

## АГРЕГАЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИ ИСТОЩЕННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

© Ю. А. Шереметьев,<sup>1</sup> А. Н. Поповичева, М. М. Rogozin, Г. Я. Левин

*Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр  
Министерства здравоохранения РФ, Нижний Новгород, 603155;*

<sup>1</sup> электронный адрес: ya.sher@rambler.ru

В настоящей работе исследовали агрегацию метаболически истощенных эритроцитов человека в аутологичной плазме после хранения крови в течение 14 сут при 4 °С методами фотометрии и световой микроскопии. Показано, что в процессе хранения крови в эритроцитах уменьшается содержание АТФ, появляется большое количество эхиноцитов и сфероэхиноцитов, снижается агрегация эритроцитов в виде «монетных столбиков». С помощью световой микроскопии обнаружено, что эхиноциты хранящейся крови начинают агрегировать между собой. Добавление к свежим эритроцитам плазмы крови, хранящейся 14 сут, показало, что она не обладает эхиноцитогенным действием на эритроциты. Агрегация эритроцитов в хранящейся аутоплазме не отличалась от агрегации свежих клеток в свежей аутологичной плазме. Свежая плазма не восстанавливала дисковидную форму и агрегацию эритроцитов крови, хранящейся 14 сут. Обсуждаются возможные механизмы агрегации эритроцитов в виде «монетных столбиков» и эритроцитов эхиноцитарной формы.

**Ключевые слова:** эритроциты, агрегация, морфология агрегатов, «монетные столбики», эхиноциты, аутологичная плазма, хранение крови.

Процесс агрегации эритроцитов в виде «монетных столбиков» определяется двумя типами биофизических и физико-химических факторов — свойствами плазмы крови и свойствами самих эритроцитов, главным образом компонентами их мембран (Baskurt, Meiselman, 1997; Baskurt et al., 2012).

Ранее нами было показано, что эхиноциты, полученные путем истощения эритроцитов по АТФ в инкубационной среде, не содержащей ионов кальция, имеют низкую агрегационную способность в аутологичной плазме (Шереметьев и др., 2013). Восстановление формы эритроцитов с помощью аденозина до дисковидной приводит к восстановлению их агрегационной способности (Шереметьев и др., 2014б).

Известно, что при хранении донорской крови или эритроцитарной массы при 4 °С в эритроцитах снижается содержание АТФ (Karger et al., 2012; Hess, 2014). При этом изменяется морфология эритроцитов — из дискоцитов они превращаются в эхиноциты (Berezina et al., 2002; Blasi et al., 2012; Reinhart et al., 2014). Кроме того, существенно изменяется агрегация эритроцитов. По данным ряда авторов (Novav et al., 1999; Relevy et al., 2008), при хранении крови увеличивается агрегационная способность эритроцитов. С другой стороны, недавно показано, что в процессе хранения крови происходит снижение степени агрегации эритроцитов в аутологичной плазме (Lim et al., 2011; Reinhart, Shulzki, 2011). В этих работах агрегация эритроцитов в виде «монетных столбиков» изучалась только фотометрическим методом. Морфологическая картина агрегатов метаболически истощенных эритроцитов (клеток с пониженным содержанием АТФ), полученных в процессе хранения крови, практически не изучена.

В настоящей работе методом световой микроскопии изучали форму и морфологию агрегатов метаболически истощенных эритроцитов человека после хранения крови в течение 14 сут при 4 °С. Процесс агрегации эритроцитов в аутологичной плазме регистрировали фотометрическим методом. Кровь хранили в присутствии антикоагулянта без добавления консервантов. В данных условиях метаболические изменения в эритроцитах происходят намного раньше, чем в присутствии консервантов.

