

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского»



На правах рукописи

Полозова Анастасия Владимировна

**Морфоструктурные особенности и функциональное состояние эритроцитов
при моделировании черепно-мозговой травмы и её экспериментальной
коррекции цитопротекторами**

1.5.5 – физиология человека и животных

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
доцент
Дерюгина Анна Вячеславовна

Нижний Новгород – 2021

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НЬ	гемоглобин
АДФ	аденозиндифосфорная кислота
АОС	антиоксидантная система
АТФ	аденозинтрифосфорная кислота
АФК	активные формы кислорода
АЧТВ	активированное частичное тромбопластиновое время
ДФГ	дифосфоглицерат
МДА	малоновый диальдегид
ПВ	протромбиновое время
ПОЛ	перекисное окисление липидов
Рн	фосфор неорганический
ТХУ	трихлоруксусная кислота
ФБ	фибриноген
ЧМТ	черепно-мозговая травма
ЭФПЭ	электрофоретическая подвижность эритроцитов

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Современные представления о структурно-функциональной организации мембран эритроцитов.....	11
1.1.1. Структурная организация мембран эритроцитов.....	11
1.1.2. Функциональные показатели в реализации структурных свойств эритроцитов.....	16
1.1.3. Влияние про- и антиоксидантной систем на мембрану эритроцитов.....	18
1.2. Гемоциркуляция.....	22
1.3. Изменения в организме при ЧМТ	23
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	26
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	26
2.1. Характеристика материалов исследования	26
2.2. Модели исследования	28
2.3. Методы исследования.....	30
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	38
3.1. Исследование морфоструктурного и функционального состояния эритроцитов и системы гемостаза в посттравматический период ЧМТ.....	38
3.2. Исследование морфоструктурного и функционального состояния эритроцитов и системы гемостаза в посттравматический период ЧМТ при действии мексикора и цитофлавина.....	51
3.3. Механизмы ответной реакции эритроцитов в условиях гипердреналемии, окислительного стресса и лактоацидоза при действии цитофлавина и мексикора <i>in vitro</i>	64
3.4. Исследование морфофункционального состояния головного мозга и моторной функции крыс в посттравматический период ЧМТ.....	68
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	90
ВЫВОДЫ	92
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	94

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Каждый год от ЧМТ в мире погибает 1.5 млн человек, а 2.4 млн становятся инвалидами. В России ежегодно ЧМТ получают около 600 тыс. человек, из них 50 тыс. погибают, а еще 50 тыс. становятся официальными инвалидами. В настоящее время общее количество инвалидов, перенесших ЧМТ, превышает 2 млн человек (Лихтерман, 2016; Benedictus, 2010; Nguyen, 2011; McDonald et al., 2016). По долгосрочным прогнозам, ожидается дальнейший рост нейротравматизма как по частоте, так и по тяжести, что обусловлено неизбежным техническим развитием, интенсификацией дорожного движения, военными конфликтами и урбанизацией населения (Потапов и др., 2010; McAllister, 2011; Ponsford, 2014; Abdul-Muneer, 2015). В связи с этим изучение механизмов, связанных с ЧМТ и развитием вторичных последствий травмы является актуальной задачей не только медицины, но фундаментальной задачей биологии, направленной на решение общегосударственной проблемы, связанной с колоссальными расходами на лечение и реабилитацию пациентов с травмой.

Ведущим механизмом нейротравмы является гипоксия, которая формируется на всех звеньях жизнедеятельности организма: системном, органном, клеточном и носит, как правило, смешанный характер (Montivero et al., 2021; Baker et al., 2021). При этом чаще всего тканевая гипоксия определяет исход критического состояния (Пурас и др., 2012; Лихтерман и др., 2016; Царев, 2018; Salehi et al., 2017; Obenaus et al., 2017). На степень проявления тканевой гипоксии существенное влияние оказывают эритроциты, поскольку от их функционального состояния зависят реологические свойства крови и микроциркуляция (Муравьев и др., 2012; Fujino, 2000). Реципрокное взаимодействие между кровотоком и ишемизированной тканью обуславливает тканевое повреждение. Гипоперфузия тканей ведет к гипоксии сосудистого эндотелия, у которого появляются прокоагулянтные свойства, что сопровождается адгезивно-агрегационной функцией клеток крови. Микроциркуляторные и эндотелиальная дисфункции при

травме, в свою очередь, рассматриваются как причина полиорганной недостаточности, состояние которой усугубляется развитием окислительного стресса (Токмакова и др., 2012; Klijn et al., 2008; Wolin et al., 2009).

Учитывая, что одним из возможных механизмов развития каскадных реакций, приводящих к полиорганной недостаточности, могут являться поврежденные эритроциты, ответственные за перенос кислорода к тканям, представляется важным понять, какие молекулярные механизмы реализуются в эритроцитах в ответ на дестабилизацию системы гомеостаза при травматическом стрессе, могут ли они иметь адаптивный характер или осуществляются изменения, имеющие необратимый деструктивный характер.

Коррекция морфофункционального состояния эритроцитов при травме, может быть важным фактором в предотвращении ишемии и гипоксии органов и тканей. В настоящее время особое внимание в лечении критических состояний сконцентрировано на исследовании цитопротекторов (Förster, Reiser, 2016). К данной группе соединений относится мексикор и цитофлавин, обладающие антиоксидантным и антигипоксическим действием (Завалий и др., 2018; Павлюченко, Бат, 2018; Kesarev et al., 2017). Мексикор – производное 3-оксипиридина (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат) широко используется при терапии кардиологических заболеваний (Бояринов и др., 2010), хронической ишемии головного мозга (Фирсов и др., 2011) и в цитопротекторной терапии при инсульте (Фирсов, Смирнов, 2011). Цитофлавин представлен комплексом из двух витаминов (В₂ и РР), янтарной кислоты и инозина (рибоксина). Препарат обладает комплексным действием: способствует компенсации дефицита энергетических субстратов и коррекции нарушений метаболизма (Джумагазиев, Рахимова, 2015; Силина и др., 2014; Скоромец и др., 2005). Однако механизмы корригирующего влияния данных цитопротекторов на морфофункциональное состояние эритроцитов при ЧМТ не изучены.

Для оценки состояния живых клеток целесообразно использование неинвазивных методик, вносящих наименьшее количество повреждений и

уменьшающих, таким образом, погрешность метода измерений. Перспективным в области исследования состояния эритроцитов является метод лазерной модуляционной интерференционной микроскопии, позволяющий оценивать клетки в режиме реального времени и получать количественную информацию об объемном распределении показателя преломления объекта, зависящем от динамики кооперативных внутриклеточных процессов, протекающих на мембране, примембранной областях и в цитоплазме эритроцитов (Jiang, Yin, 2016; Butola et al., 2018).

Цели и задачи исследования

Цель – исследовать взаимосвязь морфоструктурных показателей и функционального состояния эритроцитов на модели ЧМТ и выявить их роль в развитии репарационных процессов в посттравматический период при использовании цитопротекторов.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить фазово-интерференционные, электрокинетические, агрегационные, окислительные, метаболические характеристики эритроцитов, состояние системы гемостаза при моделировании ЧМТ и действии цитопротекторов в посттравматический период.

2. Выявить зависимость изменения функциональных показателей эритроцитов в модельных системах окислительного стресса, гипердреналемии и лактоацидоза *in vitro* при действии цитопротекторов.

3. Оценить морфофункциональное состояние головного мозга, микроциркуляторного русла головного мозга и двигательную активность крыс в динамике посттравматического периода ЧМТ и в ходе цитопротекторной терапии.

4. Обосновать значимость адаптационно-приспособительных процессов в эритроцитах для ограничения вторичных повреждений мозга в посттравматический период при применении цитопротекторов.

Научная новизна

Впервые с использованием комплексного подхода изучены фазово-интерференционные изображения, мембранные и метаболические показатели эритроцитов в посттравматический период ЧМТ и при её коррекции цитопротекторами. Показана зависимость морфоструктурных показателей эритроцитов от их функционального состояния при экспериментальной ЧМТ и действии цитопротекторов в посттравматический период. Выявлено, что увеличение фазовых характеристик эритроцитов определяется усилением процессов липопероксидации, снижением активности каталазы, содержания гемоглобина и коррелирует с уменьшением ЭФПЭ и усилением агрегации в посттравматический период ЧМТ. При действии цитофлавина и мексикора нормализация морфоструктурных характеристик сопровождается восстановлением окислительно-восстановительного баланса и повышением метаболического статуса эритроцитов.

Впервые в экспериментах *in vivo* и *in vitro* показано непосредственное действие препаратов на эритроциты, так и опосредованное их влияние, обуславливающее повышение энергетического потенциала клеток. Доказана целесообразность использования мексикора и цитофлавина для сохранения морфофункциональных показателей и энергетической стабильности эритроцитов, что является необходимым элементом коррекции гипоксических состояний организма. Установленное улучшение морфофункциональных характеристик эритроцитов в сочетании с восстановлением гемокоагуляции и микроциркуляции при ЧМТ определяет ограничение вторичных повреждений мозга при использовании цитопротекторов.

Научно-практическая значимость

Обоснован подход, основанный на анализе нефиксированных эритроцитов методом фазово-интерференционной микроскопии в визуализации динамики метаболических процессов в эритроцитах при ЧМТ и действии цитопротекторов. Выявлены зависимости морфометрических показателей фазово-

интерференционных изображений эритроцитов от активности метаболических и окислительных процессов в посттравматический период ЧМТ, что позволяет существенно дополнить и упростить способы клеточной диагностики функционального состояния эритроцитов.

Полученные данные об изменении морфофункциональных показателей эритроцитов при действии цитофлавина и мексикора, которые в настоящее время наиболее широко используется в комплексной терапии сердечно-сосудистых и неврологических заболеваний, позволяют наметить новое направление их использования: в качестве корректора структурно-функциональных показателей эритроцитов при травме и расширить внедрение мексикора и цитофлавина в медицинскую практику.

Основные результаты работы могут быть включены в соответствующие разделы спецкурсов и лекций общего курса по физиологии человека и животных, патофизиологии и биомедицине.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Фазово-интерференционные показатели эритроцитов сочетаются с метаболической активностью клеток и содержанием гемоглобина, отражают динамику ЭФПЭ и агрегации эритроцитов, что сопряжено с состоянием гемостаза при ЧМТ и действии цитопротекторов.

2. Действие мексикора и цитофлавина определяет улучшение фазово-интерференционного профиля, электрокинетических, агрегационных, метаболических показателей эритроцитов на фоне восстановления гемостаза и микроциркуляции головного мозга в посттравматический период ЧМТ.

3. Мексикор и цитофлавин снижают уровень ПОЛ, уменьшают агрегацию эритроцитов, концентрацию АТФ и повышают ЭФПЭ в условиях энергодефицита при моделировании окислительного стресса, гипердреналемии и лактоацидоза в экспериментах *in vitro*.

4. Коррекция морфофункциональных показателей эритроцитов и микроциркуляторного русла способствуют уменьшению дисфункции вторичных повреждений мозга в посттравматический период при действии цитопротекторов.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 45 научных работ, из них 12 статей в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), рекомендованных Перечнем ВАК, и 33 тезиса конференций.

Достоверность полученных результатов

Достоверность научных результатов и выводов, полученных в работе, обусловлена использованием широко применяемых на практике в биологии и медицине методов оптической визуализации биологических объектов. Полученные данные подтверждены общепринятыми методами и соответствуют теоретическим выводам и обоснованиям.

Апробация работы

Основные материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на 67-ой ежегодной научной студенческо-аспирантской конференции «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2014), 68 областной научной конференции студентов и аспирантов «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2015), II Всероссийской XIII Межрегиональной с международным участием научной сессии молодых ученых и студентов «Современные решения актуальных научных проблем в медицине» (Нижний Новгород, 2015), XXII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2016), 69-ой Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2016), Volga Neuroscience Meeting 2018 (Санкт-Петербург – Нижний Новгород, 2016), III Всероссийской 14-й межрегиональной с международным участием научной сессии молодых ученых и студентов «Современное решение актуальных научных проблем медицины» (Нижний Новгород, 2017), 70-ой Всероссийской с

международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2017), Научной сессии молодых учёных и студентов «Медицинские этюды» (Нижний Новгород, 2018), 71-ой Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2018), XXIV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2018), объединенном Международном конгрессе «Congress on Open Issues in Thrombosis and Hemostasis совместно с 9-ой Всероссийской конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии» (Санкт-Петербург, 2018), 72-ой Всероссийской с международным участием школе конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2019), 24-ой Нижегородской сессии молодых ученых (технические, естественные, математические науки) (Нижний Новгород, 2019), VI Съезде физиологов СНГ (Сочи, 2019), IV Всероссийской с международным участием школе-конференции «Физиология и патология кровообращения» (Москва, 2020), VI Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием «VolgaMedScience» (Нижний Новгород, 2020), Российском Форуме по тромбозу и гемостазу совместно с 10-й (юбилейной) конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии (Москва, 2020), 73-ей Всероссийской с международным участием школе конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2020), 25-ой Нижегородской сессии молодых ученых (естественные, математические науки) (Нижний Новгород, 2020), XXVII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2021» (Санкт-Петербург, 2021), 74-я всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2021).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные представления о структурно-функциональной организации мембран эритроцитов

1.1.1. Структурная организация мембран эритроцитов

Эритроциты – двояковогнутые дискообразные безъядерные клетки, окруженные гибкой мембраной, которая позволяет осуществлять ионо- и газообмен в организме (Шульгинова, 2016; Maurya et al., 2016). Клеточная мембрана определяет пластичность эритроцитов, которая позволяет клетке принимать любую конфигурацию и свободно передвигаться через узкие кровеносные сосуды (Трошкина и др., 2007; Боровская и др., 2010). Форма эритроцита может изменяться в зависимости от различных физико-химических воздействий (Сашенков и др., 2011; Дерюгина, 2012; Fujino, 2000). Мембрана эритроцита представлена белковыми, липидными и углеводными компонентами (рисунок 1) (Kodippili et al., 2009; Ващенко, Вильяненко, 2019).

