

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева»
Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы
«Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского
Департамента здравоохранения города Москвы»

На правах рукописи

Горончаровская Ирина Викторовна

Электрохимическое взаимодействие компонентов крови с
электродами из платины и углеродных материалов

02.00.05 Электрохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, профессор
Гольдин Марк Михайлович

Москва-2016 год

Содержание

Список сокращений	5
Введение	6
Глава 1. Литературный обзор	11
1.1 Электрохимическая природа жизненно важных процессов в организме	11
1.1.1. Передача нервных импульсов	11
1.1.2. Развитие представлений об электрохимическом характере взаимодействия клеток крови с тканями организма	13
1.2. Электрохимические методы и технологии в медицине	18
1.2.1. Электрохимически управляемая гемосорбция	18
1.2.2. Удаление свободного гемоглобина	20
1.2.3. Мониторинг редокс-потенциала с помощью измерения потенциала платинового электрода при разомкнутой цепи	22
1.2.4. Проблема оценки качества трансфузионных сред	24
1.2.4.1. Оценка жизнеспособности тромбоцитов	25
1.2.4.2. Оценка качества донорской плазмы	28
1.3 Роль форменных элементов крови в гомеостатических процессах	29
1.3.1 Основные функции и строение эритроцитов и тромбоцитов	29
1.3.2 Строение поверхности клеток крови	31
1.3.3 Электрохимические характеристики клеток крови	32
1.4 Выводы по литературному обзору	36
Глава 2. Методика эксперимента	38
2.1 Вещества, используемые в работе	38
2.2 Методика удаления кислорода из исследуемых растворов	38

2.3	Электрохимические методики	42
2.3.1	Измерение ПРЦ платинового электрода в плазме крови и в плазме, обогащенной тромбоцитами	43
2.3.2	Проведение поляризационных измерений	43
2.3.3	Измерение потенциалов гранулированных активированных углей	44
2.3.4	Электрохимическая модификация гранулированных активированных углей	45
2.3.5	Электрохимическая модификация поверхности активированных углей полипирролом (ПП)	46
2.3.6	Проведение кулонометрических измерений	47
2.4	Биологические методики	47
2.4.1	Подготовка биологических сред к исследованию	47
2.4.2	Морфофункциональные исследования	48
	Глава 3. Результаты и их обсуждение	50
3.1	Изучение взаимодействия форменных элементов крови с электропроводными материалами	50
3.1.1	Электрохимическое поведение эритроцитов на платиновом электроде	50
3.1.2	Электрохимическое поведение эритроцитов на стеклоуглеродном электроде	56
3.1.3	Электрохимическое поведение тромбоцитов на платиновом электроде	63
3.1.4	Расчет числа электронов, переносимых в процессе электровосстановления эритроцитов и тромбоцитов	66
3.1.5	Суммарные исследования электрохимического поведения клеток крови на платиновом и стеклоуглеродном электродах	74
3.2	Измерение ПРЦ платинового электрода в плазме крови	79

3.2.1	Оценка жизнеспособности тромбоцитов	79
3.2.2	Оценка качества донорской плазмы	85
3.3	Взаимодействие эритроцитов и «теней» эритроцитов с углеродными материалами	91
	Выводы	108
	Список литературы	110

Список сокращений

ПП – полипиррол

ПРЦ – потенциал платинового электрода при разомкнутой цепи

РП – редокс - потенциал

ТРГ – термически расширенный графит

Введение

Актуальность проблемы

Использование электрохимической модели при изучении взаимодействий живых систем с чужеродными материалами позволяет не только разрабатывать новые методы анализа, диагностики и лечения, но и получать новую информацию о природе взаимодействия в клетках и тканях. Однако, несмотря на большое число исследований, посвященных взаимодействию компонентов крови с различными электропроводными материалами, существующие в настоящее время схемы и механизмы данного взаимодействия часто не подтверждены экспериментально. Кроме того, на основе предполагаемых механизмов взаимодействия, как правило, невозможно предсказать травмирующую активность чужеродного материала по отношению к компонентам крови. Поэтому по-прежнему актуален интерес к изучению взаимодействия в системе [электропроводный материал]/[кровь].

Создание и многолетнее клиническое использование системы электрохимически управляемой гемосорбции для лечения острых отравлений выявила важный эффект: контакт отрицательно заряженных активированных углей с кровью при гемосорбции приводил к улучшению реологических свойств крови пациента. Это наблюдение, вероятно, может быть обусловлено переносом зарядов с поверхности угля-гемосорбента на поверхность мембран клеток крови и, как следствие, к стабилизации этих клеток. Таким образом, экспериментальное исследование электронного транспорта в системе [электрод]/[клетка крови] является исключительно актуальным как для понимания механизма взаимодействия [чужеродный материал]/[клетка крови], так и для разработки новых практически важных электрохимических медицинских технологий.

Проблема устранения последствий повреждения и гибели эритроцитов в крови также остается важной в настоящее время. Постоянно протекающие в организме процессы естественного старения и гибели клеток крови приводят

к образованию продуктов распада, требующих утилизации или удаления. Для эритроцитов разрушение мембран сопровождается освобождением гемоглобина, разрушением гема, появлением билирубина и разрушенных эритроцитов (так называемых «теней» эритроцитов). При нормальной работе организма при этом включается механизм метаболизма (фагоцитоза), обеспечивающий утилизацию погибших эритроцитов и свободного гемоглобина. Однако если погибших клеток становится больше, чем организм может утилизировать, в крови накапливаются «тени» эритроцитов, которые «забивают» почечные каналы, то есть работа почек нарушается вплоть до полного отказа системы почечного очищения организма. Несмотря на очевидную важность и актуальность проблемы удаления «теней» из крови, не удалось найти сведений о возможности их извлечения.

Разработка методов оценки биологической полноценности клеток и биологических сред также является исключительно актуальной в связи с бурным ростом биотехнологий. Известно, например, что переливание тромбоцитных сред пациенту необходимо при острых кровотечениях и патологических заболеваниях крови, однако длительное хранение тромбоцитов невозможно при существующих технологиях. Недавно было обнаружено, что жизнеспособность тромбоцитов, определяемая нормальной морфологией и функциональной активностью, зависит от количества внутриклеточных гранул. В настоящее время для оценки количества гранул, содержащихся в тромбоцитах, то есть для отбора пригодной для хранения тромбоцитной среды, используют весьма субъективный оптический метод. Выявление и использование физико-химических параметров этих клеток для поиска независимых критериев оценки их жизнеспособности, несомненно, является весьма важным.

Такая важная биотехнология, как заготовка плазмы крови и определение ее пригодности для переливания конкретному пациенту также нуждается в дополнительных независимых критериях оценки биоматериала и плазмы

реципиента, которые помогут избежать возникновения осложнений при ее переливании. Актуальность этой проблемы подчеркивается масштабом применения технологии заготовки и хранения плазмы - ежегодно в России заготавливается и переливается около 1 млн литров плазмы.

Цель работы: Электрохимическое исследование взаимодействия компонентов крови с чужеродными материалами и транспорта электронов через границу раздела [электрод]/[биологическая среда].

Достижение поставленной цели потребовало решения следующих задач:

1. Разработать методики проведения поляризационных и микрокулонометрических измерений в системе [электрод]/[клетка крови].

2. Изучить электрохимическое поведение эритроцитов и тромбоцитов на электродах из платины и стеклоуглерода с помощью поляризационных измерений в режиме линейной развертки потенциала.

3. Исследовать взаимодействие эритроцитов и тромбоцитов с электродами из платины и стеклоуглерода в потенциостатических условиях с помощью микрокулонометрии.

4. Исследовать взаимодействие электрохимически модифицированных активированных углей различной природы с суспензией нормальных и гемолизированных эритроцитов («теней» эритроцитов) в зависимости от потенциала.

5. Выявить связь электрохимических свойств тромбоцитов с их морфофункциональным статусом.

6. Изучить изменение электрохимических свойств плазмы во время ее длительного хранения при температуре -40°C .

Научная новизна работы

Получено экспериментальное подтверждение существования транспорта электронов в системе [электрод]/[клетка крови] в широком диапазоне потенциалов. Это доказано с помощью поляризационных и микрокулонометрических измерений на платиновом и стеклоуглеродном электродах в суспензии эритроцитов и тромбоцитов, которые зафиксировали протекание процессов электровосстановления и электроокисления в указанной системе. Обнаружены области потенциалов, соответствующие отсутствию транспорта электронов при контакте электродов с суспензией клеток крови.

Установлена возможность удаления «теней» эритроцитов из их смесей с нормальными эритроцитами с помощью электрохимически управляемой сорбции на поляризованных активированных углях. Обнаружена зависимость степени удаления «теней» эритроцитов от потенциала угля и его природы. Обнаружено явление стабилизации эритроцитов при определенных потенциалах угля на примере снижения количества конгломератов эритроцитов при их контакте с модифицированными активированными углями.

Обнаружено, что разность величин ПРЦ, измеренных в плазме крови, содержащей тромбоциты, до и после криодеструкции, линейно зависит от содержания в плазме тромбоцитов, богатых гранулами. Найденный эффект объяснен выбросом в плазму содержимого секреторных гранул, определяющих жизнеспособность тромбоцитов.

Обнаружено смещение величин ПРЦ в плазме крови в процессе ее шестимесячного хранения при температуре -40°C . Наблюдаемый эффект, вероятно, связан с деградированием остаточных количеств форменных элементов крови. Полученные данные могут быть использованы для разработки критерия состояния донорской плазмы перед ее переливанием.

Практическая значимость работы

Обнаружена область потенциалов, соответствующая отсутствию транспорта электронов в указанной системе, что свидетельствует об отсутствии взаимодействий между клеткой и электродом. Определение указанной области потенциалов может быть использовано для определения области индифферентности электропроводных материалов по отношению к крови.

Разработан метод извлечения «теней» эритроцитов из их смеси с нормальными эритроцитами с помощью электрохимически модифицированных поляризованных активированных углей.

Разработан электрохимический метод оценки морфофункционального состояния тромбоцитов путем измерения величин ПРЦ в плазме крови, содержащей тромбоциты, до и после их криодеструкции.

Выявлено изменение величин ПРЦ в донорской плазме в процессе ее длительного хранения. Предложено использовать данный параметр в качестве критерия пригодности плазмы для ее переливания при сравнении с величиной ПРЦ платинового электрода в плазме крови реципиента.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на 9-м Международном конгрессе молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ-2013» (Москва, 2013), 229 th Electrochemical Society Meeting (San Diego, 2016), 11-м Международном конгрессе молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ-2015» (Москва, 2015), 12-м Международном конгрессе молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ-2016» (Москва, 2016).

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 3 статьи, в том числе 2 статьи в рецензируемых журналах, включенных в перечень ВАК, а также 6 тезисов докладов, получен 1 патент Российской Федерации.

Глава 1. Литературный обзор

1.1 Электрохимическая природа жизненно важных процессов в организме

1.1.1 Передача нервных импульсов

Идея об «электрических свойствах» живых организмов известна с начала XVIII в. Впервые наличие электрических зарядов у растений и животных было обнаружено еще в 1731 году Греем при помощи электроскопа, первого прибора для регистрации электричества. Тогда же некоторыми учеными высказывались предположения об электрической природе нервного возбуждения, но не существовало фактических подтверждений этому предположению. Начало экспериментальному изучению «животного электричества» положил Луиджи Гальвани в 1791 году. Он обнаружил, что при контакте препарата нервно-мышечной ткани с двумя различными металлами происходило сокращение мышц лапок лягушки. Гальвани считал, что это явление есть ничто иное, как животное электричество. Однако существовали и противники теории «животного электричества», основным из которых был другой итальянский ученый - Алессандро Вольта. Он считал, что источником электричества является не сама мышечная ткань, а контакт разнородных металлов с раствором электролита, содержащимся в этой мышечной ткани. Несмотря на то, что позже Гальвани описал явление сокращения мышц уже без участия металлов, идея о животном электричестве была забыта на долгие годы. И только в середине XIX века идея о животном

электричестве была восстановлена, поскольку был найден целый класс живых возбудимых клеток, способных генерировать электрические поля и локальные токи [1-5].

Как стало известно много позже, уже в XX в., многие процессы в организме имеют электрохимическую природу. Например, процесс переноса заряда в электронных транспортных цепочках фотосинтеза и дыхания, ионный обмен через клеточную мембрану, преобразование сигналов и передача нервных импульсов [6-9], их генерирование, например, в виде «потенциала действия» [2,10] - скачка мембранного потенциала на небольшом участке нейрона (рис. 1). При воздействии на клетку электрического импульса происходит конформация специализированных белковых структур (ионных каналов) и разделение зарядов с последующей генерацией нервного импульса [1,5,10].

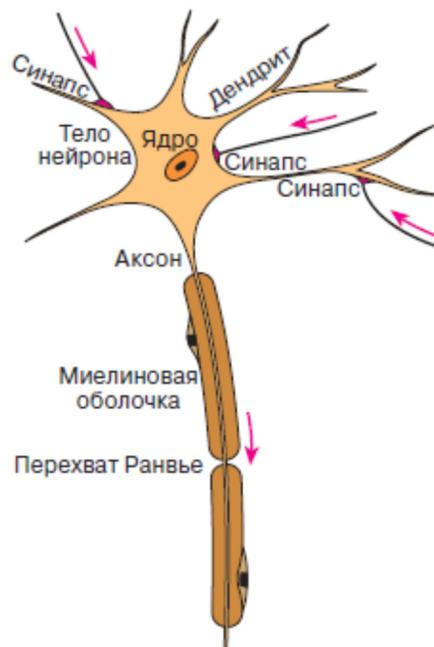


Рис.1. Схема строения нейрона [1].

Генерируемые потенциалы отражают физико-химические следствия обмена веществ и являются надежными, универсальными и точными показателями течения любых физиологических процессов [1].

1.1.2 Развитие представлений об электрохимическом характере взаимодействия клеток крови с тканями организма

Впервые концепция модели организма как суммы биологически закрытых электрических цепей была представлена в 80-х гг. XX века в работах Б. Норденстрёма [11]. Согласно его концепции, кровь, текущая по сосудам, рассматривается как проводник электрических сигналов, а здоровые и поврежденные участки тканей обладают различными электрическими потенциалами. Основываясь на этих представлениях, Норденстрём предпринимал попытки лечения злокачественных опухолей, используя электрохимический метод: он вживлял в пораженные участки платиновые электроды и поляризовал их до потенциалов, приводящих опухолевые клетки к гибели [12]. К сожалению, метод Норденстрёма не доведен до медицинской технологии, однако исследования в этом направлении продолжаются [13-16].

Электрохимические измерения живых систем успешно используются, например, с их помощью был исследован механизм клеточного метаболизма и ионного транспорта в грибах *Neurospora crassa*, и прояснено влияние внеклеточных катионов на внутриклеточный потенциал [17-19]. Эти важнейшие работы использованы для создания микробиологических топливных элементов.

Результаты, полученные с помощью метода электрофореза, позволили разделять макромолекулы, белки, клетки крови, они также послужили толчком для исследований электрохимических свойств живых клеток. С помощью электрофореза стало возможным не только определить величину и знак заряда на мембране, но также и химический состав мембраны клеток. Наиболее значимыми работами по электрофорезу форменных элементов крови являются работы Абрамсона [20-27], Пондера [27,28], Симана [29-30], Харамоненко [31].

Открытие факта, что мембрана клетки несет на своей поверхности избыточный (отрицательный) заряд, дало основание для появления предположений о том, что поведение клетки по отношению к чужеродным материалам и стенкам сосудов должно носить электрохимический характер и, хотя бы частично, определяться плотностью заряда на ее поверхности. Наиболее распространенными моделями взаимодействия клеток крови с чужеродной поверхностью оказались электростатическая и электрохимическая, либо их сочетание.

В 50-х гг. XX века появилось большое число работ по исследованию взаимодействия чужеродных материалов с форменными элементами крови. Наиболее крупный вклад в эти исследования внесли работы Сойера и его сотрудников [32-49]. Актуальность подобных исследований состояла в необходимости решения проблемы подбора материалов имплантатов, не обладающих тромбогенным действием. Эксперименты Сойера показали, что внутренняя стенка сосуда («интима») заряжена отрицательно по отношению к внешней оболочке («адвентиций»). Однако травма сосуда может изменить знак заряда его интимы на положительный [40]. Джерард, измеряя потенциалы в клетках и тканях, сформулировал концепцию «потенциала травмы» [50]. Он связал изменение потенциала травмы с выходом внутреннего содержимого клетки во внешнюю среду. Сойер же обнаружил, что контакт положительно заряженного электрода с внешней стенкой сосуда (адвентицием) продуцирует локальное образование тромба на его внутренней стенке (интима), в то время как при отрицательном потенциале электрода образование тромба не наблюдалось. Таким образом, Сойер пришел к выводу о том, что знак заряда поверхности электрода оказывает влияние на процесс тромбообразования. Эксперименты по исследованию влияния различных материалов (металлов), которые моделировали искусственную стенку сосуда, на тромбогенность в режиме отсутствия поляризации показали, что тромб образовывался только на электродах, которые имели положительное значение стационарного

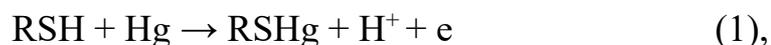
потенциала в исследуемой среде (крови) (Cu, Ni, Au, Pt), в то время как на электродах, имеющих отрицательное значение потенциала (Mg, Al, Cd) образование тромба не наблюдалось. Также было отмечено, что если изменять потенциал материала, то ему можно придать тромборезистентные свойства.

Для уточнения механизма образования тромба вследствие контакта крови с чужеродной поверхностью Соьер проводил эксперименты по определению потенциалов, соответствующих осаждению форменных элементов крови (тромбоцитов, эритроцитов и лейкоцитов) на различные электроды при поляризации. Оказалось, что форменные элементы крови претерпевают изменения при контакте с поверхностью, заряженной положительнее некоторого критического значения. Соьер связал это явление с уменьшением плотности отрицательного заряда на мембранах клеток и последующим снижением стабильности взаимного отталкивания клеток. При многократном осаждении - снятии клеток, потенциал их осаждения становился более разбросанным. Эритроциты и лейкоциты осаждались обратимо при одном и том же потенциале, как на платине, так и на золоте. При $pH = 7,4$ этот потенциал составил $530 \text{ мВ} \pm 20 \text{ мВ}$, а потенциал осаждения тромбоцитов от 600 мВ до 650 мВ , что оказалось на 150 мВ положительнее потенциала осаждения эритроцитов и лейкоцитов. Этот потенциал не зависел от концентрации клеток в широком диапазоне значений (10^3 - 10^6 кл/мл), и от материала электрода, но зависел от pH суспензии клеток и изменялся примерно на $85 \text{ мВ} \pm 15 \text{ мВ}$ при изменении pH на одну единицу [45]. В результате анализа этих данных, Соьер выдвинул предположение об электрохимической природе взаимодействия клеток крови с металлическими электродами [33-34,44-45]. Положительно заряженные поверхности, способные принимать электроны от клеток крови, или других ее компонентов (то есть акцепторы электронов в системе электрод/кровь), должны, по Соьеру, способствовать тромбозу, а поверхности, способные отдавать электроны клеткам крови или белкам (доноры электронов в системе электрод/кровь)

должны иметь тенденцию к предотвращению тромбоза [32]. Конечно, исследование взаимодействия клеток крови с электродом принципиально не могло бы охарактеризовать все стороны механизма тромбообразования, например, повышение активности свертывающей системы крови происходит за счет запуска определенных гомеостатических процессов.

Электрохимическая модель взаимодействия клеток крови с углеродными материалами, предложенная М.М. Гольдиным и др. [51,52], оказалась весьма эффективной при исследовании процесса взаимодействия клеток крови с гемосорбентами. В этих работах было обнаружено, что степень разрушения клеток крови при контакте с активированными углями зависит от величины потенциала угля. Использование электрохимической модели позволило не только предложить электрохимический механизм взаимодействия в системе уголь/кровь, но и разработать электрохимически управляемые медицинские технологии гемосорбционной детоксикации.

Сторонники электрохимической модели взаимодействий в системе [электрод]/[клетка] пытались обнаружить электрохимическую активность эритроцитов в системе [ртутный электрод]/[мембрана эритроцита]. Например, автор работы [53] предположил протекание процесса взаимодействия сульфгидрильных групп мембраны эритроцитов с ртутным капельным электродом по схеме:



Очевидно, однако, что протекание реакции (1) невозможно вследствие того, что депротонирование с присоединением ртути к сульфгидрильной группе может протекать лишь в присутствии кислорода или другого окислителя [54], чтобы перевести металлическую ртуть в ион ртути, тогда как эксперименты в работе [53] проводились в отсутствие кислорода в растворе.

К сторонникам электростатической модели взаимодействий в системе электрод/клетка относятся, кроме упомянутых выше исследователей, также

Д. Джингелл и Ж. Форнес. Они исследовали адгезию эритроцитов на поляризованном свинцовом электроде при различных плотностях заряда в среде 1,2 мМ NaF [55,56]. Было обнаружено, что клетки могут адгезироваться на электроде необратимо при потенциалах положительнее некоторой критической величины и около потенциала нулевого заряда свинцового электрода. В области потенциалов, отрицательнее потенциала нулевого заряда электрода, клетки адгезируются обратимо и могут быть сняты с электрода увеличением отрицательного заряда.

В то же время Сойер с соавторами не обнаружили корреляции осаждения клеток с потенциалом нулевого заряда электрода [46].

Годен и Капрани также трактуют взаимодействие между эритроцитами и поверхностью поляризованного платинового микроэлектрода, пользуясь электростатической моделью. Ими найдено, что при отрицательных значениях плотности заряда (от 0 мкКл/см² до -15 мкКл/см²) взаимодействие клеток с поверхностью электрода незначительно вследствие действия сил электростатического отталкивания. В области потенциала нулевого заряда и при невысоких величинах положительного потенциала (от 0 мкКл/см² до +10 мкКл/см²) наблюдался максимум взаимодействия, при дальнейшем увеличении плотности положительного заряда (>10 мкКл/см²) интенсивность взаимодействия не изменялась, что авторы связали с вероятной переориентацией макромолекул на мембране эритроцита [57-59].

Анализ приведенных выше работ показал, что предположения о протекании электрохимических процессов (то есть о существовании транспорта зарядов) при взаимодействии клеток крови с чужеродными материалами, сделанные их авторами, являются вполне мотивированными. Однако в доступной литературе не найдено экспериментальных данных, фиксирующих транспорт электронов в указанной системе, хотя попытки обнаружить это явление предпринимались.

1.2 Электрохимические методы и технологии в медицине

Электрохимические исследования процессов, протекающих в живых системах, активно продолжающиеся в течение многих последних десятилетий, привели к взаимному проникновению электрохимических и биологических знаний друг в друга. Это, в свою очередь, обеспечило интенсивное развитие медицинских приложений электрохимии и созданию новых электрохимических диагностических и лечебных медицинских технологий.

1.2.1 Электрохимически управляемая гемосорбция

Гемосорбция является одним из методов экстракорпоральной детоксикации организма, успешно применяющийся при лечении острых отравлений, эндотоксикозов и других патологических состояний. Впервые процедуру гемосорбции провел и описал Ятсидис в 1964 году [60,61]. Суть метода гемосорбции заключается в выведении из крови больного токсических соединений путем пропускания ее через колонку с сорбентом. На практике часто в качестве гемосорбентов используются активированные угли, реже – полимерные волокна. Широкое применение активированных углей обусловлено, в первую очередь, их высокими адсорбционными свойствами и сравнительно низкой стоимостью [62].

Серьезными недостатками угольных гемосорбентов являются отсутствие селективности, что может привести к травме клеток крови [63,64] и нарушению баланса свертывающей системы [65].

Таким образом, важной задачей является поиск гемосорбентов, которые совмещают гемосовместимость с высокой адсорбционной активностью по отношению к заданным классам токсикантов [66,67].

В настоящее время нет единого мнения о том, в чем заключается природа гемосовместимости материала и каков механизм взаимодействия компонентов крови с чужеродной поверхностью.

Например, существуют две модели для трактовки механизма взаимодействия активированных углей с клетками крови – на основе учета микрорельефа активированного угля, состоящего из острых кромок, шероховатостей, «игольчатых структур» и на основе электрохимических взаимодействий в системе [уголь]/[клетка]. В литературе по адсорбции на активированных углях преобладает первая модель [68-70], тогда как, по нашему мнению, электрохимическая модель в данном случае работает гораздо лучше [51-52,71-73].

Весьма доказательно это продемонстрировано в работе [71]. На основании измерений потенциалов при разомкнутой цепи (ПРЦ) в крови и в физиологическом растворе промышленных углей, было установлено, что степень травмирования форменных элементов крови при контакте с этими углями зависит от величины ПРЦ. Эти исследования также показали, что поверхностные соединения активированных углей также могут оказывать влияние на адсорбционный процесс и взаимодействие углеродного сорбента не только с клетками, но и с белками крови.

Таким образом, взаимодействие клеток крови с электродом-сорбентом в значительной степени определяются зарядом поверхности сорбента вследствие образования двойного электрического слоя на границе раздела [электропроводный сорбент]/[биологическая жидкость].

Как обнаружено в работе [51], изменение заряда поверхности сорбента путем поляризации извне, либо с помощью электрохимического модифицирования, придавало активированным углям гемосовместимость. Адсорбционная активность таких модифицированных углей сохранялась. При этом было установлено, что область потенциалов от -150 до 50 мВ соответствует гемосовместимости потенциальных гемосорбентов.

Таким образом, электрохимический подход к трактовке механизма взаимодействия в системе гемосорбент/кровь позволил найти возможность управлять свойствами активированных углей с помощью их поляризации. Поскольку известно, что адсорбция различных веществ зависит от потенциала поверхности сорбента [51,73,74], то, изменяя потенциал поверхности активированного угля, появляется возможность не только сохранить, но и увеличивать адсорбционную активность сорбента по отношению к заданным извлекаемым токсикантам.

1.2.2 Удаление свободного гемоглобина

Примером создания новых медицинских электрохимических приложений на основе электрохимической модели взаимодействий в системе [электропроводный материал]/[кровь] является решение важной задачи - удаления свободного гемоглобина из биологических сред.

Известно, что свободный гемоглобин, попадающий в кровь в результате разрушения эритроцитов, является токсичным для организма в концентрациях выше физиологических (то есть более 220 мг/л), так как становится невозможной его утилизация в организме за счет процесса нормального метаболизма. Нормальный метаболизм свободного гемоглобина протекает через образование комплекса с белком-переносчиком гаптоглобином. Организм не может вырабатывать необходимое количество гаптоглобина (свыше 300 мг/л), если содержание свободного гемоглобина превышает указанную норму [68,75-78]. Причиной избыточного количества свободного гемоглобина могут являться, например, усиленный внутрисосудистый гемолиз, переливание пациенту донорской крови в больших объемах при обширных кровопотерях, вследствие некоторых наследственных заболеваний [79,80]. Разрушение мембран эритроцитов может происходить также при острых отравлениях [78].

Попытки создать селективный по отношению к свободному гемоглобину сорбент на основе гаптоглобина, оказались неудачными, так как фиксация гаптоглобина на нерастворимом носителе приводила к потере его активности [81].

В работах [82,83] впервые была предложена методика электрохимической модификации сорбентов для удаления свободного гемоглобина путем иммобилизации аффинных агентов на активированных углях. Предложенная электрохимическая методика модификации состояла из электрополимеризации проводящего полимера на активированном угле с целью придания высокой биосовместимости и сорбционной способности [84,85] и методики иммобилизации аффинных агентов, выбор которых основан на понятии о «жесткой» и «мягкой» природе ионов металлов и лигандов [83,84,86-88].

На основе этих теоретических предположений активированный уголь был модифицирован путем электрополимеризации на его поверхности пленки полипиррола с иммобилизацией в ней «мягких» ионов Cu^{2+} с «мягким» лигандом I^- , выступающим в качестве допанта в составе полипиррола. Такие сорбенты с иммобилизованными на поверхности угля лигандами действительно позволили решить проблему селективного удаления свободного гемоглобина из плазмы крови [82,83].

Наряду с удалением из плазмы крови свободного гемоглобина, не менее важно удаление разрушенных эритроцитов (так называемых «теней» эритроцитов), появление и накапливание которых в организме является наиболее опасным следствием процесса гемолиза. Если содержание свободного гемоглобина в крови не превышает физиологических значений [89], утилизация «теней» эритроцитов происходит с помощью процесса фагоцитоза [90]. Дальнейшее разрушение эритроцитов приводит к невозможности своевременной утилизации, «тени» эритроцитов «прилипают» к эндотелию капилляров клубочков почки, образуя конгломераты, что

приводит к нарушению клубочковой фильтрации и к развитию почечной недостаточности [91]. Оказалось, однако, что на настоящий момент не существует методов удаления «теней» эритроцитов из плазмы крови.

Описанные выше электрохимические медицинские технологии являются лечебными. Ниже приводятся теоретические предпосылки для создания диагностических электрохимических технологий и примеры таких разработок, нашедших применение в клинике или имеющих хорошие перспективы для внедрения в клиническую практику для пациентов с различными патологическими состояниями.

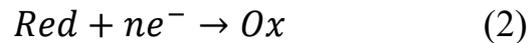
1.2.3 Мониторинг редокс-потенциала с помощью измерения потенциала платинового электрода при разомкнутой цепи

Значительным достижением последних лет в разработке электрохимических медицинских приложений является развитие техники электрохимических измерений ПРЦ платинового электрода (редокс-потенциала, РП) в различных средах. Оказалось, что с помощью обычных приборов, предназначенных для измерений ПРЦ невозможно получить воспроизводимые результаты при измерениях уровня окислительно-восстановительного состояния, характеризующего растворы медицинского назначения [92].

Разработка такого метода [93] позволила использовать его не только с указанной выше целью, но также и разработать на его основе ряд диагностических и прогностических критериев для диагностики воспалительных осложнений и прогнозирования исхода заболеваний в ранние послеоперационные сроки [94].

Следует отметить, что понятие редокс-потенциала в биохимии и медицине отличается от аналогичного понятия в электрохимии. В электрохимической

литературе под термином РП понимается электрохимический потенциал обратимой окислительно-восстановительной системы:



Согласно уравнению Нернста (3), этот потенциал зависит только от соотношения окисленной [Ox] и восстановленной [Red] форм вещества и не зависит от природы металла и состояния поверхности электрода [95]:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox]}{[Red]} \quad (3)$$

где: E – окислительно-восстановительный потенциал системы, E_0 – стандартный потенциал системы. Таким образом, для измерения параметра, называемого в медицине РП, измеряют сдвиг потенциала при разомкнутой цепи (ПРЦ) рабочего электрода при погружении его в исследуемую среду. Эта величина сдвига является интегральным параметром и отражает взаимодействие поверхности рабочего электрода с совокупностью окислителей и восстановителей в исследуемой среде.

Величина РП широко используется для мониторинга качества воды при ее очистке и обеззараживании, дезинфицирующей активности растворов [96-98], а также для исследования биологических [99,100] и других систем, обладающих окислительно-восстановительными свойствами.

Метод измерения РП весьма востребован в медицине. С 1950-х годов его начали использовать для характеристики окислительно-восстановительных свойств крови, ее компонентов и тканей [101-105].

Известно, что в нормально функционирующем организме существует баланс между прооксидатами (активными формами кислорода, АФК), образующимися в ряде физико-химических процессов и антиоксидантами [106]. Нарушение этого баланса, вследствие развития различных патологических процессов, приводит к либо к развитию окислительного

стресса, в случае, если баланс смещен в сторону прооксидантов, либо к гипоксии, если происходит торможение радикальных процессов [106].

Таким образом, РП является отражением соотношения прооксидантов и антиоксидантов в организме, следовательно, эта величина может быть использована для диагностики пациентов с различными патологиями. Работы по измерению РП в плазме и сыворотке крови пациентов после трансплантации печени и почки [94,107] и больных с нейротравмой [108-110], показали, что увеличение положительных значений РП соответствовали патологическим состояниям, вызванным окислительным стрессом организма. Мониторинг РП сыворотки крови позволил диагностировать кризы отторжения пересаженных печени и почек за несколько дней до появления у пациента клинических симптомов, что позволяло использовать величины РП и их изменение во времени в качестве критерия прогнозирования развития осложнений и отторжений трансплантата. Также измерения величин РП во времени позволяли корректировать курс лечения.

