

## Дефекты мембран эритроцитов у пациентов с нарушениями функции головного мозга (пилотное исследование)

А. В. Гречко<sup>1</sup>, И. В. Молчанов<sup>2</sup>, В. А. Сергунова<sup>2</sup>, Е. К. Козлова<sup>2,3</sup>, А. М. Черныш<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии, Россия, 141534, Московская область, Солнечногорский район, д. Лыткино, д. 777

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

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

## Defects of Red Blood Cell Membranes in Patients with Brain Dysfunction (Pilot Study)

Andrey V. Grechko<sup>1</sup>, Igor V. Molchanov<sup>2</sup>, Victoria A. Sergunova<sup>2</sup>, Elena K. Kozlova<sup>2,3</sup>, Alexander M. Chernysh<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, 777 Lytkino 141534, Solnechnogorsk district, Moscow region, Russia

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

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

**Цель работы.** Выявление перспективных диагностических и прогностических биомаркеров развития патологических процессов на основе особенностей морфологии и наноструктуры мембран эритроцитов у пациентов с нарушениями функции головного мозга, находящихся в отделении анестезиологии и реанимации.

**Материалы и методы.** В исследование включили 24 пациента отделения анестезиологии и реанимации ФНКЦ РР. Кровь забирали у данных пациентов для стандартных анализов, и все дальнейшие исследования проводили *in vitro*. Изображения эритроцитов получали с помощью атомного силового микроскопа «NTEGRA Prima» (NT-MDT, Россия) в полуконтактном режиме.

**Результаты.** У пациентов отделения анестезиологии и реанимации с черепно-мозговой травмой, ишемическим и геморрагическим инсультом, отеком головного мозга, постгипоксической энцефалопатией имели место различные формы клеток крови, на поверхности мембраны эритроцитов возникали локальные дефекты различной топологии: дефекты паллора, тора, наноструктуры.

**Заключение.** В данном пилотном исследовании мы показали, что ряд дефектов являются стартовым механизмом развития тотальных повреждений мембран. Локальные топографические дефекты наноструктур, а также нарушения морфологии эритроцитов необратимы. Количество и качество этих нарушений в перспективе могут быть использованы как диагностический и прогностический биомаркер патологических процессов.

**Ключевые слова:** эритроциты; наноструктура мембран; атомная силовая микроскопия

**The aim of the paper:** to identify promising diagnostic and prognostic biomarkers of pathological processes development based on the red blood cell membrane morphology and nanostructure in patients with brain disorders in the Intensive Care Unit.

**Materials and methods.** The study included 24 patients from the anesthesiology and resuscitation ward of the Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology. Blood was acquired from the patients for standard tests, and all further tests were performed *in vitro*. The images of red blood cells were obtained using the atomic force microscope «NTEGRA Prima» (NT-MDT, Russia) in semi-contact mode.

**Results.** Patients from the anesthesiology and intensive care ward with traumatic brain injury, ischemic and hemorrhagic stroke, cerebral edema, and post-hypoxic encephalopathy had different blood cell shapes and localized defects of different topology on the surface of erythrocyte membranes including defects of pallor, torus, and nanostructure.

**Conclusion.** In this pilot study we have shown that several defects represent the trigger mechanisms for the development of a total membrane damage. Local topographic defects of nanostructures and abnormalities

Адресс для корреспонденции:

Александр Михайлович Черныш  
E-mail: orbf@mail.ru

Correspondence to:

Alexander M. Chernysh  
E-mail: orbf@mail.ru

of erythrocyte morphology are irreversible. The number and quality of these abnormalities may eventually be used as a diagnostic and prognostic biomarker of pathological processes.

**Keywords:** red blood cells; membrane nanostructure; atomic force microscopy

DOI:10.15360/1813-9779-2019-6-11-20

## Введение

Одной из приоритетных проблем реаниматологии является исследование механизмов развития критических и терминальных состояний на органном, клеточном и молекулярном уровнях [1, 2]. Изучению вопросов, связанных с изменением эритроцитов при терминальных состояниях, посвящен ряд исследований, проведенных на клеточном уровне [3], однако, вопрос об изменениях наноструктуры мембран эритроцитов при различных патологических состояниях остается открытым. При ряде состояний таких как ишемия, гипертония, атеросклероз в организме происходит кислородное голодание. Происходит изменение морфологии эритроцитов — пойкилоцитоз [4]. Состояние мембран эритроцитов играет важную роль в сохранении их целостности [5] и в осуществлении их газотранспортной функции [6].

В ряде работ показано, что наноструктура мембран влияет на жесткость эритроцитов, а, следовательно, и на реологию крови в целом и на качество периферического кровотока [7]. Основным показателем функционирования эритроцита является стабильность наноструктуры мембраны на всех уровнях ее организации [8–10].

Таким образом, изучение наноструктуры мембран эритроцитов у пациентов отделения реанимации является одной из актуальных задач реаниматологии [11–13].

Важным направлением развития современной медицины в целом и реаниматологии в частности является применение новейших физических и биофизических методов исследования наноструктур мембран эритроцитов [14]. Наиболее универсальным и информативным методом изучения наноструктуры мембраны является метод сканирующей зондовой микроскопии, в частности, атомной силовой микроскопии (АСМ) [15–18]. Этот метод позволяет регистрировать наноструктуру мембраны в широком диапазоне ее изменений — от микрона до долей нанометров. АСМ дает возможность обнаружить морфологические изменения при заболеваниях [19], при острой кровопотере [20] и при различных физико-химических воздействиях [15]. Это определяется тем, что при критических состояниях, при кровопотерях, при сочетанных травмах собственные параметры мембран эритроцитов меняются в широких пределах [21, 22].

## Introduction

One of the key issues of intensive care is the study of mechanisms of critical illness and terminal states development at the organ, cellular and molecular levels [1, 2]. A number of studies done at the cellular level dealt with red blood cell alterations in terminal states [3], however, the nanostructure changes of the RBC membranes in various conditions remained to be investigated. In various diseases such as ischemia, hypertension, and atherosclerosis, an oxygen starvation occurs in the body. Erythrocyte morphology also changes — poikilocytosis develops [4]. The state of erythrocyte membranes plays an important role in the maintenance of their integrity [5] and in gas transport function [6].

Several studies have shown that the nanostructure of membranes affects RBC stiffness and, consequently, blood flow in general and the quality of peripheral blood flow in particular [7]. The main indicator of erythrocyte functioning is the stability of the membrane nanostructure at all levels of its structure [8–10].

Thus, the study of RBC membrane nanostructure in the intensive care unit (ICU) patients is one of the key priorities of intensive care [11–13].

One of the challenges of contemporary medicine, specifically, in ICU setting, includes to study nanostructures of erythrocyte membranes with the aid of the latest physical and biophysical techniques [14]. The most universal and informative technique for studying membrane nanostructures is the scanning probe microscopy, namely, atomic force microscopy (AFM) [15–18]. This method allows to detect the wide range of the membrane nanostructure changes, from microns to fractions of nanometers. AFM helps to detect morphological alterations in diseases [19], acute blood loss [20], and following the effects of various physical and chemical factors [15]. This is due to wide variations of erythrocyte membrane parameters in critical conditions, blood loss, and combined traumas [21, 22].

