

УДК 57.043: 547.422: 612.115

В.В. Рамазанов, Е.Л. Воловельская\*, В.А. Бондаренко

## Осмотические показатели и тромбопластическая активность эритроцитов после замораживания-отогрева в комбинированных средах

UDC 57.043:547.422:612.115

V.V. Ramazanov, E.L. Volovelskaya\*, V.A. Bondarenko

## Osmotic Indices and Thromboplastic Activity of Erythrocytes After Freeze-Thawing in Combined Media

**Реферат:** Исследованы осмотические показатели эритроцитов человека, замороженных в средах с полимерами (декстран, полиэтиленгликоль-1500), в комбинированных средах с полимером и проникающим криопротектором (1,2-пропандиол), а также их влияние на время коагуляции плазмы крови. Показано, что при замораживании в средах с полимерами нарушаются осмотические характеристики эритроцитов, в этом случае они приобретают форму сфероцитов, а при добавлении в среду альбумина – форму сфероехиноцитов. Оставшиеся эритроциты после замораживания по сравнению с интактными клетками в большей степени ускоряют коагуляцию плазмы. Эритроциты, замороженные в комбинированных средах, незначительно отличаются по осмотическим характеристикам от интактных клеток и представлены сфероехиноцитами, а при действии альбумина – дискоцитами и стоматоцитами. Оставшиеся после замораживания-отогрева эритроциты ускоряют коагуляцию плазмы, как и эритроциты, замороженные в средах с полимерами. Полученные результаты позволяют предположить, что при замораживании эритроцитов в средах с полимерами происходит устранение асимметричного распределения молекул фосфатидилсерина, который переходит на внешнюю поверхность клеточных мембран, что является причиной сфероцитоза и усиления тромбопластической активности эритроцитов. При замораживании эритроцитов в комбинированных средах происходит частичное поступление фосфатидилсерина на внешнюю сторону мембран и этого достаточно для выраженного усиления тромбопластической активности клеток при сохранении их осмотических показателей.

**Ключевые слова:** эритроциты, замораживание, комбинированные криоконсерванты, коагуляция.

**Реферат:** Досліджено осмотичні показники еритроцитів, заморожених у середовищах із полімерами (декстран, поліетиленгліколь-1500) та у комбінованих середовищах із полімером і проникним криопротектором (1,2-пропандіол), а також їх вплив на час коагуляції плазми крові. Показано, що під час заморожування у середовищах із полімерами порушуються осмотичні характеристики еритроцитів, при цьому вони мають форму сфероцитів, а при додаванні альбуміну – сфероехіноцитів. Порівняно з інтактними еритроцитами, які залишилися після заморожування, більшою мірою прискорюють коагуляцію плазми. Еритроцити, які заморожені в комбінованих середовищах, незначно відрізняються за осмотичними характеристиками від інтактних і представлені сфероехіноцитами, а при дії альбуміну – дискоцитами та стоматоцитами. Еритроцити, які залишилися після заморожування, прискорюють коагуляцію плазми, як і еритроцити, що заморожували в середовищах із полімерами. Отримані результати дозволяють припустити, що під час заморожування еритроцитів у середовищах із полімерами відбувається усунення асиметричного розподілу молекул фосфатидилсерину, який переходить на зовнішню поверхню клітинних мембран, що є причиною сфероцитозу і посилення тромбопластичної активності еритроцитів. Під час заморожування еритроцитів у комбінованих середовищах фосфатидилсерин частково надходить на зовнішню поверхню мембран, однак цього достатньо для вираженого посилення тромбопластичної активності клітин при збереженні їх осмотичних показників.

**Ключові слова:** еритроцити, заморожування, комбіновані криоконсерванти, коагуляція.

**Abstract:** Here we studied the osmotic indices of human erythrocytes, frozen in the media with polymers (dextran, polyethylene glycol 1500), in combined media with polymer and penetrating cryoprotectant (1,2-propanediol), as well as their effect on blood plasma clotting time. During erythrocyte freezing in the media with polymers there were demonstrated their disordered osmotic characteristics, in this case they were spherocyte-shaped and spheroechinocyte-shaped if supplementing the medium with albumin. The erythrocytes, which survived after freezing accelerated plasma clotting in a greater extent as compared to the intact cells. Those frozen in combined media were slightly different by osmotic characteristics from the intact cells, being represented by spheroechinocytes, but discocytes and stomatocytes under albumin effect. The erythrocytes survived freeze-thawing accelerated plasma clotting, like those, frozen in the media with polymers. Our findings have suggested the erythrocyte freezing in the media with polymers to cause the elimination of asymmetric distribution of phosphatidylserine molecules, transiting onto an outer surface of cell membranes, thereby causing spherocytosis and strengthening a thromboplastic activity of erythrocytes. Erythrocyte freezing in combined media resulted in a partial migration of phosphatidylserine onto an outer side of membrane, and that was sufficient for pronounced strengthening of thromboplastic activity of cells with preserving their osmotic indices.

**Key words:** erythrocytes, freezing, combined cryopreservatives, coagulation.

Отдел криоцитологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

\*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;  
тел.: (+38 057) 373-41-35, факс: (+38 057) 373-59-52,  
электронная почта: elizavetavolovelska@gmail.com

Поступила 09.11.2015  
Принята в печать 29.03.2016

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №3. – С. 229–237.  
© 2016 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Department of Cryocytology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

\*To whom correspondence should be addressed:  
23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 4135, fax: +380 57 373 5952,  
e-mail: elizavetavolovelska@gmail.com

Received November, 09, 2015  
Accepted March, 29, 2016

Probl Cryobiol Cryomed 2016; 26(3): 229–237.  
© 2016 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

В настоящее время разработка трансфузионных протоколов, учитывающих гемостатический потенциал крови пациентов с различными заболеваниями, остается актуальной задачей медицины [12]. В связи с этим модификация тромбопластических свойств эритроцитов при замораживании может оказаться эффективным подходом для их направленного влияния на общий гемостаз после трансфузии.