Анализ этих данных показал, что поскольку величина РП и динамика ее изменения во времени является отражением состояния окислительно-восстановительного блока гомеостаза, имеются благоприятные перспективы использовать измерения РП для оценки состояния и качества биологических сред, используемых в медицине.

1.2.4 Проблема оценки качества трансфузионных сред

В настоящее время оценка качества и сохранности биологических трансфузионных сред производится с помощью ряда биологических и биохимических методов. Оценка морфологии клеток крови требует использования оптических методов, строгая трактовка данных при этом весьма сложна из-за высокой роли личностного фактора исследователя. Поэтому использование независимых методов исследования, например,

оценка морфологии клетки с помощью измерения физико-химических констант было бы крайне полезным. Ниже будут продемонстрированы возможности электрохимических методов в приложении к указанным задачам на примерах оценки жизнеспособности тромбоцитов и оценки состояния плазмы крови.

1.2.4.1 Оценка жизнеспособности тромбоцитов

Тромбоциты являются безъядерными клетками крови, необходимыми для остановки кровотечений за счет способности тромбоцитов активироваться и агрегироваться. Основные функции и биологическая полноценность тромбоцитов определяются взаимодействием компонентов их клеточной структуры [111-113].

В настоящее время в связи с развитием прикладных биотехнологий возросла важность оценки жизнеспособности клеток, например, для оценки сохранности тромбоцитов и для отбора тромбоцитов для длительного хранения [114].

Обычно оценку жизнеспособности клеток производят в крови или плазме [115], реже в цереброспинальной жидкости [116]. Как правило, анализ направлен на выявление дефектных клеток и продуктов клеточного распада. Такой подход весьма эффективен для анализа патологических изменений тестируемых клеток крови, но, с другой стороны, он не позволяет адекватно охарактеризовать популяцию нормальных клеток.

Оценка морфофункционального статуса тромбоцитов возможна лишь с помощью морфологического исследования различных фракций тромбоцитарных гранул [114]. В одном тромбоците содержится 50-80 α -гранул, они содержат большое количество белков, в том числе фибриноген и фактор Виллебранда (vWF) [111,117]. Среди секретируемых компонентов α -гранул имеются также тиоловые белки (TSP-1, витро- и фибронектин),

содержащие SH- группы аминокислот, биологические регуляторы редокс-потенциала (тиолдисульфидная редокс система) [118]. Обратим внимание на содержание большого количества белков различной природы в α -гранулах, поскольку адсорбция белков, как известно, приводит к сдвигам потенциала платинового электрода.

Возможности использования морфофункционального исследования гранул тромбоцитов в качестве интегрального параметра оценки их функции описаны в работе [114]. Оказалось, что результаты морфофункционального исследования можно использовать в качестве критерия при отборе жизнеспособных клеток для длительного хранения, так как биологическая полноценность тромбоцитов зависит от наличия в них гранул и их количества в одной клетке.

Существенным недостатком данного метода является субъективность расчетов количества гранул на единицу объема, вызванная тем, что исследователь может наблюдать только клетки, находящиеся в поле зрения, а лишь затем усреднять расчеты на весь исследуемый объем.

Поскольку, как показано в [114], количество внутриклеточных гранул определяет морфофункциональный статус тромбоцитов, было решено проанализировать «ответ» физико-химических параметров клетки на изменение в ней количества гранул, чтобы объективизировать результаты исследования морфофункционального статуса тромбоцитов. В качестве физико-химического параметра, характеризующего состояние клетки, можно было выбрать так называемый внутриклеточный редокс-потенциал (РП), поскольку известно, что изменение его величины отражает нарушения основных функций клетки [119].

Однако величина внутриклеточного потенциала не может быть непосредственно измерена, поскольку введение электрода во внутриклеточное пространство приведет к разрушению мембраны и нарушит целостность клетки. Используемые в настоящее время непрямые методы измерений

внутриклеточных потенциалов с помощью использования редокс-активных «зеленых флюоресцирующих протеинов» («Green Fluorescent Proteins») [120,121], либо на основе измерений Рамановских спектров [122-124] являются весьма сложными, кроме того, результаты этих измерений не совпадают с результатами, полученными с помощью термодинамических расчетов величин РП.

Для определения внутриклеточного РП с помощью термодинамических расчетов обычно выбирают определенные стандартные редокс пары и искомую величину рассчитывают по уравнению Нернста при условии ряда термодинамических допущений. Как правило, в качестве стандартных редокс пар выбирают пары глутатион восстановленный/окисленный (GSH/GSSG) и цистеин/цистин (Cys/CySS) [125]. Значения РП для внутриклеточных редокс пар пространственно детерминированы и подчиняются строго определенной иерархии в формировании РП в зависимости от концентрации данных веществ. Например, рассчитанная величина митохондриального РП пары GSH/GSSG равна -100 мВ, цитоплазматического -40 мВ, а для пары Cys/CySS величина РП в цитозоле равна 60 мВ [126].

Авторы [127] предлагают использовать для оценки суммарной окислительно-восстановительной активности многокомпонентной клеточной среды понятие «эффективного внутриклеточного редокс-потенциала», который также является расчетной величиной.

Однако величины РП, рассчитанные по уравнению Нернста различными авторами не совпадают. Так, согласно [128], величина эффективного РП плазмы крови человека составила 554 мВ при $\text{pH}=7,2$, тогда как та же величина, приведенная в работе [126] составляет 120 мВ, если расчеты произведены для пары Cys/CySS, либо 60 мВ, если расчеты произведены для пары GSH/GSSG.

Более того, величина РП плазмы крови, измеренная прямым методом, что вполне корректно, поскольку речь идет не о внутриклеточном потенциале, а о плазме крови, лежит в диапазоне от -11 мВ до -56 мВ [94].

Таким образом, вопрос об оценке величины РП клетки остается открытым, несмотря на его очевидную важность для оценки морфофункционального статуса тромбоцитов.

1.2.4.2 Оценка качества донорской плазмы

В клинической практике для лечения пациентов с массивной кровопотерей широко используется трансфузия плазмы крови, только в 2014 году в России было заготовлено около 1 млн литров донорской плазмы [129]. Плазму для трансфузии (переливания пациенту) [130] замораживают и карантинизируют в течение 6 мес. при температуре -40°C .

Принято считать [130], что указанные условия хранения плазмы обеспечивают сохранность и функциональную активность всех ее компонентов [130-132]. Перед процедурой карантинизации и непосредственно перед трансфузией пациенту плазма проходит лабораторный контроль соответствующих параметров [131,132].

Однако, несмотря на сложный многоэтапный анализ плазмы до и после периода карантинизации, развитие серьезных осложнений у пациента после ее переливания все же остается. Примерами таких осложнений являются интоксикации, негемолитические реакции, сепсис, острая легочная недостаточность и др. [130]. Причины осложнений при переливании плазмы, в основном, остаются неясными, поскольку биохимические и другие контролируемые параметры донорской плазмы, допущенной к переливанию, всегда находятся в пределах установленных норм [131,132]. Таким образом, поиск дополнительных параметров оценки плазмы является весьма

актуальным и важным, так как может помочь прояснить причины осложнений при переливании.

Развитие медицинских приложений электрохимии требует сочетания знаний электрохимических свойств биологических объектов, их основных биологических свойств и строения. Эти вопросы в приложении к некоторым гомеостатическим процессам будут рассмотрены в следующей главе.

1.3 Роль форменных элементов крови в гомеостатических процессах

Используемый в физиологии термин «гомеостаз» означает поддержание относительного постоянства внутренней среды организма [133]. Ключевую роль в поддержании гомеостаза организма и защите его от чужеродных веществ играет кровь человека.

1.3.1 Основные функции и строение эритроцитов и тромбоцитов

Кровь - жидкая ткань внутренней среды организма, она состоит из плазмы и взвешенных в ней клеток - эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов. Доля клеток в общем объеме крови называется гематокритом и составляет около 45%, при этом большую часть от всей массы клеток составляют эритроциты. Основными функциями крови являются транспортная (перенос газов и питательных веществ), защитная (иммунитет и фагоцитоз) и регуляторная (гомеостатическая) [133,134]. Рассмотрим подробнее функции эритроцитов и тромбоцитов, исследование электрохимических свойств которых составляет основное содержание данной работы.

Основной функцией эритроцитов является перенос кислорода из легких к тканям тела при помощи белка гемоглобина согласно реакции:



и транспорт диоксида углерода в обратном направлении Перенос углекислого газа осуществляется при помощи фермента карбоангидразы.

Многие функции эритроцитов реализуются за счет того, что на мембране эритроцита содержатся рецепторы важнейших биологически активных веществ (например, инсулина, катехоламинов и др.) [135].

В нормальной крови человека основную массу (80-90 %) составляют эритроциты двояковогнутой формы - дискоциты. Кроме того, имеются и стареющие формы эритроцитов - эхиноциты (~ 6 %), стоматоциты (~ 1-3 %), сфероциты (~ 1 %) и некоторые другие (рис. 2).

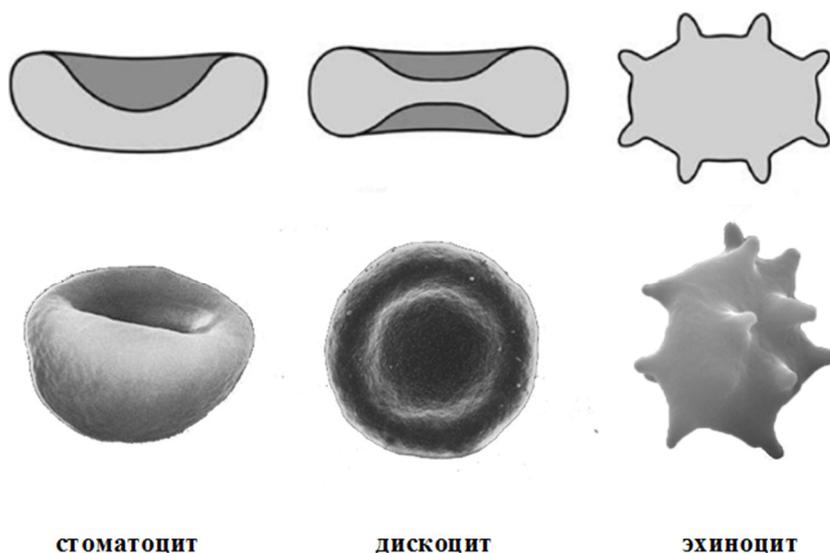


Рис.2. Основные морфологические типы эритроцитов [136,137].

Тромбоциты играют ключевую роль в физиологических и патологических процессах системы свертывания крови. Важно, как было указано ранее, что тромбоциты содержат большое количество органелл, среди которых выделяют специальные секреторные гранулы.

Тромбоциты, необходимые для образования так называемой «гемостатической пробки» (тромба) при травме сосудов и других нарушениях кровотока, в нормальных условиях не взаимодействуют со стенками сосудов, однако при повреждении сосуда тромбоциты вступают в контакт со структурами стенок сосудов и активируются (рис.3). Важную роль в этих

реакциях играют тромбоцитарные факторы, сосредоточенные в гранулах [111].



Рис. 3. Неактивированные и активированные тромбоциты [136].

1.3.2 Строение поверхности клеток крови

Любая клетка живого организма окружена плазматической мембраной, которая отделяет содержимое клетки от внешней среды, обеспечивая, таким образом, ее целостность. Плазматическая мембрана заряжена отрицательно и представляет собой два слоя липидных молекул, в которые встроены белки и углеводы [138,139]. Схематически клеточная мембрана изображена на рис.4:

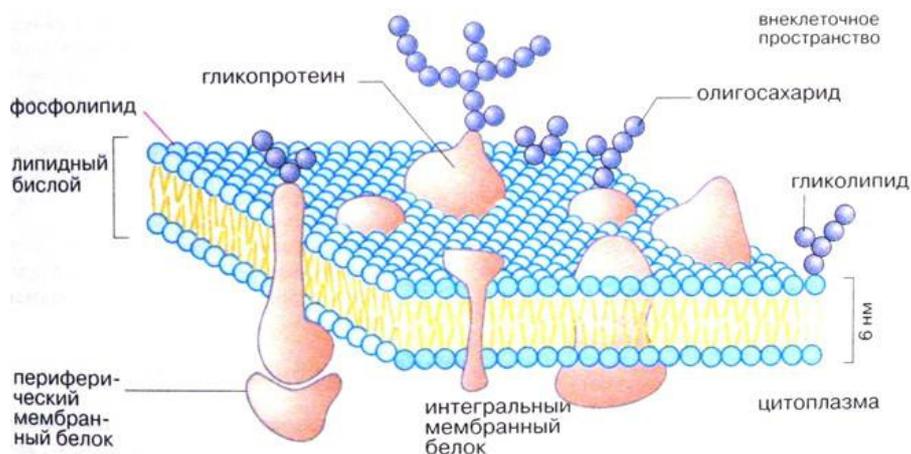


Рис.4. Схематическое строение плазматической мембраны [138].

Структура мембраны эритроцитов отличается от ее структуры других клеток. Мембрана эритроцита является проницаемой для катионов Na^+ и K^+ , в особенности она хорошо пропускает O_2 , CO_2 , Cl^- и HCO_3^- . Большинство специфических функций мембраны осуществляются ее белками [140].

Мембрана тромбоцитов имеет более сложное строение, поверхностно-связанная канальцевая система образует мембранную сеть по всему внутреннему пространству тромбоцита. Она характеризуется высоким содержанием углеводов, её поверхность, как и эритроцитарная мембрана, заряжена отрицательно. При активации тромбоцитов на их поверхности появляются также отрицательно заряженные фосфолипиды. Специфические функции тромбоцитов для осуществления реакции гемостаза реализуются при помощи различных рецепторов, прикрепленных к плазматической мембране как на поверхности тромбоцита, так и внутри к открытой канальцевой системе [112,141,142].

1.3.3 Электрохимические характеристики клеток крови

Одним из важнейших методов исследования электрохимических параметров клеток является электрофорез, который позволяет определить количественный состав и электрический заряд клеток [31,143].

Электрический заряд клеток играет важную роль в протекании физиологических процессов в организме. Известно, что клетки должны иметь стабильный заряд для нормального выполнения своих функций. Знак заряда поверхности клеток всегда отрицательный, величина заряда обуславливается химической структурой поверхности клеток и составом окружающей среды. Изменение плотности заряда поверхности клеток свидетельствует о наличии патологического состояния в организме [31].

Одним из первых исследователей электрофоретических свойств клеток является Абрамсон. Он описал электрофоретические свойства лимфоцитов,

тромбоцитов и эритроцитов крови различных видов млекопитающих и человека [20-27] и оценил плотность заряда на мембране. В 1974 году авторы работы [31] аккумулированы данные, полученные различными исследователями при изучении электрофореза клеток крови, а также представили новые данные для электрокинетических и электрохимических параметров клеток крови в норме и в патологии. Отрицательно заряженная поверхность клетки притягивает из окружающей среды противоионы, которые под воздействием электростатических сил стремятся приблизиться к ионизированным группам клеточной мембраны. В результате клетка оказывается окруженной двойным электрическим слоем (рис.5).

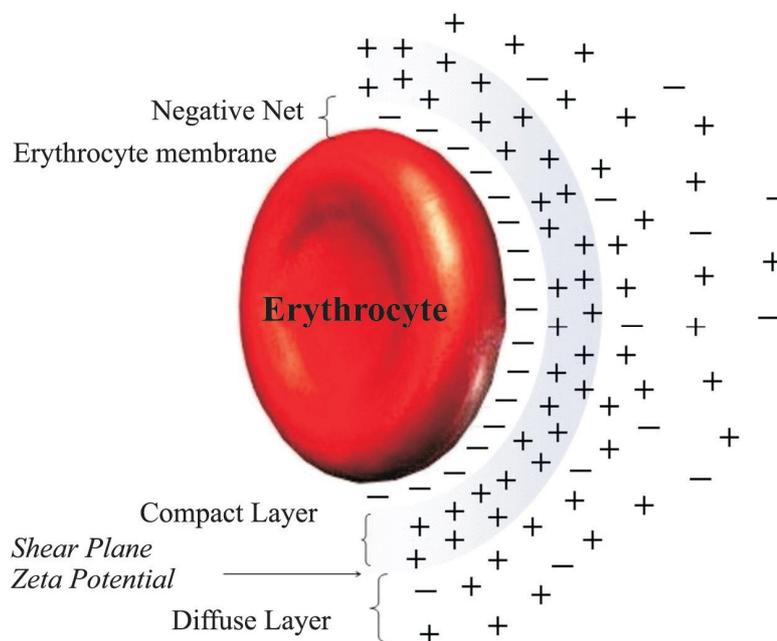


Рис.5. Упрощенная схема клеточной мембраны эритроцита и распределение заряда на ней [144].

Согласно [31] электрический заряд клеток обусловлен диссоциацией полярных групп на поверхности оболочки, адсорбцией одного из ионов среды либо суммарным воздействием двух упомянутых факторов. Известно, что клеточные оболочки состоят из белков, липоидов и полисахаридов. Эти вещества содержат различное количество кислотных и основных групп, вследствие ионизации которых создается избыточный электрический заряд на

поверхности клеток. Одним из первых попытался исследовать химический состав мембран клеток и оценить вклад каждого вещества в поверхностный заряд Симан [145-147].

Авторы [31] отметили, что расхождения в измерениях электрофоретической подвижности клеток крови различными исследователями, обусловлены различными условиями проведения экспериментов.

В таблице 1 приведены средние значения электрофоретической подвижности и плотности заряда на поверхности мембран клеток крови в норме.

Таблица 1. - Диапазон нормальных значений плотностей поверхностного заряда и электрофоретических подвижностей клеток крови [31].

Форменные элементы крови	Электрофоретическая подвижность, мкм/сек/В/с	Плотность заряда, эл.ст.ед./см ²
Эритроциты	1,1-1,3	3280
Лейкоциты	1,06	2540
Тромбоциты	0,71-1,09 ^[146]	2915 ^[148]

Оценить природу и вклад поверхностных групп в общий заряд клеток можно путем изучения зависимости электрофоретической подвижности клеток от рН и ионной силы суспендированного раствора, влияния различных ионов, от обработки клеток химическими реагентами и ферментами.

Симан с соавторами [147] установили, что клетки в физиологической среде ведут себя как макрополианионы. Основываясь на классической модели двойного электрического слоя и количественном химическом анализе, ими было подтверждено, что природа заряда на мембране эритроцита исходит из

диссоциации N-ацетилнейраминовой (сиаловой) кислоты ($1-2 \cdot 10^7$ карбоксильных групп на клетку) и некоторых неизвестных кислот, предположительно, аминокислот ($\sim 1 \cdot 10^7$ карбоксильных групп на клетку). Число положительных групп на мембране клеток составляет менее 10^6 . Однако, при высоких значениях pH, становится значительным содержание основных аминогрупп, которые несут на себе положительный заряд [147,149].

Данные о химическом составе поверхности мембран тромбоцитов и эритроцитов, полученные Симаном, приведены в таблице 2 [145]:

Таблица 2. - Ионогенные группы тромбоцитов и эритроцитов человека

Группы	Тромбоциты, групп на клетку, $\cdot 10^{-5}$	Эритроциты, групп на клетку, $\cdot 10^{-5}$
Карбоксил сиаловой кислоты	9,4-18,8	77-154
Другие карбоксилы	?	52-104
Фосфаты	6,5-13,0	Нет ($\leq 4-8$)
Неизвестные отрицательные	7,0-14,0	Нет
Амино	5,3-10,6	Нет ($\leq 4-8$)
Сульфгидрильные	2,9-5,9	Нет
Всего отрицательных	22,9-45,8	129-258
Всего положительных	5,3-10,6	Нет
Всего отрицательных и положительных*	28,2-56,4	129-258

*Исключая сульфгидрильные группы

Таким образом, с помощью методов электрофореза и количественного химического анализа были определены знак и плотность заряда на мембране

форменных элементов крови, а также дифференцированы ионогенные группы на ее поверхности.

Подчеркнем, что клетке, находящейся в нормальном или патологическом состоянии, соответствует определенная величина плотности отрицательного заряда на мембране.

1.4 Выводы по литературному обзору

Анализ литературных данных показал, что электрохимические свойства форменных элементов крови являются одним из важнейших показателей их стабильности, а также вносят существенный вклад в их поведение относительно других клеток и чужеродных материалов. Знание механизма их взаимодействия является важным для понимания того, какие именно процессы протекают на мембране клетки в результате контакта с тканями организма и чужеродными материалами, а также может быть использовано для создания новых медицинских технологий и решения важных практических задач.

Также важно, что взаимодействие клеток крови с чужеродными материалами представляет интерес для исследователей, поскольку проблема оценки травмирующего действия чужеродных материалов по отношению к компонентам крови является ключевой вследствие появления новых материалов медицинского назначения, находящихся в длительном контакте с кровью. В литературе описаны попытки прояснения характера взаимодействия в системе [чужеродный электропроводный материал]/[клетка крови], наблюдение косвенных признаков позволило сделать предположение о том, что данное взаимодействие происходит с переносом электронов, то есть является электрохимическим, однако не удалось найти экспериментальных доказательств этого предположения.

Анализ современного состояния проблем электрохимических взаимодействий в системе [электрод]/[клетка крови] позволил

сформулировать цель и задачи настоящей работы: экспериментально выявить наличие транспорта электронов в указанной системе при помощи прямых электрохимических измерений, а также исследовать взаимосвязь состояния биологической системы с ее электрохимическими параметрами.

Глава 2. Методика эксперимента

2.1 Вещества, используемые в работе

Таблица 3. - Реактивы, используемые в работе

Наименование	Категория	ГОСТ
Вода дистиллированная	-	ГОСТ 6709-72
Натрий сернокислый безводный	хч	ГОСТ 4166-76
Натрий хлористый	хч	ГОСТ 4233-77
Натрий сернистоокислый безводный	чда	ГОСТ 5644-75
Пиррол (Fluka)	>98%	-
Гемосорбент углеродный ФАС	-	ТУ 6-16-3096-89
Уголь активированный АГ-3	-	ГОСТ 20464-75
Уголь активированный СКТ-6А	-	ТУ 6-16-2333-79
Уголь активированный ВСК-А	-	-

2.2 Методика удаления кислорода из исследуемых растворов

Кислород из исследуемых растворов удаляли с помощью продувания аргоном, либо с помощью добавления раствора Na_2SO_3 . Метод удаления растворенного кислорода путем добавления в фоновый электролит деоксигенирующего агента был выбран как предпочтительный, вследствие вероятной механической травмы клеток крови при барботировании газа в течение тридцатиминутного эксперимента. Кроме того, обескислороживание водного раствора с помощью Na_2SO_3 вполне обеспечивает отсутствие кислорода в условиях наших экспериментов, поскольку для протекания в воде реакции:



требуются доли секунд и секунды [150].

В то же время скорость удаления кислорода из эритроцитов, согласно [151], составляет 0,042 с для удаления 50% кислорода и 11 мин для его полного удаления при соответствующих физиологических условиях. Эти данные согласуются с данными, полученными в работах [152] и [153], где также было получено, что скорость удаления 50% кислорода из эритроцитов в среднем составляет 0,04 с.

Чтобы оценить необходимое количество сульфита для компенсации кислорода в ячейке, было рассчитано содержание кислорода в ячейке и в суспензии эритроцитах. Известно, что растворимость кислорода в воде при 25°C составляет 8,3 мг/л ($2,6 \cdot 10^{-4}$ М) [154]. Концентрация эритроцитов в крови составляет $4 \cdot 10^{12}$ кл/л [155], следовательно, концентрация гемоглобина в ячейке должна составлять около 130 г/л [155], что в молях составляет $1,94 \cdot 10^{-3}$ М (молекулярный вес гемоглобина $M_{\text{нб}}=66800$ г/моль). Поскольку 1 моль гемоглобина способен связать 4 моля кислорода, в расчете на полное насыщение гемоглобина кислородом его концентрация составляет около $8 \cdot 10^{-3}$ М.

Таким образом, исходя из приведенных величин, общее количество кислорода, находящегося в суспензии эритроцитов и в растворе фона, составит $8,0 \cdot 10^{-3}$ М и $2,6 \cdot 10^{-4}$ М соответственно.

В действительности, однако, концентрация кислорода непосредственно в суспензии эритроцитов на самом деле гораздо меньше рассчитанной. Равновесие между гемоглобином эритроцитов, который связывает 4 молекулы кислорода, зависит от величин рН и парциального давления углекислого газа в крови ($p\text{CO}_2$). Однако, поскольку количество углекислого газа и рН в ячейке не меняются в процессе эксперимента (суспензия эритроцитов обладает высокой буферной емкостью, углекислый газ не добавляют в ячейку), трудно

предположить, что кислород полностью может быть удален из эритроцита в указанных условиях. Это соображение основано на учете эффекта Веригго-Бора [156]), согласно которому лишь высокая концентрация CO_2 увеличивает локальную концентрацию H^+ и снижает сродство гемоглобина к O_2 , что и приводит к усиленному высвобождению O_2 из гемоглобина. Напротив, при низких концентрациях CO_2 , и соответственно, сниженной локальной концентрации H^+ освобождение O_2 затруднено [134,138].

Итак, поскольку в используемой нами системе количество CO_2 не может измениться, количество кислорода, которое могло бы высвободиться при разрушении комплекса HbO_2 , на самом деле значительно меньше его предельного содержания в эритроцитах в связанном виде ($8,0 \cdot 10^{-3}$ М), отвечающего полному насыщению гемоглобина.

Приведенные соображения были проверены нами в реальных условиях при отработке этой важной методики. Был проведен анализ кислотно-щелочного состояния газов суспензии эритроцитов в фоновом растворе 0,15 М NaCl в присутствии и отсутствии 0,02М Na_2SO_3 . Данные, полученные с помощью анализатора газов крови Stat Profile CCX (Nova Biomedical, USA), представлены в таблице 4. Время контакта суспензии эритроцитов с сульфитом натрия составляло 30 минут.

Таблица 4. - Анализ кислотно-щелочного состояния газов крови.

Параметр	Результат		Ед.измерения	Диапазон референсных значений
	ЭРМ+ф.р. 1:1	ЭРМ+ф.р. (+0,02М Na_2SO_3) 1:1		
pH	6,7	6,8	-	6,5 ÷ 8,0
p CO_2	8,8	7,2	мм.рт.ст.	3,0 ÷ 200
p O_2	272,8	222,0	мм.рт.ст.	0,0 ÷ 800
Sa O_2 ,%	98,5	98,9	-	30,0 ÷ 100
Hb	104,0	92,0	г/л	40,0 ÷ 240

*ЭРМ – эритроцитарная масса,

$p\text{CO}_2$ – парциальное давление углекислого газа,
 $p\text{O}_2$ – парциальное давление кислорода,
 SaO_2 – насыщение гемоглобина кислородом,
 Hb – гемоглобин.

Из данных, представленных в таблице 4, следует, что парциальное давление CO_2 в суспензии эритроцитов, как в присутствии сульфита натрия, так и в его отсутствии находится практически на минимальном уровне. После введения в систему сульфита натрия парциальное давление кислорода снижается всего лишь на 50 мм.рт.ст., что говорит о том, что даже в условиях, когда насыщение гемоглобина кислородом практически полное (99%), не происходит его значимого выхода по градиенту концентраций из клеток в окружающую среду.

Учитывая положения эффекта Вериги-Бора и сумму данных, представленных в таблице 4, было все же принято решение дополнительно контролировать процесс поглощения кислорода с помощью фиксирования избытка сульфита натрия в исследуемом растворе, используя для этого пик его анодного окисления.

Параллельно производился контроль осмолярности исследуемых растворов с помощью криоскопического осмометра Osmomat 030 (Gonotec, Germany) для получения данных о возможной травме эритроцитов при введении в исследуемую суспензию обескислороживающего агента сульфита натрия. Оказалось, что при добавлении в фоновый электролит 0,02 М Na_2SO_3 осмолярность раствора практически не изменялась: исходный раствор 0,15 М NaCl имел величину осмолярности 308 мОсм/л, а тот же раствор, содержащий 0,02 М Na_2SO_3 , - 314 мОсм/л.

Дополнительно проводили морфометрический анализ эритроцитов для того, чтобы убедиться в отсутствии влияния сульфита натрия на морфологию клеток (рис.6).

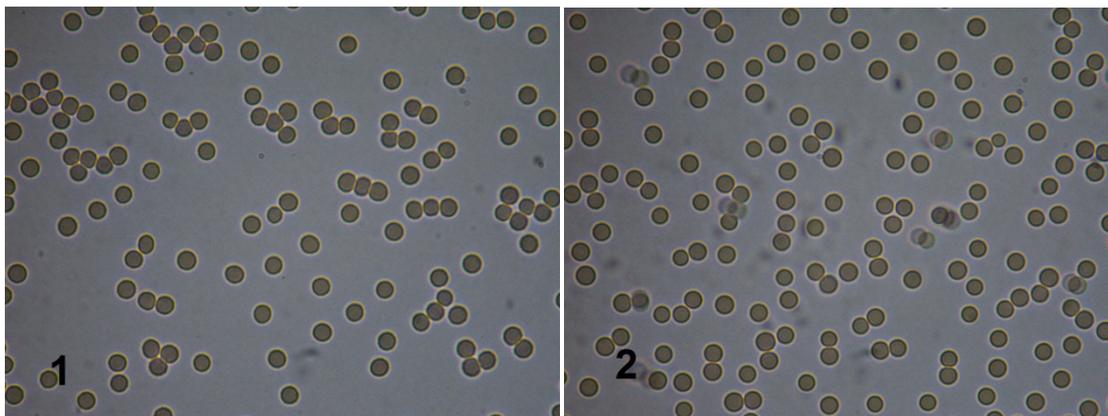


Рис. 6. Микрофотографии эритроцитарной массы в фоновом электролите $\times 400$:
1 - в фоновом растворе, 2 – фоновом растворе, содержащем $0,02 \text{ M Na}_2\text{SO}_3$;
время экспозиции- 30 мин

Как видно из рис. 6, получасовой контакт эритроцитарной массы с растворами $0,15 \text{ M NaCl}$, содержащих (2) и не содержащих сульфит натрия (1), не приводил к значимым изменениям морфологии эритроцитов.

Таким образом, было установлено, что концентрация сульфита натрия $0,02 \text{ M}$ являлась вполне пригодной для полного удаления растворенного кислорода из исследуемых растворов и суспензий, также было доказано отсутствие травмирующего действия указанной добавки сульфита натрия по отношению к эритроцитам.

2.3 Электрохимические методики

В качестве электрода сравнения при любых измерениях использовали насыщенный хлорсеребряный электрод. При поляризационных измерениях в качестве вспомогательного электрода использовали сетку из платинированного титана площадью $0,19 \text{ cm}^2$.

2.3.1 Измерение ПРЦ платинового электрода в плазме крови и в обогащенной тромбоцитами плазме

Измерения ПРЦ в плазме крови и в плазме, обогащенной тромбоцитами, проводились согласно методике, предложенной в работе [102], с незначительным усовершенствованием для измерений в плазме, которое заключалось в дополнительной поляризации платинового электрода в плазме в течение 30 секунд при потенциале $E = 130$ мВ. Схема установки для измерения ПРЦ приведена на рис. 7.

