

УДК 543.552:612.111

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОПТИЧЕСКИ ПРОЗРАЧНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ИХ ХРАНЕНИИ

© 2021 г. А. К. Евсеев¹, *, А. И. Колесникова¹, И. В. Горончаровская¹, Е. В. Трусова¹, А. И. Костин¹,
А. К. Шабанов¹, М. М. Гольдин², С. С. Петриков¹

¹Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского
Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, 129090 Россия

²Колледж Глен Окс Коммьюнити, MI 49032, Центerville, США

*E-mail: anatolevseev@gmail.com

Поступила в редакцию 22.05.2021 г.

После доработки 01.06.2021 г.

Принята к публикации 16.06.2021 г.

С помощью электрохимического метода, основанного на использовании оптически прозрачного рабочего электрода, было показано, что в условиях гипотермического (4°C) хранения эритроцитов происходит снижение степени обратимости изменения их формы при воздействии постоянного электрического тока. При катодной поляризации оптически прозрачного рабочего электрода (–0.5 В) доля эритроцитов, перешедших в сфероэритроциты, снизилась с $99.6 \pm 0.4\%$ (1-е сут) до $42.8 \pm 14.5\%$ (42-е сут) ($p < 0.05$), а при анодной поляризации (1.2 В) доля эритроцитов, перешедших в стоматоциты, снизилась с $80.6 \pm 6.7\%$ (1-е сут) до $35.4 \pm 5.6\%$ (42-е сут) ($p < 0.05$). На поздних сроках хранения в образцах наблюдали увеличение числа клеток, подвергавшихся разрушению в условиях воздействия постоянного электрического тока, наличие которых в переливаемой эритроцитарной взвеси может приводить к увеличению свободного гемоглобина в крови реципиента после трансфузии. Полученные результаты могут лечь в основу разработки новых методов оценки качества компонентов крови.

Ключевые слова: оптически прозрачный электрод, оксид индия–олова, эритроцит, деформируемость, морфология

DOI: 10.31857/S0041377121050035

Электрохимические методы, благодаря своей эффективности, простоте и гибкости широко используются не только в различных областях промышленности, но и находят свое применение в медицине и биологии (Djokić, 2016). Особого внимания заслуживают исследования поведения живых клеток при контакте с чужеродными заряженными материалами, позволяющие расширить представление о процессах функционирования клеток. Начиная с 50-х гг. прошлого века, проводились многочисленные исследования взаимодействия клеток с электропроводными материалами (например, платиной, золотом, стеклоуглеродом, активированным углем), результатом которых стало описание электрохимической природы ряда фундаментальных процессов (тромбогенеза, адгезии и пролиферации клеток) (Sawyer, 1983; Kojima et al., 1991), а также разработка принципов оценки гемосовместимости материалов (Sawyer, 1984).

Выйти на качественно новый уровень в данных исследованиях позволило внедрение оптически прозрачных электродов, используемых преимуще-

ственно при производстве жидкокристаллических дисплеев и солнечных батарей (Ellmer, 2012). При этом, в качестве оптически прозрачных электродов могут применяться как классические металлические электроды, например, тонкие слои серебра или меди (Bi et al., 2019), так и нанесенные на прозрачную подложку другие электропроводные материалы: углеродные нанотрубки (López-Naranjo et al., 2016), оксид графена (Woo, 2019), электропроводные полимеры (Hofmann et al., 2018). Однако наибольшее распространение получили оптически прозрачные электроды на основе оксидов индия и олова (ITO) (Cao et al., 2014; Afre et al., 2018), обладающие достаточно высоким светопропусканием (80–95%) при относительно низком сопротивлении (10–50 Ом/см²) (Cao et al., 2014).

Благодаря возможности визуализации функционирования клеток в условиях их контакта с поверхностью заряженного электрода, было показано влияние потенциала оптически прозрачного электрода на морфологию и рост живых клеток HeLa (Yaoita et al., 1990), морфологию эндотелиальных клеток бычьей аорты (Wong et al., 1994), а также на способность к

Принятые сокращения: ITO – indium tin oxide

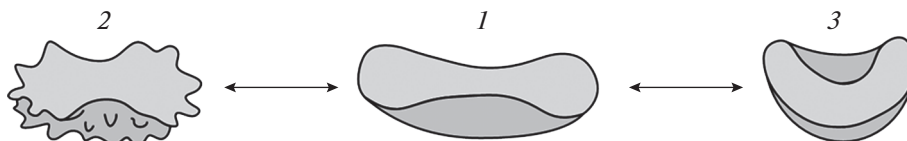


Рис. 1. Изменение морфологии эритроцита: 1 – дискоцит, 2 – эхиноцит, 3 – стоматоцит.

адгезии и росту культуры *Pseudomonas fluorescens* (Busalmen, de Sánchez, 2005). Однако более перспективными представляются исследования клеток крови, например, эритроцитов. Особого внимания заслуживает разработка и внедрение в клиническую практику новых методов анализа эритроцит-содержащих компонентов крови.

В настоящее время обеспечение сохранности свойств эритроцитов в процессе их хранения для переливания является весьма важной задачей. По стандартам РФ и рекомендациям ВОЗ хранить эритроцитсодержащие компоненты допускается при температуре 2–6°C не более 35 сут (в зависимости от используемого консерванта) со дня забора крови (Mvere et al., 2005; Рагимов, 2010). Для США и Канады такой срок составляет до 42 сут (Wang et al., 2012; Koch et al., 2013; Bhaduri et al., 2014). При этом критериями пригодности эритроцитсодержащих компонентов для трансфузии являются тест на концентрацию гемоглобина, определение гематокрита и степени гемолиза эритроцитов (Постановление Правительства РФ № 797, 2019). Однако на основании этих данных нельзя сделать выводы о структурной и функциональной полноценности эритроцитов.

