

# КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ  
При поддержке Российского общества патологоанатомов

Том 8 | № 4 | 2019

ISSN 2226-5988 (print)  
ISSN 2686-6749 (online)

«Клиническая  
и экспериментальная  
морфология»  
научно-практический  
рецензируемый журнал

Периодичность 4 раза в год

Основан в 2011 году

Включен в перечень ВАК

Журнал представлен  
в информационной базе  
данных РИНЦ  
(Российский индекс  
научного цитирования)

## Учредитель

ФГБНУ «Научно-  
исследовательский институт  
морфологии человека»

117418, Москва,  
ул. Цюрупы, д. 3

Адрес редакции  
117418, Москва, ул. Цюрупы,  
д. 3

Телефоны +7 (499) 120-13-34  
+7 (499) 128-87-01

e-mail: cem.journal@mail.ru  
[www.cem-journal.ru](http://www.cem-journal.ru)  
[www.morfolhum.ru](http://www.morfolhum.ru)

Тираж 500 экземпляров

Издательство  
«Группа МДВ»  
[www.mdv-group.ru](http://www.mdv-group.ru)

Подписные индексы:  
**70045** по каталогу агентства  
«Роспечать»  
**70045** по каталогу «Урал-Пресс»

Свидетельство о регистрации  
средства массовой информации  
ПИ № ФС77-47183  
от 2 ноября 2011 года.

© ФГБНУ «Научно-  
исследовательский институт  
морфологии человека»

Главный редактор  
Кактурский Л.В., член-корреспондент РАН, доктор мед. наук, профессор

## Заместители главного редактора

Зайратьянц О.В., доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия

Макарова О.В., доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия

## Ответственный секретарь

Болтовская М.Н., доктор биол. наук, профессор, Москва, Россия

## Редакционная коллегия

Александрова М.А., доктор биол. наук,  
Москва, Россия

Алексеева Н.Т., доктор мед. наук,  
профессор, Воронеж, Россия

Алиев Г.М., доктор мед. наук, профессор,  
Сан-Антонио, США

Андреева Е.Р., доктор биол. наук, доцент,  
Москва, Россия

Банин В.В., член-корр. РАН, доктор  
мед. наук, профессор, Москва, Россия

Большакова Г.Б., доктор биол. наук,  
Москва, Россия

Бураков С.В., доктор мед. наук,  
Москва, Россия

Гарновская М.Н., кандидат биол. наук,  
доцент, Чарльстон, США

Ковригина А.М., доктор биол. наук,  
профессор, Москва, Россия

Кориунов А.Г., доктор мед. наук,  
профессор, Гейдельберг, Германия

Кочуков М.Ю., доктор мед. наук,  
Хьюстон, США

Кушилинский Н.Е., академик РАН, доктор  
мед. наук, профессор, Москва, Россия

Марков И.И., доктор мед. наук,  
профессор, Самара, Россия

Михалева Л.М., доктор мед. наук,  
профессор, Москва, Россия

Никитюк Д.Б., член-корр. РАН,  
доктор мед. наук, профессор, Москва,  
Россия

Пауков В.С., доктор мед. наук, профессор,  
Москва, Россия

Постнов А.Ю., доктор мед. наук,  
Москва, Россия

Рогов Ю.И., кандидат мед. наук, доцент,  
Минск, Республика Беларусь

Рыжова М.В., доктор мед. наук,  
Москва, Россия

Савельев С.В., доктор биол. наук,  
профессор, Москва, Россия

Туркина Е.В., кандидат биол. наук, доцент,  
Чарльстон, США

Черняев А.Л., доктор мед. наук,  
профессор, Москва, Россия

Яглова Н.В., доктор мед. наук, Москва,  
Россия

## Редакционный совет

Волоцук И.Н., доктор мед. наук,  
профессор, Москва, Россия

Воронин К.Э., доктор мед. наук, доцент,  
Чарльстон, США

Доросевич А.Е., доктор мед. наук,  
профессор, Смоленск, Россия

Ермолаева С.А., доктор мед. наук,  
Москва, Россия

Ерофеева Л.М., доктор биол. наук,  
профессор, Москва, Россия

Знойко И.Ю., кандидат биол. наук,  
Чарльстон, США

Кондашевская М.В., доктор биол. наук,  
доцент, Москва, Россия

Кононов А.В., доктор мед. наук,  
профессор, Омск, Россия

Кравцов В.Г., кандидат мед. наук,  
Тель-Авив, Израиль

Милованов А.П., доктор мед. наук,  
профессор, Москва, Россия

Мишинев О.Д., доктор мед. наук,  
профессор, Москва, Россия

Мхитаров В.А., кандидат биол. наук,  
Москва, Россия

Новочадов В.В., доктор мед. наук,  
профессор, Волгоград, Россия

Пархоменко Ю.Г., доктор мед. наук,  
профессор, Москва, Россия

Рыбакова М.Г., доктор мед. наук,  
профессор, Санкт-Петербург, Россия

Фатхудинов Т.Х., доктор мед. наук,  
доцент, Москва, Россия

Черников В.П., кандидат мед. наук,  
Москва, Россия

Яглов В.В., доктор мед. наук, профессор,  
Москва, Россия

К публикации принимаются только статьи, подготовленные в соответствии с правилами редакции.  
Точка зрения авторов может не совпадать с мнением редакции.