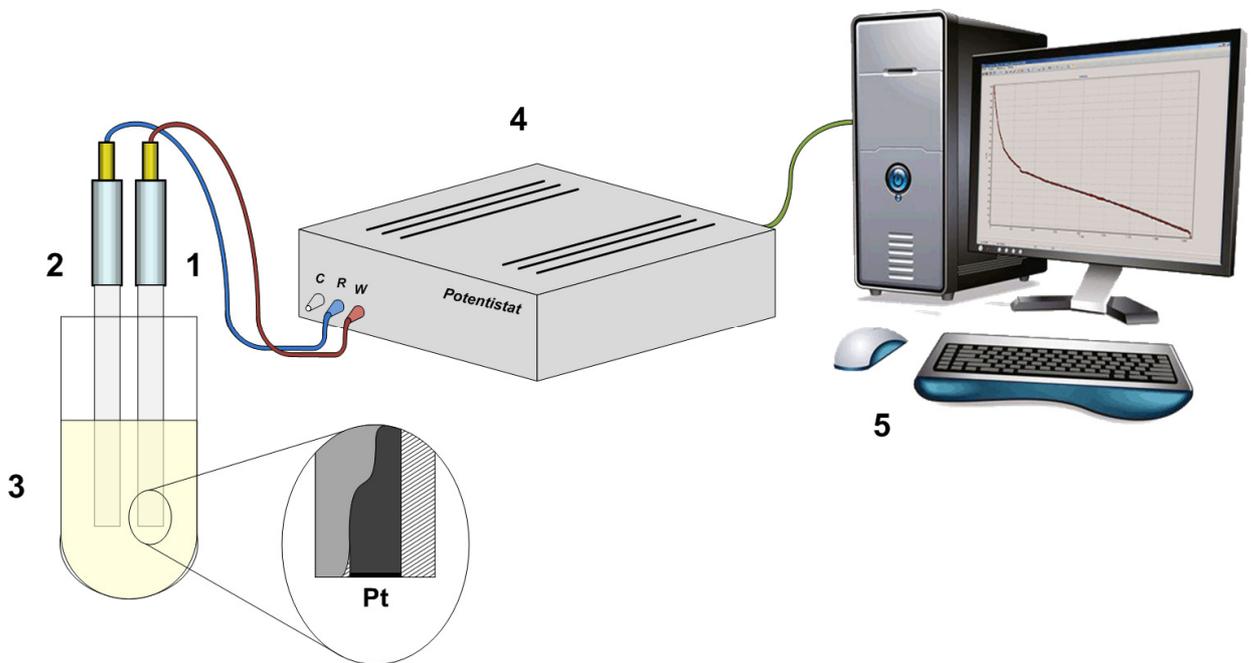


Рис. 7. Схема установки для измерения ПРЦ платинового электрода.

1-рабочий электрод (Pt), 2- электрод сравнения (нас. Ag/AgCl), 3-ячейка с анализируемым раствором, 4- потенциостат, 5-персональный компьютер.

2.3.2 Проведение поляризационных измерений

Поляризационные измерения на электродах из различных материалов проводились в трехэлектродной ячейке с помощью потенциостата IPC Pro-L. Скорость сканирования потенциала составляла 10 мВ/с. Измерения на платиновом и стеклоуглеродном электродах проводились при

перемешивании. Скорость вращения магнитного якоря мешалки составляла 500 об/мин. Выбранная скорость вращения обеспечивает достаточную интенсивность перемешивания суспензии и в то же время не вызывает травмы клеток крови [151].

2.3.2 Измерение потенциалов гранулированных активированных углей

Измерения потенциалов углей при разомкнутой цепи проводили согласно методу, описанному в [157], в электрохимической ячейке, представленной на рис.8.

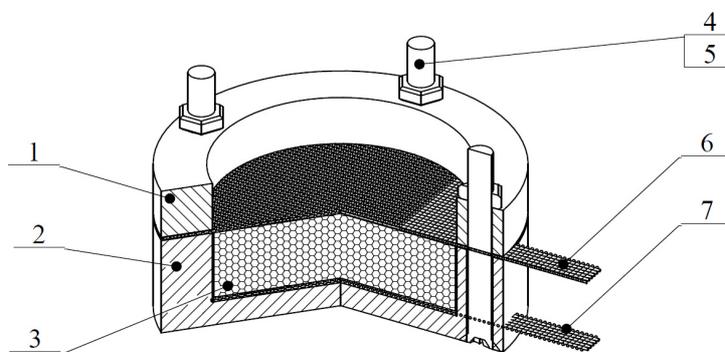


Рис. 8. Ячейка для измерения ПРЦ гранулированных углей: 1 – стягивающая крышка, 2 – корпус, 3 – цилиндрическая камера, 4,5 – тefлоновые болты с гайками, 6,7 –токоподводящие сетки из нержавеющей стали [157].

Гранулы активированного угля помещали в цилиндрическую камеру ячейки (3), далее ячейка стягивалась крышкой (1) и тefлоновыми болтами (4,5) между токоподводами в виде сетки из нержавеющей стали (6,7). Затем модуль ячейки помещали в водный раствор 0,15 М NaCl, токоподводящие сетки и электрод сравнения подключали к потенциостату и производили запись величин потенциалов угля при разомкнутой цепи в течение 15 минут. Поскольку площадь поверхности активированного угля значительно превышает площадь поверхности стальной сетки ($\sim 1500 \text{ м}^2/\text{г}$ [62] против $10^{-4} \div 10^{-5} \text{ м}^2$), измеряемая величина потенциала при разомкнутой цепи

характеризует величину потенциала активированного угля, но не токоподвода.

2.3.4 Электрохимическая модификация гранулированных активированных углей

Электрохимическая модификация активированных углей проводилась путем катодной или анодной обработки в проточном электролизере объемом 50 мл, представленном на рис. 9.

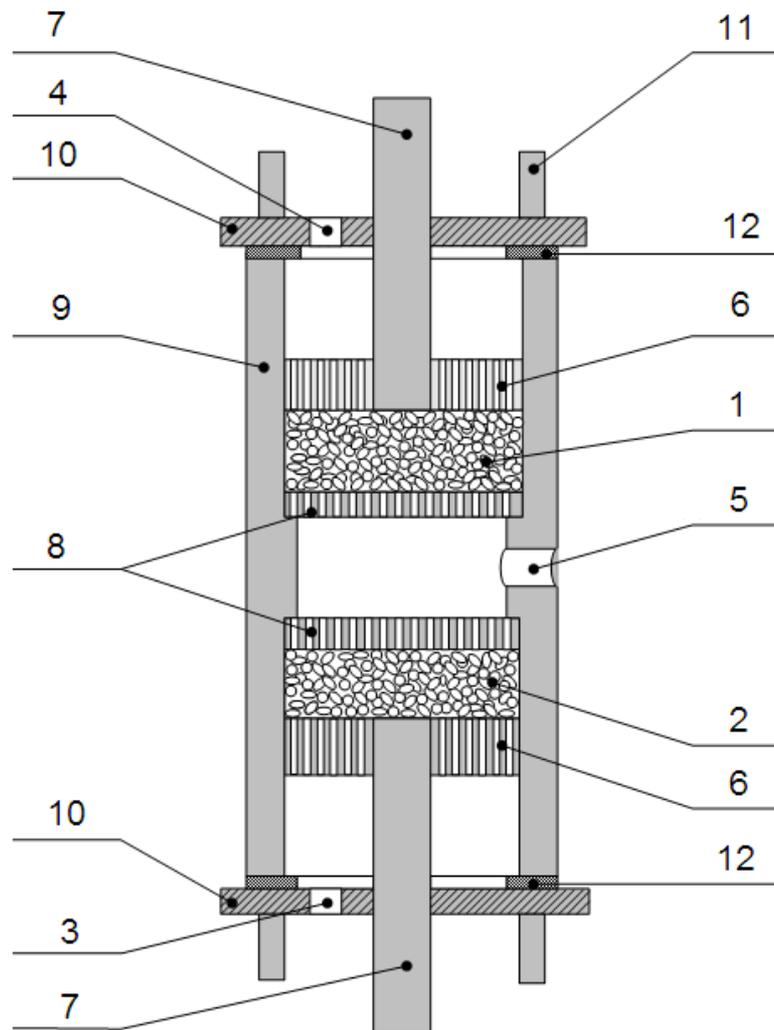


Рис. 9. Схема электролизера для электрохимической модификации активированных углей. 1- анодная камера, 2- катодная камера, 3 – вход, 4 – выход, 5 – отверстие для электрода сравнения, 6 – перфорированный

токоподводящий диск, 7 – болт из нержавеющей стали, 8 – тефлоновый перфорированный диск (сепаратор), 9 – тефлоновый корпус, 10 – крышка, 11 – тефлоновый болт, 12 – прокладка [158].

Гранулы активированного угля помещали в катодную и анодную камеры электролизера, разделенные перфорированными дисками, выполненными из тефлона, затем гранулы сжимали стальными токоподводящими дисками при помощи болтов. Циркуляция электролита через ячейку осуществлялась с помощью перистальтического насоса, скорость составляла 50 мл/мин.

Активированный уголь модифицировали гальваностатически в диапазоне величин тока от 0,75 А до 10 А в течение 90 минут. Модифицированные образцы отмывали физиологическим раствором до рН 7,2÷7,4. Были получены образцы модифицированных углей с величинами потенциалов при разомкнутой цепи от 300 мВ до -460 мВ.

2.3.5 Электрохимическая модификация поверхности активированных углей полипирролом (ПП)

Электрохимическая полимеризация пиррола на поверхности активированных углей марок АГ-3 и СКТ-6А проводилась в потенциостатическом режиме, согласно методике, описанной в [85]. Синтез ПП проводили в установке, представленной на (рис. 8). Для синтеза ПП, допированного ионом хлорида, в качестве электролита использовали раствор 0,36 М пиррола в 3 М NaCl. Электрополимеризация пиррола проводилась при потенциале 800 мВ в течение 1 часа. В качестве вспомогательного электрода использовался прокатанный листовой термически расширенный графит. В результате электрохимической модификации получали композиты состава [АГ-3/ПП/Cl⁻] и [СКТ-6А/ПП/Cl⁻], имеющие значения величин потенциалов при разомкнутой цепи 167 мВ и 309 мВ соответственно.

Для исследования пористой структуры и гидрофильно – гидрофобных свойств полипиррола был применен метод эталонной контактной порометрии [159].

2.3.6 Проведение кулонометрических измерений

Микрокулонометрические измерения проводились на платиновом и стеклоуглеродном микроэлектродах. Электрохимическую ячейку заполняли раствором фонового электролита, затем поляризовали исследуемый электрод до заданного потенциала в потенциостатическом режиме в течение 30 мин, фиксируя величину тока (I) и количество пропущенного электричества (Q). Через 30 мин, не прерывая поляризации, в раствор электролита добавлялась суспензия эритроцитов или тромбоцитов, содержание эритроцитов составляло $\sim 4,0 \cdot 10^{12}$ кл/л, тромбоцитов $\sim 220 \cdot 10^9$ кл/л. Измерения тока и количества электричества продолжали в течение 30 минут.

Кулонометрические измерения на электроде площадью $4,5 \text{ см}^2$ из листового термически расширенного графита проводили при потенциале -500 мВ , противэлектродом служила пластина из листового термически расширенного графита площадью 15 см^2 . Объем суспензии тромбоцитов составлял 15 мл с концентрацией клеток $7,35 \cdot 10^{11}$ кл/л.

2.4 Биологические методики

2.4.1 Подготовка биологических сред к исследованию

Для исследования жизнеспособности тромбоцитов использовали концентрат тромбоцитов и обогащенную тромбоцитами плазму. Обогащенную тромбоцитами плазму получали путём центрифугирования цельной крови практически здоровых доноров – добровольцев на центрифуге CR 3.12 (Jouan, France) со скоростью вращения 1200 об/мин при температуре $t \sim 22^\circ\text{C}$ в течение 10 минут. Центрифугирование при низких скоростях

вращения обусловлено снижением риска активации тромбоцитов [111]. Концентрат тромбоцитов был получен методом аппаратного афереза [131] из цельной крови с помощью сепаратора крови Trima Accel (Terumo BCT, USA). Для получения пробы с содержимым гранул тромбоцитов проводилась криодеструкция тромбоцитов в исходной пробе при температуре -20°C .

Плазму получали из цельной крови практически здоровых доноров - добровольцев путем плазмафереза [131]. Длительное хранение при температуре -40°C и оттаивание плазмы проводили согласно стандартной процедуре [130,131].

Эритроцитарную массу получали из цельной крови практически здоровых доноров - добровольцев; далее она подвергалась трехкратному отмыванию от остатков плазмы физиологическим раствором с помощью центрифугирования при 1500g и температуре $t\sim 4-6^{\circ}\text{C}$. Гемолизированную эритроцитарную массу получали путем лизиса эритроцитов.

Все процедуры, проводимые с тромбоцитами, проводились при комнатной температуре. Поскольку тромбоциты адгезируются на стеклянных поверхностях, манипуляции с ними проводились либо в посуде, совместимой с кровью [160-162].

2.4.2 Морфофункциональные исследования

Для анализа тромбоцитов был использован метод оценки морфофункционального статуса тромбоцитов, описанный в работе [163], с помощью флуоресцентного микроскопа Eclipse 80i (Nikon, Japan). Анализируемые параметры включали: концентрацию тромбоцитов (тыс/мкл), содержание тромбоцитов с гранулами, $S_{\text{тр.гр.}}$ (тыс/мкл) и $D_{\text{тр.гр.}}$ (%), содержание тромбоцитов богатых гранулами, $D_{\text{ТБГ}}$ (%).

Определение содержания различных морфологических форм эритроцитов проводили в полуавтоматическом режиме также при помощи

упомянутого флуоресцентного микроскопа. В ходе морфометрического исследования по методу [164] определяли абсолютное и относительное содержание: нормальных (дисковидных) эритроцитов, эритроцитов с отростками (эхиноцитов), «теней» эритроцитов (дегенеративные формы эритроцитов) в расчете на 200 клеток.

Гематологический анализ содержания клеток до и после эксперимента проводился с помощью анализатора Ac*Т diff 2 (Beckman Coulter, USA). Морфометрический анализ эритроцитов человека проводился на нефиксированных препаратах с помощью оптического микроскопа Eclipse 80i (Nikon, Japan). Для выявления «теней» эритроцитов образцы крови предварительно окрашивали с помощью красителей флавинового и ксантеинового ряда [165].

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1 Изучение взаимодействия форменных элементов крови с электропроводными материалами

3.1.1 Электрохимическое поведение эритроцитов на платиновом электроде

Для исследования электрохимического поведения эритроцитов на платиновом электроде, прежде всего, была определена область потенциалов, соответствующая отсутствию протекания на исследуемом электроде процессов электроокисления и электровосстановления. Эта необходимость была вызвана высокой вероятностью того, что возможные электродные процессы в водном растворе 0,15 М NaCl (например, электровосстановление растворенного кислорода, разряд воды, сопровождающийся выделением кислорода в анодной области потенциалов, электроокисление хлорид аниона) могут приводить к взаимодействию клеток крови с продуктами электрохимических реакций (например, с «активным» кислородом в виде H_2O_2 , анион-радикала $\text{HO}^{\cdot-}$ или подобных нестабильных частиц в случае электровосстановления растворенного в воде кислорода [166]).

Для выявления области потенциалов для растворов фона, в пределах которой не имеют места электрохимические процессы, снимались поляризационные кривые на платиновом электроде в водном растворе 0,15 М NaCl со скоростью развертки потенциала 10 мВ/с.

Так, было найдено, что в катодной области потенциалов в отсутствие кислорода протекание электрохимических процессов не имеют места в диапазоне потенциалов от 0 мВ до -800 мВ. В анодной области потенциалов в отсутствие сульфита, этот диапазон составлял от 0 мВ до 1100 мВ. Исходя из этих данных, измерения в катодной области производились в фоне, содержащем сульфит натрия, тогда как в анодной области использовали фон, не освобожденный от кислорода.

Добавление к обескислороженному раствору фонового электролита суспензии эритроцитов, концентрация клеток в которой составляла $8,0 \cdot 10^{12}$ кл/л, в соотношении 1:1, приводило к появлению волны восстановления в катодной области с потенциалом полуволны $E_{1/2} = -420$ мВ (Рис. 10, кривая 2).

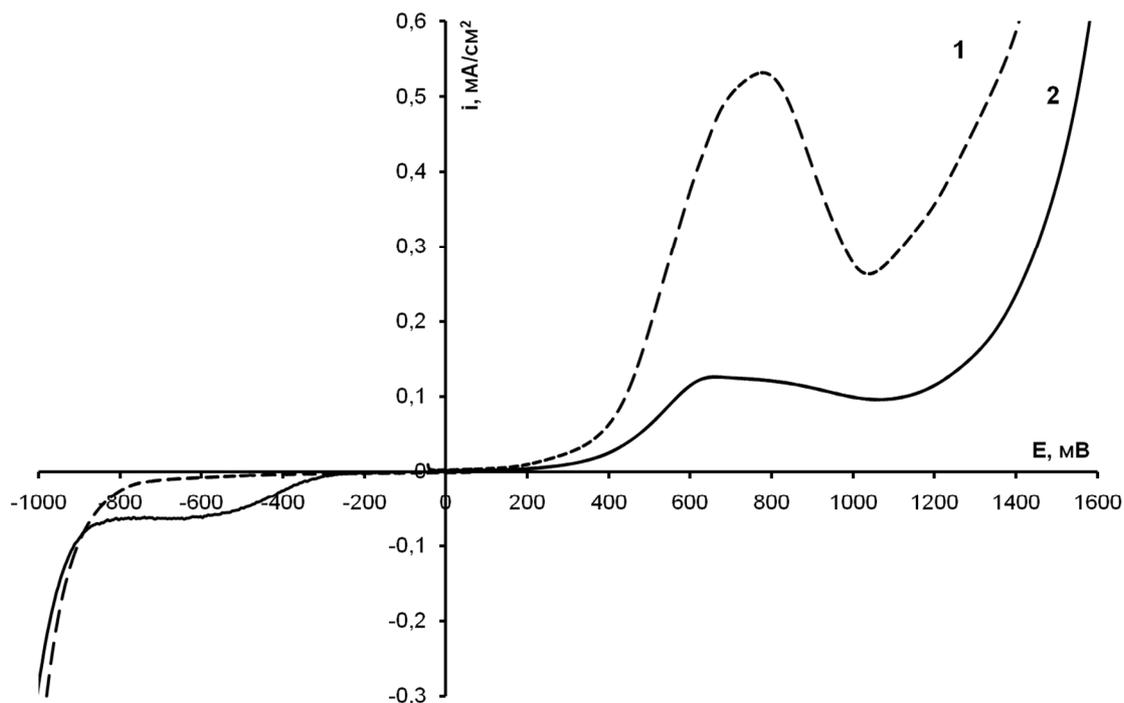


Рис. 10. Поляризационные кривые на Pt электроде; скорость развертки 10 мВ/с: 1 – фон - 0,15 М NaCl + 0,02 М Na₂SO₃, 2 - суспензия эритроцитов в 0,15 М NaCl + 0,02 М Na₂SO₃.

Таким образом, была обнаружена волна восстановления в присутствии суспензии эритроцитов в обескислороженном растворе 0,15 М NaCl, что доказало электрохимическую активность эритроцитов в катодной области потенциалов и, следовательно, найдено экспериментальное доказательство существования транспорта электронов в системе платина/эритроцит.

Вопрос о присутствии или отсутствии растворенного молекулярного кислорода в процессе проведения экспериментов является принципиально важным. Поэтому мы не ограничились фиксированием значительной разницы между величинами потенциалов полуволн электровосстановления кислорода

и электровосстановления, обусловленного присутствием суспензии эритроцитов в электролите. Чтобы получить дополнительные доказательства отсутствия кислорода в исследуемой системе во время проведения эксперимента, были проведены дополнительные поляризационные измерения в анодной области потенциалов до и после тридцатиминутного электрохимического исследования фонового электролита, содержащего суспензию эритроцитов и $0,02 \text{ M Na}_2\text{SO}_3$.

Как видно из данных, представленных на рис. 11, волна окисления сульфита натрия уменьшается, но не исчезает после тридцатиминутного контакта с эритроцитарной массой, что доказывает постоянное наличие в исследуемом растворе избытка сульфита в течение всего эксперимента.

Поляризационные кривые в суспензии эритроцитов без добавления сульфита натрия, то есть, в присутствии кислорода и эритроцитов, представлены на рис. 11.

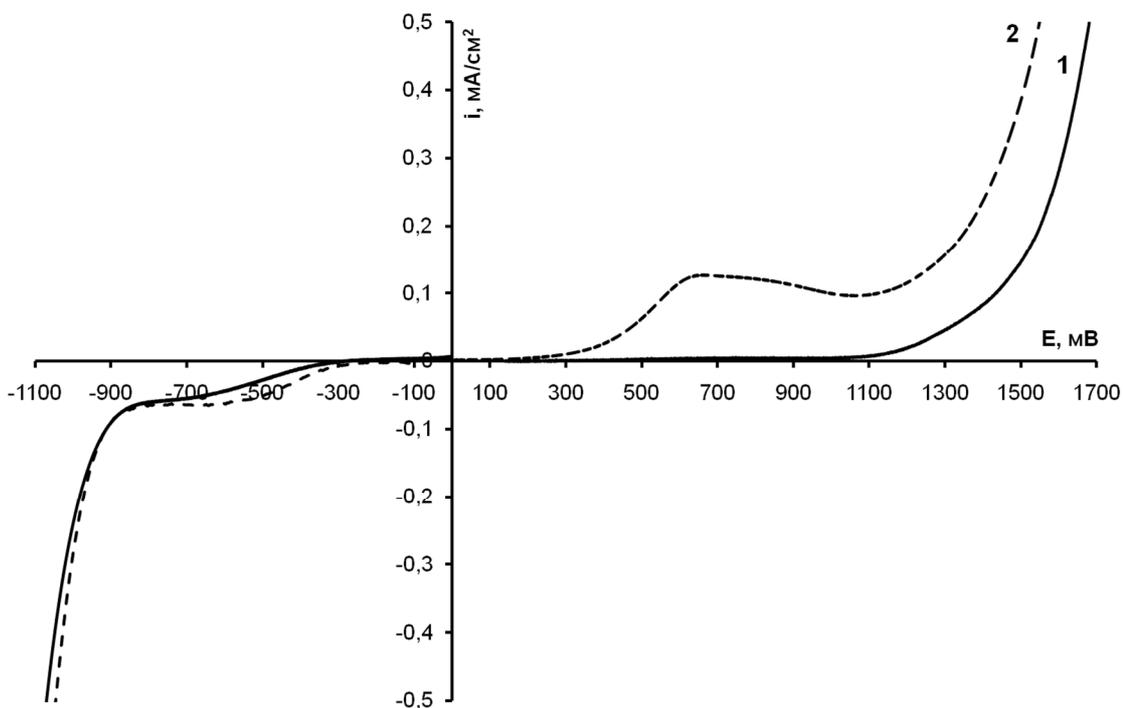


Рис. 11. Поляризационные кривые на Pt электроде; скорость развертки 10 мВ/с : 1 – суспензия эритроцитов в $0,15 \text{ M NaCl}$, 2 - суспензия эритроцитов в $0,15 \text{ M NaCl} + 0,02 \text{ M Na}_2\text{SO}_3$.

Полученные данные показали, что в присутствии кислорода величина потенциала полувольты суммарного процесса электровосстановления составляет -520 мВ, что на 100 мВ отрицательнее значения в отсутствие кислорода. Был измерен потенциал полувольты электровосстановления кислорода в тех же условиях, он составил 340 мВ, что на 180 мВ положительнее потенциала полувольты при совместном присутствии эритроцитов и кислорода. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в растворе, где присутствуют и кислород, и клетки, происходит совместный процесс электровосстановления.

Можно предположить, что в катодной области потенциалов происходит восстановление не собственно эритроцитов, а эритроцитов, окисленных продуктами протекающей параллельной реакции электровосстановления кислорода:



Таким образом, обнаружение процесса электрохимического восстановления суспензии эритроцитов в обескислороженном электролите позволило прийти к выводу об экспериментальном подтверждении процесса переноса электронов с платинового электрода на поверхность мембраны эритроцита в катодной области потенциалов. Вероятно, данный процесс отвечает электровосстановлению электроноакцепторных групп на поверхности мембраны эритроцитов.

Однако, в то же время, поляризационные измерения не позволили нам наблюдать анодные превращения суспендированных эритроцитов, хотя вероятность протекания таких реакций весьма высока, поскольку известно, что на поверхности мембраны эритроцита существуют как электроноакцепторные, так и электронодонорные группы. Было

предположено, что отсутствие анодных волн на поляризационных кривых может, возможно, объясняться недостаточной чувствительностью метода поляризационных измерений в анодной области потенциалов.

Для того, чтобы проверить это, были проведены исследования взаимодействия эритроцитов с платиновым микроэлектродом при различных потенциалах поляризации в пределах области потенциалов, где отсутствуют электрохимические процессы, с помощью измерения величины прошедшего количества электричества. Вначале производился электролиз в течение 30 мин. при заданном потенциале в растворе фонового электролита, а затем электролизу в течение того же времени при том же потенциале подвергали суспензию эритроцитов в фоновом электролите.

Таким образом, измеренные величины разности количества электричества, должны соответствовать количеству электричества, расходуемому на протекание электрохимических процессов.

С помощью описанных измерений было обнаружено протекание процессов электровосстановления и электроокисления в широкой области потенциалов, причем измеренные величины количества электричества зависели от потенциала поляризации платинового электрода (рис. 12).

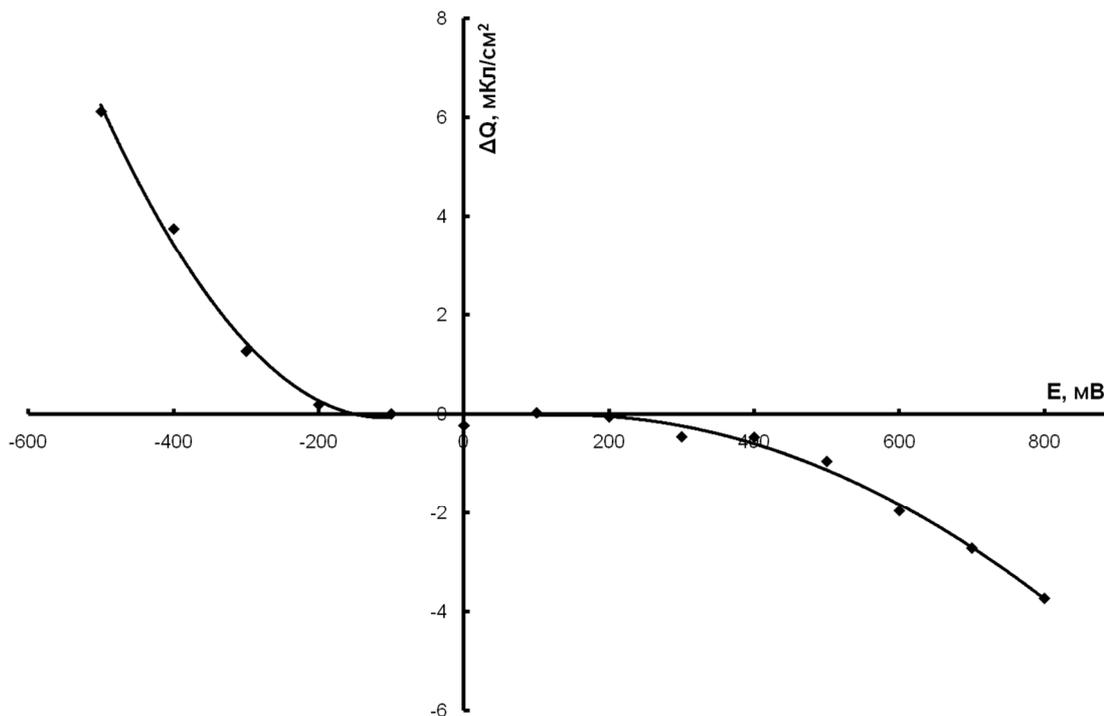


Рис. 12. Микрокулометрические измерения в суспензии эритроцитов ($4 \cdot 10^{12}$ кл./л) на платиновом электроде при различных потенциалах: электролит - 0,15M NaCl (анодная область), 0,15 M NaCl + 0,02 M Na₂SO₃ (катодная область).

Таким образом, при катодной поляризации платинового электрода в области потенциалов отрицательнее потенциала -150 мВ по мере увеличения отрицательного потенциала возрастает величина количества электричества, затраченного на поддержание постоянного потенциала электрода в суспензии эритроцитов. Этот эффект, как и соответствующая поляризационная кривая (Рис. 10, кривая 2) экспериментально доказывают наличие транспорта электронов в системе платина/эритроцит за счет протекания реакции электровосстановления. Электровосстановлению, по-видимому, подвергаются электроноакцепторные группы на поверхности мембраны эритроцита в указанной области потенциалов.

Анодная поляризация платины в диапазоне потенциалов от 200 мВ до 800 мВ также приводит к увеличению количества электричества, затраченного

на поддержание постоянного потенциала электрода в суспензии эритроцитов. Этот эффект также свидетельствует о протекании электрохимической реакции, в данном случае - реакции электроокисления в исследуемых условиях.

Таким образом, можно утверждать, что найдены экспериментальные доказательства транспорта электронов между платиновым электродом и мембраной эритроцитов за счет протекания процессов электровосстановления электроноакцепторных и электроокисления электронодонорных функциональных групп на поверхности мембраны эритроцита. Этот процесс не удавалось обнаружить с помощью поляризационных измерений, вероятно, как было отмечено ранее, за счет низкой чувствительности метода.

Весьма важно, что данные, представленные на рис. 12, показали, что в области потенциалов $-150 \text{ мВ} \div 200 \text{ мВ}$ величины измеренных количеств электричества остаются практически неизменными. Обнаруженный факт указывает на отсутствие электрохимических процессов в данном диапазоне потенциалов и, соответственно, на отсутствие электронного транспорта в указанном диапазоне потенциалов. Отметим, что данное наблюдение может быть использовано для тестирования гемосовместимости электропроводных материалов с помощью простых электрохимических измерений.

Далее было решено исследовать, влияет ли материал электрода на взаимодействие с ним эритроцитов. Для этой цели был выбран электрод из стеклоуглерода, поскольку данный углеродный материал практически не содержит поверхностных соединений и является химически инертным [167].

3.1.2 Электрохимическое поведение эритроцитов на стеклоуглеродном электроде

Для выявления области потенциалов, свободной от электрохимических процессов, на стеклоуглеродном электроде в физиологическом растворе

снимались поляризационные кривые при скорости развертки потенциала 10 мВ/с.

Было обнаружено, что на стеклоуглеродном электроде в отсутствие кислорода катодные процессы в водном растворе 0,15 М NaCl не имеют места в области потенциалов от 0 мВ до -1400 мВ, а анодные - от 0 мВ до 1100 мВ. Исходя из этих данных, как и на платиновом электроде, измерения в катодной области производились в фоне, содержащем сульфит натрия, тогда как в анодной области использовали фон, не освобожденный от кислорода.

Добавление к обескислороженному раствору фонового электролита суспензии эритроцитов, приводило к появлению волны восстановления в катодной области с потенциалом полу волны $E_{1/2} = -777$ мВ (рис. 13, кривая 2), что на 147 мВ отрицательнее потенциала полу волны процесса ионизации кислорода, который, как показали наши измерения, составил в данных условиях величину ($E_{1/2} = -630$ мВ).