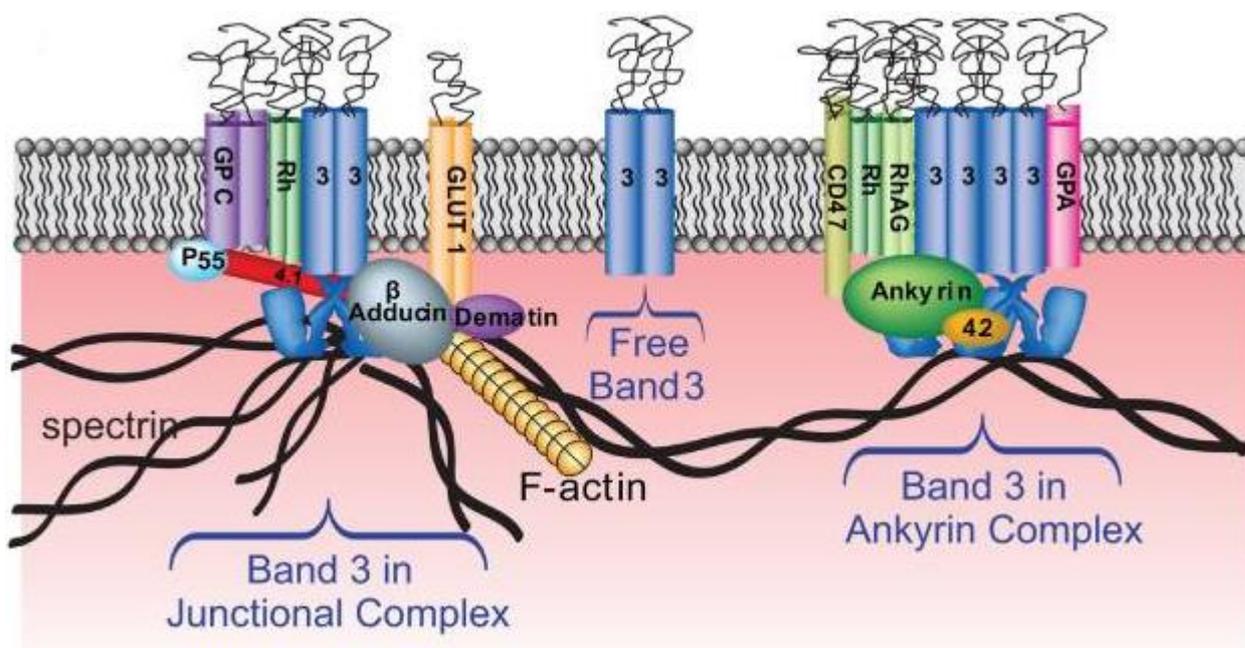


Рисунок 1. Схема расположения белковых структур и спектринового матрикса в бислое мембраны эритроцита (Kodippili et al., 2009).

Липидный бислой включает в себя различные типы фосфолипидов, сфинголипидов, гликолипидов и холестерин (Трошкина и др., 2007; Мороз и др.,

2012). Липиды в эритроцитарной мембране распределены асимметрично: фосфатидилхолин и сфингомиелин локализируются на внешней поверхности, фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин на внутренней. Холестерин, взаимодействуя с углеводородными цепями фосфолипидов, определяет текучесть и деформируемость мембраны (Murate et al., 2016; Arashiki, Takakuwa, 2017).

Поддержание и регуляция асимметричного расположения фосфолипидов определяются активностью скрамблазы, Mg-АТФ-зависимой аминофосфолипидтранслоказы (флиппаза или АТФ-аза II) и Mg-АТФ-зависимой фосфолипид-транслоказы (флопаза) (Pomorski and Menon, 2006; Contreras et al., 2010; Naggata et al., 2016). Флиппазы производят флиппирование, перенося фосфотидилсерин и другие липиды из наружного монослоя во внутренний. Флопазы осуществляют флоппирование: транспортируют сфинголипиды, холестерин, и фосфотидилхолин из внутреннего монослоя в наружный (Contreras et al., 2010; Arashiki, Takakuwa, 2017). Под действием различных сигналов может происходить выравнивание концентраций фосфолипидов между двумя слоями, этот процесс называется скремблинг. Скрамблазы не являются АТФ-зависимыми, а активируются при повышении внутриклеточного кальция (Шевченко, 2007; Akel et al., 2006; Naggata et al., 2016). Опосредованное скрамблазой перемещение фосфатидилсерина на внешнюю поверхность мембраны вызывает открывание Ca-активируемых K-каналов и высвобождение ионов калия из эритроцитов (Arashiki, Takakuwa, 2017). Это приводит к нарушению асимметрии фосфолипидов, гиперполяризации клеточной мембраны, активной везикуляции эритроцита, ускоренного уменьшения объема клетки и, как следствие, к апоптозу эритроцитов (Рыбина и др., 2001; Костин и др., 2004; Брызгалова и др., 2009; Муравлёва и др., 2013; Foller et al., 2008). Показано, что нарушение асимметрии фосфатидилсерина происходит в ответ на окислительный стресс и гипоэнергетическое состояние (Муравлёва и др., 2013; Arashiki, Takakuwa, 2017).

Скелет мембраны эритроцитов представляет собой псевдогексагональную сеть из спектрина, актина и связанных с ним белков (белков полос 4.1, 4.9,

аддуцин, тропомиозин и тропомодулин), которые образуют внутреннюю поверхность мембраны и прикрепляются к вышележащему липидному бислою через гликофорин и белок полосы 3 (рисунок 1). Мембранный скелет укрепляет липидный бислой и наделяет мембрану прочностью и гибкостью, тем самым позволяя выдерживать жесткие сдвиги напряжения в кровотоке (Муравьев и др., 2016; Lux, 2016; Yamaguchi and Fukuzaki, 2019).

Основным белком цитоскелета, отвечающим за целостность, прочность и деформируемость эритроцитов, является спектрин. Известно, что при снижении его количества, уменьшении числа связей с анкирином и нарушениях белка полосы 4.1 снижается поверхностная вязкость мембраны (Мороз и др., 2012; Муравьев и др., 2013; Черныш и др., 2020). В физиологических условиях спектрин эритроцитов имеет очень слабую связь с актином. Глобулярный белок полосы 4.1 латерально взаимодействуя с адудином, спектрином и актином, формирует тройные комплексы, которые помогают прикрепить мембранный скелет к мембране и стабилизировать структуру цитоскелета. По вертикали белок 4.1 связывает гликофорин С, белок р55, полосу 3 и кальмодулин в отдельных четко определенных областях, образуя мостик между белковой сетью и бислоем липидов (Salomao et al., 2008). Выявлена способность белка полосы 4.1 снижать стабильность спектринового комплекса, увеличивать пластичность мембраны и деформируемость клетки в результате его фосфорилирования протеинкиназой С (Муравьев и др., 2013; Minetti et al., 2004; Manno et al., 2005; Nunomura et al., 2006; Aoki, 2017). Критическую роль в фосфорилировании и регуляции формы играет уровень внутриклеточного Ca^{2+} в цитозоле (Ghosh et al., 2010).

Белок полосы 3 – интегральный полифункциональный белок эритроцитарной мембраны. Цитоплазматическая область белка полосы 3 (N – концевой терминальный домен канала) является ключевым местом связывания с тетрамером спектрина через анкирин, имеет сайты связывания с дезоксигемоглобином и рядом ферментов гликолиза (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, альдолаза) (Nunomura, 2000; Manno et al., 2005).

Гидрофобная область белка образует анионный канал, который участвует в пассивном транспорте анионов (Cl^- , HCO_3^- , OH^-), глюкозы и углекислого газа (Biswas et al., 2008; Lux, 2016). Известно, что белок полосы 3 на фоне увеличения активности пентозофосфатного пути способен ингибировать гликолиз в условиях гипербарической оксигенации. И, наоборот, в условиях сатурации усиливать гликолиз и снижать активность пентозофосфатного пути (Brazhe et al., 2009; Муравлёва и др., 2013).

Белок полосы 4.1, связываясь с гликофоринами С и D, обеспечивает прочную взаимосвязь с цитоскелетом, участвует в поддержании формы и механических свойств эритроцитарных мембран. Гликофорины А и В, способствуют формированию отрицательного поверхностного заряда, содержат 75% и 10% сиаловой кислоты от общего количества сиаловой кислоты мембраны эритроцитов соответственно, не связаны с цитоскелетом, что позволяет им легко высвободиться из мембраны эритроцитов. Уменьшение содержания главного гликофорина А (составляет примерно 1.6% от общего количества белков) значительно снижет подвижность эритроцитов (Aoki, 2017).

Известно, что в поддержании и сохранении двояковогнутой дискообразной формы эритроцитов принимают активное участие Na-K-АТФаза и Ca^{2+} -АТФ-аза (Трошкина и др., 2007; Боровская и др., 2010; Муравлёва и др., 2013; Kassak, 2006).

Ca^{2+} -АТФаза, отвечающая за транспорт ионов кальция из клетки, контролируется кальмодулином, кислыми фосфолипидами (в частности фосфатидилинозитолами, локализующимися преимущественно во внешнем слое мембраны), протеинкиназами А и С и калпаином (Verhoeven et al., 2006). Повышение внутриклеточного содержания свободных ионов кальция активирует калпаин-цистеиновую эндопептидазу и каспазу 3, что приводит к переносу фосфатидилсерина на внешнюю поверхность мембраны эритроцита, уменьшению объема клетки и запуску везикуляции (Рыбина и др., 2001; Костин и др., 2004; Брызгалова и др., 2009; Foller et al., 2008; Arashiki, Takakuwa, 2017).

Na-K -АТФаза, отвечающая за активный транспорт ионов Na^+ и K^+ против градиента концентрации, принимает участие в образовании мембранного потенциала, поддержании объема клетки и осмотического равновесия, тем самым контролируя разбухание или сжатие клетки (Боровская и др., 2010; Kassak, 2006). Активация Na-K -АТФазы зависит от соотношения АТФ, Ca^{2+} , Mg^{2+} и степени полимеризации актина. Ионы Ca^{2+} препятствуют, а Mg^{2+} способствуют полимеризации G-актина, тем самым оказывая активирующий эффект на Na-K-АТФазу (Шалабодов и др., 2015).

Структура цитоскелета регулируется определенным соотношением АТФ и Ca^{2+} , т.к. все мембранные белки, кроме актина, фосфорилируются кальцийзависимыми протеинкиназами, представленными в эритроцитах (Муравьев и др., 2013; Сергеева и др., 2015; Sridharan et al., 2012). Показано, что снижение активности АТФ-аз и накопление АФК в клетке приводит к уменьшению концентрации АТФ, накоплению ионов Ca^{2+} , активации фосфолипаз, перемещению фосфатидилсерина на наружную поверхность эритроцитарной мембраны, повышению проницаемости, уменьшению деформируемости мембраны, снижению активности ферментов и, как следствие, к запуску апоптоза эритроцитов (Зинчук, 2001; Voccoli et al., 2014; Murate et al., 2016). Накопление ионов Ca^{2+} в клетке способствует активации Ca^{2+} -чувствительных ферментов: фосфолипаз, фосфатаз, трансглутаминаз, калппаин и киназ (Ващенко и др., 2019; Sarang et al., 2007). При этом происходит изменение проницаемости мембраны, что приводит к изменению межмолекулярных взаимодействий и трансформации формы эритроцита (Кленова и др., 2009; Minetti et al., 2004; Manno et al., 2005; Nunomura et al., 2006). Так, при инкубации изолированных эритроцитов с АТФ количество дискоцитов уменьшается, а число эхиноцитов увеличивается в 2 раза (Бочкарева, 2016; Yamaguchi and Fukuzaki, 2019).

