

КОНФОРМАЦИОННЫЕ НАРУШЕНИЯ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ В ПРОЦЕССЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ ЭРИТРОЦИТНОЙ ВЗВЕСИ

Сергунова В. А.^{1*}, Кузовлев А. Н.¹, Онуфриевич А. Д.², Иноземцев В. А.¹, Гудкова О. Е.¹, Шерстюкова Е. А.¹

¹Научно-исследовательский институт общей реаниматологии имени В.А. Неговского Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии (ФНКЦ РР), 107031, Москва, Россия

²ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства обороны Российской Федерации, 105229, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Эритроцитная взвесь (ЭВ) является наиболее востребованным компонентом крови для гемотрансфузий. Хранение эритроцитов в условиях банка крови вызывает нарушение молекулярной структуры мембран длительно хранящихся эритроцитов, что может повлиять на качество и безопасность переливаемых эритроцитов.

Цель — анализ динамики патологических изменений морфологии, наноструктуры, сети цитоскелета и механических свойств мембран эритроцитов в процессе длительного хранения ЭВ, а также связь этих изменений со сроком хранения.

Материалы и методы. Герметичные пакеты ЭВ с антикоагулянтом CPD в ресуспендирующем растворе SAGM хранили в течение 42 дней при температуре +4 °С. Образцы отбирали на 3, 12, 19, 21, 24, 28, 35 и 42-е сутки хранения и получали изображения морфологии, наноструктуры, цитоскелета с помощью атомно-силовой микроскопии. Модуль Юнга использовали для оценки жесткости мембран нативных клеток, используя атомно-силовую спектроскопию.

Результаты. По мере хранения ЭВ морфология клеток изменялась. После 20–24 дней хранения происходила необратимая трансформация дискоцитов в эхиноциты, сфероэхиноциты и другие формы клеток. В процессе хранения ЭВ на поверхности мембраны эритроцитов возникали топологические дефекты в виде доменов с зернами, конфигурация сети цитоскелета претерпевала структурные изменения, увеличивался модуль Юнга.

Выводы. В процессе длительного хранения ЭВ (до 42 суток, 4 °С, CPD/SAGM) молекулярная структура эритроцитов подвергается необратимым нарушениям. Эти изменения наступают после 20–24 суток хранения.

Ключевые слова: эритроциты, морфология, наноструктура, цитоскелет, жесткость мембраны, хранение эритроцитной взвеси

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Сергунова В.А., Кузовлев А.Н., Онуфриевич А.Д., Иноземцев В.А., Гудкова О.Е., Шерстюкова Е.А. Конформационные нарушения мембран эритроцитов в процессе длительного хранения эритроцитной взвеси. Гематология и трансфузиология. 2022; 67(2): 181–192. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2022-67-2-181-192>

CONFORMATIONAL DISORDERS OF RBC MEMBRANES DURING LONG-TERM STORAGE

Sergunova V. A.¹, Kuzovlev A. N.¹, Onufrievich A. D.², Inozemtsev V. A.¹, Gudkova O. E.¹, Sherstyukova E. A.¹

¹"V.A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology" of the Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, 107031, Moscow, Russian Federation

²"Main Military Clinical Hospital named after N.N. Burdenko" of the Ministry of Defense of the Russian Federation, 105094, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. Packed red blood cells (pRBCs) are the most required component of blood used for transfusion. Storage of erythrocytes in blood bank conditions causes a disruption of the molecular structure of long-stored pRBC membranes. This "disruption" can affect the quality and safety of transfused red blood cells.

Aim — to analyze the dynamics of pathological changes in the morphology, nanostructure, cytoskeleton network, and mechanical properties of RBC membranes during long-term storage of pRBCs, and the relationship of these changes with storage time.

Materials and methods. Hermetic bags of pRBCs with anticoagulant CPD in resuspending solution SAGM were stored for 42 days at +4 °C. Samples were taken on days 3, 12, 19, 21, 24, 28, 35, and 42 of storage and images of morphology, nanostructure, and cytoskeleton were obtained by atomic force microscopy. Young's modulus was used to assess the stiffness of native cell membranes using atomic force spectroscopy.

Results. During storage of pRBCs, their cell morphology changed. After 20–24 days of storage an irreversible transformation of discocytes into echinocytes, spherocytocytes and other cell forms occurred. It was found that during storage of pRBCs, topological defects in the form of domains with grains appeared on the surface of RBC membranes, the configuration of the cytoskeleton network transformed structurally, and the Young's modulus increased.

Conclusions. During long-term storage of pRBCs (up to 42 days, 4 °C, CPD/SAGM) the molecular structure of RBCs undergoes irreversible disorders. These changes occur, as a rule, after 20–24 days of storage.

Keywords: RBC, morphology, nanostructure, cytoskeleton, stiffness, storage of pRBCs

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Financial disclosure: the study had no sponsorship.

For citation: Sergunova V.A., Kuzovlev A.N., Onufrievich A.D., Inozemtsev V.A., Gudkova O.E., Sherstyukova E.A. Conformational disorders of RBC membranes during long-term storage. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2022; 67(2): 181–192. (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2022-67-2-181-192>

Введение

Эритроцитная взвесь (ЭВ) является наиболее востребованным продуктом для гемотрансфузий. Показания к трансфузиям ЭВ включают симптоматическую анемию, острую кровопотерю, с целью восстановления доставки кислорода тканям. Проблема сохранения качества хранящихся эритроцитов и экономические показатели заготовки донорской крови являются весьма

актуальными. Ежегодно в мире заготавливают около 118,5 млн единиц ЭВ [1], из них ежегодно в России — 2 млн единиц.

Согласно современным протоколам [2, 3], эритроциты для переливания получают путем центрифугирования цельной крови с последующим удалением плазмы и лейкоцитомбоцитного слоя. После разделения цель-

ной крови на компоненты добавляют взвешивающие растворы, обеспечивающие поддержание жизнеспособности эритроцитов в условиях, отличающихся от физиологических. В 1981 г. была разработана первая современная добавка, содержащая 0,9%-ный раствор хлорида натрия, аденин-глюкозу и маннит (SAGM). Это позволило хранить ЭВ до 6 недель при температуре от +4 до +6 °С. Современные добавочные растворы, например PAGGSM, позволяют сохранять эритроциты до 49 дней [4]. Существуют также взвешивающие растворы SOLX [5] или ESOL5 [6], которые способствуют подщелачиванию внутриклеточного pH и позволяют сохранять ЭВ до 56 дней [7].

Несмотря на то что в рандомизированных клинических исследованиях не было установлено различий в смертности при переливании «молодых» и «старых» образцов ЭВ [8–10], в ряде работ показано, что такие осложнения, как повышенная восприимчивость к инфекциям, острое повреждение легких, нарушение гемостаза, увеличение частоты пневмонии возникают, когда реципиенту переливают ЭВ, хранящуюся при 4 °С более 19–21 дней [11–16]. Тем не менее прямое влияние качества эритроцитов на состояние здоровья человека остается неясным.

В ЭВ по мере ее хранения развиваются патологические процессы в эритроцитах. Физико-химическая природа патогенного фактора — свободные радикалы, вызывающие оксидативный стресс. В результате меняется морфология эритроцитов [17], нарушается ионная проницаемость мембран [18], уменьшается концентрация 2,3-дифосфоглицерата, образуются поры в липидном бислое, возникает везикуляция [19]. Однако молекулярные механизмы «старения» эритроцитов изучены недостаточно. Неясно, в чем состоят патофизиологические отличия «молодой» от «старой» ЭВ, какова причина старения эритроцитов, каковы механизмы такого старения, какие изменения происходят в мембранах и цитоскелете эритроцитов. Поэтому исследования, отвечающие на эти вопросы, являются весьма актуальными.

Цель настоящей работы — анализ динамики патологических изменений морфологии, наноструктуры, сети цитоскелета и механических свойств мембран эритроцитов в процессе длительного хранения ЭВ, а также связь этих изменений со сроком хранения.