### Материал и методика

В работе использовали кровь 10 здоровых добровольцев. Кровь забирали в вакуутайнеры, содержащие 3.13%-ный цитрат натрия (в соотношении 9 : 1), и хранили в течение 14 сут при 4 °С. Исследование проводили в день забора крови, через 7 и 14 сут хранения. Для изучения влияния плазмы, полученной после хранения цельной крови, на интактные эритроциты и свежей плазмы на эритроциты цельной крови, хранящейся 14 сут, кровь забирали у тех же добровольцев.

Бестромбоцитарную плазму получали путем центрифугирования крови в течение 20 мин при 3000 об/мин. Для исследования агрегации эритроцитов плазму смешивали с клетками в соотношении 2 : 1. Агрегацию эритроцитов в аутологичной плазме изучали фотометрическим методом (Schmid-Schonbein et al., 1973; Шереметьев и др., 2013). При изучении процесса агрегации оценивали следующие показатели: степень агрегации  $M_a$  — максимальная амплитуда агрегатограммы (мм); скорость агрегации  $A_{40}$  — амплитуда агрегатограммы че-

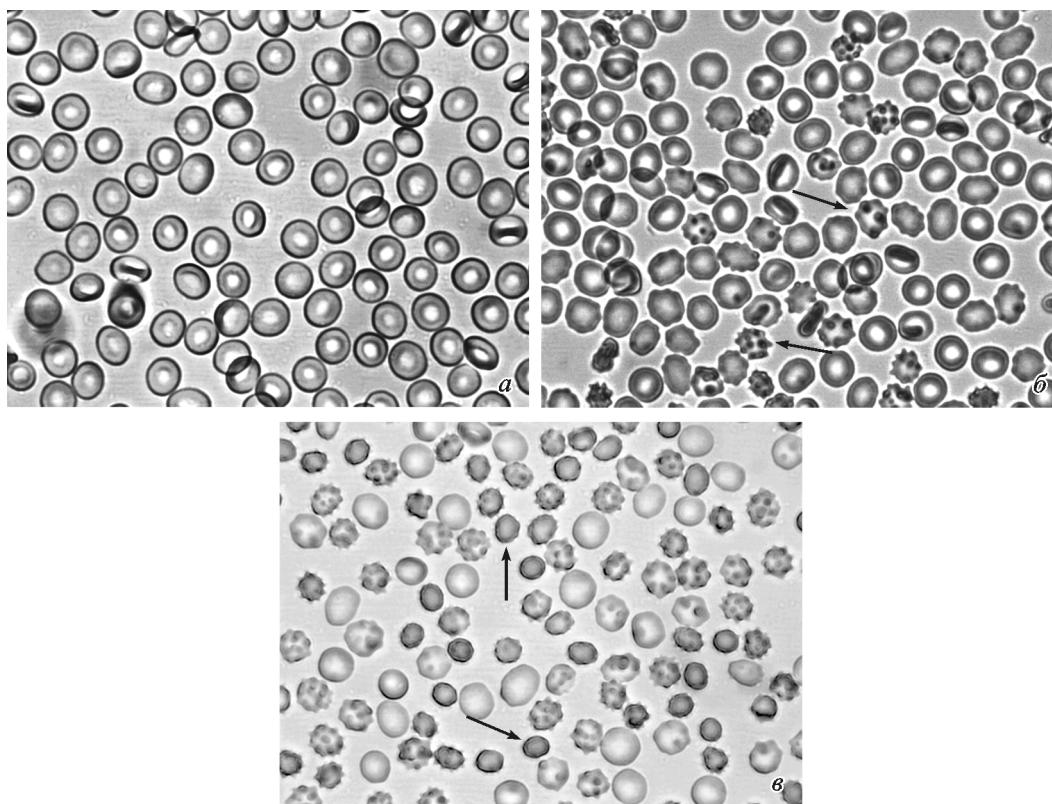


Рис. 1. Морфология эритроцитов до (а) и при хранении крови в течение 7 (б) и 14 (в) сут при 4 °С. Стрелками отмечены эхиноциты (б) и сфероциты (в). Фиксация глутаровым альдегидом. Об. 100×.