Перепечатка и любое воспроизведение материалов и иллюстраций в печатном или электронном виде из журнала  
«Клиническая и экспериментальная морфология» допускаются только с письменного разрешения издателя.

© Коллектив авторов, 2019

DOI: 10.31088/CEM2019.8.4.42-48

УДК: 576.3.08; 576.31; 612.1

# Изменение морфологических характеристик клеток цельной человеческой крови и сгустков свиной крови при различных способах ее хранения

**К.Д. Топчу<sup>1</sup>, Е.М. Пономарчук<sup>1</sup>, А.В. Кунтурова<sup>1</sup>, П.Б. Росницкий<sup>1</sup>,  
Т.Д. Хохлова<sup>2</sup>, Я.Н. Ванг<sup>3</sup>, В.А. Хохлова<sup>1,3</sup>, С.В. Буравков<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва, Россия

<sup>2</sup> Департамент гастроэнтерологии медицинской школы Университета штата Вашингтон, Сиэтл, США

<sup>3</sup> Центр промышленного и медицинского ультразвука при лаборатории прикладной физики Университета штата Вашингтон, Сиэтл, США

<sup>4</sup> ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, Москва, Россия

**Введение.** Для отсроченного проведения исследований по акустическому воздействию на образцы коагулированной крови как модели внутренних гематом человека необходимо определение способа ее хранения, минимизирующего изменения ее морфологических характеристик.

**Цель работы** – сравнение различных способов и оценка допустимого времени хранения жидкой и коагулированной цельной крови с использованием методов ультраструктурного анализа.

**Материалы и методы.** В качестве образцов жидкой крови использовали цельную человеческую кровь, хранившуюся в течение 7 суток с антикоагулянтом цитрат–фосфат–декстроза (ЦФД) и в течение 9 суток с добавлением солевого раствора аденин–глюкоза–манинит (САГМ). Для моделирования гематом применяли свиную кровь, коагулированную естественным образом сразу после забора и затем хранившуюся в течение 2 суток в полиакриламидном геле, физиологическом растворе и геле из агара. Каждые сутки осуществляли забор содержимого образцов, его подготовку и анализ с помощью сканирующей электронной микроскопии. При хранении цельной крови с антикоагулянтом также каждый день проверяли возможность и скорость ее коагуляции путем добавления 25 ммоль раствора  $\text{CaCl}_2$ .

**Результаты.** Было показано, что в течение 5 суток хранения цельной крови в ЦФД изменения морфологических свойств эритроцитов проявляются незначительно вне зависимости от присутствия САГМ. К 7-м суткам заметно растет степень эхиноцитоза и агрегации эритроцитов, что несколько сдерживается добавлением САГМ. Время свертывания крови с помощью раствора не изменялось в течение срока хранения и находилось в пределах 10–12 минут при температуре +37°C. Также выявлено, что при хранении коагулированной крови в геле из агара морфология клеток сохраняется. Хранение в физиологическом растворе приводит к уменьшению видимой части фибриновых волокон, а в полиакриламидном геле – к заметному гемолизу уже спустя сутки хранения.

**Заключение.** С целью отсроченного использования сгустков цельной крови при сохранении ее морфологических характеристик предпочтительны либо хранение цельной крови в некоагулированном состоянии и коагуляция непосредственно перед исследованием, либо хранение сгустков крови в контейнере из агарового геля.

**Ключевые слова:** хранение крови, антикоагулянт, цитрат–фосфат–декстроза, солевой раствор аденин–глюкоза–манинит, гематома, сканирующая электронная микроскопия, гистотрипсия.

**Для корреспонденции:** Ксения Дмитриевна Топчу. E-mail: topchu.kd17@physics.msu.ru

**Для цитирования:** Топчу К.Д., Пономарчук Е.М., Кунтурова А.В., Росницкий П.Б., Хохлова Т.Д., Ванг Я.Н., Хохлова В.А., Буравков С.В. Изменение морфологических характеристик клеток цельной человеческой крови и сгустков свиной крови при различных способах ее хранения. Клин. эксп. морфология. 2019;8(4):42–48. DOI:10.31088/CEM2019.8.4.42-48

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ-ОНКО № 17-54-33034 Фонда развития теоретической физики и математики «БАЗИС» № 18-2-6-163-1 и Focused Ultrasound Foundation (FUSF) Global Internship Program.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 23.09.2019. Получена после рецензирования 08.11.2019. Принята в печать 19.11.2019.

## Changes of morphological characteristics of whole human blood and porcine coagulated blood cells depending on a storage method

**K.D. Topchu<sup>1</sup>, E.M. Ponomarchuk<sup>1</sup>, A.V. Kunturova<sup>1</sup>, P.B. Rosnitsky<sup>1</sup>,  
T.D. Khokhlova<sup>2</sup>, Y.N. Wang<sup>3</sup>, V.A. Khokhlova<sup>1,3</sup>, S.V. Buravkov<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Physics, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Department of Medicine, Division of Gastroenterology, Seattle, USA

<sup>3</sup> Center for Industrial and Medical Ultrasound, University of Washington, Seattle, USA

<sup>4</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine, Moscow, Russia

**Introduction.** For delayed studies on the acoustic exposure of coagulated blood samples as a model of human internal hematomas, it is necessary to find a method for storing blood that minimizes changes of its morphological characteristics. The aim of the study was to compare various methods and assess the possible storage time of uncoagulated and coagulated whole blood by means of the ultrastructural analysis.

