

© 2025 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 16.05.2025
Принята к печати 06.06.2025



EDN: PWYNRG

Контактная информация:

Чабин Иван Андреевич,
лаборант-исследователь лаборатории
клеточного гемостаза и тромбоза
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: ivan.chabin@dgoi.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-104-110

Детекция фосфатидилсерин-экспрессирующих эритроцитов в цельной крови

И.А. Чабин¹, Н.А. Подоплелова^{1,2}, Е.М. Кольцова^{1,2}, К.Р. Бутов¹⁻³, С.И. Обыденный^{1,2}, Н.С. Сметанина¹, М.А. Пантелеев^{1,2,4}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

²ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

³ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

⁴ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

Механизмы клиренса эритроцитов из кровотока разнообразны и могут включать такие процессы, как эриптоз и гемолиз. При этом несомненна роль селезенки, которая удаляет эритроциты из кровотока в связи с их способностью проходить сквозь узкие пространства, однако отдельные аспекты, такие как роль белков в этом процессе, которые могут связывать фосфатидилсерин, продолжают вызывать вопросы. Таким образом, точные механизмы элиминации эритроцитов до сих пор не установлены. В данной работе приведен цитофлуориметрический протокол детекции эритроцитов цельной крови, которые могут быть отнесены к предэлиминационной стадии, с использованием маркеров фосфатидилсерина. Также представлены результаты анализа крови здоровых доноров, которые позволяют говорить о возможности надежной детекции эриптоза в цельной крови. Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

Ключевые слова: эритроциты, клеточная смерть, эриптоз, проточная цитофлуориметрия

Чабин И.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025; 24 (2): 104–110.
DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-104-110

Detection of phosphatidylserine-expressing red blood cells in whole blood

I.A. Chabin¹, N.A. Podoplelova^{1,2}, E.M. Koltsova^{1,2}, K.R. Butov¹⁻³, S.I. Obydennyi^{1,2}, N.S. Smetanina¹, M.A. Panteleev^{1,2,4}

¹The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of Russia, Moscow

²Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow

³The N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Healthcare of Russia, Moscow

⁴The M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

There are various mechanisms of red blood cell (RBC) clearance from the circulation, including eryptosis and hemolysis. The spleen plays a major role in eliminating RBCs from the blood flow thanks to their ability to pass through narrow spaces. Still, some questions such as the role of phosphatidylserine-binding proteins in this process remain unanswered. Thus, RBC elimination mechanisms are still not very well explored. Here, we report on a flow cytometry protocol using phosphatidylserine markers for the detection of whole blood erythrocytes that can be classified as pre-elimination RBCs. We also provide the results of healthy donors' blood testing suggesting that reliable detection of eryptosis in whole blood is indeed possible. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of Russia.

Key words: red blood cells, cell death, eryptosis, flow cytometry

Chabin I.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025; 24 (2): 104–110.

DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-104-110

Эритроциты – самые распространенные клетки крови человека, их основной задачей является доставка кислорода ко всем клеткам тела. Гемоглобин, занимающий до 80% объема клетки, является токсичным для внутренних органов белком, в связи с чем предотвращение его высвобождения вследствие внутрисосудистого лизиса представляет собой важный вопрос. Другой причиной убрать эритроциты из кровотока до их окончательной смерти является нарушение способности «старых» клеток к изменению формы и, как следствие, возможность застревания в капиллярах [1]. Основную роль

в их элиминации отводят селезенке – лимфоидному органу, который содержит ретикуло-эндотелиальную систему, ответственную за клиренс эритроцитов. Но каким образом селезенке удастся элиминировать все клетки, которые могут погибнуть в ближайшее время? Могут ли эритроциты в стадии гибели циркулировать в общем кровотоке?

Считается, что решающую роль в клиренсе эритроцитов играет их фильтрация через особые ходы в селезенке, которые имитируют крайне узкие капилляры [1, 2]. В ходе старения эритроцит теряет способность менять свою форму [3] и в конце концов

застревает там. У данной гипотезы есть ряд недостатков. Так, в экспериментах на мышинных моделях было продемонстрировано, что элиминация эритроцитов замедляется при нокауте по лактадхерину (белок, способный связываться с фосфатидилсеринном на поверхности клетки и опосредовать фагоцитоз) [4, 5]. Другое важное замечание (чисто математический расчет) – через селезенку в час проходит около 9 л крови, что приблизительно составляет 2 объема циркулирующей крови (ОЦК), однако до 90% этого объема проходит сквозь «закрытую» систему кровотока, в которой фильтрации сквозь ретикулоэндотелиальную систему не происходит. Несложно посчитать, что характерное время фильтрации 1 ОЦК через «открытую» систему, где и происходит клиренс, составит примерно 5 ч. Возможно, что некоторые эритроциты могут не попасть туда в течение и более длительного времени.