рез 40 с после начала процесса агрегации (мм);  $T_{1/2}$  — время, за которое достигается 1/2 Ма (с).

Морфологию агрегатов эритроцитов изучали предложенным нами методом (Шереметьев и др., 2014а). Для этого плазму крови смешивали с эритроцитами в соотношении 2 : 1. Каплю полученной смеси помещали на предметное стекло, перемешивали и опускали в нее объектив (100×). Для достижения фокуса объекта добавляли небольшое количество плазмы крови. Морфологию агрегатов и форму эритроцитов изучали с помощью светового микроскопа (Primo Star, Carl Zeiss, Германия), оснащенного мегапиксельной цифровой телевизионной камерой цветного изображения. Для изучения формы эритроциты фиксировали в 0.25%-ном растворе глутарового альдегида, приготовленного на фосфатном буфере (10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150 mM NaCl, pH 7.4).

Содержание АТФ в эритроцитах определяли люциферин-люциферазным методом с использованием набора реактивов для определения АТФ (Люмтек, Россия). Интенсивность люминесценции регистрировали на хемилюминометре Lum-5773 (ДИСофт, Россия).

Результаты исследования обработаны методами непараметрической статистики с применением критерия парных сравнений Вилкоксона.

## Результаты и обсуждение

Как показали исследования, через 7 сут хранения крови в эритроцитах снижалось содержание АТФ в среднем на 60 % (с  $556.55 \pm 72.66$  до  $223.48 \pm 15.52$  мкмоль/л,

$p < 0.05$ ) и на 85 % через 14 сут хранения (до  $80.79 \pm 10.02$  мкмоль/л,  $p < 0.05$ ).

Кроме того, отмечали изменение формы эритроцитов: уменьшилось количество дискоцитов, появилось около 20 % эхиноцитов и небольшое количество сфероэхиноцитов и сфероцитов (рис. 1, б). На 14-е сут количество эхиноцитов увеличивается до 40 %, а общее количество сфероэхиноцитов и сфероцитов — до 20 % (рис. 1, в).

При изучении процесса агрегации эритроцитов хранящейся крови фотометрическим методом наблюдали уменьшение максимальной амплитуды агрегатограммы, скорости агрегации и увеличение  $T_{1/2}$  (см. таблицу). Это свидетельствует о значительном снижении количества и размера агрегатов в форме «монетных столбиков» через 7 и 14 сут хранения.

Кроме того, на рис. 2, б видно, что в «монетных столбиках» эхиноциты отсутствуют. В то же время наблюдается выраженная агрегация эхиноцитов как через 7, так и через 14 сут хранения крови. Ранее мы наблюдали такую агрегацию эхиноцитов после помещения эритроцитов в плазму с высоким содержанием биоактивного липида лизофосфатидной кислоты (Шереметьев и др., 2014а).

Известно, что при длительном хранении крови или эритроцитарной массы в плазме накапливаются биоактивные липиды, которые могут приводить к эхиноцитозу (Silliman et al., 2011; Vlaar et al., 2011; Nagura et al., 2013). Поэтому мы провели специальные исследования, в которых изучили влияние плазмы крови, хранящейся в течение 14 сут, на свежие эритроциты. Мы также изучили влияние свежей плазмы на эритроциты крови, которая хранилась в течение 14 сут.

## Агрегация эритроцитов в аутологичной плазме при хранении цельной крови

Показатели агрегации	Сроки хранения при 4 °С, сут		
	0	7	14
Ma, мм	113.64 ± 1.68	95.64 ± 5.49 <sup>a</sup>	64.55 ± 5.45 <sup>a</sup>
A <sub>40</sub> , мм	74.00 ± 2.51	56.83 ± 6.12 <sup>a</sup>	30.96 ± 4.22 <sup>a</sup>
T <sub>1/2</sub> , с	20.00 ± 2.05	33.67 ± 4.35 <sup>a</sup>	50.67 ± 6.82 <sup>a</sup>

Примечание. <sup>a</sup> $p < 0.05$  — сравнение с показателями крови, хранящейся меньше 1 сут. Критерий Вилкоксона.