The aim of this work was to reveal promising diagnostic and prognostic candidate biomarkers of pathological process development based on erythrocyte membrane shape and nanostructure in patients with brain dysfunction in the anesthesiology and resuscitation ward.

## Materials and Methods

The research was conducted by the laboratory of cell membrane biophysics in critical conditions of the

Цель работы — выявление перспективных диагностических и прогностических биомаркеров развития патологического процесса на основе особенностей морфологии и наноструктуры мембран эритроцитов у пациентов с нарушениями функции головного мозга, находящихся в отделении анестезиологии и реанимации.

## Материал и методы

Работа выполнена лабораторией биофизики мембран клеток при критических состояниях НИИОР им. В. А. Неговского ФНКЦ РР совместно с лабораторией метаболической реабилитации отделения анестезиологии и реанимации ФНКЦ РР.

В исследование включили 24 пациента отделения анестезиологии и реанимации ФНКЦ РР с черепно-мозговой травмой (ЧМТ), ишемическим и геморрагическим инсультом, отеком головного мозга (ОГМ), постгипоксической энцефалопатией (ПГЭ), тромбозом вен.

Кровь забирали у данных пациентов для стандартных анализов, и все дальнейшие исследования проводили *in vitro*. Все исследования проводили с учетом требований Хельсинской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г, а также с нормами этического комитета ФНКЦ РР.

После забора 10 мкл цельной крови наносили на предметное стекло и приготавливали монослой эритроцитов с помощью прибора «V-sampler, Vision Microscopy» (Австрия).

Изображения эритроцитов получали с помощью атомного силового микроскопа «NTEGRA Prima» (NT-MDT, Россия) в полуконтактном режиме. В качестве зондов использовали кантилеверы NSG01-A. Число точек сканирования 512 и 1024, поля сканирования 100×100 мкм, 10×10 мкм.

Исследование состояния клеток крови и их мембран включало:

- анализ морфологии эритроцитов;
- анализ размеров клеток, анизоцитоза, пойкилоцитоза;
- оценку состояния наноструктуры мембран эритроцитов;
- оценку состояния и содержания в крови тромбоцитов.

В качестве группы сравнения использовали эритроциты и мембраны здоровых доноров и нормы, которые известны по данным литературы, и нами неоднократно были описаны [7, 22].

## Результаты и обсуждение

У здорового человека основную массу составляют эритроциты двояковогнутой формы — дискоциты (80–90%). В норме диаметр эритроцита составлял 7500±500 нм. Максимальная высота тора дискоцита в монослое — 1500 нм, высота впадины — 420 нм [7, 10, 22].

У пациентов, включенных в исследование, наблюдали различные формы эритроцитов (таблица).

V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology of the Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation (FRCCICMR) in cooperation with the laboratory of metabolic rehabilitation of the Anesthesiology and Resuscitation Department of the FRCCICMR.

The study included 24 patients of the Anesthesiology and Resuscitation Department of the FRCCICMR with traumatic brain injury (TBI), ischemic and hemorrhagic stroke, brain edema, posthypoxic encephalopathy (PHE), venous thrombosis.

Blood was taken from the patients for standard tests, and all further tests were performed *in vitro*. All studies were conducted in accordance with the requirements of the World Medical Association Helsinki Declaration on the ethical principles of scientific medical research involving human subjects, as amended in 2000, as well as with the standards of the FRCCICMR Ethics Committee.

After 10 µl of whole blood had been collected, a monolayer of red blood cells was prepared using the V-Sampler, Vision Microscopy (Austria).

The images of red blood cells were obtained using the atomic force microscope «NTEGRA Prima» (NT-MDT, Russia) in semi-contact mode. Cantilevers NSG01-A were used as probes. The number of scanning points was 512 and 1024, scanning fields were 100×100 µm and 10×10 µm.

The study of the state of blood cells and their membranes included:

- erythrocyte morphology analysis;
- analysis of cell size, anisocytosis, poikilocytosis presence;
- assessment of nanostructure state of erythrocyte membranes;
- assessment of the condition and blood count of platelets.

As a control group, we used erythrocytes and healthy donor membranes and reference ranges taken from the literature and repeatedly described in our papers as well [7, 10, 22].

## Results and Discussion

In a healthy person, the bulk of the RBC population is made up of double concave cells called discocytes (80–90%). Normally, the erythrocyte diameter is 7500±500 nm. The maximum height of the discocyte torus in the monolayer is 1500 nm, the height of the central indentation is 420 nm [7, 22].

Different shapes of red blood cells were observed in the patients included in the study (Table).

Target cells, or codocytes, are cells with a thickened center where hemoglobin accumulates. These cells are large and heavily compacted, which prevents their free passage through thin vessels. Codocytes are typical for alpha- and beta-thalassemia, hemoglobinopathy C and S, lead intoxication and liver disease, particularly prolonged mechanical jaundice. Codocytes are particularly common in obstructive jaundice. Target cells have increased sodium content and decreased potassium content [23]. These cells (Fig. 1 *a, b, c*) were observed



Формы эритроцитов в исследованных образцах крови.  
Shapes of RBCs in the blood samples studied.

Red Blood Cells							Platelets	
Shapes				Defective			Torus	Central indentation
Discocytes	Tear-like (dacryocytes)	Ovalocytes	Codocytes	Echinocytes (burr cells)	Stomatocytes	Abnormal		
States and diseases								
Normal, healthy person	TBI	TBI, ischemic stroke	TBI, ischemic stroke	TBI, ischemic and hemorrhagic stroke, cerebral edema, posthypoxic encephalopathy, lower extremity venous thrombosis				

**Примечание.** Red Blood Cells — эритроциты; shapes — формы; defective — дефекты; platelets — тромбоциты; discocytes — дискоциты; stomatocytes — овалоциты; echinocytes (burr cells) — эхиноциты; tear-like (dacryocytes) — слезовидные (дакриоциты); stomatocytes — стоматоциты; abnormal — аномальные; torus — на торе; Central indentation — во впадине; states and diseases — состояния и заболевания; normal, healthy person — норма, здоровый человек; TBI — ЧМТ; ischemic and hemorrhagic stroke — ишемический и геморрагический инсульт; cerebral edema — ОГМ; posthypoxic encephalopathy — ППЭ; lower extremity venous thrombosis — тромбоз вен нижних конечностей.

in 14 patients out of 24, on average,  $20 \pm 8\%$  per smear. Codocytes were found in patients with traumatic brain injury, posthypoxic encephalopathy, ischemic and hemorrhagic stroke, cerebral edema, lower extremity venous thrombosis (Table).

Abnormal erythrocytes are red blood cells that do not fall within the standard classification (Fig. 1 *d, e, f*), they were observed in 17 out of 24 patients. On the average,  $28 \pm 6\%$  of abnormal cells were seen per smear in each patient.