При замораживании эритроцитов в среде с поливинилпирролидоном в мембранах нарушается асимметричное распределение молекул фосфатидилсерина, который выявляется на поверхности клеток [15]. Известно, что на внешней поверхности мембран фосфатидилсерин вместе с фосфатидилхолином и белками образует липопротеиновые комплексы, обладающие тромбопластической активностью [4], подобной тромбопластину тромбоцитов [3]. В физиологических условиях на поверхности различных клеток (тромбоциты, эритроциты, фибробласты и др.) под контролем специфических механизмов образуется тромбин из его неактивного предшественника (протромбина) под действием тромбиназы [14], которая активируется на поверхности клеток при наличии тромбопластина [16].

При замораживании эритроцитов в среде с поливинилпирролидоном отмечается значительная потеря аденозинтрифосфата (АТФ), при этом клетки трансформированы в сфероциты, в которых молекулы фосфатидилсерина находятся на внешней поверхности мембран. Замораживание в среде с поливинилпирролидоном и глюкозой обеспечивает сохранение концентрации АТФ на 60–70%, при этом эритроциты представлены стоматоцитами и дискоцитами, в большей части которых молекулы фосфатидилсерина располагаются на поверхности мембран [15]. Ранее было показано [6], что среда, содержащая непроникающий (декстран, полиэтиленгликоль-1500) и проникающий (1,2-пропандиол) криопротекторы обеспечивает сохранение устойчивости эритроцитов к осмотическому стрессу при замораживании-отогреве. Осмотические показатели эритроцитов, замороженных в данной среде, подобны интактным клеткам [7]. Кроме того, замораживание эритроцитов в среде с декстраном и 1,2-пропандиолом обеспечивает сохранение содержания АТФ и 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) на уровне 74,6 и 76,3% соответственно по сравнению со средой, включающей только декстран (44,8 и 54,8% соответственно) [8].

Представленные данные литературы позволяют предположить, что при замораживании эритроцитов в комбинированных средах с непроникающими и проникающими криопротекторами происходит активация их тромбопластической активности

Nowadays the designing of transfusion protocols, which would consider a blood hemostatic potential of patients with different diseases has remained an important task of medicine [3]. In this regard the modification of thromboplastic properties of erythrocytes caused by freezing may be an efficient approach to control general hemostasis after transfusion.

Freezing of erythrocytes in the polyvinyl pyrrolidone-containing medium results in a disordered asymmetric distribution of phosphatidylserine molecule in membranes, *i. e.* its appearance on a cell surface [9]. Phosphatidylserine together with phosphatidylcholine and proteins forms the lipoprotein complexes on outer membrane surface which possess a thromboplastic activity [5], similar to platelet thromboplastin [6]. Under physiological conditions and control of specific mechanisms the thrombin is formed on surface of different cells (platelets, erythrocytes, fibroblasts, *etc.*) from its inactive precursor (prothrombin) under thrombinase effect [9], which is activated on cell surface in the thromboplastin presence [16].

Freezing of erythrocytes in the polyvinyl pyrrolidone-containing medium is accompanied with a significant loss of adenosine triphosphate (ATP), accompanied with transformation of the cells into spherocytes, which peculiarity is the presence of phosphatidylserine molecules on external membrane surface. Freezing in the medium with polyvinyl pyrrolidone and glucose provides the preservation of 60–70% of initial ATP concentration, and the erythrocytes are presented by stomatocytes and discocytes, the majority of which also has the phosphatidylserine molecules on membrane surface [9]. There was previously demonstrated [10] that the medium, containing non-penetrating (dextran, polyethylene glycol-1500) and penetrating (1,2-propanediol) cryoprotectants provided the preservation of erythrocyte resistance to osmotic stress during freeze-thawing. Osmotic indices of erythrocytes, frozen in this medium are similar to intact cells [11]. In addition, the erythrocyte freezing in the medium with dextran and 1,2-propanediol provides the ATP and 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) content at the level of 74.6 and 76.3%, respectively, as compared to the medium, containing dextran only (44.8 and 54.8%, respectively) [13].

The reported data enable assuming the fact that during erythrocyte freezing in combined media with non-penetrating and penetrating cryoprotectants the activation of their thromboplastic activity occurs, whereas the main organophosphorous compounds (ATP, 2,3-DPG) content, as well as osmotic and morphological properties of cells are preserved.

The research aim was to study the relationship between osmotic indices and thromboplastic activity of erythrocytes, frozen in a combined medium with



при сохранении главных фосфоорганических соединений (АТФ, 2,3-ДФГ), а также осмотических и морфологических свойств клеток.

Цель работы – исследование связи осмотических показателей с тромбопластической активностью эритроцитов, замороженных в комбинированной среде с непроникающими (полиэтиленгликоль-1500, декстран) и проникающим (1,2-пропандиол) криопротекторами.

### Материалы и методы

Для выделения плазмы и эритроцитов (семь доноров) кровь центрифугировали 10 мин при 350g. Полученную плазму центрифугировали 5 мин при 350g. Осадок эритроцитов отмывали физиологическим раствором NaCl (0,9%) и трижды центрифугировали в течение 5 мин при 1500g (гематокрит осадка 70%).

Образцы эритроцитов с криоконсервантом в полиэтиленовых капсулах объемом 1 мл с гематокритом 35% замораживали прямым погружением в жидкий азот. В эксперименте использовали две комбинированные криозащитные среды. В состав первой среды были включены 20% декстрана (35 000) и 15% 1,2-пропандиола (1,2-ПД), второй – 20% полиэтиленгликоля-1500 (ПЭГ-1500) и 15% 1,2-ПД. Концентрация NaCl в обеих средах составляла 0,6%. Образцы отогревали на водяной бане (40°C). Размороженную суспензию в 10 раз медленно разводили (с перемешиванием) теплым (37°C) физиологическим раствором и дважды центрифугировали при 1500g в течение 5 мин с последующим удалением надосадочной жидкости. Клетки дополнительно два раза отмывали теплым (37°C) физиологическим раствором без учета скорости разведения осадка эритроцитов.

Тромбопластическую активность эритроцитов и гемолизатов оценивали по времени рекальцификации (коагуляции) плазмы [4] после добавления в нее исследуемого материала [5]. В пробирку, установленную на водяной бане (37°C), вносили 0,2 мл раствора CaCl<sub>2</sub> (0,28%), 0,1 мл раствора NaCl (0,9%) или 0,1 мл H<sub>2</sub>O (для эксперимента с гемолизатом) и 50 мкл суспензии эритроцитов или гемолизата (разведенной в четыре раза). Через 60 с в пробирку вносили 0,1 мл плазмы и фиксировали время свертывания.