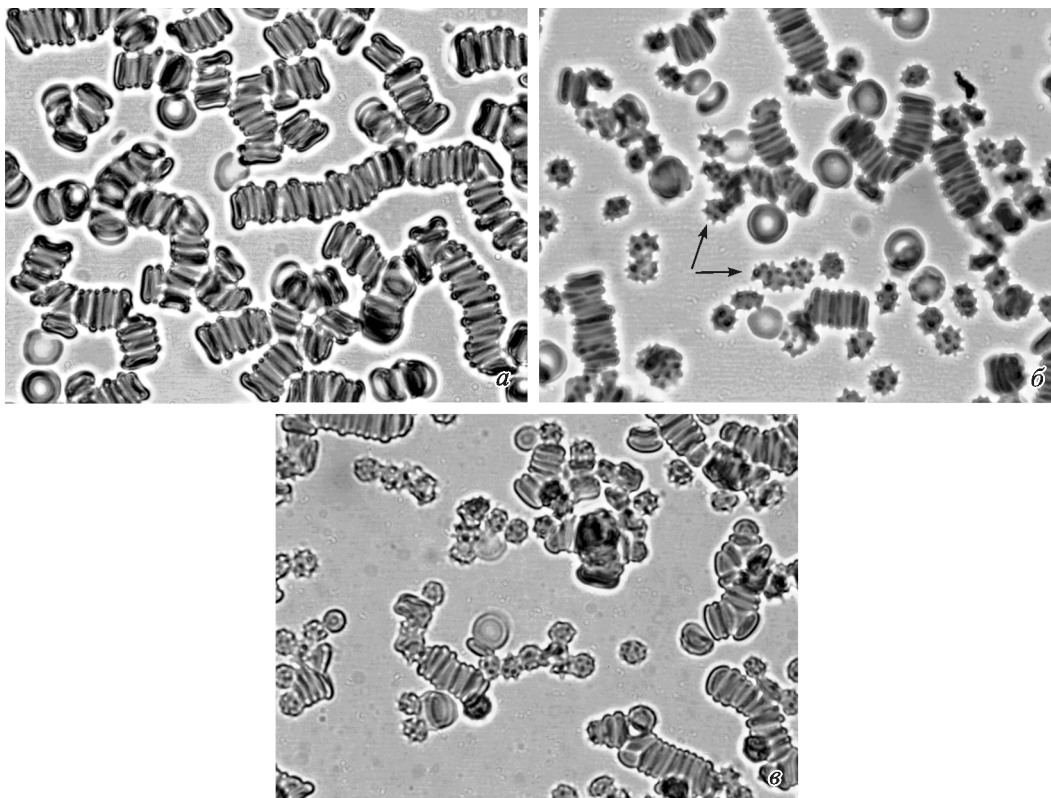


Рис. 2. Агрегация эритроцитов в аутологичной плазме до (а) и при хранении крови в течение 7 (б) и 14 (в) сут при 4 °С. Стрелками отмечены агрегаты эхиноцитов. Об. 100×.