Stomatocytes have a slit-like central lumen (pallor). They are produced due to the increased permeability of the membrane for sodium and potassium. Stomatocytes with slit defects (Fig. 2 *a, b, c*) were observed in 17 patients out of 24. The smears of each patient contain on the average  $16 \pm 4\%$  stomatocytes with slit defects. These cells are formed as a result of low pH, non-permeating anions, cationic detergents, vitamin A. In a smaller number (approximately 3% of the total cell population), stomatocytes can be found in obstructive liver disease, alcoholic cirrhosis, cardiovascular disease, and malignant tumors [23]. Stomatocytes were observed in patients with lower extremity venous thrombosis, cerebral edema, traumatic brain injury, posthypoxic encephalopathy, cerebral infarct (Table).

Dacryocytes, or teardrop red blood cells (Fig. 2 *d*), have one large spicula. They were observed in 2 out of 24 patients with traumatic brain injury, with an average of  $21 \pm 4\%$  dacryocytes per smear in each patient with TBI. Such cells are most often detected in myelofibrosis [24] and in various forms of anemia. Hemoglobin crystallization inside a cell like this is particularly dangerous [25].

Each echinocyte has 30–50 spiculas of similar size evenly distributed on the cell surface. Such erythrocytes are produced due to the increase of pH, depletion of ATP stores [26], and also due to the increase of intracellular calcium. They can be found in uremia, transfusion of RBC suspension stored for more than 3 weeks [27], peptic ulcer complicated by bleeding, hypophosphatemia, hypomagnesemia, hereditary deficit of pyruvate kinase or phosphoglycerate kinase [23].

Echinocytes were observed in 18 out of 24 patients, on the average  $26 \pm 4\%$  per smear. Transformation of discocyte to echinocyte is reversible in the early stages. If the cell stays in a state of echinocyte for a long time, the loss of the membrane lipid component occurs and the change of shape becomes irreversible. This form of cells was noted in patients with posthypoxic encephalopathy, traumatic brain injury, ischemic and hemorrhagic stroke (Table 1).

Ovalocytes (Fig. 3) have typical oval or elongated shape. Membrane or hemoglobin abnormalities result into a change of cell shape. Ovalocytes were observed in 2 out of 24 patients, with an aver-

Мишеневидные эритроциты или кодоциты — клетки с утолщением в центре, в котором скапливается гемоглобин. Такие клетки имеют большие размеры и сильно уплотнены, что препятствует их свободному прохождению через тонкие сосуды. Кодоциты характерны для а- и р-талассемии, гемоглобинопатии С и S, свинцовой интоксикации и болезней печени, в частности, длительной механической желтухи. Кодоциты особенно часто встречаются при обструктивной желтухе. У мишеневидных клеток увеличена концентрация натрия и снижена концентрация калия [23]. Эти клетки (рис. 1 *a, b, c*) наблюдались у 14 пациентов из 24, в среднем,  $20 \pm 8\%$  на мазке. Кодоциты наблюдали у пациентов с черепно-мозговой травмой, постгипоксической энцефалопатией, ишемическим и геморрагическим инсультом, отеком головного мозга, тромбозом вен нижних конечностей (см. табл.).

Аномальные эритроциты — это эритроциты, которые по своим характеристикам не входят в стандартную классификацию (рис. 1 *d, e, f*), наблюдали у 17 пациентов из 24. У каждого пациента на мазке встречали в среднем  $28 \pm 6\%$  аномальных клеток.

Стоматоциты имеют щелевидную форму центрального просвета (паллора). Причиной их появления является повышенная проницаемость мембраны для натрия и калия. Стоматоциты с дефектами щели (рис. 2 *a, b, c*) наблюдали у 17 пациентов из 24. В среднем,  $16 \pm 4\%$  стоматоцитов с дефектами щели присутствует в мазках каждого пациента. Эти клетки образуются под действием: низкого рН, не проникающих анионов, катионных детергентов, витамина А. В меньшем числе (приблизительно 3% от общей популяции клеток) стоматоциты встречаются при обструктивных болезнях печени, алкогольном циррозе, кардиоваскулярной патологии, злокачественных опухолях [23]. Стоматоциты наблюдали у пациентов с тромбозом вен нижних конечностей, отеком головного мозга, черепно-мозговой травмой, постгипоксической энцефалопатией, инфарктом головного мозга (см. табл.).

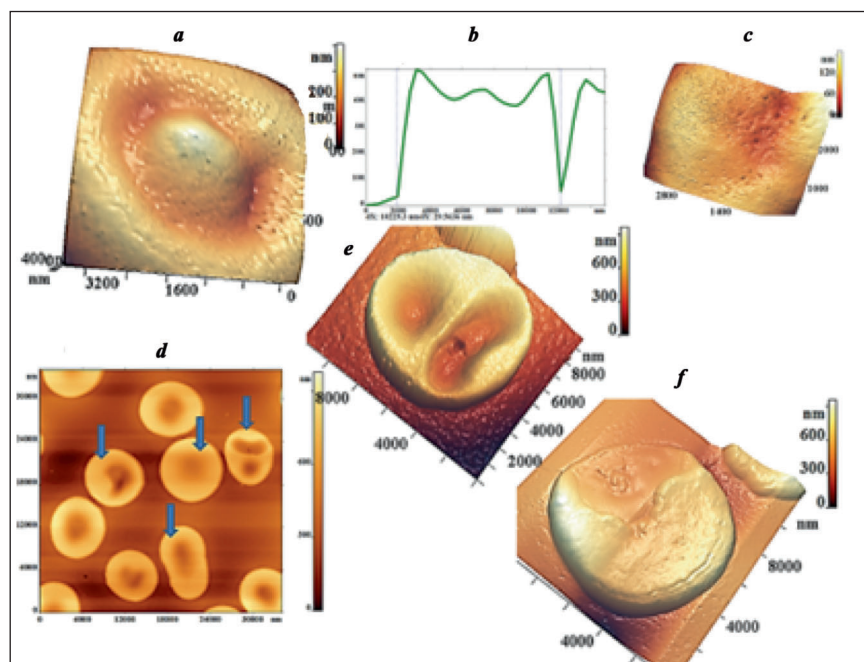


Рис. 1. АСМ изображение эритроцитов: *a, b* — фрагмент мембраны кодоцита и его профиль; *c* — наноструктура фрагмента мембраны кодоцита; *d* — аномальные эритроциты  $30 \times 30$  мкм (синие стрелки); *e, f* — аномальные эритроциты  $10 \times 10$  мкм.

Fig. 1. AFM image of erythrocytes: *a, b* — fragment of codocyte membrane and profile of a codocyte; *c* — nanostructure of a codocyte membrane fragment; *d* — abnormal erythrocytes  $30 \times 30$   $\mu\text{m}$  (blue arrows); *e, f* — abnormal erythrocytes  $10 \times 10$   $\mu\text{m}$ .

age of  $8 \pm 3\%$  per smear. Elliptocytes (ovalocytes) normally make up less than 1% of all cells. In case of anemia (thalassemia, iron deficiency and especially megaloblastic) their level reaches as much as 10%. The population of elliptocytes is not uniform in size [23]. Such cells were observed in patients with ischemic stroke and TBI (Table).