В эритроцитах изучали транспорт ионов H<sup>+</sup> в сульфатной среде (110 моль H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) без буфера. Клеточную суспензию помещали в термостатируемую ячейку (37°C) с pH-электродом при постоянном перемешивании [9].

Осмотический гемолиз эритроцитов исследовали в среде, содержащей 10 ммоль/л трис-буфера (pH 7,4) и NaCl в разной концентрации (0,09–0,9%).

non-penetrating (polyethylene glycol 1500, dextran) and penetrating (1,2-propanediol) cryoprotectants.

### Materials and methods

To isolate the plasma and erythrocytes (from seven donors) the blood was centrifuged for 10 min at 350g. The obtained plasma was centrifuged for 5 min at 350g. The erythrocyte sediment was washed with physiological NaCl solution (0.9%) and thrice centrifuged for 5 min at 1500g (sediment hematocrit reached 70%).

Erythrocyte samples with cryopreservative in 1 ml polyethylene capsules with 35% hematocrit were frozen via direct immersion into liquid nitrogen. In the experiment we used two combined cryoprotective media. The first medium consisted of 20% dextran (35000) and 15% 1,2-propanediol (1,2-PD), the second one comprised 20% polyethylene glycol 1500 (PEG 1500) and 15% 1,2-PD. The concentration in both media was 0.6%. The samples were thawed in water bath (40°C). The frozen-thawed suspension was 10-fold slowly diluted (with mixing) using warm (37°C) physiological saline and twice centrifuged at 1500g for 5 min with following removal of supernatant. Cells were additionally washed twice with warm (37°C) physiological saline without control of erythrocyte sediment dilution rate.

Thromboplastic activity of erythrocytes and hemolysates was assessed by plasma recalcification (coagulation) time [4] after supplementing it with the studied material [10]. We introduced 0.2 ml CaCl<sub>2</sub> solution (0.28%), 0.1 ml NaCl solution (0.9%) or 0.1 ml H<sub>2</sub>O (for the experiment with hemolysate) and 50 µl erythrocyte suspension or hemolysate (4-fold dilution) into the tube, placed on water bath (37°C). After 60 sec 0.1 ml of plasma was transferred into the vial and the clotting time was fixed.

We studied in erythrocytes the H<sup>+</sup> ion transport in buffer-free sulfate medium (110 mol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). The cell suspension was placed in thermostatically controlled well (37°C) with pH electrode at a constant mixing [14].

Osmotic hemolysis of erythrocytes was studied in the medium, containing 10 mmol/l Tris-buffer (pH 7.4) and different concentrations of NaCl (0.09–0.9%). Cells were incubated for 15 min at 22°C in the medium (1 ml) with 0.6% hematocrit, then centrifuged at 1500g for 3 min. Hemolysis degree was measured spectrophotometrically at 543 nm, and glutathione content in erythrocytes was assessed spectrophotometrically using dithiobisnitrobenzoic acid at 412 nm [2].

To study the erythrocyte structure prior to and after freezing we introduced albumin in 1% concentration into the cell suspension with 2% hematocrit. The suspension was mixed and a change in erythrocyte structure prior to and after albumin introduction was studied. Albumin stabilizes red blood cell's discoid



Клетки инкубировали в течение 15 мин при 22°C в среде (1 мл) с гематокритом 0,6%, затем центрифугировали при 1500g в течение 3 мин. Степень гемолиза измеряли на спектрофотометре при длине волны 543 нм, а содержание глутатиона в эритроцитах – спектрофотометрически с использованием дитиобиснитробензойной кислоты при длине волны 412 нм [11].

Для изучения структуры эритроцитов до и после замораживания в клеточную суспензию с гематокритом 2% вносили альбумин в концентрации 1%. Взвесь перемешивали и исследовали изменение структуры эритроцитов до и после внесения альбумина. Альбумин является стабилизатором дискоидных форм эритроцитов (нормоцитов) крови [13], поэтому по степени их трансформации в дискоциты можно судить об обратимости структурных нарушений в мембранах замороженных клеток.

Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка. Для определения различий между выборками использовали непараметрический критерий Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ) [2].

### Результаты и обсуждение

После замораживания-отогрева эритроцитов в средах, содержащих декстран или ПЭГ-1500, с последующим отмыванием от криоконсерванта повреждается значительное их количество (60–65%), а в оставшихся клетках снижается концентрация глутатиона. По сравнению с интактными в сохранившихся после замораживания-отогрева эритроцитах усиливается интенсивность потока ионов  $H^+$  (таблица). Степень осмотического гемолиза эритроцитов, замороженных-отогретых в данных средах, отличается при концентрациях NaCl 0,4–0,9% от таковой интактных клеток (рис. 1). Эритроциты, замороженные-отогретые в средах с декстраном или ПЭГ-1500, представлены сфероцитами, а в средах с альбумином – сфероэритроцитами (рис. 2).

В среде, содержащей полимеры и 1,2-ПД, увеличивается степень повреждения замороженных эритроцитов, при этом в среде с ПЭГ-1500 она больше, чем в среде с 1,2-ПД (таблица). Осмотические показатели эритроцитов, замороженных-отогретых в комбинированных средах, незначительно отличаются от интактных клеток (таблица, рис. 1). Эритроциты, замороженные в данных средах, представлены сфероэритроцитами, а при действии альбумина большая их часть приобретает форму дискоцитов, как и при его влиянии на интактные клетки (рис. 2).

Время коагуляции плазмы составляет 170 с, в присутствии интактных эритроцитов – 130 с, гемолизата – 95 с. Ускорение коагуляции отмечается в

shape (normocyte) [6], therefore one may judge about the reversibility of structural disorders in frozen cell membranes by the extents of their transformation into discocytes.

Data are presented as the mean  $\pm$  standard error. To determine the significance of differences between the samples we used the Mann-Whitney U-test ( $p < 0.05$ ) [1].

