

Однородная деформация нативных эритроцитов при их длительном хранении

Е. А. Манченко^{1,2}, Е. К. Козлова^{1,2}, В. А. Сергунова¹, А. М. Черныш^{1,2}

¹ НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ РР, Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

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

Homogeneous Deformation of Native Erythrocytes During Long-Term Storage

Ekaterina A. Manchenko^{1,2}, Elena K. Kozlova^{1,2}, Viktoriya A. Sergunova¹, Alexander M. Chernysh^{1,2}

¹ V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, 25 Petrovka Str., Bldg. 2, 107031 Moscow, Russia

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

Цель исследования — выявление биомеханических закономерностей глубокой деформации мембран нативных эритроцитов при длительном (до 32 суток) хранении эритроцитарной взвеси.

Материалы и методы. Методом решения указанной проблемы является атомно-силовая спектроскопия. Измеряли h_{Hz} — глубину, до которой процесс погружения зонда описывается взаимодействием с однородной средой. Получали эмпирические и теоретические зависимости силы взаимодействия F (nN) от глубины погружения зонда h ($нм$) — $F(h)$. Строили гистограммы плотности относительных частот модуля Юнга E .

Результаты. Модуль E менялся от $9,3 \pm 3,2$ кПа — для 3 суток хранения, до $22,7 \pm 8,7$ кПа — для 32 суток. Коэффициент асимметрии для 3 суток составил $0,52 \pm 0,04$, а для 32 суток — $0,82 \pm 0,09$. Величина h_{Hz} при этом оставалась постоянной.

Заключение. По мере хранения эритроцитарной взвеси мембраны эритроцитов до глубин 700 нм прогибались однородно, несмотря на то, что модуль Юнга возрастал в 2.4 раза.

Ключевые слова: эритроциты; жесткость мембраны; деформация; хранение крови; атомно-силовая спектроскопия

Purpose of the study — to evaluate biomechanical regularities of deep deformation of native erythrocytes' membranes during long-term (up to 32 days) storage of erythrocyte suspension.

Materials and methods. The method for addressing the said problem was atomic-force spectroscopy. The measured value was h_{Hz} comprizing the depth to which the probe immersion process was described by interaction with a homogeneous medium. Empirical and theoretical dependence of the interaction force F (nN) on the probe immersion depth h (nm) — $F(h)$ were obtained. Bar charts of relative frequency density of Young's modulus E were built.

Results. Modulus E changed from 9.3 ± 3.2 kPa — for 3 days of storage, to 22.7 ± 8.7 kPa — for 32 days. Coefficients of skewness were 0.52 ± 0.04 (for day 3) and 0.82 ± 0.09 (for day 32 d), h_{Hz} value remaining constant.

Conclusion. Progressively as erythrocyte suspension was stored, erythrocyte membranes to the depth of 700 nm deflected homogeneously in spite of 2.4-fold increase of Young's modulus.

Key words: erythrocytes; membrane stiffness; deformation; blood storage; atomic-force spectroscopy

DOI:10.15360/1813-9779-2019-5-4-10

Введение

При длительном хранении эритроцитов в гемоконсерванте (до 32 суток) меняются биохимические

Introduction

In case of long-term (up to 32 days) storage of erythrocytes in blood preservative, biochemical

Адресс для корреспонденции:

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

Correspondence to:

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

мические и биомеханические свойства этих клеток крови [1]. Каким образом меняется биомеханика и как при этом меняется эластичность мембран — это важная, но малоизученная тема. Особый интерес представляет глубокий прогиб мембран, соизмеримый с деформациями этих клеток в капиллярном русле.

Функциональное состояние эритроцитов во многом определяет биомеханические свойства их мембран и клетки в целом. Изменения механических характеристик клеток, например, снижение их деформируемости, то есть увеличение жесткости, может приводить к нарушениям капиллярного кровотока [2–5]. В ряде работ модуль Юнга определяют на глубинах погружения зонда на 10–50 нм [6]. Однако наибольший интерес представляет изучение закономерностей прогибов мембран внутрь клеток на глубины 0,5–1,8 микрон. Именно такие глубины соизмеримы с физиологическими деформациями эритроцитов [7]. Очевидно, что измерение деформаций эритроцитов необходимо проводить только на нативных клетках [7, 8], и полностью исключая применение фиксаторов [9, 10]. Если в эксперименте использовать сухие эритроциты, то результаты таких измерений будут «смещены», так как при высыхании мембраны существенно меняются ее механические свойства [11].

Ранее показано, что при длительном хранении эритроцитарной взвеси (до 32 суток при температуре 4°C) мембраны фильтрованных эритроцитов теряют эластичные свойства, а их жесткость возрастает [1, 5, 6, 12, 13]. Не ясно, меняется ли в этом случае способность мембран прогибаться на большие глубины и меняются ли при этом закономерности механического взаимодействия мембран. Поэтому изучение способности мембран нативных эритроцитов прогибаться на большие глубины представляет собой важную научную проблему.

Наиболее перспективным методом ее решения является атомно-силовая спектроскопия (АСС) [8–11, 14].

