и другие функции организма. Причинами непреднамеренной гипотермии являются раскрытие полостей при внутриполостных хирургических вмешательствах (например, лапаротомия), влияние анестезии на терморегуляцию, длительные хирургические вмешательства, переливание растворов и препаратов крови и использование промывных жидкостей [3–5].

Влияние периоперационной гипотермии на функции органов и систем многообразно. В результате этого влияния могут развиваться инфекционные осложнения, приводящие к увеличению длительности пребывания в отделениях реаниматологии и повышению летальности.

Среди больных, оперированных по поводу тяжелой черепно-мозговой травмы, почти в 11% случаев имела место непреднамеренная гипотермия ( $\leq 35^\circ\text{C}$ ). Летальность у этих больных была достоверно выше, чем в группе больных с нормотермией [6].

Среди больных, которым выполнялись полостные операции гипотермия ( $\leq 35^\circ\text{C}$ ) встречалась в 15% случаев. В этой группе больных имела место достоверно большая кровопотеря —  $2,6\pm 2,4$  л в сравнении с группой больных с нормотермией —  $1,7\pm 1,8$  л; летальность у больных с гипотермией была также значительно выше — 35% по сравнению с 8% больных с нормотермией [7].

Исследования Sessler D.I. с соавторами показали, что гипотермия способствует снижению

## Introduction

Changes in the erythrocytes structure lead to gas exchange disturbance [1, 2]. The problem of unintentional perioperative hypothermia is still an urgent one and is widely discussed in scientific literature. The study assesses the impact of different ways of warming (active and passive) on functional, metabolic, and other body functions. The causes of unintentional hypothermia include the opening of cavities during intracavitary surgical interventions (e.g. laparotomy), the impact of anesthesia on the thermoregulation, duration of surgery, transfusion of fluids and blood products and use of lavage liquids [3–5].

The effect of the perioperative hypothermia on functions of organs and systems is diverse; and infectious complications, increased ICU stay and increased lethality are the results of this effect.

Among the patients operated for severe cranio-cerebral injury, nearly 11% experienced an unintended hypothermia ( $\leq 35^\circ\text{C}$ ). The mortality rate in this group of patients was significantly higher than that in the group of patients with normothermia [6].

Hypothermia ( $\leq 35^\circ\text{C}$ ) was diagnosed in 15% of patients who underwent abdominal operation. In this group of patients, there was a significantly large blood loss ( $2.6\pm 2.4$  L) as compared to the group of patients with normothermia ( $1.7\pm 1.8$  L); the mortality in patients with hypothermia was also significantly higher (35%) as compared to 8% in patients with normothermia [7].

The study of D.I. Sessler et al. has shown that hypothermia contributes to the reduction of the oxygen uptake by tissues [8] and the oxyhemoglobin dissociation curve shift to the left [9].

Therefore, the state of transfused erythrocytes without ES preheating up to  $37^\circ\text{C}$  is of a special interest. The temperature gradient can impair the spectrin matrix of the membrane, which leads to the change of the membrane nanostructure and the cell morphology.

потребления кислорода тканями [8], сдвигу кривой диссоциации оксигемоглобина влево [9].

Поэтому отдельный интерес представляет состояние введенных в кровяное русло эритроцитов без их предварительного подогрева ЭВ до 37°C. Градиент температуры может вызвать нарушение спектринового матрикса мембраны, которое приводит к изменению наноструктуры мембраны и морфологии самой клетки.

ЭВ хранится при 4°C [10]. Перед проведением гемотрансфузии ее необходимо подогреть до физиологической температуры 37°C [11].

Согревание снижает вязкость охлажденной крови в 2,5 раза. Зачастую подогревание производят, погружая пакет с ЭВ в воду, с температурой +37°C на 20–30 мин [12]. Для подогревания компонентов эритроцитарной взвеси рекомендуется использовать специальные приспособления, позволяющие осуществлять контроль за процессом согревания [13].

Цель работы — оценить влияние температуры *in vitro* на морфологию и наноструктуру мембран эритроцитов.

### Материал и методы

Использовали 4 контейнера эритроцитарной взвеси с разными группами крови, запаянную в герметичные контейнеры (400 мл) с гемоконсервантом СРД. Эритроцитарную взвесь хранили при 4°C. Измерения проводили по схеме, представленной на рис. 1. Из каждого контейнера отбирали пробы по 15 мл. Пробы помещали в термостат на 20°C и 37°C и устанавливали на ротатор (6–8 об/мин) BioRS-24 Mini-Rotator Bioscan (EU) для моделирования процесса кровообращения. После достижения установленной температуры ЭВ брали пробу для проведения измерений. В табл. 1 представлены обозначения проб.

Общий анализ крови проводили на гематологическом анализаторе «ADVIA 60» (Germany), биохимический анализ — на анализаторе «Miura One» (I.S.E. Group, Italy).

ES is stored at 4°C [10]. Before the transfusion blood should be warmed to the physiological temperature of 37°C [11].