1.1.2. Функциональные показатели в реализации структурных свойств эритроцитов

Эритроциты на своей поверхности несут избыточный отрицательный заряд, который определяет электростатическое отталкивание и обеспечивает эффективное функционирование эритроцитов в кровотоке (Golub, Pittman, 2008). Электрический заряд эритроцитов формируют сиаловые кислоты, некоторые виды α -карбокисильных групп и слабых основных групп (Боровская и др., 2010; Кудрявцева, 2018; Hsu et al., 2003). 60-90% отрицательного заряда клетки определяют сиаловые кислоты (Сашенков и др., 2011; Fernandes et al, 2011; Simmonds et al., 2013). Определение электрического заряда эритроцита, функцией которого является ЭФПЭ, проводят методом клеточного микроэлектрофореза (Головецкий, 2007; Крылов, 2010). Показано однонаправленное изменение ЭФПЭ при различных экстремальных воздействиях и патологиях (Antipenko et al., 2017; Бояринов и др., 2016; Дерюгина и др., 2018). При активации симпатoadренальной системы наблюдается снижение ЭФПЭ, напротив, при активации гипofизарно-надпочечниковой системы и включении адаптационных процессов в организме ЭФПЭ повышается (Крылов и др., 2010). Однотипная динамика изменения ЭФПЭ, выражающаяся в снижении (первая фаза) с последующим её повышением (вторая фаза) и восстановлением по мере отмены стресса, позволяет использовать данный показатель как маркер выраженности стрессовой реакции (Сашенков и др., 2011; Deryugina et al., 2017).

Электрокинетические свойства мембраны эритроцитов зависят от взаимодействия белков, содержания АТФ и ионов, в первую очередь, ионов кальция (Кузник, 2004; Сашенков и др., 2011). Модификация интегральных белков, так и белков цитоскелета при изменении внутриклеточного уровня АТФ вызывает перераспределение поверхностного отрицательного заряда эритроцитов. АТФ, определяя дефосфорилирование белкового комплекса спектрин-актин-белок полосы 4.1, опосредует взаимодействие бислоя липидов с белками цитоскелета. При снижении концентрации АТФ уменьшается жесткость мембраны и пластичность клетки в целом (Betz et al., 2009; Yamaguchi, Fukuzaki,

2019). Уменьшение концентрации АТФ приводит к накоплению ионов натрия и воды в клетке, снижению механической и осмотической устойчивости эритроцита, ускорению процессов разрушения (Tellone et al., 2019). Изменение концентрации АТФ не влияет на упорядоченность фосфолипидов в мембране, но при высоких концентрациях АТФ подвижность их максимальна (Боровская и др., 2010; Дерюгина и др., 2017).

Наряду с АТФ важное значение в стабилизации мембраны эритроцита имеет 2,3-ДФГ, который образуется в боковом пути гликолиза и служит важным аллостерическим регулятором связывания кислорода с гемоглобином (Jensen, 2004). Этот метаболит обратимо взаимодействует с комплексом спектрин-актин-белок 4,1 (Glenn, Armstrong, 2019), придавая при этом необходимую эластичность мембранному каркасу. Увеличение концентрации в эритроцитах 2,3-ДФГ улучшает деформацию клеток (Зинчук, 2001; Goodman et al., 2007; Brazhe et al., 2009). Кроме того, рассмотрена потенциальная роль 2,3-ДФГ в качестве «ловушки» для свободных радикалов: в физиологической концентрации 2,3-ДФГ способен улавливать гидроксильный радикал, пероксильный радикал, катион-радикалы, хелатировать железо в восстановленном состоянии и предотвращать окисление железа внутри гемоглобина (Tellone et al., 2019).

Изменения белок-липидных взаимодействий, модификация структуры мембраны, снижение содержания сиаловой кислоты и поверхностного отрицательного заряда, способствуют уменьшению деформации, повышению агрегации эритроцитов, нарушению реологических показателей крови и инициированию процесса тромбообразования (Боровская и др., 2010; Baskurt, 2007; Fernandes et al, 2011; Simmonds et al., 2013). При нарушении целостности мембраны эритроцитов и их проницаемости наблюдается высвобождение из них прокоагулянтов: эритроцитина и АДФ, которые способствуют усилению гемостаза (Дерюгина и др., 2015; Соколова, 2010; Meiselman, 2006).

Структурная модификация мембраны эритроцитов во многом определяется активацией рецепторов при изменении гомеостаза организма. На

фоне активации аденилатциклазного сигнального пути происходит увеличение мембранной эластичности и деформируемости эритроцитов, снижение степени агрегации, тогда как при снижении его активности и активации кальциевого сигнального пути отмечаются обратные микрореологические изменения (Муравьев, 2013; Meiselman et al., 2007; Minetti et al., 2007). Агрегация клеток снижается при увеличении активности системы аденилатциклаза-цАМФ и уменьшении концентрации ионов кальция, а при истощении АТФ и значительном увеличении содержания цитоплазматического кальция повышалась (Муравьев и др., 2016; Тихомирова, Муравьев, 2007; Соколова, 2010).

Таким образом, эритроциты, являясь специализированными клетками, играют существенную роль в поддержании гемодинамических и реологических показателей крови, задействуя различные пути ответа на внешнее воздействие. Изучение механизмов изменения морфологических и функциональных параметров эритроцитов является актуальной задачей и обусловлено важностью участия эритроцитов в кислородтранспортной функции крови, а также гомеостатического состояния всего организма.

1.1.3. Влияние про- и антиоксидантной систем на мембрану эритроцитов

Эритроциты – клетки богатые полиненасыщенными жирными кислотами, кислородом и железом являются легкой мишенью для свободных радикалов (Maurya et al., 2015). АФК вступают в химические реакции с липидными компонентами мембраны, в первую очередь с ненасыщенными жирными кислотами тем самым инициируя процессы ПОЛ (Землянских, Бабийчук, 2019). Наиболее распространенные АФК, оказывающие негативное влияние на билипидный слой мембраны клеток – гидроксильный радикал ($\bullet\text{OH}$) и гидропероксил ($\text{HO}_2\bullet$) (Blanco et al., 2004).

Гидроксильный радикал ($\bullet\text{OH}$) представляет собой небольшую короткоживущую молекулу, которая может образовываться из кислорода в окислительно-восстановительном цикле (реакции Фентона и Габера-Вейса) в процессе клеточного метаболизма и различных стрессовых условиях (рисунок 2).

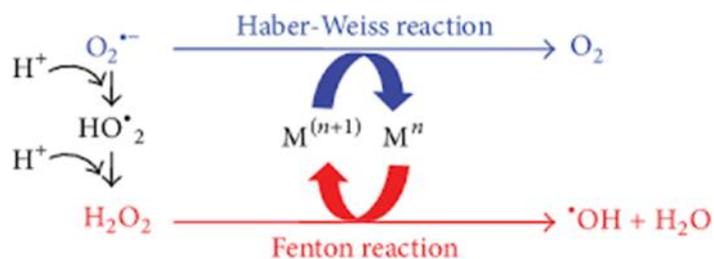


Рисунок 2. Реакции Фентона и Хабера-Вайса. Haber-Weiss reaction – реакция Хабера-Вайса; Fenton reaction - реакция Фентона; Mn – переходные металлы; $M(n+1)$ – окисленная форма переходных металлов (Ayala et al., 2014).

Гидропероксильный радикал (HO_2^{\bullet}) – более сильный окислитель, который образуя H_2O_2 может реагировать с активными окислительно-восстановительными металлами, такими как железо или медь с дальнейшим образованием HO^{\bullet} посредством реакций Фентона или Габера-Вейсса. Кроме того, гидропероксильный радикал способен инициировать цепное окисление полиненасыщенных фосфолипидов, что приводит к нарушению мембрано-цитоскелетного комплекса (Муравлёва и др., 2013; Землянских, Бабийчук, 2019; Kuhn et al., 2017; Bayır et al., 2020).

Общий процесс ПОЛ состоит из трех стадий: инициация, продолжение и обрыв цепной реакции (Ayala et al., 2014).

1 стадия – фаза инициации. Свободный кислородный радикал взаимодействует с жирной кислотой, имеющей ненасыщенные связи, отделяет алкильный атом водорода и образует липидный радикал (L^{\bullet}).

2 стадия – фаза продолжения цепной реакции. Липидный радикал (L^{\bullet}) реагирует с кислородом и образует липидный пероксидный радикал (LOO^{\bullet}), который отщепляет водородный атом от другой близлежащей липидной молекулы, образуя новый L^{\bullet} (который продолжает цепную реакцию) и неустойчивый липидный гидропероксид ($LOOH$).

3 стадия – фаза обрыва цепной реакции. Антиоксиданты, например, витамин E, отдают атом водорода липидному пероксидному радикалу LOO^{\bullet} , что приводит к образованию нерадикальных продуктов (рисунок 3).

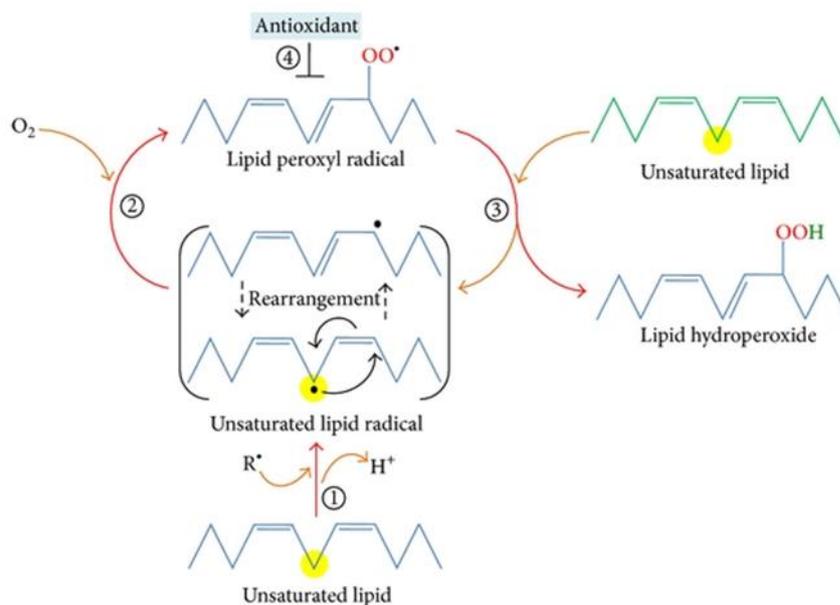


Рисунок 3. Процесс перекисного окисления липидов (Ayala et al., 2014). R^\bullet – липидный алкильный радикал; unsaturated lipid – ненасыщенный липид; unsaturated lipid radical – ненасыщенный липидный радикал; rearrangement – преобразование; lipid peroxy radical – пероксидный радикал; lipid hydroperoxide – липидный гидропероксид.

В результате ПОЛ образуются первичные, вторичные и конечные молекулярные продукты окисления, играющие важную роль в структурной перестройке биомембран и изменении их физико-химических свойств (Maurya et al., 2015). К первичным продуктам ПОЛ относятся гидроперекиси, эндперекиси и диеновые конъюгаты, избыточное образование которых приводит к потере целостности мембраны, инактивации мембраносвязанных белков, ферментов гликолиза и цикла трикарбоновых кислот. В отличие от радикалов они легко могут диффундировать через мембрану и ковалентно модифицировать любой белок вдали от места их происхождения (Baig et al., 2020). При этом клетки теряют способность к восстановлению, запрограммированы на гибель путем апоптоза или некроза, имеют молекулярные повреждения, которые могут способствовать развитию патологических состояний (Reis et al., 2012; Volinsky et al., 2013).

К вторичным продуктам ПОЛ относят кислородсодержащие соединения: альдегиды и диальдегиды, в частности, МДА, алканали, алкенали, гидросиалкенали и триеновые конъюгаты (Bayir et al., 2020). МДА - бифункциональный электрофильный альдегид, реакционная способность которого зависит от рН. При снижении рН среды увеличивается его реакционная способность. Повышенный уровень МДА приводит к изменению функциональной активности ферментных белков, белков цитоскелета и антиоксидантных систем, перераспределению поверхностного заряда и нарушению функциональной целостности клетки (Maurya et al., 2015).

Вторичные продукты, взаимодействуя с N-концевыми остатками аминокислот, белков и аминокруппами фосфолипидов, образуют конъюгированные флуоресцирующие соединения типа оснований Шиффа, которые обладают большой реакционной способностью и могут производить межмолекулярные “сшивки”, вступать в реакции полимеризации и поликонденсации. Поскольку эти соединения являются более стабильными, то их утилизация в организме происходит с очень низкой скоростью, поэтому они накапливаются в тканях организма (Maurya et al., 2015; Bayir et al., 2020).

Эритроциты снабжены мощной системой антиоксидантной защиты, которая позволяет поддерживать баланс активирующих и подавляющих факторов в клетке. Важнейшим ферментом регуляции скорости антиоксидантной защиты клетки является супероксиддисмутаза, которая катализирует реакцию дисмутации супероксидного анион-радикала с образованием пероксид водорода (Rodríguez-Rodríguez et al., 2014). Вторая линия ферментативной защиты клетки, участвующая в превращении $H_2O_2 \rightarrow H_2O$, представлена каталазой и пероксидазами. Глутатионпероксидаза, в качестве субстратов использует перекись водорода, органическую перекись и перекись ненасыщенных жирных кислот (Kuhn et al., 2017; Ighodaro et al., 2018; Bayir et al., 2020).