Таким образом, для того чтобы в кровотоке не было ни одного эритроцита в «мертвом» или «практически мертвом» состоянии, необходима система, элиминирующая их за несколько часов до теоретически возможной смерти с достаточно высокой степенью точности и, что немаловажно, специфичности. Данная задача представляется достаточно тяжелой, однако на сегодняшний день в крови здоровых доноров в ряде исследований достоверно не было детектировано ни одного «мертвого» эритроцита с достаточной степенью уверенности, чтобы не считать это проблемой метода (оценка спустя длительное время – 24–48 ч, определение эритроцитов после центрифугирования цельной крови в плазме, богатой тромбоцитами [6] и др.), но специалисты верят в их существование [3, 7–9]. А что такое «мертвый» или «практически мертвый» эритроцит? Основываясь на каких параметрах можно так сказать о клетке, у которой нет ни ядра, ни митохондрии?

Всего около 20 лет назад появилось и в дальнейшем закрепилось такое понятие, как «эриптоз», или запрограммированная гибель эритроцита [10]. Она характеризуется, во первых, нарушением мембранной асимметрии – появлением фосфатидилсерина на внешней мембране эритроцита, во-вторых, уменьшением объема клетки и, в-третьих, образованием микровезикул [10–12]. Данные признаки характерны и для апоптоза ядерных клеток. Для детекции эриптоза может быть использована проточная цитофлуориметрия, позволяющая оценивать форму/размер (через прямое (FSC) и боковое (SSC) светорассеяние), а также экспрессию фосфатидилсерина на внешней мембране клетки с использованием специальных маркеров.

В данной работе мы приводим собственный протокол проточной цитофлуориметрии для детекции эриптотических эритроцитов в цельной крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Взятие крови

Для исследования выполнялось взятие крови у здоровых добровольцев, подписавших добровольное информированное согласие в соответствии с Хельсинкской декларацией. Работа одобрена независимым этическим комитетом и утверждена решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. Взятие крови проводилось посредством венопункции в вакуумные пробирки с цитратом натрия (3,2%) в качестве антикоагулянта, объем крови во время хранения был не менее 1 мл. Перед анализом допускалось хранение крови до 6 ч при комнатной температуре.

Окрашивание и анализ образцов с помощью проточной цитофлуориметрии

Общая пробоподготовка и окраска подробно представлены в *таблице*. Цельная кровь для анализа разводилась модифицированным буфером Тироде

Таблица
Протокол выполнения проточной цитофлуориметрии

Table
The protocol for flow cytometry

| Параметр Parameter | Значение Value | | | |
|--|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Шаг 1. Разведение цельной крови Step 1. Dilution of whole blood | | | | |
| Буфер Тироде, мкл Tyrode's buffer, μL | 1000 | | | |
| Цельная кровь, мкл Whole blood, μL | 1 | | | |
| Шаг 2. Пробоподготовка Step 2. Sample preparation | | | | |
| | Проба 1 Sample 1 | Проба 2 Sample 2 | Проба 3 Sample 3 | Проба 4 Sample 4 |
| Разведенная кровь, мкл Diluted blood, μL | 150 | 150 | 150 | 150 |
| Хлорид кальция (100 мМ), мкл Calcium chloride (100 mM), μL | 3 | 3 | 3 | – |
| ЭДТА (100 мМ), мкл EDTA (100 mM), μL | – | – | – | 3 |
| Шаг 3. Окрашивание маркерами фосфатидилсерина Step 3. Staining with phosphatidylserine markers | | | | |
| Аннексин V – AF647 (5 мкМ), мкл Annexin V – AF647 (5 μM), μL | 3 | 3 | – | 3 |
| Лактадхерин – mNeonGreen (10 мкл), мкл Lactadherin – mNeonGreen (10 μL), μL | 1,5 | 1,5 | – | – |
| mNeonGreen (10 мкМ), мкл mNeonGreen (10 μM), μL | – | – | 1,5 | – |
| Инкубация, мин Incubation, min | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Шаг 4. Окрашивание антителами Step 4. Staining with antibodies | | | | |
| Антитела к CD235a, мкл Antibodies to CD235a, μL | – | 3 | – | – |
| Инкубация, мин Incubation, min | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Шаг 5. Измерение на проточном цитофлуориметре Step 5. Flow cytometry | | | | |