Одним из важнейших свойств эритроцита, обеспечивающего газотранспортную функцию, является его способность к деформации, которая обеспечивается взаимодействием интегральных белков (гликофориннов, белка полосы 3) и периферических компонентов (спектрина, актина и др.) мембрано-цитоскелетного комплекса. Деформируемость эритроцитов претерпевает значительные изменения с их возрастом (Ламзин и др., 2014) и по выраженности изменения можно судить о деструктивных процессах при старении эритроцитов *in vitro* (Kirkpatrick et al., 1998; Lutten et al., 2008; Hess, 2010; Мороз и др., 2013), которые могут являться причиной развития трансфузионных осложнений (Moore et al., 1997; Bennett-Guerrero et al., 2007; Kim et al., 2015).

Еще одной важной характеристикой эритроцита является величина поверхностного заряда мембраны эритроцита (Левин, Сухарева, 2015), отрицательное значение которого (в норме около –15 мВ; Jan, Chien 1973), обуславливаемое присутствием сиаловых кислот в олигосахаридных цепях гликофориннов, становится менее отрицательным при хранении.

В целом, механизмы, лежащие в основе изменения деформации эритроцитов, пока остаются неясными. Наблюдаемые изменения в процессе старе-

ния эритроцитов связывают с необратимой агрегацией спектрина и гемоглобина, которая вызывает нарушение структуры эритроцитов и их пластичности. Однако основной причиной считают окисление мембраны эритроцита при хранении под влиянием активных форм кислорода (D'Amici et al., 2007).

Изменение двойного электрического слоя у мембраны эритроцита за счет влияния различных внешних факторов оказывает влияние на морфологию эритроцитов (переход эхиноцит ↔ дискоцит ↔ стоматоцит (рис. 1)). Данный механизм трансформации формы клеток реализуется благодаря электрохимическим процессам и не вступает в противоречие с широко распространенной теорией бислоистой пары (Tachev et al., 2004).

Кроме того, было обнаружено влияние заряда поверхности инородного тела на изменение морфологии эритроцита. Так, было описано явление агрегации (слипания) эритроцитов при контакте с положительно заряженным электродом, но механизм наблюдаемого явления для авторов остался неясным (Ci et al., 1998).

Ранее было показано, что сочетание электрохимических и микроскопических методов исследования позволяет оценить морфологию эритроцитов при контакте с поверхностью заряженного электрода (Tsivadze et al., 2017). Так, в области потенциалов отрицательнее –250 мВ наблюдали переход морфологических форм эритроцита из дискоцита в эхиноцит, в области потенциалов положительнее 600 мВ наблюдали переход из дискоцита в стоматоцит.

Можно предположить, что изменение морфологии эритроцита и потеря части отрицательного заряда при старении может привести к изменению характера взаимодействия эритроцитов с заряженной поверхностью электрода.

Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния гипотермического хранения эритроцитов на степень обратимости изменения их формы при воздействии постоянного электрического тока.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материал. В работе использовали эритроцитарную взвесь 5 практически здоровых доноров от 27 до 35 лет, заготовленную на гемоконсерванте ЦФД и С.А.Г.М. (MacoPharma, Франция) в отделении производственной трансфузиологии НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского. Образцы хранили

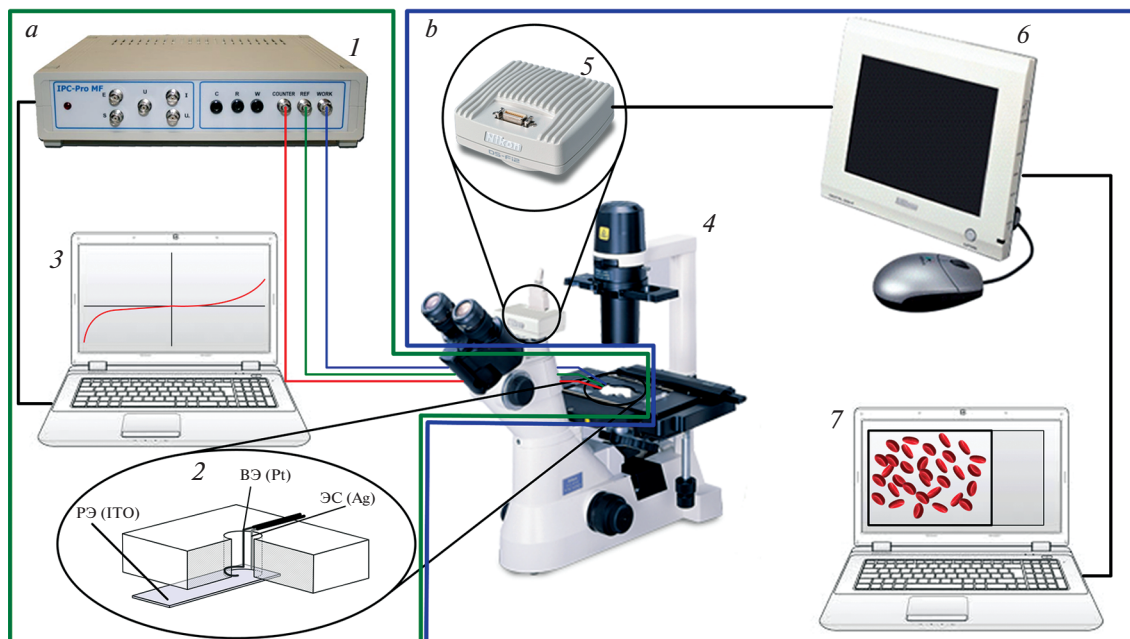


Рис. 2. Схема установки для исследования влияния внешней поляризации постоянным током на морфологию эритроцитов: 1 – потенциостат; 2 – электрохимическая ячейка: РЭ – рабочий электрод, ВЭ (Pt) – вспомогательный электрод, ЭС (Ag) – электрод сравнения; 3 – компьютер для управления электрохимическим блоком, 4 – инвертированный микроскоп, 5 – цифровая камера, 6 – цифровая рамка, 7 – компьютер для управления оптическим блоком.