Материалы и методы

Характеристики ЭВ

Шесть пакетов ЭВ разных групп крови были получены в клинических центрах переливания крови г. Москвы. ЭВ хранилась с антикоагулянтом CPD в ресуспендирующем растворе SAGM, при температуре +4 °С, гематокрит составлял 55–62%. Забор образцов для проведения экспериментов *in vitro* проводили на 3, 12, 19, 21, 24, 28, 35, 42-е дни хранения. Образцы ЭВ

отбирались из пакетов с гемоконсервантом без нарушений их целостности, с сохранением герметичности.

Схема эксперимента

Эксперимент проводился по схеме, представленной на рисунке 1. На первом этапе в контрольные дни хранения из пакета с ЭВ отбирали пробу 13 мл. Полученный образец помещали в термостат на 30 мин для достижения температуры +20 °С. Затем удаляли остатки консервирующего раствора перед проведением каждого исследования. Следующим этапом было проведение различных опытов. Исследовались морфология, наноструктура мембран эритроцитов, изменения сети цитоскелета и жесткость мембран. Были проведены биохимические анализы и анализы кислотно-основного состояния эритроцитов во время хранения ЭВ. Такую схему экспериментов применяли для каждого из 6 пакетов с ЭВ.

Получение монослоя эритроцитов

100 мкл ЭВ центрифугировали при 3000 оборотов в течение 5 минут на центрифуге Universal 320 (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Германия). Удаляли надосадочный слой и из осадка приготавливали мазок с помощью специального устройства V-sampler (Vision Microscopy, Австрия).

Получение цитоскелета

Для получения изображений цитоскелета и его отдельных фрагментов формировали тени эритроцитов. Подготовку образца проводили в несколько этапов. На первом этапе удаляли компоненты раствора, в котором находились эритроциты во время их хранения. Для этого к 100 мкл ЭВ добавляли 500 мкл фосфатно-солевого буфера pH 7,4. Эту суспензию перемешивали на мини-ротаторе «Bio RS-24» (Biosan, Латвия) со скоростью 8 об./мин в течение 5 мин. Вторая стадия — осаждение клеток. Для этого суспензию центрифугировали при 1500 об./мин в течение 5 мин. Убирали надосадочную жидкость. В осадок с эритроцитами добавляли 500 мкл буфера. Процесс перемешивания и осаждения повторяли 5 раз. После этого оставалось 75 мкл осажденных клеток. Следующая стадия — гемолиз полученных эритроцитов. Для этого к клеткам добавляли 500 мкл гипотонического раствора 0,09% NaCl в дистиллированной воде. Полученную суспензию центрифугировали при 3000 об./мин 5 мин. Затем убирали надосадочную жидкость. В завершающей стадии полученный образец помещали на 30 мин в холодильник при +4 °С, после чего смесь выдерживали в течение 10 мин при +20 °С. В полученном образце формировались тени эритроцитов. Из осадка был приготовлен монослой на устройстве V-Sampler для сканирования его на АСМ.

Атомно-силовая микроскопия

Изображения клеток и цитоскелета были получены с использованием атомно-силового микроскопа

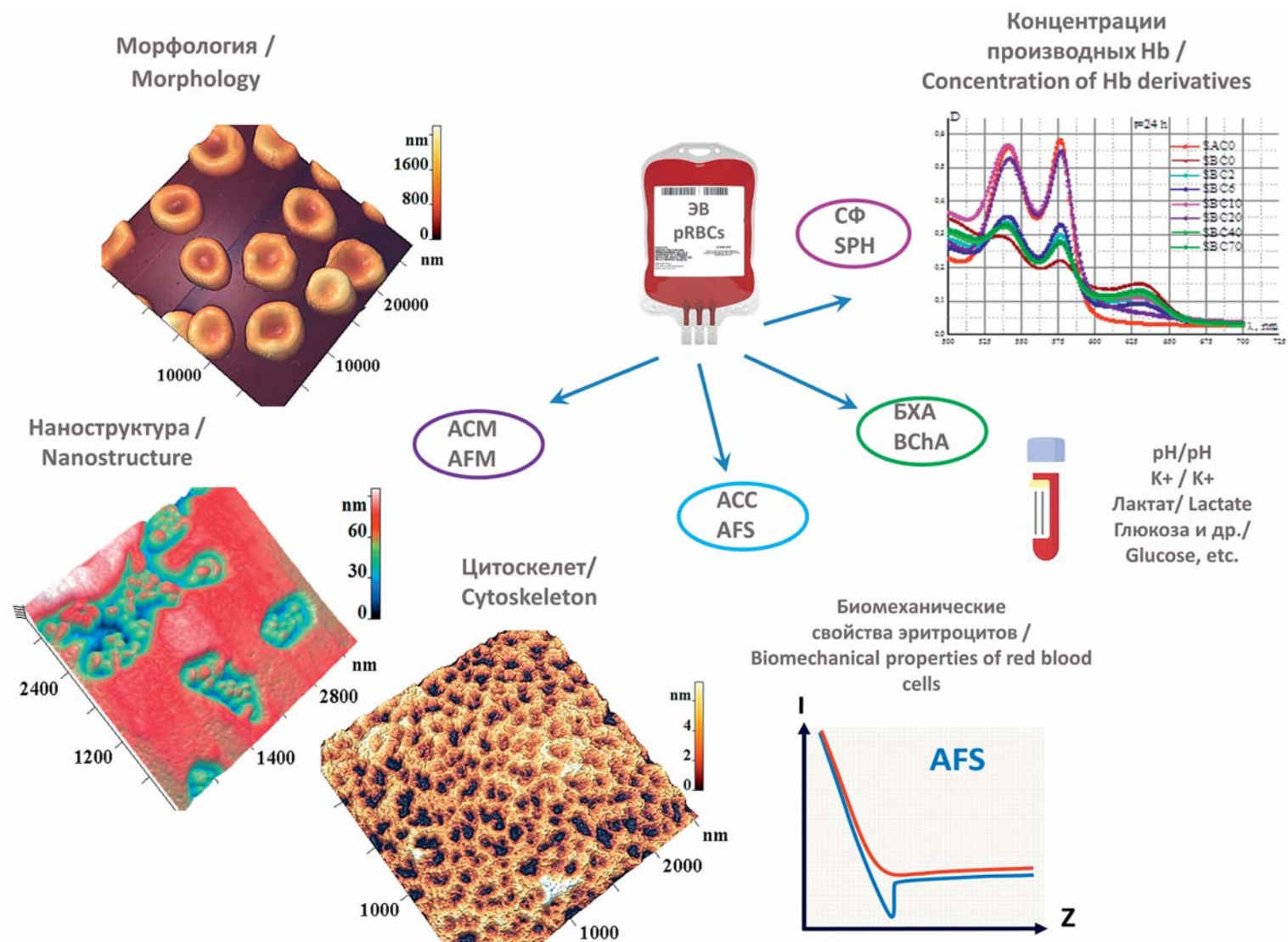


Рисунок 1. Схема эксперимента
Figure 1. Experiment design

«NTEGRA Prima» (NT-MDT Spectrum Instrument, Российская Федерация) в полуконтактном режиме. Использовали кантилеверы «NSG01» (TipsNano, Эстония) с радиусом острия 10 нм, резонансной частотой 87–230 кГц, коэффициентом упругости кантилевера $K = 5$ Н/м. Количество точек сканирования составляло 512 или 1024 в каждой строке изображения. Поля сканирования были 100×100 мкм², 50×50 мкм², 30×30 мкм², 10×10 мкм². Изображения обрабатывали в «SPM Nova software» (NT-MDT Spectrum Instruments, Российская Федерация) [20].