(150 мМ хлорида натрия, 2,7 мМ хлорида калия, 1 мМ хлорида магния, 0,4 мМ дигидрофосфата натрия, 20 мМ HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), 5 мМ глюкозы, и 0,5% бычьего сывороточного альбумина; pH 7,4) в 1000 раз. После этого разбавленную кровь инкубировали с маркерами фосфатидилсерина в течение 15 мин в присутствии 2 мМ хлорида кальция. В качестве маркеров использовали рекомбинантный аннексин V собственного производства, конъюгированный с AF647 (Lumiprobe, США), а также рекомбинантный C2-фрагмент лактадхерина с флуоресцентной меткой mNeonGreen собственного производства [13]. Финальные концентрации маркеров фосфатидилсерина были 100 нМ. Для наиболее точного детектирования эритроцитов образцы дополнительно окрашивали антителами к гликофору А (Elabscience, Китай), время окраски – 5 мин (добавляли через 10 мин от начала инкубации с маркерами фосфатидилсерина), финальное разведение 1:50. Для определения возможного влияния антител на процессы эритроцитоза также использовали контрольную пробу без окрашивания антителами.

Для аннексина V в качестве контроля была выбрана проба с добавлением аннексина V – AF647 в присутствии ЭДТА (динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, хелатор ионов кальция), которая блокирует связывание аннексина V с фосфатидилсерином. По данной пробе была проведена граница региона, обозначающего аннексин V-положительные события. Для лактадхерина в качестве контроля была выбрана проба с добавлением рекомбинантного mNeonGreen в концентрации 100 нМ. В качестве положительного контроля для связывания маркеров фосфатидилсерина использовались отмытые эритроциты, обработанные индуктором эритроцитоза ФМА (форбол-12-миристан-13-ацетат) [14].

Готовые образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (BD Biosciences, США) при средней скорости потока, дополнительное разведение перед измерением не проводилось. Общее число событий в пробе для анализа – не менее 150 000, число событий в регионе эритроцитов – не менее 120 000.

Обработка цитофлуориметрических данных

Обработка цитофлуориметрических данных проводилась в соответствии со схемой, представленной на *рисунке 1*. Для пробы без антител к CD235a регион эритроцитов выделялся с использованием плота FSC/SSC. Для пробы с добавлением антител регион эритроцитов выделялся по плоту FSC/CD235a, что в дальнейшем позволяет (и может быть особенно актуально для отдельных пациентов) при использо-

вании плота FSC/SSC выделять регион эритроцитов с сохранной и измененной формой. Кроме того, представлены стратегии гейтирования для маркеров фосфатидилсерина.

Статистический анализ

Статистическая обработка результатов проточной цитофлуориметрии проводилась с использованием программного обеспечения Origin 2018b (OriginLab Corporation, США). Для сравнения долей фосфатидилсерин-положительных эритроцитов в зависимости от используемого маркера применялся дисперсионный анализ (ANOVA) с пост-хок t-критерием методом Бонферрони. Для анализа влияния антител на уровень фосфатидилсерин-положительных эритроцитов использовался U-критерий Манна-Уитни. Отличия считались статистически достоверными при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С учетом литературных данных об особенностях анализа эритроцитов в норме и в стадии эритроцитоза был разработан метод цитофлуориметрического исследования цельной крови с детекцией эритроцитических клеток с использованием 2 разных маркеров фосфатидилсерина – лактадхерина и аннексина V. Несмотря на то, что традиционным маркером фосфатидилсерина является именно аннексин V, по литературным данным, лактадхерин – более чувствительный маркер [15], в связи с чем он был выбран в качестве возможной альтернативы. При использовании антител удалось выявить субпопуляцию с измененными параметрами FSC и SSC (*рисунок 1Д*), до половины данной субпопуляции связывает лактадхерин, что указывает на процессы клеточной смерти, которая сопровождается потерей дискоидной формы. Однако, учитывая малое число этих событий, их достоверный анализ затруднен.