### Results and discussion

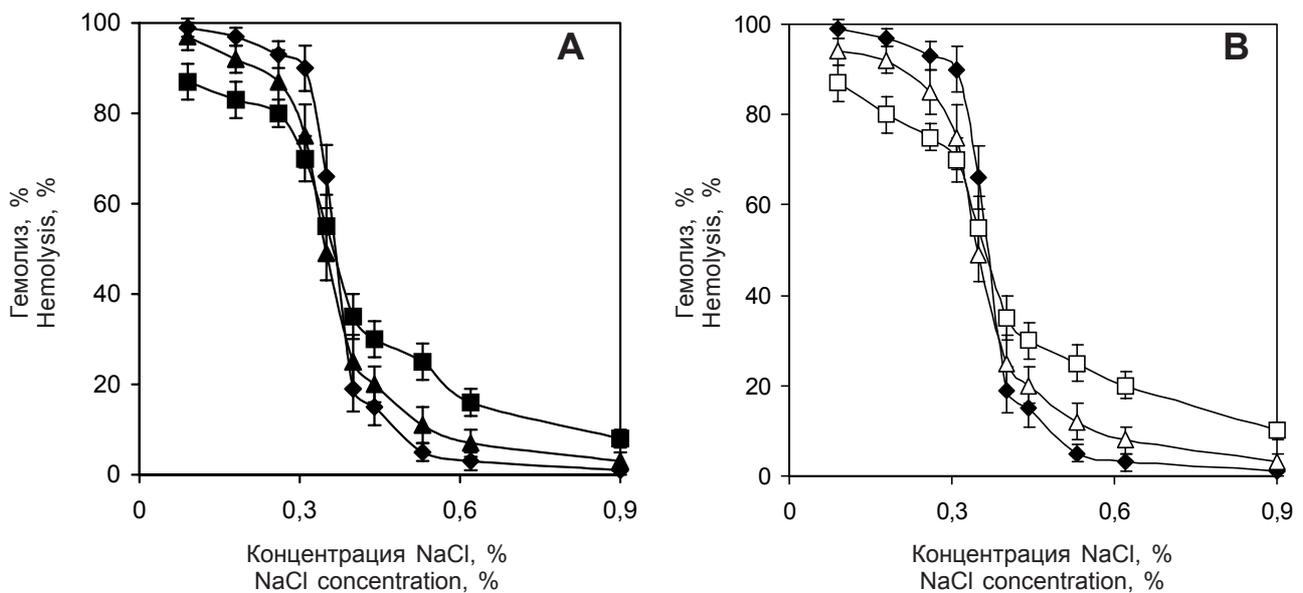
Freeze-thawing of erythrocytes in the media, containing either dextran or PEG 1500 with following washing from cryopreservative resulted in a damage of majority of the cells (60–65%), and a decrease of the glutathione concentration in the survived cells. The intensity of  $H^+$  ion flux in the erythrocytes survived after freeze-thawing was strengthened as compared to the intact cells (Table). The rate of osmotic hemolysis of erythrocytes, frozen-thawed in the media in the case of 0.4–0.9% NaCl concentrations differed from that of intact cells (Fig. 1). The erythrocytes, frozen-thawed in the media with either dextran or PEG 1500 were presented by spherocytes, and spherocytocytes in albumin-contained media (Fig. 2).

In the medium, containing polymers and 1,2-PD the damage rate of frozen erythrocytes increased, herewith in the PEG 1500-containing medium it was higher than in 1,2-PD-containing ones (Table). Osmotic indices of erythrocytes, frozen-thawed in combined media were slightly different from the intact cells (Table, Fig. 1). The erythrocytes frozen in these media were represented by spherocytocytes and under albumin effect most of them were discocyte-shaped, *i. e.* the effect was the same as in intact cells (Fig. 2).

The plasma clotting time was 170 sec, in the presence of intact erythrocytes and hemolysate it made 130 and 95 sec, respectively. The acceleration of blood coagulation was observed in the presence of erythrocytes and hemolysate. Irrespectively of cryopreservative composition the frozen-thawed erythrocytes facilitated more rapid coagulation as compared to the intact cells. Herewith the hemolysate effect of frozen-thawed erythrocytes was slightly different from that of intact cells (Fig. 3).

The combination of non-penetrating and penetrating cryoprotectants was previously demonstrated [11] as critical to preserve erythrocytes during freezing, thereby preserving their resistance to posthypertonic stress during thawing and eliminating the so-called ‘packing effect’. Irrespectively of damage rate (osmotic indices, ion transport, morphology) the erythrocytes, frozen-thawed in different media accelerate the plasma coagulation to the same extent. The intact cells provide slower plasma coagulation, comparing to the frozen-thawed ones. The hemolysates of frozen-thawed and





**Рис. 1.** Зависимость гемолиза эритроцитов от концентрации NaCl для интактных (А), отмытых после замораживания-отогрева (В) в средах: ■ – декстран, ▲ – декстран + 1,2-ПД; □ – ПЭГ-1500, △ – ПЭГ-1500 + 1,2-ПД.

**Fig. 1.** Dependency of erythrocyte hemolysis on NaCl concentration for intact (A), washed after freeze-thawing (B) in the media: ■ – dextran; ▲ – dextran + 1,2-PD; □ – PEG 1500; △ – PEG 1500 + 1,2-PD.

присутствии эритроцитов и гемолизата. Независимо от состава криоконсерванта замороженные-отогретые эритроциты способствуют более быстрой коагуляции по сравнению с интактными клетками. При этом действие гемолизата замороженных-отогретых эритроцитов незначительно отличается от действия гемолизата интактных клеток (рис. 3).

Ранее было показано [6], что для сохранения эритроцитов при замораживании необходима комбинация непроницающего и проникающего крипротекторов, что обеспечивает сохранение их устойчивости к постгипертоническому стрессу при размораживании и устранение так называемого «эффекта упаковки». Независимо от степени повреждения (осмотические показатели, транспорт ионов, морфология) замороженные-отогретые в различных средах эритроциты с одинаковой степенью ускоряют коагуляцию плазмы. Интактные клетки способствуют более медленной коагуляции плазмы, чем замороженные-отогретые. Гемолизаты замороженных и интактных эритроцитов одинаково коагулируют плазму, поэтому можно предположить, что при замораживании-отогреве-отмывании происходит модификация клеточных мембран без изменения активности цитоплазматических гемостатических факторов.