Атомно-силовая спектроскопия

Жесткость клеточных мембран оценивали с помощью модуля Юнга (E). Для приготовления образца использовали метод оседания клеток на стекло. Жесткость клеток измеряли с помощью кантилеверов «SD-R150-T3L450B» (Nanosensors, Швейцария) с коэффициентом упругости кантилевера $K = 1$ Н/м и радиусом иглы 150 нм. Все измерения производили

только на нативных клетках в фосфатно-солевом буфере. В процессе подготовки измерений для каждого образца проводили калибровку кантилевера на стекле [21]. Для получения эмпирической силовой кривой $I(Z)$ задавали максимальную величину подъема пьезосканера $Z_{\max} = 4000$ нм и величину тока фотодиода $I = 0,5$ нА. Время погружения зонда составляло 5 сек. Получение кривых жесткости образцов с эритроцитами проводили по методике, описанной подробно нами ранее [21, 22].

Биохимические показатели

Анализатором крови «Miura One» (ISE S.r.l., Италия) определяли количество лактата и глюкозы на протяжении всего периода хранения. Ионметрическим прибором «I-510» (NPO Akvilon, Российская Федерация) измеряли концентрацию внеклеточного калия в ЭВ, используя электрод XC-K-001. pH измеряли прибором «STARTER 2100» (OHAUS, США). Использовали электрод ST210 pH (OHAUS, США). Для оценки

процентного содержания производных гемоглобина (HbO₂, Hb, MetHb) и количества свободного гемоглобина использовали цифровой спектрофотометр «Unico 2800» (United Products & Instruments, США). Были измерены спектры поглощения суспензии эритроцитов в фосфатно-солевом буфере в диапазоне длин волн 500–700 нм с шагом 1 нм.

Статистический анализ

Для каждого исследуемого дня хранения (для каждого пакета) приготавливали по три мазка с монослоями теней и монослоями клеток. На каждом мазке сканировали по 5 изображений в разных частях мазка с размером 100 × 100 мкм². Для анализа наноструктуры сетки цитоскелета сканировали участок размером 2,5 × 2,5 мкм² на 30 тенях. Получали по 280–300 изображений на один пакет. Всего для 6 пакетов было проанализировано около 4140 изображений. С помощью программы «Image Analysis» P9 (NT-MDT Spectrum Instruments Co., Российская Федерация) рассчитывали параметры: количество пор и сумму их площадей на заданном размере образца. На каждом образце измеряли по 100 силовых кривых. Всего в исследовании проанализировано 3200 нативных эритроцитов. Для анализа наноструктуры мембран эритро-

цитов использовали наноповерхности I и II порядков, полученные пространственным преобразованием Фурье. Более подробное разложение исходной поверхности на сумму поверхностей двух и более пространственных периодов подробно описано в предыдущей нашей работе [23, 24].

Статистический анализ проводили с помощью программы «Origin Pro2019» (Origin Lab Corporation, США). Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Непрерывные переменные предварительно анализировали на нормальность распределения тестом Шапиро — Уилка. Были рассчитаны коэффициенты корреляции Спирмена, чтобы определить тесноту связи между исследуемыми величинами. Для сравнения средних использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с вычислением F-теста и поправкой Бонферрони.

Результаты

В процессе хранения ЭВ морфология клеток изменялась. На 3-й день хранения ЭВ в монослое наблюдались преимущественно дискоциты. Их количество составляло 89 ± 8 %. К 12-му дню хранения количество дискоцитов уменьшилось до 35 ± 4 %, при этом количество эхиноцитов увеличилось до 25 ± 6 %. К 21-му

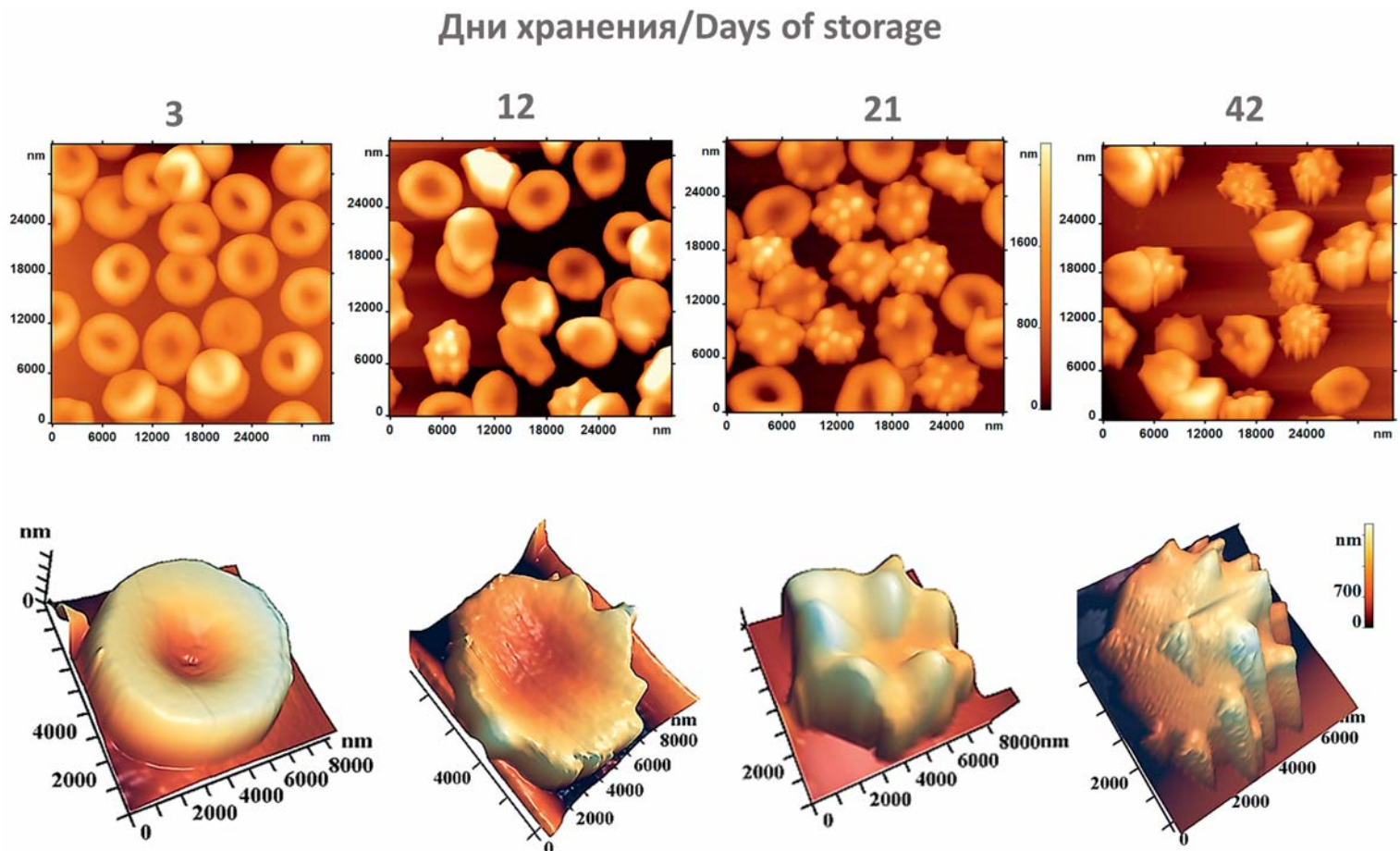


Рисунок 2. АСМ изображения 30 × 30 мкм² эритроцитов на 3-й, 12-й, 21-й, 42-й дни хранения ЭВ в плоском формате и одиночные клетки в 3D-формате тех же дней хранения

Figure 2. AFM images of pRBCs in flat format on days 3, 12, 21, and 42 of storage, scale 30 × 30 μm², and single cells in 3D-format on the same days of storage

дню хранения большинство клеток стало эхиноцитами и сфероэхиноцитами — $64 \pm 12\%$. К 42-му дню хранения количество эхиноцитов составило $14 \pm 3\%$, сфероэхиноцитов — $45 \pm 6\%$, лимonoобразных — $22 \pm 3\%$, теней — $3 \pm 1\%$. Также наблюдали $16 \pm 2\%$ клеток другой формы. На рисунке 2 представлены изображения характерных форм клеток на 3-й, 12-й, 21-й и 42-й дни хранения.