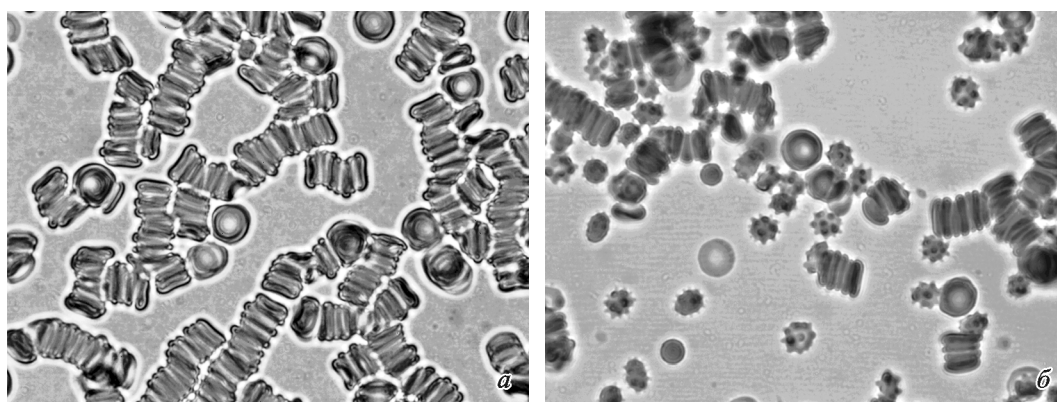


Рис. 3. Агрегация свежих эритроцитов в аутологичной плазме крови, хранящейся в течение 14 сут при 4 °С (а), и агрегация эритроцитов крови, хранящейся в течение 14 сут при 4 °С после добавления свежей плазмы (б). Об. 100×.

Добавление плазмы крови, хранящейся в течение 14 сут, к свежим эритроцитам показало, что она не вызывает образования эхиноцитов, а морфологическая картина агрегатов не отличается от таковой для нормальных клеток (рис. 3, а). Добавление свежей плазмы к эритроцитам крови, хранящейся в течение 14 сут, не восстанавливало дисковидную форму эхиноцитов. На рис. 3, б видно, что в свежей плазме крови эхиноциты также взаимодействуют между собой. Полученные результаты позволяют предположить, что образование эхиноцитов не связано с изменениями, происходящими в плазме в процессе хранения крови, а обусловлено, по-видимому, падением в клетках содержания АТФ.

Проведенные исследования показали, что у метаболически истощенных эритроцитов снижено количество агрегатов в виде «монетных столбиков». В то же время нами обнаружена агрегация эритроцитов, состоящая из эхиноцитов хранящейся крови.

Механизмы формирования «монетных столбиков» из эритроцитов и образования агрегатов, состоящих из эхиноцитов, во многом остаются неясными, хотя за последнее десятилетие их изучению посвящены многочисленные исследования (Ramplung et al., 2004; Barshtein et al., 2007; Baskurt, Meiselman, 2013). В первую очередь это относится к изучению агрегации эритроцитов в форме «монетных столбиков» (Baskurt et al., 2012; Wagner et al., 2013).

Существуют две модели, объясняющие механизм агрегации эритроцитов, состоящих из «монетных столбиков»: «мостиковая» (Chien, Jan, 1973) и «истощенного слоя» (Neu, Meiselman, 2002). Однако ни одна из этих моделей до сих пор не является общепризнанной.

Ранее нами была выдвинута гипотеза о механизме агрегации эритроцитов в виде «монетных столбиков», основанная на изменении спонтанной кривизны мембран эритроцитов (Шереметьев и др., 2014а). Согласно этой гипотезе, образование отрицательной кривизны мембран эритроцитов приводит к появлению стоматоцитоподобных эритроцитов с последующим объединением их в «монетные столбики». Предполагается, что фибриноген и  $\alpha_2$ -макроглобулин индуцируют образование отрицательной кривизны мембран эритроцитов. Показано, что  $\alpha_2$ -макроглобулин является более сильным агрегантом, чем фибриноген (Kirschkamp et al., 2008). Недавно нами показано, что аутологичная сыворотка крови индуцирует достаточно сильную агрегацию эритроцитов (Sheremet'ev et al., 2013). По-видимому, в отсутствие фибриногена возникновение агрегации в аутологичной сыворотке связано с  $\alpha_2$ -макроглобулином. Важным моментом в образовании «монетных столбиков» является нормальная форма эритроцитов. Эритроциты должны иметь двояковогнутую дисковидную форму. Изменения в спонтанной кривизне мембран эритроцитов, определяющей форму клеток, будут приводить к усилению или снижению их агрегационной способности. Снижение агрегации эритроцитов хранящейся крови в форме «монетных столбиков» связано с образованием эхиноцитов. По-видимому, фибриноген и  $\alpha_2$ -макроглобулин не могут индуцировать отрицательную кривизну мембран в эритроцитах эхиноцитарной формы и вследствие этого образование «монетных столбиков». Предполагается также, что изменение спонтанной кривизны мембраны может приводить к изменению ее связывающей способности к белкам плазмы.