Metabolic disturbances and damage to cell membranes cause an increase in the population of echinocytes, target cells and degenerative forms of erythrocytes, which may be accompanied by a high probability of intravascular hemolysis and thus contribute to the development of blood hypoxia [28]. This is supported by the fact that irreversibly altered red blood cells are prone to premature aging and hemolysis. The abnormally shaped RBC have less plasticity and while passing through the smallest vessels can further worsen the blood flow and dramatically change the capillary exchange [29, 30].

Figure 4 shows an image of red blood cells in the AFM field of  $10 \times 10$   $\mu\text{m}$  with pallor defects. Normal RBC indentation height is 400–450 nm.

An average of  $70 \pm 15\%$  of RBC with a pallor defect per smear were found in 17 of 24 patients (Fig. 4 *a, b*). Defects in the pallor itself (Fig. 4 *c, d, e*) were observed in smears of 15 patients out of 24. In case of traumatic brain injury, ischemic and hemorrhagic stroke, cerebral edema, posthypoxic encephalopathy, lower extremity venous thrombosis, their number may increase up to  $50 \pm 16\%$  per smear.



Дакриоциты или слезовидные эритроциты (рис. 2 *d*) имеют одну большую спикулу. Их наблюдали у 2 из 24 пациентов с черепно-мозговой травмой, в среднем —  $21 \pm 4\%$  дакриоцитов на мазке у каждого пациента с ЧМТ. Такие клетки чаще всего выявляются при миелофиброзе [24], при различных формах анемии. Особая опасность заключается в возможной кристаллизации гемоглобина внутри клетки [25].

Эхиноциты имеют на поверхности выросты, сходной величины, равномерно распределенные на поверхности клетки в количестве 30–50 спикул. Такие эритроциты образуются при увеличении pH, истощении запасов АТФ [26], а также при повышении уровня внутриклеточного кальция. Встречаются при уремии, переливании эритроцитарной взвеси после 3 недели хранения [27], пептической язве, осложненной кровотечением, гипофосфатемии, гипомагнемии, при наследственном дефиците пируваткиназы, фосфолицераткиназы [23].

Эхиноциты наблюдали у 18 пациентов из 24, в количестве  $26 \pm 4\%$  на мазке. Трансформация дискоцит-эхиноцит в начальной стадии обратима. Если клетка долго пребывает в состоянии эхиноцита, то возникает потеря липидного компонента мембраны и изменение формы становится необратимым. Такую форму клеток наблюдали у пациентов с постгипоксической энцефалопатией, черепно-мозговой травмой, ишемическим и геморрагическим инсультом (см. табл.).

Овалоциты (рис. 3) — клетки характерной овальной или удлинённой формы. Аномалии мембраны или гемоглобина приводят к изменению формы клетки. Овалоциты наблюдали у 2 пациентов из 24, в среднем —  $8\% \pm 3$  на мазке. Эллиптоциты (овалоциты) в норме составляют менее 1% всех клеток. При различных анемиях (талассемия, железодефицитная и особенно мегалобластная анемии) их содержание доходит до 10%. При этом популяция эллиптоцитов неоднородна по размерам [23]. Такие клетки наблюдали у пациентов с ишемическим инсультом и черепно-мозговой травмой (см. табл.).

Метаболические нарушения и повреждение клеточных мембран вызывают увеличение

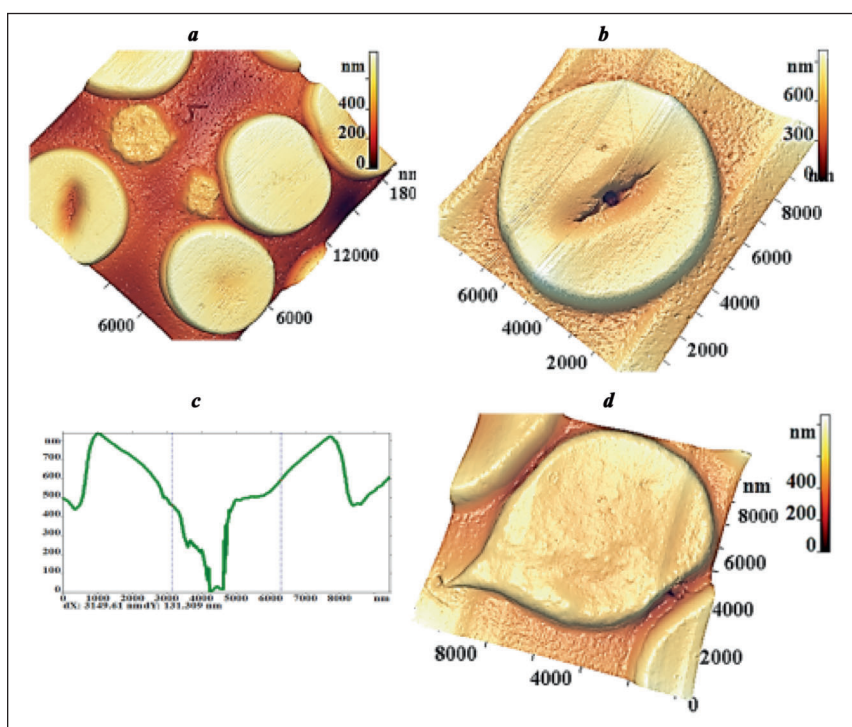


Рис. 2. АСМ изображение эритроцитов: *a* — аномальные эритроциты  $30 \times 30$  мкм; *b*, *c* — стоматоцит с дефектами щели и его профиль; *d* — дакриоцит.

Fig. 2. AFM images of erythrocytes: *a* — abnormal erythrocytes  $30 \times 30$   $\mu\text{m}$ ; *b*, *c* — stomatocyte with slit defects and a profile of a stomatocyte with slit defects; *d* — a dacryocyte.

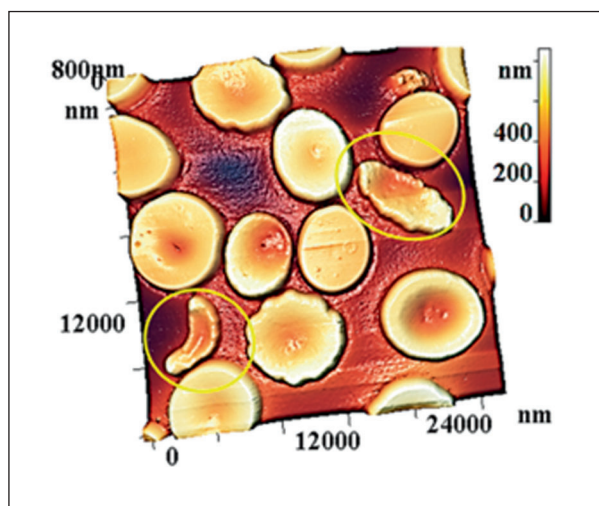


Рис. 3. АСМ изображение эритроцитов в поле  $25 \times 25$  мкм. Fig. 3. AFM image of erythrocytes in the field of  $25 \times 25$   $\mu\text{m}$ .