1.2. Гемомикроциркуляция

Согласно современным представлениям, ключевая роль в поддержании гомеостаза принадлежит системе гемомикроциркуляции, структура которой включает 4 звена: 1 – звено притока артериальной крови (артериолы, прекапилляры); 2 – обменное звено, состоящее из капиллярных сетей; 3 – звено оттока венозной крови (посткапилляры, венулы); 4 – звено, содержащее коллатерали и соустья (анастомозы). Главная функция системы гемомикроциркуляции – гемотканевый обмен, реализация которой напрямую зависит от адекватного кровообращения в микроциркуляторном русле, поддержания оптимального режима транспорта газов и нормальной деформируемости эритроцитов (Андрианова, Рывкин, 2008). Ухудшение последнего показателя приводит к снижению степени насыщения крови кислородом, запуску механизма выхода АТФ и АДФ из эритроцитов в плазму крови (Карпун и др., 2013; Чумакова и др., 2018; Wan et al., 2011; Kuhn et al., 2017). Активированные эритроциты способствуют интенсификации процесса свертывания крови за счет чрезмерного высвобождения из них прокоагулянтов (тромбоциты – факторы 3 и 4, эритроциты – эритроцитин и АДФ, ткань – тканевой тромбопластин) и усиления агрегации клеток (Бояринов и др., 2016; Kuhn et al., 2017). Стимуляция и взаимодействие факторов свертывания крови осуществляется на отрицательно заряженных фосфолипидах (фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин) мембраны эритроцита (Naggata et al., 2016; Arashiki, Takakuwa, 2017). Процесс гемокоагуляции регулируется внутриклеточным кальцием, фосфолипидными скрамблазами и флиппазами (Contreras et al., 2010; Arashiki, Takakuwa, 2017).

Кроме того, эритроциты участвуют в регуляции местного сосудистого сопротивления и тем самым обеспечивают эффективную доставку кислорода в тканевые микрорайоны (Муравьев и др., 2013). Эритроциты рассматривают как своеобразные «сенсоры» гипоксии. Количество выделяемого ими АТФ пропорционально степени десатурации оксигемоглобина в веноулярном отделе

микроциркуляторного русла. Вышедший АДФ из АТФ связывается с пуринергическими рецепторами эндотелиальных клеток посткапиллярных венул, тем самым стимулирует выделение ими оксида азота, который вызывает дилатацию рядом расположенных артериол (Муравьев и др., 2013; Мороз и др., 2016). Выход АТФ из эритроцитов может быть связан с их механической деформацией при прохождении через узкие капилляры, закислением среды, избыточным количеством CO_2 в крови, турбулентностью потока крови, умеренным повышением температуры, что может существенно модифицировать прирост внеклеточного АТФ в условиях гипоксии (Лунева и др., 2015; Wan et al., 2008; Kalsi, Gonzalez-Alonso, 2012).

1.3. Изменения в организме при ЧМТ

В раннем посттравматическом периоде ЧМТ запускаются сложные каскадные реакции во всех функциональных системах организма, которые приводят к их перенапряжению вплоть до истощения и формированию гипоксии смешанного характера (Marklund, Hillered, 2011; Kinoshita, 2016; Montivero et al., 2021). Первичные повреждения, связаны непосредственно с воздействием механических факторов, запускают различные патофизиологические механизмы и инициируют множественные биохимические и иммунологические деструктивные процессы, в значительной степени обусловленные развитием гипоксии и усугубляющие тяжесть поражения мозга. В результате инициации происходит значимое нарушение ионного гомеостаза и метаболического статуса клетки, повышение уровня эксайтотоксичности и ионов кальция, что приводит к развитию окислительного стресса, изменениям в экспрессии генов и активации кальций-зависимых протеаз, включая каспазы, кальпайны и фосфолипазы, и как следствие к обширному повреждению цитоскелета клеток (Пурас и др., 2012; Holland et al., 2003; Algattas et al., 2014; Roth et al., 2014; Faden et al., 2015; Kinoshita, 2016).

Изменения, возникающие в результате первичного повреждения, инициируют деструктивные биохимические процессы как в клетках,

расположенных в области механического повреждения, так и интактных клетках мозга (Пурас, 2012; Smith, 2003; Nay, 2015). Механизмы последовательного ишемического каскада головного мозга приводят к нарушению гематоэнцефалического барьера, формированию отёка мозга, и как следствие дисфункции или гибели нейронов и глиальных клеток (Stoica, Fade, 2010; Kinoshita, 2016; Montivero et al., 2021).

В основе изменений, возникающих при ЧМТ, лежит активация процессов свободнорадикального окисления параллельно с уменьшением активности антиоксидантной системы защиты и метаболизма нейронов и глии (Marklund, Hillered, 2011; Abdul-Muneer, 2015). Снижение или сбой непрерывной генерации антиоксидантной способности приводит к избыточному накоплению активных форм кислорода, оказывающих разрушительное воздействие на всех уровнях жизнедеятельности организма (Quillinan, 2016). Образующиеся молекулярные продукты окисления, попадая в сосудистое русло, являются мощным стимулом развития сосудистых и морфологических нарушений (Itoh, 2012; Kenney et al., 2016). Ключевая роль в развитии инволютивных изменений сосудистой стенки принадлежит эндотелию. Системное повреждение эндотелиоцитов обусловлено тем, что они расположены на границе между кровью и тканями и, поэтому первыми реагируют на патогенные факторы, которые формируются после ЧМТ (Фирсов и др., 2014; Кан и др., 2015; Aird, 2007). Проведенные клинические исследования выявили, что дисфункция эндотелия выявляется уже на ранних стадиях болезни (Корж, 2003; Шилов и др., 2018; Бояринов и др., 2016; Винник и др., 2018; Фирсов, Матвеев, 2014). В этой связи эндотелиоциты являются органами-мишенями при травмах и нарушениях гемостазиологического статуса (Фирсов и др., 2014).

На фоне развивающейся гипоксии в организме происходят изменения в структуре и составе красных клеток крови. Согласно литературным данным у пациентов в раннем посттравматическом периоде наблюдаются морфоструктурные нарушения эритроцитов, которые приводят к снижению

кислородтранспортной функции, замедлению микрокровотока, гиперкоагуляции, диapedезу, местному вазоспазму, увеличению вязкости крови, вызывая блокаду микроциркуляции не только в головном мозге, но и в интактных тканях на момент развития острого центрального синдрома (Кармен и др., 2011; Муравьев и др., 2012; Карпун и др., 2013; Кан и др., 2015; Kenney, 2016; Montivero et al., 2021).

Непосредственное повреждение вещества головного мозга в момент травмы, нарушение мозгового кровообращения и динамики цереброспинальной жидкости, формирование рубцовоспаечных процессов, аутонейросенсибилизация приводят к формированию психоневрологических, когнитивных, эмоциональных и поведенческих нарушений в посттравматическом периоде (Лихтерман, 2016; Benedictus, 2010; Alder et al., 2011; Nguyen, 2011; McDonald et al., 2016; Немкова, 2019). Поскольку процессы вторичного повреждения мозга преобладают над процессами нейрорегенерации и нейрорепарации в клетках, ведущим принципом реабилитации последствий ЧМТ является раннее и адекватное лечение острых явлений, так и предупреждение возможных последствий и осложнений (Крылов, Пурас, 2013; Stoica, Faden, 2010). Поэтому для купирования негативных изменений, возникающих при ЧМТ, необходимо обеспечить раннюю коррекцию гипоксического состояния и восстановление гомеостаза клеточных и субклеточных мембран.

Таким образом, изучение механизмов развития посттравматических изменений структурно-функциональных и метаболических показателей эритроцитов, ангио- и цитоархитектоники головного мозга и их коррекции в раннем посттравматическом периоде ЧМТ имеет важное как научное, так и прикладное значение.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Характеристика материалов исследования

Работа выполнена на кафедре физиологии и анатомии Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского (зав. кафедрой – д.б.н., доцент Дерюгина А.В.).

Исследование включало эксперименты *in vivo* и *in vitro*. Схема проведенных исследований представлена в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика исследований

Экспериментальная часть		
Этапы	Направление исследований	Кол-во животных
Исследование структурного, функционально-метаболического состояния эритроцитов при моделировании ЧМТ	ЭФПЭ, агрегация эритроцитов, МДА, каталаза, измерение активности Na-K-АТФазы, определение 2.3-ДФГ и АТФ в эритроцитах, морфометрия эритроцитов методом лазерной модуляционной интерференционной микроскопии, количество эритроцитов, гемоглобин	200 крыс
Исследование действия стресс-факторов на эритроциты	ЭФПЭ, агрегация эритроцитов, МДА, определение 2.3-ДФГ и АТФ в эритроцитах	Образцы крови 40 крыс <i>in vitro</i>
Исследование гемокоагуляции в	Цельная кровь: тромбопластиновое время, конец	80 крыс

посттравматический период ЧМТ	свертывания, продолжительность процесса свертывания, начало ретракции и фибринолиза. Плазма крови: Исследование активированное частичное тромбопластиновое время, протромбиновое время, фибриноген	
Исследование морфофункционального состояния головного мозга и моторной функции крыс в посттравматический период ЧМТ	Световая микроскопия Метод передвижения по бруску	70 крыс

Исследование *in vivo* было проведено на 350 белых нелинейных крысах – самках (14 недель), массой 180 ± 20 г. Животные были получены из питомника лабораторных животных филиала «Андреевка» ФГБУН БМТ ФМБА России, Московская область. Животных содержали в виварии, оборудованном согласно требованиям «Санитарных правил проектирования, оснащения и содержания экспериментальных и биологических клиник (вивариев)» (СР 2.2.1.3218-14) (постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29.08.2014 № 51). Содержание и оперативные вмешательства осуществляли в соответствии с нормативами, данными в руководстве «Guide for care and use of laboratory animals» и требованиями приказа Министерства здравоохранения РФ от 1.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». Протокол исследования утвержден

Локальным этическим комитетом на проведение научных исследований с использованием животных в качестве объектов исследования ФГАОУ ВО «ННГУ им. Н.И. Лобачевского» 4 июля 2014 г. Животные содержались в искусственном 12-часовом цикле ночного освещения (освещение в 07:00) при постоянной температуре 21 ± 2 ° С (влажность $50 \pm 5\%$). Животные находились в одинаковых пластиковых клетках с поилками, получали полноценный экструдированный комбикорм и достаточное количество воды. Часть исследований проводили на цельной крови и отмытых эритроцитах животных. Забор крови для анализа производили из подъязычной вены крыс. Другую часть исследований проводили на изолированном головном мозге после декапитации крыс.

2.2. Модели исследования

Моделирование черепно-мозговой травмы у крыс

Травму наносили без анестезии на неповрежденный череп, без предварительных манипуляций (Цымбалюк, Кочин, 2008). Крыс фиксировали на планшете. Животным из цилиндрической трубы ($\varnothing 20$ мм), жестко закреплённой на штативе двумя держателями и центрированной над теменно-затылочной областью черепа, падал металлический груз массой 100 г с высоты 80 см. Голова животного при этом была не зафиксирована. Приложение такой механической энергии обеспечивало моделирование сотрясения головного мозга, очаговые повреждения, ушиб мозга, который сопровождается формированием эпидуральных и субдуральных гематом (Цымбалюк, Кочин, 2008; Flierl et al., 2009). Летальность при падении груза составила 0-10%, а время рефлекторного выпрямления 2 - 4 мин. Это указывает на развитие легкой ЧМТ (Alder et al., 2011). Сразу после травмы у крыс наблюдались асфиксия, судороги, кровотечения и т.д. Через 30 – 40 мин отмечалось восстановление к нормальному режиму жизни и питания. Животные, погибшие ($n = 2$) во время экспериментов, были исключены из исследования.

Крысы были разделены на четыре экспериментальные группы. Первая группа – «интактные» – животные без воздействия. Вторая группа – животные после ЧМТ, которым вводили мексикор (ООО «ЭкоФармИнвест», г. Москва) в дозе 8,0 мг/кг в сут. Третья группа – «цитофлавин» – животные после ЧМТ, которым вводили цитофлавин (ООО «НТФФ «Полисан», г. Санкт-Петербург) в дозе 0,2 мл/кг в сутки. Четвертая группа – «контроль» – животные после ЧМТ, которым вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. Препараты вводили ежедневно в течение 10 суток внутривентриально. Первое введение препаратов осуществляли через 1 час после моделирования ЧМТ. Уровень физиологической нормы определяли у интактных животных. Образцы крови брали из подъязычной вены на 1, 3, 7 и 12 сутки после нанесения травмы.