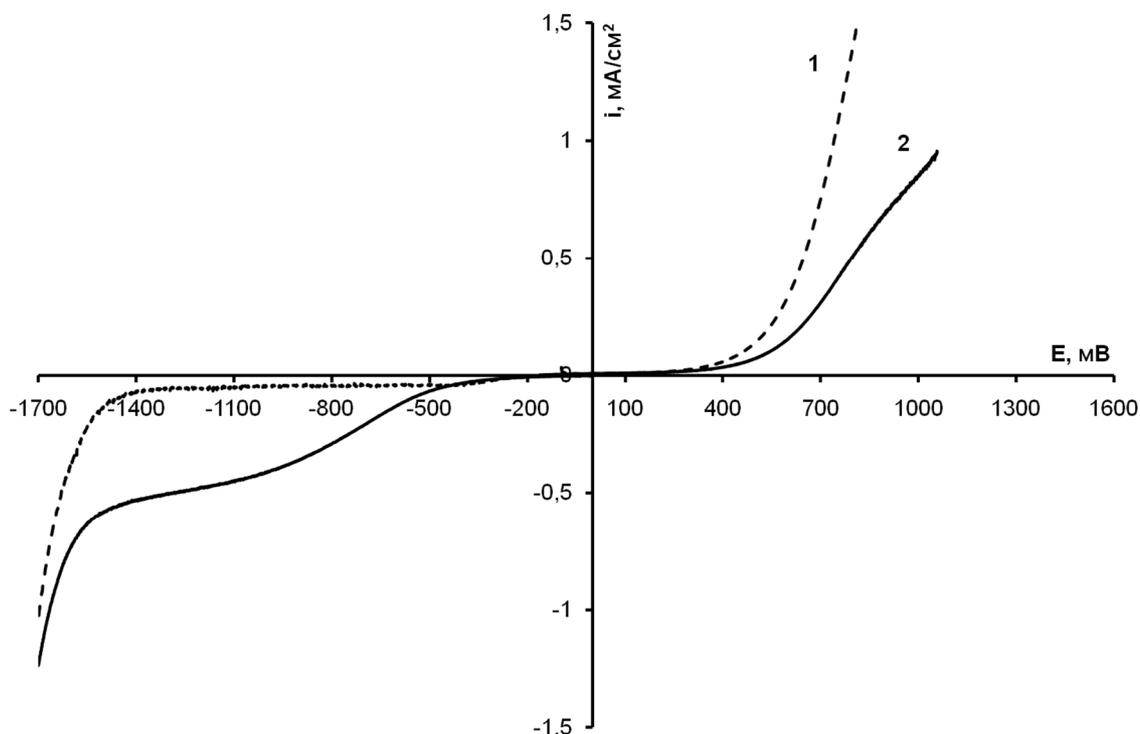


Рис. 13. Поляризационные кривые на стеклоуглеродном электроде; скорость развертки потенциала 10 мВ/с: 1 – фон - 0,15 М NaCl + 0,02 М Na₂SO₃, 2 – суспензия эритроцитов в 0,15 М NaCl + 0,02 М Na₂SO₃.

Таким образом, волна с потенциалом полуволны $E_{1/2} = -777$ мВ обусловлена, вероятно, восстановлением электроноакцепторных групп на поверхности мембраны эритроцита, что, как и на платине, свидетельствует о транспорте электронов в системе стеклоуглерод/эритроцит.

Поляризационные измерения в суспензии клеток (рис. 14) показали, что в отсутствие кислорода волна электровосстановления находится положительнее по сравнению с волной, возникающей в суспензии клеток, содержащей кислород ($E_{1/2} = -777$ мВ против $E_{1/2} = -795$ мВ), однако разница этих величин составляет лишь $\Delta E = 18$ мВ.

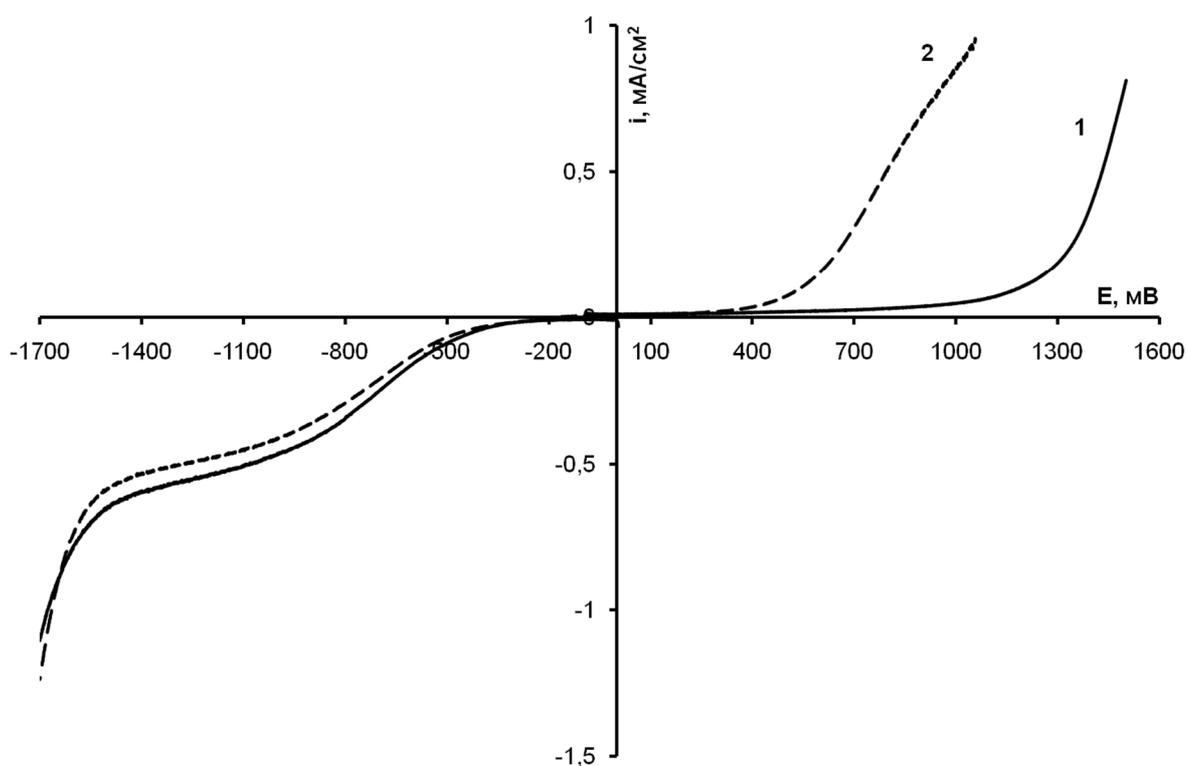


Рис. 14. Поляризационные кривые на стеклоуглеродном электроде; скорость развертки потенциала 10 мВ/с: 1 – суспензия эритроцитов в 0,15 М NaCl, 2 – суспензия эритроцитов в 0,15 М NaCl + 0,02 М Na₂SO₃.

Вероятно, на этом электродном материале имеют место процессы совместного электровосстановления кислорода и эритроцитов (5.1) и (5.2), подобно процессам, протекающим на платиновом электроде.

В анодной области потенциалов начало электрохимического процесса, протекающего при добавлении эритроцитов к раствору фона (рис.15, кривая 2), приходится на потенциал около 200 мВ, тогда как начало разряда фона начинается при потенциалах, положительнее 1000 мВ. (рис.13, кривая 1).

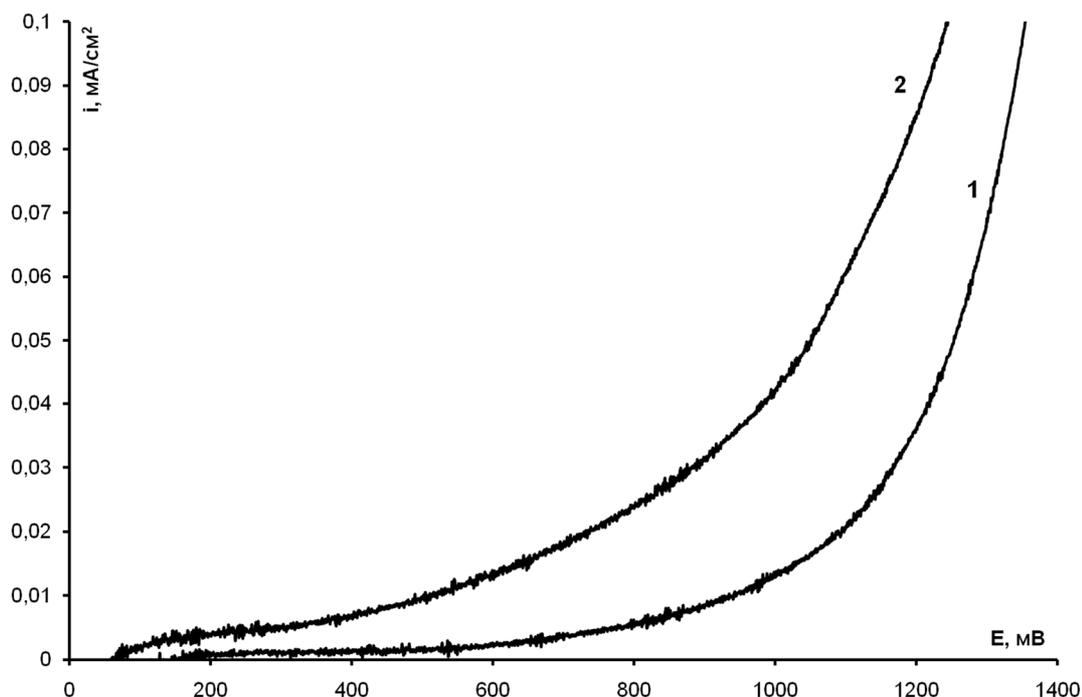


Рис. 15. Анодные поляризационные кривые на стеклоуглеродном электроде; скорость развертки потенциала 10 мВ/с: 1 – фон - 0,15 М NaCl, 2 – суспензия эритроцитов в 0,15 М NaCl.

Таким образом, поляризационные измерения на стеклоуглеродном электроде в физиологическом растворе, содержащем и не содержащем эритроциты, позволили обнаружить электрохимическую активность эритроцитов на данном электроде как в катодной, так и в анодной областях потенциалов.

Результаты микрокулометрических измерений, произведенных с целью исследования взаимодействия эритроцитов с поверхностью стеклоуглерода, представлены на рис. 16 и 17.

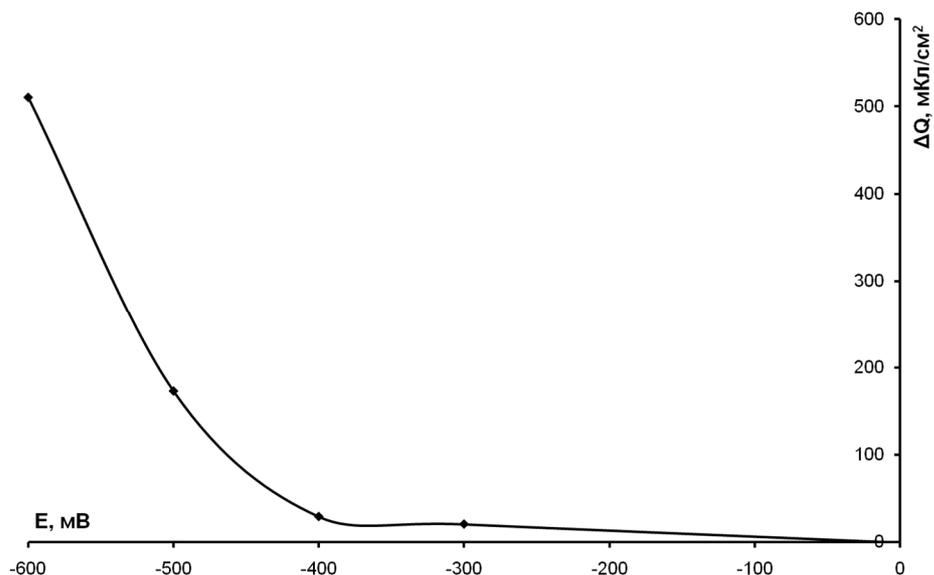


Рис. 16. Электровосстановление эритроцитов на стеклоуглероде. Зависимость разницы количества электричества, прошедшего за 30 мин через раствор фона до и после добавления эритроцитов, от потенциала электрода: электролит – 0,15 M NaCl + 0,02 M Na₂SO₃

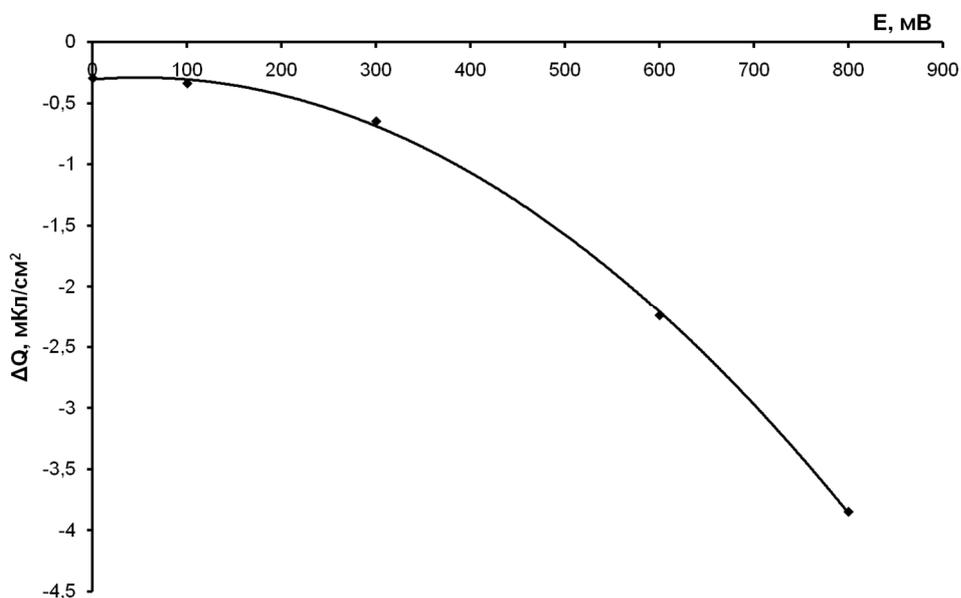


Рис. 17. Электроокисление эритроцитов на стеклоуглероде. Зависимость разницы количества электричества, прошедшего через ячейку за 30 мин, от потенциала электрода до и после добавления эритроцитов в систему: электролит – 0,15 M NaCl.

Как видно из данных, представленных на рис. 16, в катодной области потенциалов начиная от потенциала поляризации $E = -100$ мВ возрастает величина количества электричества, затраченного на протекание электрохимического процесса в суспензии эритроцитов за вычетом этой величины в фоновом растворе. Полученные данные также подтверждают протекание реакции электровосстановления в присутствии суспензии эритроцитов и свидетельствуют о переносе электронов с электрода на эритроцит.

Аналогичный эффект обнаружен в анодной области (рис. 17) в диапазоне потенциалов от 150 мВ до 800 мВ. Наблюдаемое явление подтверждает данные поляризационных измерений о протекании реакции электроокисления, при которой имеет место перенос электронов с клетки (точнее, по-видимому, с мембраны клетки) на поверхность электрода.

Таким образом, на стеклоуглеродном электроде, как и на платиновом, зафиксирован обмен зарядами между эритроцитом и поверхностью электрода, сопровождающийся электроокислением или электровосстановлением. По-видимому, как было предположено, обнаруженные электрохимические процессы протекают с участием электронодонорных и акцепторных функциональных групп на поверхности мембран эритроцитов.

Кроме того, данные, представленные на рис. 16 и 17, показали, что на стеклоуглеродном электроде, подобно платиновому, существуют области потенциалов, где не происходит взаимодействия клеток с поверхностью электрода. Это наблюдение привело нас к выводу о существовании области потенциалов, соответствующей индифферентности платины и стеклоуглерода по отношению к эритроцитам и, следовательно, отсутствию электронного транспорта между ними. Для стеклоуглерода такая область индифферентности по отношению к эритроцитам лежит в диапазоне потенциалов от -100 мВ до 150 мВ. Полученный диапазон потенциалов, определяющий область гемосовместимости стеклоуглерода по отношению к эритроцитам, может быть

применен при исследовании взаимодействия данных клеток с другими материалами, например, с активированными углями.

Отметим, что на электроде из стеклоуглерода величины удельного количества электричества за 30 мин, затраченного на электровосстановление и электроокисление суспензии эритроцитов выше, чем те же величины на платиновом электроде. Это важно, так как отмеченный эффект указывает на влияние природы электродного материала на кинетику электродного процесса. Диапазоны потенциалов на стеклоуглероде, где отсутствует взаимодействие клеток с электродом, оказались близкими к тем, которые были ранее получены для активированных углей [51].

Чтобы убедиться в том, что обнаруженная электрохимическая активность эритроцитов, позволившая нам получить экспериментальное подтверждение транспорта электронов в системе электрод/клетка, не является уникальной особенностью исключительно эритроцита, было решено исследовать другую клетку крови с той же целью. В самом деле, электрохимическая активность эритроцита не должна быть уникальной, поскольку наличие электронодонорных и акцепторных групп на поверхности мембран других клеток крови не вызывает сомнений [145]. Для дальнейших исследований электрохимических свойств клеток крови был выбран тромбоцит, поскольку выделение лейкоцитов из крови в количествах, необходимых для наших экспериментов, сопряжено с их малым содержанием в биологическом материале.

Тромбоциты представлялись более простым объектом для исследования по сравнению с эритроцитами, так как перенос кислорода не является их физиологической функцией. Таким образом, только растворенный в фоновом водном растворе кислород следовало принимать во внимание при деаэрировании фонового электролита. Также следовало учитывать, что тромбоциты являются наиболее чувствительными клетками, наиболее остро, среди клеток крови, реагирующими на внешние воздействия.

3.1.3 Электрохимическое поведение тромбоцитов на платиновом электроде

Введение в обескислороженный физиологический раствор (рис. 18, кривая 1) суспензии тромбоцитов практически не изменил ход поляризационной кривой в катодной области потенциалов (рис. 18, кривая 2). В анодной области потенциалов также наблюдается процесс окисления сульфита натрия до сульфата, начало которого приходится на потенциалы положительнее 150 мВ.

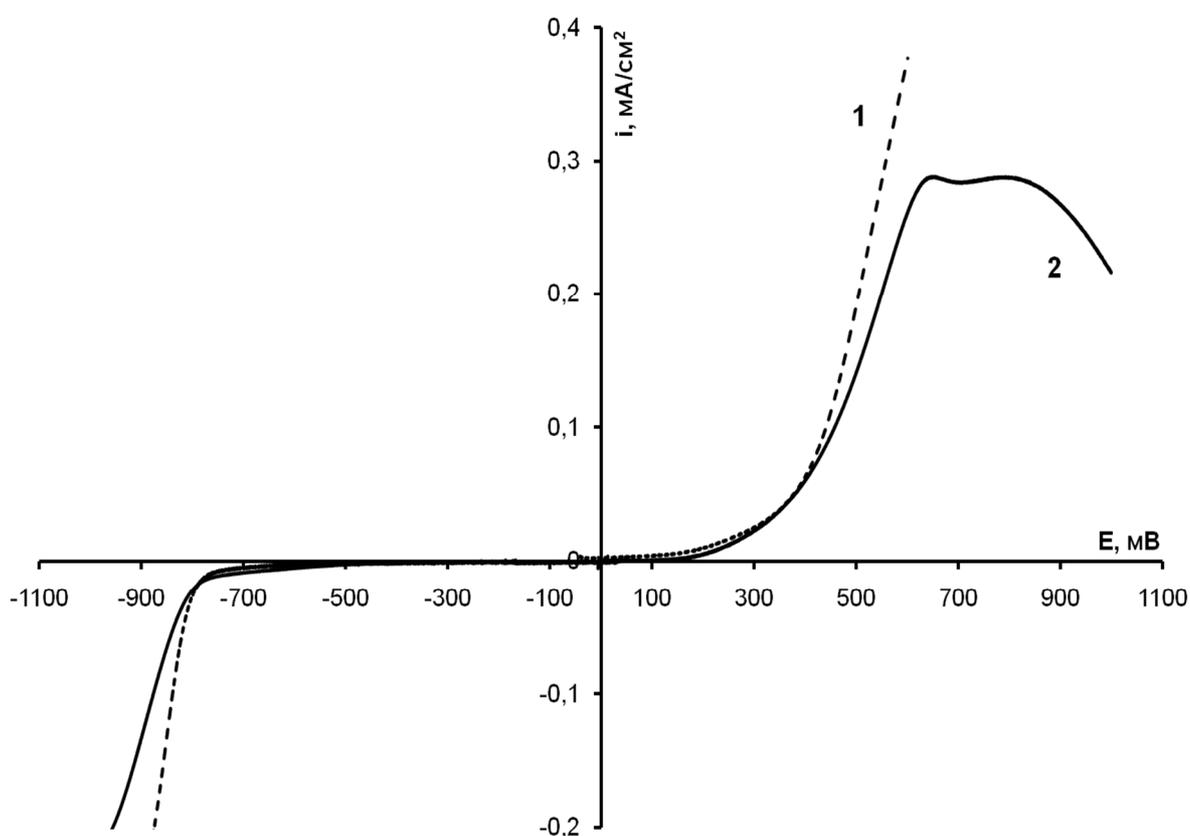


Рис. 18. Поляризационные кривые на Pt электроде; скорость развертки 10 мВ/с: 1 – фон - 0,15 М NaCl + 0,02 М Na₂SO₃, 2 - суспензия тромбоцитов в 0,15 М NaCl + 0,02 М Na₂SO₃.

Поляризационные кривые в анодной области потенциалов показали, что в растворе фона, не содержащего сульфит натрия, после добавления суспензии

тромбоцитов (рис. 19) при потенциалах, положительнее 400 мВ начинает протекать электрохимический процесс, который не может быть обусловлен ничем, кроме окисления тромбоцитов.

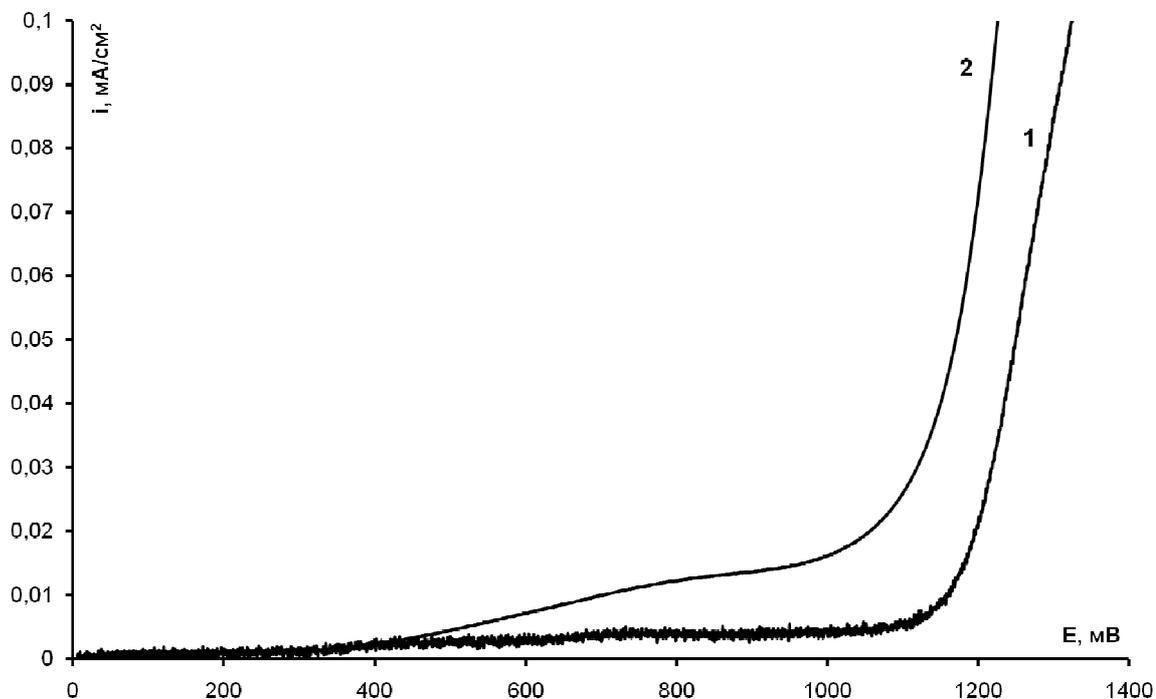


Рис. 19. Анодные поляризационные кривые на Pt электроде; скорость развертки 10 мВ/с: 1 – фон - 0,15 М NaCl, 2 - суспензия тромбоцитов в 0,15 М NaCl.

Таким образом, в суспензии тромбоцитов были обнаружены признаки электроокисления и не обнаружены признаки электровосстановления. Было решено, как при исследовании эритроцитов, провести микрокулонометрические измерения на платиновом электроде в суспензии тромбоцитов (рис. 20, 21).

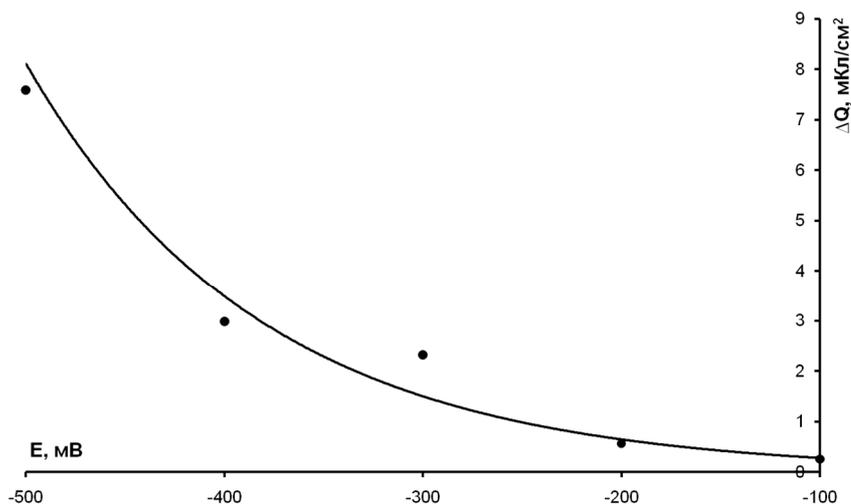


Рис. 20. Электровосстановление тромбоцитов на платине. Зависимость разницы количества электричества, прошедшего через ячейку за 30 мин, от потенциала электрода до и после добавления тромбоцитов в систему: электролит – 0,15 М NaCl + 0,02 М Na₂SO₃.

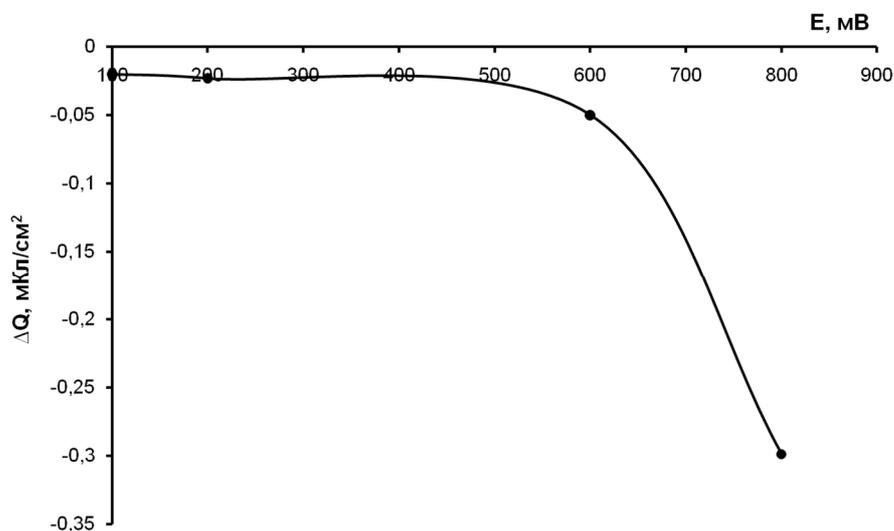


Рис. 21. Электроокисление тромбоцитов на платине. Зависимость разницы количества электричества, прошедшего через ячейку за 30 мин, от потенциала электрода до и после добавления тромбоцитов в систему: электролит – 0,15 М NaCl.

Результаты микрокулонометрических измерений на платине в катодной области потенциалов, представленные на рис. 20, показали, что количество электричества, затраченное на протекание процесса электровосстановления в течение 30 мин в суспензии клеток, за вычетом количества электричества, протекшего через фоновый электролит за то же время, возрастает, начиная с потенциалов отрицательнее -150 мВ. Этот эффект свидетельствует о том, что, начиная с указанного потенциала, в системе имеет место процесс электровосстановления тромбоцитов.

Увеличение разницы количества электричества при добавлении к фоновому электролиту суспензии клеток в анодной области потенциалов (рис. 21) наблюдается при потенциалах, положительнее 400 мВ, что свидетельствует о протекании процесса электроокисления тромбоцитов.

Таким образом, микрокулонометрические измерения в катодной области потенциалов позволили зафиксировать протекание процесса электровосстановления суспензии тромбоцитов, который невозможно было увидеть при поляризационных измерениях в катодной области потенциалов. В то же время микрокулонометрические измерения в анодной области потенциалов подтвердили, что в суспензии тромбоцитов имеет место протекание процесса электроокисления.

3.1.4 Расчет числа электронов, переносимых в процессе электровосстановления эритроцитов и тромбоцитов

С помощью стеклоуглеродного вращающегося дискового электрода была предпринята попытка определить суммарное число электронов, участвующих в процессе электровосстановления эритроцитов, суспендированных в физиологическом растворе. Для этого были сняты поляризационные кривые в указанных растворах, обескислороженных с помощью сульфита натрия, при различных скоростях вращения

стеклоуглеродного электрода в диапазоне от 500 об/мин до 2000 об/мин. Концентрация клеток в суспензии составляла $8 \cdot 10^{10}$ кл/л. Полученные данные представлены на рис. 22.

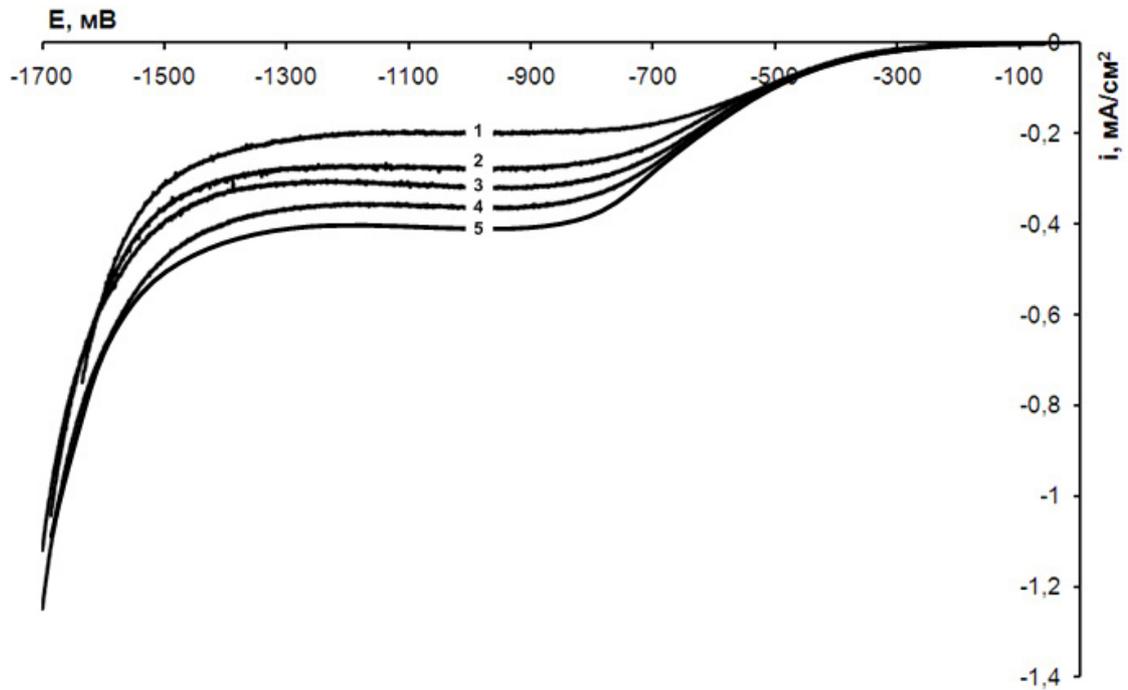


Рис. 22. Поляризационные кривые на стеклоуглероде в обескислороженной суспензии клеток ($8 \cdot 10^{10}$ кл/л) в зависимости от числа оборотов электрода, скорость развертки потенциала 10 мВ/с: 1 – 500 об/мин, 2 – 800 об/мин, 3 – 1000 об/мин, 4 – 1500 об/мин, 5 – 2000 об/мин.

Оказалось, что величина предельного тока процесса линейно зависит от корня квадратного из числа оборотов электрода в исследованном диапазоне скоростей вращения (рис. 23).