при температуре 4°C в соответствии с рекомендациями ВОЗ.

Экспериментальная установка. В работе использовали установку, состоящую из электрохимического (рис. 2а) и оптического (рис. 2б) блоков. Электрохимический блок состоял из трехэлектродной электрохимической ячейки (рис. 2, позиция 2) с рабочим оптически прозрачным ITO-электродом, расположенным на дне ячейки, серебряной проволокой, покрытой хлоридом серебра (в качестве электрода сравнения), и платиновой проволокой в качестве вспомогательного электрода. Потенциал рабочего электрода устанавливали и контролировали с помощью потенциостата IPC-Pro MF (Кронас, Россия) (рис. 2, позиция 1). Морфологию в режиме реального времени исследовали в проходящем свете на инвертированном микроскопе Eclipse TS100 (Nikon, Япония), объектив CFI S Plan Fluor ELWD 60×/0.70 (Nikon, Япония), с цифровой 5.0 Мрiх камерой DS-Fi1 и цифровой рамкой DS-L2 (Nikon, Япония) (рис. 2, позиции 4–6).

Анализ суспензии эритроцитов. В электрохимическую ячейку вносили 0.1 мл суспензии эритроцитов, полученной добавлением к 10 мл 0.15 М раствора NaCl (рН 7.2) 0.01 мл эритроцитарной взвеси. Для обеспечения осаждения эритроцитов на поверхности оптически прозрачного электрода измерения начинали через 15 мин. Поляризацию рабочего электрода осуществляли в потенциодинамическом режиме со скоростью развертки потенциала 10 мВ/с от бестокового потенциала до достижения потенциала

–0.5 В при движении в катодную область и до потенциала 1.2 В при движении в анодную область. Одновременно с началом изменения потенциала рабочего электрода запускали запись на цифровую камеру инвертированного микроскопа, фиксирующего морфологию эритроцитов, находящихся на поверхности оптически прозрачного рабочего электрода. По завершении работы потенциостата запись прекращалась. Исследование эритроцитарной взвеси проводили на 1, 5, 7, 14, 21, 28, 35 и 42 сут хранения.

Анализ монослойных мазков эритроцитарной взвеси. Монослойные мазки эритроцитарной взвеси, взятые в те же сутки хранения, исследовали по стандартной методике на микроскопе AxioStar PLUS (Carl Zeiss, Германия), объектив CP-Achromat 100×/1.25 Oil (Carl Zeiss, Германия).

Оценка деформируемости эритроцитов. Деформируемость эритроцитов оценивали фильтрационным методом (Закутский и др., 2001), основанным на определении показателя деформируемости (Z) по значениям диаметров физиологического раствора и пятна эритроцитарной массы на бумажном фильтре:

$$Z = ((D_{\text{эп}} - D_{\text{ср}}) / D_{\text{фр}}) \times 100\%,$$

где Z – показатель деформируемости эритроцитов, $D_{\text{эп}}$ – диаметр пятна суспензии эритроцитов, $D_{\text{ср}}$ – диаметр периферического кольца суспензии деформированных эритроцитов, $D_{\text{фр}}$ – диаметр пятна физиологического раствора.

Статистическая обработка. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с ис-