Цель работы — изучение биомеханических закономерностей глубокой деформации мембран нативных эритроцитов при длительном (до 32 суток) хранении эритроцитарной взвеси.

Материал и методы

Для проведения исследования использовали эритроцитарную взвесь (ЭВ) с разными группами крови, герметично запакованную с антикоагулянтом СРД (цитрат, фосфат, декстроза) и ресуспендирующим раствором SAGM (физиологический раствор, аденин, глюкоза, маннит). Донорскую кровь получали на станции переливания крови. В течение 32 дней эритроцитарную взвесь хранили при 4°C в

and biomechanical properties of blood cells undergo changes [1]. How biomechanics changes and how membrane elasticity changes in this instance is an important but poorly studied topic. Deep deflection of membranes commensurate with deformations of these cells in the capillary bed is of particular interest.

The functional condition of erythrocytes largely determines the biomechanical properties of their membranes and cell on the whole. Changes of mechanical patterns of cells, for example, lessening of their deformability, i.e. increase of stiffness, might lead to capillary blood flow disturbances [2–5]. In a number of papers, Young's modulus is determined at a probe immersion depth of 10–50 nm [6]. However, investigation of the regularities of membranes' deflection into cells to the depth of 0.5–1.8 microns is particularly interesting. These are the depths that are commensurate with physiological deformations of erythrocytes [7]. Measurement of erythrocytes' deformations should be evidently carried out on native cells only [7, 8], and completely excluding the employment of fixatives [9, 10]. If only dry erythrocytes are used in an experiment, the results of such measurements would be 'shifted' because when a membrane dries its mechanical properties alter cardinally [11].

It has been earlier shown that in case of long-term storage of erythrocyte suspension (up to 32 days at 4°C), membranes of filtered erythrocytes lose their elastic properties and their stiffness grows [1, 5, 6, 12, 13]. It is unclear whether the membrane's ability to deflect to greater depths changes and whether the regularities of mechanical interaction of membranes changes in such case. Therefore, determining the ability of native erythrocytes' membranes to deflect to greater depths is an urgent scientific problem. Atomic-force spectroscopy (AFS) is the most promising method to address this problem [8–11, 14].

Purpose: to study biomechanical regularities of deep deformation of native erythrocytes' membranes during a long-term (up to 32 days) storage of erythrocyte suspension.

Materials and Methods

To perform the study, erythrocyte suspensions (ES) of different blood specimens, which were tightly packed with anticoagulant CPD (citrate, phosphate, dextrose) and resuspending solution SAGM (saline, adenine, glucose, mannitol), were used. Donated blood samples were received at a blood transfusion center. The erythrocyte suspension was stored at 4°C pursuant to WHO guidelines [15] for 32 days.

On the day of experiment, a 200 µl specimen was sampled from each container without compromising its tightness. At first, 100 µl of blood was three times washed in phosphate-salt buffer, pH 7.4 (PBS Tablets, MP Biomedicals, USA) by centrifugation at 1500 rpm for 5 minutes to remove residual preservative solution. Thereafter,

соответствии с рекомендациям ВОЗ [15].

В день проведения опыта из каждого контейнера отбирали пробу 200 мкл, при этом его герметичность не нарушалась. Сначала 100 мкл крови трижды промывали в фосфатно-солевом буфере pH 7,4 (PBS Tablets MP Biomedicals, USA), центрифугируя при 1500 об. 5 минут, чтобы удалить остаток консервирующего раствора. Затем приготавливали суспензию эритроцитов. Для этого в 6 мл фосфатного буфера добавляли 30 мкл эритроцитов. 200 мкл полученной суспензии наносили на стекло, предварительно покрытое раствором полилизина (MP Biomedicals, France) [16]. Время адгезии эритроцитов на стекло с полилизинным покрытием составляло 30 минут. Полученный образец промывали в буфере pH 7,4 в течение 10 секунд и измеряли силовые кривые.

Оценку деформации нативных эритроцитов проводили с помощью атомного силового микроскопа (АСМ) NTEGRA Prima, (NT-MDT, Russian Federation). При работе в жидкости необходимо правильно подобрать параметры кантилевера с учетом биомеханических характеристик исследуемого объекта [7, 17–20]. Для измерения нативных эритроцитов использовали кантилеверы SD-R150-T3L450B-10 (Nanosensor, Switzerland) с радиусом зонда $R = 150$ нм, резонансной частотой 21 кГц, коэффициентом упругости кантилевера $K = 1$ Н/м.

В процессе подготовки к измерениям для каждого образца проводили калибровку кантилевера на стекле [8, 17, 18]. Для получения эмпирической силовой кривой $I(Z)$ задавали максимальную величину подъема пьезосканера $Z_{max} = 4000$ нм и величину тока фотодиода $I = 0,5$ нА. Время погружения зонда составляло $t = 5$ секунд, так как при более быстрых измерениях смещается оценка жесткости мембраны [20].