Изменение морфологии клеток связано с изменением наноструктуры мембран эритроцитов. Участок мембраны размером $1,5 \times 1,5 \text{ мкм}^2$ для каждого контрольного дня хранения раскладывали на поверхности двух порядков, используя пространственное преобразование Фурье. Для каждого фрагмента мембраны измеряли пространственный период l и высоту H . На рисунке 3 показана наноструктура второго порядка для 3-го, 21-го и 42-го дней хранения. В начале срока хранения наноповерхность мембраны эритроци-

тов имела параметры второго порядка, характерные для нормального эритроцита $l = 80\text{--}200 \text{ нм}$ и $H = 2\text{--}4 \text{ нм}$. Пространственный период l наноповерхности мембраны, показанный на рисунке 3, составлял $88 \pm 7 \text{ нм}$, при этом высота ее шероховатости не превышала $2 \pm 1 \text{ нм}$. В середине срока хранения (19–21-й день) на поверхности появлялись дефекты в виде зерен. Размер отдельного зерна составлял $130 \pm 20 \text{ нм}$. В области доменов образовывалось от 4–5 до нескольких десятков зерен. Размер домена варьировал от 400 до 2000 нм. Далее к 42-му дню происходило слияние отдельных зерен в более крупные структуры.

Морфология эритроцитов и наноструктура их мембран определяются состоянием их цитоскелета. Сеть цитоскелета состоит из псевдогексагональных ячеек, которые включают филаменты и пустоты (поры) между филаментами. На рисунке 3 представлено изображение цитоскелета эритроцитов в плоском формате

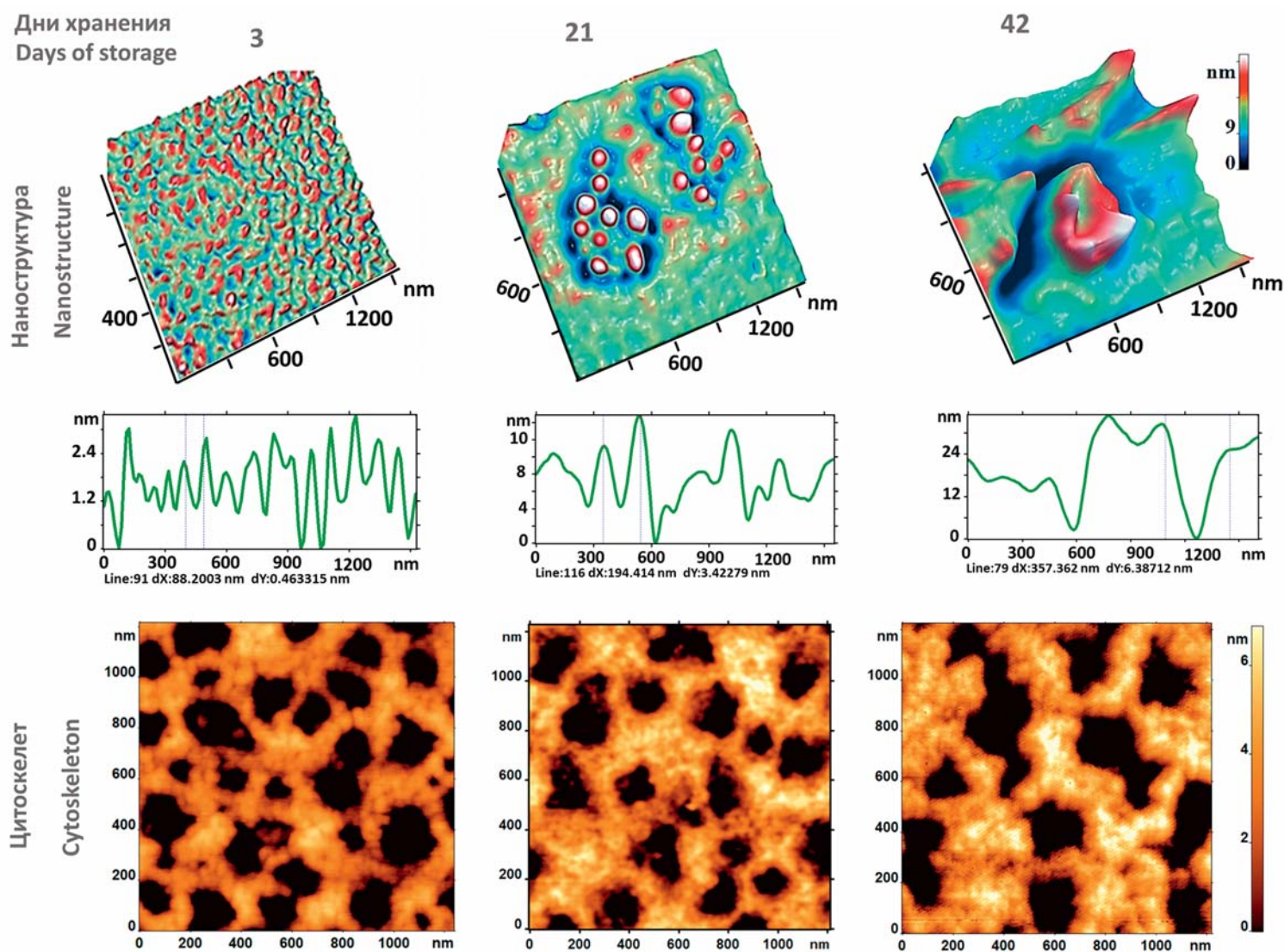


Рисунок 3. АСМ-изображения $1,5 \times 1,5 \text{ мкм}^2$ наноструктуры второго порядка эритроцитов на 3-й, 21-й, 42-й дни хранения ЭВ в 3D-формате и их профили соответственно. АСМ-изображение цитоскелета эритроцитов на 3-й, 21-й, 42-й дни хранения ЭВ в плоском формате

Figure 3. 3D AFM images of the second order of nanostructures on days 3, 21, 42 of storage, scale $1,5 \times 1,5 \text{ мкм}^2$, and their profiles, respectively. AFM image of pRBCs cytoskeleton on days 3, 21, 42 of storage in flat format

1,5 × 1,5 мкм² для 3-го, 21-го и 42-го дня хранения. С помощью метода сегментации Advance Watershed в программе Image Analysis P9 рассчитали площади ячеек и количество пор. Средняя площадь пор (S) по мере хранения от 3-го до 42-го дня хранения возрастала в $4,2 \pm 0,4$ раза. В начале срока хранения средняя площадь составляла $0,018 \pm 0,008$ мкм². До 12-го дня хранения ЭВ размеры пор практически не изменялись ($p > 0,01$). На 21-й день хранения средняя площадь составляла $0,042 \pm 0,003$ мкм². К 42-му дню хранения средняя площадь составляла $0,076 \pm 0,008$ мкм².

По мере хранения ЭВ количество пор на единицу площади цитоскелета $2,5 \times 2,5$ мкм² уменьшалось (рис. 4 А). Количество пор в контрольный 3-й день хранения было 250 ± 20 . К 21-му дню хранения произошло резкое уменьшение количества пор до 100 ± 25 ($p < 0,01$), а к 42-му дню хранения их количество составляло 50 ± 13 ($p < 0,01$). Таким образом, за весь период хранения ЭВ количество пор уменьшилось в $3,4 \pm 1,1$ раза.

Сумма площадей всех пор на фиксированном скане $2,5 \times 2,5$ мкм² к концу срока хранения ЭВ практически не изменялась (рис. 4 Б). До 24-го дня суммы площадей пор оставались в пределах $5,0 \pm 0,5$ мкм², а количество пор за это время уменьшалось в $1,8 \pm 0,4$ раза.