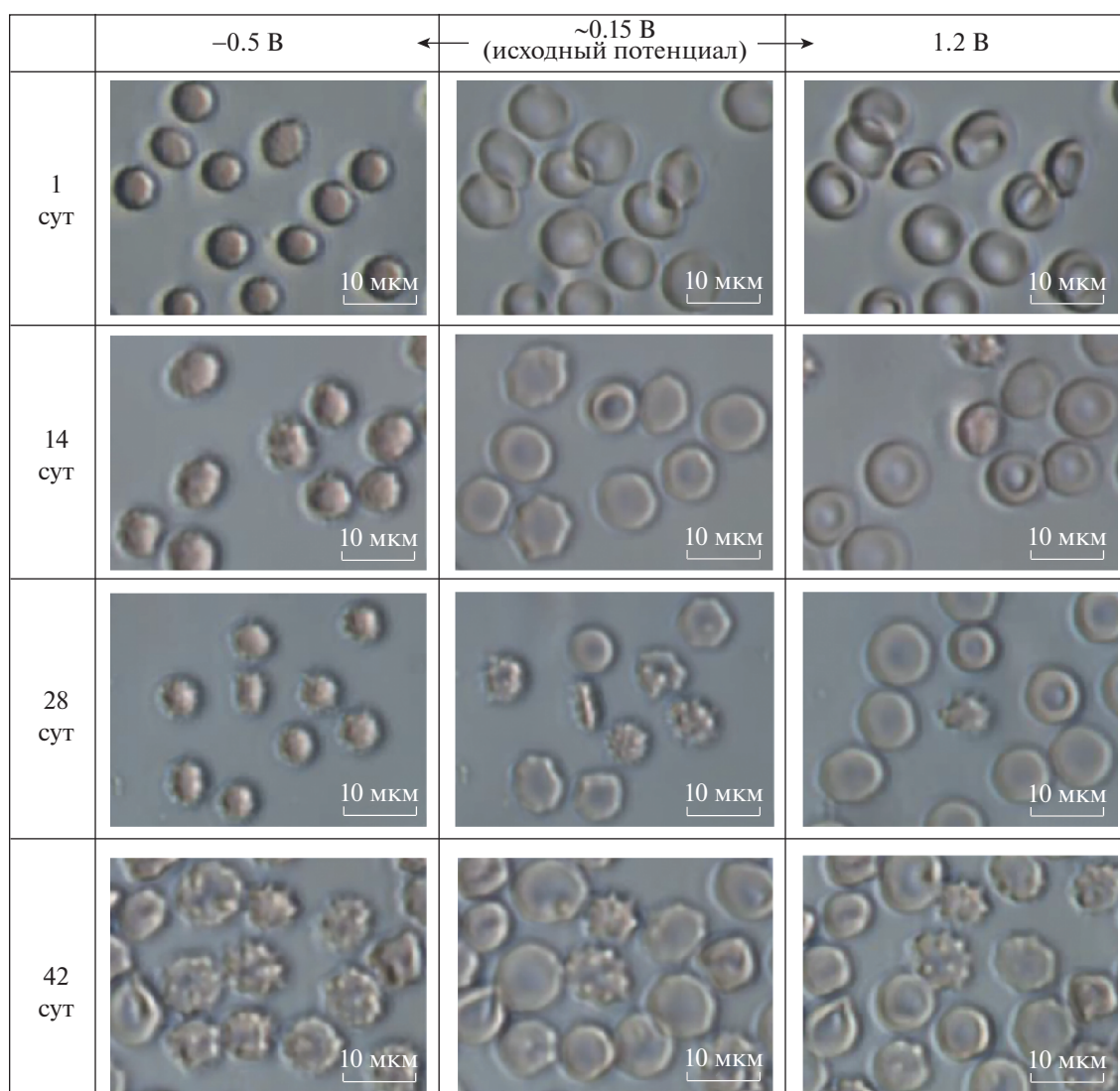


Рис. 3. Морфология эритроцитов в различные сроки хранения при стационарном потенциале и значениях потенциала -0.5 и 1.2 В. Увел. об.: $600\times$. Масштабная линейка: 10 мкм.

пользованием программного обеспечения Statistica 6.0 (StatSoft). Описательная статистика количественных признаков представлена в виде среднего значения и ошибки среднего. Для оценки достоверности различий изменения морфологии эритроцитов в процессе их хранения использовали критерий Уилкоксона. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании эритроцитов разных сроков хранения, осевших из суспензии на поверхность оптически прозрачного электрода, было обнаружено, что их морфология в отсутствие внешней поляризации рабочего электрода (смещения его потенциала в область катодных или анодных значений потенциа-

лов при постоянном токе) совпадала с полученными нами аналогичными результатами микроскопии мазков эритроцитарной взвеси. Совпадение было и с данными из литературы (Blasi et al., 2012; Мороз и др., 2013), а именно: снижалось содержание дискоцитов и увеличивалось содержание эхиноцитов по мере увеличения срока хранения (рис. 3).

В то же время, в условиях внешней поляризации рабочего электрода наблюдали не только изменение морфологии эритроцитов в ответ на внешнее воздействие электрическим током, но и изменения соотношения морфологических форм эритроцитов с увеличением срока хранения эритроцитарной взвеси как в условиях катодной, так и анодной поляризации рабочего электрода (рис. 3, табл. 1).

В суспензии эритроцитов в 1-е сут хранения, когда общее состояние клеток можно характеризовать

Таблица 1. Морфологические формы эритроцитов в разные сроки хранения эритроцитарной взвеси при стационарном потенциале и значениях потенциала -0.5 и 1.2 В

Срок хранения, сут	Количество морфологических форм, %		Величина потенциала электрода, В		
			-0.5	~ 0.15 (исходный)	1.2
1	Дискоциты		0	91.80 ± 0.97	15.20 ± 5.12
	Эхиноциты	I	0.20 ± 0.20	6.20 ± 0.58	3.80 ± 2.17
		II	0	2.00 ± 0.45	0.40 ± 0.45
		III	0.20 ± 0.20	0	0
	Сфероэхиноциты		99.6 ± 0.40	0	0
	Стоматоциты		0	0	80.60 ± 6.72
14	Дискоциты		0	$61.00 \pm 1.73^{a, б}$	18.20 ± 1.46
	Эхиноциты	I	0	$18.00 \pm 2.98^{a, б}$	9.00 ± 1.05
		II	2.80 ± 1.07	$11.40 \pm 1.12^{a, б}$	7.00 ± 0.89^a
		III	$16.20 \pm 1.16^{a, б}$	$8.40 \pm 0.75^{a, б}$	3.00 ± 0.89^a
	Сфероэхиноциты		81.00 ± 1.70^a	1.20 ± 0.58	0.60 ± 0.40
	Стоматоциты		0	0	$62.20 \pm 2.80^{a, б}$
28	Дискоциты		0.20 ± 0.20	$25.80 \pm 2.18^{a, б}$	18.60 ± 2.14
	Эхиноциты	I	0.20 ± 0.20	24.40 ± 0.68^a	10.60 ± 1.57
		II	4.80 ± 0.86^a	$25.40 \pm 1.44^{a, б}$	$11.00 \pm 1.63^{a, б}$
		III	$45.80 \pm 2.54^{a, б}$	$20.00 \pm 1.30^{a, б}$	$8.40 \pm 1.12^{a, б}$
	Сфероэхиноциты		$48.60 \pm 2.11^{a, б}$	4.00 ± 0.71^a	3.40 ± 0.82^a
	Стоматоциты		0.40 ± 0.24	0.40 ± 0.24	$48.00 \pm 2.30^{a, б}$
42	Дискоциты		2.40 ± 1.12	$15.00 \pm 1.70^{a, б}$	20.40 ± 2.93
	Эхиноциты	I	8.00 ± 4.23	$20.20 \pm 0.97^{a, б}$	14.40 ± 1.60^a
		II	17.20 ± 6.87^a	31.00 ± 2.30^a	12.20 ± 1.77^a
		III	$26.20 \pm 5.15^{a, б}$	$25.20 \pm 2.39^{a, б}$	12.60 ± 1.69^a
	Сфероэхиноциты		42.80 ± 14.49^a	5.00 ± 1.61	5.00 ± 1.79
	Стоматоциты		3.40 ± 1.44	3.60 ± 1.50	35.40 ± 5.56^a

