

А.А. Гайдаш<sup>1</sup>, В.Н. Цыган<sup>1</sup>, Е.В. Ивченко<sup>1</sup>,  
В.В. Левичев<sup>2</sup>, В.В. Лесничий<sup>1</sup>, В.Н. Вильянинов<sup>1</sup>,  
В.С. Иванов<sup>1</sup>, Э.М. Мавренков<sup>1</sup>

## Источники неиммунных рисков, обусловленных действием технологических факторов криоконсервации на структуру эритроцитов

<sup>1</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург

**Резюме.** При замерзании вода, являющаяся главным структурообразующим фактором клеток, испытывает фазовые переходы, сопровождающиеся изменением ее физических и механических свойств. Эти изменения оказывают влияние на тонкую структуру, поверхностные и водообменные характеристики эритроцитов. Атомно-силовая микроскопия в сочетании с эритроцитометрией уточняют источники рисков, вызванных действием низких температур на структуру эритроцитов. Общие источники рисков обусловлены сжатием, увеличением проницаемости, истончением и деструкцией мембран. Содержание рисков зависит от режима замораживания. Эритроциты, замороженные при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ , испытывают гидродинамический удар, вследствие чего деформируются и открывают поры. Это ускоряет трансмембранный массообмен, но увеличивает риски «оводнения» клетки, потери вещества и гибели эритроцитов путем пироптоза. Кроме того, использование высоких концентраций глицерина требует оптимизации технологии освобождения эритроцитных взвесей от остаточного глицерина. Установлено, что в эритроцитах, подвергнутых глубокому замораживанию и длительно хранившихся в парах жидкого азота, развивается нестабильность цитоплазматических мембран. Мембраны перфорированы мелкими порами, задерживающими воду и детрит. Это снижает интенсивность трансмембранного массообмена и повышает адгезивность клеток. Соответственно, при глубоком замораживании риски обусловлены ухудшением кислородтранспортной функции и агрегацией эритроцитов.

**Ключевые слова:** атомно-силовая микроскопия, эритроциты, цитоплазматические мембраны, кислородтранспортная функция, низкие температуры, вода, замораживание, глицерин, криоконсервация в парах жидкого азота.

**Введение.** Среди технологических факторов криоконсервации замораживание является ключевым. При этом действие низких температур на структуру эритроцитов остается во многом неясным. Это увеличивает неопределенность в прогнозировании рисков, возникающих при переливании декриоконсервированных эритроцитосодержащих гемоконпонентов. Менее всех определены источники неиммунных рисков. Вместе с тем, очевидно, что при замерзании вода, являющаяся главным структурообразующим фактором клеток, испытывает фазовые переходы, сопровождающиеся изменением ее физических и механических свойств. Эти изменения не могут не влиять на тонкую структуру, поверхностные и водообменные характеристики эритроцитов. Исследование этих явлений требует разработки методологического подхода (скрининга), позволяющего в едином континууме оценивать параметры размеров и форм клеток, структуру и состояние мембранных пор, турбулентность гидродинамических течений, рельеф и адгезивность поверхностей, агрегируемость и подвижность частиц. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) визуализирует микро- и наноструктуры, а локальная адгезиометрия позволяет уточнить реологические свойства точно позиционированных объектов [2, 3].

**Цель исследования.** Выявление неиммунных рисков, обусловленных действием низких температур на структуру эритроцитов, с помощью современных морфофункциональных методик, основанных на атомно-силовой микроскопии.

**Материалы и методы.** Изучены эритроциты в мазках, нанесённых на покровные стекла и фиксированных на воздухе. Данный способ пробоподготовки приемлем для проведения морфометрических и микромеханических исследований [5, 7]. Мазки готовили из образцов эритроцитной массы (ЭМ) с удаленным лейкоцитомбоцитарным слоем (ЛТС). В зависимости от источников получения крови материал распределен на следующие группы: 1-я группа (контрольная) – мазки из капиллярной крови; 2-я группа – мазки из ЭМ, замороженной при  $-80^{\circ}\text{C}$  в контейнерах «Baxter» с концентрацией глицерина 40%; 3-я группа – мазки из ЭМ, замороженных при  $-196^{\circ}\text{C}$  (в парах жидкого азота) в контейнерах DF-700 – «Гемофриз» с концентрацией глицерина 20%. В замороженном состоянии образцы ЭМ хранились от 2 до 20 лет. Каждая группа составлена из образцов крови от 10 доноров. АСМ, включая адгезиометрию, выполняли в полуконтактном