Note. Yellow circles indicate ovalocytes.

Примечание. Желтыми кругами выделены овалоциты.

In 5 out of 24 patients, microdefects were observed on the torus (Fig. 5 *a*, *b*), with an average of  $10 \pm 3\%$  per smear. Six out of 24 patients had grain domains on the torus (Fig. 5 *c*, *d*, *e*), with an average of  $15 \pm 6\%$  per smear. This represents the starting mechanism for the irreversible membrane damage. Microdefects on the torus appeared in patients with the above mentioned abnormalities.

In all studied patients,  $16 \pm 7\%$  of active platelets were observed per smear (Fig. 6).

популяции эритроцитов, мишеневидных и дегенеративных форм эритроцитов, что может сопровождаться высокой вероятностью внутрисосудистого гемолиза и, тем самым, способствовать развитию гемической гипоксии [28]. В пользу этого свидетельствуют данные о том, что необратимо измененные эритроциты склонны к преждевременному старению и гемолизу. Измененные формы эритроцитов обладают меньшей пластичностью в результате чего прохождение таких клеток в мельчайших сосудах усугубляет нарушение кровотока и резко изменяет капиллярный обмен [29].

На рис. 4 представили изображение красных клеток крови в поле АСМ  $10 \times 10$  мкм с дефектами паллора. У нормального эритроцита впадина — 400–450 нм.

На мазках 17 из 24 пациентов встречали в среднем  $70 \pm 15\%$  эритроцитов с дефектом паллора (рис. 4 *a, b*). Дефекты в самом паллоре (рис. 4 *c, d, e*) наблюдали на мазках у 15 пациентов из 24. При черепно-мозговой травме, ишемическом и геморрагическом инсульте, отеке головного мозга, постгипоксической энцефалопатии, тромбозе вен нижних конечностей их количество может увеличиваться до  $50 \pm 16\%$  на мазке.

У 5 пациентов из 24 наблюдали микродефекты на торе (рис. 5 *a, b*), в среднем —  $10 \pm 3\%$  на мазке. У 6 пациентов из 24 на торе появлялись зерновые домены (рис. 5 *c, d, e*), в среднем —  $15 \pm 6\%$  на мазке. Это стартовый механизм зарождения необратимых повреждений мембран. Микродефекты на торе появлялись у пациентов с перечисленными выше патологиями.

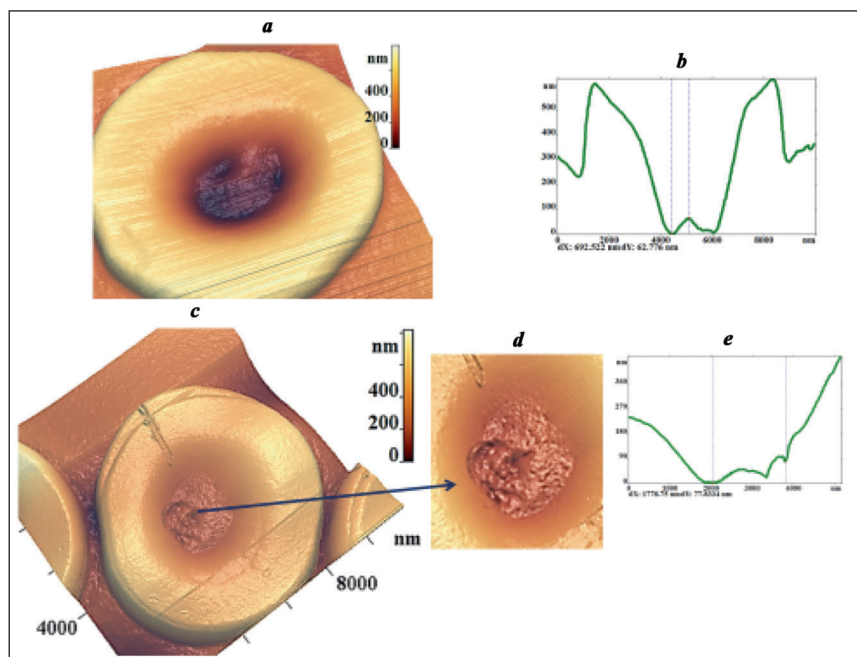


Рис. 4. АСМ изображение эритроцитов: *a, b* — дискоцит с дефектом паллора и его профиль; *c* — дискоцит с дефектом в самом паллоре; *d, e* — фрагмент мембраны дефекта в самом паллоре (синяя стрелка указывает дефект и его профиль).  
Fig. 4. AFM image of erythrocytes: *a, b* — a discocyte with a pallor defect and its profile; *c* — a discocyte with a defect in the pallor itself; *d, e* — a membrane fragment of the defect in the pallor itself (the blue arrow indicates the defect and its profile).

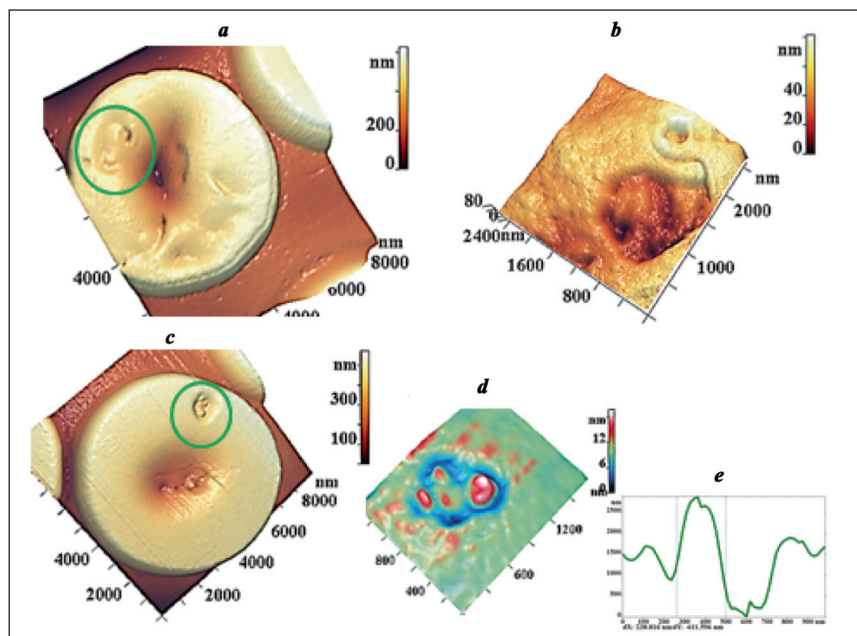


Рис. 5. АСМ изображение эритроцитов: *a* — эритроцит с микродефектом на торе; *b* — фрагмент мембраны с микродефектом на торе; *c* — дискоцит с зерновыми доменами; *d, e* — наноструктура мембраны эритроцита с зерновыми доменами и его профиль.  
Fig. 5. AFM image of erythrocytes: *a* — erythrocyte with a microdefect on torus; *b* — membrane fragment with a microdefect on torus; *c* — discocyte with grain domains; *d, e* — erythrocyte membrane nanostructure with grain domains and its profile.