Примечание. Показаны средние значения и их ошибки. Различия достоверны при $p < 0.05$ относительно (^a) 1-х сут и (^б) относительно предыдущего срока (критерий Уилкоксона).

как нормальное (рис. 3), при смещении потенциала ИТО электрода в область более отрицательных значений наблюдали переход морфологических форм эритроцита из дискоцита в сфероцит с поочередным прохождением всех стадий эхиноцитоза (эхиноцит I, II, III, сфероэхиноцит). Названия морфологических форм даны согласно данным из литературы (Bessis, 1973). Так, при потенциале -0.5 В все эритроциты представлены, как правило, сфероэхиноцитами. В то же время, при смещении потенциала в область более положительных значений наблюдали переход из дискоцита в стоматоцит. При потенциале 1.2 В клетки были представлены преимущественно стоматоцитами.

Морфологические переходы как в сторону эхиноцитов, так и в сторону стоматоцитов, являются обратимыми, т.е. при смене направления развертки по-

тениала или при отключении поляризации морфологическая форма клеток возвращается к исходному состоянию.

С увеличением срока хранения в случае катодной поляризации снижалось количество сфероэхиноцитов и повышалось количество эхиноцитов III. Так, если в 1-е сут при -0.5 В доля эритроцитов, представленных сфероэхиноцитами, составляла $99.6 \pm 0.4\%$, то к 42-м сут доля сфероэхиноцитов составила $42.8 \pm 14.5\%$.

В условиях анодной поляризации с увеличением срока хранения эритроцитарной взвеси был обнаружен ряд особенностей. Во-первых, доля эритроцитов, перешедших в стоматоциты, снизилась с $80.6 \pm 6.7\%$ (1-е сут) до $35.4 \pm 5.6\%$ (42-е сут). Во-вторых, в этой области потенциалов обнаружено явление перехода из эхиноцита II и III в эхиноцит I или морфо-

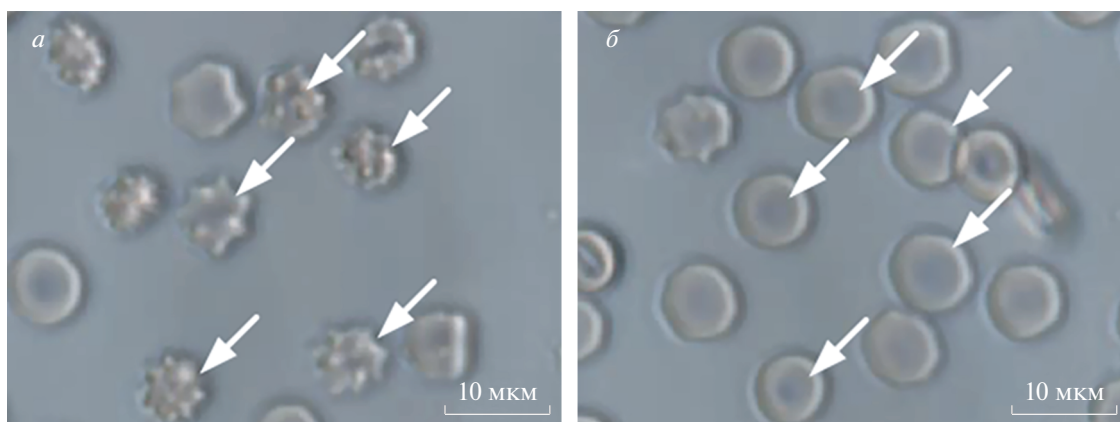


Рис. 4. Морфология эритроцитов через 28 сут хранения в отсутствие внешней поляризации постоянным током (а) и при величине потенциала ИТО-электрода 1.2 В (б). Стрелки показывают эхиноциты, перешедшие в форму, близкую к дискоциту. Увел. об.: 600×.

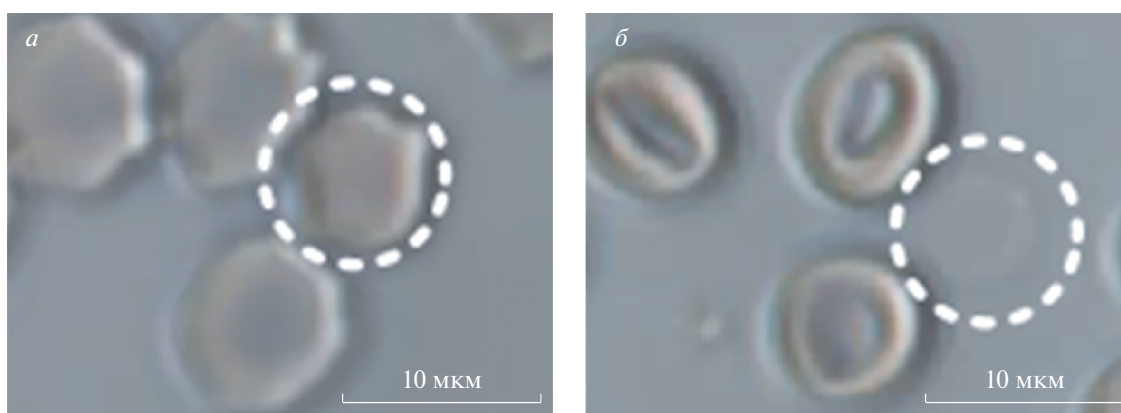


Рис. 5. Морфология эритроцитов на 35-е сут хранения в отсутствие внешней поляризации постоянным током (а) и при величине потенциала ИТО электрода 1.2 В (б). Увел. об.: 600×. Кругжками выделены клетки, подвергшиеся разрушению.