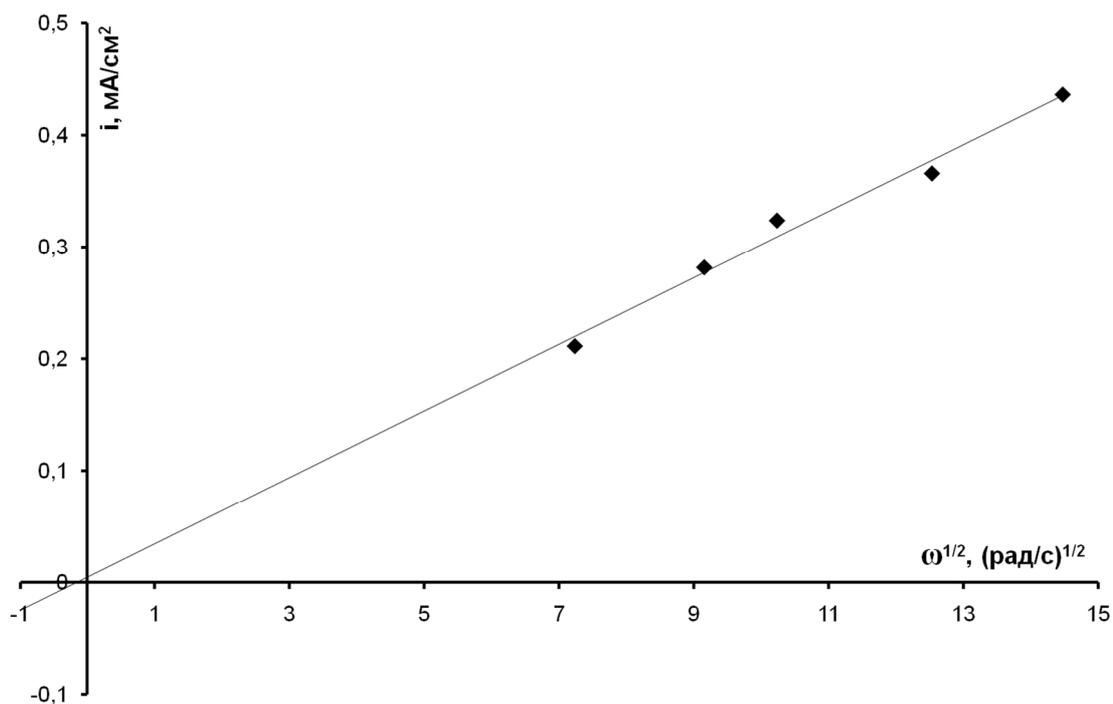


Рис. 23. Зависимость предельного тока восстановления эритроцитов от корня квадратного из числа оборотов вращающегося дискового электрода из стеклоглерида.

Следовательно, согласно теории Левича [95], процесс электровосстановления суспензии эритроцитов лимитируется диффузией клеток к электроду. Следует, однако, заметить, что теория Левича применима к молекулярным системам, тогда как наши измерения сделаны в коллоидной системе, причем коэффициент диффузии суспендированной частицы, подвергающейся электрохимическим превращениям с переносом электронов, на несколько порядков ниже по сравнению не только с ионами и органическими молекулами, но даже по сравнению с такими белковыми соединениями, как гемоглобин, входящим, как известно, во внутреннее строение исследуемых нами огромных частиц (эритроцитов) (см. таблицу 5).

Таблица 5. - Коэффициенты диффузии в водных растворах различных деполяризаторов

Деполяризатор	Коэффициент диффузии D, см ² /с
Эритроцит	$1,6 \cdot 10^{-9}$ [168]
Тромбоцит	$2 \cdot 10^{-7}$ [169]
Гемоглобин	$5 \cdot 10^{-7}$ [170]
Протон	$9,3 \cdot 10^{-5}$
Коллоидные частицы	$10^{-7} \div 10^{-9}$ [171]
Молекулы и ионы	10^{-5} [171]

Поэтому расчет чисел переносимых электронов по уравнению Левича [95] является оценочным. Было решено рассчитать число электронов, переносимых на одну клетку крови, с учетом приблизительного количества электроноакцепторных групп на мембране эритроцита.

$$i_{\text{пр}} = \pm 0,62 nFD^{2/3} \nu^{-1/6} \omega^{1/2} C_0 \quad (6)$$

где

$i_{\text{пр}}$ - плотность предельного тока диффузии, А/см²,

F - постоянная Фарадея, ~96500 Кл/моль,

D – коэффициент диффузии вещества, см²/с,

$\nu_{\text{кин}}$ - кинематическая вязкость среды, см²/с,

ω - угловая скорость вращения электрода, с⁻¹,

C_0 - концентрация деполяризатора, моль/см³.

Мы предположили, что одним из потенциальных деполяризаторов, находящихся на поверхности мембраны и способных восстанавливаться, могут быть дисульфидные группы полипептидов. Основным сиалогликопротеином эритроцитов является гликофорин А, имеющий молекулярный вес 36 кДа ($6 \cdot 10^{-20}$ г). Всего на мембране эритроцита находится

$\sim 5 \cdot 10^5$ молекул гликопротеина [172]. Было предположено, что на электроде происходит восстановление дисульфидных групп только указанного выше гликопротеина. Тогда количество молей гликофорина А на мембране всех эритроцитов ($8 \cdot 10^{10}$ кл/л) составит:

$$\vartheta = \frac{N}{N_A} \quad (7)$$

где

N - число частиц данного вещества,

N_A - число частиц в 1 моль вещества (число Авогадро), $6,02 \cdot 10^{23}$.

Тогда количество молей гликофорина А:

$$\nu = 5 \cdot 10^5 \cdot 8 \cdot 10^{10} / 6,02 \cdot 10^{23} = 6,64 \cdot 10^{-8} \text{ моль,}$$

и его концентрация, соответственно, $C_0 = 6,64 \cdot 10^{-8}$ моль/л или $6,64 \cdot 10^{-11}$ моль/см³

Число электронов, переносимых в процессе электровосстановления эритроцитов, рассчитывается из уравнения Левича:

$$n = \frac{i_{\text{пр}}}{0,62 F D^{2/3} \vartheta^{-1/6} \omega^{1/2} C_0} \quad (8),$$

Величина коэффициента диффузии эритроцитов составляет $D = 1,6 \cdot 10^{-9}$ см²/с [168], кинематическая вязкость крови - $\nu = 0,04$ см²/с [173], площадь стеклоглеродного электрода – $0,071$ см².

Подставляя полученные значения в формулу для числа электронов, получаем:

При 500 об/мин:

$$n = \frac{15 \cdot 10^{-6}}{0,62 \cdot 96500 \cdot (1,6 \cdot 10^{-9})^{2/3} \cdot 0,04^{-1/6} \cdot 52,3^{1/2} \cdot 0,071 \cdot 6,64 \cdot 10^{-11}} = 3,32 \cdot 10^6$$

При 800 об/мин:

$$n = \frac{20 \cdot 10^{-6}}{0,62 \cdot 96500 \cdot (1,6 \cdot 10^{-9})^{2/3} \cdot 0,04^{-1/6} \cdot 83,7^{1/2} \cdot 0,071 \cdot 6,64 \cdot 10^{-11}} = 3,5 \cdot 10^6$$

При 1000 об/мин:

$$n = \frac{23 \cdot 10^{-6}}{0,62 \cdot 96500 \cdot (1,6 \cdot 10^{-9})^{2/3} \cdot 0,04^{-1/6} \cdot 104,67^{1/2} \cdot 0,071 \cdot 6,64 \cdot 10^{-11}} = 3,6 \cdot 10^6$$

При 1500 об/мин:

$$n = \frac{26 \cdot 10^{-6}}{0,62 \cdot 96500 \cdot (1,6 \cdot 10^{-9})^{2/3} \cdot 0,04^{-1/6} \cdot 157^{1/2} \cdot 0,071 \cdot 6,64 \cdot 10^{-11}} = 3,32 \cdot 10^6$$

При 2000 об/мин:

$$n = \frac{31 \cdot 10^{-6}}{0,62 \cdot 96500 \cdot (1,6 \cdot 10^{-16})^{2/3} \cdot 0,04^{-1/6} \cdot 209,31^{1/2} \cdot 0,071 \cdot 6,64 \cdot 10^{-11}} = 3,43 \cdot 10^6$$

Таким образом, были получены весьма высокие значения чисел электронов для реакции электровосстановления суспензии эритроцитов. Подчеркнем, что в данном случае расчет проводили только на один гликопротеин мембраны эритроцита.

Из литературы известно, что числа электронов для процесса окисления или восстановления белковых молекул также имеют высокие значения. Так, в работе [174] были получены значения эффективного числа электронов для процесса адсорбции молекулы гемоглобина на активированных углях, которые зависели от природы угля. Например, для угля марки ВСК-А значение эффективного числа электронов составило около 1000. Для процесса восстановления альбумина на ртутном капельном электроде, как показано в [175] число переносимых электронов составляет 10,5. Авторы объясняли это высокое число электронов наличием пяти дисульфидных групп (S-S групп) в структуре белка и приняли во внимание, что на восстановление каждой группы требуется два электрона.

Также были проведены кулонометрические измерения на макроэлектроде из термически расширенного графита (ТРГ) площадью $4,5 \text{ см}^2$ в суспензии тромбоцитов с концентрацией клеток $7,35 \cdot 10^{11}$ кл/л.

Эти результаты позволили оценить значения чисел электронов для процесса электровосстановления суспензии тромбоцитов на электроде из ТРГ. Числа электронов оценивались по убыли клеток в ячейке, исходя из закона Фарадея:

$$m = \frac{Q}{F} \cdot \frac{M}{n} \quad (9),$$

где

Q - количество электричества, пошедшее на электровосстановление вещества, Кл,

M - молярная масса вещества, г/моль,

n – число электронов,

F – постоянная Фарадея, ~ 96500 Кл/моль,

m – масса вещества, подвергнутого электровосстановлению, г.

Переходя к количеству вещества и выражая из закона Фарадея число электронов, получим формулу:

$$n = \frac{Q}{\vartheta F} \quad (10)$$

Если учесть, что $\vartheta = N/N_a$ и $N = \Delta_{абс}$,

где N - число частиц данного вещества,

N_a - число частиц в 1 моль вещества (число Авогадро), $6,02 \cdot 10^{23}$,

$\Delta_{абс}$ – абсолютная убыль клеток в ячейке,

имеем в итоге:

$$n = \frac{Q \cdot N_a}{F \cdot \Delta_{абс}} \quad (11)$$

Количество электричества, затраченного непосредственно на электровосстановление клетки (Q), соответствуют количеству электричества, пошедшего на электрохимические процессы при заданном потенциале в суспензии тромбоцитов за вычетом количества электричества при том же потенциале, пошедшего на зарядание двойного электрического слоя и электролиз примесей, присутствующих в фоновом электролите.

Так, например, при потенциале -500 мВ исходная концентрация клеток составляла $7,35 \cdot 10^{11}$ кл/л, а после 30 минутного эксперимента – $5,4 \cdot 10^{11}$ кл/л, что соответствует абсолютной убыли клеток в ячейке $2,93 \cdot 10^9$ клеток. При этом, разница количества электричества составила $\Delta Q = 43,9$ мКл. Тогда число переносимых электронов для процесса электровосстановления тромбоцита составит:

$$n = \frac{43,9 \cdot 10^{-3} \cdot 6,02 \cdot 10^{23}}{96500 \cdot 2,93 \cdot 10^9} = 93,5 \cdot 10^6$$

Мы сопоставили полученные величины чисел электронов, а также величины коэффициентов диффузии с литературными данными для других деполяризаторов биологической природы. Эти данные приведены в таблице 6.

Таблица 6. - Коэффициенты диффузии и числа электронов для процессов электровосстановления некоторых форменных элементов, белков крови и ионов.

Деполяризатор	Число электронов, n	Коэффициент диффузии D, см ² /с
Эритроцит	$\sim 3,4 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^{-9}$ [168]
Гемоглобин	1000	$5 \cdot 10^{-7}$ [170]
Альбумин	10,5	$4,49 \cdot 10^{-7}$ [175]
Тромбоцит	$\sim 10^7$	$2 \cdot 10^{-7}$ [169]
Кислород	4	$2,1 \cdot 10^{-5}$ [154]

3.1.5 Суммарные исследования электрохимического поведения клеток крови на платиновом и стеклоуглеродном электродах

Эксперименты на платиновом и стеклоуглеродном электродах в суспензиях эритроцитов и тромбоцитов доказали, что в исследованных системах имеет место транспорт электронов как с поверхности электрода на клетку, так и в обратном направлении. Важно, однако, установить локализацию транспорта электронов при протекании обнаруженных нами процессов электровосстановления и окисления эритроцитов и тромбоцитов. Мы предполагаем, что поток зарядов направлен на мембрану клетки или в обратном направлении, а преобразования, происходящие при указанных электрохимических процессах, локализованы именно на мембране. Это предположение основано на известных сведениях об электронодонорных и акцепторных группах различных биологически активных соединениях, которые входят в состав поверхности клеточных мембран [29]. На основании существующих данных и представлений о строении мембран и составах их компонентов можно, однако, предположить, что электронодонорными (окисляющимися на аноде) могут быть аминокислоты, содержащие, например, сульфгидрильные связи, а электроноакцепторными (восстанавливающимися на катоде) могут быть дисульфидные связи аминокислот, входящих в состав компонентов клеточной мембраны, например, гликопротеинов.

Обнаружено, что природа электрода оказывает влияние на характер взаимодействия, что выражается в различии величин потенциалов полуволн электровосстановления клеток (табл. 7) и в количестве электричества, затраченного на протекающие электрохимические процессы (рис. 24).

Таблица 7. – Значения потенциалов полуволн процессов электровосстановления в исследуемых объектах.

Среда	$E_{1/2}$, мВ	
	Pt	Стеклоуглерод
0,15 М NaCl	-340	-630
ЭРМ+0,15 М NaCl (1:1)	-520	-795
ЭРМ+0,15 М NaCl + 0,02 М Na ₂ SO ₃ (1:1)	-420	-777

*ЭРМ – эритроцитарная масса

Потенциал полуволны электровосстановления клеток и потенциал полуволны суммарного процесса электровосстановления клеток в присутствии растворенного кислорода различаются: -777 мВ и -795 мВ на стеклоуглероде против -420 мВ и -520 мВ на платине. Разница потенциалов полуволн данных процессов на платине и стеклоуглероде при этом составляет $\Delta E_{1/2} = 357$ мВ и 275 мВ соответственно.

Сравнение микрокулометрических данных, полученных при исследовании эритроцитов и тромбоцитов (рис. 24) показало, как сходство электрохимических взаимодействий данных клеток с исследованными электродами, так и существенные различия, обусловленные природой материала электрода. Например, при потенциале -500 мВ за время эксперимента через системы Pt/эритроциты и Pt/тромбоциты протекло близкое по значениям удельное количество электричества (6,1 и 7,6 мКл/см² соответственно), тогда как через систему стеклоуглерод/эритроциты эта величина составила 173 мКл/см². Это явление, обусловленное природой материала электрода, требует для понимания дополнительного исследования.

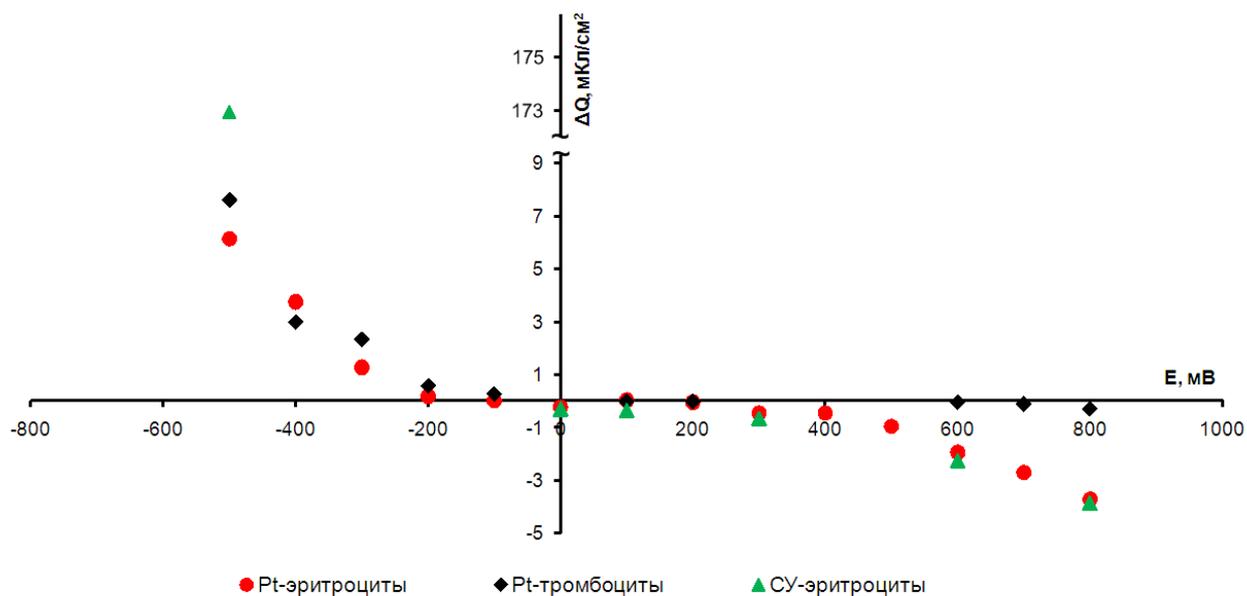


Рис. 24. Микрокулометрические измерения в суспензиях эритроцитов ($4 \cdot 10^{12}$ кл/л) и тромбоцитов ($220 \cdot 10^9$ кл/л) на платиновом и стеклоуглеродном (СУ) электродах при различных потенциалах: электролит - 0,15 М NaCl (анодная область), 0,15 М NaCl + 0,02 М Na₂SO₃ (катодная область).

Обнаруженное экспериментально явление обмена зарядами в системе электрод/клетка может происходить без приложенного извне потенциала за счет выравнивания величин плотностей зарядов поверхностей мембран и электрода в электростатическом поле системы [электрод/эритроцит] по схеме, представленной на рис. 25.

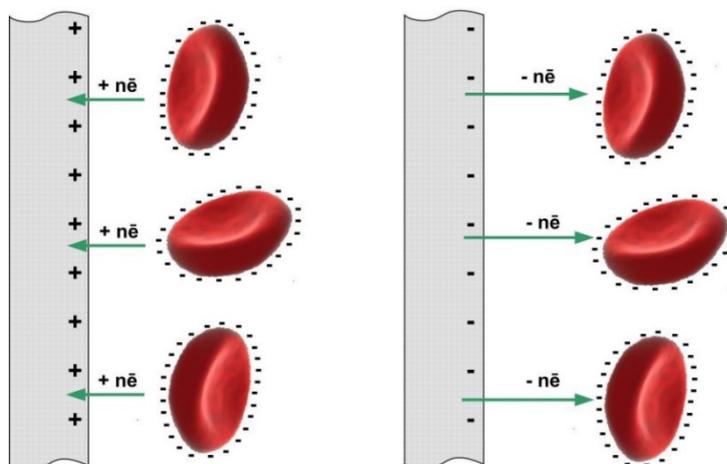


Рис. 25. Схема взаимодействия электрод/эритроцит.

При этом знаки заряда и соотношение величин плотности зарядов поверхностей электрода ($\delta_{эл}$) и мембраны эритроцита ($\delta_{м}$) будут определять направление транспорта электронов или его отсутствие. Если знаки зарядов поверхности электрода и мембраны одинаковы (то есть при отрицательном знаке зарядов поверхности электрода, так как заряд поверхности мембраны всегда является отрицательным) [144,176] и плотность заряда поверхности электрода превышает плотность заряда мембраны клетки крови, заряд может перемещаться с поверхности электрода на мембрану эритроцита. В случае противоположных знаков заряда поверхности электрода и мембраны процесс переноса поверхностных зарядов может протекать в обратном направлении. Наконец, процесс переноса электронов может отсутствовать в случае равенства плотностей зарядов поверхности электрода и мембраны, либо недостаточной для протекания процесса разности плотностей поверхностных зарядов.

Процесс транспорта электронов в системе [электрод]/[клетка крови] в отсутствие внешней поляризации также был обнаружен в исследовании изменения величины ПРЦ платинового электрода (рис. 26) и активированного угля ФАС (рис. 27) при введении в фоновый электролит суспензии эритроцитов.

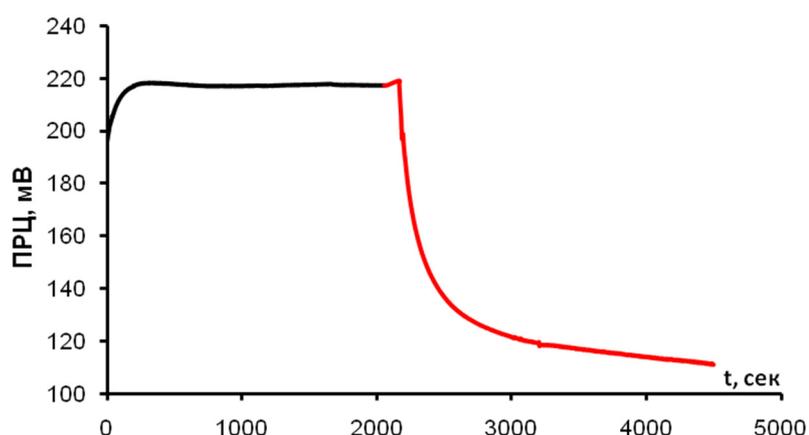


Рис. 26. Смещение ПРЦ платинового электрода при введении в фоновый электролит (0,15 М NaCl) суспензии эритроцитов.

Как можно видеть из рис. 26 добавление суспензии эритроцитов в фоновый электролит вызывало сдвиг ПРЦ платинового электрода $\Delta E = 106$ мВ в отрицательную область. Таким образом, мы наблюдали изменение заряда платинового электрода, что свидетельствует о переносе электронов с поверхности мембраны клеток на электрод. В случае контакта активированного угля ФАС с суспензией эритроцитов (рис. 27), добавление суспензии приводило к сдвигу потенциала угля в положительную область на $\Delta E = 21$ мВ, то есть перенос электронов протекает в обратном направлении – с поверхности активированного угля на мембрану клеток.

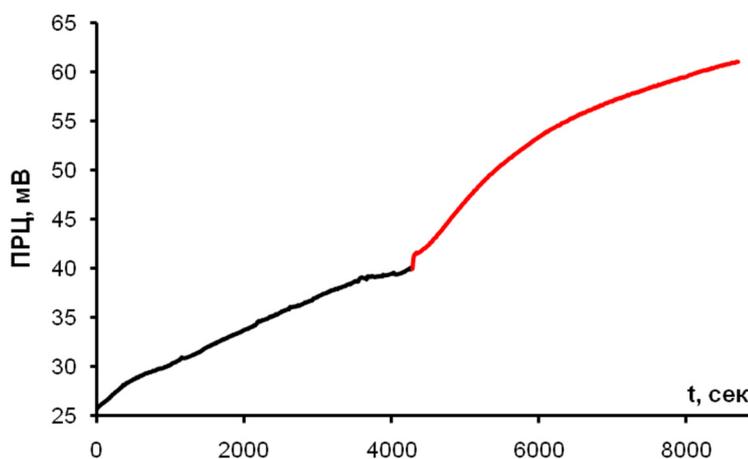


Рис. 27. Смещение потенциала при разомкнутой цепи (ПРЦ) активированного угля ФАС при введении в фоновый электролит (0,15 М NaCl) суспензии эритроцитов.

Предложенная модель (то есть самопроизвольные окислительно-восстановительные процессы, протекающие без приложенной извне поляризации) активно используется для описания многих электрохимических процессов. Работоспособность такой модели иллюстрируется многочисленными аналогичными явлениями, известными в электрохимии. В качестве примеров можно привести процессы саморазряда источников тока [177] или суперконденсаторов [178], когда микропримеси электролита в виде ионов или органических молекул окисляются или восстанавливаются при

разомкнутой цепи, процессы коррозии, контактного восстановления ионов металлов и др.

Предположение о способности вступать в окислительно-восстановительные реакции различных функциональных групп, входящих в состав мембраны эритроцита, можно подкрепить многочисленными работами в области электрохимии белков, где, наряду с их электрохимической активностью [179], обнаружен прямой и непрямой транспорт электронов между электродами и редокс протеинами [180].

3.2 Измерение ПРЦ платинового электрода в плазме крови

Поляризационные и микрокулонометрические измерения, а также измерения без внешней поляризации в суспензии клеток показали, что в системе [электрод/клетка] происходят взаимодействия, приводящие к транспорту электронов. Электрохимические параметры системы отражают взаимодействия в указанной системе, что, в свою очередь зависит от состояния каждого ее компонента. Поэтому было предположено, что изменения одного из компонентов системы в биологической среде, могут влиять на физико-химические параметры системы в целом, что могло бы быть выявлено путем электрохимических измерений. Так, в данной работе мы попытались обнаружить взаимосвязь между состоянием клеток и биологической среды и ПРЦ электрода, погруженного в данную среду.

3.2.1 Оценка жизнеспособности тромбоцитов

Всего было произведено 74 измерения ПРЦ в плазме и в концентрате тромбоцитов. Вначале были измерены величины ПРЦ в плазме крови, обогащенной тромбоцитами. Эти величины находились в диапазоне от -10 мВ

до -52 мВ, что совпадало с величинами, характерными для практически здоровых людей [94].

Однако корреляционная связь между величинами ПРЦ и соотношением в суспензии тромбоцитов, бедных и богатых гранулами (по классификации [181]), не была обнаружена. Так, при содержании в плазме тромбоцитов в концентрации 2000 тыс/мкл значение ПРЦ составляло -37 мВ, а после удаления части клеток из плазмы до концентрации менее 15 тыс/мкл величина ПРЦ находилась также, как и до обеднения, в пределах, характерных для здоровых людей (-39,3 мВ).

Итак, как показано в [114], морфофункциональный статус тромбоцитов зависит от количества тромбоцитов богатых гранулами, но на величине ПРЦ в плазме это не сказывается. Мы связали это с тем, что, сколько бы гранул ни находилось во внутреннем пространстве тромбоцита, они всегда отграничены от плазмы мембраной клетки. Однако, поскольку измерения ПРЦ производятся в плазме, для изменения измеряемой величины требуются изменения состава плазмы.

Гранулы, от количества которых зависит морфофункциональный статус тромбоцитов, содержат различные вещества и секреторные жидкости. Было предположено, что величина ПРЦ зависит от содержания в плазме веществ, находящихся в гранулах, их биохимического и химического состава.

Таким образом, было решено проверить, скажется ли на измеряемых величинах ПРЦ попадание в плазму, окружающую тромбоциты, секреторных веществ, находящихся в гранулах. Шансы на успех подкреплялись тем, что секреторные гранулы тромбоцитов, как отмечалось выше (раздел 1.2.4.1), содержат большое количество белковых соединений, а адсорбция белков на платине, как известно, приводит к сдвигам потенциала электрода. Действительно, ранее нами было установлено влияние адсорбции белка на величину потенциала платинового электрода при разомкнутой цепи [182].

При активации тромбоцитов содержимое гранул выходит из клеток (реакция высвобождения) и играет важную роль в процессе агрегации и образования в сосуде гемостатической пробки. В данном случае важно, что протекание реакции высвобождения приводит к выбросу секреторных белков за пределы клеток в плазму, окружающую тромбоциты. Принимая во внимание эти данные, выброс внутреннего содержимого тромбоцитарных гранул в плазму крови должен был сказаться на величине ПРЦ, измеренного в плазме.

В то же время разрушение биологически неполноценных тромбоцитов (не содержащих гранул или содержащих мало гранул) не должно значительно увеличивать содержания белков и секреторных веществ в плазме. Поэтому было решено попытаться оценивать разницу величин ПРЦ (Δ ПРЦ) до и после разрушения тромбоцитов.

Для разрушения клеток был выбран метод криодеструкции при температуре около -20°C . Этот способ разрушения тромбоцитов был выбран, поскольку холодное разрушение клеток не связано с введением в плазму крови других веществ, способных дополнительно влиять на ПРЦ в плазме или разбавляющих плазму. Например, если разрушать клетки с помощью добавления в плазму гипертонических растворов солей или дистиллированной воды, меняется солевой состав плазмы, что также приведет к определенному сдвигу величины ПРЦ.

Одновременно с измерением величин ПРЦ в плазме до и после криодеструкции тромбоцитов проводилась оценка морфофункционального статуса тестируемых тромбоцитов с помощью указанного выше оптического метода [114], используя его в качестве стандартного метода.

Было обнаружено, что разность величин ПРЦ в плазме, богатой тромбоцитами, измеренных до и после криодеструкции, изменяется в зависимости от содержания в плазме тромбоцитов, богатых гранулами. Морфофункциональный анализ показал, что после криодеструкции в плазме

значительно увеличивается содержание тромбоцитарного фактора роста (PDGF), как известно, являющегося белком [113], а увеличение количества белка в электролите, как известно, приводит к его адсорбции на платине и, соответственно, к изменению потенциала платины [182].

Было исследовано 10 образцов плазмы с концентрацией клеток 250 тыс/мкл. Оказалось, что до криодеструкции содержание белка PDGF в обогащенной тромбоцитами плазме не превышало 1 пг/мл, тогда как после криодеструкции тромбоцитов этот показатель находился в пределах от 60-70 пг/мл до 300-400 пг/мл. При этом обнаружено, что, если содержание PDGF в образцах находилось в пределах 60-70 пг/мл, количество тромбоцитов с гранулами, измеренное оптическим методом, составляло $D_{тр.гр.}=35-36\%$, тогда как для образцов плазмы, где содержание PDGF находилось в пределах 300-400 пг/мл, количество тромбоцитов с гранулами было примерно в 2 раза больше и составляло ($D_{тр.гр.}=73-75\%$).

Итак, замораживание плазмы до -20°C и последующее ее размораживание приводило к тотальной криодеструкции тромбоцитов (рис. 28), которая, как и можно было ожидать, сопровождалась выбросом содержимого гранул, в частности, белка PDGF, за пределы клеток, что и было зафиксировано.

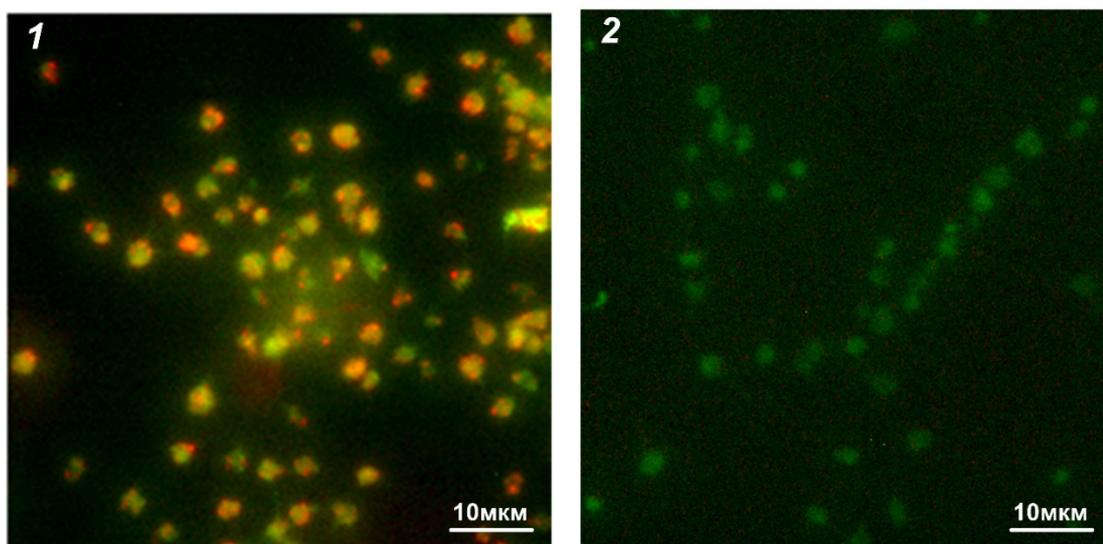


Рис. 28. Микроскопическое исследование витально окрашенных тромбоцитов: исходные тромбоциты (1) и тромбоциты после криодеструкции (2).

Одновременно удалось обнаружить заметное изменение величин ПРЦ в размороженной плазме по сравнению с исходной плазмой. В исследованных образцах обогащенной тромбоцитами плазмы и концентрата тромбоцитов величина Δ ПРЦ изменялась от -19 мВ до 100 мВ. Более того, была выявлена линейная взаимосвязь между сдвигом ПРЦ в плазме под действием криодеструкции и содержанием в ней тромбоцитов богатых гранулами (рис. 29). С помощью этих данных удалось установить, что коэффициент корреляции полученной линейной зависимости составил $r = 0,94$.