Модели стрессового воздействия *in vitro*

Модельные исследования *in vitro* проводили на предварительно отмытых эритроцитах. В экспериментах использовали эритроциты в физрастворе (1:1). Каждая серия включала по 20 опытов. Окислительный стресс моделировали путем добавления к фракции отмытых эритроцитов 25 мМ раствора $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ с последующей инкубацией 30 мин. при 37°C (Rise-Erans et al., 1987). Гиперадреналемию осуществляли путем инкубации эритроцитов в течение 30 мин с адреналином (1×10^{-9} г/мл), что соответствует его концентрации в организме при стрессовой реакции. Лактатную модель гипоксического состояния моделировали инкубацией эритроцитов при 37°C в течение 30 мин с 10 мМ/л раствором молочной кислоты, что соответствует концентрации, имитирующей умеренный ацидоз (Boning et al., 1989). Контролем служили клетки, инкубированные с физиологическим раствором. Во всех сериях проводили исследование действия мексикора (2×10^{-6} г/мл эритроцитов) и цитофлавина (1×10^{-4} мл/мл эритроцитов) на эритроциты, инкубируя их с цитопротекторами в течение 30 мин.

2.3. Методы исследования

Определение электрофоретической подвижности эритроцитов (Deryugina et al., 2017)

Определение ЭФПЭ проводили микрометодом, который основан на измерении под микроскопом в горизонтальной микрокамере с помощью секундомера и окулярной сетки перемещения эритроцитов в электрическом поле. Концентрация взвеси эритроцитов в трис-НСl буфера (рН=7.4) составляла 0.02%. Расстояние, на которое перемещались клетки – 100 мкм, сила тока 8 мА. В каждой пробе фиксировали перемещение 10 клеток. Рассчитывали ЭФПЭ по формуле:

$$U=S/tH,$$

где S – расстояние, на которое переместились исследуемые клетки в микронах;
 t – время в секундах, в течение которого клетки переместились на указанное расстояние;

H – величина градиента потенциала в v/cm ,

U – подвижность клеток в $\mu \cdot \text{сек}^{-1} \cdot \text{v}^{-1} \cdot \text{cm}$ ($\text{мкм см В}^{-1} \text{ с}^{-1}$).

$$H=I/qx,$$

где I – сила тока в А,

q – поперечное сечение камеры в см^2 ,

x – удельная электропроводность среды в Ω^{-1} .

Определение агрегации эритроцитов (Дерюгина и др., 2006)

Агрегацию эритроцитов определяли путем расчета процента неагрегированных эритроцитов от общего числа эритроцитов в камере Горяева. В качестве стимулятора агрегации использовали раствор голубого декстрана Т-2000 (20 мг/мл) в трис НСl-буфере (рН=7.4).

Уровень агрегации (А) рассчитывали по формуле:

$A=100\% - (\text{число свободных (неагрегированных) эритроцитов} \times \text{общее число эритроцитов}^{-1} \times 100\%)$.

Определение концентрации малонового диальдегида в эритроцитах (Лившиц, 2007)

Концентрацию малонового диальдегида (МДА) в эритроцитах оценивали спектрофотометрически по образованию комплекса с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Для получения триметинового комплекса к 0.1 мл взвеси отмытых эритроцитов добавляли 1.9 мл воды, 2 мл 30% трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и 2 мл 0.75% ТБК и кипятили в течение 15 минут. После охлаждения и центрифугирования измеряли оптическую плотность при зеленом светофильтре (532 нм.). Концентрацию МДА (С) рассчитывали по формуле:

$C = D \cdot 50 / 1.56$ (нМоль/мл эритроцитов), где D – оптическая плотность, 50 – разведение, 1.56 – молярный коэффициент экстинкции МДА.

Определение активности каталазы в эритроцитах (Beers, Sizer, 1952)

Активность каталазы отмытых эритроцитов оценивали спектрофотометрически при длине волны 240 нм по количеству перекиси водорода образующейся в пробе. Исследование уровня пероксида проводили в опытной пробе сразу и через 20 секунд после внесения H_2O_2 в кювету, которая содержала: 1.9 мл фосфатного буфера, 0.1 мл гемолизата эритроцитов (разведение 1:100) и 1.0 мл 30мкМ раствора H_2O_2 , которую вносили непосредственно при фотометрировании. Контроль включал гемолизат эритроцитов в фосфатном буфере.

Активность каталазы (А) рассчитывали по формуле:

$$A = \lg(E_1/E_2) \times 120\,000/Hb,$$

где E_1 , E_2 — экстинкция опытной пробы сразу и через 20 сек. после внесения H_2O_2 ;

Hb — количество гемоглобина в г/л.

Определение активности Na-K-АТФазы (Казеннов и др., 1984)

Активность Na-K-АТФазы исследовали в отмытых эритроцитах по измерению оптической плотности неорганического фосфата на фотометре фотоэлектрическом КФК-3 при длине волны 660 нм. Для определения активности

Na-K-АТФазы к 0.5 мл гемолизата эритроцитов добавляли стандартную инкубационную среду: 1.2 мл трис – HCl, 0.2мл MgCl₂, 0.2 мл NaCl, 0.2 мл KCl и 0.2мл АТФ. Пробы (опыт, контроль) выдерживали в водяной бане в течение 45 минут при 37⁰С. Затем в опытную пробу добавляли 1 мл ТХУ и обе пробирки центрифугировали при 1500 оборотов в минуту.

Для определения количества Рн к 2 мл ТХУ-фильтрата (опыт, контроль) добавляли 0.25 мл аскорбиновой кислоты, 0.25 мл молибденовокислого аммония и 0.5 мл стабилизирующего реактива и через 15 минут определяли Рн фотоэлектрически. Концентрацию Рн определяли по калибровочной кривой, используя стандартный раствор КН₂РО₄.

Определение содержания 2.3-ДФГ и АТФ (Виноградова и др., 1980; Boyarinov et al., 2017)

Концентрацию АТФ и 2.3-ДФГ определяли неэнзиматически по содержанию неорганического фосфата на фотометре фотоэлектрическом КФК-3 при длине волны 660 нм.

Готовили ТХУ фильтрат: к гемолизированным эритроцитам добавляли 12% ТХУ и центрифугировали при 3000 оборотов в минуту. ТХУ фильтрат делили на 2 части: для определения АТФ и 2.3-ДФГ.

Определение АТФ

1 мл ТХУ фильтрата, 1 мл 2Н HCl кипятили в течение 7 минут и к охлажденному гидролизату добавляли 1 мл 2Н NaOH. В 0.5 мл полученного раствора определяли неорганический фосфор (Рн), в состав которого входил Рн, отщепившийся от АТФ после гидролиза и Рн до гидролиза (пробирка 1).

Определение 2.3-ДФГ

1.5 мл ТХУ фильтрата, 100 мг активированного угля центрифугировали со скоростью 1500 оборотов в минуту для удаления нуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ) из пробы. Центрифугат фильтровали через бензольный фильтр. В 0.5 мл фильтрата определяли Рн (пробирка 2) находящийся в пробе до гидролиза. Оставшиеся 0.5 мл фильтрата подвергали озолению: к пробе добавляли 0.5 мл 5%

раствора нитрата магния и нагревали на песчаной бане до полного испарения жидкости (в течение часа). Затем пробу сжигали на спиртовке до появления бурого дыма в пробирке. После охлаждения содержимое пробирки растворяли в 0.5 мл 0.36N H₂SO₄. Определяли Рн, присутствующий после сжигания (пробирка 3). Вычисляли Рн, который включал в себя Рн – до сжигания и Рн, присутствующий после сжигания, т.е. фосфор, содержащийся в 2.3 – ДФГ.

Определение неорганического фосфора

Определение Рн проводили однотипно во всех трех пробирках, добавляя 0.36 N серной кислоты до 1 мл; 0.25 мл 4,6% аскорбиновой кислоты, 0.25 мл 0.9% молибденовокислого аммония, 0.5 мл стабилизирующего раствора (9% цитрата Na, 9% мышьяковистый Na, 9% уксусная кислота в равных объемах).

Анализ свертывания крови (Булавкин и др., 2003)

проводили на коагулометре Н-338-1П (Краснодар, Россия) определяя тромбопластиновое время, конец и продолжительность свертывания крови, время начала ретракции и фибринолиза. Пробу крови (0.28 мл) помещали в ячейку из фторпласта, на дне которой вмонтированы два электрода из нержавеющей стали, через которые проходил электрический ток. Находящаяся в ячейке кровь, стекая с электродов, замыкала и размыкала их. По мере свертывания крови перемещение её по ячейке замедлялось, нарушалось прохождение тока. Возникающие периодические импульсы в процессе свертывания крови записывались на диаграммной ленте с помощью самописца. Регистрировали следующие показатели:

1. Начало свертывания (тромбопластиновое время) T₁ – время от начала исследования до первого колебания с уменьшенной амплитудой;
2. Конец свертывания (T₂) – время от начала исследования до первого колебания с минимальной амплитудой;
3. Продолжительность процесса свертывания (T₃) – время от первого колебания с уменьшенной амплитудой до первого колебания с минимальной амплитудой.

4. Начало ретракции и фибринолиза (Т4) – время от начала исследования до первого колебания с увеличенной амплитудой, следующего после окончания свертывания.

Исследование свертывающей системы плазмы крови

проводили на анализаторе АПГ4-01 «Минилаб 704» (Москва, Россия) с помощью стандартных наборов реагентов фирмы НПО РЕНАМ (Москва, Россия), определяли активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), фибриноген (ФБ) в плазме крови.

Исследование гематологических показателей

На гематологическом анализаторе «Abacus Junior» 30ND (Diatron, Австрия) определяли количество эритроцитов (RBC) и концентрацию гемоглобина (HGB).

Метод лазерной сканирующей микроскопии

Методом лазерной модуляционной интерференционной микроскопии на микроскопе МИМ-340 (Уральский оптико-механический завод им. Э.С. Яламова, Россия) изучали комплексную фазометрию эритроцитов.

Принцип лазерной модуляционной интерференционной микроскопии основан на измерении локальных фаз света, отраженного объектом. В приборе лазерный луч делится на опорный (контрольный) и объектный лучи. Опорный луч отражается от контрольного зеркала и идет на детектор. Объектный луч проходит через объект, помещенный в специальную камеру с зеркальным дном, отражается от зеркальной подложки, снова проходит через объект и тоже идет на детектор, где интерферирует с первым лучом. За счет разницы в показателях преломления среды и объекта между лучами возникает оптическая разность хода, иначе называемая фазовая высота.

Оптическая разность хода (H_{Φ}) выражается следующим образом:

$$H_{\Phi} = \frac{\varphi_{\circ} - \varphi_{obj}}{2\pi} \cdot \frac{\lambda}{2} - \Phi_{\circ},$$

где φ_{\circ} — начальная фаза луча, φ_{obj} — фаза луча, прошедшего через объект, λ — длина волны лазера, Φ_{\circ} — постоянный фазовый сдвиг, который задается в начале эксперимента.

Значения фазовой высоты в каждой точке объекта формируют фазовое изображение объекта. Для всех клеток фазовое изображение зависит от геометрических размеров клетки и распределения показателя преломления (Браже и др., 2009). Фазовое изображение в плоскости (x, y) может быть описано интегралом

$$h(x, y) = \int [n(x, y, z) - n_e] dz,$$

где $n(x, y, z)$ – показатель преломления объекта и n_e – показатель преломления окружающей среды. Функцию $h(x, y)$ можно интерпретировать как «проекцию» (на плоскость изображения) оптически неоднородного объекта с показателем преломления $n(x, y, z)$ (Tychinsky et al., 2013).

Для оптически однородного объекта (n, H) в иммерсионной среде n_0 уравнение будет иметь вид

$$h(x, y) \approx H(n - n_0),$$

где $h(x, y)$ – фазовая высота, $H(x, y)$ – геометрическая высота, n – показатель преломления объекта (Тычинский, 2001).

В работе использовали лазер с длиной волны 650 нм и мощностью 5 мВт (мощность излучения на объекте была менее 2 мВт). Объектив микроскопа с увеличением 30 ($NA=0.65$), разрешение в плоскости объекта – до 15 нм, разрешение по вертикали – 0,1 нм. Рабочее поле микроскопа в пределах 5 – 50 мкм. Для захвата изображений применяли CCD видеокамеру VS-415U (НПК «Видеоскан», Россия) с разрешением 782x582 пикселей. Обработку полученных изображений проводили в программе MIM Visualizer 1.0 (MIM Software Inc., США).

Световая микроскопия

Головной мозг животных исследуемых групп забирали на 1, 3, 7 и 12 сутки посттравматического периода ЧМТ. Для светооптического исследования состояния ангио- и цитоархитектоники коры больших полушарий мозга материал фиксировали в 10% забуференном водном растворе нейтрального формалина 72–96 часов; затем вырезали фрагменты теменно-затылочной области мозга.

Гистологическую проводку образцов и окрашивание фронтальных срезов (толщиной 5 – 7 мкм) гематоксилином и эозином проводили по стандартному протоколу. Структуру микроциркуляторного русла, состояние паренхимы, нейронов и глиальных клеток и их морфометрический анализ исследовали с помощью микровизора проходящего света Vizo 103 (Ломо, Санкт-Петербург) на увеличениях 20х и 40х. Анализировали следующие структуры в головном мозге: диаметр капилляров (d , мкм²), площадь капиллярного русла (S , мкм²), площадь перикапиллярного отёка (S , мкм²) и площадь перицеллюлярного отёка нейронов (S , мкм²). При статистической обработке оценивали 10 полей зрения.