**Materials and methods.** Whole human blood was used as a sample of uncoagulated blood, stored for seven days with the anticoagulant Citrate Phosphate Dextrose (CPD), and nine days with the Saline Adenine Glucose Mannitol Solution (SAGM). Porcine blood was used as hematoma model, coagulated naturally immediately after collection and then stored for two days in a polyacrylamide gel, saline and agar gel. Daily, the contents of the samples were collected, processed and analyzed by means of the scanning electron microscopy. Upon whole blood storage with an anticoagulant, the possibility and rate of its coagulation was also controlled every day by adding 25 mmol CaCl<sub>2</sub> solution.

**Results.** Morphological characteristics of red blood cells have changed slightly regardless of the presence of SAGM within five days of whole blood storage in the CPD. By the 7th day of storage, degree of echinocytosis and aggregation of erythrocytes has considerably increased, which is slightly constrained by the addition of SAGM. The coagulation time with CaCl<sub>2</sub> solution has not changed during the storage period and was within 10–12 minutes at a temperature of +37°C. It was also shown that coagulated blood storage in agar gel preserved morphological properties of the cells. Storage in saline leads to the loss of fibrin fibers, and in polyacrylamide gel – to considerable hemolysis after a day of storage.

**Conclusion.** For the purpose of delayed use of whole blood clots with maintained morphological characteristics of the cells, it is preferable to store the whole blood uncoagulated and coagulate it right before the study, or to store blood clots in an agar gel container.

**Keywords:** blood storage, anticoagulant, citrate phosphate dextrose, saline adenine glucose mannitol solution, hematoma, scanning electron microscopy, histotripsy.

**Corresponding author:** Kseniya D. Topchu. E-mail: topchu.kd17@physics.msu.ru

**For citation:** K.D. Topchu, E.M. Ponomarchuk, A.V. Kunturova, P.B. Rosnitsky, T.D. Khokhlova, Y.N. Wang, V.A. Khokhlova, S.V. Buravkov. Changes of morphological characteristics of whole human blood and porcine coagulated blood cells depending on a storage method. Clin. exp. morphology. 2019;8(4):42–48. (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2019.8.4.42-48

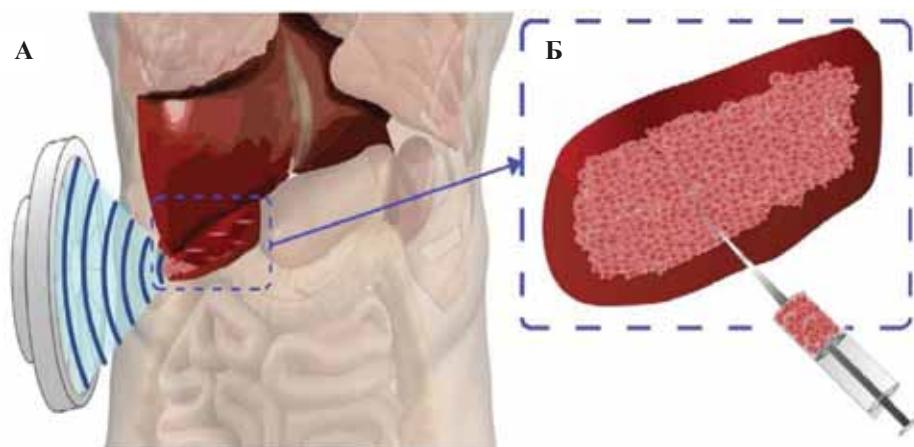
**Funding.** This study was supported by RFBR-ONCO grant No.17-54-33034, Foundation for the Advancement of Theoretical Physics and Mathematics «BASIS» grant No.18-2-6-163-1, and Focused Ultrasound Foundation (FUSF) Global Internship Program.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 23.09.2019. Received in revised form 08.11.2019. Accepted 19.11.2019.

В настоящее время активно ведутся исследования, направленные на изучение свойств и характеристик крови [1, 2]. При этом интерес представляет изучение свойств крови не только в жидком, но и в коагулированном состоянии. Одним из примеров таких исследований в области медицинской акустики является возможность неинвазивного разрушения внутренних гематом человека мощным фокусированным ультразвуком (в англоязычной литературе – high intensity focused ultrasound, HIFU) [3]. Предлагаемый способ направлен на расширение используемых сегодня хирургических методов удаления крупных гематом с целью ускорения лечения и восстановительного периода, а также предотвращения послеоперационных осложнений.

Метод механического разрушения биологической ткани с помощью мощного фокусированного ультразвука (гистотрипсия) уже используется в течение последних двух десятилетий для различных клинических приложений [4]. Суть метода состоит в импульсном воздействии на ткань, при котором взаимодействие каждого из импульсов с образующейся в фокальной области ультразвукового излучателя парогазовой полостью либо кавитационным облаком приводит к раздроблению ткани на мелкие фрагменты субклеточных размеров (рис. 1 А). При разрушении гематомы полученная суспензия разжиженной ткани впоследствии может быть удалена путем аспирации тонкой иглой (рис. 1 Б), тем самым снижая боль и уменьшая отсроч-



*Рис. 1. Иллюстрация идеи применения мощного фокусированного ультразвука для разжижения и аспирации внутренних гематом на примере гематомы печени*

*Fig. 1. Illustration of the idea of using high-intensity focused ultrasound for liquefaction and aspiration of internal hematomas through the liver hematoma example*

ченные эффекты инвазивного вмешательства. Помимо прямого клинического приложения модель гематомы также является наиболее простым фантомом биологической ткани, ее использование в акустическом эксперименте позволяет тестировать ультразвуковые установки HIFU и оптимизировать протоколы облучения иных видов тканей [3, 5].