Анализ зависимости изменений параметра площади S по мере хранения ЭВ показал, что в начале срока хранения (до 21-го дня) $90 \pm 2\%$ пор имели размеры сети цитоскелета как на 3-й день хранения ЭВ. Затем вплоть до 42-го дня хранения доля контрольных пор монотонно уменьшалась. К 28–35-му дню $50 \pm 3\%$ пор стали отличными от контрольных. Далее к 42-му дню доля пор с контрольными значениями площади S уменьшилась до $30 \pm 7\%$ ($p < 0,01$).

Деформационную способность клеток оценивали с помощью модуля Юнга (E). Для оценки E регистрировали экспериментальные силовые кривые для каждого эритроцита с помощью атомно-силовой спектроскопии. Гистограммы плотности относительных

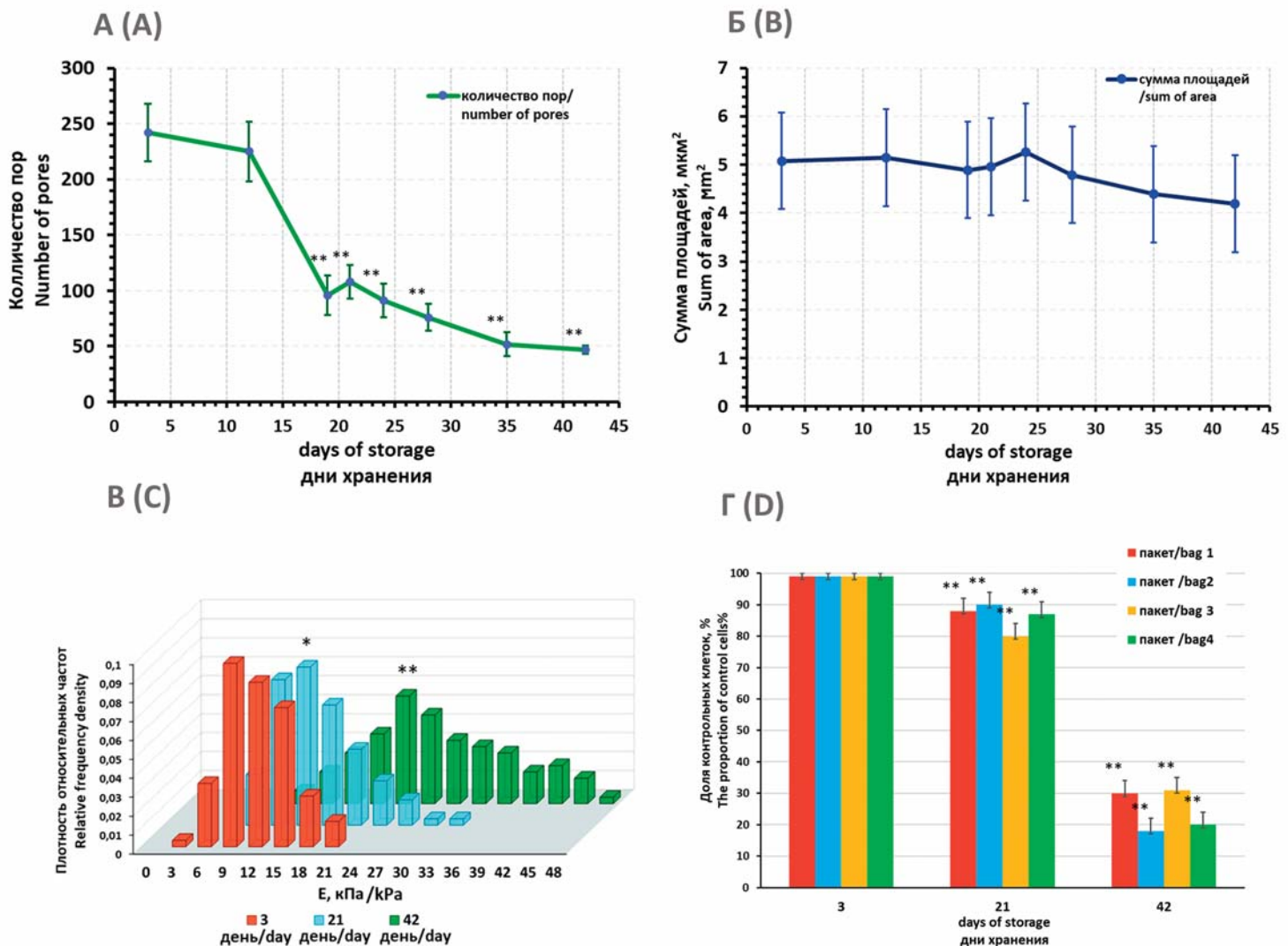


Рисунок 4. Динамика изменения количества пор по мере хранения (А), суммы площадей (Б), модуля Юнга (В), доля клеток с модулем Юнга (Г) 3-го дня хранения на 3-и, 21-е и 42-е сутки; $p < 0,01$ по сравнению с 3-м днем хранения

Figure 4. Dynamics of changes in the number of pores during storage (A), the sum of areas (B), Young's modulus (C), the proportion of cells with Young's modulus on the 3rd day of storage (D) on days 3, 21, and 42, $p < 0.01$ compared to day 3 of storage

частот для модуля Юнга на 3-й, 21-й и 42-й дни хранения представлены на рисунке 4 В. В начале срока хранения среднее значение модуля Юнга было равно 9 ± 4 кПа. После 21-го дня хранения модуль Юнга начал расти, и к 42-му дню хранения среднее значение модуля Юнга достигло $27 \pm 8,7$ кПа.

Детальный анализа изменений жесткости мембран в процессе хранения ЭВ производили на основе функции распределения:

$$F(E) = \int_{-\infty}^E f(E) dE, \quad (1)$$

где $f(E)$ — нормальный закон распределения Гаусса, которым аппроксимировались гистограммы относительных частот для экспериментальных данных. Доля клеток, у которых модуль Юнга мембран сохранял значения, соответствующие третьему дню хранения, рассчитывалась на уровне 0,98 из функций распределения $f(E)$.

К 21-му дню хранения доля клеток с модулем Юнга 3-го дня хранения составила около $85 \pm 5\%$, т.е. клетки сохранили жесткость как на третий день хранения. К 42-му дню хранения оставалось $30 \pm 3\%$ контрольных клеток в пакетах № 1, № 3 и $18 \pm 4\%$ — в пакетах № 2, № 4, т.е. происходило резкое уменьшение доли клеток с модулем Юнга 3-го дня хранения после 21-го дня хранения ЭВ (рис. 4 Г).

Изменение биохимических показателей по мере хранения ЭВ

Во время хранения происходил патологический процесс, который заключался в нарушении функционального состояния натрий-калиевого насоса, что приводило к потере внутриклеточного калия и накоплению натрия в цитоплазме. В норме концентрация калия составляет около 90 мМ внутри эритроцита и 5 мМ — снаружи, а концентрации натрия внутри и снаружи эритроцита составляют 5 мМ и 140 мМ соответственно [25]. По мере хранения соотношение концентраций калия и натрия претерпевало изменения в несколько раз. Полученные данные показали, что концентрация ионов K^+ во внешнем растворе возрастала от $3,4 \pm 0,4$ до 18 ± 4 мМ от 3-го до 42-го дня соответственно, то есть увеличилась в $4,9 \pm 0,2$ раза. Для генерирования достаточного количества АТФ и 2,3-дифосфоглицерата по мере хранения эритроцитов в контейнере в состав взвешивающего раствора добавляют глюкозу или декстрозу, которые поддерживают процесс гликолиза. Во взвешивающих растворах концентрация глюкозы составляет более 500 мг/дл (27,55 мМ), что в несколько раз превышает ее нормальную концентрацию [26]. Начальное содержание глюкозы в растворе гемоконсерванта исследуемых контейнеров ЭВ составляло 20 ± 4 мМ, а к концу срока хранения оно падало до 12 ± 3 мМ. С течением времени хранения образующийся при гликолизе лактат накапливался в растворе гемо-

консерванта. К 42-му дню концентрация лактата увеличилась с 8 до 20 мМ. Значение pH с 3-го до 42-го дня хранения изменилось от $7,04 \pm 0,03$ до $6,67 \pm 0,05$. С помощью спектрофотометрического метода вычисляли процентное содержание производных гемоглобина и количество свободного гемоглобина в каждый контрольный день для всех пакетов. Расчет показал, что метгемоглобин не образовывался. К 42-му дню хранения в пакетах № 1 и № 2 гемолиз был $0,49 \pm 0,05$ и $0,20 \pm 0,04\%$ соответственно. Степень гемолиза в пакетах № 3 и № 4 к концу срока хранения составил $0,55 \pm 0,05$ и $0,77 \pm 0,06\%$, а в пакетах № 5 и № 6 — $0,45 \pm 0,05$ и $0,52 \pm 0,04\%$ соответственно.