Для каждого пакета проводили сканирование поверхности мембран эритроцитов в поле 50×50 мкм² с помощью АСМ. Затем в режиме атомно-силовой спектроскопии действовали на клетки с заданной силой F и получали силовые кривые. На каждом образце измеряли по 100 нативных клеток. Для каждой эмпирической кривой $I(Z)$ производили переход к зависимости $F(h)$ для расчета модуля Юнга мембран эритроцитов [7, 9]. Всего в исследовании было проанализировано 4400 нативных клеток. Статистическая обработка полученных результатов была выполнена с помощью программы Origin Pro (Origin Lab Corporation, Northampton, Massachusetts, USA). Все данные представлены в виде: среднее ± стандартное отклонение.

Результаты и обсуждение

Деформируемость эритроцитов определяли по способности их мембран прогибаться внутрь клетки под действием приложенной силы. Сила в эксперименте оценивалась по кривым:

$$F = f(h), (1)$$

где F (нН) — сила, действующая на мембрану эритроцита со стороны зонда; h (нм) — глубина прогиба мембраны. Функции (1) получены после преобразования начальных эмпирических зависимостей вида $I(Z)$; I (нА) — ток

erythrocyte suspension was prepared. To this end, 30 μ l of erythrocytes were added to 6 ml of phosphate buffer. 200 μ l of the resultant suspension was applied onto a glass preliminarily coated with polylysine solution (MP Biomedicals, France) [16]. Adhesion of erythrocytes on the polylysine coated glass lasted for 30 minutes. The resultant sample was washed in buffer, pH 7.4, for 10 seconds, then force curves were measured.

Deformation of native erythrocytes was evaluated with the help of atomic-force microscope (AFM) NTEGRA Prima, (NT-MDT, Russian Federation). Handling a liquid, one should choose correctly the cantilever's parameters taking into account the biomechanical properties of the object under study [7, 17–20]. To measure native erythrocytes, cantilevers SD-R150-T3L450B-10 (Nanosensor, Switzerland) with probe radius $R = 150$ nm, resonance frequency 21 kHz, and cantilever's elastic coefficient $K = 1$ N/m were used.

As a part of preparation to measurements, cantilever calibration on glass was performed for every sample [8, 17, 18]. To obtain an empirical force curve $I(Z)$, maximal piezoscaner rise $Z_{max} = 4000$ nm and photodiode current $I = 0.5$ nA were set. The probe immersion time was $t = 5$ seconds, because in case of faster measurements, the membrane stiffness estimation shifts [20].

For each bag, erythrocyte membranes' surface was scanned over the field of $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ using AFM. Thereafter, an action was rendered on cells with preset force F in the atomic-force spectroscopy mode to obtain force curves. In each sample, the parameters of 100 native cells were determined. For each empirical curve $I(Z)$, transition to dependence $F(h)$ was carried out to calculate erythrocyte membranes' Young's modulus [7, 9]. Total of 4400 native cells were analyzed in the study. Statistical processing of findings was carried out with the help of Origin Pro software (Origin Lab Corporation, Northampton, Massachusetts, USA). All data are shown as the means \pm standard deviation.

Results and Discussion

Erythrocyte deformability was determined based on the ability of their membranes to deflect into the cell under the effect of applied force. The force in the experiment was estimated based on curves:

$$F = f(h), (1)$$

where F (nN) is the force acting on the erythrocyte membrane from the side of the probe; h (nm) is the membrane deflection depth. Functions (1) were obtained after transformation of initial empirical correlations of type $I(Z)$; I (nA) is the AFM mismatch current, Z (nm) is the cantilever movement. The methodology of transformation was described in detail in our previous paper [18]. Erythrocyte membranes' stiffness was estimated based on Young's modulus E (N/m²). To this end, the Hertz model was used [21]:

$$F = 4/3ER^{0.5}h^{1.5}, (2)$$

where E is the Young's modulus of material, R is the indenter's radius, h is the membrane deflection depth. In this model, the power at h and R is determined by non-linear interaction of the probe's

рассогласования АСМ; Z (нм) — перемещение кантилевера. Методика преобразования подробно описана в нашей предыдущей работе [18]. Жесткость мембран эритроцитов оценивали по модулю Юнга E (Н/м²). Для этого использовали модель Герца [21]:

$$F = 4/3ER^{0,5}h^{1,5}, \quad (2)$$

где E — модуль Юнга материала; R — радиус индентора; h — глубина прогиба мембраны. В этой модели степени при h и R определяются нелинейным взаимодействием сферической поверхности зонда с мембраной. Начальным условием модели (2) является предположение о взаимодействии зонда с однородным материалом, в нашем случае с мембраной эритроцита. Отсюда следует, что если степень при h отлична от 1,5, то взаимодействие происходит с неоднородным материалом. Поэтому, для оценки закономерностей прогиба мембран эритроцитов в работе использовали аппроксимацию эмпирических кривых вида (1) степенной функцией:

$$F = kh^n \quad (3)$$

Степень n и коэффициент k в (3) подбирали с помощью метода нелинейной аппроксимации экспериментальных кривых. Степень n вычисляли, начиная с величины h_{max} и с шагом 5 нм, опускались к меньшим значениям h . Очевидно, что при $n \neq 1,5$ аппроксимирующая кривая не удовлетворяла модели (2). Вычисление n пошагово продолжали до глубины h , для которой выполнялось условие $n = 1,5$. Эта глубина называется h_{Hz} .