Хранение клеток крови в растворе, проявляющем антикоагулянтное или консервационное действие, может повлиять на их морфологические характеристики. Например, ранее были предоставлены косвенные доказательства, что при хранении клеток крови с антикоагулянтом ЦФД (цитрат–fosfat–декстроза) и добавочным консервационным раствором САГМ (солевой раствор аденин–глюкоза–маннит), питающим клетки крови и поддерживающим ее функции, они претерпевают повреждения в меньшей степени, чем при хранении в ЦФДА (цитрат–фосфат–декстроза–аденин) [6]. Также высказывалось предположение, что хранение эритроцитов в ЦФД–САГМ может быть схожим с процессом старения клеток крови *in vivo* в отличие от других способов хранения. Наряду с этим отмечалось, что при хранении цельной крови присутствие консервантов сдерживает метаболические изменения эритроцитов, в частности, приводящие к их агрегации [7].

В соответствии с руководством ВОЗ [8] клетки крови, помещенные в среду гемоконсерванта, рекомендуется хранить до 30–35 дней. При этом их морфологические и физиологические характеристики могут изменяться в течение этого периода, однако восстанавливаются после переливания. При подготовке образцов гематом для акустического эксперимента по облучению сгустков крови критичным является сохранение морфологических характеристик клеток крови именно в момент коагуляции. Кроме того, при нарушении герметичности упаковки, содержащей кровь, что связано с периодическим забором биологического материала, изменения могут проявляться на более ранних сроках.

Результаты исследования свойств клеток крови при хранении эритроцитарной массы отдельно от плазмы свидетельствуют об обратимости изменений, проис-

ходящих при хранении эритроцитов в течение первых двух недель [9, 10]. К ним относится, например, ранняя стадия эхиноцитоза [7, 11]. Повреждения, наступающие после 4 недель хранения (снижение эластичности стеки эритроцита, изменение его диаметра, появление выростов на его поверхности, образование везикул), как правило, необратимы [10]. В исследованиях по ультразвуковому воздействию на сгустки крови критичными могут оказаться и обратимые изменения эритроцитов, если они влияют на гемореологические свойства крови: вязкость, упругость мембраны клеток, индекс деформируемости и т.д., поскольку отклик облучаемого сгустка на воздействие ультразвуком определяется его акустическими (то есть упругими) свойствами. В литературе представлены данные по изменениям преимущественно физиологических свойств эритроцитов при их хранении [11, 12]. Исследование же упругих параметров крови показало, что при хранении эритроцитарной массы в физиологическом растворе аденина изменения формы клеток, а также серьезные гемореологические нарушения, в том числе снижение деформируемости эритроцитов вследствие аномалий формы, ацидоз и снижение свертываемости крови, начинаются уже на 2-й неделе хранения [9]. Кроме того, при хранении эритроцитодержащей смеси при стандартных температурных условиях с добавлением CPDA-1 наблюдалось увеличение средних значений модуля Юнга эритроцитов, что свидетельствует о снижении эластичности клеточной мембрany [13].

Таким образом, для проведения акустических экспериментов по облучению сгустков крови важно исследовать изменение параметров, связанных с морфологическими характеристиками клеток крови при различных способах ее хранения, и определить наиболее щадящий, то есть не изменяющий первоначальные свойства, способ хранения либо цельной, либо коагулированной крови.

Целью работы являлись сравнительный анализ различных способов и оценка допустимого времени хранения клеток крови для приготовления модели гематомы. С помощью методов ультраструктурного анализа исследовано изменение морфологических характеристик

цельной человеческой крови под действием антикоагулянта и консервационного раствора, а также влияние различных способов хранения сгустков свиной крови: в 10% полиакриламидном геле (ПАА), в физиологическом растворе (фосфатно-буферном растворе) и в 6% геле из агара.

## Материалы и методы

При проведении экспериментов в качестве образцов жидкой крови использовалась цельная человеческая кровь, хранившаяся в течение 7 суток при температуре +5°C с антикоагулянтом ЦФД, а также в течение 9 суток с добавлением к нему консервационного раствора САГМ (рис. 2 А).

В качестве образцов гематом использовалась свежая свинья кровь, полученная с бойни и коагулированная естественным образом сразу после забора, с последующим хранением полученных сгустков в течение 2 суток в полиакриламидном геле (акриламид и персульфат аммония (PANREAC AppliChem, Германия), ТМЭДА и бисакриламид (Sigma-Aldrich, США), физиологическом растворе (ООО «ПанЭко», Россия) и геле из пищевого агара (Kotanyi) (рис. 2 Б–Г).