Исходя из полученных данных и сведений, имеющих в литературе, можно предположить и возможный

механизм возникновения агрегации метаболически истощенных эритроцитов эхиноцитарной формы. Известно, что в процессе образования эхиноцитов на мембранах эритроцитов происходит перераспределение поверхностного отрицательного заряда. Это показано для эхиноцитов после понижения в эритроцитах уровня АТФ (Marikovsky et al., 1985). В результате перераспределения заряда на мембранах эритроцитов образуются дискретные области с сильным отрицательным зарядом. Известно также, что в результате снижения уровня pH в эритроцитах на их мембранах образуется избыточный положительный заряд (Head, Seaman, 1960). Ранее нами показано, что для агрегации эхиноцитов требуется не только изменение формы эритроцитов, но и низкое значение pH (Шереметьев и др., 2005). Нами также установлено, что образование истощенных по АТФ эхиноцитов в среде, не содержащей кальция, не приводит к агрегации эхиноцитов в аутологичной плазме (Шереметьев и др., 2014б).

Механизм агрегации эхиноцитов хранящейся крови в аутологичной плазме, вероятно, сходен с механизмом агрегации эхиноцитов после обработки эритроцитов лизофосфатидной кислотой (Шереметьев и др., 2014а). В результате снижения содержания АТФ в эритроцитах хранящейся крови происходит увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . Уменьшение АТФ и увеличение содержания кальция в эритроцитах приводят к образованию эхиноцитов и снижению уровня внутриклеточного pH (Nguyen, 2010). В связи с этим на мембранах эритроцитов образуются дискретные области (кластеры) с сильными отрицательными и положительными зарядами. Электростатическое взаимодействие эхиноцитов приводит к их агрегации.

Таким образом, проведенные исследования показали, что в процессе хранения крови происходит изменение формы эритроцитов из дискоцитов в эхиноциты и сфероциты. У метаболически истощенных эритроцитов снижено количество агрегатов в виде «монетных столбиков». В то же время нами обнаружена агрегация эритроцитов, состоящая из эхиноцитов хранящейся крови. Это необходимо учитывать при хранении цельной крови и эритроцитарной массы.

## Список литературы

- Шереметьев Ю. А., Поповичева А. Н., Егорихина М. Н., Левин Г. Я. 2013. Изучение взаимосвязи между изменением формы и агрегацией эритроцитов человека. Биофизика. 58 (2) : 264—268. (Sheremet'ev Yu. A., Popovicheva A. N., Egorihina M. N., Levin G. Ya. 2013. Study of the relationship between shape and aggregation change in human erythrocytes. Biophysics. 58 (2) : 193—196.)
- Шереметьев Ю. А., Поповичева А. Н., Левин Г. Я. 2014а. Лизофосфатидная кислота и агрегация эритроцитов человека. Цитология. 56 (1) : 84—88. (Sheremet'ev Yu. A., Popovicheva A. N., Levin G. Ya. 2014a. Lysophosphatidic acid and human erythrocyte aggregation. Cell Tissue Biol. 8 (3) : 237—243.)
- Шереметьев Ю. А., Поповичева А. Н., Рогозин М. М., Левин Г. Я. 2014б. Влияние аденозина на форму, морфологию агрегатов и агрегационную способность эритроцитов человека, истощенных по АТФ. Биофизика. 59 (3) : 488—491. (Sheremet'ev Yu. A., Popovicheva A. N., Rogozin M. M., Levin G. Ya. 2014b. Effect of adenosine on the shape, aggregates morphology and aggregability of ATP-depleted erythrocytes. Biophysics. 59 (3) : 399—401.)
- Шереметьев Ю. А., Шереметьева А. В., Леднев А. В. 2005. Изучение агрегации эритроцитов человека, индуцированной пикриновой кислотой. Биофизика. 50 (5) : 901—902. (Shere-