Что такое h_{Hz} ? Это та наибольшая глубина погружения зонда в мембрану эритроцита $h < h_{Hz}$, до которой эмпирическая кривая $F(h)$ подчиняется модели Герца. Следовательно, это та глубина, до которой процесс погружения зонда описывается взаимодействием с однородной средой. На рис. 1 представили эмпирическую и теоретическую зависимости силы взаимодействия F (нН) от глубины погружения зонда h (нм).

Кривая h_{32} располагается выше кривой h_{03} так как ее модуль Юнга E в 2,4 раза больше. То есть по мере хранения жесткость мембраны возрастает. Поэтому, при одной и той же силе $F_1 = const$ зонд на 3 суток погружался глубже, чем на 32 (рис. 1 *a, b*). По этой же причине силы, при которых зонд погружался до h_{Hz} так же различны: на 3 суток хранения сила была существенно меньше, чем на 32 суток. На рис. 1, *b* оба зонда еще не достигли h_{Hz} так как F_1 для этого не достаточна. Глубины h_{Hz} как на 3 суток хранения ЭВ, так и на 32 суток статистически не различались на уровне $p > 0,05$. На рис. 1, *a* представлена величина Δh_{Hz} , которая определялась статистическим разбросом измеренной h_{Hz} .

По функциям $F(h)$ (по 100 измеренным кривым) с учетом (2) вычисляли модуль Юнга E ,

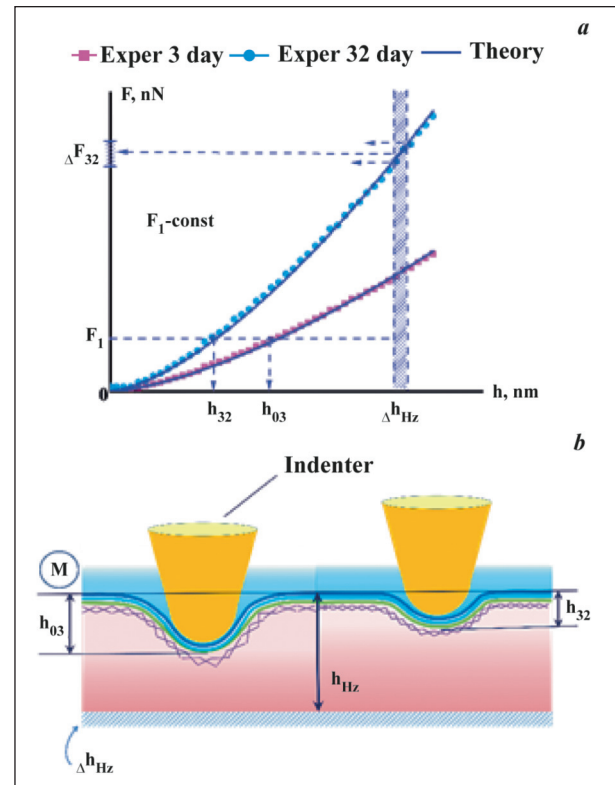


Рис. 1. Эмпирическая и теоретическая зависимости силы взаимодействия F (нН) от глубины погружения зонда h (нм).

Fig. 1. Empirical and theoretic dependences of the force of interaction F (nN) on the depth of probe immersion h (nm).

Note. *a* — h_{03} and h_{32} are probe immersion depths at preset force F_1 on ES storage day 3 and 32. Δh_{Hz} is the range of statistical dispersion of value h_{Hz} ; *b* — is probe immersion depending on stiffness (E) of membranes (M) on ES storage day 3 and 32 at interaction force F_1 .

Примечание. *a* — h_{03} и h_{32} глубины погружения зонда при заданной силе F_1 на 3 и 32 сутки хранения ЭВ. Δh_{Hz} интервал статистического разброса величины h_{Hz} ; *b* — погружения зондов в зависимости от жесткости (E) мембран (M) на 3 и 32 сутки хранения ЭВ при силе взаимодействия F_1 .

spherical surface with the membrane. The initial condition of model (2) is the assumption that the probe interacts with a homogeneous material, in our case — erythrocyte's membrane. It follows thence that if the power at h differs from 1.5, then the interaction continues with a heterogeneous material. Therefore, to assess regularities of erythrocyte membrane deflection, approximation of empirical curves of type (1) by power function was used in the study:

$$F = kh^n \quad (3)$$

Power n and coefficient k in (3) were selected by non-linear approximation of experimental curves. Power n was calculated starting with h_{max} going down in 5-nm steps to lower values of h . Obviously, at $\neq 1.5$ the approximating curve did not comply with model (2). Stepwise calculation of n was continued to depth h , for which the condition $n = 1.5$ was fulfilled. This depth is referred to as h_{Hz} .