Известно, что при переливании замороженных-отогретых эритроцитов происходят частичный гемолиз и выход в кровяное русло эритроцитарных факторов свертывания крови и антикоагулянтов [1]. Гемолиз эритроцитов приводит к экспонированию

intact erythrocytes coagulate plasma equally, therefore we could assume the modification of cell membrane with no change in activity of cytoplasmic hemostatic factors to occur during freeze-thawing-washing procedure.

A partial hemolysis and release into blood channel of blood clotting erythrocyte factors and anticoagulants are known to occur during transfusion of frozen-thawed erythrocytes [1]. The erythrocyte hemolysis results in thromboplastin exposure and consequently in a contact of phosphatidylserine of inner membrane surface with clotting factors, that causes additional activation of thrombinase [5]. In patients with different hemorrhagic diseases an increase in hemolysing erythrocytes was revealed, that might be of a compensatory-adaptive character. A decrease in hemorrhagic syndrome manifestation under conditions of thrombocytic-vascular hemostasis failure is stipulated by higher procoagulating activity of hemolysate if compared to intact erythrocytes [15].

Thromboplastic factors of erythrocytes and platelets are qualitatively the same, therefore one assumed [5] to use the preparations of erythrocyte membranes to correct hemostasis in patients with hypocoagulation. However, this approach was not introduced into practice, since the conventional osmotic method of erythrocyte membrane procurement (based on erythrocyte hemolysis by 100-fold volume of distilled water) results in their damage [5].

A disorder of asymmetric distribution of phosphatidylserine molecules was demonstrated [9] to occur in

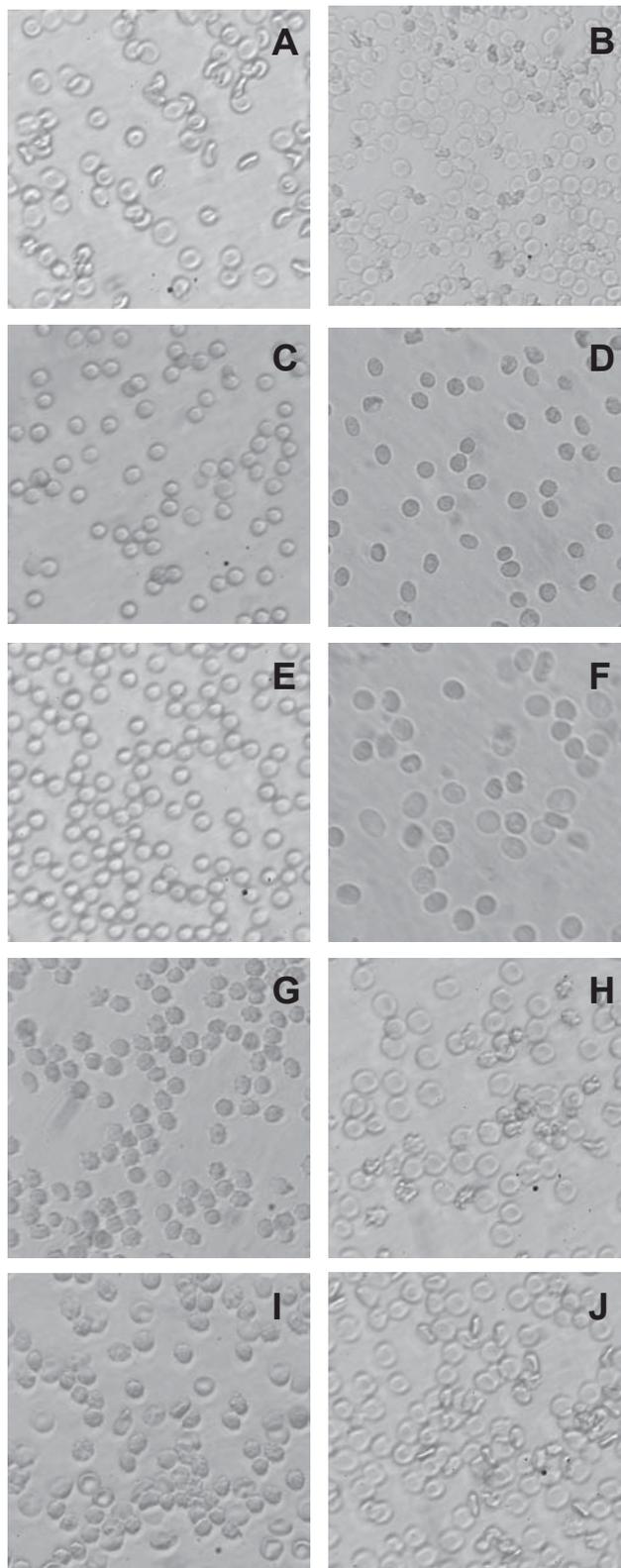
тромбопластина, а, следовательно, и к контакту фосфатидилсерина внутренней поверхности мембран с факторами свертывания, что вызывает дополнительную активацию тромбиназы [3]. У больных с различными геморрагическими заболеваниями было выявлено увеличение количества гемолизирующих эритроцитов, которое может иметь компенсаторно-приспособительный характер. Уменьшение проявления геморрагического синдрома в условиях недостаточности тромбоцитарно-сосудистого гемостаза обусловлено большей прокоагулирующей активностью гемолизата по сравнению с целыми эритроцитами [10].

Тромбопластический фактор эритроцитов и тромбоцитов качественно не отличается, поэтому предполагалось [3] использовать препараты мембран эритроцитов для коррекции гемостаза у больных с гипокоагуляцией. Однако этот подход не нашел практического применения, поскольку существующий осмотический метод получения эритроцитарных мембран (основанный на гемолизе эритроцитов 100-кратным объемом дистиллированной воды) повреждает их [3].

Показано [15], что в мембранах замороженных-отогретых эритроцитов нарушается асимметричное распределение молекул фосфатидилсерина. При замораживании-отогреве в среде с поливинилпирролидоном (20%) повреждалось 50–60% эритроцитов, оставшиеся клетки были представлены сфероцитами, в которых молекулы фосфатидилсерина располагались на внешней поверхности мембраны. При замораживании эритроцитов в среде с поливинилпирролидоном (20%) и глюкозой (0,2 М) количество поврежденных эритроцитов составило менее 10%, оставшаяся часть клеток приобретала форму стоматоцитов и дискоцитов. У 60% оставшихся эритроцитов молекулы фосфатидилсерина выявлялись на поверхности мембраны [15]. Эти данные указывают на то, что при потере частью клеток асимметрии фосфатидилсерина они сохраняют форму стоматоцитов и, возможно, дискоцитов.