- met'ev Yu. A., Sheremet'eva A. V., Lednev A. V. 2005. A study of the aggregation of human erythrocytes induced by picric acid. *Biophysics*. 50 (5) : 784—785.)
- Barshtein G., Ben-Ami R., Yedgar S. 2007. Role of red blood cell flow behavior in hemodynamics and hemostasis. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 5 : 743—752.
- Baskurt O. K., Meiselman H. J. 1997. Cellular determinants of low-shear blood viscosity. *Biorheology*. 34 : 235—247.
- Baskurt O. K., Meiselman H. J. 2013. Erythrocyte aggregation: basic aspects and clinical importance. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 53 : 23—37.
- Baskurt O. K., Neu B., Meiselman H. J. 2012. Red blood cell aggregation. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. 304 p.
- Berezina T. L., Zaets S. B., Morgan C., Spillert C. R., Kamiyama M., Spolarics Z., Deitch E. A., Machiedo G. W. 2002. Influence of storage on red blood cell rheological properties. *J. Surg. Res.* 102 : 6—12.
- Blasi B., D'Alessandro A., Ramundo N., Zolla L. 2012. Red blood cell storage and cell morphology. *Transfus. Med.* 22 : 90—96.
- Chien S., Jan K. M. 1973. Red cell aggregation by macromolecules: roles of surface adsorption and electrostatic repulsion. *J. Supramol. Struct.* 1 : 385—409.
- Heard D. H., Seaman G. V. F. 1960. The influence of pH and ionic strength on the electrokinetic stability of the human erythrocyte membrane. *J. Gen. Physiol.* 43 : 635—654.
- Hess J. R. 2014. Measures of stored red blood cell quality. *Vox Sang.* 107 : 1—9.
- Hovav T., Yedgar S., Manny N., Barshtein G. 1999. Alteration of red cell aggregability and shape during blood storage. *Transfusion*. 39 : 277—281.
- Karger R., Lukow C., Kretschmer V. 2012. Deformability of red blood cells and correlation with ATP content during storage as leukocyte-depleted whole blood. *Transfus. Med.* 39 : 277—282.
- Karon B. S., van Buskirk C. M., Jaben E. A., Hoyer J. D., Thomas D. D. 2012. Temporal sequence of major biochemical events during blood bank storage of packed red blood cells. *Blood Transfus.* 10 : 453—461.
- Kirschkamp T., Schmid-Schonbein H., Weinberger A., Smeets R. 2008. Effects of fibrinogen and  $\alpha_2$ -macroglobulin and their apheretic elimination on general blood rheology and rheological characteristics of red blood cell aggregates. *Therapeutic. Apheresis and Dialysis*. 12 : 360—367.
- Kooijman E. E., Chupin V., Fuller N. L., Koslov M. M., de Kruijff B., Burger K. N., Rand P. R. 2005. Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Biochemistry*. 44 : 2097—2102.
- Lim H.-J., Nam J.-H., Lee B.-K., Suh J.-S., Shin S. 2011. Alteration of red blood cell aggregation during blood storage. *Korea-Australia Rheol. J.* 23 : 67—70.
- Marikovskiy Y., Weinstein R. S., Skutelsky E., Danon D. 1985. Changes of cell shape and surface charge topography in ATP-depleted human red blood cell. *Mech. Ageing and Develop.* 29 : 309—316.
- Nagura Y., Tsuno N. H., Ohkawa R., Nojiri T., Tokuhara Y., Matsuhashi M., Yatomi Y., Takahashi K. 2013. Inhibition of lysophosphatidic acid increase by prestorage whole blood leukoreduction in autologous CPDA-1 whole blood. *Transfusion*. 53 : 3139—3148.