Используя разработанную методику, мы проанализировали циркулирующие эритроциты крови здоровых доноров, выявили кратное увеличение доли фосфатидилсерин-положительных эритроцитов при использовании в качестве маркера фосфатидилсерина лактадхерин (*рисунок 2*). Данные группы при дисперсионном анализе достоверно отличались друг от друга. Что интересно, при анализе пост-хок выявилось лишь достоверное отличие ($p < 0,05$) группы лактадхерина от остальных, в то время как остальные группы не отличались друг от друга ($p > 0,05$).

При сравнительном анализе влияния антител на процент эритроцитических эритроцитов была продемонстрирована зависимость изменения процента клеток, экспрессирующих фосфатидилсерин, от используемого маркера. Так, отличие, видимое при использо-

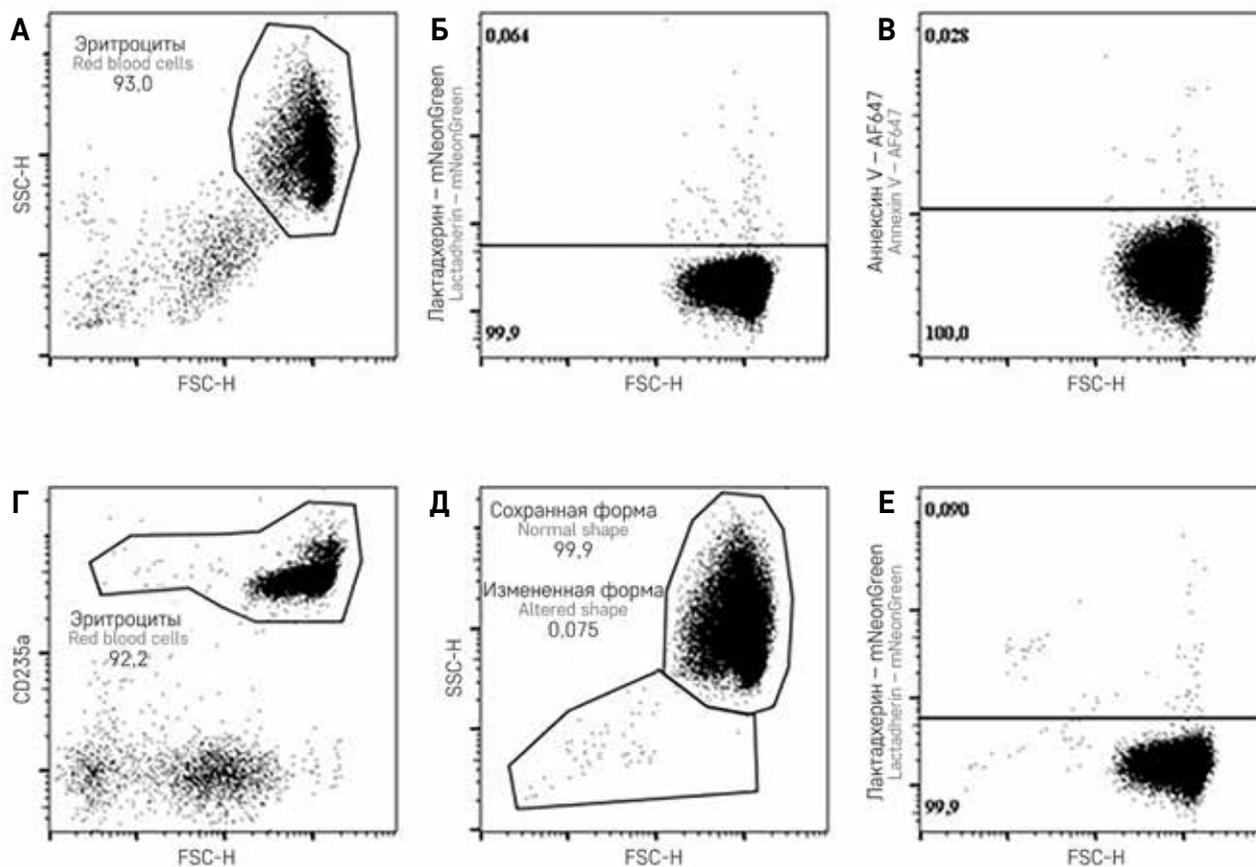
Рисунок 1

Стратегия гейтирования эритроцитов и выделения регионов фосфатидилсерин-экспрессирующих субпопуляций