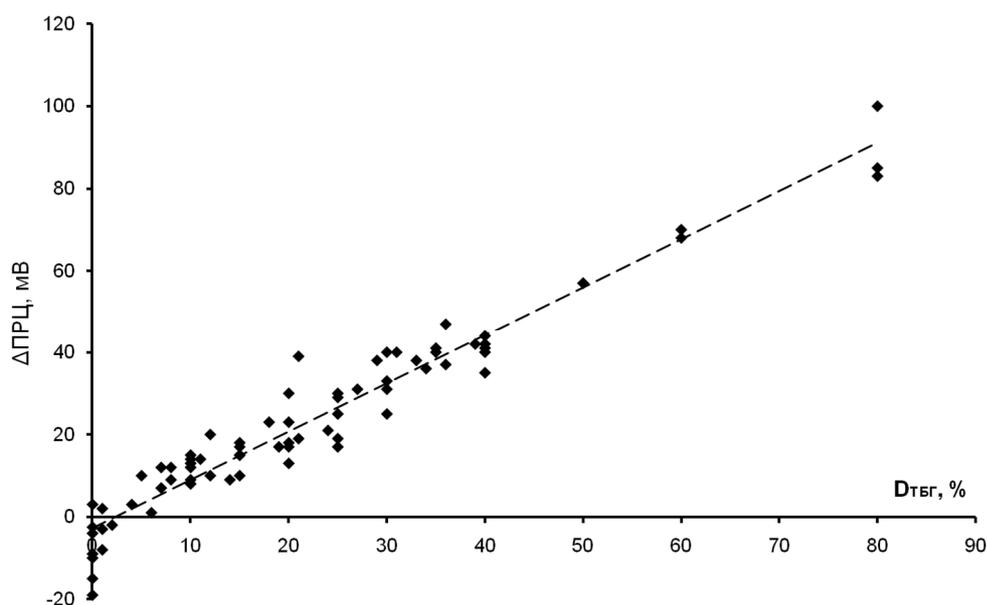


Рис. 29. Корреляция смещения величины ПРЦ в плазме, содержащей тромбоциты, в результате криодеструкции с содержанием в плазме тромбоцитов богатых гранулами.

Эффект, обусловивший полученную линейную зависимость (рис. 29), как было предположено выше, связан с выбросом белков, содержащихся в гранулах тромбоцитов, в плазму в результате криодеструкции тромбоцитов. Это предположение подтверждается приведенными выше данными о связи количества белка, выброшенного гранулами тромбоцитов в плазму в результате криодеструкции, с количеством гранул в исследованных образцах тромбоцитов. Нельзя, однако, исключать, что выявленный сдвиг ПРЦ может

также быть частично обусловлен изменением соотношения оксидантов и антиоксидантов, находившихся в тромбоцитах, в результате их выброса из гранул при разрушении клеток. В подтверждение этих предположений, еще раз приведем данные, полученные нами ранее, о связи величин ПРЦ с адсорбцией белков [182] и содержанием про- и антиоксидантов в водных растворах и плазме крови [173].

Как видно из данных, представленных на рис. 29, по мере увеличения содержания в плазме тромбоцитов, богатых гранулами, измеренная разность потенциалов смещается в область положительных потенциалов и, напротив, при уменьшении в плазме содержания тромбоцитов богатых гранулами, величина Δ ПРЦ приближается к 0 мВ или даже становится отрицательной.

Анализ измерений величин Δ ПРЦ и морфофункционального статуса клеток в концентрате тромбоцитов, хранившемся в течение 5 суток при 22°C показал, что происходит монотонное снижение содержания тромбоцитов, богатых гранулами по мере увеличения времени хранения. Исходные значения $D_{\text{ТБГ}}$ составляли в среднем 25,5%, через 1 сутки хранения – 20,8%, через 2 суток – 18,6%, через 3 суток – 9,1%, через 4 суток – 5,6%, через 5 суток – 0%. Одновременные измерения величин ПРЦ до и после криодеструкции исследуемых образцов выявили снижение величин разности потенциалов плазмы до и после криодеструкции. Так, исходная величина Δ ПРЦ в концентрате тромбоцитов, составила 29,5 мВ, то через 1 сутки хранения – 21,8 мВ, через 2 суток – 15,1 мВ, через 3 суток – 6,9 мВ, через 4 суток – 1 мВ, через 5 суток – -5 мВ.

Можно заключить, что биологическая полноценность концентрата тромбоцитов сохраняется в течение 2-х суток хранения, после чего наступает ее резкое падение. Эти наблюдения соответствуют данным, полученным с помощью морфофункционального анализа витально окрашенных тромбоцитов методом флуоресцентной микроскопии в работе [163].

При разрушении тромбоцитов в образцах с низким содержанием тромбоцитов богатых гранулами или в плазме, не содержащей тромбоцитов богатых гранулами выявлено смещение ПРЦ в отрицательную область, т.е. наблюдался эффект обратный тому, который имел место при исследовании проб с высоким содержанием тромбоцитов богатых гранулами. Таким образом, оценка ПРЦ в плазме позволяет оценить популяцию функционально пригодных тромбоцитов.

3.2.2 Оценка качества донорской плазмы

Как показано выше, изменение величины потенциала электрода при его контакте с биологической средой обусловлено переносом электронов в системе [электрод]/[биологическая среда]. Мы попытались использовать это явление для разработки электрохимического критерия для оценки качества донорской плазмы после ее длительного хранения и для прогнозирования возможности переливания донорской плазмы предполагаемому реципиенту.

Исследованы образцы плазмы 20 доноров. Образцы плазмы хранили в условиях, соответствующих процедуре карантинизации (при -40°C). Величины ПРЦ в плазме измеряли при температуре 21°C в день плазмафереза до замораживания, через 1,3,7,14 сутки, а затем по достижении 1,2,3,4,5 и 6 месяцев хранения. Результаты мониторинга ПРЦ в плазме в процессе карантинизации представлены на рис. 30.

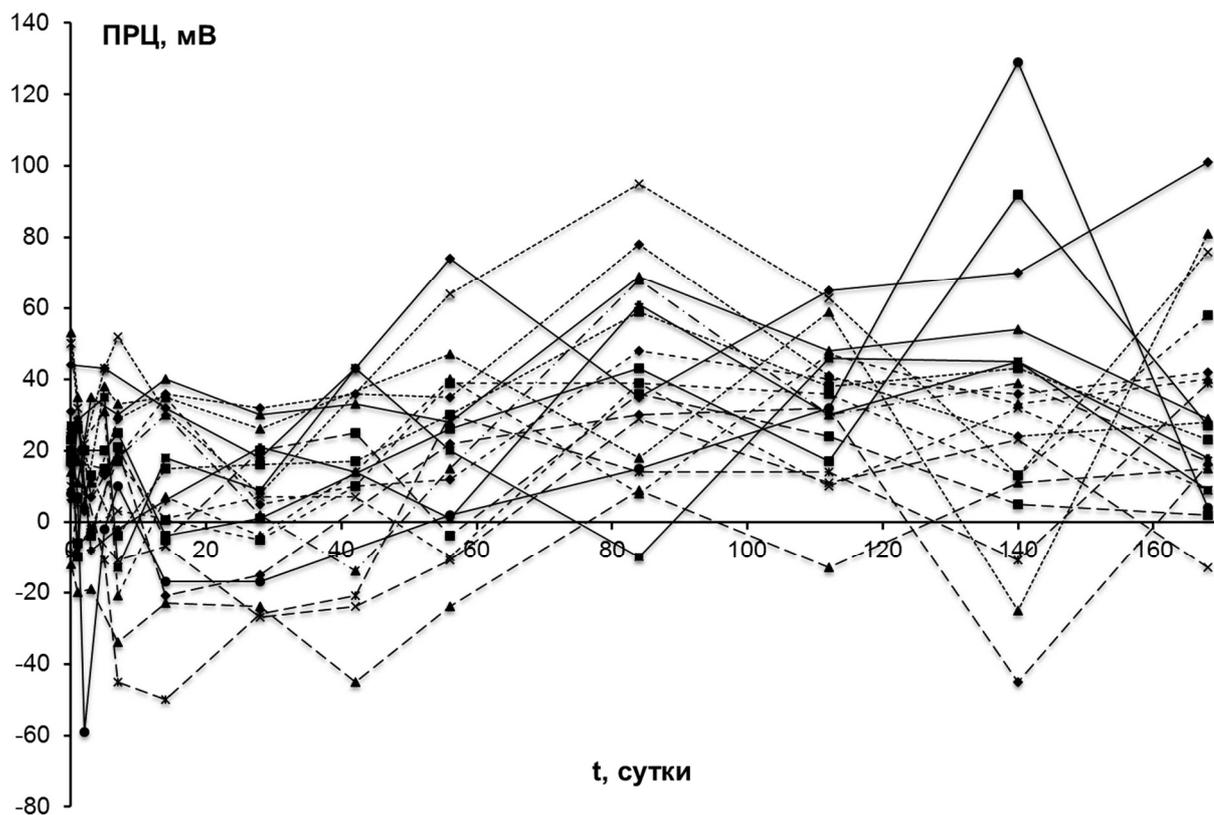


Рис. 30. Мониторинг ПРЦ в донорской плазме в течение ее хранения.

Непривычный для электрохимиков, но обычный для медиков вид полученных зависимостей обусловлен тем, что данное исследование представляло собой мониторинг электрохимического параметра в биологической среде в течение длительного времени. Поэтому представленный на рис. 30 график фиксирует дискретные величины потенциалов и выявляет лишь тенденцию изменения величины ПРЦ в процессе хранения плазмы крови.

Как видно из этих данных, величина ПРЦ в плазме перед хранением находилась в пределах от -12 мВ до 53 мВ, что соответствовало результатам [94] для практически здоровых людей. К концу срока карантинизации плазмы (168 дней) величины ПРЦ находились в диапазоне от -13 мВ до 101 мВ, что говорит о преимущественном смещении величин ПРЦ в плазме при ее хранении в положительную область потенциалов. Таким образом,

равновесие [прооксиданты]/[антиоксиданты] при хранении этих образцов плазмы, в основном, смещается в сторону накопления прооксидантов.

Замечено также, что в течение первых 14 суток происходили значительные колебания величин ПРЦ в плазме, причем, начиная с истечения 1 месяца хранения, изменение ПРЦ протекало синхронно для всех доноров (величины ПРЦ монотонно смещались либо в положительную, либо в отрицательную области). Максимальные величины сдвигов ПРЦ в положительную область потенциалов наблюдались до 129 мВ.

Таким образом, было обнаружено, что при низкотемпературном режиме хранения в процессе карантинизации величины ПРЦ в плазме претерпевают весьма значительные изменения. Это наблюдение свидетельствует о высокой вероятности протекания окислительных процессов в плазме в процессе карантинизации. Возможно, наблюдаемые эффекты могут быть связаны с окислением остаточных количеств деградированных форменных элементов (например, в виде остатков их мембран).

Важно, что величины ПРЦ в плазме, готовой к трансфузии, находятся, как правило, в области положительных значений, далеко выходящих за пределы диапазона ПРЦ практически здоровых людей.

Предположение об окислении плазмы подтверждается данными, полученными при измерениях ПРЦ в эритроцитарной массе, хранящейся при комнатной температуре. В работе [183] показано, что окислители приводят к смещению величин ПРЦ в положительную область, а восстановителей (антиоксидантов) - в отрицательную область потенциалов. И, действительно, результаты измерений ПРЦ в эритроцитарной массе при комнатной температуре показали, что ПРЦ в этих условиях быстро смещаются в положительную область (рис. 31) в результате протекания окислительных процессов.

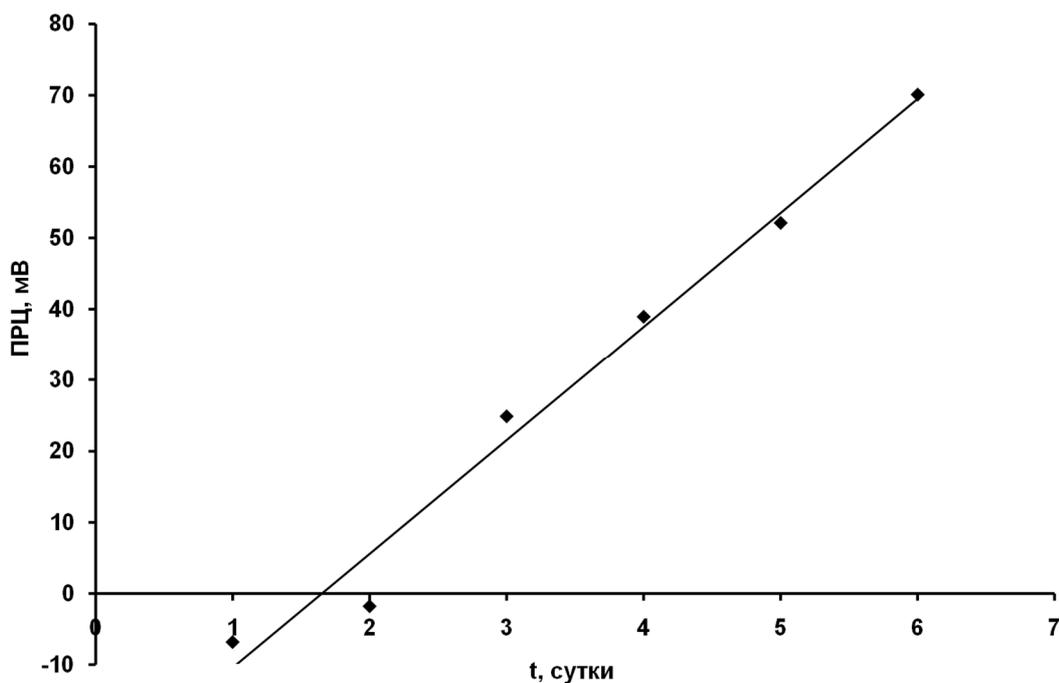


Рис. 31. Изменение величины ПРЦ в эритроцитарной массе от времени при комнатной температуре

При температуре хранения плазмы (-40°C) окислительные процессы, безусловно, протекают медленнее, но, по-видимому, не тормозятся абсолютно. Однако тенденция смещения величин ПРЦ в плазме при низких температурах имеет ту же направленность, что и в эритроцитах, поэтому предположение о протекании в плазме при длительном хранении окислительных процессов действительно связано с окислением остатков в ней форменных элементов крови.

Сопоставление величин ПРЦ в плазме по окончании срока карантинизации с областью величин ПРЦ практически здоровых людей показало, что переливание окисленной плазмы пациенту может привести к сдвигам величин ПРЦ в плазме пациента в положительную область. Поэтому, вероятно, попадание в организм такой окисленной плазмы может являться причиной возникновения осложнений.

Для того чтобы оценить влияние трансфузии донорской плазмы на величину ПРЦ в плазме крови реципиента, были проведены модельные

эксперименты по смешиванию плазмы для переливания с образцами плазмы практически здоровых добровольцев ($N = 15$). Плазма смешивалась с плазмой практически здоровых доноров в соотношении 1:1. Диаграмма величин ПРЦ в переливаемой плазме, донорской плазме и их смеси приведена на рис. 32 (сплошная линия).

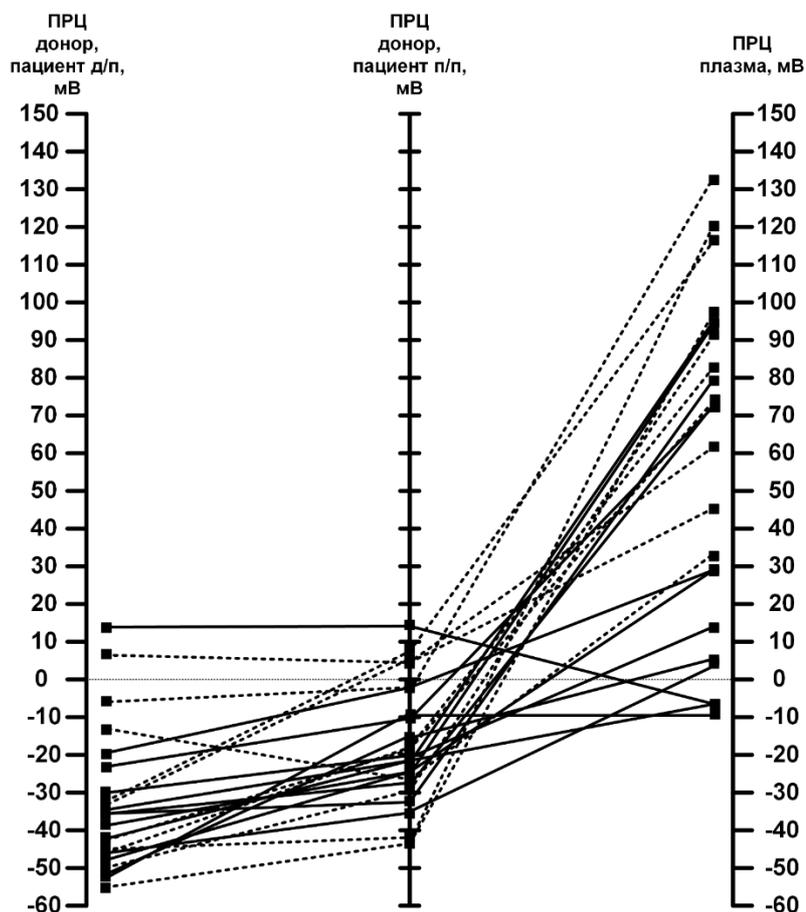


Рис. 32. Диаграмма смещения ПРЦ в плазме доноров (—) и пациентов реанимации (-----) при трансфузии плазмы.

Величины ПРЦ в плазме доноров находились в обычных для здоровых людей пределах от -53 мВ до 13 мВ, в то же время величины ПРЦ в карантинизированной плазме находились в пределах от -10 мВ до 93 мВ. После смешения плазмы доноров с образцами переливаемой плазмы величины ПРЦ в смешанной плазме смещались в положительную область значений относительно донорской плазмы. Разница достигала значений 43 мВ.

Известно, однако [182], что смещение величины ПРЦ в плазме пациента более чем на 25 мВ, свидетельствует о развитии в организме патологических процессов. Таким образом, трансфузии плазмы с положительными величинами ПРЦ, выходящими за пределы величин, характерных для практически здоровых людей, могут приводить к риску возникновения ответной реакции, например, развитию окислительного стресса или воспалительных процессов [182].

Приведенные экспериментальные данные, полученные *in vitro*, при смещении величины ПРЦ в исходной плазме после смешивания ее с плазмой, прошедшей процедуру карантинизации, нашли подтверждение при обследовании реанимационных пациентов с различными травмами. Измерения величин ПРЦ в плазме пациентов до и после переливания пациенту плазмы после низкотемпературного хранения (рис. 32, пунктир) показали, что это привело к тем же эффектам, как по направлению сдвигов ПРЦ, так и по их абсолютным величинам, которые наблюдались при смешивании образцов плазмы *in vitro* (рис. 32, сплошная).

Исследование ПРЦ в плазме больных с тяжелыми травмами ($N = 10$) показало, что величины ПРЦ в переливаемой плазме 10 доноров находились в пределах от 30 мВ до 130 мВ. После переливания плазмы у пациентов было отмечено смещение ПРЦ в область положительных значений (рис. 32, пунктир).

Приведем пример изменения величин ПРЦ в плазме двух пациентов после переливания плазмы. Плазма пациента М. до переливания имела ПРЦ -32 мВ, размороженная после хранения плазма - 62 мВ, после переливания плазмы ПРЦ пациенту величина ПРЦ в его плазме увеличилась до значения 5 мВ, то есть сдвиг ПРЦ составил 37 мВ в положительную область. Величина ПРЦ в плазме пациента Х. до переливания составляла -32 мВ, в размороженной плазме - 115 мВ, после переливания величина ПРЦ в плазме пациента

составила 9 мВ, то есть сдвиг потенциала составил 41 мВ в положительную область.

Полученные данные показали, что переливание плазмы с высокими положительными значениями ПРЦ пациентам приводило к нежелательным смещениям величин ПРЦ в плазме пациента в положительную область потенциалов.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что величину ПРЦ в плазме для переливания можно использовать в качестве критерия безопасности переливания после сопоставления этой величины с величиной ПРЦ в собственной плазме пациента.

3.3 Взаимодействие эритроцитов и «теней» эритроцитов с углеродными материалами

Приведенные выше данные, описывающие влияние электрохимических параметров системы электрод/клетка на взаимодействия в указанной системе, позволили создать электрохимический метод контроля состояния клетки крови, что проиллюстрировано на примере разработки электрохимических методов определения морфофункционального статуса тромбоцитов и контроля качества донорской плазмы. В то же время, ранее было обнаружено влияние потенциала активированных углей на их травмирующую активность по отношению к клеткам крови, что позволило создать метод электрохимически управляемой гемосорбционной детоксикации.

В рамках данной работы была предпринята попытка решить более сложную задачу: попытаться разделить нормальные эритроциты, включая эхиноциты, от разрушенных клеток, «теней» эритроцитов, опасность накопления которых в крови была описана в главе 1.

Подчеркнем, что эта задача до сих пор не имеет практического решения, ни с помощью цитологических, ни физико-химических методов, несмотря на очевидную важность этой проблемы.

Первоначально было исследовано взаимодействие активированных углей различных марок (АГ-3, СКТ-6А, ВСК-А и ФАС), а также углей марок АГ-3 и СКТ-6А, модифицированных проводящим полимером полипирролом, с гемолизатом эритроцитов, содержащим преимущественно разрушенные эритроциты («тени» эритроцитов). Отметим, что в исходной пробе до контакта с углями наблюдалось большое количество скоплений «теней» эритроцитов, с конгломератами размером 50-100 мкм (рис. 33).

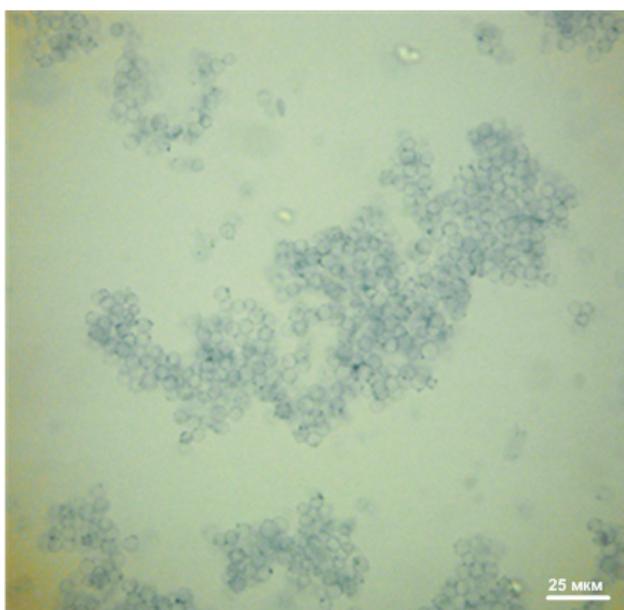


Рис. 33. Световая микроскопия витально окрашенных эритроцитов гемолизированной эритроцитарной массы. Увеличение $\times 400$.

Как видно из данных, представленных в таблице 8, обнаружено возрастание степени извлечения «теней» эритроцитов из гемолизата при сдвиге величины потенциалов углей в отрицательную область. Было предположено, что убыль «теней» эритроцитов связана с их адсорбцией на поверхности активированного угля. Данное предположение получило подтверждение путем исследования витально окрашенных эритроцитов и лизированных клеток с помощью флуоресцентной микроскопии (рис. 34).

Таблица 8. - Морфометрический анализ эритроцитов крови человека до и после контакта гемолизированной эритроцитарной массы с различными активированными углями.

Анализируемые параметры	Морфология эритроцитов			Степень извлечения «теней» эритроцитов, %
	Дискоциты	Эхиноциты	«Тени» эритроцитов	
	*ЭРМ крови донора			
Концентрация клеток $\times 10^9$ /л	7200	1530	270	-
Распределение клеток %	80	17	3	
	**ГЭМ до контакта углем			
Концентрация клеток $\times 10^9$ /л	90	540	8370	-
Распределение клеток %	1	6	93	
	ГЭМ после контакта с углем: АГ-3 ***Е = 228 мВ			
Концентрация клеток $\times 10^9$ /л	24	605	7508	10,3
Распределение клеток %	0,3	7,4	92,3	
	ГЭМ после контакта с углем СКТ-6А Е = 207 мВ			
Концентрация клеток $\times 10^9$ /л	30	595	5376	35,8
Распределение клеток %	0,5	9,9	89,6	

*ЭРМ – эритроцитарная масса

**ГЭМ – гемолизированная эритроцитарная масса

***Е – величина потенциала при разомкнутой цепи активированных углей, мВ

Продолжение таблицы 8.

Анализируемые параметры	Морфология эритроцитов			Степень извлечения «теней» эритроцитов, %
	Дискоциты	Эхиноциты	«Тени» эритроцитов	
	ГЭМ после контакта с углем ВСК-А E = 156 мВ			
Концентрация клеток $\times 10^9$ /л	80	540	1380	83,5
Распределение клеток %	4,0	27,0	69,0	
	ГЭМ после контакта с углем ФАС E = 121 мВ			
Концентрация клеток $\times 10^9$ /л	90	112	247	97
Распределение клеток %	20,0	25,0	55,0	
	ГЭМ после контакта с углем [АГ-3/ПП/СІ] E = 167 мВ			
Концентрация клеток $\times 10^9$ /л	70	380	7115	15
Распределение клеток %	0,8	4,6	94,6	
	ГЭМ после контакта с углем [СКТ6А/ПП/СІ] E = 309 мВ			
Концентрация клеток $\times 10^9$ /л	35	630	7951	5,5
Распределение клеток %	0,4	7,3	92,3	

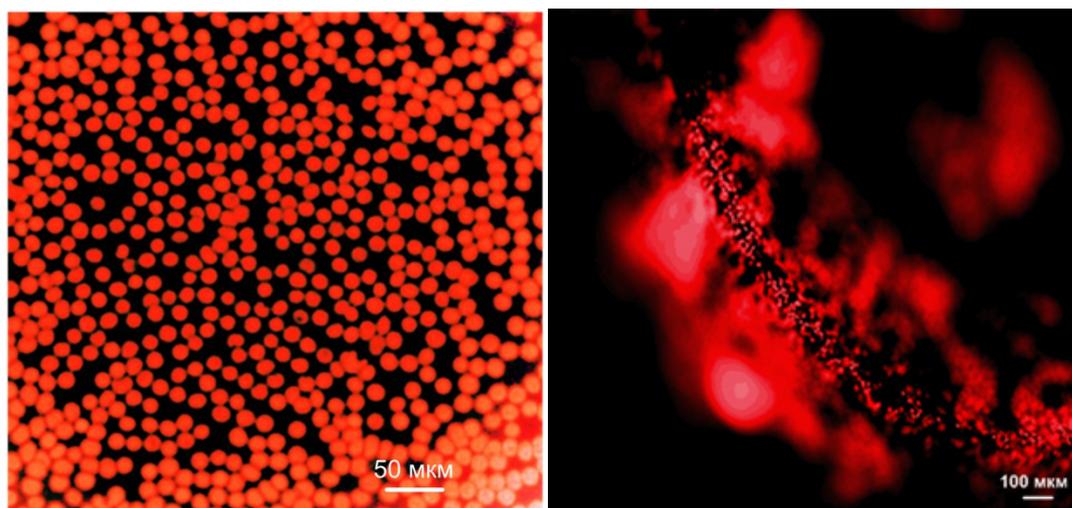


Рис. 34. Флуоресцентная микроскопия витально окрашенных «теней» эритроцитов на поверхности угля ФАС после его контакта с гемолизированной эритроцитарной массой. А – увеличение $\times 400$, Б – увеличение $\times 40$.

Эти данные показали, что среди исследованных углей наиболее эффективно удаляет «тени» эритроцитов из гемолизата уголь марки ФАС (до 97,0%), тогда как АГ-3, величина потенциала при разомкнутой цепи которого на 107 мВ положительнее по сравнению с величиной потенциала угля ФАС, удаляет всего 10,3% «теней» эритроцитов из гемолизата эритроцитов. Было обнаружено, что композит [АГ-3/ПП/СГ], имеющий значение величины потенциала при разомкнутой цепи 168 мВ сорбирует 15% «теней» эритроцитов, в то время как композит [СКТ-6А/ПП/СГ] с величиной потенциала при разомкнутой цепи 309 мВ практически не обладает адсорбционной активностью по отношению к «теням» эритроцитов (5,5 % убыли).

Поскольку диаметр эритроцитов, а, следовательно, и их теней составляет 6-8 мкм, имеют место стерические затруднения для адсорбции этих клеток в мезо- и микропорах активированных углей. Действительно, согласно классификации Дубинина [184], микро-, мезо- и макропоры имеют размеры менее 2 нм, от 2 нм до 50 нм и более 50 нм, соответственно. Из

экспериментально полученных микрофотографий поверхности угля видно, что тени эритроцитов адсорбированы на его поверхности, то есть, как и следовало ожидать, в макропорах (рис. 34). Величины распределения пор по размерам в исследуемых активированных углях приведены в таблице 9.

Таблица 9. - Распределение пор по размерам в исследуемых активированных углях (см³/г).

Марка угля Тип пор	СКТ-6А	АГ-3	ВСК-А	ФАС
Микро- Менее 2 нм	0,57-0,60	0,24-0,28	0,55-0,68	0,45-0,61
Мезо- 2-50 нм	0,15-0,25	0,08-0,1	0,15-0,28	0,39-0,59
Макро Более 50 нм	0,15-0,25	0,51-0,6	0,20-0,28	0,01-0,02

Для того чтобы оценить влияние покрытия активированных углей проводящим полимером, была исследована пористая структура пленки полипиррола с помощью метода эталонной контактной порометрии с применением воды в качестве измерительной жидкости. На рис. 35 и 36 приведены соответственно интегральная и дифференциальная кривые распределения пор по радиусам (в логарифмической шкале).

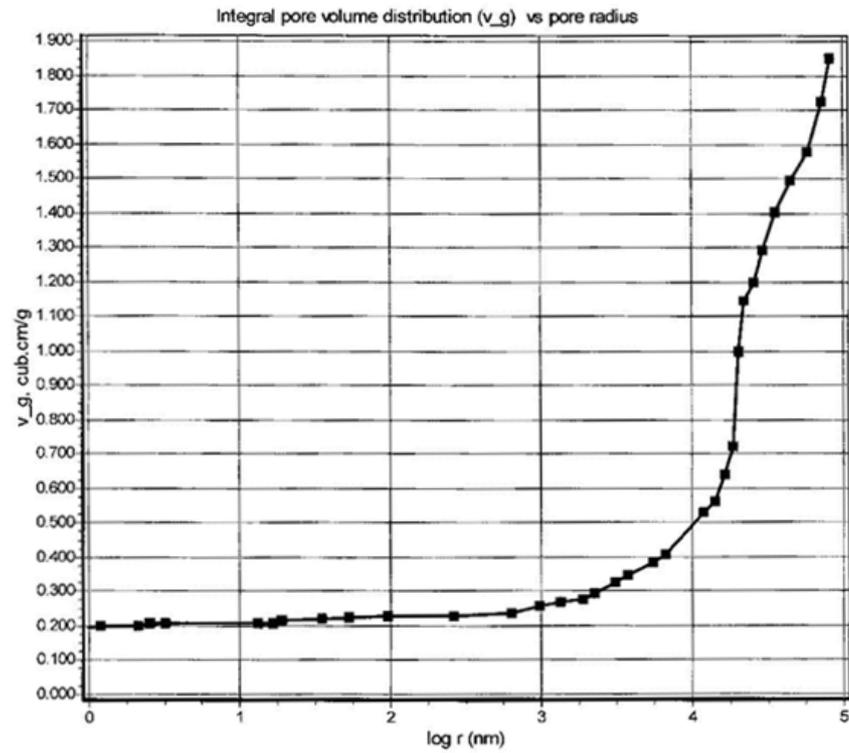


Рис. 35. Интегральная кривая распределения пор по радиусам для полипиррола.