Раз в сутки на протяжении всего времени хранения образцов цельной крови и гематом осуществлялись забор содержимого и его подготовка к сканирующей электронной микроскопии (СЭМ): нанесенный на клейкую ленту образец фиксировался в 2,5% растворе глютаральдегида (DC Panreac, США), обезвоживался в этиловых спиртах восходящей концентрации, пропитывался в гексаметилдисилазане (Sigma-Aldrich, США), высушивался на воздухе, и далее готовая лен-

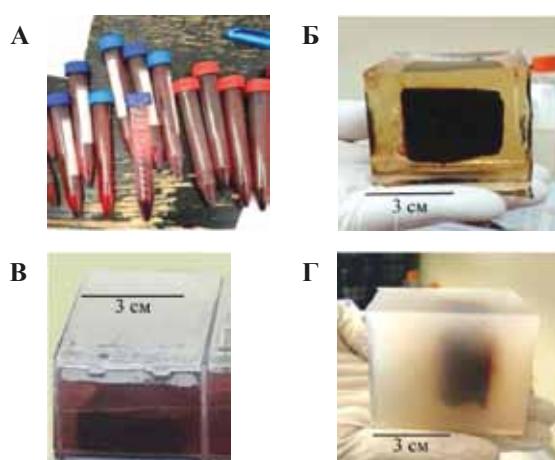


Рис. 2. Способы хранения крови для акустического эксперимента.

А – цельная человеческая кровь с антикоагулянтом; Б–Г – свинья кровь в коагулированном виде: Б) в полиакриламидном геле, В) в физиологическом растворе, Г) в геле из агара

Fig. 2. Blood storage methods for acoustic experiment.

А – whole human blood with anticoagulant;  
Б–Г – coagulated porcine blood: Б) in polyacrylamide gel,  
В) in saline solution, Г) in agar gel

та с образцом монтировалась на предметный столик и напылялась золотом [14]. Забор содержимого гематом осуществлялся из середины объема образца. Исследование полученных образцов проводили на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-6380LA Analytical Scanning Electron Microscope (Япония) биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

При хранении цельной крови с антикоагулянтом также каждый день проверялись возможность и скорость ее коагуляции путем добавления 25 ммоль раствора  $\text{CaCl}_2$ .

## Результаты и обсуждение

### *Изменение морфологических характеристик клеток цельной крови при хранении с антикоагулянтом*

На рисунке 3 А представлен обзорный снимок контрольного образца сразу после забора крови. Видно, что все пространство изображения заполнено дискоцитами. На 5-е сутки хранения в ЦДФ с добавлением либо без добавления САГМ (рис. 3 Б, В) в обоих образцах количество эхиноцитов мало, а влияние добавления консервационного раствора на изменения формы клеток незначительно по сравнению с контрольным образцом (рис. 3 А).

К 7-м суткам (рис. 3 Г, Д) заметно возрастает число эхиноцитов, а некоторые эритроциты агрегируют в «монетные столбики». В присутствии САГМ степень агрегации несколько ниже, что согласуется с данными литературы: добавление аденин- и маннитолодержащего раствора поддерживает гемореологические свойства крови [7, 12]. Тем не менее стоит отметить, что биофизика, лежащая в основе образования подобных структур эритроцитов, на данный момент остается недостаточно изученной.

При исследовании процесса приготовления модели гематомы было выявлено, что время свертывания крови при добавлении 25 ммоль раствора не изменялось в течение недели хранения и находилось в пределах 10–12 минут при температуре +37°C.

### *Изменение свойств гематомы с течением времени в зависимости от способа ее хранения*

В контрольных образцах свиных гематом, полученных сразу после свертывания крови, можно видеть, что все эритроциты подверглись эхиноцитозу (рис. 4 А, Г, Ж). Вероятно, это связано с использованием электрического шока при умерщвлении животного перед взятием крови. Ранее было показано, что форма эритроцитов человека может изменяться при наложении электрического поля, а степень трансформации клеток напрямую зависит от силы и длительности электрических импульсов [15].

*Хранение в полиакриламидном геле (ПАА)* привело к изменениям в структуре сгустка свиной крови уже спустя сутки после погружения в гель (рис. 4 Б). Фор-