логическую форму, близкую к дискоциту, что более подробно показано на примере морфологии эритроцитов на 28-е сут хранения (рис. 4).

Немаловажным, с нашей точки зрения, наблюдением является то, что с увеличением срока хранения в обследованных образцах возрастало количество клеток, подвергшихся разрушению при воздействии электрического тока (рис. 5). При этом на поверхности электрода можно видеть тени эритроцитов (рис. 5б).

Наличие в эритроцитарной взвеси клеток с измененными физическими свойствами под влиянием длительного гипотермического хранения может привести к внутрисосудистому гемолизу (вследствие их низкой механической прочности) в организме реципиента и увеличению содержания свободного гемоглобина в крови после трансфузии.

Ранее в ряде исследований было показано, что с увеличением срока хранения эритроцитарной взвеси возрастает количество функционально непригодных клеток (Weinberg, Patel, 2016) и концентрация

свободного гемоглобина в крови реципиента после трансфузии (Windsant et al, 2012), что является причиной развития ряда серьезных осложнений (Schaer et al., 2013), например, острой почечной недостаточности (Deuel et al., 2016).

В настоящее время степень гемолиза хранящихся эритроцитсодержащих компонентов не должна превышать 0.8% в конце срока хранения, что регламентируется «Правилами заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов» (Постановление Правительства РФ № 797, 2019). Этот показатель определяется по концентрации свободного гемоглобина в супернатанте эритроцитарной взвеси после центрифугирования фотометрическим методом с использованием специализированных анализаторов, например, HemoCue Plasma/Low Hb (HemoCue, Швеция). Таким образом, учитывается только доля разрушенных эритроцитов за период хранения, без применения дополнительных методов контроля состояния клеток.

Одним из предположений, объясняющих вышеописанные явления изменений морфологии эритроцитов в условиях внешней поляризации рабочего электрода, может быть зависимость морфологического ответа клеток от деформируемости эритроцита. Однако данное предположение не подтвердилось, поскольку при экспериментальной оценке деформируемости эритроцитов фильтрационным методом достоверное различие показателя деформируемости (критерий Уилкоксона, $p < 0.05$) было зафиксировано только к 42 сут. При этом за весь срок хранения данный показатель снизился примерно на 5% — с 38.34 ± 0.42 отн. ед. (1 сут) до 37.15 ± 0.76 отн. ед. (42 сут).

Таким образом, электрохимический метод с использованием оптически прозрачного электрода позволяет не только получить качественную картину изменения обратимости морфологии эритроцитов в условиях гипотермического хранения, но и выявлять в исследуемых образцах наличие функционально непригодных эритроцитов.