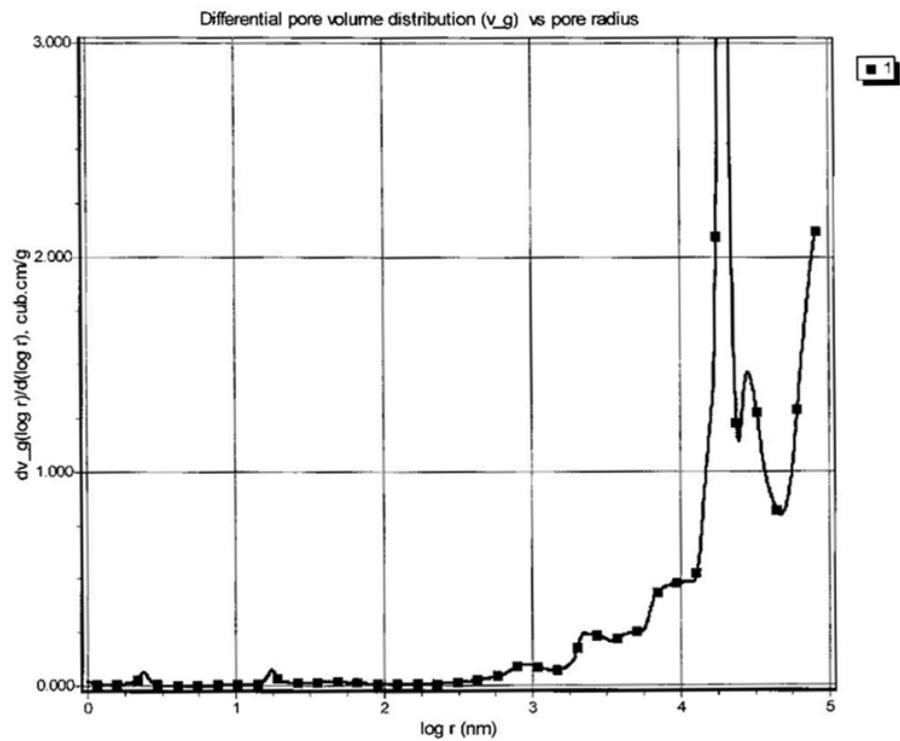


Рис. 36. Дифференциальная кривая распределения пор по радиусам для полипиррола.

Измерения проводились в диапазоне радиусов пор от 1 до 10^5 нм. Были получены следующие характеристики пористой структуры ПП: объем микропор - $0,198 \text{ см}^3/\text{г}$, объем мезопор - $0,029 \text{ см}^3/\text{г}$, объем макропор - $1,623 \text{ см}^3/\text{г}$, величина удельной поверхности $405 \text{ м}^2/\text{г}$.

Из этих данных можно было бы предположить, что сорбционная способность полипиррола по отношению к эритроцитам и «теням» эритроцитов должна определяться, в основном, макропорами.

Однако, представленные в таблице 8 данные об адсорбции «теней» эритроцитов углями СКТ-6А и АГ-3, покрытыми полипирролом, показывают, что, напротив, адсорбция «теней» снижается при покрытии указанных углей полипирролом. Таким образом, можно предположить, что при электрополимеризации пиррола на поверхности активированных углей происходит блокировка поверхностей указанных марок углей, что приводит к потере адсорбционной активности по отношению к «теням» эритроцитов.

Поскольку выявлено отрицательное влияние полипиррольного покрытия на величину адсорбции «теней» эритроцитов, дальнейшие исследования проводили на углях без полипиррольного покрытия.

В большинстве исследований адсорбционных явлений не учитывается электрохимическая сторона взаимодействий. Считается, что адсорбционная активность активированных углей определяется составом поверхностных соединений и порометрическими параметрами, то есть относительным вкладом микро- и мезопор [62]. Однако сравнение степени извлечения, количества макропор и потенциалов при разомкнутой цепи активированных углей (таблица 10) позволило сделать заключение о том, что потенциал при разомкнутой цепи углей играет ключевую роль в механизме адсорбции «теней» эритроцитов. Это заключение основано на нелогичности наблюдения того, что, несмотря на снижение специфического объема «работающих» пор, происходит значительное увеличение адсорбции (степени извлечения) «теней» эритроцитов. Важно, что при этом наблюдается увеличение

адсорбции при смещении величины потенциала при разомкнутой цепи угля в отрицательную область (в данном случае с 280 мВ до 121 мВ).

Таблица 10. - Факторы, влияющие на степень извлечения «теней» эритроцитов.

Марка угля \ Параметр	Средний объем макропор на мл, см ³	Степень извлечения «теней», %	ПРЦ, мВ
АГ-3	0,275	10,3	280
[АГ-3/ПП/СГ]	-	15,0	167
СКТ-6А	0,100	35,8	207
[СКТ-6А/ПП/СГ]	-	5,5	309
ВСК-А	0,125	83,5	156
ФАС	0,008	97,0	121

*ПРЦ – потенциал при разомкнутой цепи активированного угля

Несмотря на то, что «тени» эритроцитов могут адсорбироваться только в макропорах угля, это не означает увеличения эффективности их адсорбции при увеличении поверхности макропор. Кроме того, известно, что адсорбционная и биологическая активность активированных углей зависит не только от их структурных характеристик, но также и от состава поверхностных соединений [51]. Исходя из данных, представленных в таблице 10, была построена зависимость эффективности удаления «теней» эритроцитов от величин потенциала при разомкнутой цепи исследованных углей и от величин удельных объемов макропор углей (рис. 37).

Эти данные показали, что степень извлечения «теней» эритроцитов тем выше, чем меньше удельный объем макропор и чем отрицательнее величина потенциала при разомкнутой цепи. Данное явление может быть объяснено тем, что плотность заряда «теней» эритроцитов положительнее, чем у нормальных эритроцитов, поскольку известно, что заряд мембран

эритроцитов при травме и разрушении смещается в положительную область [185]. Поэтому увеличение степени извлечения «теней» при значительных отрицательных потенциалах может быть обусловлено электростатическим взаимодействием между «тенями» эритроцитов и активированными углями. Таким образом, полученные данные показали, что потенциал угля оказывает преобладающее влияние на процесс сорбции «теней» по сравнению с влиянием его структурных характеристик.

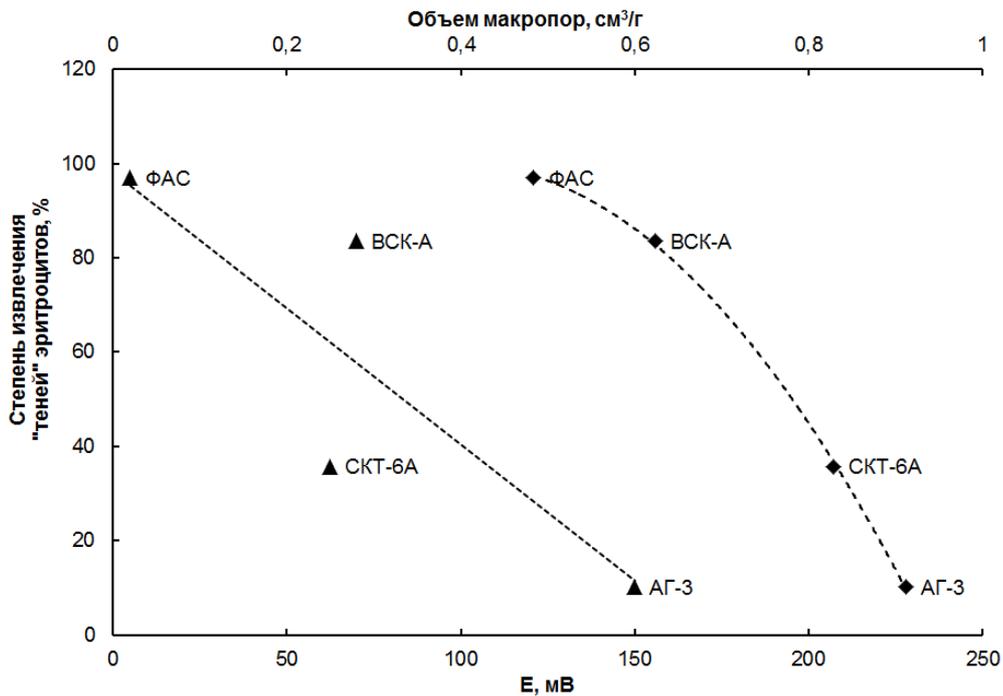


Рис. 37. Зависимости степени извлечения «теней» эритроцитов активированными углями от величин их потенциала при разомкнутой цепи (◆) и удельных объемов макропор (▲).

Сравнение адсорбционной активности исследованных образцов активированных углей позволило установить, что углеродный гемосорбент из активированного угля марки ФАС обладает наиболее высокой адсорбционной активностью по отношению к «теням» эритроцитов, поэтому было решено исследовать влияние величины его потенциала при разомкнутой цепи на степень извлечения «теней» эритроцитов из частично гемолизированной эритроцитарной массы.

На практике процедуре очистки от «теней» эритроцитов подвергаются биологические среды, содержащие не более 20-30% «теней» эритроцитов. Поэтому весьма важно подбирать углеродные сорбенты, способные эффективно адсорбировать «тени» эритроцитов, но при этом сохраняющие индифферентность по отношению к нормальным клеткам крови.

Исследование адсорбционной активности углеродного гемосорбента ФАС, модифицированного в диапазоне потенциалов от -460 до 290 мВ, по отношению к «теням» эритроцитов показало, что зависимость степени извлечения «теней» эритроцитов из частично гемолизированной эритроцитарной массы от потенциала угля отвечает зависимости, представленной на рис. 38.

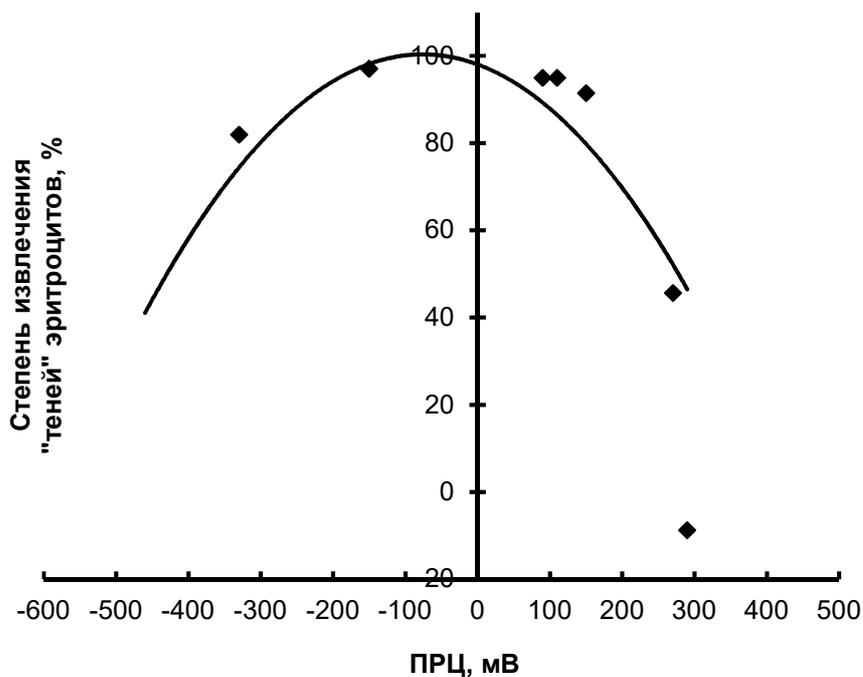


Рис. 38. Зависимость степени извлечения теней эритроцитов (%) от величины потенциала при разомкнутой цепи (ПРЦ) угля ФАС.

Как видно из данных, представленных на рис. 38, точка максимальной адсорбции «теней» эритроцитов соответствует потенциалу около -100 мВ. Отрицательная величина степени извлечения «теней» эритроцитов при потенциале 290 мВ указывает на то, что их содержание в анализируемом

образце увеличивается, то есть при указанном потенциале происходит разрушение эритроцитов.

На рис. 39 представлена микрофотография гемолизированной эритроцитарной массы после взаимодействия с углем ФАС при потенциале около 100 мВ, где можно видеть, что число «теней» эритроцитов резко снижено по сравнению с исходной гемолизированной эритроцитарной массой (рис. 33).

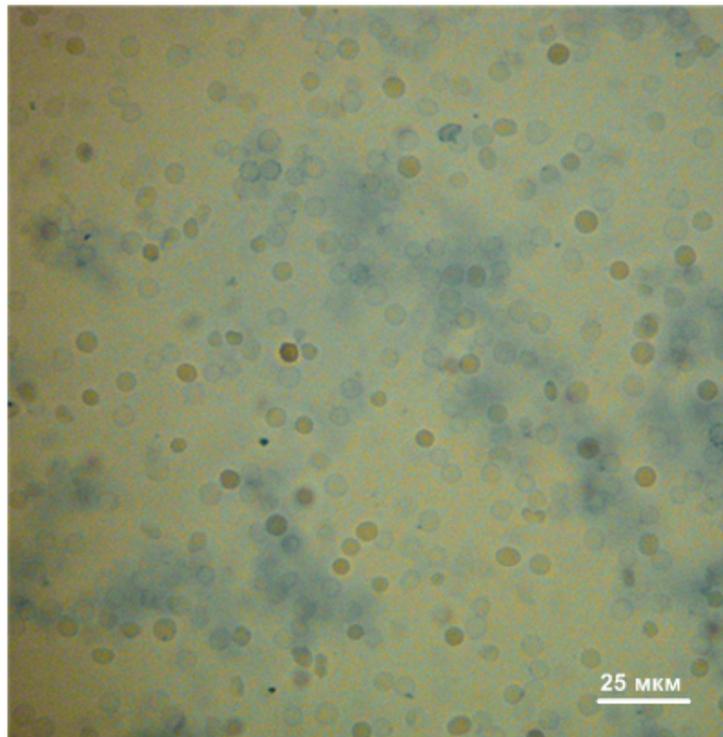


Рис. 39. Световая микроскопия витально окрашенных эритроцитов гемолизированной эритроцитарной массы после взаимодействия с углем ФАС при потенциале около 100 мВ. Увеличение $\times 400$.

Также была выявлена важная особенность при взаимодействии суспензии клеток с углем ФАС, поляризованным до потенциала, указанного выше - после контакта с поверхностью модифицированного угля в исследуемой пробе не было обнаружено конгломератов клеток, тогда как исходная гемолизированная эритроцитарная масса содержит такие конгломераты (рис. 33). Таким образом, происходил распад конгломератов на отдельные клетки, то есть происходила их стабилизация вероятно за счет

переноса части заряда с поверхности угля на поверхность клеток. Конгломерат распадался вследствие расталкивания клеток с отрицательным зарядом. Действительно, из литературных данных известно, что увеличение плотности отрицательного заряда на мембране клеток приводит к их стабилизации [31]. Данное наблюдение еще раз подтверждает предположение об электрохимическом взаимодействии мембран клеток с проводящими поверхностями.

В ранних исследованиях отмечалось [51], что активированные угли, обработанные в диапазоне потенциалов от -100 до 50 мВ являются индифферентными по отношению к клеткам крови. Таким образом, очевидно, что диапазон потенциалов угля ФАС, соответствующий, максимальной степени извлечения «теней» эритроцитов вполне приемлем для практического использования этого угля для удаления «теней» эритроцитов из крови.

После того, как были проведены эксперименты на модельных смесях частично гемолизированной эритроцитарной массы, где в качестве суспендирующей среды выступал физиологический раствор, было решено провести исследование влияния потенциала угля ФАС на эффективность удаления «теней» эритроцитов, а также на морфологическое состояние эритроцитов.

Так, было обнаружено, что взаимодействие образцов угля ФАС, модифицированных до различных величин потенциала при разомкнутой цепи, с эритроцитами, суспендированными в плазме крови может приводить к морфологическим изменениям клеток в зависимости от исходного потенциала угля. Как видно из данных, представленных в таблице 11, образцы угля ФАС, электрохимически модифицированные до потенциалов -617 мВ и 85 мВ, полностью адсорбируют имеющиеся в клеточной суспензии «тени» эритроцитов, уголь ФАС, модифицированный до потенциала 145 мВ, адсорбирует около половины «теней» эритроцитов, содержащихся в пробе, тогда как ФАС, модифицированный до потенциала 283 мВ, их не адсорбирует.

Образец ФАС, модифицированный до потенциала 371 мВ, не только не адсорбирует имеющиеся в клеточной суспензии «тени» эритроцитов, но и разрушает до 5% имеющихся в плазме эритроцитов. При этом отмечается изменение соотношения морфологических форм эритроцитов в пробе, т.е. происходит травмирование нормальных эритроцитов. Так, клеточная суспензия после контакта с этим образцом не имеет нормальных эритроцитов (0% против 40% в исходной плазме), увеличив при этом содержание эхиноцитов (90% против 55% в исходной плазме).

Таблица 11. - Морфометрический анализ эритроцитов до и после контакта плазмы, содержащей эритроциты, с модифицированными образцами активированного угля ФАС.

Тип образца	Распределение морфологических форм эритроцитов (в % от всей популяции)		
	Нормальные эритроциты (дискоциты)	Эхиноциты	«Тени» эритроцитов
Суспензия эритроцитов в плазме	40	55	5
ФАС E = -617 мВ	25	75	0
ФАС E = 85 мВ	32	68	0
ФАС E = 145 мВ	10	88	2
ФАС E = 283 мВ	1	94	5
ФАС E = 371 мВ	0	90	10

Важно также, что контакт эритроцитарной массы с углем ФАС при любом из потенциалов в диапазоне от -617 до 371 мВ приводит к деформации эритроцитов. Действительно, как видно из данных, приведенных в таблице 11, количество нормальных эритроцитов уменьшается после контакта угля с эритроцитами, причем минимальное травмирующее действие оказывает

на эритроциты уголь ФАС с потенциалом 85 мВ. Более того, минимальное количество эхиноцитов также наблюдается при контакте этого образца угля ФАС (85 мВ) с исходной клеточной суспензией, содержащей нормальные эритроциты.

Таким образом, контакт эритроцитов с углями, потенциал которых положительнее 280 мВ, приводит к разрушению клеток. Вероятно, гибель клеток в этом случае связана с электрохимическим характером взаимодействия с поверхностью активированного угля, то есть происходит перенос электронов с мембраны клетки на поверхность угля.

Итак, взаимодействие эритроцитов с углем ФАС, модифицированным до различных потенциалов, позволило выявить следующие особенности. Во-первых, обнаружена область потенциалов, соответствующая максимальной адсорбции «теней» эритроцитов. Во-вторых, оказалось, что в широкой области потенциалов имеет место активное взаимодействие эритроцитов с углем, что приводит либо к появлению деформированных форм эритроцитов (эхиноцитов), либо к гибели эритроцитов и образованию «теней». Однако, стоит отметить, что эхиноциты сохраняют основные свойства нормальных клеток [186]. Дополнительные эксперименты показали, что при контакте эритроцитарной массы с углем ФАС, поляризованным до потенциалов от 85 до 145 мВ, общее количество эритроцитов остается постоянным: количество клеток в исходной эритроцитарной массе составляло $4,19 \cdot 10^{12}$ кл/л, тогда как после часового контакта с углем при потенциале 85 мВ количество эритроцитов составило $4,26 \cdot 10^{12}$ клеток/л, а при потенциале 145 мВ - $4,24 \cdot 10^{12}$ кл/л. Разница $0,05 \cdot 10^{12}$ (около 1%) сопоставима с ошибкой измерения. Эти результаты свидетельствуют о том, что контакт эритроцитарной массы, не содержащей «теней» эритроцитов, с углем в указанном диапазоне потенциалов не приводит к образованию «теней» эритроцитов. Таким образом, можно говорить о перспективности

использования поляризованных активированных углей для отделения разрушенных клеток («теней» эритроцитов) от нормальных клеток.

Механизм разрушения клеток при их контакте с активированными углями является весьма важным для природы взаимодействия угля с эритроцитами. Эксперименты, проведенные на платиновом и стеклоуглеродном электродах, доказали, что при взаимодействии клеток крови с электропроводными материалами имеет место транспорт электронов между мембраной клеток и поверхностью электрода, сопровождающийся электрохимическим окислением или восстановлением функциональных групп на клеточной мембране. В то же время, данные, полученные на активированных углях, позволили обнаружить, что при взаимодействии клеток с поверхностью угля при определенных потенциалах могут происходить изменения их морфологии. Можно сделать вывод о том, что обнаруженные морфологические изменения обусловлены соударениями клеток крови с поверхностью активированного угля, сопровождающимися обменом зарядами между поверхностью угля и мембранами клеток. В простейшем случае, если поверхность угля и мембраны эритроцитов несут заряды одного знака, имеет место процесс образования эхиноцитов. Если же поверхность угля и мембраны эритроцитов несут разноименные заряды, имеет место более глубокое взаимодействие, вплоть до разрушения мембран клетки и образования «теней» (в наших экспериментах этот диапазон потенциалов положительнее 200 мВ). С другой стороны, известно, что морфология эритроцитов зависит от рН среды, в которой суспендированы клетки. Так, при подщелачивании или подкислении могут происходить морфологические переходы от нормальных эритроцитов к дегенеративным формам (обратимым или необратимым) [187-189]. В свою очередь, на рН среды могут влиять поверхностные соединения на поверхности активированных углей, состав и соотношение которых можно изменять путем электрохимической модификации. Эти поверхностные соединения могут так же влиять на адсорбционную активность углеродных материалов по

отношению к клеткам крови [51]. Сочетание этих факторов (плотность заряда на поверхности угля и состав поверхностных соединений) обуславливает время контакта клетки с поверхностью угля в процессе их соударения.

Важно отметить, что поверхность угля может иметь отрицательную плотность заряда не только в катодной области потенциалов, измеренных в настоящей работе относительно хлорсеребряного электрода сравнения, но также и в анодной области потенциалов относительно указанного электрода сравнения. Определение знака заряда поверхности угольных электродов является весьма сложной задачей и составляет отдельный предмет для исследования.

Для того чтобы получить подтверждение обоснованности представлений об обмене зарядами при соударении эритроцитов с поверхностью угля, были измерены потенциалы углей до и после их контакта с эритроцитарной массой. Оказалось, что в диапазоне потенциалов от -617 до 85 мВ контакт угля с эритроцитарной массой приводил к сдвигам в область более положительных потенциалов. Величины сдвигов потенциалов углей колебались от единиц милливольт до 10-15 мВ. Обнаруженные сдвиги потенциалов углей, также подтверждают существование переноса зарядов с поверхности угля на мембраны клеток крови при соударении клетки с углем.

Выводы:

1. С помощью поляризационных и микрокулонометрических измерений на платиновом и стеклоуглеродном электродах в суспензии эритроцитов и тромбоцитов обнаружено протекание электрохимических процессов, что является прямым доказательством транспорта электронов в системе электрод/клетка.
2. Протекание электрохимических процессов в суспензиях эритроцитов и тромбоцитов обнаружено как в катодной, так и в анодной областях потенциалов. Предположено, что транспорт электронов в системе электрод/клетка определяется соотношением плотностей заряда поверхности клеточной мембраны и чужеродной поверхности.
3. Установлены диапазоны потенциалов, где изменяется разность количества пропущенного электричества, требуемого для поддержания постоянного потенциала в фоновом электролите в отсутствие и присутствии клеток крови.
4. Микрокулонометрические измерения могут быть использованы для тестирования гемосовместимости материала, поскольку отсутствие изменений количества электричества при микрокулонометрии на платиновом и стеклоуглеродном электродах в суспензиях клеток крови свидетельствует об отсутствии взаимодействий в системе электрод/клетка.
5. Обнаружено влияние потенциала активированного угля на его адсорбционную активность по отношению к эритроцитам и «теням» эритроцитов, что можно использовать для разработки метода разделения нормальных эритроцитов и их «теней».
6. Разработан электрохимический метод определения морфофункционального статуса тромбоцитов с помощью измерения потенциала платинового электрода при разомкнутой цепи до и после их криодеструкции в плазме крови.

7. Предложен метод определения пригодности измерять плазме крови после хранения для оценки ее пригодности для переливания путем измерения величины потенциалов платинового электрода при разомкнутой цепи в указанной плазме.

Список литературы

1. Чизмаджев, Ю.А. Биоэлектрохимия: из прошлого в будущее / Ю.А. Чизмаджев // Соросовский образовательный журнал. - 2000. – Т. 6. - № 3. - С. 23.
2. Коган, А. Б. Электрофизиология / А.Б. Коган. – М: Высшая школа, 1969. – 367 с.
3. Berg, H. Historical roots of bioelectrochemistry / H. Berg // Cell. Mol. Life Sci. – 1980. – V. 36. – № 11. – P. 1247.
4. Walz, D. Bioelectrochemistry of cells and tissues / D. Walz, H. Berg, G. Milazzo. - Basel; Boston; Berlin: Birkhäuser, 2012. – 305 p.
5. Маркин, В.С. Физика нервного импульса / В.С. Маркин, В.Ф. Пастушенко, Ю.А. Чизмаджев // Успехи физ. наук. – 1977. – Т. 123. – № 2. – С. 289.
6. Bullock, T.H. Conduction and transmission of nerve impulses / T.H. Bullock // Ann. Rev. Physiol. - 1951. - V. 13. – P. 261.
7. Bezanilla, F. How membrane proteins sense voltage / F. Bezanilla // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. - 2008. - V. 9. - P. 323.
8. Gadsby, D.C. Ion channels versus ion pumps: the principal difference, in principle / D.C. Gadsby // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. - 2009. - V. 10. - P. 344.
9. Franco, R. Potential roles of electrogenic ion transport and plasma membrane depolarization in apoptosis / R. Franco, C.D. Bortner, J.A. Cidlowski // J. Membr. Biol. – 2006. - V. 209. - P. 43.
10. Ходжкин, А. Нервный импульс / А. Ходжкин. - М.: Мир, 1965. – 125 с.
11. Nordenström, B.E.W. Biologically closed electric circuits: Clinical, experimental and theoretical evidence for an additional circulatory system / B. Nordenström. – Stockholm: Nordic Medical Publications, 1983. – 358 p.
12. Nordenström, B.E.W. Survey of Mechanisms in Electrochemical treatment (ECT) of Cancer / B.E.W. Nordenström // Eur. J. Surg. – 1994. – V. 574. – P. 93.

- 13.Lao, Y.H. Electrochemical therapy for intermediate and advanced liver cancer: a report of 50 cases / Y.H. Lao, T.G. Ge, X.L. Zheng, J.Z. Zhang [et al.] // *Eur. J. Surg.* – 1994. – V. 574. – P. 51.
- 14.Борсуков, А.В. Электрохимический лизис метастазов печени под ультразвуковым контролем (возможности и перспективы) / А.В. Борсуков, А.В. Бельков, Р.А. Алибегов, А.С. Ефимкин [и др.] // *SonoAce-International.* – 2004. – № 12. – С. 25.
- 15.Jing-Hong, L. Electrochemical Therapy of Tumors / L. Jing-Hong, X. Yu Ling // *Conf. Papers Sci.* –2013. – V. 2013.
- 16.Hua-Ling, W. Electrochemical therapy of 74 cases of liver cancer / W. Hua-Ling // *Eur. J. Surg. Suppl.* – 1994. – № 574. – P. 55.
- 17.Slayman, C. L. Depolarization of the plasma membrane of *Neurospora* during active transport of glucose: evidence for a proton-dependent cotransport system / C.L. Slayman, C.W. Slayman // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1974. - V. 71 - P. 1935.
- 18.Slayman, C.L. Electrical properties of *Neurospora crassa*: Respiration and the intracellular potential / C.L. Slayman // *J. Gen. Physiol.* - 1965. - V. 49. - P. 93.
- 19.Slayman, C.L. Correlated changes in membrane potential and ATP concentrations / C.L. Slayman, C.Y. Lu, L. Shane // *Nature (London).* - 1970. - V. 226. - P. 274.
- 20.Abramson, H.A. The influence of a low electromotive force on the electrophoresis of lymphocytes of different ages / H.A. Abramson // *The J. Exp. Med.* – 1925. – V. 41. – № 4. – P. 445.
- 21.Abramson, H.A. The mechanism of the inflammatory process: I. The electrophoresis of the blood cells of the horse and its relation to leucocyte emigration / H.A. Abramson // *J. Exp. Med.* – 1927. – V. 46. – № 6. – P. 987.
- 22.Abramson, H.A. The mechanism of the inflammatory process: III. electrophoretic migration of inert particles and blood cells in gelatin sols and gels

- with reference to leucocyte emigration through the capillary wall / H.A. Abramson // *J. Gen. Physiol.* – 1928. – V. 11. – № 6. – P. 743.
23. Abramson, H.A. The electrophoresis of the blood platelets of the horse with reference to their origin and to thrombus formation / H.A. Abramson // *J. Exp. Med.* – 1928. – V. 47. – № 5. – P. 677.
24. Abramson, H.A. Electrokinetic phenomena. III The "isoelectric point" of normal and sensitized mammalian erythrocytes / H.A. Abramson // *J. Gen. Physiol.* – 1930. – V. 14. – № 2. – P. 163.
25. Abramson, H.A. Electrokinetic phenomena IV. A comparison of electrophoretic and streaming potentials / H.A. Abramson, E.B. Grossman // *J. Gen. Physiol.* – 1931. – V. 14. – № 5. – P. 563.
26. Abramson, H.A. Electrokinetic phenomena IX. Electrophoresis and electroosmosis / H.A. Abramson // *J. Gen. Physiol.* – 1932. – V. 16. – № 1. – P. 1.
27. Abramson, H.A. The electrophoretic mobility of rabbit erythrocytes and ghosts / H.A. Abramson, R.F. Furchgott, E. Ponder // *J. Gen. Physiol.* – 1939. – V. 22. – № 4. – P. 545.
28. Furchgott, R.F. Electrophoretic studies on human red blood cells / R.F. Furchgott, E. Ponder // *J. Gen. Physiol.* – 1941. – V. 24. – № 4. – P. 447.
29. Seaman, G.V.F. The surface chemistry of the erythrocyte and thrombocyte membrane / G.V.F. Seaman // *J. Supramol. Struct.* – 1973. – V. 1. – № 4-5. – P. 437.
30. Seaman, G.V.F. Changes in the electrokinetic properties of platelets during their aggregation / G.V.F. Seaman, P.S. Vassar // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1966. – V. 117. – № 1. – P. 10.
31. Харамоненко, С.С. Электрофорез клеток крови в норме и патологии / С.С. Харамоненко, А.А. Ракитянская. Минск: Беларусь, 1974. – 143 с.