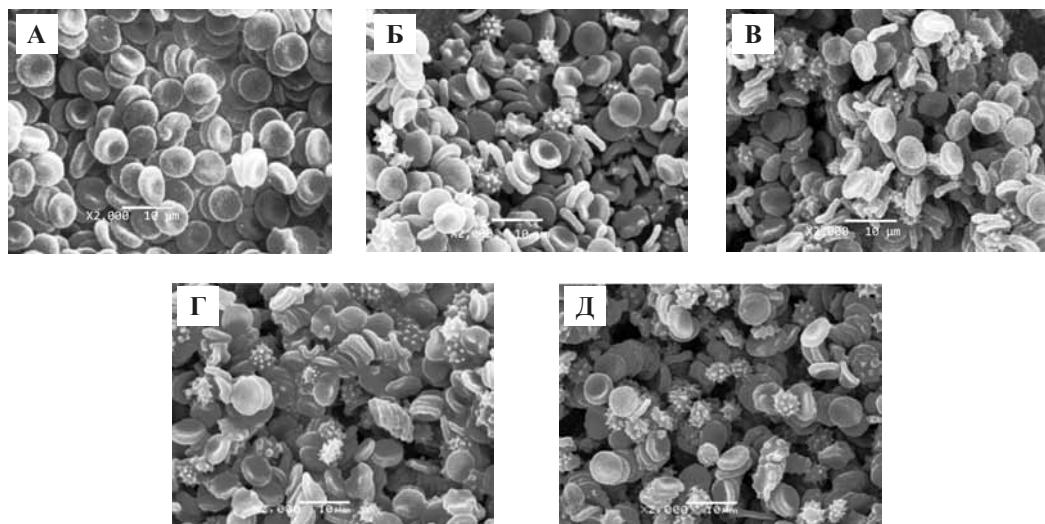


Рис. 3. СЭМ цельной крови при хранении с антикоагулянтом ЦФД.  
А – в течение 0 суток, Б – 5 суток, В – 5 суток с добавлением САГМ, Г – 7 суток, Д – 7 суток с добавлением САГМ. Масштабные линии: 10 мкм

Fig. 3. SEM images of whole blood stored with CPD anticoagulant.  
A – 0 days, B – 5 days, C – 5 days with SAGM, D – 7 days, E – 7 days with SAGM. Scale bar: 10 microns

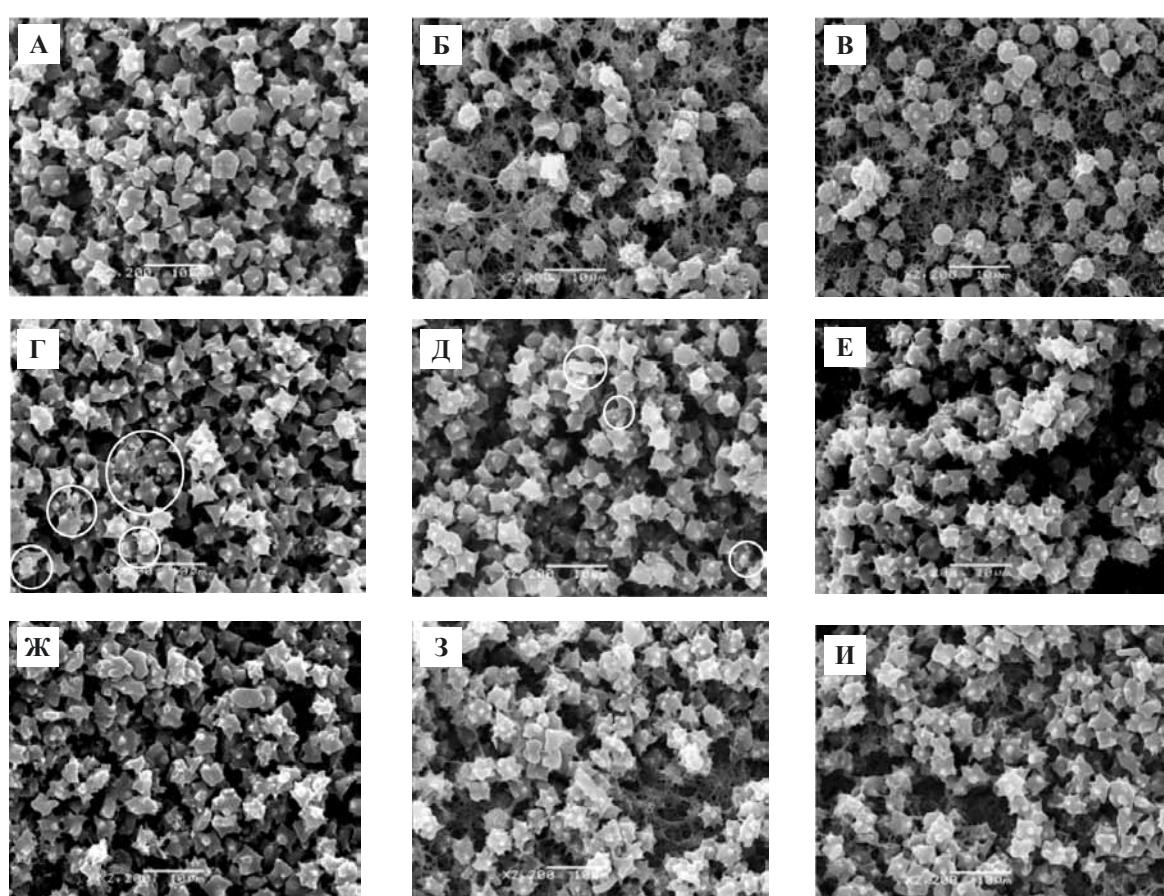


Рис. 4. СЭМ содержимого гематом при различном хранении с течением времени.  
А, Г, Ж – контрольные снимки в день погружения; Б, Д, З – через сутки; В, Е, И – через 2 суток. А, Б, В – в ПАА;  
Г, Д, Е – в физиологическом растворе; Ж, З, И – в агаре. Маркерные линии: 10 мкм. Фибриновые волокна при хранении  
в физиологическом растворе выделены кружками

Fig. 4. SEM images of hematoma contents for different storage methods over time. A, G, J – control samples on the immersion day;  
B, D, Z – after 1 day storage; C, E, I – after two days storage; A, B, C – in polyacrylamide gel; D, E, F – in saline;  
J, Z, I – in agar gel. Scale bars: 10 microns. Fibrin fibres during storage in saline solution are circled

ма эхиноцитов изменилась на более округлую, клетки выглядят «набухшими», что, по-видимому, может быть вызвано разностью осмотического давления в ПАА и внутри клеток крови. Количество открытых участков фибриновых волокон, связывающих клетки в сгусток, увеличилось (рис. 4 В, Г), что, вероятнее всего, обусловлено гемолизом части эритроцитов при их «набухании».