Метод оценки двигательной активности (Saatman, 1996)

Двигательные нарушения крыс в посттравматический период ЧМТ исследовали с помощью теста «метод оценки передвижения по бруску». За 2 суток до моделирования ЧМТ животных обучали передвигаться по узкому деревянному бруску шириной 2 см и длиной 50 см. Движение стимулировали ярким светом у одного конца бруска, к другому, где была расположена темная камера, в которой животное укрывается от света. Оценивали время, затрачиваемое на передвижение по бруску от источника яркого света до темной камеры, и частоту соскальзывания лап крыс.

Общий показатель двигательной активности оцениваем по 10-бальной шкале (таблица 2). Максимально возможное число баллов 10 (невозможность выполнения задачи), минимально возможное – 2 (успешное выполнение задачи).

Таблица 2. Система оценки двигательной активности

Оценка, баллы	Время, с	Частота соскальзывания лап
5	17-20	>4
4	13-16	3
3	9-12	2
2	5-8	1
1	4-1	0

Статистические методы оценки результатов эксперимента

Полученные экспериментальные данные рассчитывали, как среднее значение (Mean) со стандартным отклонением (SD) или ошибкой среднего (SEM). Сравнительный анализ данных проводили с помощью пакетов прикладных программ Statistica 6.0. и Microsoft Excel. Для проверки гипотезы о виде распределения применялся метод Шапиро-Уилка. Изучение статистических закономерностей осуществлялось с применением параметрического (критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони) метода статистики. За величину уровня статистической значимости различий принимали $p \leq 0.05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Исследование морфоструктурного и функционального состояния эритроцитов и системы гемостаза в посттравматический период ЧМТ

Исследование динамики морфометрических показателей и функциональной активности эритроцитов крыс проводили в течение 12 суток посттравматического периода после моделирования закрытой ЧМТ. Визуализация эритроцитов методом лазерной интерференционной микроскопии показала, что фазовые портреты характеризовались статистически значимым увеличением фазовой высоты, диаметра, площади, объема и периметра эритроцитов относительно значений тех же показателей у интактной группы животных (таблица 3, рисунок 4).

Таблица 3. Морфометрические параметры эритроцитов крови крыс на фоне экспериментальной черепно-мозговой травмы в динамике посттравматического периода.

Показатель	Интактные	Этапы исследования, сутки			
		1	3	7	12
Фазовая высота, нм	88.26 ± 3.16	101.36 ± 2.18*	95.61 ± 2.03*	96.36 ± 2.39*	94.35 ± 2.95*
Геометрическая высота, мкм	0.88 ± 0.32	1,01 ± 0.22*	0,95 ± 0.2*	0,96 ± 0.24*	0,94 ± 0.3*
Диаметр, мкм	6.28 ± 0.07	6.65 ± 0.05*	6.92 ± 0.07*	6.52 ± 0.08*	6.31 ± 0.08
Периметр, мкм	21.97 ± 0.31	21.56 ± 0.36	23.82 ± 0.39*	21.84 ± 0.53	20.98 ± 0.49*
Площадь, мкм ²	28.04 ± 0.59	32.06 ± 0.08*	35.16 ± 1.18*	31.46 ± 1.43*	29.36 ± 1.34
Объем, мкм ³	24.74 ± 1.12	32.58 ± 1.24*	33.64 ± 1.14*	30.32 ± 1.28*	27.7 ± 1.45

Примечание: Среднее ± SEM, обсчет проводили по 50 – 75 клеткам для каждой временной точки. «*» – статистически значимые различия относительно значений интактной группы, $p \leq 0.05$.

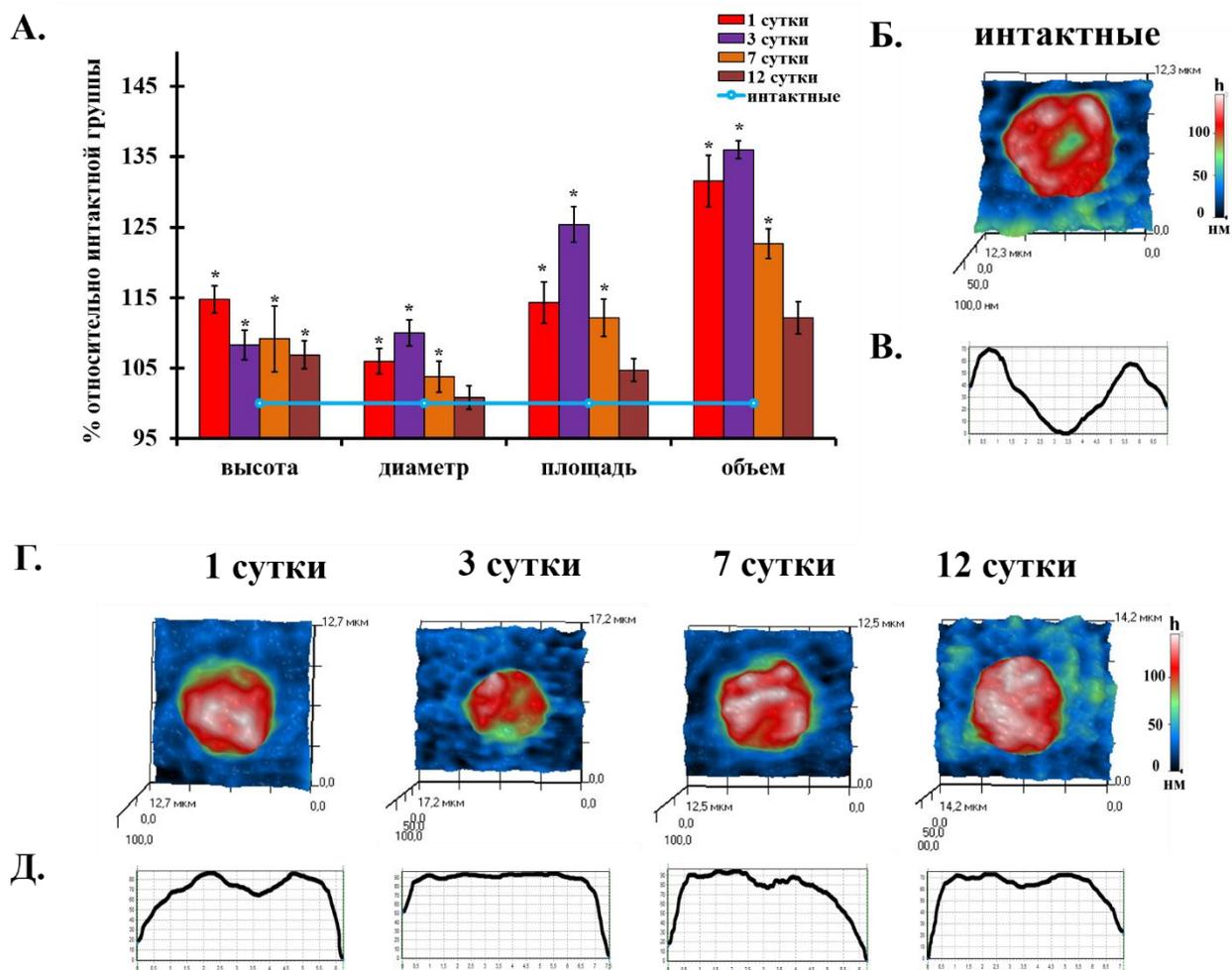


Рисунок 4. Динамика морфометрических показателей эритроцитов крыс при ЧМТ (А – гистограмма морфометрических размеров, Б – типичное фазово-интерференционное изображение эритроцита интактных животных, В – фазовый профиль эритроцита интактных животных, Г – типичные фазово-интерференционные изображения эритроцитов крыс в динамике посттравматического периода, Д – профиль эритроцитов крыс в динамике посттравматического периода). Среднее \pm SEM, обсчет проводили по 50 – 75 клеткам для каждой временной точки. «*» – статистически значимые различия относительно значений интактной группы, $p \leq 0.05$.

Наиболее значимо изменялся объем клеток: на 31.4% к 1 суткам и на 35% к 3 суткам посттравматического периода относительно значений интактной группы. С 1 суток посттравматического периода регистрировали выраженное изменение фазовой высоты на 14.8%, диаметра на 5.9%, площади эритроцитов на 14.3% от

значений интактной группы соответственно (таблица 3, рисунок 4 А). На 3 сутки максимально увеличивались диаметр (на 10.2%) и периметр клеток (на 8.4%) относительно показателей нормы. На 7 сутки исследования отмечали уменьшение диаметра и площади эритроцитов, однако исследуемые показатели превышали значения нормы. К 12 суткам сохранялись повышенные значения фазовой высоты, площади и объема относительно значений интактной группы.

С 1 суток посттравматического периода ЧМТ фазовые портреты эритроцитов характеризовалась увеличенной сферичностью и появлением большого количества выпуклостей на поверхности тора (рисунок 4 В). Поскольку метод лазерной интерференционной микроскопии дает информацию о пространственном распределении показателя преломления, то он является очень чувствительным к любым, даже незначительным изменениям компартиментализации клеток (Браже и др., 2009). Так, динамика фазовых изображений эритроцитов крыс после травмы на всех контрольных точках исследования свидетельствует о существенных различиях от эритроцитов интактных крыс и, вероятно, интегрально отражает изменения в структуре цитоскелета и перераспределении гемоглобина в цитоплазме и подмембранных областях клетки. Известно, что после ЧМТ наблюдается выраженный анизоцитоз и пойкилоцитоз, характеризующийся снижением уровня нормоцитов, дискоцитов, повышением уровня макроцитов, микроцитов, эхиноцитов и плоских клеток (Мороз и др., 2013). Показано, что появление морфологически измененных форм эритроцитов связано с интенсификацией процессов ПОЛ, неспецифическими изменениями рН, увеличением количества гемина и концентрации грубодисперсных белков (Baskurt, Meiselman, 2003; Юнусов, 2014; Сергунова и др., 2016; Гречко и др., 2019). Для выявления взаимосвязи морфометрических и функциональных показателей эритроцитов при травме далее был проведен анализ функциональных показателей эритроцитов в динамике посттравматического периода экспериментальной ЧМТ.

Анализ функциональных изменений эритроцитов показал, что на 1 сутки после моделирования ЧМТ наблюдали снижение ЭФПЭ на 34%, на 3 сутки – на 28% относительно животных интактной группы (таблица 4). Снижение ЭФПЭ сочеталось с повышением агрегационной активности красных клеток крови на 132% и 111% к 1 и 3 суткам соответственно.

Таблица 4. Функционально-метаболические показатели эритроцитов крови крыс на фоне экспериментальной черепно-мозговой травмы в динамике посттравматического периода

Показатель	Интактные крысы	Этапы исследования, сутки			
		1	3	7	12
ЭФПЭ, мкм·см·В-1·с ⁻¹	1.19±0.03	0.78±0.03*	0.85±0.03 *	0.93±0.03 *	1.05±0.02 *
Агрегация эритроцитов, %	36.85±1.17	85.81±0.74 *	77.89±1.35 *	69.09±1.13 *	59.68±0.75 *
МДА, нМоль/мл	0.08±0.01	0.23±0.02*	0.18±0.04*	0.19±0.03*	0.14±0.02*
Каталаза, ед/гНв·мин	28.23±0.66	20.46±0.49 *	17.02±0.75 *	16.65±0.81 *	17.28±1.3*
АТФ, мкмольРн/мл клеток	1.78±0,17	1.49±0.17	2.28±0.19*	2.56±0.13*	2.37 ±0.19*
2.3-ДФГ, мкмольРн/мл клеток	2.99±0.25	5.22±0.57*	5.12±0,25*	4.01±0,34*	3.79 ±0,32
Na-K-АТФаза, нМольРн/мг белка·мин	14±1.45	7.00±0.68*	8.33±0.56*	9.50±0.80*	7.83±0.39*

Примечание: Среднее ± SD. «*» – статистически значимые различия относительно значений интактной группы, $p \leq 0.05$.

При этом процент агрегируемых эритроцитов превышал значения нормы на протяжении всего периода исследования. Тенденция к снижению агрегации

эритроцитов до значений интактной группы отмечалась лишь к 12 суткам наблюдения ($p \leq 0.05$).