режиме кремниевым кантилевером CSG10 с радиусом закругления 10 нм при латеральном разрешении 0,24 нм на платформе зондовой нанолaborатории «Ntegra Prima» («NT-MDT», Россия). Анализ изображений и морфометрию выполнили в редакторе Imaging [1]. Достоверность межгрупповых различий оценивали по *tst* критерию Стьюдента. Значимыми считались различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** По данным морфометрических исследований, линейные размеры эритроцитов, подвергнутых замораживанию, проявляли разнонаправленные тенденции. По длинным осям эритроциты сжимались тем больше, чем глубже было замораживание (табл.). Сжатие, более выраженное при замораживании в парах жидкого азота, осложнялось уплотнением, стягиванием и расслоением клеточных мембран. На АСМ-сканах уплотнения имеют вид мозаично расположенных очагов размерами до 300 нм, выстоящих над поверхностью и лишенных нанопор. Уплотнение, возможно, обусловлено золь-гель переходами в липопротеиновой структуре мембран. Стягивание и расслоение выявляются в поверхностных слоях мембран, преимущественно вблизи пор, концентрирующих напряжение, энергия которого, по видимому, расходуется на межпластовые смещения. В результате слои расползаются, собираются в складки, обнажая подлежащую цитолемму. Увеличение высоты в большей мере наблюдается в эритроцитах, замороженных при  $-80^{\circ}\text{C}$ . На фоне сжатия рост высоты компенсирует потерю объема, и эритроциты принимают

сферическую форму – форм-фактор близок к единице (см. табл.).

В эритроцитах контрольной группы соотношение высот в периферических и центральных участках колеблется в пределах 2:1. Это значит, что стенка в области центральной ямки способна вогнуться примерно до середины диска. Такая подвижность свидетельствует о высоких пластических возможностях цитоскелета, позволяющих стенкам дискоцитов максимально сближаться. Очевидно, что в норме цитолемма достаточно эластична и способна к обратимой деформации (сворачивание – разворачивание нитей спектрина) при прохождении эритроцитов через капилляры. В криоконсервированных эритроцитах центральная область монотонно поднимается, глубина ямок уменьшается (см. табл.). Это значит, что вследствие замораживания цитоскелет подвергается пластической деформации и спектриновые нити утрачивают способность к энергозависимому сворачиванию. На профилограммах криоконсервированные эритроциты имеют выпуклый, а морфологически – набухший вид. В выпуклой части поверхность шероховата, эрозирована. На АСМ эрозии имеют вид полиморфных дефектов диаметром 1–1,5 мкм, дно которых заполнено детритом. Края эрозий рваные, приподняты, вывернуты. Это признаки действия мощного концентрационного градиента, направленного изнутри наружу, под действием которого внутриклеточная вода и связанные с ней соли стремятся наружу, а внутриклеточные структуры подвергаются деформации и деструкции. Морфологически это схоже с пироптозом – разновидностью апоптоза, в терминальной стадии которого открываются мембранные поры, и из гибнущих эритроцитов как бы «выплескивается» внутриклеточный гемоглобин.

Анализ форм распределения диаметров эритроцитов имеет принципиальное значение. В контрольной группе гистограмма мономодальная, значения достигаются плавно через промежуточные классы. Гистограммы криоконсервированных эритроцитов, наоборот, полимодальные. При этом в гистограмме эритроцитов замороженных при  $-80^{\circ}\text{C}$  существенно уменьшены объемы первого и второго размерных классов (рис.). В итоге левое крыло гистограммы поднимается быстро, значения как бы «проскакивают» через предшествующие малоразмерные классы. Это отражает скачкообразный рост объемов и означает, что диполи воды со связанными с ней солями поступают в клетки стремительно. В такой ситуации эритроциты могут испытывать гидродинамический удар («оводнение»). На это указывает и волнообразная форма правого крыла гистограммы, свидетельствующая о колебательном механизме разгрузки. И, как мы полагаем, является статистическим проявлением остаточного напряжения упруго среагировавших клеточных мембран и цитоскелета.