В качестве образца для анализа использовалась цельная кровь, разведенная в 1000 раз буфером Тироде. Сверху приведены гейты для региона эритроцитов по плоту FSC/SSC (А), для клеток внутри выделенного региона в целях определения доли фосфатидилсерин-экспрессирующих субпопуляций для лактадхерина (Б) и аннексина V (В). Снизу представлены гейты для региона эритроцитов по плоту FSC/CD235a (проба, окрашенная антителами к гликофору А) (Г), для событий внутри этого региона в целях выделения клеток сохранной и измененной формы по данным плота FSC/SSC (Д), а также выделение фосфатидилсерин-экспрессирующей субпопуляции с использованием лактадхерина (Е)

Figure 1

A strategy for red blood cell gating and identification of regions of phosphatidylserine-expressing subpopulations. A sample of whole blood diluted a 1000 times in Tyrode's buffer was utilized. The upper row of images shows gates for a region of RBCs in the FSC/SSC plot (A), for cells within the selected region for determination of the proportion of phosphatidylserine-expressing subpopulations when using lactadherin (B) or annexin V (C). The lower row of images shows gates for a region of RBCs in the FSC/CD235a plot (a sample stained with antibodies to glycophorin A) (D), for events within this region for identification of cells of normal and altered shape as per the FSC/SSC plot data (D) as well as for identification of a phosphatidylserine-expressing subpopulation using lactadherin (E).



зовании лактадхерина, оказалось статистически незначимым ($p = 0,063$) (рисунок 3А), в то время как при использовании в качестве маркера аннексина V выявлено достоверное увеличение процента в пробе с добавлением антител ($p = 0,015$) (рисунок 3Б). В качестве положительного контроля использовались эритроциты, обработанные ФМА. Как представлено на рисунке 4, оба маркера позволяют выявлять фосфатидилсерин-экспрессирующую субпопуляцию в условиях стимуляции эритроцитоза.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Применение методов проточной цитофлуориметрии для выявления эритроцитов в стадии эритроцитоза в цельной крови сопряжено с рядом трудностей.

Описанные в литературе методы используют для детекции продолжительное (зачастую более суток) время предварительной инкубации *ex vivo*, относительно жесткие режимы центрифугирования, что усложняет интерпретацию данных [16].

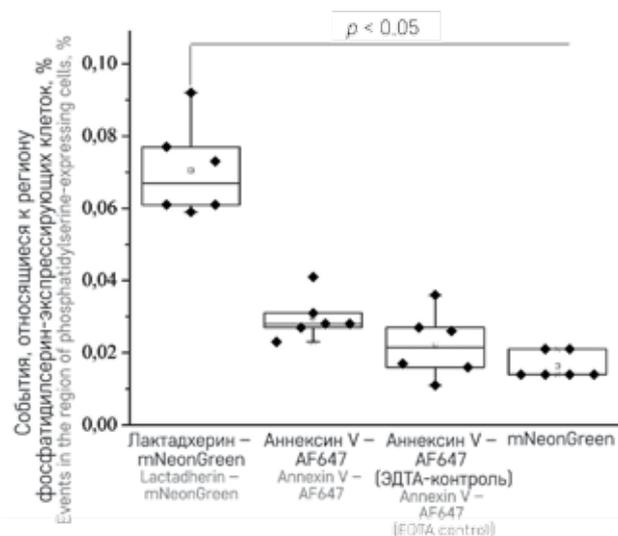
Приведенный в данной работе протокол позволяет обойти вероятную проблему в детекции эритроцитоза – низкие количества экспрессируемого фосфатидилсерина на ранних стадиях за счет использования более чувствительного маркера [15]. Что еще более интересно, приведенные результаты показывают, что, по крайней мере, на малой выборке не продемонстрировано статистически значимого различия между процентом аннексин V-связывающих клеток в пробе и контроле. В то же время лактадхерин показывал достоверное отличие процента фосфа-