Warming reduces the viscosity of cooled blood by 2.5-fold. Usually the blood is warmed by emerging the bag with ES in water at a temperature of +37°C for 20–30 min [12]. Special devices permitting to monitor the process of warming should be used for heating of erythrocyte suspension components [13].

The purpose of the work was to assess *in vitro* the effect of the temperature on the morphology and nanostructure of erythrocyte membranes.

### Materials and Methods

4 containers with erythrocyte suspensions belong to different blood groups were used; the suspension was packed in sealed containers (400 mL) with CPD blood preservative. The erythrocyte suspension was kept at 4°C. The measurement was performed according to the flow-chart presented in Fig. 1. 15 mL was sampled from each container. The samples were placed in a thermostat at 20°C and 37°C; then they were placed on the BioRS-24 Mini-Rotator Bioscan (EU) rotator (6–8 rpm) for simulating the blood circulation process. When the ES reached the established temperature, a sample was taken for measurements. Table 1 presents the sample description.

The complete blood parameters set was analyzed using the ADVIA 60 hematologic analyzer (Germany), and the blood chemistry test was performed using the Miura One analyzer (I.S.E. Group, Italy).

The analysis of the acid-base balance was carried out using the I-510 ionometric converter (Russian Federation). For pH measurements, ES-10603 electrodes were used along with a reference electrode (ESr-10103). The concentration of potassium ions was measured using a potassium-selective electrode HS-K-001.

The morphology and nanostructure of erythrocyte membranes were analyzed using an atomic force microscope (AFM) «NTEGRA Prima» (NT-MDT, Russian Federation), in a contact mode, on monolayers prepared using a method of sedimentation in liquid and air. The sed-

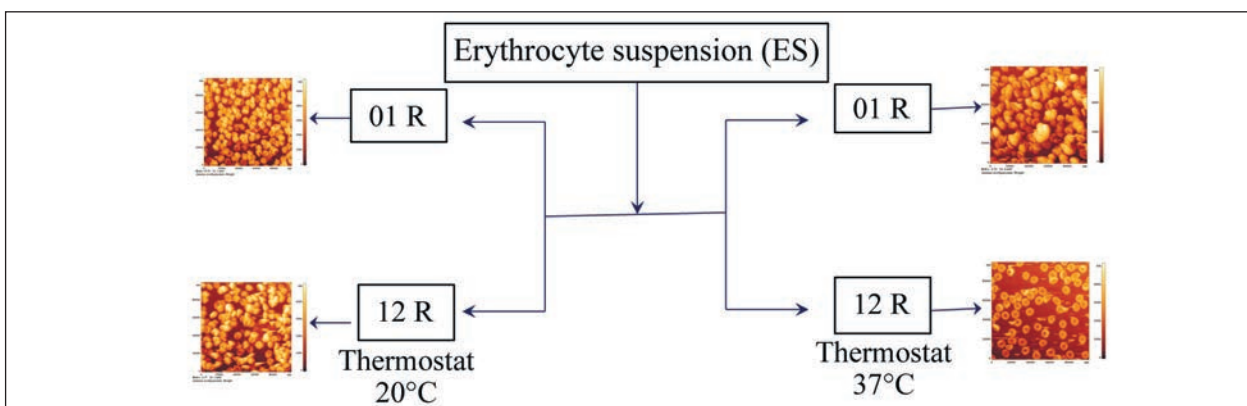


Рис.1. Схема проведения эксперимента.

Fig. 1. Flow-chart of the experiment.

Note. 01 R — 1-hour rotation; 12 R — 12-hour rotation. AFM images obtained in the semicontact mode in air.

Примечание. Erythrocyte suspension — эритроцитарная взвесь; 01 R — ротация 1 час; 12 R — ротация 12 часов; Thermostat — термостат. АСМ изображения полученные в полуконтактном режиме на воздухе.

**Таблица 1. Исследуемые пробы.**  
**Table 1. Study samples.**

Sample name	Rotation time	t°C
01R-20	1 hr	20°C
12R-20	12 hrs	20°C
01R-37	1 hr	37°C
12R-37	12 hrs	37°C

**Примечание.** Sample name — название пробы; Rotation time — время ротации; hrs — часы.

Анализ кислотно-основного состояния проводили с помощью ионометрического преобразователя «И-510» (РФ). Для измерения pH использовали электроды ЭС-10603 с электродом сравнения ЭСр-10103. Концентрацию ионов калия измеряли калий-селективным электродом ХС-К-001.

Анализ морфологии и наноструктуры мембран эритроцитов клеток проводили с помощью атомного силового микроскопа (АСМ) «NTEGRA Prima», (NT-MDT, РФ) в контактном режиме на моносолях приготовленных с помощью метода оседания в жидкости и на воздухе. Монослой оседания делали по схеме, которая представлена на рис. 2. В 5 мл PBS (pH7,4) добавляли 50 мкл эритроцитарной взвеси. Полученную суспензию наносили на стекло с полилизинном на 20 минут. Осевшие клетки фиксировали, в течение 10 сек в 1% растворе глутарового альдегида. После фиксации образец промывали повторно в буфере и оставляли на 40 минут для формирования моносоля.