Скорость трансмембранной миграции и темпы заполнения цитоплазмы водой в значительной мере определяются структурой пор. При АСМ-сканировании в мембранах выявляются щелевидные поровые струк-

Таблица

**Морфометрические показатели и значения адгезионных сил эритроцитов, подвергнутых криоконсервации,  $M \pm m$**

Параметр	Группа		
	1	2	3
Диаметр дисков, мкм	11,1±0,1	10,6±0,1	9,1±0,1*
Высота дисков, нм	462,5±25,7	551,5±28,5*	497,5±27,2*, **
Глубина центральных ямок, нм	234,5±15,6	556,7±27,0*	521,1±22,3*
Форм-фактор, отн. ед.	0,82±0,02	0,85±0,01	0,91±0,01*
Диаметр пор, нм	208,9±11,2	132,1±7,8*	104,7±5,7*, **
Глубина пор, нм	110,1±8,1	57,7±3,6*	44,1±3,2*, **
Удельная площадь поверхности пор, $\text{мкм}^3/\text{мкм}^2$	29,9±0,7	65,2±1,7*	70,1±2,1*
Относительный объем пор, %	10,6±0,5	15,2±0,6*	14,6±0,6*
Доля сложных агрегатов, %	55,1±2,1	27,5±1,2*	81,1±3,5*, **
Адгезионные силы, нН	46,4±1,1	40,3±1,1	58,2±1,5*, **

**Примечание:** \* – различия относительно контрольной группы; \*\* – относительно 2-й группы,  $p < 0,05$ .

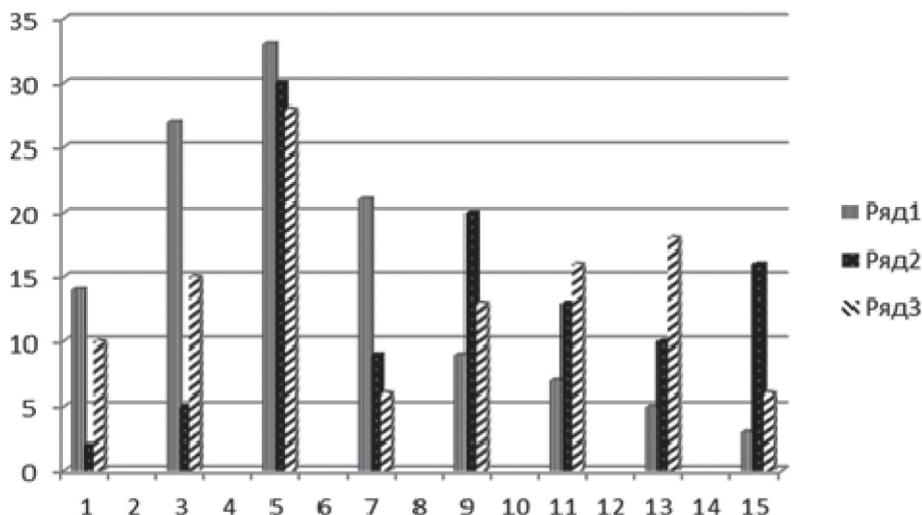


Рис. Гистограммы распределений эритроцитов по диаметрам. Ряд 1 – контроль. Ряд 2 – эритроциты, замороженные при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ряд 3 – эритроциты, замороженные в парах жидкого азота

туры, расположенные между гранулами. По существу, это – межгранулярное пространство, сообщающееся с более крупными сквозными порами. Сквозные поры имеют воронкообразный наружный вход и в виде наноканалов уходят вглубь. Края воронок окаймлены сегрегированными частицами. Размеры наноканалов достигают 150–250 нм. В эритроцитах контрольной группы выявляются три вида пор. Первый – сквозные поры со свободным входом, диаметр которых не превышает 25–50 нм. Второй – поры диаметром до 100 нм, вход в которые частично прикрыт диафрагмой, образованной 1–3 лепестками цитолеммы. Третий вид – наиболее крупные поры (диаметром до 250 нм), вход в которые полностью перекрыт перфорированной диафрагмой.