*Хранение в физиологическом растворе* в течение 2 суток не вызвало значительных изменений, за исключением небольшого уменьшения с течением времени количества фибриновых волокон (рис. 4 Г, Д) (выделены кружками), предположительно из-за усиления фибринолиза или вымывания физиологическим раствором.

*Хранение в геле из агара* в течение 2 суток существенно не повлияло на состояние гематомы: количество видимых фибриновых волокон, соединяющих клетки, выглядит неизменным, форма клеток и плотность их распределения остались прежними (рис. 4 Ж–И).

## Заключение

В работе исследовано влияние различных способов хранения цельной крови в жидким и в коагулированном состоянии на изменение ее морфологических характеристик с течением времени при подготовке моделей гематомы для акустического эксперимента по их неинвазивному разжижению мощным фокусированным ультразвуковым пучком.

С помощью сканирующей электронной микроскопии было показано, что в течение 5 суток хранения цельной человеческой крови в антикоагулянте ЦФД наблюдаемые изменения морфологических свойств эритроцитов проявляются в незначительной степени вне зависимости от присутствия САГМ. К 7-м суткам заметно растет степень эхиноцитоза, а также агрегации эритроцитов в «монетные столбики», что может быть связано с присутствием белков плазмы при хранении цельной крови [7]. Добавление к антикоагулянту раствора САГМ в некоторой степени сдерживает агрегацию эритроцитов, что согласуется с данными литературы [7, 12]. В течение 7 суток хранения цельной человеческой крови с антикоагулянтом не отмечалось заметного гемолиза эритроцитов; время свертывания крови с помощью раствора не изменялось и находилось в пределах 10–12 минут при температуре +37°C.

Методом СЭМ было показано, что в течение по крайней мере 2 суток наиболее подходящим контейнером для хранения свиных гематом является гель из агара – он не оказывает токсического действия и таким образом сохраняет их первоначальные морфологические свойства. Физиологический раствор, по-видимому, усиливает фибринолиз или вымывает небольшую часть фибриновых волокон, а ПАА гель приводит к заметному гемолизу уже через сутки после погружения в него.

Таким образом, при подготовке моделей гематомы для последующего акустического эксперимента пред-

почтительны хранение цельной крови в некоагулированном состоянии в течение времени до 5 суток и ее коагуляция непосредственно перед экспериментом либо хранение сгустков крови в контейнере из агарового геля в течение до 2 суток.

## Благодарность

Авторы выражают благодарность лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова за возможность работы на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-6380LA Analytical Scanning Electron Microscope.

## Acknowledgments

The authors are grateful to the Laboratory of Electron Microscopy, Faculty of Biology, Moscow State University M.V. Lomonosov for the opportunity to work on a JEOL JSM-6380LA Analytical Scanning Electron Microscope.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – С.В. Буравков, П.Б. Росницкий, В.А. Хохлова.

Сбор и обработка материала – К.Д. Топчу, Е.М. Пономарчук, А.В. Кунтуро娃.

Написание текста – К.Д. Топчу, Е.М. Пономарчук.

Редактирование – П.Б. Росницкий, Т.Д. Хохлова, Я.Н. Ванг, В.А. Хохлова, С.В. Буравков.

## Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – S.V. Burakov, P.B. Rosnitsky, V.A. Khokhlova.

Collected the data and performed the analysis – K.D. Topchu, E.M. Ponomarchuk, A.V. Kunturova.

Wrote the paper: K.D. Topchu, E.M. Ponomarchuk.

Edited the manuscript – P.B. Rosnitsky, T.D. Khokhlova, Y.N. Wang, V.A. Khokhlova, S.V. Burakov.

## Литература/References

1. Craddock N, Hurles ME, Cardin N, Pearson RD, Plagnol V, Robson S et al. Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2010;464:713–20. DOI: 10.1038/nature08979.
2. Пантелеев М.А., Синауридзе Е.И., Атаяуллаханов Ф.И. Свертывание крови: современные проблемы (часть 3). Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2008;1(3):259–265.  
Panteleev MA, Sinauridze EI, Ataullakhhanov FI. Blood coagulation: current problems (part 3). Clinical oncohematology. Basic research and clinical practice. 2008;1(3):259–265 (In Russ.).
3. Khokhlova TD, Monsky WL, Haider YA, Maxwell AD, Wang YN, Matula TJ. Histotripsy liquefaction of large hematomas. *Ultrasound in Med. & Biol.* 2016;42(7):1491–8. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2016.01.020.
4. Khokhlova VA, Fowlkes JB, Roberts WW, Schade GR, Xu Z, Khokhlova TD et al. Histotripsy methods in mechanical disintegration of tissue: Towards clinical applications. *Int J Hyperthermia*. 2015;31(2):145–62. DOI: 10.3109/02656736.2015.1007538.