Ускорение коагуляции плазмы после внесения гемолизата по сравнению с цельными эритроцитами (рис. 3) вероятно связано с большей доступностью фосфатидилсериновых молекул внутренней поверхности мембран к факторам свертывания. Ускорение коагуляции плазмы замороженными-отогретыми эритроцитами и их гемолизатами значительно не отличается от действия гемолизата интактных клеток (рис. 3).

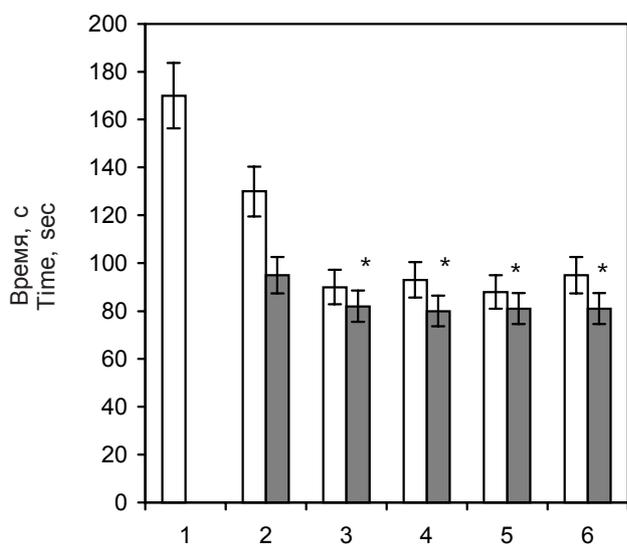
После замораживания-отогрева в среде с декстраном или ПЭГ-1500 эритроциты представлены сфероцитами (см. рис. 2) и являются осмотически хрупкими при концентрации NaCl 0,4–0,9% (см. рис. 1). При замораживании в комбинации



**Рис. 2.** Эритроциты замороженные-отогретые в средах с декстраном (C, D); декстраном и 1,2-ПД (G, H); ПЭГ-1500 (E, F); ПЭГ-1500 + 1,2-ПД (I, J); A, D – интактные клетки; B, D, F, H, J – клетки после действия альбумина (1%).

**Fig. 2.** Erythrocytes, frozen-thawed in media with dextran (C, D); dextran and 1,2-PD (G, H); PEG 1500 (E, F); PEG 1500 + 1,2-PD (I, J); A, D – intact cells; B, D, F, H, J – cells after albumin (1%) effect.





**Рис. 3.** Время коагуляции плазмы в присутствии эритроцитов (□) ( $3,0 \times 10^8$  кл/мл) и их гемолизатов (■): 1 – плазма без клеток; 2 – интактные эритроциты; 3, 4 – эритроциты, замороженные-отогретые в среде с декстраном, декстраном и 1,2-ПД соответственно; 5, 6 – эритроциты, замороженные-отогретые в среде с ПЭГ-1500, ПЭГ-1500 и 1,2-ПД соответственно; \* – отличия статистически значимы по сравнению с интактными эритроцитами (\*),  $p < 0,05$ .

**Fig. 3.** Time of plasma clotting in erythrocyte presence (□) ( $3.0 \times 10^8$  cells/ml) and their homolysates (■): 1 – cell-free plasma; 2 – intact erythrocytes; 3, 4 – erythrocytes frozen-thawed in the medium with dextran, dextran and 1,2-PD, respectively; 5, 6 – erythrocytes, frozen-thawed in the medium with PEG 1500, PEG 1500 and 1,2-PD, respectively; \* – differences are statistically significant as compared to intact erythrocytes (\*),  $p < 0.05$ .

ных средах эритроциты представлены сфероэхиноцитами (см. рис. 2), однако их осмотические показатели сходны с показателями интактных клеток (см. рис. 1). Можно предположить, что после замораживания эритроцитов в среде с декстраном или ПЭГ-1500 нарушается асимметрия мембран относительно фосфатидилсериновых молекул. При замораживании в комбинированных средах частично нарушается асимметрия фосфатидилсерина, что инициирует сфероэхиноцитоз, однако в присутствии альбумина сфероэхиноциты приобретают форму дискоцитов и стоматоцитов (см. рис. 2, G, H, I, J), что не свойственно для сфероцитов (см. рис. 2, C, D, E, F). Это также усиливает тромбoplastическую активность эритроцитов, значительно не изменяя их осмотические характеристики.

Таким образом, замораживание-отогрев эритроцитов в средах с полимерами (декстран или ПЭГ-1500) приводит к их значительному повреждению, усилению тромбoplastической активности остатка клеток и нарушению их осмотических характеристик. При замораживании-отогреве в

frozen-thawed erythrocyte membranes. During freeze-thawing in the medium with polyvinyl pyrrolidone (20%) the number of damaged erythrocytes was 50–60%, the survived cells were presented by spherocytes with phosphatidylserine molecules located on outer membrane surface. Following erythrocyte freeze-thawing in the medium with polyvinyl pyrrolidone (20%) and glucose (0.2 M) a number of damaged erythrocytes was lower than 10%, the survived cells were stomatocyte- and discocyte-shaped. In 60% of survived erythrocytes the phosphatidylserine molecules were revealed on membrane surface [9]. These data point to the fact, that when some cells lose phosphatidylserine asymmetry, they preserve the stomatocyte and possibly discocyte shapes.

The acceleration of plasma coagulation after hemolysate introduction as compared to the whole erythrocyte (Fig. 3) was probably associated to a higher accessibility of phosphatidylserine molecules of inner membrane surface to clotting factors. The acceleration of plasma clotting by frozen-thawed erythrocytes and their hemolysates did not significantly differ from the effect of intact cell hemolysate (Fig. 3).