В эритроцитах, прошедших технологические циклы криоконсервации, уменьшаются диаметры и глубина пор. Сокращение диаметров обусловлено сжатием, а уменьшение глубины – истончением стенок. Показатели удельных площадей поверхностей и относительных объемов пор достоверно выше, чем в контроле (см. табл.), что свидетельствует об увеличении порозности мембран. При замораживании до  $-80^{\circ}\text{C}$  поры шире и глубже, чем при замораживании в парах жидкого азота. При равенстве относительных объемов численная плотность пор будет там меньше, где поры крупнее. Именно это и выявлено в эритроцитах, замороженных при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Здесь поры крупнее и, следовательно, численная плотность будет меньше. Уменьшение численной плотности пор обусловлено неравномерным сжатием и стягиванием цитоплазматических мембран. В области сжатия ультратонкие щели межгранулярных пространств будут спадаться. И поскольку межгранулярные пространства занимают большую часть площади мембран, энергии возникающего напряжения, по-видимому, оказывается достаточно, чтобы растянуть плотные стенки наноканалов. Несмотря на то, что возникающая

нестабильность размеров пор термодинамически менее выгодна, она упорядочивает, делает более предсказуемым трансмембранный массообмен. Не менее важны форма и рельеф поверхности стенок пор. На профилограммах эритроцитов, замороженных при  $-80^{\circ}\text{C}$ , поры аппроксимируются преимущественно к усеченным конусам с относительно гладким рельефом стенок. А поры эритроцитов, замороженных в парах жидкого азота, – к остроконечным конусам с шероховатой текстурой стенок. Это и определяют скорость и структуру трансмембранной миграции воды. В эритроцитах, замороженных при  $-80^{\circ}\text{C}$ , скорость гидродинамических течений будет выше, и они будут менее турбулированными, так как вода проникает вглубь клеток по более крупным и гладкостенным каналам. Стремительному продвижению воды способствует и относительная гидрофобность поверхностей. Увеличение гидрофобности (оцененное по падению показателя адгезивности) означает появление дополнительных сил, стабилизирующих билипидные слои цитоплазматических мембран. Эффект усиливается при добавлении криофилактиков, что, собственно, и преследуется при глицеринизации. Глицерин нарушает структуру воды, молекулы которой расходуются на образование клатратных решеток, окружающих молекулы криопротектора. Ясно, что чем больше концентрация глицерина, тем больше свяжется воды, тем более гидрофобизируются поверхности. С учетом этого становится понятным относительно большая гидрофобность поверхностей эритроцитов, при замораживании которых используются высокие концентрации глицерина (40%). При замораживании в парах жидкого азота глицерин используется в меньших концентрациях (20%). Значит, вероятность попадания его молекул в нанопоры будет ниже, и вода начнет задерживаться. Соответственно этому повысились и показатели адгезивности в эритроцитах 3-й группы (см. табл.). Известно, что в ультратонких

каналах с гидрофильными стенками, вода более вязкая в сравнении с гидрофобными каналами [4, 6]. Это значит, что при глубоком замораживании вода в порах более вязкая. Малые размеры, сложный рельеф поверхности пор, а также повышенная вязкость снижают скорость и турбулируют гидродинамические потоки. Вода в таких порах более прочно удерживается, застаивается, превращается в вязкую жидкость, которая в смеси с частицами детрита тромбирует пористые структуры. Повышенная липкость поверхности, конечно же, осложняется агрегированием эритроцитов с формированием разветвленных многосоставных агглютинатов.

**Заключение.** Эритроциты, прошедшие технологические циклы криоконсервации, подвержены структурным преобразованиям, обусловленным нестабильностью цитоплазматических мембран. Морфологически это проявляется в виде сжатия (пикноз), повышения порозности, истончения и деструкции поверхностных слоев клеточных стенок. Структурные сдвиги варьируют в зависимости от режима замораживания. Эритроциты, замороженные при  $-80^{\circ}\text{C}$ , испытывают гидродинамический удар, вследствие чего в мембранах развиваются сдвиговые деформации, сопровождаемые относительно широким раскрытием пор. Это интенсифицирует трансмембранный массообмен, но увеличивает риск, обусловленный «оводнением» эритроцитов, потерей солей и жидкости и гибелью клеток, возможно, путем пироптоза. Мембраны эритроцитов, замороженных при  $-196^{\circ}\text{C}$ , подвергаются мелкопористой трансформации, вследствие чего задерживают воду и обратимо деформируются (кренируются), приобретая вид шиповатых клеток, астроцитов, стоматоцитов и т.д. В результате снижается интенсивность трансмембранного массообмена

и повышается адгезивность клеток. Следовательно, при более глубоком замораживании риск обусловлен возможно более выраженной деградацией газотранспортной функции и повышением вязкости клеточной суспензии.