Рисунок 2

Процент эриптотических клеток в зависимости от используемого маркера фосфатидилсерина. Представлены диаграммы размаха с исходными данными результатов проточной цитофлуориметрии разведенной цельной крови с определением доли фосфатидилсерин-экспрессирующих клеток в регионе эритроцитов по данным плота FSC/SSC. Приведены результаты для лактадхерина, аннексина V и их парных контролей – mNeonGreen и аннексина V в присутствии ЭДТА (этилендиаминтетраацетат). Зафиксировано отличие в дисперсионном анализе, по результатам пост-хок теста Бонферрони доля клеток, окрашенных лактадхерином, достоверно отличалась от остальных методов окраски ($p < 0,05$). Результаты остальных методов достоверно не отличались друг от друга. Представлены данные для 6 здоровых доноров

Figure 1

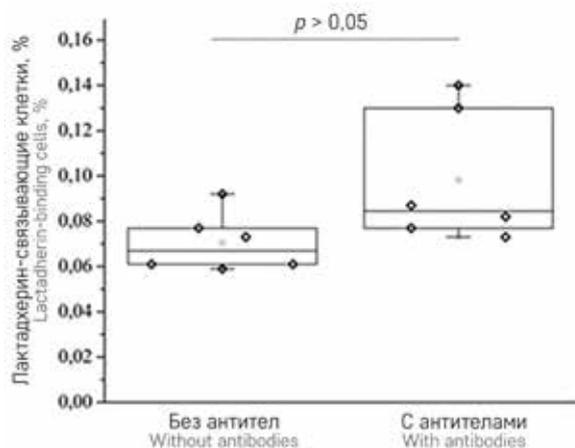
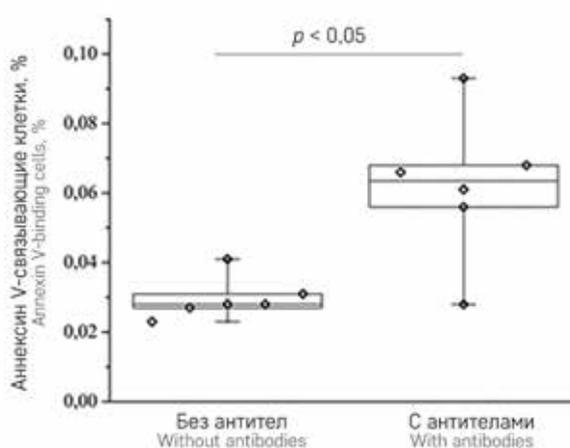
The percentage of eryptotic cells according to the utilized phosphatidylserine marker. Box plots based on the initial results of flow cytometry of diluted whole blood with determination of the proportion of phosphatidylserine-expressing cells in the region of RBCs as per the FSC/SSC plot data. The graph demonstrates results for lactadherin, annexin V and their matched controls - mNeonGreen and annexin V with EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid). There were differences in the analysis of variance, and according to the results of a post-hoc Bonferroni test, the proportion of lactadherin-stained cells differed significantly from other staining methods ($p < 0.05$). The results of testing using other methods were not significantly different. The graph shows data for 6 healthy donors

**Рисунок 3**

Изменение количества эриптотических клеток в зависимости от наличия антиэритроцитарных антител. А – представлены диаграммы размаха с исходными данными для доли лактадхерин-связывающих клеток в регионе эритроцитов для пробы с добавлением антител и без них. Статистически значимого различия при использовании критерия Манна-Уитни не выявлено ($p = 0,063$); Б – приведены аналогичные диаграммы размаха для аннексина V в качестве маркера фосфатидилсерина. Отмечен статистически достоверный прирост числа аннексин V-положительных событий при использовании антител ($p = 0,015$). Результаты приведены для 6 здоровых доноров

Figure 3

The number of eryptotic cells based on the presence/absence of anti-RBC antibodies. A – box plots with the initial data on the proportion of lactadherin-binding cells in the region of RBCs in a sample with/without antibodies. The Mann-Whitney U test did not reveal any significant differences ($p = 0.063$); B – similar box plots for annexin V used as a phosphatidylserine marker. A significant rise in the number of annexin V-positive events was registered when using antibodies ($p = 0.015$). The graph shows data for 6 healthy donors

А**Б**

фосфатидилсерин-положительных клеток в сравнении с контролем, и с пробой с аннексином V.