After freeze-thawing in the medium with either dextran or PEG-1500 the erythrocytes were presented by spherocytes (see Fig. 2), being osmotically fragile at 0.4–0.9% NaCl concentration (see Fig. 1). During freezing in combined media the erythrocytes were presented by spherocochinocytes (see Fig. 2), but their osmotic indices were similar to those of intact cells (see Fig. 1). We could assume that erythrocyte freeze-thawing in the medium with dextran or PEG 1500 results in a disorder in membrane asymmetry in terms of phosphatidylserine molecules. Following freeze-thawing in combined media only a partial disorder in phosphatidylserine asymmetry occurred, that initiated spherocochinocytosis, however, in the presence of albumin the spherocochinocytes became discocyte- and stomatocyte-shaped (see Fig. 2, G, H, I, L), that was not inherent to spherocytes (see Fig. 2, C, D, E, F). This also strengthened a thromboplast activity of erythrocytes, without significant change in their osmotic characteristics.

Thus, the erythrocyte freeze-thawing in the media with polymers (dextran or PEG 1500) resulted in their significant damage, strengthening of thromboplast activity of survived cells and disorders in their osmotic characteristics. Freeze-thawing in combined media with polymer and penetrating cryoprotectant (1,2-PD) resulted in a reduction of cell damage rate, herewith their thromboplast activity was strengthened and osmotic characteristics were preserved. Our findings enabled to suggest the erythrocyte freeze-thawing in the media with polymers as a cause of a complete disorder of phosphatidylserine molecule asymmetry in

комбинированных средах с полимером и проникающим криопротектором (1,2-ПД) степень повреждения клеток уменьшается, при этом усиливается их тромбопластическая активность и сохраняются осмотические характеристики. Полученные результаты позволяют предположить, что замораживание-отогрев эритроцитов в средах с полимерами вызывает полное нарушение асимметрии молекул фосфатидилсерина в мембранах и их поступление на внешнюю поверхность клеток. Это является причиной сфероцитоза и усиления тромбопластической активности эритроцитов. При замораживании-отогреве эритроцитов в комбинированных средах происходит частичная переориентация фосфатидилсерина на внешнюю сторону клеточных мембран без значительного нарушения асимметричности, тем не менее этого достаточно для выраженного усиления тромбопластической активности оставшихся клеток при сохранении их осмотических характеристик. В перспективе эритроцитарная масса (эритроциты, криоконсервированные в комбинированных средах с непроницающими и проникающими криопротекторами) может использоваться для пациентов с геморрагическими заболеваниями не только с целью восполнения потери крови, но и усиления ее свертывающей активности.

## Выводы

1. Отмечается нарушение осмотических показателей (барьерная функция мембран для глутатиона, поток ионов  $H^+$  и осмотическая хрупкость) эритроцитов, отмытых физраствором после замораживания-отогрева в средах с полимерами (декстран или ПЭГ-1500).

2. Установлено сохранение осмотических характеристик эритроцитов, отмытых физраствором после замораживания в комбинированных средах с полимерами и 1,2-ПД.

3. После замораживания-отогрева в среде с полимерами эритроциты представлены сфероцитами, при действии альбумина трансформируются в сфероэхиноциты. После замораживания в комбинированных средах эритроциты приобретают форму сфероэхиноцитов, а при действии альбумина – дискоцитов и стоматоцитов.

Осмотические показатели эритроцитов, отмытых после замораживания в различных средах  
Osmotic indices of erythrocytes washed after freeze-thawing in different media

Образцы клеток Cell samples	Среды замораживания Freezing media	Гемолиз, % Hemolysis, %	Глутатион, мкмоль/г Hb Glutathione, $\mu\text{mol/g Hb}$	Поток ионов $H^+$ в сульфатной среде ( $J_m \times 10^6$ ), моль $\times \text{см}^{-2} \times \text{с}^{-1}$ $H^+$ ion flux in sulphate medium ( $J_m \times 10^6$ ), $\text{mol} \times \text{cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$
Интактные Intact	–	$0,0 \pm 0,0$	$9,5 \pm 1,6$	$0,85 \pm 0,14$
Замороженные-отогреты Frozen-thawed	Декстран (20%) Dextran (20%)	$65,0 \pm 2,0$	$8,8 \pm 1,4$ n/w $4,0 \pm 0,8^{\#}$ w	$1,58 \pm 0,31^*$
	Декстран + 1,2-ПД (15%) Dextran + 1,2-PD (15%)	$26,0 \pm 3,5$	$8,9 \pm 1,6$ n/w $7,3 \pm 1,1$ w	$0,98 \pm 0,18$
	ПЭГ-1500 (20%) PEG 1500 (20%)	$60,0 \pm 3,0$	$8,7 \pm 1,5$ n/w $4,1 \pm 0,7^{\#}$ w	$1,65 \pm 0,33^*$
	ПЭГ-1500 + 1,2-ПД (15%) PEG 1500 + 1,2-PD (15%)	$7,0 \pm 2,5$	$8,5 \pm 1,6$ n/w $7,0 \pm 1,3$ w	$1,10 \pm 0,25$

**Примечание:** n/w, w – до и после отмывания соответственно; \*, # – отличия статистически значимы по сравнению с данными для интактных и неотмытых эритроцитов ( $p < 0,05$ ).

**Note:** n/w, w – prior to and after washing, respectively; \*, # – statistically significant differences as compared to the data of intact and non-washed erythrocytes ( $p < 0.05$ ).

membranes and their transition to the outer surface of cells. This caused spherocytosis and strengthened thromboplastic activity of erythrocytes. Following erythrocyte freeze-thawing in combined media a partial transition of phosphatidylserine onto the outer side of cell membranes occurred without a significant disorder in asymmetry, though it was sufficient to strengthen significantly the thromboplastic activity of the survived cells, which preserved their osmotic characteristics. The packed erythrocytes (cryopreserved in combined media with non-penetrating and penetrating cryoprotectants) may be used in future for the patients with hemorrhagic diseases both for blood loss replacement, and for clotting activity strengthening as well.

## Conclusions

1. A disorder of osmotic indices (membrane barrier function for glutathione,  $H^+$  ion flux and osmotic fragility) was found in erythrocytes, washed with physiological saline after freeze-thawing in media with polymers (dextran or PEG 1500).

2. Osmotic characteristics were preserved in erythrocytes, washed with physiological saline after freezing in combined media with polymers and 1,2-PD.