Изображения в растворе получали кантилеверами типа SD-R150-T3L450B-10. Число точек сканирования — 512. Поля сканирования: 100×100 мкм, 50×50 мкм, 10×10 мкм. Подробно методика получения и анализа наноизображений мембран эритроцитов описана нами в работе [14, 15].

## Результаты и обсуждение

В качестве примера привели результаты, полученные при хранении ЭВ в течение 19 суток. На каждом образце получали по 2 скана. На каж-

иментацию monolayer was made using the scheme presented in Fig. 2. 50  $\mu$ L of the erythrocyte suspensions is added to 5 mL of PBS (pH7.4). The resulting suspension was applied onto glass with polylysine for 20 minutes. The settled cells were fixed in 1% solution of glutaraldehyde for 10 sec. The sample was washed again in the buffer after fixation and left for 40 minutes to form a monolayer.

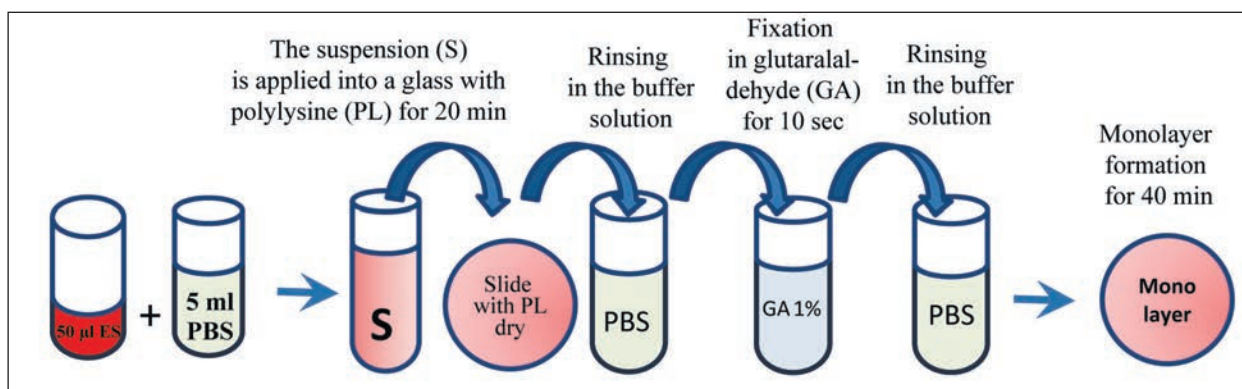
Images in the solution were obtained using SD-R150-T3L450B-10-type cantilevers. The number of scanning points was 512. Scan fields: 100×100  $\mu$ m, 50×50  $\mu$ m, 10×10  $\mu$ m. The detailed methodology for obtaining and analyzing nanoimages of erythrocyte membranes was described by us in [14, 15].

## Results and Discussion

Results obtained after a 19-day ES storage are presented as an example. 2 scans were obtained for each sample. The morphology (70–80 cells) was analyzed in each scan. To study the membrane nanostructure, 15–18 cells of each scan obtained earlier were used. In total, 450 fragments for temperatures  $t=37^\circ\text{C}$  and  $20^\circ\text{C}$  were scanned.

The morphology of donor erythrocytes is the main indicator of their state. Table 2 shows the percentage ratio of different cell forms on the 19th day of storage after 1-hour and 12-hour rotation at a temperature of  $t=37^\circ\text{C}$  and  $20^\circ\text{C}$ .

Discocytes were present in monolayers of blood after 1-hour and 12-hour rotation ( $12\pm 3\%$ ) on Day



**Рис. 2. Схема получения моносоля методом оседания.**

**Fig. 2. Scheme of production of monolayer using a sedimentation technique.**

**Примечание.** The suspension (S) is applied into a glass with polylysine (PL) for 20 min — суспензия наносится на стекло с полилизинном на 20 мин; Slide with PL dry — сухое предметное стекло с полилизинном; Rinsing in the buffer solution — промывка в буфере; Fixation in glutaraldehyde (GA) for 10 sec — фиксация в глутаровом альдегиде 10 сек; Monolayer formation for 40 min — формирование моносоля 40 мин; PBS — буфер.

## Experimental Studies

**Таблица 2. Морфология клеток эритроцитарной взвеси на 19-е сутки хранения.**  
**Table 2. Cell morphology of erythrocyte suspension on Day 19 of storage.**

t°C	Cell morphology							
	1-hour rotation			12-hour rotation				
	d	e	sph	ov	d	e	sph	ov
20°C	12±3%	14±2%	74±2%		18±4%	40±7%	42±8%	
37°C	28±7%	32±7%	24±7%	16±7%	97±2%			3±1%

**Note.** d – diskocytes; e – echinocytes; sph – spherocochinocytes; ov – ovalocytes.

**Примечание.** Cell morphology – морфология клеток; hour rotation – часов ротации. d – дискоциты; e – эхиноциты; sph – сфероэхиноциты; ov – овалоциты.