Таким образом, сравнительный анализ различных групп декриоконсервированных эритроцитов, основанный на атомно-силовой микроскопии и морфометрии, уточняет источники неиммунных рисков, возникающих при действии низких температур на структуру эритроцитов, в пользу методик консервирования клеток при умеренно низких температурах ( $-80^{\circ}\text{C}$ ).

### Литература

1. Скоркина, М.Ю. Методика оценки морфометрических параметров нативных клеток крови с использованием атомно-силовой микроскопии / М.Ю. Скоркина [и др.] // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 2010. – Т. 150. – № 8. – С. 238–240.
2. Bremmell, K.E. Deformation and nano-rheology of red blood cells: an AFM investigation / K.E. Bremmell, A. Evans, C.A. Prestidge // Colloids surf. B. Biointerfaces. – 2006. – № 50 (1). – С. 43–48.
3. Ebner, A. Normal and pathological erythrocytes studied by atomic force microscopy / A. Ebner, H. Schillers, P. Hinterdorfer // Methods mol. biol. – 2011. – № 736. – С. 223–241.
4. Goertz, M.P. Hydrophilicity and the viscosity of interfacial water / M.P. Goertz, J.E. Houston // Langmuir. – 2007. – № 23. – С. 5491–5497.
5. Gould, S.A. From atoms to integrated circuit chips, blood cells and bacteria with the atomic force microscope / S.A. Gould [et al.] // The journal of vacuum science and technology. – 1990. – № 8. – С. 369–373.
6. Li, T.-D. Structured and viscous water in subnanometer gaps / T.-D. Li, J. Gao, R. Szoszkiewicz // Phys. rev. – 2007. – № 75. – С. 115–115.
7. Wang, H. Preparation of cell membranes for high resolution imaging by AFM / H. Wang [et al.] // Ultramicroscopy. – 2010. – № 110 (4). – С. 305–312.

A.A. Gajdash, E.V. Ivchenko, V.N. Tsygan, V.V. Levichev, V.V. Lesnichij, V.N. Vilyaninov, V.S. Ivanov, E.M. Mavrenkov

### Sources not the immune risks caused by action of technology factors kryoconservation on structure erythrocytes

**Abstract.** When water freezes, which is the main structure-forming factor of cells that undergo phase transitions accompanied by a change in its physical and mechanical properties. These changes have an impact on fine structure, surface and water exchange characteristics erythrocytes. Atomic force microscopy in a combination with erythrocytometric, specify sources of the risks caused by action of low temperatures on structure erythrocytes. The general sources of risks are caused by compression, permeability increase, and reduction of a thickness and destruction of membranes. The maintenance of risks depends on a way of freezing. Red blood cells, frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ , test hydrodynamic blow owing to what are deformed and open a porous. It accelerates substance exchange through membranes, but increases risks of an endocellular hypostasis, substance and destruction loss erythrocytes by piroptosis. In addition, use of high concentration of glycerin demands optimization of technology of clearing suspensions of erythrocytes from residual glycerin. It is established, that in erythrocytes instability of cytoplasmic membranes develops. Membranes are punched by the small time, detaining water and detritus. It reduces intensity substance exchange through membranes, but raises adhesiveness of cages. Accordingly, at deep freezing risks, are caused by deterioration of transport of oxygen and agglutination erythrocytes.

**Key words:** atomic force microscopy, erythrocytes, cytoplasmic membranes, oxygen function, low temperatures, water, freezing, glycerin, kryoconservation in steams of liquid nitrogen.

Контактный телефон: (812) 329-71-18; e-mail: otel.npkir@mail.ru