Note. Green circles indicate the defects.

Примечание. Зелеными кругами выделены дефекты.

Platelets are among the indicators of acute inflammation in sepsis, tumors, bleeding. The increase



У всех пациентов, включенных в исследование, наблюдали  $16 \pm 7\%$  активных тромбоцитов на мазке (рис. 6).

Тромбоциты входят в число показателей острой фазы воспаления при сепсисе, опухолях, кровотечениях. Увеличение количества тромбоцитов является сигналом развития воспалительных патологий. При активации тромбоциты приобретают сферическую форму и образуют специальные выросты (псевдоподии), как правило, это фибриногены, гликопротеины и другие белковые фракции плазмы. Главные факторы активации тромбоцита: тромбин плазмы, тромбоксан (продукт тромбоцита), АДФ. С помощью подобных выростов кровяные пластинки могут соединяться друг с другом (агрегировать) и образовывать тромб [29, 30].

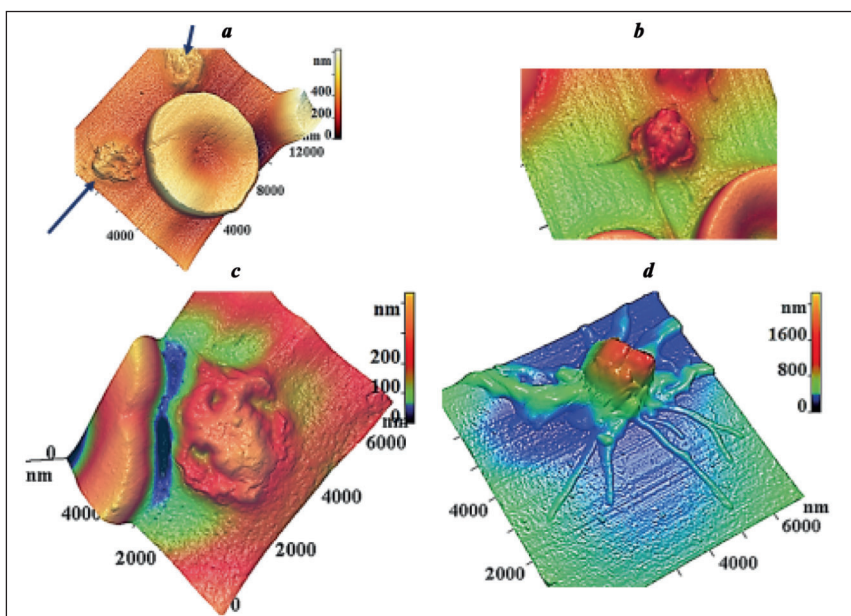


Рис. 6. АСМ изображение: *a* — дискцит и активные тромбоциты (синие стрелки); *b, c, d* — активные тромбоциты.

Fig. 6. AFM image: *a* — a discocyte, blue arrows indicate active platelets; *b, c, d* — active platelets.

### Заключение

В данном пилотном исследовании мы показали, что при указанных патологиях имеют место изменения морфологии, состава эритроцитов, возникают специфические локальные дефекты различной топологии: дефекты паллора, тора, наноструктуры. Ряд дефектов является стартовым механизмом развития тотальных повреждений мембран эритроцитов: например, образование зерновых доменов на поверхности мембраны, образование спикул на торе, возникновение сфероцитоза, увеличение модуля Юнга мембраны. Количество и качество этих нарушений в перспективе могут быть использованы как диагностический и прогностический биомаркер патологических процессов.

Для получения полной классификации нарушений мембранных структур эритроцитов, достоверно ассоциированных с исследуемыми патологическими состояниями, необходимо продолжить исследование и увеличить выборку результатов.

### Благодарность.

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

in the number of platelets is an indicator of inflammatory disorders. When activated, platelets appear spherical and form extensions called pseudopodia, which are typically made of fibrinogen, glycoproteins and other protein fractions of plasma. The main factors of platelet activation are plasma thrombin, thromboxane (platelet product), ADP. With the help of these extensions, the platelets may connect with each other (aggregate) and form a clot [30].

### Conclusion

In this pilot study, we have shown that various factors lead to changes in morphology and composition of RBCs, as well as specific local defects in various topologies, i. e. pallor, torus, and nanostructure. Several defects represent the starting points for the development of total erythrocyte membrane damage, e. g. grain domains on the membrane surface or spiculas on the torus, the occurrence of sphero- or echinocytes, and the increase in the Young's module of the membrane. The number and quality of these disorders can be used as a diagnostic and prognostic biomarker of pathological processes in the perspective.

It is necessary to proceed with the research and increase the sample size to get a complete classification of erythrocyte membrane structural alterations, which reliably associate with the studied conditions.

**Acknowledgments.** This work has been supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation and by the «Russian Academic Excellence Project 5-100».