дом скане анализировали морфологию 70–80 клеток. Для исследования наноструктуры мембран использовали по 15–18 клеток с каждого полученного ранее скана. Всего просканировали 450 фрагментов для температур  $t=37^\circ\text{C}$  и  $20^\circ\text{C}$ .

Основным показателем состояния донорских эритроцитов является их морфология. В табл. 2 привели процентное соотношение различных форм клеток на 19-е сутки хранения для 1 и 12 часов ротации при температуре  $t=37^\circ\text{C}$  и  $20^\circ\text{C}$ .

На 19-е сутки хранения ЭВ при исследовании крови, сохранявшейся при температуре  $20^\circ\text{C}$ , через 1 час и 12 часов ротации в монослоях крови присутствовали дискоциты (12±3%). Количество эхиноцитов после 1 часа ротации составляло 14±2%, после 12 часов ротации 40±7%. Количество сфероэхиноцитов после 1 часа ротации составляло 74±2%, после 12 часов ротации 42±8%. При  $37^\circ\text{C}$  после 1 часа ротации в монослое присутствовало четыре вида форм эритроцитов, такие как дискоциты, эхиноциты, сфероэхиноциты, овалоциты. После 12 часов ротации распределение форм клеток изменилось, клетки восстановили свою форму до дискоцитов (97±2%). Эти изменения проследили, сравнивая соответствующие изображения по горизонтали (рис. 3, показаны стрелками).

На рис. 3 приведены АСМ изображения клеток на 19-е сутки хранения для 1 и 12 часов ротации при температуре  $t=37^\circ\text{C}$  и  $20^\circ\text{C}$ .

Для анализа наноструктуры сканировали фрагмент клетки размером  $1,5 \times 1,5$  мкм с разрешением  $1024 \times 1024$  точек на скане АСМ. На рис. 4 а в формате 3D показана наноповерхность эритроцита после 12 часов ротации при  $t=37^\circ\text{C}$ . Поверхность клетки не имела топологических дефектов, а высота ее шероховатости не превышала 3 нм. На поверхности эритроцита после 12 часов ротации при  $t=20^\circ\text{C}$  наблюдались топологические дефекты в виде доменов. Характерные размеры доменов 120–200 нм. Глубина погружения домена 8–10 нм. Количество «зерен» в области домена составляют от 4–5 до нескольких десятков. Такие домены возникали практически на всех клетках эритроцитарной взвеси. Подобный эффект мы наблюдали при действии токсинов на кровь.

19 of ES storage at temperature  $20^\circ\text{C}$ . The number of echinocytes was 14±2% after a 1-hour rotation and 40±7% after a 12-hour rotation. The number of spherocochinocytes was 74±2% after a 1-hour rotation and 42±8% after a 12-hour rotation. At a temperature of  $37^\circ\text{C}$ , after a 1-hour rotation, four forms of erythrocytes were present in a monolayer: discocytes, echinocytes, spherocochinocytes, and ovalocytes. The distribution of cell forms changed after a 12-hour rotation, and the cells recovered their shapes to discocytes (97±2%). These changes can be traced by comparing the corresponding images horizontally (Fig. 3, arrows).

Fig. 3 shows the AFM images of cells on the 19th day of storage after 1-hour and 12-hour rotation at a temperature of  $t=37^\circ\text{C}$  and  $20^\circ\text{C}$ .

Fig. 3 Images of native erythrocytes in the field of the AFM on Day of storage. Flat  $100 \times 100$  μm scans. a) ES after a 1-hour rotation at  $t=37^\circ\text{C}$ ; the arrow points to the ES after a 12-hour rotation at  $t=37^\circ\text{C}$ ; b) ES after a 1-hour rotation at  $t=20^\circ\text{C}$ ; the arrow points to the ES after a 12-hour rotation at  $t=20^\circ\text{C}$ .

To analyze the nanostructures, a  $1.5 \times 1.5$  μm cell fragment was scanned with a resolution of  $1024 \times 1024$  pixels in an AFM scan. Fig. 4 (a) demonstrates a 3D image of the erythrocyte nanostructure after a 12-hour rotation at  $t=37^\circ\text{C}$ . The cell surface had no topological defects and the roughness height did not exceed 3 nm. Topological defects in the form of domains were observed on the erythrocyte surface after a 12-hour rotation at  $t=20^\circ\text{C}$ . Typical sizes of domains were 120–200 nm. The domain immersion depth was 8–10 nm. The number of «grains» in the domain ranges from 4–5 to several dozens. Such domains appeared in practically all cells of the erythrocyte suspension. A similar effect was observed during the effect of toxins on the blood.