Другим важным аспектом цитофлуориметрического анализа является использование антител. Однако антитела к эритроцитам известны своей способностью вызывать их агглютинацию и, возможно, повреждение, что также было подтверж-

дено в данном исследовании для антител к гликофодину А (CD235a) [17]. Данное влияние было более заметно при использовании традиционного, менее чувствительного маркера фосфатидилсерина – аннексина V (рисунки 3). Таким образом, логичным выводом может стать мысль об ускорении процессов смерти эритроцитов в присутствии антител в первую

Рисунок 4

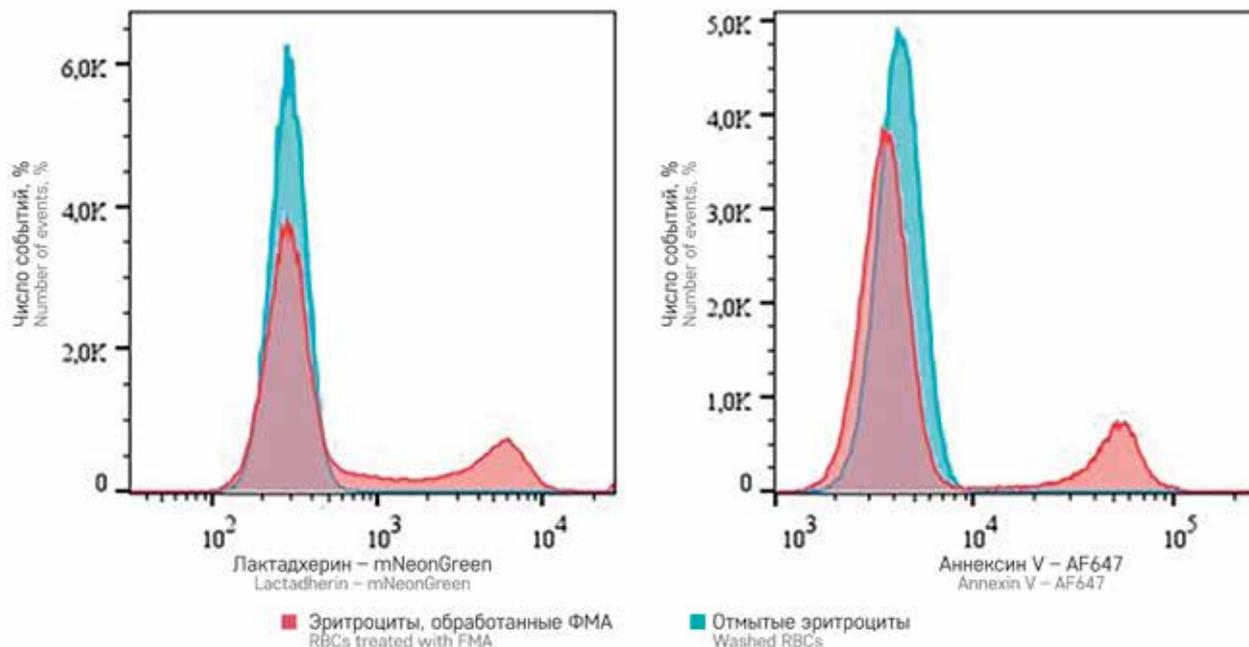
Связывание маркеров фосфатидилсерина интактными эритроцитами и эритроцитами, стимулированными ФМА

На гистограммах представлены результаты окраски маркерами фосфатидилсерина отмытых эритроцитов (голубой цвет) и эритроцитов, обработанных индуктором эритроптоза ФМА (розовый цвет). На панели А представлены результаты окрашивания лактадхерином, на панели Б – аннексином V. Оба маркера позволяют выявлять субпопуляцию фосфатидилсерин-экспрессирующих событий

Figure 4

The binding of phosphatidylserine markers by intact and PMA-stimulated RBCs

The histograms show the results of staining with phosphatidylserine markers performed on washed red blood cells (blue) and red blood cells treated with an eryptosis inducer (PMA) (pink). Panel A demonstrates the results of staining with lactadherin, panel B - the results of staining with annexin V. Both markers can be used to detect a subpopulation of phosphatidylserine-expressing events



очередь для тех клеток, которые уже находятся «на грани». Это утверждение является гипотезой и требует дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе был разработан и апробирован новый протокол детекции эритроцитических эритроцитов с использованием метода проточной цитофлуориметрии, который позволяет обнаруживать такие клетки в цельной крови здоровых доноров. Проведен сравнительный анализ 2 известных маркеров фосфатидилсерина – аннексина V и лактадхерина, в ходе которого продемонстрирована способность последнего к более точной детекции таких клеток. Важным методическим результатом данной работы является идея использования одновременно 2 маркеров