## Литература

- Costa K.D. Imaging and probing cell mechanical properties with the atomic force microscope. *Meth. Mol. Biol.* 2006; 319: 331–361. DOI: 10.1007/978-1-59259-993-6\_17. PMID: 16719364
- Martínez-Vieyra V., Rodríguez-Varela M., García-Rubio D., De la Mora-Mojica B, Méndez-Méndez J, Durán-Álvarez C, Cerecedo D. Alterations to plasma membrane lipid contents affect the biophysical properties of erythrocytes from individuals with hypertension. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2019; 1861 (10) 182996 DOI: 10.1016/j.bbamem.2019.05.018.
- Berezina T.L., Zaets S.B., Morgan C. Influence of storage on red blood cell rheological properties. *J. Surg. Res.* 2002; 102 (1): 6–12. DOI: 10.1006/jsre.2001.6306. PMID: 11792145
- Yusipovich A.I., Bryzgalova N.Y., Parshina E.Y., Lomakin A.G., Rodnenkov O.V., Levin G.G., Maksimov G.V., Rubin A.B. Evaluation of erythrocyte shape and status by laser interference microscopy. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2008; 145 (3): 382–385. DOI: 10.1007/s10517-008-0097-3. PMID: 19039950
- Betz T., Bakowsky U., Müller M., Lehr C.M., Bernhardt I. Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cells. *Bioelectrochemistry.* 2007; 70: 122–126. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2006.03.019. PMID: 16713378
- Cabrerales P. Effects of erythrocyte flexibility on microvascular perfusion and oxygenation during acute anemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 293 (2): 1206–1215. DOI: 10.1152/ajpheart.00109.2007. PMID: 17449555
- Манченко Е. А., Козлова Е. К., Сергунова В. А., Черныш А. М. Однородная деформация нативных эритроцитов при их длительном хранении. *Общая реаниматология.* 2019; 15 (5): 2–10. DOI: 10.15360/1813-9779-2019-5-4-10
- Skoumalová A., Herget J., Wilhelm J. Hypercapnia protects erythrocytes against free radical damage induced by hypoxia in exposed rats. *Cell Biochem. Funct.* 2008; 26 (7): 801–807. DOI: 10.1002/cbf.1509. PMID: 18683905
- Girotti A.W., Thomas J.P. Damaging effects of oxygen radicals on resealed erythrocyte ghosts. *J. Biol. Chem.* 1984; 259 (3): 1744–1752. PMID: 6546380
- Vignini A., Alia S., Pugnali S., Giulietti A., Bacchetti T., Mazzanti L., Luzzi S., Fiorini R. Erythrocyte membrane fluidity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease patients. *Exp. Gerontol.* 2019; 128: 110754. DOI: 10.1016/j.exger.2019.110754.
- Катюхин Л.Н. Реологические свойства эритроцитов. Современные методы исследования. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* 1995; 81 (6): 122–129.
- Котовская Ю.В. Метаболический синдром: прогностическое значение и современные подходы к комплексной терапии. *Сердце.* 2005; 4 (5): 236–241.
- Ройтберг Г.Е. Метаболический синдром. Москва: МЕДпресс-информ; 2007: 224. ISBN 5-98322-253-8
- Spyratou E., Dilvoi M., Patatoukas G., Platoni K., Makropoulou M., Efsthathopoulos E.P. Probing the Effects of Ionizing Radiation on Young's Modulus of Human Erythrocytes Cytoskeleton using Atomic Force Microscopy. *J. Med. Phys.* 2019; 44 (2): 113–117. DOI: 10.4103/jmp. JMP\_95\_18.
- Moroz V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Borshegovskaya P.Y., Bliznjuk U.A., Rysaeva R.M., Gudkova O.Y. Comparison of red blood cell membrane microstructure after different physicochemical influences: Atomic force microscope research. *J. Crit. Care.* 2010; 25 (3): 539. 1–12. DOI: 10.1016/j.jcrc.2010.02.007. PMID: 20381299
- Ji X.L., Ma Y.M., Yin T., Shen M.S., Xu X., Guan W. Application of atomic force microscopy in blood research. *World J. Gastroenterol.* 2005; 11 (11): 1709–1711. DOI: 10.3748/wjg.v11.i11.1709. PMID: 15786556
- Girasole M., Cricenti A., Generosi R., Congiu-Castellano A., Boffi F., Arcovito A., Boumis G., and Amiconi G. Atomic force microscopy study of erythrocyte shape and membrane structure after treatment with a dihydropyridinic drug. *Appl. Phys. Lett.* 2000; 76: 3650–3652. DOI: 10.1063/1.126736
- Betz T., Bakowsky U., Müller M.R., Lehr C.M., Bernhardt I. Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cells. *Bioelectrochemistry.* 2007; 70: 122–126. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2006.03.019. PMID: 16713378
- Zhang Y., Zhang W., Wang S., Wang C., Xie J., Chen X., Xu Y., Mao P. Detection of erythrocytes in patients with multiple myeloma using atomic force microscopy. *Scanning.* 2012; DOI: 10.1002/sca.21008. PMID: 22311545
- Мороз В.В., Черныш А.М., Козлова Е.К., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Федорова М.С., Кирсанова А.К., Новодержкина И.С. Нарушение наноструктуры мембран эритроцитов при острой кровопотере и их коррекция перфторуглеродной эмульсией. *Общая реаниматология.* 2011; 7 (2): 5–9. DOI: 10.15360/1813-9779-2011-2-5
- Khromova V.S., Myshkin A.E. Coagulation of zinc-modified hemoglobin. *Russian Journal of General Chemistry.* 2002; 72 (10): 1645–1649. DOI: 10.1023/A: 1023356221708
- Мороз В.В., Мягкова Е.А., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Остапченко Д.А., Черныш А.М., Решетняк В.И. Морфологические особенности эритроцитов у больных с тяжелой сочетанной травмой. *Общая реаниматология.* 2013; 9 (3): 14–23. DOI: 10.15360/1813-9779-2013-3-14

## References

- Costa K.D. Imaging and probing cell mechanical properties with the atomic force microscope. *Meth. Mol. Biol.* 2006; 319: 331–361. DOI: 10.1007/978-1-59259-993-6\_17. PMID: 16719364
- Martínez-Vieyra V., Rodríguez-Varela M., García-Rubio D., De la Mora-Mojica B, Méndez-Méndez J, Durán-Álvarez C, Cerecedo D. Alterations to plasma membrane lipid contents affect the biophysical properties of erythrocytes from individuals with hypertension. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2019; 1861 (10) 182996 DOI: 10.1016/j.bbamem.2019.05.018.
- Berezina T.L., Zaets S.B., Morgan C. Influence of storage on red blood cell rheological properties. *J. Surg. Res.* 2002; 102 (1): 6–12. DOI: 10.1006/jsre.2001.6306. PMID: 11792145
- Yusipovich A.I., Bryzgalova N.Y., Parshina E.Y., Lomakin A.G., Rodnenkov O.V., Levin G.G., Maksimov G.V., Rubin A.B. Evaluation of erythrocyte shape and status by laser interference microscopy. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2008; 145 (3): 382–385. DOI: 10.1007/s10517-008-0097-3. PMID: 19039950
- Betz T., Bakowsky U., Müller M., Lehr C.M., Bernhardt I. Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cells. *Bioelectrochemistry.* 2007; 70: 122–126. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2006.03.019. PMID: 16713378
- Cabrerales P. Effects of erythrocyte flexibility on microvascular perfusion and oxygenation during acute anemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 293 (2): 1206–1215. DOI: 10.1152/ajpheart.00109.2007. PMID: 17449555
- Manchenko E.A., Kozlova E.K., Sergunova V.A., Chernysh A.M. Homogeneous Deformation of Native Erythrocytes During Long-Term Storage. *Obshchaya Reanimatologiya—General Reanimatology.* 2019; 15 (5): 4–10. [In Russ.]. DOI: 10.15360/1813-9779-2019-5-4-10
- Skoumalová A., Herget J., Wilhelm J. Hypercapnia protects erythrocytes against free radical damage induced by hypoxia in exposed rats. *Cell Biochem. Funct.* 2008; 26 (7): 801–807. DOI: 10.1002/cbf.1509. PMID: 18683905
- Girotti A.W., Thomas J.P. Damaging effects of oxygen radicals on resealed erythrocyte ghosts. *J. Biol. Chem.* 1984; 259 (3): 1744–1752. PMID: 6546380
- Vignini A., Alia S., Pugnali S., Giulietti A., Bacchetti T., Mazzanti L., Luzzi S., Fiorini R. Erythrocyte membrane fluidity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease patients. *Exp. Gerontol.* 2019; 128: 110754. DOI: 10.1016/j.exger.2019.110754.
- Katyuhin L.N. Rheological properties of erythrocytes. Modern research methods. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova.* 1995; 81 (6): 122–129 [In Russ.]
- Kotovskaya Yu.V. Metabolic syndrome: prognostic value and modern approaches to complex therapy. *Serdtsse.* 2005; 4 (5): 236–241 [In Russ.]
- Rojtberg G.E. Metabolic syndrome. Moscow: MEDpress-inform; 2007: 224. ISBN 5-98322-253-8 [In Russ.]
- Spyratou E., Dilvoi M., Patatoukas G., Platoni K., Makropoulou M., Efsthathopoulos E.P. Probing the Effects of Ionizing Radiation on Young's Modulus of Human Erythrocytes Cytoskeleton using Atomic Force Microscopy. *J. Med. Phys.* 2019; 44 (2): 113–117. DOI: 10.4103/jmp. JMP\_95\_18.
- Moroz V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Borshegovskaya P.Y., Bliznjuk U.A., Rysaeva R.M., Gudkova O.Y. Comparison of red blood cell membrane microstructure after different physicochemical influences: Atomic force microscope research. *J. Crit. Care.* 2010; 25 (3): 539. 1–12. DOI: 10.1016/j.jcrc.2010.02.007. PMID: 20381299
- Ji X.L., Ma Y.M., Yin T., Shen M.S., Xu X., Guan W. Application of atomic force microscopy in blood research. *World J. Gastroenterol.* 2005; 11 (11): 1709–1711. DOI: 10.3748/wjg.v11.i11.1709. PMID: 15786556
- Girasole M., Cricenti A., Generosi R., Congiu-Castellano A., Boffi F., Arcovito A., Boumis G., and Amiconi G. Atomic force microscopy study of erythrocyte shape and membrane structure after treatment with a dihydropyridinic drug. *Appl. Phys. Lett.* 2000; 76: 3650–3652. DOI: 10.1063/1.126736
- Betz T., Bakowsky U., Müller M.R., Lehr C.M., Bernhardt I. Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cells. *Bioelectrochemistry.* 2007; 70: 122–126. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2006.03.019. PMID: 16713378
- Zhang Y., Zhang W., Wang S., Wang C., Xie J., Chen X., Xu Y., Mao P. Detection of erythrocytes in patients with multiple myeloma using atomic force microscopy. *Scanning.* 2012; DOI: 10.1002/sca.21008. PMID: 22311545
- Moroz V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Fedorova M.S., Kirsanova A.K., Novoderzhkina I.S. Impairments in the Nanostructure of Red Blood Cell Membranes in Acute Blood Loss and Their Correction with Perfluorocarbon Emulsion. *Obshchaya Reanimatologiya—General Reanimatology.* 2011; 7 (2): 5. (In Russ.) DOI: 10.15360/1813-9779-2011-2-5
- Khromova V.S., Myshkin A.E. Coagulation of zinc-modified hemoglobin. *Russian Journal of General Chemistry.* 2002; 72 (10): 1645–1649. DOI: 10.1023/A: 1023356221708
- Moroz V.V., Myagkova E.A., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Ostapchenko D.A., Chernysh A.M., Reshetnyak V.I. Morphological Features of Red Blood Cells in Patients with Severe Concomitant Injury. *General Reanimatology—Obshchaya Reanimatologiya.* 2013; 9 (3): 14. (In Russ.) DOI: 10.15360/1813-9779-2013-3-14