Metabolic parameters did not depend on the temperature during the ES storage. During the ES storage the concentration of  $\text{K}^+$  ions in the suspension increased. On the 5th day of storage, it was  $2.7 \pm 0.1$  mM, and by the end of the storage period it increased to  $17.1 \pm 3.7$  mM. The pH value decreased from  $7.1 \pm 0.08$  in the beginning of the storage period to  $6.6 \pm 0.08$  at to the end of it. The lactate concentra-

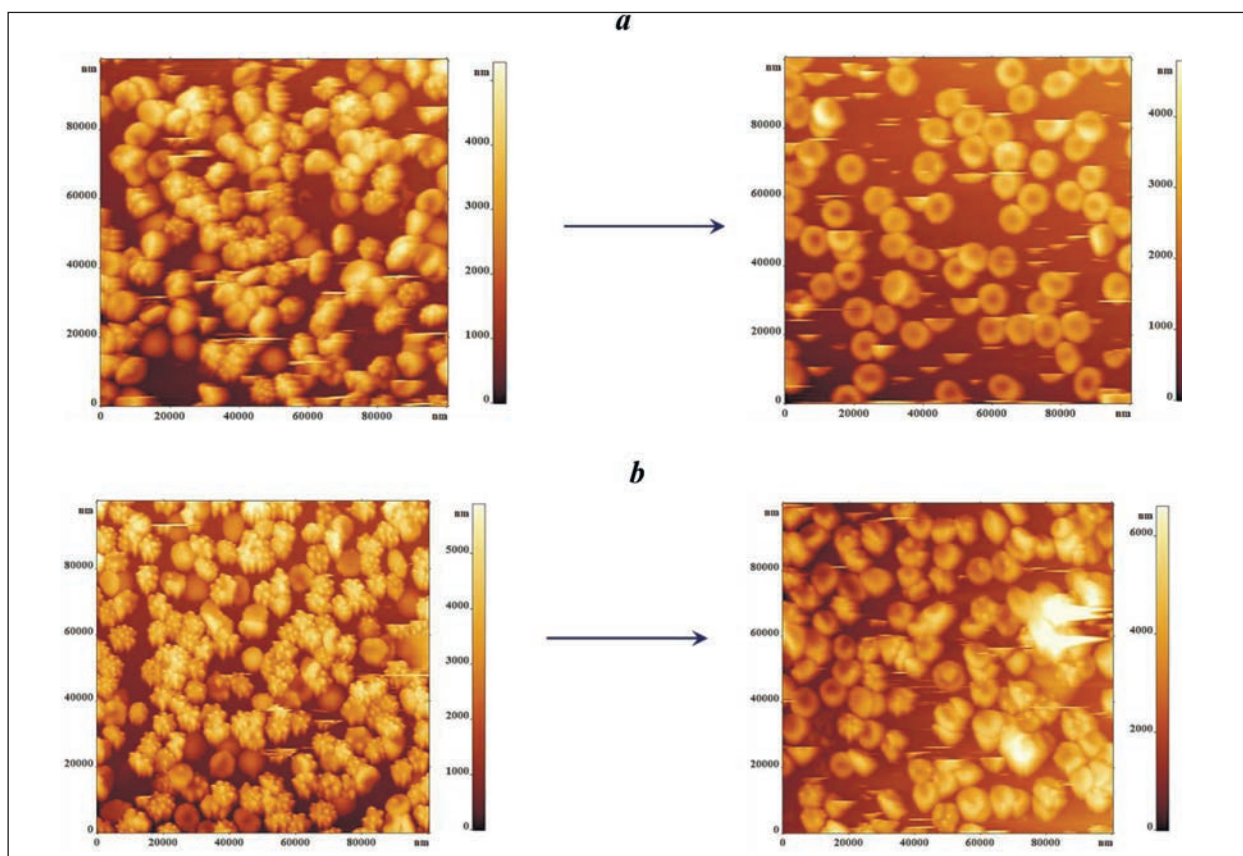


Рис. 3. Изображения нативных эритроцитов в поле АСМ.

Fig. 3. Images of native erythrocytes in the field of the AFM.

**Note.** On Day 19 of ES storage. Flat  $100 \times 100 \mu\text{m}$  scans. *a* – ES after a 1-hour rotation at  $t=37^\circ\text{C}$ ; the arrow points to the ES after a 12-hour rotation at  $t=37^\circ\text{C}$ ; *b* – ES after a 1-hour rotation at  $t=20^\circ\text{C}$ ; the arrow points to the ES after a 12-hour rotation at  $t=20^\circ\text{C}$ .

**Примечание.** 19-е сутки хранения ЭВ. Сканы  $100 \times 100 \mu\text{m}$  в плоском формате. *a* – ЭВ через 1 час ротации при  $t=37^\circ\text{C}$  стрелкой показана ЭВ – через 12 часов ротации при  $t=37^\circ\text{C}$ ; *b* – ЭВ через 1 час ротации при  $t=20^\circ\text{C}$  стрелкой показана ЭВ через 12 часов ротации при  $t=20^\circ\text{C}$ .