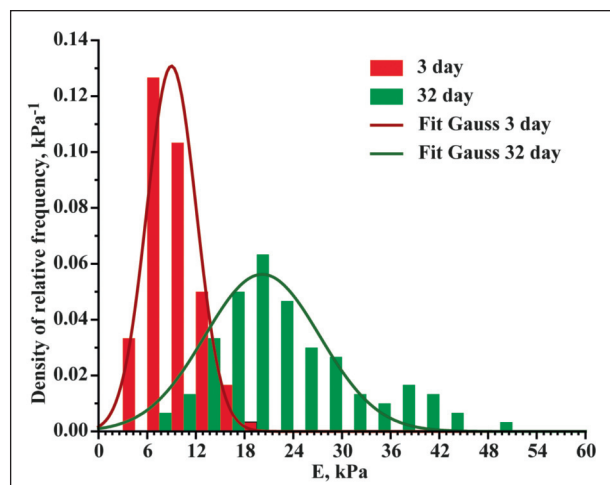


Рис. 2. Гистограммы плотности относительной частоты модулей Юнга E для 3 и 32 суток хранения ЭВ.

Fig. 2. Bar charts of density of relative frequency of Young's modulus E for ES storage day 3 and 32.

Note. Bar charts were approximated according to Gaussian normal distribution law. Distribution for ES storage day 3 and 32 was statistically different at $P < 0.01$.

Примечание. Гистограммы аппроксимировали нормальным законом распределения Гаусса. Распределение для 3 и 32 суток хранения ЭВ статистически различно на уровне $p < 0,01$.

который является основной биомеханической характеристикой мембран эритроцитов. Эти данные использовали для построения гистограмм плотности относительной частоты, представленные на рис. 2. Затем каждую гистограмму аппроксимировали нормальным законом Гаусса. Для 3 суток хранения ЭВ $E_m = 9,3 \pm 3,2$ кПа, а для 32 суток уже $22,7 \pm 8,7$ кПа, что на рис. 2 показано сдвигом функции Гаусса в сторону роста E . Коэффициент асимметрии для третьих суток составил $0,52 \pm 0,04$, а для 32 суток — $0,82 \pm 0,09$. Иными словами, если на третьи сутки кривая Гаусса симметрична, то по мере хранения возникает асимметрия, хвост которой направлен в сторону роста модуля E . Это происходило потому, что появлялись клетки с новым значением модуля E , а среднее значение модуля еще не менялось на достаточную величину.

Анализ изменений жесткости мембран при хранении ЭВ до 32 суток проводили по функции распределения $F_d(E)$:

$$F_d(E) = \int_{-\infty}^E f(E) dE \quad (4)$$

При этом считали, что гистограммы относительных частот (рис. 2) аппроксимируются нормальным законом распределения Гаусса. Для оценки доли эритроцитов, на которых увеличился модуль Юнга E (на 32 сутки), на графиках функций (4) откладывали уровень 0,98 и на этом уровне определяли, какая часть клеток, имеющих $E_m = 22,7$ кПа (32 сутки), сохранила E_m третьих суток — 9,3 кПа. Из графиков следует,

What the h_{Hz} means? It is the greatest depth of probe immersion into the erythrocyte membrane $h < h_{Hz}$, up to which empirical curve $F(h)$ complies with the Hertz model. Hence, it is the depth up to which the probe immersion process is described by interaction with homogeneous medium. Fig. 1 shows the empirical and theoretical dependencies of the force of interaction F (nN) on the depth of probe immersion h (nm).

Curve h_{32} is located higher than curve h_{03} because its Young's modulus E is 2.4 times greater. That is membrane stiffness grows as storage period increases. Hence, at the same force $F_1 = const$, the probe immersed deeper on day 3 than on day 32 (fig. 1 a, b). For the same reason, the forces at which the probe immersed to h_{Hz} are also different: the force was significantly less on storage day 3 than on day 32. On fig. 1, b, both probes have not yet reached h_{Hz} because F_1 is insufficient for this. There was no statistical difference in depths h_{Hz} on ES storage day 3 vs. day 32 at $p > 0.05$. Fig. 1a shows value Δh_{Hz} that was determined by statistical dispersion of measured h_{Hz} values.

From functions $F(h)$ (as determined from 100 measured curves) subject to (2), Young's modulus E , which is the basic biomechanical characteristic of erythrocytes' membranes, was calculated. The data were used to build the relative frequency density bar charts given on fig. 2. Thereafter, each bar chart was approximated following Gaussian normal distribution law. For ES storage day 3, $E_m = 9.3 \pm 3.2$ kPa, while for day 32 it is already equal to 22.7 ± 8.7 kPa, which is shown on fig. 2 by Gauss function shift towards growth of E . The coefficient of skewness amounted to 0.52 ± 0.04 for day 3 and to 0.82 ± 0.09 for day 32. In other words, if on day 3 the Gauss curve is symmetrical, with storage the coefficient of skewness appears, the tail of which is directed towards growth of modulus E . That happened because cells with a new value of modulus E appeared while the mean modulus value had not yet changed sufficiently.