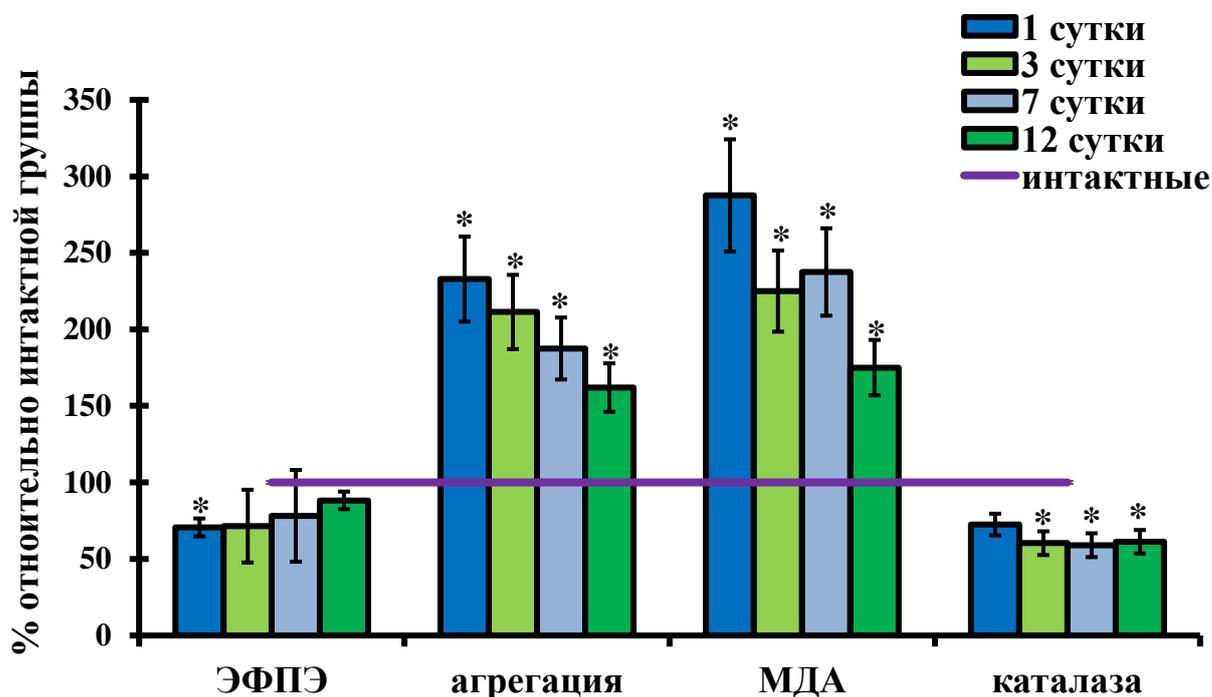


Рисунок 5. Динамика поверхностных, про- и антиоксидантных свойств эритроцитов в посттравматический период ЧМТ крыс. Примечание: Среднее \pm SD. «*» – статистически значимые различия относительно значений интактной группы, $p \leq 0.05$.

Установленные изменения электрокинетических и агрегационных показателей эритроцитов сопровождалась модификацией мембранных структур клетки в результате интенсификации процессов ПОЛ, что подтверждалось увеличением концентрации МДА в 3.4 раза на фоне снижения активности каталазы на 27% ($p < 0.05$) по сравнению со значениями интактной группы через 1 сутки после ЧМТ (таблица 4, рисунок 5). Анализ показателей окислительных реакций и антиоксидантной системы продемонстрировал, что во всех контрольных точках наблюдения преобладали эритроциты со статистически значимо низкой активностью каталазы и высокой концентрацией МДА относительно значений нормы ($p < 0.05$). Максимальное снижение активности каталазы в эритроцитах отмечалось к 7 суткам посттравматического периода

(снизилась на 40% по сравнению с нормой), что свидетельствовало об истощении АОС.

Динамика концентрации МДА коррелировала с изменениями электрокинетических показателей мембран эритроцитов ($r=0.91$). Так, максимальное увеличение концентрации МДА сочеталось со снижением ЭФПЭ, тогда как уменьшение концентрации МДА приводило к наибольшему увеличению суммарного поверхностного заряда мембран эритроцитов. При этом известно, что сдвиги электрокинетического потенциала мембраны эритроцита (ЭФПЭ) можно рассматривать не только как функцию поверхностного заряда мембраны эритроцитов, но и как чувствительный индикатор адаптационных реакций целостного организма (Головецкий и др., 2007). Показано, что динамика изменения ЭФПЭ опосредуется последовательной активацией стрессреализующих систем. Первичное уменьшение ЭФПЭ при стрессовых воздействиях связано с активацией выделения эндогенных катехоламинов и их действием на мембрану клеток. Вторая фаза (увеличение ЭФПЭ) обусловлена нарастанием в крови глюкокортикоидов. Механизм изменения ЭФПЭ под влиянием адреналина и кортизола реализуется через модификацию мембраны при изменении реактивности организма (Дерюгина, 2012; Крылов и др., 2014).

Выявленные нами закономерности изменения электрокинетических характеристик в результате нарушения окислительно-восстановительного баланса свидетельствуют о снижении функциональной активности эритроцитов и развитии дизадаптационных процессов в организме после травмы.

Известно, что интенсивные процессы ПОЛ приводят к модификации мембранных липидов (Герасимов и др., 2010). Na-K-АТФаза является липидзависимым ферментом и влияет на ионный гомеостаз клеток (Voccoli et al., 2014). Исследование каталитической активности Na-K-АТФазы показало, что через 24 часа после моделирования ЧМТ снижалась активность натриевого насоса в 2 раза относительно значений интактной группы (таблица 4, рисунок 6). Важно отметить, что инактивация Na-K-АТФазы приводит к замене внутриклеточных

ионов калия (K^+) на ионы натрия (Na^+) с последующей деполяризацией мембран, резкому нарастанию внутриклеточных концентраций Ca^{2+} , лактата, усилению катаболических процессов, последующей активации внутриклеточных ферментов (кальмодулин-зависимых киназ, липаз, протеаз, эндонуклеаз, таких как протеинкиназа С, фосфолипаза А2, NO-синтазы и пр.), действие которых направлено на гибель клетки (Ghosh et al., 2010; Кармен и др., 2011; Voccoli et al., 2014). Ингибирование активности Na-K-АТФазы сохранялось на протяжении всего периода исследования.

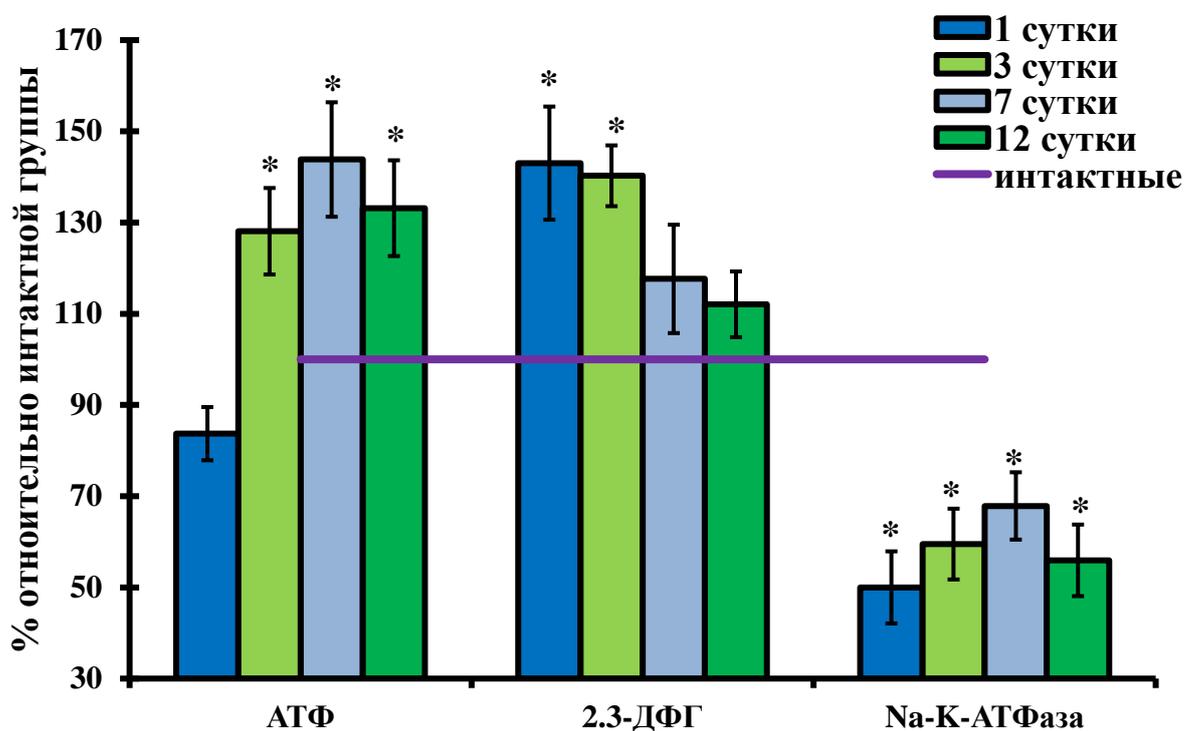


Рисунок 6. Динамика активности Na-K-АТФазы, содержания АТФ и 2.3-ДФГ эритроцитов в посттравматический период ЧМТ крыс. Среднее \pm SD. «*» – статистически значимые различия относительно значений интактной группы, $p \leq 0.05$.

Выявленные изменения мембранных характеристик эритроцитов сопровождалось снижением на 16.3% концентрации АТФ и увеличением на 74.6% концентрации 2.3-ДФГ относительно интактной группы животных на 1 сутки после ЧМТ (таблица 4, рисунок 6). Энергетические процессы опосредуют функциональную активность клеток и модификацию их мембранных свойств

(Бояринов и др., 2016). Так, уменьшение содержания АТФ приводит к увеличению рельефа поверхности, агрегации эритроцитов и снижению их деформации (Муравьев и др., 2013; Иващенко и др., 2019; Baskurt, 2007).

Оценка корреляционных зависимостей фазово-интерференционных изображений и динамики функционального состояния эритроцитов выявила взаимосвязь морфометрических показателей эритроцитов с исследуемыми функциональными характеристиками. Наиболее удобным в этом случае представляется использование для этой цели фазовой высоты, как одного из наиболее точно измеряемой методом фазово-интерференционной микроскопии параметра. Увеличение фазовой высоты сочеталось со снижением концентрации АТФ ($r=0.89$), активности Na-K-АТФазы ($r=0.93$), каталазы ($r=0.91$) и с увеличением концентрации МДА ($r=0.84$). В свою очередь, была выявлена высокая корреляционная зависимость ЭФПЭ и агрегации – показателей оказывающих существенную роль на микрореологию крови, от диаметра эритроцитов: для ЭФПЭ $r=0.87$, агрегации $r=0.91$.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что увеличение морфометрических показателей эритроцитов сопровождалось увеличением концентрации МДА, снижением содержания АТФ, активности каталазы и Na-K-АТФазы.

Обсуждая полученные результаты можно предположить, что усиление ПОЛ, как универсального механизма повреждения клеток (Миронов и др., 2012), нарушало состояние липидного и белкового компонента и приводило к изменению морфологии клеток. Образующийся МДА, который является поперечно-сшивающим реагентом (Владимиров, 2000), вызывал нарушение липид-белковых структур, в том числе, спектрина. Считается, что спектрин, кроме структурной функции, отвечает за мембранную проницаемость и оказывает влияние на свойства АТФаз, структурно взаимосвязанных со спектрин-актиновым цитоскелетом (Bennett et al., 2009).

Кроме того, интенсивные процессы ПОЛ на фоне развивающейся стресс реакции приводили к модификации мембранных липидов и увеличению проницаемости мембраны для различных ионов (Forman et al., 2004; Zarkovic et al., 2013). Так, в результате активации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменного механизма увеличивалось содержание внутриклеточного Ca^{2+} (Крылов и др., 2014). Повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в клетках вызывало активацию скрамблазы, определяющей экспозицию фосфотидилсерина на внешнюю поверхность эритроцитов; активацию трансглутаминазы, перекрестно сшивающей белки мембраны; стимуляцию мембранных фосфолипаз А и С; активацию различных протеинкиназ; стимуляцию калпаинов (Maellaro et al., 2011). Выход фосфотидилсерина на внешнюю поверхность эритроцитов вызывало изменение формы с увеличением сферичности клеток (Koshkaryev et al., 2003). Кроме этого, повреждение спектрин-актинового цитоскелета происходило на фоне снижения концентрации АТФ, повышения проницаемости мембран эритроцитов для ионов K^+ и Na^+ . Это приводило к механической деформации мембраны эритроцитов, увеличению объема и диаметра, образованию выростов и появлению эхиноцитарных форм клеток (Bukowska, 2003; Сергунова и др., 2016; Черныш и др., 2018).

Следует отметить, что выявленное в работе увеличение фазовых характеристик эритроцитов происходило на фоне уменьшения количества эритроцитов и, что особенно важно, на фоне снижения содержания гемоглобина (таблица 5). Максимальные изменения регистрировали на 3 сутки посттравматического периода, что выражалось в снижении количества эритроцитов и концентрации гемоглобина цельной крови на 35.1% и 28.9% соответственно относительно значений интактной группы. С 7 суток наблюдали увеличение количества эритроцитов и концентрации гемоглобина цельной крови, однако исследуемые параметры не достигли границ нормы.

Таблица 5. Динамика гематологических показателей крыс в посттравматический период черепно-мозговой травмы

Показатель	Интактные крысы	Время после ЧМТ (сутки)			
		1	3	7	12
Количество эритроцитов, $10^{12} \cdot \text{л}^{-1}$	5.81±0,4	4.45±0.33*	3.77±0.2*	4.67±0.28*	4.72±0.19*
Гемоглобин, г·л⁻¹	104.6±2.24	92.00±2.12 *	74.33±3.39 *	86.83±4.45 *	92.20±1.92 *

Примечание: Среднее \pm SD. «*» – статистически значимые различия относительно значений интактной группы, $p \leq 0.05$; «▲» – статистически значимые различия опыта от контроля, $p \leq 0.05$.