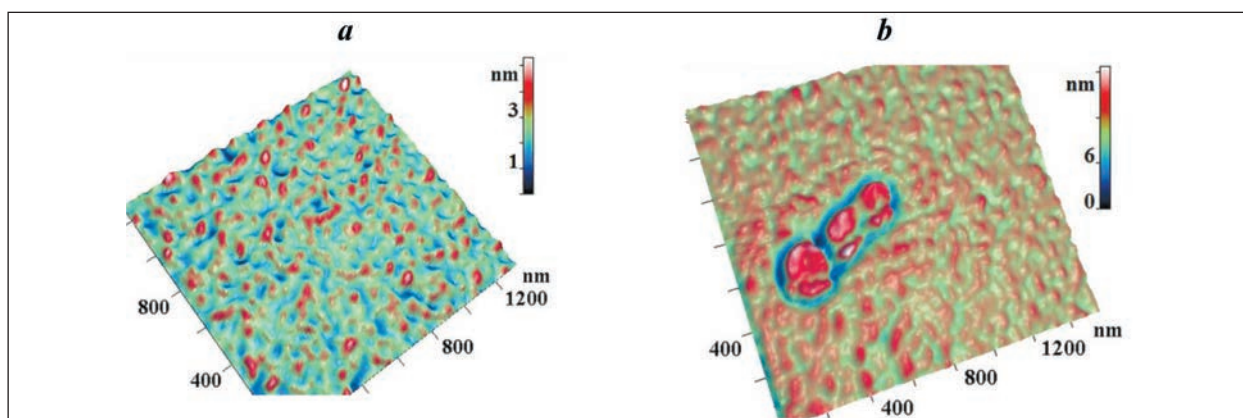


Рис. 4. Наноповерхность мембраны эритроцитов II порядка в формате 3D в поле АСМ на воздухе.

Fig. 4. 3D image of the nanosurface of second-order erythrocyte membranes in the AFM field in air.

**Note.** On Day 19 of ES storage.  $100 \times 100 \mu\text{m}$  scans. *a* – after a 12-hour rotation at  $t=37^\circ\text{C}$ ; *b* – after a 12-hour rotation at  $t=20^\circ\text{C}$ .

**Примечание.** 19-е сутки хранения ЭВ. Сканы  $100 \times 100 \mu\text{m}$ . *a* – через 12 часов ротации при  $t=37^\circ\text{C}$ ; *b* – через 12 часов ротации при  $t=20^\circ\text{C}$ .

Показатели метаболизма при хранении ЭВ не зависели от температуры. По мере хранения ЭВ повышалась концентрация ионов  $\text{K}^+$  в суспензии. На 5 сутки хранения она составляла  $2,7 \pm 0,1$

tion increased from  $8 \pm 1,3$  (the first day of the ES storage) up to  $20 \pm 1,2$ . The glucose level decreased from  $27 \pm 2$  on the first day of storage to  $14,6 \pm 1,2$ . Other biochemical parameters were within normal

mM, а к окончанию срока хранения увеличивалась до  $17,1 \pm 3,7$  mM. Показатель pH уменьшался от  $7,1 \pm 0,08$  вначале хранения до  $6,6 \pm 0,08$  к концу срока хранения. Концентрация лактата увеличивалась с  $8 \pm 1,3$  (первый день хранения ЭВ) до  $20 \pm 1,2$  ммоль/л. Глюкоза уменьшалась с  $27 \pm 2$  (первый день хранения) до  $14,6 \pm 1,2$  ммоль/л. Остальные биохимические показатели находились в пределах нормы. Производили по 3 измерения для каждой пробы ( $p < 0,05$ ).

До введения в кровяное русло не подогретой ( $20^\circ\text{C}$ ) ЭВ клетки крови могли менять свою морфологию и наноструктуру. При этом ряд форм клеток (такие как эхиноциты, сфероэхиноциты, овалоциты) и изменения их наноповрежденности становились необратимыми. При ротации в течение 12 часов их наноструктура и морфология не возвращалась в исходное состояние (рис. 3, а).

После ротации ЭВ в течение 12 часов при температуре  $37^\circ\text{C}$  более 97% клеток восстанавливают свою форму до дискоцитов (рис. 3, б).

Возможно, что изменения в эритроцитах, а также изменения метаболизма и кислородного обеспечения организма ответственны за развитие послеоперационных осложнений у пациентов, имевших ту или иную степень и продолжительность непреднамеренной гипотермии в интраперационном периоде.

С помощью АСМ показали, что при нагревании до  $37^\circ\text{C}$  морфология клеток изменяется. Количество эритроцитов разных форм (полиморфизм) уменьшается или такие клетки полностью трансформируются в дискоциты. На поверхности мембраны эритроцитов при нагревании ЭВ до  $37^\circ\text{C}$  топологические дефекты отсутствуют. Подогревание крови до  $37^\circ\text{C}$  является необходимым методом для снижения риска введения измененных форм эритроцитов для пациента.

### Заключение

Полученные результаты доказывают влияние охлаждения при консервировании эритроцитов на изменение их формы. Появляется большое количество эхиноцитов, сфероэхиноцитов и др. Выявлены нарушения наноструктуры мембран эритроцитов, появление топологических дефектов в виде доменов. Эти изменения могут быть причиной нарушения кислородо-транспортной функции эритроцитов и развития гипоксических нарушений в послеоперационном периоде. Восстановление морфологической структуры замороженных эритроцитов происходит медленно — в течение

### Литература

1. Мороз В.В., Новодержкина И.С., Антошина Е.М., Афанасьев А.В., Рыжков И.А., Зарзешский Ю.В. Коррекция пойкилоцитоза и биохимических показателей крови при острой кровопотере. *Общая*

limits. 3 measurements were performed for each sample ( $P < 0.05$ ).