Внедрение аналитических методов, основанных на использовании оптически прозрачных электродов, открывает новые возможности в диагностике состояния клеток, что может впоследствии лечь в основу разработки новых методов оценки качества компонентов крови.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках плановой темы НИР НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы (№ 004.20.22).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Используемые в работе образцы эритроцитарной взвеси были заготовлены в отделении производственной трансфузиологии НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского. Каждый донор подписывал информированное добровольное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Закутский А.В., Радужекевич В.Л., Пастухова Л.Ю., Белошецкий В.А.* 2001. Способ оценки деформируемости эритроцитов. Патент РФ № 2173461. (*Zakutsky A.V., Radushkevich V.L., Pastukhova L.Yu., Beloshevsky V.A.* 2001. A method for assessing the deformability of erythrocytes. Patent RF № 2173461.)
- Ламзин И.М., Хайруллин Р.М., Ханман М.Э.* 2014. Оценка структуры популяции эритроцитов эритроцитсодержащих сред, находящихся на хранении в банке крови, по данным атомно-силовой микроскопии. Вестник совр. клин. мед. Т. 7. № 5. С. 16. (*Lamzin I.M., Khayrullin R.M., Hanman M.E.* 2014. A analysis of changes population structure of stored red blood cells using atomic force microscopy. Vestnik Sovremennoi Klinicheskoi Mediciny. V. 7. № 5. P. 16.)
- Левин Г.Я., Сухарева Е.Г.* 2015. Изменение электрокинетических свойств эритроцитов при их консервации. Гематология и трансфузиология. Т. 60. № 1. С. 21. (*Levin G.Ya., Sukhareva E.G.* 2015. Changes in erythrocyte electrokinetic characteristics after their preservation. Russ. J. Hematol. Transfusiol. V. 60. № 1. P. 21.)
- Мороз В.В., Голубев А.М., Козлова Е.К., Афанасьев А.В., Гудкова О.Е., Новодержкина И.С., Марченков Ю.В., Кузовлев А.Н., Заржецкий Ю.В., Костин А.И., Волков Д.П., Яковлев В.Н.* 2013. Динамика морфологических изменений эритроцитов и биохимических показателей консервированной цельной крови в различные сроки хранения. Общая реаниматология. Т. 9. № 1. С. 5. (*Moroz V.V., Golubev A.M., Kozlova E.K., Afanasyev A.V., Gudkova O.E., Novodержкина I.S., Marchenkov Yu.V., Kuzovlev A.N., Zarzhetsky Yu.V., Kostin A.I., Volkov D.P., Yakovlev V.N.* 2013. Time course of morphological changes in red blood cells and banked whole blood biochemical parameters in different storage periods. Gen. Reanimatol. (Russ.). V. 9. № 1. P. 5)
<https://doi.org/10.15360/1813-9779-2013-1-5>
- Рагимов А.А., Шербаклова Г.Н.* 2010. Инфузионно-трансфузионная терапия: руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа. (*Ragimov A.A., Scherbakova G.N.* 2010. Infusion-transfusion therapy: A guide. Moscow: GEOTAR-Media.)
- Afre R.A., Sharma N., Sharon M., Sharo M.* 2018. Transparent conducting oxide films for various applications: A review. Rev. Adv. Mater. Sci. V. 53. P. 79.
- Bennett-Guerrero E., Veldman T.H., Doctor A., Telen M.J., Ortel T.L., Reid T.S., Mulherin M.A., Zhu H., Buck R.D., Califf R.M., McMahon T.J.* 2007. Evolution of adverse changes in stored RBCs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 104. P. 17063.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0708160104>
- Bessis M.* 1973. Red cell shapes. An illustrated classification and its rationale. In: Red cell shape. Berlin: Springer. P. 1.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-88062-9_1
- Bhaduri B., Kandel M., Brugnara C., Tangella K., Popescu G.* 2014. Optical assay of erythrocyte function in banked blood. Sci. Rep. V. 4. Article 6211.
<https://doi.org/10.1038/srep06211>
- Bi Y.G., Liu Y.F., Zhang X.L., Yin D., Wang W.Q., Feng J., Sun H.B.* 2019. Ultrathin metal films as the transparent electrode in ITO-free organic optoelectronic devices. Adv. Opt. Mater. V. 7. Article 1800778.
<https://doi.org/10.1002/adom.201800778>
- Blasi B., D'Alessandro A., Ramundo N., Zolla L.* 2012. Red blood cell storage and cell morphology. Transfus. Med. V. 22. P. 90
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2012.01139.x>
- Busalmen J.P., de Sánchez S.R.* 2005. Electrochemical polarization-induced changes in the growth of individual cells and biofilms of fluorescens (ATCC 17552). Appl. Environ. Microbiol. V. 71. P. 6235.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6235-6240.2005>
- Cao W., Li J., Chen H., Xue J.* 2014. Transparent electrodes for organic optoelectronic devices: A review. J. Photonics Energy. V. 4. Article 040990.
<https://doi.org/10.1117/1.JPE.4.040990>