фосфатидилсерина и необходимость наличия проб как с использованием антиэритроцитарных антител, так и без них, с учетом их влияния на эритроциты.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда №23-75-10120.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Chabin I.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0625-1743>

Podoplelova N.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8013-1112>

Koltsova E.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0167-6726>

Butov K.R. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4664-6953>

Obydenyi S.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2930-8768>

Smetanina N.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8805-1499>

Panteleev M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8128-7757>

Литература / References

1. Атауллаханов Ф.И., Борсакова Д.В., Протасов Е.С., Синауридзе Е.И., Зейналов А.М. Эритроцит: мешок с гемоглобином или живая, активная клетка? Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2018; 17 (1): 108–16. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-1-108-116 [Ataullakhanov F.I., Borsakova D.V., Protasov E.S., Sinauridze E.I., Zeynalov A.M. Erythrocyte: a bag with hemoglobin, or a living active cell? Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2018; 17 (1): 108–16. (In Russ.)].
2. Piety N.Z., Reinhart W.H., Pourreau P.H., Abidi R., Shevkopyas S.S. Shape matters: the effect of red blood cell shape on perfusion of an artificial microvascular network. Transfusion 2016; 56 (4): 844–51.
3. Franco R.S., Estela Puchulu-Campanella M., Barber L.A., Palascak M.B., Joiner C.H., Low P.S., Cohen R.M. Changes in the properties of normal human red blood cells during *in vivo* aging. Am J Hematol 2013; 88 (1): 44–51.
4. Fens M.H.A.M., Mastrobattista E., de Graaff A.M., Flesch F.M., Ultee A., Rasmussen J.T., et al. Angiogenic endothelium shows lactadherin-dependent phagocytosis of aged erythrocytes and apoptotic cells. Blood 2008; 111 (9): 4542–50.
5. Lee S.J., Park S.-Y., Jung M.-Y., Mun Bae S., Kim I.-S. Mechanism for phosphatidylserine-dependent erythrophagocytosis in mouse liver. Blood 2011; 117 (19): 5215–23.
6. Zahedpanah M., Azarkeivan A., Aghaiepour M., Nikogoftar M., AhmadiNegad M., Hajibeigi B., et al. Erythrocytic phosphatidylserine exposure and hemostatic alterations in β -thalassemia intermediate patients. Hematology 2014; 19 (8): 472–6.
7. Alamin A.A. The Role of Red Blood Cells in Hemostasis. Semin Thromb Hemost 2021; 47 (1): 26–31.
8. Weisel J.W., Litvinov R.I. Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis. J Thromb Haemost 2019; 17 (2): 271–82.
9. Byrnes J.R., Wolberg A.S. Red blood cells in thrombosis. Blood 2017; 130 (16): 1795–9.
10. Lang K.S., Lang P.A., Bauer C., Duranton C., Wieder T., Huber S.M., Lang F. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. Cell Physiol Biochem 2005; 15 (5): 195–202.
11. Leal J.K.F., Adjobo-Hermans M.J.W., Bosman G.J.C.G.M. Red blood cell homeostasis: Mechanisms and effects of microvesicle generation in health and disease. Front Physiol 2018; 9: 703.
12. Morel O., Jesel L., Freyssinet J.-M., Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2011; 31 (1): 15–26.
13. Koltsova E., Avilova A., Nikolaeva E., Kolchin N., Butov K. Engineered fluorescent variants of lactadherin C2 Domain for phosphatidylserine detection in flow cytometry. Biomolecules 2025; 15: 673.
14. Nguyen D.B., Wagner-Britz L., Maia S., Steffen P., Wagner C., Kaestner L., Bernhardt I. Regulation of phosphatidylserine exposure in red blood cells. Cell Physiol Biochem 2011; 28 (5): 847–56.
15. Shi J., Shi Y., Waehrens L.N., Rasmussen J.T., Heegaard C.W., Gilbert G.E. Lactadherin detects early phosphatidylserine exposure on immortalized leukemia cells undergoing programmed cell death. Cytometry A 2006; 69 (12): 1193–201.
16. Jemaà M., Fezai M., Bissinger R., Lang F. Methods employed in cytofluorometric assessment of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. Cell Physiol Biochem 2017; 43 (2): 431–44.
17. Sutherland D.R., Keeney M., Illingworth A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. Cytometry B Clin Cytom 2012; 82B (4): 195–208.