23. Льюис С.М. Практическая гематология. Москва: ГЭОТАР-медиа; 2009: 672. ISBN 978-5-9704-1192-6
24. Robier C., Klescher D., Reicht G., Amouzadeh-Ghadikolai O., Quehenberger F., Neubauer M. Dacryocytes are a common morphologic feature of autoimmune and microangiopathic haemolytic anaemia. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2015; 53 (7): 1073–1076. DOI: 10.1515/cclm-2014-0936. PMID: 25503671
25. Сергунова В.А., Манченко Е.А., Гудкова О.Е. Гемоглобин: модификации, кристаллизация, полимеризация (обзор). *Общая реаниматология.* 2016; 12 (6): 49–63. DOI: 10.15360/1813-9779-2016-6-49-63
26. Lim H. W. G., Wortis M., Mukhopadhyay R. Stomatocyte–discocyte–echinocyte sequence of the human red blood cell: Evidence for the bilayer couple hypothesis from membrane mechanics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99 (26): 16766–16769. DOI: 10.1073/pnas.202617299. PMID: 12471152
27. 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. PMID: 28798476
28. Ишутина Н. А., Андриевская И. А. Изменение показателей свободно-радикального статуса, антиоксидантной защиты и морфологические изменения эритроцитов периферической крови беременных первого триместра с цитомегаловирусной инфекцией. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания.* 2018; 68: 57–62. DOI: 10.12737/article\_5b18ba014d2d06.81485843
29. Львов С.Е., Назаров С.Б., Молчанов О.С., Пахрова О.А. Особенности поверхностной архитектоники эритроцитов при заболеваниях тазобедренного сустава. *Вестник Ивановской медицинской академии.* 2008; 13 (1–2): 46–49.
30. Chignard M., Le Couedic J. P., Tence M., Vargaftig B. B., Benveniste J. The role of platelet-activating factor in platelet aggregation. *Nature.* 1979; 279: 799–800. DOI: 10.1038/279799a0
23. Lyuis S.M. Practical Hematology. Moscow: GEOTAR-media; 2009: 672. ISBN 978-5-9704-1192-6 [In Russ.]
24. Robier C, Klescher D, Reicht G, Amouzadeh-Ghadikolai O, Quehenberger F, Neubauer M. Dacryocytes are a common morphologic feature of autoimmune and microangiopathic haemolytic anaemia. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2015; 53 (7): 1073–1076. DOI: 10.1515/cclm-2014-0936. PMID: 25503671
25. Sergunova V.A., Manchenko E.A., Gudkova O.Y. Hemoglobin: Modification, Crystallization, Polymerization (Review). *Obshchaya Reanimatologiya=General Reanimatology.* 2016; 12 (6): 49–63. (In Russ.) DOI: 10.15360/1813-9779-2016-6-49-63
26. Lim H. W. G., Wortis M., Mukhopadhyay R. Stomatocyte–discocyte–echinocyte sequence of the human red blood cell: Evidence for the bilayer couple hypothesis from membrane mechanics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99 (26): 16766–16769. DOI: 10.1073/pnas.202617299. PMID: 12471152
27. 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. PMID: 28798476
28. Ishutina N. A., Andrievskaya I. A. Changes in indicators of free-radical status, antioxidant defense, and morphological changes in peripheral red blood cells of pregnant women in the first trimester with cytomegalovirus infection. *Byulleten fiziologii i patologii dykhaniya.* 2018; 68: 57–62. [In Russ.] DOI: 10.12737/article\_5b18ba014d2d06.81485843
29. Lvov S.E., Nazarov S.B., Molchanov O.S., Pakhrova O.A. Features of the surface architectonics of red blood cells in diseases of the hip joint. *Vestnik Ivanovskoy medicinskoj akademii.* 2008; 13 (1–2): 46–49. [In Russ.]
30. Chignard M., Le Couedic J. P., Tence M., Vargaftig B. B., Benveniste J. The role of platelet-activating factor in platelet aggregation. *Nature.* 1979; 279: 799–800. DOI: 10.1038/279799a0

Поступила 03.07.19

Received 03.07.19