Для оценки взаимосвязи между структурными, механическими характеристиками и биохимическими показателями проведен корреляционный анализ Спирмена. Установлена корреляционная зависимость между данными параметрами (табл. 1): прямая корреляционная связь с концентрацией внеклеточного калия и лактата, обратная корреляционная связь с pH и концентрацией глюкозы.

Время начала существенных изменений (21-й день хранения) конфигурации цитоскелета (S), механических свойств (E), коррелировало со сроком хранения ЭВ (более 21-го дня) (табл. 1).

Обсуждение

В последнее время все большее внимание трансфузиологов обращено к проблемам физиологического состояния сохраняемых эритроцитов и, следовательно, к качеству переливаемой ЭВ [2]. Согласно нормативным документам [27], качество ЭВ к концу срока ее хранения определяется по степени выраженности гемолиза и измерению общих гематологических показателей. Выраженность гемолиза объективно демонстрирует количество гемолизированных эритроцитов *in vitro* [28]. При исследовании образцов в данной работе степень выраженности гемолиза была ниже порогового значения, что свидетельствует об удовлетворительном качестве всех исследованных образцов ЭВ к 42-му дню хранения. Однако такой показатель лишь косвенно характеризует конформационные изменения мембран консервированных эритроцитов [17] и не позволяет непосредственно судить о состоянии клеток, сохранивших свою целостность.

При длительном хранении в стандартных условиях форма сохранных эритроцитов претерпевала трансформацию. Если на третий день хранения преобладали дискоциты, то в конце периода хранения наблюдалось большое количество эхиноцитов и сфероэхиноцитов. Возможно, пусковым механизмом изменения форм клеток явилось появление топологических дефектов в виде зерен [17]. К 42-му дню хранения такие структуры увеличились и объединились в более крупные (рис. 3), что привело к необратимой трансформации

Таблица 1. Коэффициенты корреляции между изменения характеристик цитоскелета (S), модуля Юнга (E) и изменением pH, концентраций K⁺, лактата, глюкозы, степени гемолиза в процессе хранения ЭВ при $p < 0,05$

Table 1. Correlation coefficients between the dynamics of changes in the characteristics of the cytoskeleton (S), Young's modulus (E) and changes in pH, K⁺, lactate, glucose, hemolysis level during pRBC storage, at $p < 0,05$

Параметры Parameters	pH	K ⁺	Глюкоза Glucose	Лактат Lactate	% гемолиза Hemolysis	S	E
pH	1	-0,95	0,90	-0,91	-0,8	-0,82	-0,88
K ⁺	-0,95	1	-0,90	0,92	0,82	0,87	0,86
Глюкоза Glucose	0,90	-0,90	1	-0,77	-0,9	-0,81	-0,91
Лактат Lactate	-0,91	0,92	-0,77	1	0,69	0,78	0,83
% Гемолиза Hemolysis	-0,80	0,82	-0,90	0,69	1	0,81	0,84
S	-0,82	0,87	-0,81	0,78	0,81	1	0,88
E	-0,88	0,86	-0,91	0,83	0,84	0,88	1

формы эритроцитов. В это же время в процессе хранения происходили изменения в сети цитоскелета: филаменты цитоскелета деформировались и разрывались, мелкие поры объединялись в более крупные образования, происходила кластеризация белковых комплексов [29]. К концу срока хранения размеры пор цитоскелета увеличивались в 2 и более раз.

Цитоскелет представляет собой белковую сеть, состоящую в основном из тетрамеров спектрина, которые связаны с белковыми комплексами актина, белка 4.1R, анкирина, а также с тропомиозином, тропомодулином, аддуцином и дематином. Тетрамер спектрина является основным структурным элементом цитоскелета. Он связан с мембраной эритроцитов. Окислительные процессы могут вызывать превращение тетрамеров в димеры [23], приводящие к нарушениям связи «спектрин — полоса 4.1 — полоса 3» [30] «спектрин — анкирин — полоса 3» [23].

До 19–21-го дня жесткость мембраны практически не изменилась и везде была примерно 10 кПа. После

24-го дня жесткость мембраны резко увеличивалась в 2,8 раза.

Причиной морфологической трансформации, роста жесткости мембран, нарушений метаболизма, модификации структуры цитоскелета, угнетения антиоксидантной системы, ухудшения физиологического состояния эритроцитов является оксидативный стресс [31]: рост АФК, уменьшение pH, увеличение содержания калия и лактата в растворе гемоконсерванта.

Таким образом, в процессе длительного хранения ЭВ (до 42 суток, 4 °C, CPD/SAGM) молекулярная структура эритроцитов подвергается необратимым нарушениям. Эти изменения наступают, как правило, после 20–24 дней хранения. Результаты работы могут быть использованы для оценки качества длительно хранящейся ЭВ. Полученные индивидуальные биофизические показатели мембран эритроцитов могут быть полезны при характеристике ряда гематологических заболеваний в качестве новых диагностических методов персонализированной медицины.

Литература

1. World Health Organization. Blood safety and availability. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/blood-safety-and-availability>.
2. Аксельрод Б.А., Балашова Е.Н., Баутин А.Е. и др. Клиническое использование эритроцитсодержащих компонентов донорской крови. Гематология и трансфузиология. 2018; 63(4): 372–435. DOI: 10.25837/HAT.2019.62.39.006.
3. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM). Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 19th ed. Strasbourg: EDQM Publishers; 2017.
4. D'Alessandro A., Reisz J.A., Culp-Hill R., et al. Metabolic effect of alkaline additives and guanosine/gluconate in storage solutions for red blood cells. Transfusion. 2018; 58(8): 1992–2002. DOI: 10.1111/trf.14620.
5. Cancelas J.A., Dumont L.J., Maes L.A., et al. Additive solution-7 reduces the red blood cell cold storage lesion. Transfusion. 2015; 55(3): 491–8. DOI: 10.1111/trf.12867.
6. Radwanski K., Thill M., Min K. Red cell storage in E-Sol 5 and Adsol additive solutions: Paired comparison using mixed and non-mixed study designs. Vox Sang. 2014; 106(4): 322–9. DOI: 10.1111/vox.12108.

References

1. World Health Organization. Blood safety and availability. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/blood-safety-and-availability>.
2. Akselrod B.A., Balashova E.N., Bautin A.E., et al. Clinical guidelines for red blood cell transfusion. Gematologiya i Transfusiologiya. 2018; 63(4): 372–435. DOI: 10.25837/HAT.2019.62.39.006. (In Russian).
3. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM). Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 19th ed. Strasbourg: EDQM Publishers; 2017.
4. D'Alessandro A., Reisz J.A., Culp-Hill R., et al. Metabolic effect of alkaline additives and guanosine/gluconate in storage solutions for red blood cells. Transfusion. 2018; 58(8): 1992–2002. DOI: 10.1111/trf.14620.
5. Cancelas J.A., Dumont L.J., Maes L.A., et al. Additive solution-7 reduces the red blood cell cold storage lesion. Transfusion. 2015; 55(3): 491–8. DOI: 10.1111/trf.12867.
6. Radwanski K., Thill M., Min K. Red cell storage in E-Sol 5 and Adsol additive solutions: Paired comparison using mixed and non-mixed study designs. Vox Sang. 2014; 106(4): 322–9. DOI: 10.1111/vox.12108.