- Neu B., Meiselman H. J. 2002. Depletion-mediated red blood cell aggregation in polymer solutions. *Biophys. J.* 83 : 2482—2490.
- Nguyen D. B. 2010. Phosphatidylserine exposure in red blood cells: a suggestion for the active role of red blood cells in blood clot formation. Dissertation. Saarbrücken. 144 p.
- Rampling M. W., Meiselman H. J., Neu B., Baskurt O. K. 2004. Influence of cell-specific factors on red blood cell aggregation. *Biorheology*. 41 : 91—112.
- Reinhart W. H., Schulzki T. 2011. Metabolic depletion decreases the aggregability of erythrocytes. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 49 : 451—461.
- Reinhart S. A., Schulzki T., Bonetti P. O., Reinhart W. H. 2014. Studies on metabolically depleted erythrocytes. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 56 : 161—173.
- Relevy H., Koshkaryev A., Manny N., Yedgar S., Barshtein G. 2008. Blood banking-induced alteration of red blood cell flow properties. *Transfusion*. 48 : 136—146.
- Schmid-Schonbein H., von Gosen J., Heinich L., Klose H. J., Volger E. 1973. A counter-rotating «rheoscope chamber» for study of the microrheology of blood cell aggregation by microscopic observation and microphotometry. *Microvasc. Res.* 6 : 366—376.
- Sheremet'ev Y. A., Popovicheva A. N., Levin G. Ya. 2013. Effects of storage duration and temperature of human plasma and serum on red blood cell aggregation and shape. *Open J. Biophys.* 3 : 212—216.
- Silliman C. C., Moore E. E., Kelher M. R., Khan S. Y., Gellar L., Elzi D. J. 2011. Identification of lipids that accumulate during the routine storage of prestorage leukoreduced red blood cells and cause acute lung injury. *Transfusion*. 51 : 2549—2554.
- Vlaar A. P. J., Kulik W., Nieuwlan R., Peters C. P., Tool A. T. J., van Bruggen R., Juffermans N. P., de Korte D. 2011. Accumulation of bioactive lipids during storage of blood products is not cell but plasma derived and temperature dependent. *Transfusion*. 51 : 2358—2366.
- Wagner C., Steffen P., Svetina S. 2013. Aggregation of red blood cells: from rouleaux to clot formation. *Comptes Rendus Physique*. 14 : 459—469.

Поступила 12 VI 2015

#### AGGREGATION OF METABOLICALLY DEPLETED HUMAN ERYTHROCYTES

Yu. A. Sheremet'ev,<sup>1</sup> A. N. Popovicheva, M. M. Rogozin, G. Ya. Levin

Privolzhsky Federal Research Medical Centre, Ministry of Health of Russia, Nizhny Novgorod, 603155;

<sup>1</sup> e-mail: ya.sher@rambler.ru

An aggregation of erythrocytes in autologous plasma after blood storage for 14 days at 4 °C was studied using photometry and light microscopy. The decrease of ATP content, the formation of echinocytes and spherocytes, the decrease of rouleaux form of erythrocyte aggregation were observed during the storage. On the other hand the aggregates of echinocytes were formed in the stored blood. The addition of plasma from the fresh blood didn't restore the normal discocytic shape and aggregation of erythrocytes in the stored blood. The possible mechanisms of erythrocytes and echinocytes aggregation are discussed.

**Key words:** erythrocytes, aggregation, aggregate morphology, autologous plasma, rouleaux, echinocytes, blood storage.