5. Ponomarchuk EM, Buravkov SV, Rosnitskiy PB, Tsysar SA, Kartzova MM, Kunturova AV et al. Cytological and ultrastructural analysis of mechanically liquefied lesions generated using boiling histotripsy in a porcine model of hematoma ex vivo. Abstract book of the 19th International Symposium of ISTU. 5th European Symposium of EUFUS; 2019 June 13–15; Barcelona, Spain, 2019; p. 51.
6. Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adrenine-glucose-mannitol. *Transfusion*. 2010;50(2):376–89. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2009.02449.x.
7. Шереметьев Ю.А., Поповичева А.Н., Рогозин М.М., Левин Г.Я. Агрегация метаболически истощенных эритроцитов человека. *Цитология*. 2016;58(1):30–4.  
*Sheremet'ev YuA, Popovicheva AN, Rogozin MM, Levin GYa. Aggregation of metabolically depleted human erythrocytes. Cytology*. 2016;58(1):30–34 (In Russ.).
8. World Health Organization. Manual on the management, maintenance and use of blood cold chain equipment. 2005. Available from: [https://www.who.int/bloodsafety/Manual\\_on\\_Management\\_Maintenance\\_and\\_Use\\_of\\_Blood\\_Cold\\_Chain\\_Equipment.pdf](https://www.who.int/bloodsafety/Manual_on_Management_Maintenance_and_Use_of_Blood_Cold_Chain_Equipment.pdf).
9. Berezina T, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z et al. Influence of storage on red blood cell rheological properties. *Journal of Surgical Research*. 2002;102:6–12. DOI: 10.1006/jsre.2001.6306.
10. Barshtein G, Arbell D, Livshits L, Gural A. Is It Possible to Reverse the Storage-Induced Lesion of Red Blood Cells? *Front Physiol*. 2018 Jul 24;9:914. DOI: 10.3389/fphys.2018.00914.
11. Мороз В.В., Голубев А.М., Афанасьев А.В., Кузовлев А.Н., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Черныш А.М. Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях. Общая реаниматология. 2012;8(1):52–60.  
*Moroz VV, Golubev AM, Afanasyev AV, Kuzovlev AN, Sergunova VA, Gudkova OE, Chernysh AM. The Structure and Function of a Red Blood Cell in Health and Critical Conditions. General reanimatology*. 2012;8(1):52–60 (In Russ.). DOI: 10.1536/1813-9779-2012-1-52.
12. Gevi F, D'Alessandro A, Rinalducci S, Zolla L. Alterations of red blood cell metabolome during cold liquid storage of erythrocyte concentrates in CPD-SAGM. *Journal of Proteomics*. 2012;76:168–80. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.03.012.
13. Ламзин И.М., Харуллин Р.М. Исследование изменений биофизических свойств эритроцитов при хранении в эритроцитодержащих средах с помощью атомно-силовой микроскопии. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2014;10(1):44–8.  
*Lamzin IM, Khayrullin RM. The study of changes of biophysical properties of red blood cells in storage in erythrocyte-containing solutions using atomic force microscopy*. Saratov Journal of medical scientific research. 2014;10(1):44–8 (In Russ.).
14. Buravkov SV, Chernikov VP, Buravkova LB. Simple Method of Specimen Preparation for Scanning Electron Microscopy. *Bull Exp Biol Med*. 2011; Jul;151(3):378-82. DOI: 10.1007/s10517-011-1335-7.
15. Henszen MM, Weske M, Schwarz S, Haest CW, Deuticke B. Electric field pulses induce reversible shape transformation of human erythrocytes. *Mol Membr Biol*. 1997;14(4):195–204. PMID: 9491371.

## Информация об авторах

Ксения Дмитриевна Топчу – студентка физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Екатерина Максимовна Пономарчук – студентка физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Анна Владимировна Кунтурова – студентка физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Павел Борисович Росницкий – аспирант физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Татьяна Дмитриевна Хохлова – кандидат физико-математических наук, ассистент департамента гастроэнтерологии, Университет штата Вашингтон, Сиэтл, США.

Як-Нам Ванг – PhD, старший научный сотрудник Центра промышленного и медицинского ультразвука, Университет штата Вашингтон, Сиэтл, США.

Вера Александровна Хохлова – доктор физико-математических наук, доцент кафедры акустики физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Сергей Валентинович Буравков – доктор медицинских наук, профессор факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова.

## Author information

Kseniya D. Topchu – B.Sc. student, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University. <https://orcid.org/0000-0003-4106-3596>

Ekaterina M. Ponomarchuk – M.Sc. student, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University. <https://orcid.org/0000-0002-6486-2895>

Anna V. Kunturova – B.Sc. student, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University. <https://orcid.org/0000-0003-2806-4359>

Pavel B. Rosnitsky – Graduate student, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University. <https://orcid.org/0000-0001-6423-3506>

Tatiana D. Khokhlova – PhD, Assistant, Division of Gastroenterology, Department of Medicine, University of Washington, Seattle, USA.

Yak-Nam Wang – PhD, Senior Researcher, Center for Industrial and Medical Ultrasound, University of Washington, Seattle, USA.

Vera A. Khokhlova – D.Sc. in Acoustics, Associate professor, Department of Acoustics, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University. <https://orcid.org/0000-0002-2585-8228>

Sergey V. Buravkov – Dr.Sci.(Med.), professor, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University. <https://orcid.org/0000-0002-1461-464X>