7. Lagerberg J.W., Korsten H., Van Der Meer P.F., et al. Prevention of red cell storage lesion: A comparison of five different additive solutions. *Blood Transfus.* 2017; 15(5): 456–62. DOI: 10.2450/2017.0371-16.
8. Shah A., Brunskill S.J., Desborough M.J., et al. Transfusion of red blood cells stored for shorter versus longer duration for all conditions. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018; 12(12): CD010801. DOI: 10.1002/14651858.CD010801.pub3.
9. Bennett-Guerrero E., Rizwan S., Rozensky R., et al. Randomized controlled trial of 7, 28, vs 42 day stored red blood cell transfusion on oxygen delivery (VO(2) max) and exercise duration. *Transfusion.* 2021; 61(3): 699–707. DOI: 10.1111/trf.16237.
10. Протопопова Е.Б., Буркитбаев Ж.К., Кузьмин Н.С. и др. Срок хранения донорских эритроцитов не влияет на эффективность их переливания. *Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова.* 2015; 10(3): 118–20.
11. DeSantis S.M., Brown D.W., Jones A.R., et al. Characterizing red blood cell age exposure in massive transfusion therapy: the scalar age of blood index (SBI). *Transfusion.* 2019; 59(8): 2699–708. DOI: 10.1111/trf.15334.
12. Zallen G., Offner P.J., Moore E.E., et al. Age of transfused blood is an independent risk factor for postinjury multiple organ failure. *Am J Surg.* 1999; 178(6): 570–2. DOI: 10.1016/s0002-9610(99)00239-1.
13. Sparrow R.L. Red blood cell storage duration and trauma. *Transfus Med Rev.* 2015; 29(2): 120–6. DOI: 10.1016/j.tmr.2014.09.007.
14. Bishnoi A.K., Garg P., Patel K., et al. Effect of red blood cell storage duration on outcome after paediatric cardiac surgery: A prospective observational study. *Heart Lung Circ.* 2019; 28(5): 784–91. DOI: 10.1016/j.hlc.2018.03.012.
15. Sanders J., Patel S., Cooper J., et al. Red blood cell storage is associated with length of stay and renal complications after cardiac surgery. *Transfusion.* 2011; 51(11): 2286–94. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2011.03170.x.
16. Steiner M.E., Ness P.M., Assmann S.F., et al. Effects of red-cell storage duration on patients undergoing cardiac surgery. *N Engl J Med.* 2015; 372(15): 1419–29. DOI: 10.1056/NEJMoa1414219.
17. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., et al. Morphology, membrane nanostructure and stiffness for quality assessment of packed red blood cells. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 7846. DOI: 10.1038/s41598-017-08255-9.
18. Gusev G.P., Govekar R., Gadewal N., Agalakova N.I. Understanding quasi-apoptosis of the most numerous enucleated components of blood needs detailed molecular autopsy. *Ageing Res Rev.* 2017; 35: 46–62. DOI: 10.1016/j.arr.2017.01.002.
19. Дерюгина А.В., Бояринов Г.А., Симутис И.С. и др. Морфологические и метаболические показатели эритроцитов при обработке озонном эритроцитной массы. *Общая реаниматология.* 2018; 14(1): 40–9. DOI: 10.15360/1813-9779-2018-1-40-49.
20. Sergunova V., Leesment S., Kozlov A., et al. Investigation of red blood cells by atomic force microscopy. *Sensors (Basel).* 2022; 22(5): 2055. DOI: 10.3390/s22052055.
21. Kozlova E., Chernysh A., Manchenko E., et al. Nonlinear biomechanical characteristics of deep deformation of native RBC membranes in normal state and under modifier action. *Scanning.* 2018; 2018: 1810585. DOI: 10.1155/2018/1810585.
22. Манченко Е.А., Козлова Е.К., Сергунова В.А., Черныш А.М. Однородная деформация нативных эритроцитов при их длительном хранении. *Общая реаниматология.* 2019; 15(5): 4–10. DOI: 10.15360/1813-9779-2019-5-4-10.
23. Kozlova E.K., Chernysh A.M., Moroz V.V., Kuzovlev A.N. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *Micron.* 2013; 44: 218–27. DOI: 10.1016/j.micron.2012.06.012.
7. Lagerberg J.W., Korsten H., Van Der Meer P.F., et al. Prevention of red cell storage lesion: A comparison of five different additive solutions. *Blood Transfus.* 2017; 15(5): 456–62. DOI: 10.2450/2017.0371-16.
8. Shah A., Brunskill S.J., Desborough M.J., et al. Transfusion of red blood cells stored for shorter versus longer duration for all conditions. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018; 12(12): CD010801. DOI: 10.1002/14651858.CD010801.pub3.
9. Bennett-Guerrero E., Rizwan S., Rozensky R., et al. Randomized controlled trial of 7, 28, vs 42 day stored red blood cell transfusion on oxygen delivery (VO(2) max) and exercise duration. *Transfusion.* 2021; 61(3): 699–707. DOI: 10.1111/trf.16237.
10. Protopopova E.B., Burkitbaev Z.K., Kuzmin N.S., et al. Donor red blood cells storage period does not affect the effectiveness of their transfusion. *Vestnik Natsionalnogo mediko-chirurgicheskogo Centra im N.I. Pirogova.* 2015; 10(3): 118–20. (In Russian).
11. DeSantis S.M., Brown D.W., Jones A.R., et al. Characterizing red blood cell age exposure in massive transfusion therapy: the scalar age of blood index (SBI). *Transfusion.* 2019; 59(8): 2699–708. DOI: 10.1111/trf.15334.
12. Zallen G., Offner P.J., Moore E.E., et al. Age of transfused blood is an independent risk factor for postinjury multiple organ failure. *Am J Surg.* 1999; 178(6): 570–2. DOI: 10.1016/s0002-9610(99)00239-1.
13. Sparrow R.L. Red blood cell storage duration and trauma. *Transfus Med Rev.* 2015; 29(2): 120–6. DOI: 10.1016/j.tmr.2014.09.007.
14. Bishnoi A.K., Garg P., Patel K., et al. Effect of red blood cell storage duration on outcome after paediatric cardiac surgery: A prospective observational study. *Heart Lung Circ.* 2019; 28(5): 784–91. DOI: 10.1016/j.hlc.2018.03.012.
15. Sanders J., Patel S., Cooper J., et al. Red blood cell storage is associated with length of stay and renal complications after cardiac surgery. *Transfusion.* 2011; 51(11): 2286–94. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2011.03170.x.
16. Steiner M.E., Ness P.M., Assmann S.F., et al. Effects of red-cell storage duration on patients undergoing cardiac surgery. *N Engl J Med.* 2015; 372(15): 1419–29. DOI: 10.1056/NEJMoa1414219.
17. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., et al. Morphology, membrane nanostructure and stiffness for quality assessment of packed red blood cells. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 7846. DOI: 10.1038/s41598-017-08255-9.
18. Gusev G.P., Govekar R., Gadewal N., Agalakova N.I. Understanding quasi-apoptosis of the most numerous enucleated components of blood needs detailed molecular autopsy. *Ageing Res Rev.* 2017; 35: 46–62. DOI: 10.1016/j.arr.2017.01.002.
19. Deryugina A.V., Boyarinov G.A., Simutis I.S., et al. Morphological and metabolic parameters of red blood cells after their treatment with ozone. *Obschaya Reanimatologiya.* 2018; 14(1): 40–9. DOI: 10.15360/1813-9779-2018-1-40-49. (In Russian).
20. Sergunova V., Leesment S., Kozlov A., et al. Investigation of red blood cells by atomic force microscopy. *Sensors (Basel).* 2022; 22(5): 2055. DOI: 10.3390/s22052055.
21. Kozlova E., Chernysh A., Manchenko E., et al. Nonlinear biomechanical characteristics of deep deformation of native RBC membranes in normal state and under modifier action. *Scanning.* 2018; 2018: 1810585. DOI: 10.1155/2018/1810585.
22. Manchenko E.A., Kozlova E.K., Sergunova V.A., et al. Homogeneous deformation of native erythrocytes during long-term storage. *Obschaya Reanimatologiya.* 2019; 15(5): 4–10. DOI: 10.15360/1813-9779-2019-5-4-10. (In Russian).
23. Kozlova E.K., Chernysh A.M., Moroz V.V., Kuzovlev A.N. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *Micron.* 2013; 44: 218–27. DOI: 10.1016/j.micron.2012.06.012.