3. After freeze-thawing in the medium with polymers the erythrocytes were presented by spherocytes, under albumin effect they were transformed into spherocochinocytes. After freezing in combined media



4. Замороженные-отогретые эритроциты, независимо от состава криоконсерванта, ускоряют коагуляцию плазмы по сравнению с интактными клетками.

### Литература

1. Аграненко В.А., Федорова Л.И. Замороженная кровь и ее клиническое применение. – М.: Медицина, 1983. – 96 с.
2. Ашмарин И.П., Васильев И.П., Амбросов А.В. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов. Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1975. – 76 с.
3. Григорьев Г.И. Способ атравматического деплазмирования эритроцитов с целью получения их оболочек, способных выполнять гемостатическую функцию тромбоцитов // Клинич. лаборатор. диагностика. – 1999. – №7. – С. 18–21.
4. Основы клинической гематологии. Справочное пособие / Под ред. В.Г. Радченко. – СПб. – 2003. – 242 с.
5. Потехин К.Г., Никитин Ю.П., Феденков В.И. Коагуляционные и фибринолитические свойства эритроцитов кролика при экспериментальном атеросклерозе // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1971. – №12. – С. 16–19.
6. Рамазанов В.В. Влияние комбинированных сред на повреждение эритроцитов, замороженных с различным гематокритом // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, №2. – С. 155–163.
7. Рамазанов В.В., Бондаренко В.А. Осмотические свойства эритроцитов, замороженных в средах с непроницаемыми и проникающими криопротекторами // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, №1. – С. 47–58.
8. Рамазанов В.В., Бондаренко В.А. Определение содержания аденозинтрифосфата и 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах донорской крови при замораживании // Актуальные проблемы современной медицины. – 2016. – Т. 16, Вып. 1 (53). – С. 233–237.
9. Рамазанов В.В., Забродский Р.Ф., Найдюк Я.Ю., Бондаренко В.А. Функционирование системы транспорта ионов  $H^+$  при модификации мембран эритроцитов в условиях моделирующих условия замораживания // Вісник проблем біології і медицини. – 2010. – Вып. 3. – С. 186–192.
10. Селезнев А.В. Резистентность эритроцитов при геморрагических тромбоцитопатиях и тромбоцитарно-сосудистый гемостаз // Проблемы гематологии и переливания крови. – 2004. – №4. – С. 35–42.
11. Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. – New York: Grune&Stratton, 1975. – 160 p.
12. Bosman G.J. Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: structural aspects and implications for transfusion // Transfus. Med. – 2008. – Vol. 18, №6. – P. 335–347.
13. Hoffman J.F. On the mechanism and measurement of shape transformations of constant volume of human red blood cells // Blood Cells. – 1987. – Vol. 12, №3. – P. 565–588.
14. Hoffman M., Monroe D.M. A cell-based model of hemostasis // Thromb. Haemost. – 2001. – Vol. 85, №6. – P. 958–965.
15. Quan G., Zang L., Guo Y. et al. Intracellular sugars improve survival of human red blood cells cryopreserved at –80 degrees C in the presence of polyvinyl pyrrolidone and human serum albumin // CryoLetters. – 2007. – Vol. 28, №2. – P. 95–108.
16. Sims P.J., Wiedmer T. Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling // Thromb. Haemost. – 2001. – Vol. 86. – P. 266–275.

the erythrocytes became spherocochinocyte-shaped ones, but under albumin effect they were discocyte- and stomatocyte-shaped.

4. Frozen-thawed erythrocytes independently on cryopreservative composition accelerated the plasma coagulation as compared to the intact cells.

### References

1. Agranenko V.A., Fedorova L.I. Frozen blood and its clinical application. Moscow: Meditsyna; 1983.
2. Ashmarin I.P., Vasilyev I.P., Ambrosov A.V. Express methods of statistical analysis and design of experiments. Leningrad: Publishing House of Leningrad University; 1975.
3. Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. New York: Grune&Stratton; 1975.
4. Bosman G.J. Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: structural aspects and implications for transfusion. Transfus Med 2008; 18(6): 335–347.
5. Grigoriev G.I. Way for atraumatic plasma removal of erythrocytes to procure their membranes, capable to implement hemostatic platelet function. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika 1999; (7): 18–21.
6. Hoffman J.F. On the mechanism and measurement of shape transformations of constant volume of human red blood cells. Blood Cells 1987; 12(3): 565–588.
7. Hoffman M., Monroe D.M. A cell-based model of hemostasis. Thromb Haemost 2001; 85(6): 958–965.
8. Potekhin K.G., Nikitin Yu.P., Fedenkov V.I. Coagulation and fibrinolytic properties of rabbit erythrocytes in experimental atherosclerosis. Bul Exp Biol Med 1971; (12): 16–19.
9. Quan G., Zang L., Guo Y. et al. Intracellular sugars improve survival of human red blood cells cryopreserved at –80 degrees C in the presence of polyvinyl pyrrolidone and human serum albumin. CryoLetters 2007; 28(2): 95–108.
10. Radchenko V.G., editor. Fundamentals of clinical hematology. Reference manual. St. Petersburg; 2003.
11. Ramazanov V.V. Effect of combined media on damage of red blood cells frozen with different hematocrit. Problems of Cryobiology 2006; 16(2): 155–163.
12. Ramazanov V.V., Bondarenko V.A. Osmotic properties of red blood cells, frozen in media containing non-penetrating and penetrating cryoprotectants. Problems of Cryobiology 2010; 20(1): 47–58.
13. Ramazanov V.V., Bondarenko V.A. Determination of ATP and 2,3-diphosphoglycerate content in erythrocytes of donor blood during freezing. Actual Problems of Modern Medicine 2016; 16(1): 233–237.
14. Ramazanov V.V., Zabrodski R.F., Naydyuk Ya.Yu., Bondarenko V.A. Functioning of  $H^+$  ion transport system during modification of erythrocyte membranes under conditions, modeling freezing ones. Visnyk Problem Biol Med 2010; (3): 186–192.
15. Seleznev A.V. Erythrocytes resistance at hemorrhagic thrombocytopeny and platelet-vascular hemostasis. Problemy Gematologii i Perelivaniya Krovi 2004; (4): 35–42.
16. Sims P.J., Wiedmer T. Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. Thromb Haemost 2001; 86: 266–275.