When the unheated ES was transfused ( $20^\circ\text{C}$ ) blood cells could alter their morphology and nanostructure. At that, a number of forms (such as echinocytes, spherocytocytes, and ovalocytes) and their nanosurface became irreversible. After a rotation of 12 hours their nanostructure and morphology did not return to their initial state (Fig. 3, a).

After a rotation of the ES for 12 hours at a temperature of  $37^\circ\text{C}$ , the cells restore their shape to discocytes (over 97%) (Fig. 3, b).

It is possible that erythrocyte surface nanostructure, as well as changes in metabolism and oxygen provision of the body are responsible for the development of postoperative complications in patients who were exposed to some degree of unintentional hypothermia in the intraoperative period.

Using AFS, we demonstrated that heating to  $37^\circ\text{C}$  changes the morphology of the cells. The number of different forms of erythrocytes (polymorphism) is reduced or such cells completely transform into discocytes. There were no topological defects on the erythrocyte membrane surface of after ES heating up to  $37^\circ\text{C}$ . Warming the blood up to  $37^\circ\text{C}$  is a necessary technique to reduce the risk of injection of modified forms of erythrocytes to the patient.

### Conclusion

The obtained findings confirm the effect of cooling during erythrocyte preservation. The shape of erythrocytes was changed. A great number of echinocytes, spherocytocytes, etc. appeared. Defects of erythrocyte membrane nanostructure were detected, as well as the emergence of topological defects in the form of domains. These changes may impair the oxygen transport function of erythrocytes and cause the development of hypoxic disorders in the postoperative period. The morphological structure of frozen erythrocytes recovers slowly, within 12 hours. It means that the transfusion of red blood cells whose temperature is below  $37^\circ\text{C}$  may not be effective for at least 12 hours and the transfusion medium should be warmed to reduce the risk of transfusion of altered forms of erythrocytes to the patients.

12 часов. Это означает, что трансфузия эритроцитов, температура которых ниже  $37^\circ\text{C}$ , не может быть эффективной в течение, по крайней мере, 12 часов и требуется согревание трансфузионной среды, чтобы уменьшить риск трансфузии препаратов крови.

### References

1. Moroz V.V., Novoderzhkina I.S., Antoshina E.M., Afanasyev A.V., Ryzhkov I.A., Zarzhetsky Y.V. Correction of poikilocytosis and blood biochemical indicators in acute blood loss. *Obshchaya Reanimatologiya*