24. Шерстюкова Е.А., Иноземцев В.А., Козлов А.П. и др. Атомно-силовая микроскопия в оценке механических свойств мембран эритроцитов при воздействии различных физико-химических агентов. Альманах клинической медицины. 2021; 49(6): 427–34. DOI: 10.18786/2072-0505-2021-49-059.
25. Flatt J.F., Bawazir W.M., Bruce L.J. The involvement of cation leaks in the storage lesion of red blood cells. *Front Physiol.* 2014; 5: 214. DOI: 10.3389/fphys.2014.00214.
26. Yoshida T., Prudent M., D'alessandro A. Red blood cell storage lesion: Causes and potential clinical consequences. *Blood Transfus.* 2019; 17(1): 27–52. DOI: 10.2450/2019.0217-18.
27. Постановление Правительства РФ от 22 июня 2019 г. № 797 «Об утверждении Правил заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов и о признании утратившими силу некоторых актов Правительства Российской Федерации». URL: <https://docs.cntd.ru/document/560504285>.
28. Ламзин И.М., Хайруллин Р.М. Исследование изменений биофизических свойств эритроцитов при хранении в эритроцитсодержащих средах с помощью атомно-силовой микроскопии. Саратовский научно-медицинский журнал. 2014; 10(1): 44–8.
29. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., et al. Two-step process of cytoskeletal structural damage during long-term storage of packed red blood cells. *Blood Transfus.* 2021; 19(2): 124–34. DOI: 10.2450/2020.0220-20.
30. Delobel J., Prudent M., Rubin O., et al. Subcellular fractionation of stored red blood cells reveals a compartment-based protein carbonylation evolution. *J Proteomics.* 2012; 76(Spec No): 181–93. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.05.004.
31. Sherstyukova E., Chernysh A., Moroz V., et al. The relationship of membrane stiffness, cytoskeleton structure and storage time of pRBCs. *Vox Sang.* 2021; 116(4): 405–15. DOI: 10.1111/vox.13017.
24. Sherstyukova E.A., Inozemtsev V.A., Kozlov A.P., et al. Atomic force microscopy in the assessment of erythrocyte membrane mechanical properties with exposure to various physicochemical agents. *Almanac of Clinical Medicine.* 2021; 49(6): 427–34. DOI: 10.18786/2072-0505-2021-49-059. (In Russian).
25. Flatt J.F., Bawazir W.M., Bruce L.J. The involvement of cation leaks in the storage lesion of red blood cells. *Front Physiol.* 2014; 5: 214. DOI: 10.3389/fphys.2014.00214.
26. Yoshida T., Prudent M., D'alessandro A. Red blood cell storage lesion: Causes and potential clinical consequences. *Blood Transfus.* 2019; 17(1): 27–52. DOI: 10.2450/2019.0217-18.
27. Decree of the Government of the Russian Federation from June 22, 2019 N 797 "On approval of the Rules of procurement, storage, transportation and clinical use of donor blood and its components and on the invalidation of some acts of the Government of the Russian Federation". URL: <https://docs.cntd.ru/document/560504285>. (In Russian).
28. Lamzin I.M., Khayrullin R.M. The study of changes of biophysical properties of red blood cells in storage in erythrocyte-containing solutions using atomic force microscopy. *Saratov Journal of Medical Scientific Research.* 2014; 10(1): 44–8. (In Russian).
29. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., et al. Two-step process of cytoskeletal structural damage during long-term storage of packed red blood cells. *Blood Transfus.* 2021; 19(2): 124–34. DOI: 10.2450/2020.0220-20.
30. Delobel J., Prudent M., Rubin O., et al. Subcellular fractionation of stored red blood cells reveals a compartment-based protein carbonylation evolution. *J Proteomics.* 2012; 76(Spec No): 181–93. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.05.004.
31. Sherstyukova E., Chernysh A., Moroz V., et al. The relationship of membrane stiffness, cytoskeleton structure and storage time of pRBCs. *Vox Sang.* 2021; 116(4): 405–15. DOI: 10.1111/vox.13017.

Информация об авторах

Сергунова Виктория Александровна*, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией биофизики мембран клеток при критических состояниях, Научно-исследовательский институт общей реаниматологии имени В.А. Неговского Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии,
e-mail: vika_23s82@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8425-0845>

Кузовлев Артем Николаевич, доктор медицинских наук, заместитель директора, Научно-исследовательский институт общей реаниматологии имени В.А. Неговского Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии,
e-mail: artem_kuzovlev@fnkcr.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5930-0118>

Александр Дмитриевич Онуфриевич, начальник центра крови, ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства обороны Российской Федерации,
e-mail: alonuf@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5720-8660>

Information about the authors

Viktoria A. Sergunova*, Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Biophysics of Cell Membranes under Critical State, "V.A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology" of the Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology,
e-mail: vika_23s82@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8425-0845>

Artem N. Kuzovlev, Dr. Sci. (Med.), Deputy Director, "V.A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology" of the Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology,
e-mail: artem_kuzovlev@fnkcr.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5930-0118>

Alexander D. Onufrievich, Head of the Blood Center, "Main Military Clinical Hospital named after N.N. Burdenko" of the Ministry of Defense of the Russian Federation,
e-mail: alonuf@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5720-8660>

Владимир Александрович Иноземцев, научный сотрудник лаборатории биофизики мембран клеток при критических состояниях, НИИ общей реаниматологии им. Научно-исследовательский институт общей реаниматологии имени В.А. Неговского Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии,
e-mail: va.inozemcev@physics.msu.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4693-5624>

Гудкова Ольга Евгеньевна, старший научный сотрудник лаборатории биофизики мембран клеток при критических состояниях, Научно-исследовательский институт общей реаниматологии имени В.А. Неговского Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии,
e-mail: olkagood@yandex.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9220-0138>

Шерстюкова Екатерина Александровна, старший научный сотрудник лаборатории биофизики мембран клеток при критических состояниях, Научно-исследовательский институт общей реаниматологии имени В.А. Неговского Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии,
e-mail: kmanchenko@yandex.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9962-6315>

*** Автор, ответственный за переписку**

Поступила: 21.09.2021

Принята в печать: 16.02.2022

Vladimir A. Inozemtsev, Researcher, Laboratory of Biophysics of Cells Membranes in Critical States, "V.A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology" of the Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation,
e-mail: va.inozemcev@physics.msu.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4693-5624>

Olga E. Gudkova, Senior Researcher, Laboratory of Biophysics of Cells Membranes in Critical States, "V.A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology" of the Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation,
e-mail: olkagood@yandex.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9220-0138>

Ekaterina A. Sherstyukova, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Biophysics of Cells Membranes in Critical States, "V.A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology" of the Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation,
e-mail: kmanchenko@yandex.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9962-6315>

*** Corresponding author**

Received 21.09.2021

Accepted 16.02.2022