- Ci Y.X., Li H.N., Feng J.* 1998. Electrochemical method for determination of erythrocytes and leukocytes. *Electroanalysis*. V. 10. P. 921.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4109\(199810\)10:13<921::AID-ELAN921>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4109(199810)10:13<921::AID-ELAN921>3.0.CO;2-4)
- D'Amici G.M., Rinalducci S., Zolla L.* 2007. Proteomic analysis of RBC membrane protein degradation during blood storage. *J. Proteome Res.* V. 6. P. 3242.
<https://doi.org/10.1021/pr070179d>
- Deuel J.W., Schaer C.A., Boretti F.S., Opitz L., Garcia-Rubio I., Baek J.H., Spahn D.R., Buehler P.W., Schaer D.J.* 2016. Hemoglobinuria-related acute kidney injury is driven by intrarenal oxidative reactions triggering a heme toxicity response. *Cell Death Dis.* V. 7. P. e2064.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2015.392>
- Djokić S.* 2016. Biomedical and pharmaceutical applications of electrochemistry. Springer Int. Publ.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-31849-3>
- Ellmer K.* 2012. Past achievements and future challenges in the development of optically transparent electrodes. *Nat. Photonics*. V. 6. P. 809.
<https://doi.org/10.1038/nphoton.2012.282>
- Hess J.R.* 2010. Red cell changes during storage. *Transfus. Apher. Sci.* V. 43. P. 51.
<https://doi.org/10.1016/j.transci.2010.05.009>
- Hofmann A.I., Cloutet E., Hadziioannou G.* 2018. Materials for transparent electrodes: From metal oxides to organic alternatives. *Adv. Opt. Mater.* V. 4. Article 1700412.
<https://doi.org/10.1002/aelm.201700412>
- Jan K.M., Chien S.* 1973. Role of surface electric charge in red blood cell interactions. *J. Gen. Physiol.* V. 61. P. 638.
<https://doi.org/10.1085/jgp.61.5.638>
- Kim J., HoYoon L., Shin S.* 2015. Advances in the measurement of red blood cell deformability: A brief review. *J. Cell. Biotechnol.* V. 1. P. 63.
<https://doi.org/10.3233/JCB-15007>
- Kirkpatrick U.J., Adams R.A., Lardi A., McCollum C.N.* 1998. Rheological properties and function of blood cells in stored bank blood and salvaged blood. *Br. J. Haematol.* V. 101. P. 364.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1998.00689.x>
- Koch C.G., Figueroa P.I., Li L., Sabik J.F., Mihaljevic T., Blackstone E.H.* 2013. Red blood cell storage: how long is too long? *Ann. Thorac. Surg.* V. 96. P. 1894.
<https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2013.05.116>
- Kojima J., Shinohara H., Ikariyama Y., Aizawa M., Nagaike K., Morioka S.* 1991. Electrically controlled proliferation of human carcinoma cells cultured on the surface of an electrode. *J. Biotechnol.* V. 18. P. 129.
[https://doi.org/10.1016/0168-1656\(91\)90241-M](https://doi.org/10.1016/0168-1656(91)90241-M)
- López-Naranjo E.J., González-Ortiz L.J., Apátiga L.M., Rivera-Muñoz E.M., Manzano-Ramírez A.* 2016. Transparent electrodes: A review of the use of carbon-based nanomaterials. *J. Nanomater.* V. 2016. Article 4928365.
<https://doi.org/10.1155/2016/4928365>
- Luten M., Roerdinkholder-Stoelwinder B., Schaap N.P. de Grip W.J., Bos H.J., Bosman G.J.C.G.M.* 2008. Survival of red blood cells after transfusion: a comparison between red cells concentrates of different storage periods. *Transfusion.* V. 48. P. 1478.
<https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.01734.x>
- Mvere D., Vinelli E., Bond K.* 2005. Manual on the management, maintenance and use of blood cold chain equipment. Geneva: World Health Organization.
- Moore F.A., Moore E.E., Sautia A.* 1997. Blood transfusion: An independent risk factor for postinjury multiple organ failure. *Arch. Surg.* V. 132. P. 620.
- Sawyer P.N.* 1983. The relationship between surface charge (potential characteristics) of the vascular interface and thrombosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* V. 416. P. 561.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1983.tb35212.x>
- Sawyer P.N.* 1984. Electrode-biologic tissue interactions at interfaces – a review. *Biomater. Med. Devices Artif. Organs.* V. 12. P. 161.
<https://doi.org/10.3109/10731198409118831>
- Schaer D.J., Buehler P.W., Alayash A.I., Belcher J.D., Vercellotti G.M.* 2013. Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood.* V. 121. P. 1276.
<https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-451229>
- Tachev K.D., Danov K.D., Kralchevsky P.A.* 2004. On the mechanism of stomatocyte-echinocyte transformations of red blood cells: experiment and theoretical model. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* V. 34. P. 123.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2003.12.011>
- Tsivadze A.Yu., Khubutiya M.Sh., Goroncharovskaya I.V., Evseev A.K., Goldin Michael M., Borovkova N.V., Batishchev O.V., Goldin Mark M.* 2017. Electron transport and morphological changes in the electrode/erythrocyte system. *Mendeleev Commun.* V. 27. P. 183.
<https://doi.org/10.1134/S0012501617110021>
- Wang D., Sun J., Solomon S.B., Klein H.G., Natanson C.* 2012. Transfusion of older stored blood and risk of death: a meta-analysis. *Transfusion.* V. 52. P. 1184.
<https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03466.x>
- Weinberg J.A., Patel R.P.* 2016. Red blood cell transfusion and its effect on microvascular dysfunction in shock states. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* V. 30. P. 491.
<https://doi.org/10.1016/j.bpa.2016.10.005>
- Windsant I.C.V., de Wit N.C.J., Sertorio J.T.C., Beckers E.A.M., Tanus-Santos J.E., Jacobs M.J., Buurman W.A.* 2012. Blood transfusions increase circulating plasma free hemoglobin levels and plasma nitric oxide consumption: a prospective observational pilot study. *Crit. Care.* V. 16. Article R95.
<https://doi.org/10.1186/cc11359>
- Wong J.Y., Langer R., Ingber D.E.* 1994. Electrically conducting polymers can noninvasively control the shape and growth of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 91. P. 3201.
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.8.3201>
- Woo Y.S.* 2019. Transparent conductive electrodes based on graphene-related materials. *Micromachines (Basel).* V. 10. Article 13.
<https://doi.org/10.3390/mi10010013>
- Yaoita M., Ikariyama Y., Aizawa M.* 1990. Electrical effects on the proliferation of living HeLa cells cultured on optically transparent electrode surface. *J. Biotechnol.* V. 14. P. 321.
[https://doi.org/10.1016/0168-1656\(90\)90116-S](https://doi.org/10.1016/0168-1656(90)90116-S)

Use of Optically Transparent Electrodes for the Assessment of the Erythrocytes Quality during Their Storage

A. K. Evseev^{a, *}, A. I. Kolesnikova^a, I. V. Goroncharovskaya^a, E. V. Trusova^a, A. I. Kostin^a, A. K. Shabanov^a,
M. M. Goldin^b, and S. S. Petrikov^a

^a Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine, Department of Moscow Health Ministry, Moscow, 129090 Russia

^b Glen Oaks Community College, Centreville, MI 49032, 62249 Shimmel Road, USA

*e-mail: anatolevseev@gmail.com

Using an electrochemical method based on the use of an optically transparent working electrode, it was shown that during the erythrocytes storage under hypothermic conditions (4°C), the degree of reversibility of shape changes decreases when exposed to direct electrical current. With the cathodic polarization of the optically transparent working electrode (−0.5 V), the proportion of erythrocytes converted to spherocytocytes decreased from 99.6 ± 0.4% (1st day) to 42.8 ± 14.5% (42nd day) ($p < 0.05$), and with anodic polarization (1.2 V) the proportion of erythrocytes converted to stomatocytes decreased from 80.6 ± 6.7% (1st day) to 35.4 ± 5.6% (42nd day) ($p < 0.05$). At the later stages of storage, an increase in the number of cells that underwent destruction under the influence of direct electrical current was observed in the samples. The presence of such cells in transfused packed red blood cells can lead to an increase in plasma free hemoglobin levels in the recipient after transfusion. The results obtained may form the basis for the development of new methods for assessing the quality of blood components.

Keywords: optically transparent electrode, indium tin oxide, erythrocyte, deformability, morphology