- реаниматология. 2015; 11 (3): 6-15. DOI: 10.15360/1813-9779-2015-3-6-15
2. Перепелица С.А., Сергунова В.А., Алексеева С.В., Гудкова О.Е. Морфология эритроцитов при изотимизации новорожденных по резус-фактору и АВО-системе. *Общая реаниматология*. 2015; 11 (2): 25-34. DOI: 10.15360/1813-9779-2015-2-25-34
  3. Abelha F.J., Castro M.A., Neves A.M., Landeiro N.M., Santos C.C. Hypothermia in a surgical intensive care unit. *BMC Anesthesiol.* 2005; 5: 5-7. DOI: 10.1186/1471-2253-5-7. PMID: 15938757
  4. Annadata R., Sessler D.I., Tayefeh F., Kurz A., Dechert M. Desflurane slightly increases the sweating threshold but produces marked, nonlinear decreases in the vasoconstriction and shivering thresholds. *Anesthesiology*. 1995; 83 (6): 1205-1211. DOI: 10.1097/00000542-199512000-00011. PMID: 8533913
  5. Sessler D.I. Perioperative heat balance. *Anesthesiology*. 2000; 92 (2): 578-596. DOI: 10.1097/00000542-200002000-00042. PMID: 10691247
  6. Konstantinidis A., Inaba K., Dubose J., Barmparas G., Talving P., David J.S., Lam L., Demetriades D. The impact of nontherapeutic hypothermia on outcomes after severe traumatic brain injury. *J. Trauma*. 2011; 71 (6): 1627-1631. DOI: 10.1097/TA.0b013e3182159e31. PMID: 21537207
  7. Inaba K., Teixeira P.G., Rhee P., Brown C., Salim A., DuBose J., Chan L.S., Demetriades D. Mortality impact of hypothermia after cavitory explorations in trauma. *World J. Surg.* 2009; 33 (4): 864-869. DOI: 10.1007/s00268-009-9936-2. PMID: 19219493
  8. Sessler D.I. Mild perioperative hypothermia. *N. Engl. J. Med.* 1997; 336 (24): 1730-1737. DOI: 10.1056/NEJM199706123362407. PMID: 9180091
  9. Bush H.L., Hydo L.J., Fischer E., Fantini G.A., Silane M.F., Barie P.S. Hypothermia during elective abdominal aortic aneurysm repair: the high price of avoidable morbidity. *J. Vasc. Surg.* 1995; 21 (3): 392-400. DOI: 10.1016/S0741-5214(95)70281-4. PMID: 7877221
  10. World Health Organization. Dept. of Blood Safety and Clinical Technology, Safe Blood and Blood Product. Manual on the management, maintenance and use of blood cold chain equipment. Geneva: World Health Organization; 2005: 92.
  11. Минздрав России. Приказ от 02.04.2013 №183н «Об утверждении правил клинического использования донорской крови и (или) ее компонентов».
  12. Рагимов А.А., Еременко А.А., Никифоров Ю.В. Трансфузиология в реаниматологии. М.: МИА; 2005: 784.
  13. Iserson K.V., Huestis D.W. Blood warming: current applications and techniques. *Transfusion*. 1991; 31 (6): 558-571. DOI: 10.1046/j.1537-2995.1991.31691306256.x. PMID: 1853451
  14. 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/j.yexcr.2015.07.009. PMID: 26169694
  15. Сергунова В.А., Козлова Е.К., Мягкова Е.А., Черныш А.М. Измерение упруго-эластических свойств мембраны нативных эритроцитов *in vitro*. *Общая реаниматология*. 2015; 11 (3): 39-44. DOI: 10.15360/1813-9779-2015-3-39-44
- = *General Reanimatology*. 2015; 11 (3): 6-15. DOI: 10.15360/1813-9779-2015-3-6-15. [In Russ., In Engl.]
2. *Perpelitsa S.A., Sergunova V.A., Alekseeva S.V., Gudkova O.E.* Erythrocyte morphology in neonatal rhesus factor and ABO isoimmunization. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2015; 11 (2): 25-34. DOI: 10.15360/1813-9779-2015-2-25-34. [In Russ., In Engl.]
  3. *Abelha F.J., Castro M.A., Neves A.M., Landeiro N.M., Santos C.C.* Hypothermia in a surgical intensive care unit. *BMC Anesthesiol.* 2005; 5: 5-7. DOI: 10.1186/1471-2253-5-7. PMID: 15938757
  4. *Annadata R., Sessler D.I., Tayefeh F., Kurz A., Dechert M.* Desflurane slightly increases the sweating threshold but produces marked, nonlinear decreases in the vasoconstriction and shivering thresholds. *Anesthesiology*. 1995; 83 (6): 1205-1211. DOI: 10.1097/00000542-199512000-00011. PMID: 8533913
  5. *Sessler D.I.* Perioperative heat balance. *Anesthesiology*. 2000; 92 (2): 578-596. DOI: 10.1097/00000542-200002000-00042. PMID: 10691247
  6. *Konstantinidis A., Inaba K., Dubose J., Barmparas G., Talving P., David J.S., Lam L., Demetriades D.* The impact of nontherapeutic hypothermia on outcomes after severe traumatic brain injury. *J. Trauma*. 2011; 71 (6): 1627-1631. DOI: 10.1097/TA.0b013e3182159e31. PMID: 21537207
  7. *Inaba K., Teixeira P.G., Rhee P., Brown C., Salim A., DuBose J., Chan L.S., Demetriades D.* Mortality impact of hypothermia after cavitory explorations in trauma. *World J. Surg.* 2009; 33 (4): 864-869. DOI: 10.1007/s00268-009-9936-2. PMID: 19219493
  8. *Sessler D.I.* Mild perioperative hypothermia. *N. Engl. J. Med.* 1997; 336 (24): 1730-1737. DOI: 10.1056/NEJM199706123362407. PMID: 9180091
  9. *Bush H.L., Hydo L.J., Fischer E., Fantini G.A., Silane M.F., Barie P.S.* Hypothermia during elective abdominal aortic aneurysm repair: the high price of avoidable morbidity. *J. Vasc. Surg.* 1995; 21 (3): 392-400. DOI: 10.1016/S0741-5214(95)70281-4. PMID: 7877221
  10. World Health Organization. Dept. of Blood Safety and Clinical Technology, Safe Blood and Blood Product. Manual on the management, maintenance and use of blood cold chain equipment. Geneva: World Health Organization; 2005: 92.
  11. Ministry of Health Care of Russia. Order from 02.04.2013 № 183n «On the approval of the rules for the clinical use of donor blood and (or) its components». [In Russ.]
  12. *Ragimov A.A., Eremenko A.A., Nikiiforov Yu.V.* Transfusiology in intensive care. Moscow: Meditsinskoe Informatsionnoe Agentstvo; 2005: 784. [In Russ.]
  13. *Iserson K.V., Huestis D.W.* Blood warming: current applications and techniques. *Transfusion*. 1991; 31 (6): 558-571. DOI: 10.1046/j.1537-2995.1991.31691306256.x. PMID: 1853451
  14. *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/j.yexcr.2015.07.009. PMID: 26169694
  15. *Sergunova V.A., Kozlova E.K., Myagkova E.A., Chernysh A.M.* *In vitro* measurement of the elastic properties of the native red blood cell membrane. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2015; 11 (3): 39-44. DOI: 10.15360/1813-9779-2015-3-39-44. [In Russ., In Engl.]

Поступила 15.06.17

Received 15.06.17