Changes in membranes' stiffness during ES storage up to 32 days were analyzed based of the function of distribution $F_d(E)$:

$$F_d(E) = \int_{-\infty}^E f(E) dE \quad (4)$$

It was assumed that bar charts of relative frequencies (fig. 2) are approximated according to Gaussian normal distribution law. To estimate the fraction of erythrocytes with increased Young's modulus E (on day 32), on diagrams of functions (4), level 0.98 was singled out and at that level it was determined what fraction of cells having $E_m = 22.7$ kPa (day 32) retained day three E_m — 9.3 kPa. It follows from the diagrams that this value is equal to 0.28. So, on day 32 there were only 28% of cells, which Young's modulus remained the same as on the first three days.

It has been demonstrated that erythrocytes' stiffness grows with the time of storage (fig. 1–3). It

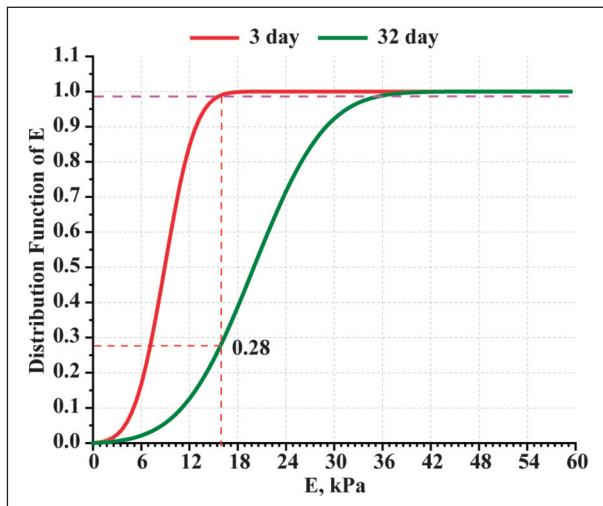


Рис. 3. Функции распределения $F_d(E)$ для 3 и 32 суток хранения ЭВ.

Fig. 3. Distribution functions $F_d(E)$ for ES storage day 3 and 32.

что это значение составляет 0,28. Таким образом, на 32-е сутки оставалось лишь 28% клеток, модуль Юнга которых сохранялся таким же, как и в первые трое суток.

Показали, что жесткость эритроцитов по мере их хранения возрастает (рис. 1–3). Было бы логичным предполагать, что и величина h_{Hz} также должна возрастать или меняться по какому-либо закону. Однако, измеренные величины h_{Hz} для 3-х и 32-х суток хранения эритроцитарной взвеси показали, что эта критическая глубина и для тех, и для других суток хранения остается почти одинаковой. Величина h_{Hz} находилась в диапазоне 730 ± 106 нм и эти глубины как на 3 суток хранения ЭВ, так и на 32 суток статистически не различались на уровне $p > 0,05$. Все полученные силовые кривые $F(h)$ адекватно аппроксимировались функцией (2) и степенной функцией (3) со степенью $n = 1,50 \pm 0,02$ на уровне коэффициента детерминации $R^2 \geq 0,95$.

Отсюда следует важный вывод о том, что по мере хранения ЭВ при 4°C мембраны эритроцитов до глубин 700 нм прогибались однородно, несмотря на то, что модуль Юнга возрастал в 2,4 раза.

Заключение

При хранении ЭВ (32 суток) модуль E_m менялся от $9,3 \pm 3,2$ кПа — для 3 суток хранения,

would be logical to suppose that the value h_{Hz} should also increase or alter following some law. However, values h_{Hz} as determined on day 3 and day 32 of erythrocyte suspension storage exhibited almost the same critical depth for both periods of storage. Value h_{Hz} was within the range of 730 ± 106 nm, and there was no statistical difference in the depth either on ES storage day 3 or day 32 at the level of $P > 0.05$. All force curves $F(h)$ obtained were adequately approximated by function (2) and power function (3) with power $n = 1.50 \pm 0.02$ at the level of determination coefficient $R^2 \geq 0.95$.

Thence, an important conclusion follows that with ES storage at 4°C erythrocyte membranes deflected homogeneously up to the depths of 700 nm in spite of 2.4-fold increase of Young's modulus.

Conclusion

During ES storage (32 days), modulus E_m changed from 9.3 ± 3.2 kPa for 3 days of storage to 22.7 ± 8.7 kPa for 32 days of storage. However, value h_{Hz} remained constant. During erythrocyte suspension storage, erythrocyte membranes deflected homogeneously to the depths of 700 nm in spite of the fact that Young's modulus increased 2.4 times.

The results demonstrate the processes of interaction of the surfaces of native erythrocyte membranes with the walls of small vessels and might be useful for future studies.

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».

до $22,7 \pm 8,7$ кПа — для 32 суток. Но величина h_{Hz} при этом оставалась постоянной. По мере хранения эритроцитарной взвеси мембраны эритроцитов до глубин 700 нм прогибались однородно, несмотря на то, что модуль Юнга возрастал в 2,4 раза.

Полученные результаты способствуют более глубокому пониманию процессов взаимодействия поверхностей мембран нативных эритроцитов со стенками мелких сосудов и могут быть полезным в практической реаниматологии и медицине в целом.