32. Sawyer, P.N. The relationship between surface charge (potential characteristics) of the vascular interface and thrombosis / P.N. Sawyer // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1983. – V. 416. - № 1. – P. 561.
33. Sawyer, P.N. Electrochemical precipitation of human blood cells and its possible relation to intravascular thrombosis. / P.N. Sawyer, W.H. Brattain, P.J. Boddy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1964. - V. 51. – P. 428.
34. Sawyer, P.N. Electrochemical precipitation of blood cells on metal electrodes: an aid in the selection of vascular prostheses? / P.N. Sawyer, K.T. Wu, S.A. Weselowski, W.H. Brattain [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1965. - V. 53. – P. 294.
35. Sawyer, P.N. Electrochemical interactions at the endothelial surface / P.N. Sawyer, B. Stanczewski, W.S. Ramsey, Jr.N. Ramasamy [et al.] // *J. Supramol. Struct.* – 1973. – P. 417.
36. Sawyer, P.N. Electrochemical Aspects of Thrombogenesis – Bioelectrochemistry Old and New / P.N. Sawyer, S. Srinivasan, B. Stanczewski, N. Ramasamy [et al.] // *Electroanal. Chem.* – 1974. - V. 121. - № 7. – P. 221.
37. Srinivasan, S. Role of surface charge of the blood vessel wall, blood cells, and prosthetic materials in intravascular thrombosis / S. Srinivasan, P.N. Sawyer // *J Colloid Interface Sci.* – 1970. - V. 32. - № 3. – P. 456.
38. Sawyer, P.N. Relations of abnormal and injury electric potential differences to intravascular thrombosis. / P.N. Sawyer, J.W. Pate, C.S. Weldon // *Am. J. Physiol.* – 1953. - V. 175. - № 1. – P. 108.
39. Harshaw, D.H. Electrical potential difference across blood vessels. / D.H. Harshaw, H. Ziskind, R. Mazlen, P.N. Sawyer // *Circ. Res.* – 1962. - V. 11. – P. 360.
40. Sawyer P.N. Bio-electric phenomena as an etiologic factor in intravascular thrombosis / P.N. Sawyer, J.W. Pate // *Am. J. Physiol.* – 1953. - V. 175. - № 1. - P. 103

41. Duic, L. Electrochemical behavior of blood coagulation factors: Prothrombin and thrombin / L. Duic, S. Srinivasan, P.N. Sawyer // J. Electrochem. Soc. - 1973. - V. 120. - № 3. – P. 348.
42. Ramasamy, N. Electrochemical behavior of blood coagulation factors: Fibrinogen / N. Ramasamy, M. Ranganathan, L. Duic, S. Srinivasan [et al.] // J. Electrochem. Soc. - 1973. - V. 120. - № 3. – P. 354.
43. Sawyer, P.N. Electrochemistry of thrombosis – and aid in the selection of prosthetic materials / P.N. Sawyer, S. Srinivasan, P.S. Chopra, J.G. Martin [et al.] // Biomed. Mater. Res. – 1970. - V. 4. – P. 43.
44. Sawyer, P.N. Irreversible electrochemical precipitation of mammalian platelets and intravascular thrombosis / P.N. Sawyer, J.H. Reardon, J.C. Ogoniak // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1965. - V. 53. – P. 200.
45. Sawyer, P.N. The effect of various metal interfaces on blood and other living cells / P.N. Sawyer // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1968. – V. 146. – P. 49.
46. Sawyer, P.N. The role of electrochemical surface properties, in thrombosis at vascular interfaces: cumulative experience of studies in animals and man / P.N. Sawyer, S. Srinivasan // Bull. N.Y. Acad. Med. – 1972. – V. 48. - № 2. – P. 235.
47. Gileadi, E. Antithrombogenic characteristics, of cathodically polarized copper prostheses / E. Gileadi, B. Stanczewsky, A. Parmeggiani, T. Lucas // J. Biomed. Mater. Res. – 1972. – V. 6. - № 6. – P. 489.
48. Sawyer, P.N. Electrical potential differences across the normal aorta and aortic grafts of dogs / P.N. Sawyer, J.W. Pate // Am. J. Physiol. – 1953. - V. 175. - № 1. – P. 113.
49. Sawyer, P.N. Electrode-Biologic Tissue Interactions at Interfaces-A Review / P.N. Sawyer // Biomater. Med. Devices Artif. Organs – 1984. – V. 12. – № 3-4. – P. 161.
50. Ling, G. The membrane potential and metabolism of muscle fibers / G. Ling, R.W. Gerard // J. Cell. Comp. Physiol. – 1949. – V. 34. – № 3. – P. 413.

51. Goldin, M.M. Electrochemical Aspects of Hemosorption / M.M. Goldin, A.G. Volkov, Y.S. Goldfarb, M.M. Goldin // *J. Electrochem. Soc.* - 2006. - V. 153. - P. J91.
52. Гольдин, М.М. Влияние электрохимических характеристик сорбента на содержание форменных элементов крови при гемосорбции / М.М. Гольдин, Е.А. Лужников, И.М. Сулова // *Электрохимия* - 1980. - Т. 15. - С. 1667.
53. Allen, M.J. Electrochemical behaviour of blood. I. A voltammetric study of metabolizing erythrocytes / M.J. Allen // *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* - 1971. - V. 36. - P. 658.
54. Yamamoto, M. Electrochemical behaviors of sulfhydryl compounds in the presence of elemental mercury / M. Yamamoto, T. Charoenrak, H. Pan-Hou, A. Nakano [et al.] // *Chemosphere.* - 2007. - V. 69. - P. 534.
55. Gingell, D. Interaction of red blood cells with a polarized electrode / D. Gingell, J.A. Fornés // *Biophys. J.* - 1976. - V. 16. - P. 1131.
56. Gingell, D. Demonstration of intermolecular forces in cell adhesion using a new electrochemical technique / D. Gingell, J.A. Fornés // *Nature.* - 1975. - V. 256. - P. 210.
57. Godin, C. Effect of blood storage on erythrocyte/wall interactions: implications for surface charge and rigidity / C. Godin, A. Caprani // *Eur. Biophys. J.* - 1997. - V. 26. - № 2. - P. 175.
58. Godin, C. Interactions of erythrocytes with an artificial wall: influence of the electrical surface charge / C. Godin, A. Caprani // *Eur. Biophys. J.* - 1996. - V. 25. - № 1. - P. 25.
59. Godin, C. Electrochemical analysis of blood cell/substrate interactions under flow conditions / C. Godin, M. Violleau, A. Caprani // *Biorheology* - 1995. - V. 32. - № 5. - P. 571.
60. Yatzidis, H. Treatment of severe barbiturate poisoning / H. Yatzidis, S. Voudiclari, D. Oreopoulos, D. Triantaphyllidis [et al.] // *The Lancet* - 1965. - V. 286. - № 7405. - P. 216.

61. Yatzidis, H. A convenient haemoperfusion micro-apparatus over charcoal for the treatment of endogenous and exogenous intoxications. Its use as an effective artificial kidney / H. Yatzidis // Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc. – 1964. – V. 1. – P. 83.
62. Bansal, R.C. Activated carbon adsorption / R.C. Bansal, M. Goyal. – Boca Raton: CRC Press, 2005. – 520 p.
63. Dunea, G. Clinical experience with the Yatzidis charcoal artificial kidney / G. Dunea, W.J. Kolff // Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs. - 1965. - V. 11. - P. 178.
64. Dutton, R.C. A simple technique for the experimental production of acute platelet deficiency / R.C. Dutton, R.L. Dedrick // Bull B.S. Thromb. Diath. Haemorrh. - 1969. - V. 21. - P. 367.
65. Mikhalovsky, S.V. Biocompatibility of activated carbons / S.V. Mikhalovsky, T.A. Alexeeva, E.A. Fesenko, N.T. Kartel [et al.] // Extended Abstracts, Carbon. – 2001. – V. 2001.
66. Суровикин, В.Ф. Углеродные гемо- и энтеросорбенты на основе нанодисперсных углерод – углеродных материалов и использование их в медицине при критических состояниях. / В.Ф. Суровикин // Эфферентная терапия - 2008. – Т. 14. - № 1-2. – С. 4.
67. Mikhalovsky, S. Activated carbons in extracorporeal methods of medical treatment - Time to reactivate the idea? / S. Mikhalovsky // Symposium in Memory of Frank Derbyshire, ACS, Washington, DC, USA. – 2000.
68. Лопухин, Ю. М. Гемосорбция / Ю.М. Лопухин, М.Н. Молоденков. — М.: Медицина, 1978. – 302 с.
69. Chang, T.M. Semipermeable microcapsules / T.M. Chang // Science - 1964. V. 146. - P. 524.
70. Николаев, В.Г. Гемосорбция на активированных углях / В.Г. Николаев, В.В. Стрелко. - Киев: Наукова думка, 1979. – 288 с.

- 71.Тарасевич, М.Р. Электрохимически управляемая гемосорбция / М.Р. Тарасевич, М.М. Гольдин, Е.А. Лужников, В.А. Богдановская // Итоги науки и техн. ВИНТИ. Сер. Электрохимия. - 1990. - Т. 31. - С. 127.
- 72.Лужников, Е.А. Потенциал сорбента и сохранность форменных элементов крови / Е.А. Лужников, М.М. Гольдин, И.М. Сулова // Фармация - 1980. Т. 3. - С. 65.
- 73.Гольдин, М.М. К вопросу о влиянии потенциала сорбента на сорбцию токсических соединений / М.М. Гольдин, Е.А. Лужников // Электрохимия - 1979. - Т. 15. - С. 1419.
- 74.Лопухин, Ю.М. Подготовка и проведение эфферентных методов лечения (методическое пособие для врачей) / Ю.М. Лопухин. - СПб.: РЕНКОР, 1998. - 84 с.
- 75.Дементьева, И.И., Интраоперационное повышение концентрации свободного гемоглобина в плазме крови (гемолиз) в кардиохирургии / И.И. Дементьева, Ю.А. Морозов, М.А. Чарная // Анестезиология и кардиореанимация - 2008. - № 6. - С. 60.
- 76.Hamburger, J. Les accidents renaux postoperatives (analyse de 200 observation) / J. Hamburger // Presse méd. - 1960. - V. 68. - P. 279.
- 77.Nishiyama, T. Free hemoglobin concentrations in patients receiving massive blood transfusion during emergency surgery for trauma / T. Nishiyama, K. Hanaoka // Can. J. Anaesth. – 2000. – V. 47. – № 9. – P. 881.
- 78.Лужников Е.А. Клиническая токсикология / Е.А. Лужников, Г.Н. Суходулова. - М.: Медицина, 2008. – 576 с.
- 79.Rees, D.C., Sickle-cell disease / D.C. Rees, T.N. Williams, M.T. Gladwin // The Lancet – 2010. – V. 376. – № 9757. – P. 2018.
- 80.Cross, M.H. Autotransfusion in cardiac surgery / M.H. Cross // Perfusion – 2001. – V. 16. – № 5. – P. 391.
- 81.Sugiyama, M., Nagatsuma, Y. Method for absorbing free hemoglobin from blood: пат. 4952322 США. – 1990.

82. Хубутия М.Ш. и др. Адсорбция свободного гемоглобина электрохимически модифицированными активированными углями. Сообщение 2. Плазма крови / М.Ш. Хубутия, А.Ю. Цивадзе, Г.Р. Гараева, В.Н. Андреев, М.М. Гольдин // Макрогетероциклы - 2012. – Т. 5. – № 4-5. – С. 321.
83. Khubutiya, M.S. Adsorption of Free Hemoglobin by Electrochemically Modified Activated Carbons. Part 1. Aqueous Solutions / M.S. Khubutiya, A.Yu. Tsivadze, G.R. Garaeva, V.N. Andreev // Macroheterocycles – 2012. – V. 5. – № 4-5. – P. 321.
84. Khubutiya, M. Electrochemical Properties and Biological Activity of Carbon Materials Modified by Polypyrrole / M. Khubutiya, M. Goldin, A. Stepanov, P. Hall [et al.] // ECS Transactions – 2010. – V. 25. – № 19. – P. 33.
85. Khubutiya, M.S. The effect of electrochemically polymerized pyrrole on the physicochemical properties and biological activity of carbon materials / M.S. Khubutiya, M.M. Goldin, A.A. Stepanov, V.A. Kolesnikov [et al.] // Carbon – 2012. – V. 50. – № 3. – P. 1146.
86. Khubutiya, M.S. Adsorption interaction of individual hemoglobin with active carbon surface modified with polypyrrole / M.S. Khubutiya, A.Yu. Tsivadze, G.R. Garaeva, V.N. Andreev // Prot. Met. Phys. Chem. Surf. – 2013. – V. 49. – № 4. – P. 440.
87. Ahrland, S. The relative affinities of ligand atoms for acceptor molecules and ions / S. Ahrland, J. Chatt, N.R. Davies // Q. Rev. Chem. Soc. - 1958. - V. 12. – P. 265.
88. Пирсон Р.Д. Применение принципа жестких и мягких кислот и оснований в органической химии / Р.Д. Пирсон, И. Зонгстад // Успехи химии – 1969. – Т. 38. – № 7. – С. 1223.
89. Hoffman R., Hematology: Basic Principles and Practice / R. Hoffman, B. Furie, E. J. Benz, P. McGlave [et al.] – Philadelphia: Churchill Livingstone/Elsevier, 2009. - 2640 p.

90. Krysko, D.V. Phagocytosis of Dying Cells: From Molecular Mechanisms to Human Diseases / D.V. Krysko, P. Vandenabeele. - Springer Science + Business Media B.V., 2009. - 464 p.
91. Reilly R.Jr. Nephrology in 30 days / R.J. Reilly, M. Perazella - New York: McGraw-Hill Education-Europe, 2005. - 500 p.
92. Goldin, M.M. Redox potential measurement in aqueous solutions and biological media / M.M. Goldin, A.G. Volkov, M.S. Khubutiya, V.A. Kolesnikov [et al.] // ESC Transactions. – 2008. – V. 11. – P. 39.
93. Пат. 2497107
94. Goldin, M.M. Noninvasive Diagnosis of Dysfunctions in Patients After Organ Transplantation by Monitoring the Redox Potential of Blood Serum / M.M. Goldin, M.S. Khubutia, A.K. Evseev, M.M. Goldin [et al.] // Transplantation – 2015. – V. 99. – P. 1288.
95. Багоцкий, В.С. Основы электрохимии / В.С. Багоцкий. – М: Химия, 1988. – 400 с.
96. Filer, S. ORP Provides Versatile Water Treatment / S. Filer, M.M. Janick // Power Eng. - 1998. - V. 102. - № 11. - P. 50
97. McPherson, L.L. Understanding ORP's role in the disinfection process / L.L. McPherson // Water Eng. Manag. - 1993. - V. 140. - № 11. - P. 29.
98. Stella, D.F. Optimizing Disinfection Through Induction Mixing and ORP Control / D.F. Stella, T.A. Brunner, K.H. Vause // Water Environ. Technol. - 2005. - V. 17. - № 8. - P. 45.
99. Elek, S.D. Time-Lag in Eh Potentials/ S.D. Elek, E.S. Boatman // Nature - 1953. - V. 172. - P. 1056.
100. Stuart, L.S. The effect of Eh and sodium chloride concentration on the physiology of halophilic bacteria / L.S. Stuart, L.H. James // J. Bacteriol. – 1938. – V. 35 - № 4. – P. 381.

101. Прохоров, Г.Г. Методика редоксметрии в клинических исследованиях / Г.Г. Прохоров, А.М. Писаревский, И.Ю. Николаев // Вопросы медицинской химии – 1989. – Т. 35. – № 5. – С. 2.
102. Хубутя, М.Ш. Измерения потенциала платинового электрода в крови, плазме и сыворотке крови / М.Ш. Хубутя, А.К. Евсеев, В.А. Колесников, М.М. Гольдин, А.Д. Давыдов, А.Г. Волков, А.А. Степанов // Электрохимия - 2010. - Т. 46. - № 5. - С. 569.
103. Grosz, H.J. Reduction - Oxidation Potential of Blood as a Function of Partial Pressure of Oxygen / H.J. Grosz, B.V. Farmer // Nature - 1967. - V. 213. - № 5077. - P. 717.
104. Ziegler, E. The Redox Potential of the Blood in Vivo and in Vitro / E. Zigler. - Springfield: Charles C. Thomas Publ., 1965. - 196 p.
105. Кузнецова, И.Н. Динамика измеряемого окислительного потенциала в консервированной крови / И.Н. Кузнецова, А.А. Пендин // Биофизика - 1976. - Т. 31. - С. 867.
106. Kohen, R. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification / R. Kohen, A. Nyska // Toxicologic pathology. – 2002. – V. 30. – P. 620.
107. Ваграмян, Т.А. Потенциал платинового электрода при разомкнутой цепи в сыворотке крови для оценки эффективности лечения пациентов после трансплантации печени / Т.А. Ваграмян, А.К. Евсеев, И.В. Александрова, А.О. Чугунов А.О. [и др.] // Химическая промышленность сегодня – 2012. - № 10. - С.35.
108. Goldin, M.M. Assessment of hyperbaric oxygenation efficacy for treatment of acute cerebral pathology using electrochemical method / M.M. Goldin, M.V. Romasenko, A.K. Evseev // Neurokhirurgiya. – 2010. – V. 4. – P. 33.
109. Khubutiya, M. Redox potentials of blood serum in patients with acute cerebral pathology / M. Khubutiya, M. Goldin, M. Romasenko, A. Volkov [et al.] // ECS Transactions – 2010. – V. 25. – № 19. – P. 63.

110. Rael, L.T. Plasma oxidation-reduction potential and protein oxidation in traumatic brain injury / L.T. Rael, R. Bar-Or, C.W. Mains, D.S. Slone [et al.] // *J. Neurotrauma* – 2009. – V. 26. – № 8. – P. 1203.
111. Мазуров, А.В. Физиология и патология тромбоцитов / А.В. Мазуров. – М.: Литтерра, 2011. – 482 с.
112. Васильев, С.А. Структура и функции тромбоцитов / С.А. Васильев, В.Л. Виноградов, З.К. Карабудагова // *Гематология и трансфузиология* – 2010. – Т. 55. – №.5. – С. 4.
113. Michelson, A.D. Platelets, 3rd ed. / A.D. Michelson. - London: Academic Press, 2012. – 1353 p.
114. Макаров, М.С., Боровкова, Н.В., Кобзева, Е.Н., Высочин, И.В. Способ оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека и его применение в клинической практике / М.С. Макаров, Н.В. Боровкова, Е.Н. Кобзева, И.В. Высочин [и др.] // *Мед. Алфавит*. - 2012. - Т. 3. - С. 32.
115. Андреева, Н.Е., Парапротеинемические гемобластозы: Руководство по гематологии. Под ред. А.И. Воробьева / Н.Е. Андреева, Т.В. Балакирева. - М.: Ньюдиамед, 2003. - С. 151-184
116. Blennow, K. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease / K. Blennow, H. Hampel, M. Weiner, H. Zetterberg // *Nat. Rev. Neurol.* - 2010. - V. 6. - P. 131
117. Blair, P. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates / P. Blair, R. Flaumenhaft // *Blood Rev.* - 2009. - V. 23. - P. 177.
118. Sharathkumar, A.A. Platelet function disorders / A.A. Sharathkumar, A.Shapiro // *Treatment for Hemophilia*. - 2008. - № 19. - P. 1
119. Essex, D.W. Redox control of platelet function / D.W. Essex // *Antioxid. Redox Signal.* - 2009. - V. 11. - P. 1191.
120. Dooley, C.T. Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators / C.T. Dooley, T.M. Dore, G.T. Hanson, W.C. Jackson [et al.] // *J. Biol. Chem.* - 2004. - V. 279. - P. 22284.

121. Hanson, G.T. Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators / G.T. Hason, R. Aggeler, D. Oglesbee, M. Cannon [et al.] // *J. Biol. Chem.* - 2004. - V. 279. - P. 13044.
122. Jamieson, L.E. Simultaneous intracellular redox potential and pH measurements in live cells using SERS nanosensors / L.E. Jamieson, A. Jaworska, J. Jiang, M. Baranska [et al.] // *Analyst.* - 2015. - V. 140. - P. 2330.
123. Auchinvole, C.A.R. Monitoring intracellular redox potential changes using SERS nanosensors / C.A.R. Auchinvole, P. Richardson, C. McGuinness, V. Mallikarjun [et al.] // *ACS nano.* - 2011. - V. 6. - P. 888.
124. Jiang, J. Quantitative measurement of redox potential in hypoxic cells using SERS nanosensors / J. Jiang, C.A.R. Auchinvole, K. Fisher, C.J. Campbell // *Nanoscale.* - 2014. - V. 6. - P. 12104.
125. Билан, Д.С. Основные редокс-пары клетки / Д.С. Билан, А.Г. Шохина, С.А. Лукьянов, В.В. Белоусов // *Биоорг. химия.* - 2015. - Т. 41. - С. 385.
126. Go Y.M. Redox compartmentalization in eukaryotic cells / Y.M. Go, D.P. Jones // *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects.* - 2008. - V. 1780. - P. 1273.
127. Martinovich, G.G. Intracellular redox state: towards quantitative description / G.G. Martinovich, S.N. Cherenkevich, H. Sauer // *Eur. Biophys. J.* - 2005. - V. 34. - P. 937.
128. Мартинович Г.Г., Количественная характеристика редокс-состояния эритроцитов / Г.Г. Мартинович, И.В. Мартинович, С.Н. Черенкевич // *Биофизика.* - 2008. - Т. 53. - С. 618.
129. Чечеткин, А.В. / А.В. Чечеткин, В.В. Данильченко, М.Ш. Григорьян, А.Б. Макеев // *Трансфузиология* - 2015. - № 1. - С. 4.
130. Рагимов А.А. Инфузионно-трансфузионная терапия. М: ГЭОТАР-Медиа. 2010. 235 с.
131. Жибурт, Е.Б. Трансфузиология: учебник / Е.Б. Жибурт. - Спб: «Питер», 2002. - 736 с.

132. Joint UKBTS/HPA Professional Advisory Committee. Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom, 8th Ed. L: Stationery Office, 2013. - 414 p.
133. Гомеостаз под ред. П. Д. Горизонтова. - М.: Медицина, 1976. - 464 с
134. Покровский, В.М. Физиология человека / В.М. Покровский, Г.Ф. Коротько. – М: Медицина, 2003. – 656 с.
135. Боровская, М.К. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменения при патологиях разного генеза / М.К. Боровская, Э.Э. Кузнецова, В.Г. Горохова, Л.Б. Корякина [и др.] // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН – 2010. – № 3. – С. 334.
136. Howard, L. Human blood cells. Lymphocyte. [Electronic resource] / L. Howard // Dartmouth College. Electron microscope facility. – Режим доступа: http://remf.dartmouth.edu/Blood_cells_SEM/.
137. Wortis, M. Stomatocyte – discocyte - echinocyte sequence of the human red blood cell: Evidence for the bilayer–couple hypothesis from membrane mechanics / M. Wortis, R. Mukhopadhyay // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2002. – V. 99. – № 26. – P. 16766.
138. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, Л.Г. Рем. - М: Мир, 2004. – 469 с.
139. Jamieson, G.A. Mammalian Cell Membranes: Volume 2: The Diversity of Membranes / G.A. Janieson, D.M. Robinson D. M. – London: Butterworths, 2014. – 376 p.
140. Dolowy, K. Bioelectrochemistry of cell surfaces / K. Dolowy // Prog. Surf. Sci. – 1984. – V. 15. – № 3. – P. 245.
141. Jurk, K. Platelets: physiology and biochemistry / K. Jurk, B.E. Kehrel // Semin. Thromb. Hemost. – 2004. – V. 31. – № 4. – P. 381.
142. White, J.G. Platelet structure / J.G. White // Platelets. – 2013. – P. 117.
143. Vesterberg, O. A short history of electrophoretic methods / O. Vesrterberg // Electrophoresis – 1993. – V. 14. – № 1. – P. 1243.

144. Fernandes, H.P. Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation / H.P. Fernandes, C.L. Cesar, M.L. Barjas-Castro // *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* – 2011. – V. 33. – № 4. – P. 297.
145. Seaman, G.V.F. The surface chemistry of the erythrocyte and thrombocyte membrane / G.V.F. Seaman // *J. Supramol. Struct.* – 1973. – V. 1. – № 4-5. – P. 437.
146. Seaman, G.V.F. Changes in the electrokinetic properties of platelets during their aggregation / G.V.F. Seaman, P.S. Vassar // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1966. – V. 117. – № 1. – P. 10.
147. Seaman, G.V.F. Electrochemical properties of peripheral zone of erythrocytes / G.V.F. Seaman // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1983. – V. 416. – № 1. – P. 176.
148. Boisseau, M.R. Change in electrophoretic mobility associated with the shape change of human blood platelets / M.R. Boisseau // *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci.* – 1977. – P. 471.
149. Hsu, J.P. Effect of cell membrane structure of human erythrocyte on its electrophoresis / J.P. Hsu, S.H. Lin, S. Tseng // *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* – 2003. – V. 32. – № 3. – P. 203.
150. Durovic, A.D., A comparison of different methods to remove dissolved oxygen: application to the electrochemical determination of imidacloprid / A.D. Durovic, Z.S. Stojanovic, S.Z. Kravic, Z.J. Suturovic [et al.] // *Acta Periodica Technologica.* – 2015. – V. 46. – P. 149.
151. Симонян, К.С. Посмертная кровь в аспекте трансфузиологии / К.С. Симонян, К.П. Гутионтова, Е.Г. Цуринова. – М.: Медицина, 1975. – 271 с.
152. Lawson, W.H. Effect of temperature on deoxygenation rate of human red cells / W.H. Lawson, R.A.B. Holland, R.E. Forster // *Journal of Applied Physiology.* – 1965. – V. 20 – P. 912.
153. Mochizuki, M. On the velocity of oxygen dissociation of human hemoglobin and red cell / M. Mochizuki // *The Japanese Journal of Physiology.* – 1996. – V. 16 – P. 649.

154. Возная, Н.Ф. Химия воды и микробиология: учеб. пособие для вузов / Н.Ф. Возная. – М.: Высшая школа, 1979. – 340 с.
155. Назаренко, Г.И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г.И. Назаренко, А.А. Кишкун. – М: Медицина, 2002. – 541 с.
156. Ленинджер, А. Основы биохимии: в 3-х томах. Том 1. / А. Ленинджер. — М.: Мир, 1985. — 367 с.
157. Goldin, M. M. Open circuit potential shifts of activated carbon in aqueous solutions during chemical and adsorption interactions / M.M. Goldin, V.A. Kolesnikov, M.S. Khubutiya, A.G. Volkov [et al.] // J. Appl. Electrochem. – 2008. – V. 38. – № 10. – P. 1369.
158. Goldin, M. Mechanism of copper and tert-butyl alcohol adsorption on carbon material at various open-circuit potentials / M. Goldin, M.S. Khubutiya, B.M. Grafov, A.D. Davydov [et al.] // ESC Transactions. – 2011. – V. 35. – P. 9.
159. Volfkovich, Yu.M. The standard contact porosimetry / Yu.M. Volfkovich, V.S. Bagotsky, V.E. Sosenkin, I.A. Blinov // Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp. - 2001. - V. 187. - P. 349.
160. Seaman, G.V.F. Electrochemical features of platelet interaction / G.V.F. Seaman // Thromb. Res. – 1976. - V. 8. – P. 235.
161. Han, P. and The influence of pH, temperature and calcium on platelet aggregation: maintenance of environmental pH and platelet function for in vitro studies in plasma stored at 37°C / P. Han, N.G. Ardlie // Brit. J. Haematol. – 1974. – V. 26. – P. 373.
162. Kattlove, H.E. The effect of cold on platelets. I. cold-induced platelet aggregation / H.E. Kattlove, B. Alexander // Blood. – 1971. - V. 38. - № 1. - P. 39.
163. Макаров, М.С. Применение витального окрашивания для морфофункционального анализа тромбоцитов человека короткого

- хранения / М.С. Макаров, Е.Н. Кобзева, И.В. Высочин, Н.В. Боровкова [и др.] // Альманах клинической медицины – 2014. – № 30. – С.83.
164. Кост, Е.А. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / Е.А. Кост. – М.: Медицина, 1975. – 360 с.
165. Макаров, М.С. Флюоресценция в исследовании клеток: пути и возможности / М.С. Макаров // Молекулярная медицина. – 2013. - № 4. – С. 10.
166. Divisek, J. Electrochemical generation and reactivity of the superoxide ion in aqueous solutions / J. Divisek, B. Kastening // J. Electroanal. Chem. - 1975. - V. 65. № 2. - P. 603.
167. Van der Linden, W.E. Glassy carbon as electrode material in electroanalytical chemistry / W.E. Van der Linden, J.W. Dieker // Anal. Chim. Acta – 1980. – V. 119. – № 1. – P. 1.
168. Fritz, O.G. Anomalous diffusion of erythrocytes in the presence of polyvinylpyrrolidone // O.G. Fritz, Jr. // Biophys. J. – 1984. – V. 46. – P. 219.
169. Turitto, V.T. Platelet diffusion in flowing blood / V.T. Turitto, A.M. Benis, E.F. Leonard // Ind. Eng. Chem. Fundam. – 1972. – V. 11. – P. 216.
170. Phillies, G.D.L. Interpretation of micelle diffusion coefficients / G.D.L. Phillies // J. Colloid Interface Sci. – 1982. – V. 86. – P. 226.
171. Фридрихсберг, Д.А. Курс коллоидной химии. Учеб. Для вузов // Д.А. Фридрихсберг. – Л.: Химия, 1984. – 368 с.
172. Steck, T.L. The organization of proteins in the human red blood cell membrane / T.L. Steck // J. Cell. Biol. – 1974. – V. 62. – P.1.
173. Лещенко, В.Г. Медицинская и биологическая физика: учеб. пособие / В.Г. Лещенко, Г.К. Ильич. – Минск: Новое знание, М.: ИНФРА-М, 2012. – 552 с.
174. Khubutiya, M.S. Effective numbers of electrons as characteristic of adsorption processes on perfectly polarizable electrode hemosorbents / M.S. Khubutiya,

- B.M. Grafov, M.M. Goldin, G.R. Garaeva [et al.] // *J. Solid State Electrochem.* – 2012. – V. 16. – P. 3505.
175. Cecil, R. The electroreduction of the disulphide bonds of insulin and other proteins / R. Cecil, P.D.J. Weitzman // *Biochem. J.* - 1964. - V. 93. - P. 1.
176. Jan, K.M. Role of surface electric charge in red blood cell interactions / K.M. Jan, S. Chien // *J. Gen. Physiol.* – 1973. - V. 61. – P. 638.
177. Багоцкий, В.С., Химические источники тока / В.С. Багоцкий, А.М. Скундин. – М.: Энергоиздат, 1981. - 360 с.
178. Conway, B.E. *Electrochemical Supercapacitors: Scientific Fundamentals and Technological Applications* / B.E. Conway. – New York: Springer Science + Business Media, 1999. – 698 p.
179. Brabec, V. Electrochemical behavior of proteins at graphite electrodes. I. Electrooxidation of proteins as a new probe of protein structure and reactions. / V. Brabec, V. Mornstein // *Biochim. Biophys. Acta* – 1980. – V. 625. – P. 43.
180. Frew, J.E. Direct and indirect electron transfer between electrodes and redox proteins / J.E. Frew, H.A. Hill // *Eur. J. Biochem.* – 1988. – V. 172. – P. 261.
181. Макаров, М.С. Морфофункциональный анализ тромбоцитов человека с помощью витального окрашивания / М.С. Макаров, Е.Н. Кобзева, И.В. Высочин, Н.В. Боровкова [и др.] // *Бюл. exper. биол. мед.* - 2013. - Т. 156. - № 9. - С. 388.
182. Khubutiya, M.S. Development of diagnostic criteria of rejection crises in liver transplantation by redox potential measurements / M.S. Khubutiya, M.M. Goldin, A.K. Evseev, A.V. Zhao [et al.] // *Transactions* - 2011. - V. 35. - P. 45.
183. Гольдин, М.М. Определение эффективности использования гипербарической оксигенации при острой церебральной патологии с помощью электрохимической методики / М.М. Гольдин, М.В. Ромасенко, А.К. Евсеев, О.А. Левина [и др.] // *Нейрохирургия.* - 2010. - № 4. - С. 33.
184. Дубинин, М.М. Поверхность и пористость адсорбентов / М.М. Дубинин // *Успехи химии.* – 1982. – Т. 51. – С.1065.

185. Кручинина, С.А. Электрические параметры и структура мембран эритроцитов при диффузных заболеваниях печени / С.А. Кручинина, М.В. Курилович, В.М. Генералов, Т.С. Бакиров [и др.] // РЖГГК. – 2009. – Т. 19. № 2. – С. 30.
186. Bain, B.J. Dacie and Lewis Practical Haematology / B.J. Bain, I. Bates, M.A. Laffan, S.M. Lewis. – London: Churchill Livingstone, 2011. – 668 p
187. Rasia, M. Red blood cell shape as a function of medium's ionic strength and pH / M. Rasia, A. Bollini // Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes. – 1998. – V. 1372. – № 2. – P. 198.
188. Gedde, M. Resolution of the paradox of red cell shape changes in low and high pH / M. Gedde, E. Yang, W.H. Huestis // Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes. – 1999. – V. 1417. – № 2. – P. 246
189. Kuzman, D. Effect of pH on red blood cell deformability / D. Kuzman, T. Žnidarčič, M. Gros, S. Vrhovec // Pflügers Arch. – E. J. Physiol. - 2000. – V. 440. – № 1. – P. R193.