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

Литература

1. D'Almeida M. S., Jagger J., Duggan M., White M., Ellis C., Chin-Yee I. H. A comparison of biochemical and functional alterations of rat and human erythrocytes stored in CPDA-1 for 29 days: implications for animal models of transfusion. *Transfus. Med.* 2000; 10(4): 291–303. DOI: 10.1046/j.1365-3148.2000.00267.x. PMID: 11123813
2. Wang C.H., Popel A.S. Effect of red blood cell shape on oxygen transport in capillaries. *Math. Biosci.* 1993; 116 (1): 89–110. PMID: 8343620

References

1. D'Almeida M. S., Jagger J., Duggan M., White M., Ellis C., Chin-Yee I. H. A comparison of biochemical and functional alterations of rat and human erythrocytes stored in CPDA-1 for 29 days: implications for animal models of transfusion. *Transfus. Med.* 2000; 10 (4): 291–303. DOI: 10.1046/j.1365-3148.2000.00267.x. PMID: 11123813
2. Wang C.H., Popel A.S. Effect of red blood cell shape on oxygen transport in capillaries. *Math. Biosci.* 1993; 116 (1): 89–110. PMID: 8343620

3. Tomaiuolo G. Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics. *Biomicrofluidics*. 2014; 8 (5): 051501. DOI: 10.1063/1.4895755. eCollection 2014 Sep. PMID: 25332724
4. Chien S. Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Annu. Rev. Physiol.* 1987; 49: 177–192. DOI: 10.1146/annurev.ph.49.030187.001141. PMID: 3551796
5. Frank S.M., Abazyan B., Ono M., Hogue C.W., Cohen D.B., Berkowitz D.E., Barodka V.M. Decreased erythrocyte deformability after transfusion and the effects of erythrocyte storage duration. *Anesth. Analg.* 2013; 116 (5): 975–981. DOI: 10.1213/ANE.0b013e31828843e6. PMID: 23449853
6. 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 (7): 1–11. DOI: 10.1038/s41598-017-08255-9. PMID: 28798476
7. Kozlova E., Chernysh A., Manchenko E., Sergunova V., Moroz V. Nonlinear biomechanical characteristics of deep deformation of native RBC membranes in normal state and under modifier action. *Scanning*. 2018; Article ID 1810585. DOI: 10.1155/2018/1810585
8. Lekka M., Fornal M., Pyka-Fościk G., Lebed K., Wizner B., Grodzicki T., Styczeń J. Erythrocyte stiffness probed using atomic force microscope. *Biorheology*. 2005; 42 (4): 307–317. PMID: 16227658
9. Kuznetsova T.G., Starodubtseva M.N., Yegorenkov N.I., Chizhik S.A., Zhdanov R.I. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*. 2007; 38 (8): 824–833. DOI: 10.1016/j.micron.2007.06.011. PMID: 17709250
10. Сергунова В.А., Козлова Е.К., Мягкова Е.А., Черныш А.М. Измерение упруго-эластичных свойств мембраны нативных эритроцитов *in vitro*. *Общая реаниматология*. 2015; 11 (3): 39–44. DOI: 10.15360/1813-9779-2015-3-39-44
11. Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Козлов А.П., Черныш А.М. Измерение локальной жесткости мембран эритроцитов с помощью атомно-силовой спектроскопии. *Общая реаниматология*. 2013; 9 (1): 14. DOI: 10.15360/1813-9779-2013-1-14
12. Xu Z., Zheng Y., Wang X., Shehata N., Wang C., Sun Y. Stiffness increase of red blood cells during storage. *Microsyst. Nanoeng.* 2018; 4: 17103. DOI: 10.1038/micronano.2017.103
13. Park H., Lee S., Ji M., Kim K., Son Y., Jang S., Park Y. Measuring cell surface area and deformability of individual human red blood cells over blood storage using quantitative phase imaging. *Sci. Rep.* 2016; 6: 34257. DOI: 10.1038/srep34257. PMID: 27698484
14. Girasole M., Cricenti A., Generosi R., Congiu-Castellano A., Boumis G., Amiconi G. Artificially induced unusual shape of erythrocytes: an atomic force microscopy study. *J Microsc.* 2001; 204: 46–52. DOI: 10.1046/j.1365-2818.2001.00937.x. PMID: 11580812
15. 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.
16. Zhang W., Liu F. Effect of polylysine on blood clotting, and red blood cell morphology, aggregation and hemolysis. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2014; 17 (1): 251–255. PMID: 29620337
17. Fornal M., Lekka M., Pyka-Fościk G., Lebed K., Grodzicki T., Wizner B., Styczeń J. Erythrocyte stiffness in diabetes mellitus studied with atomic force microscope. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2015; 35 (1–2): 273–276. PMID: 16899942
18. Черныш А.М., Козлова Е.К., Мороз В.В., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Козлов А.П., Манченко Е.А. Нелинейные локальные деформации мембран эритроцитов: нормальные эритроциты (Часть 1). *Общая реаниматология*. 2017; 13(5): 58–68. DOI: 10.15360/1813-9779-2017-5-58-68
19. Thomas G., Burnham N.A., Camesano T.A., Wen Q. Measuring the mechanical properties of living cells using atomic force microscopy. *J. Vis. Exp.* 2013; (76). DOI: 10.3791/50497. PMID: 23851674
20. Lien C. C., Wu M. C., Ay C. Study on the Young's modulus of red blood cells using atomic force microscope. *Applied Mechanics and Materials*. 2014; 627: 197–201. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMM.627.197
21. Hertz H. Ueber den kontakt elastischer koerper. *Journal für die Reine und Angewandte Mathematik*. 1881; 92 (4): 245–260.
3. Tomaiuolo G. Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics. *Biomicrofluidics*. 2014; 8 (5): 051501. DOI: 10.1063/1.4895755. eCollection 2014 Sep. PMID: 25332724
4. Chien S. Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Annu. Rev. Physiol.* 1987; 49: 177–192. DOI: 10.1146/annurev.ph.49.030187.001141. PMID: 3551796
5. Frank S.M., Abazyan B., Ono M., Hogue C.W., Cohen D.B., Berkowitz D.E., Barodka V.M. Decreased erythrocyte deformability after transfusion and the effects of erythrocyte storage duration. *Anesth. Analg.* 2013; 116 (5): 975–981. DOI: 10.1213/ANE.0b013e31828843e6. PMID: 23449853
6. 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 (7): 1–11. DOI: 10.1038/s41598-017-08255-9. PMID: 28798476
7. Kozlova E., Chernysh A., Manchenko E., Sergunova V., Moroz V. Nonlinear biomechanical characteristics of deep deformation of native RBC membranes in normal state and under modifier action. *Scanning*. 2018; Article ID 1810585. DOI: 10.1155/2018/1810585
8. Lekka M., Fornal M., Pyka-Fościk G., Lebed K., Wizner B., Grodzicki T., Styczeń J. Erythrocyte stiffness probed using atomic force microscope. *Biorheology*. 2005; 42 (4): 307–317. PMID: 16227658
9. Kuznetsova T.G., Starodubtseva M.N., Yegorenkov N.I., Chizhik S.A., Zhdanov R.I. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*. 2007; 38 (8): 824–833. DOI: 10.1016/j.micron.2007.06.011. PMID: 17709250
10. 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. *Obschaya reanimatologiya=General Reanimatology*. 2015; 11 (3): 39–44. [In Russ.] DOI: 10.15360/1813-9779-2015-3-39-44
11. Sergunova V.A., Gudkova O.E., Kozlov A.P., Chernysh A.M. Measurement of the local tension of red blood cell membranes by atomic force spectroscopy. *Obschaya reanimatologiya=General Reanimatology*. 2013; 9 (1): 14. [In Russ.] DOI: 10.15360/1813-9779-2013-1-14
12. Xu Z., Zheng Y., Wang X., Shehata N., Wang C., Sun Y. Stiffness increase of red blood cells during storage. *Microsyst. Nanoeng.* 2018; 4: 17103. DOI: 10.1038/micronano.2017.103
13. Park H., Lee S., Ji M., Kim K., Son Y., Jang S., Park Y. Measuring cell surface area and deformability of individual human red blood cells over blood storage using quantitative phase imaging. *Sci. Rep.* 2016; 6: 34257. DOI: 10.1038/srep34257. PMID: 27698484
14. Girasole M., Cricenti A., Generosi R., Congiu-Castellano A., Boumis G., Amiconi G. Artificially induced unusual shape of erythrocytes: an atomic force microscopy study. *J Microsc.* 2001; 204: 46–52. DOI: 10.1046/j.1365-2818.2001.00937.x. PMID: 11580812
15. 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.
16. Zhang W., Liu F. Effect of polylysine on blood clotting, and red blood cell morphology, aggregation and hemolysis. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2014; 17 (1): 251–255. PMID: 29620337
17. Fornal M., Lekka M., Pyka-Fościk G., Lebed K., Grodzicki T., Wizner B., Styczeń J. Erythrocyte stiffness in diabetes mellitus studied with atomic force microscope. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2015; 35 (1–2): 273–276. PMID: 16899942
18. Chernysh A.M., Kozlova E.K., Moroz V.V., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Kozlov A.P., Manchenko E.A. Nonlinear local deformations of erythrocyte membranes: normal erythrocytes (part 1). *Obschaya reanimatologiya=General Reanimatology*. 2017; 13 (5): 58–68. (In Russ.) DOI: 10.15360/1813-9779-2017-5-58-68
19. Thomas G., Burnham N.A., Camesano T.A., Wen Q. Measuring the mechanical properties of living cells using atomic force microscopy. *J. Vis. Exp.* 2013; (76). DOI: 10.3791/50497. PMID: 23851674
20. Lien C. C., Wu M. C., Ay C. Study on the Young's modulus of red blood cells using atomic force microscope. *Applied Mechanics and Materials*. 2014; 627: 197–201. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMM.627.197
21. Hertz H. Ueber den kontakt elastischer koerper. *Journal für die Reine und Angewandte Mathematik*. 1881; 92 (4): 245–260.

Поступила 13.08.19

Received 13.08.19