Можно предположить, что изменение фазовой высоты, которое связано с изменением показателя преломления клеток и, таким образом, зависит от концентрации и соотношения количества веществ, будет зависеть от содержания в эритроцитах гемоглобина. Кроме того, перераспределение оптической плотности внутри клетки может быть обусловлено увеличением плотности упаковки гемоглобина при усилении окислительных процессов. В частности, показано, что для порфиринов характерно проявление молекулярной агрегации, которая существенно меняет физико-химические свойства веществ (Würthner et al., 2011).

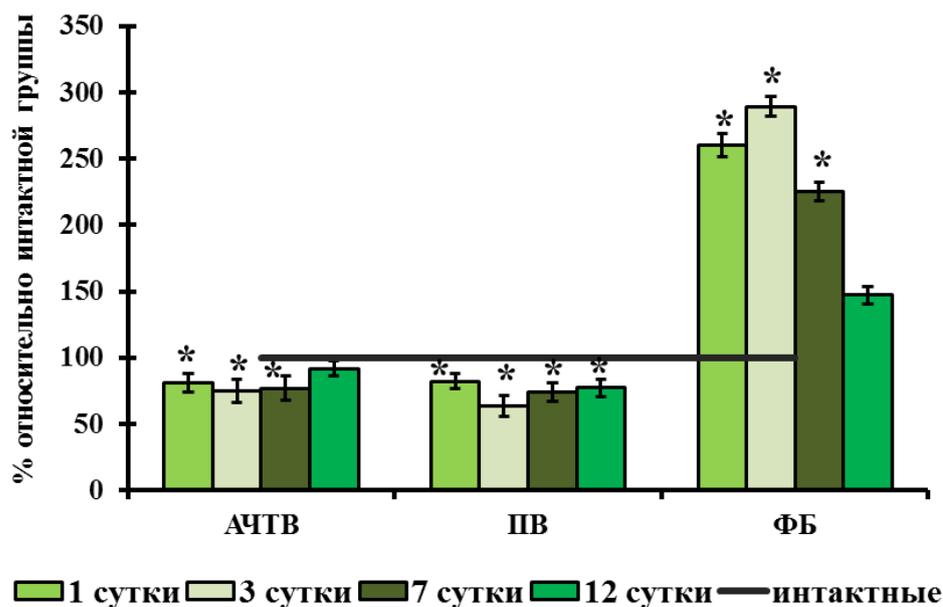
Снижение содержания эритроцитов и гемоглобина в посттравматический период ЧМТ может быть обусловлено кровопотерей, повреждением зрелых эритроцитов, повышенным потреблением эритроцитов вследствие гиперагрегации и разрушения (Бояринов и др., 2016).

Нарушение одного из важнейших биофизических показателей крови – агрегационной активности эритроцитов приводит к развитию гипоксии, от выраженности и длительности которой зависит вероятность возникновения полиорганной недостаточности и летальности (Мороз и др., 2012). При этом

значение гиперагрегации в немалой степени связано с формированием нарушений свертывающей системы крови (Герасимов и др., 2010).

Анализ показателей свертывания цельной крови показал, что посттравматический период ЧМТ крыс характеризовался гиперкоагуляцией и угнетением фибринолиза (рисунок 7, таблица 6).

А.



Б.

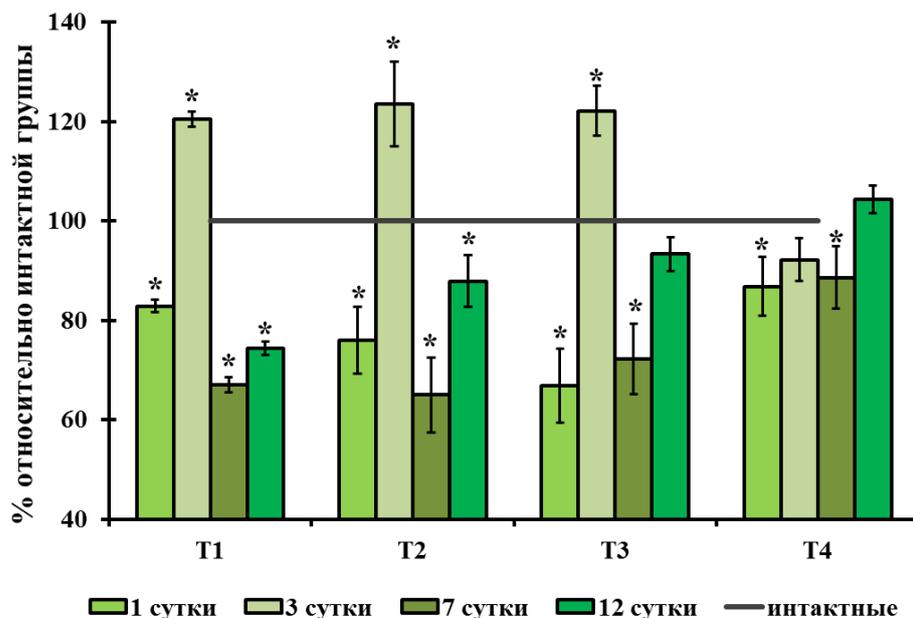


Рисунок 7. Динамика изменения гемостатических показателей крови в посттравматический период ЧМТ крыс (А – изменение показателей свертывания

плазмы крови; Б – изменение показателей свертывания цельной крови). Среднее \pm SD. «*» – статистически значимые различия относительно значений интактной группы, $p \leq 0.05$. Сокращения: АЧТВ – активированное частично тромбопластиновое время, ПВ – протромбиновое время, ФБ – фибриноген, Т1 – начало свертывания крови, Т2 – конец свертывания крови, Т3 – продолжительность свертывания крови, Т4 – время ретракции и фибринолиза.

Таблица 6. Динамика изменения показателей свертывания крови крыс в посттравматический период черепно-мозговой травмы

Показатель	Интактные крысы	Время после ЧМТ (сутки)			
		1	3	7	12
свертывание цельной крови					
Начало свертывания, с	112 ± 5.83	92.83 $\pm 11.38^*$	135.00 $\pm 7.64^*$	75.00 $\pm 5.00^*$	83.33 $\pm 6.15^*$
Конец свертывания, с	182 ± 7.44	138.3 $\pm 14.0^*$	225.00 $\pm 11.81^*$	118.3 $\pm 7.03^*$	160.0 $\pm 10.00^*$
Продолжительность процесса свертывания, с	60 ± 7.07	40.00 $\pm 5.77^*$	73.33 ± 17.89	43.33 $\pm 3.33^*$	56.00 ± 5.85
Начало ретракции и фибринолиза, с	570 ± 17.03	495.0 $\pm 13.54^*$	525.67 ± 13.02	505.0 $\pm 10.07^*$	595.0 ± 9.05
свертывание плазмы крови					
Активированное частичное тромбопластиновое время, с	17.94 ± 0.87	14,54 $\pm 0,3^*$	13.44 $\pm 0.6^*$	13.83 $\pm 0.25^*$	16.45 ± 0.32
Протромбиновое время, с	22.93 ± 1.35	18.84 $\pm 0.61^*$	14.6 $\pm 0.77^*$	17.05 $\pm 0.6^*$	17.7 $\pm 0.61^*$
Фибриноген, г/л	2.62 ± 0.1	6.82 $\pm 0.42^*$	7.58 $\pm 0.14^*$	5.9 $\pm 0.37^*$	3.86 ± 0.51

Примечание: Среднее \pm SD. «*» – статистически значимые различия относительно значений интактной группы, $p \leq 0.05$; «▲» – статистически значимые различия опыта от контроля, $p \leq 0.05$.

У животных контрольной группы регистрировали укорочение времени свертывания крови и времени начала ретракции и фибринолиза на 17.5%, 24%,

34.1% и 13% соответственно ($p \leq 0.05$) на 1 сутки после травмы относительно показателе нормы. Максимальные нарушения регистрировали на 7 сутки исследования, что выражалось в снижении времени начала свертывания на 33%, конца времени свертывания на 35%, ретракции и фибринолиза на 11.4% и 19.7% относительно значений интактной группы. К 12 суткам исследования отмечали восстановление общего времени свертывания до значений интактной группы, при этом время начала свертывания крови было меньше на 25.6%.

Аналогичные изменения регистрировались в плазме крови – уменьшение АЧТВ на 19% и ПВ на 18%, увеличение уровня ФБ в 2.6 раза ($p \leq 0.05$) относительно нормы на 1 сутки после ЧМТ. Следует отметить, что концентрация фибриногена увеличивалась и достигла максимальных значений на 3 сутки (в 2.9 раза) посттравматического периода. К 12 суткам исследования регистрировали восстановление исследуемых показателей до значений интактной группы, при этом уровень фибриногена оставался повышенным (в 1.5 раза).

Таким образом, выявлена зависимость морфоструктурных показателей эритроцитов от функционального состояния клеток при ЧМТ. Появление и нарастание морфологически измененных клеток «запускает» патологически порочный круг, приводящий к снижению доставки кислорода к тканям, развитию внутрисосудистого гемолиза с высвобождением большого количества АДФ, способного активировать свертывание крови и гиперкоагуляцию (Чумакова и др., 2018). Это приводит к нарушению микро- и макрореологии крови, и, как следствие, необратимым повреждениям головного мозга при травме (Герасимов и др., 2010; Кармен и др., 2011).

Учитывая, важность морфофункциональных показателей эритроцитов в газотранспортной функции крови и тот факт, что клетки, расположенные вокруг очага первичного повреждения, крайне чувствительны к малейшим изменениям доставки кислорода (Крылов, Пурас, 2013) было проведено исследование цитопротекторов – мексикора и цитофлавина на морфоструктурные и функциональные характеристики эритроцитов.

Мексикор – относится к гетероароматическим водорастворимым антиоксидантам биогенного типа, в котором сукцинат соединен ковалентной связью с эмоксипином (Тюренков и др., 2013). Эмоксипин, содержащийся в липосомах, легко проникает в клетки организма и ингибирует процессы ПОЛ, реагирует с перекисными радикалами липидов, первичными и гидроксильными радикалами пептидов, повышает активность антиоксидантных ферментов и стабилизирует клеточные мембраны (Тюренков и др., 2013; Бояринов и др., 2010; Сейфула и др., 2009). Цитофлавин – комплексный препарат, в состав которого входят янтарная кислота, инозин (рибоксин) и витамины (В2 и РР). Янтарная кислота в цитофлавине представлена в виде Na-N-метилглюкаммония сукцината. Это соль янтарной кислоты, имеющая мощные внутри- и межмолекулярные водородные связи между гидроксильными группами и вторичным азотом, которая способствует переносу янтарной кислоты через поляризованные клеточные мембраны (Коваленко, 2005). Янтарная кислота активирует сукцинатдегидрогеназное окисление и стимулирует активность дыхательной цепи митохондрий, что обеспечивает её антигипоксическое действие (Antipenko и др., 2017; Черний и др., 2015). Дополняется антигипоксический эффект янтарной кислоты рибофлавином, способным за счет своих коферментных свойств увеличивать активность сукцинатдегидрогеназы и восстанавливать окисленный глутатион (Новиков, 2013). Инозин подавляет активность ксантиноксидазы, уменьшая тем самым продукцию высокоактивных форм и соединений кислорода (Оковитый и др., 2012). При этом исследований действия данных препаратов на морфофункциональное состояние эритроцитов при ЧМТ в литературе описано крайне мало.

3.2. Исследование морфоструктурного и функционального состояния эритроцитов и системы гемостаза в посттравматический период ЧМТ при действии мексикора и цитофлавина

Анализ фазовых портретов эритроцитов при действии цитопротекторов показал, что эритроциты на 1 – 3 сутки посттравматического периода

характеризовались появлением различной степени двояковогнутости, при сохранении шипов, выпуклостей и неровностей на поверхности тора, которые были выявлены при ЧМТ (контрольная группа). К 7 суткам регистрировалось восстановление поверхностной архитектоники при действии цитопротекторов, однако сохранялись впадины и выпуклости по поверхности тора в большей степени выраженные при действии мексикора (рисунок 8).

На 3-7 сутки посттравматического периода ЧМТ в ходе проведения сравнительной цитопротекторной терапии цитофлавина и мексикора регистрировали восстановление геометрических размеров клетки до значений интактной группы (таблица 7). Более активные процессы восстановления геометрических размеров клетки отмечали при действии мексикора начиная с 3 суток, что выражалось в уменьшении объема (на 23.9%), периметра (на 14.5%), диаметра (на 11.4%), площади (на 20.1%) и высоты (на 4.2%) относительно показателей контрольной группы. Тогда как при действии цитофлавина снижение исследуемых морфометрических характеристик эритроцитов до показателей нормы регистрировали с 7 суток посттравматического периода (рисунок 8 Д).

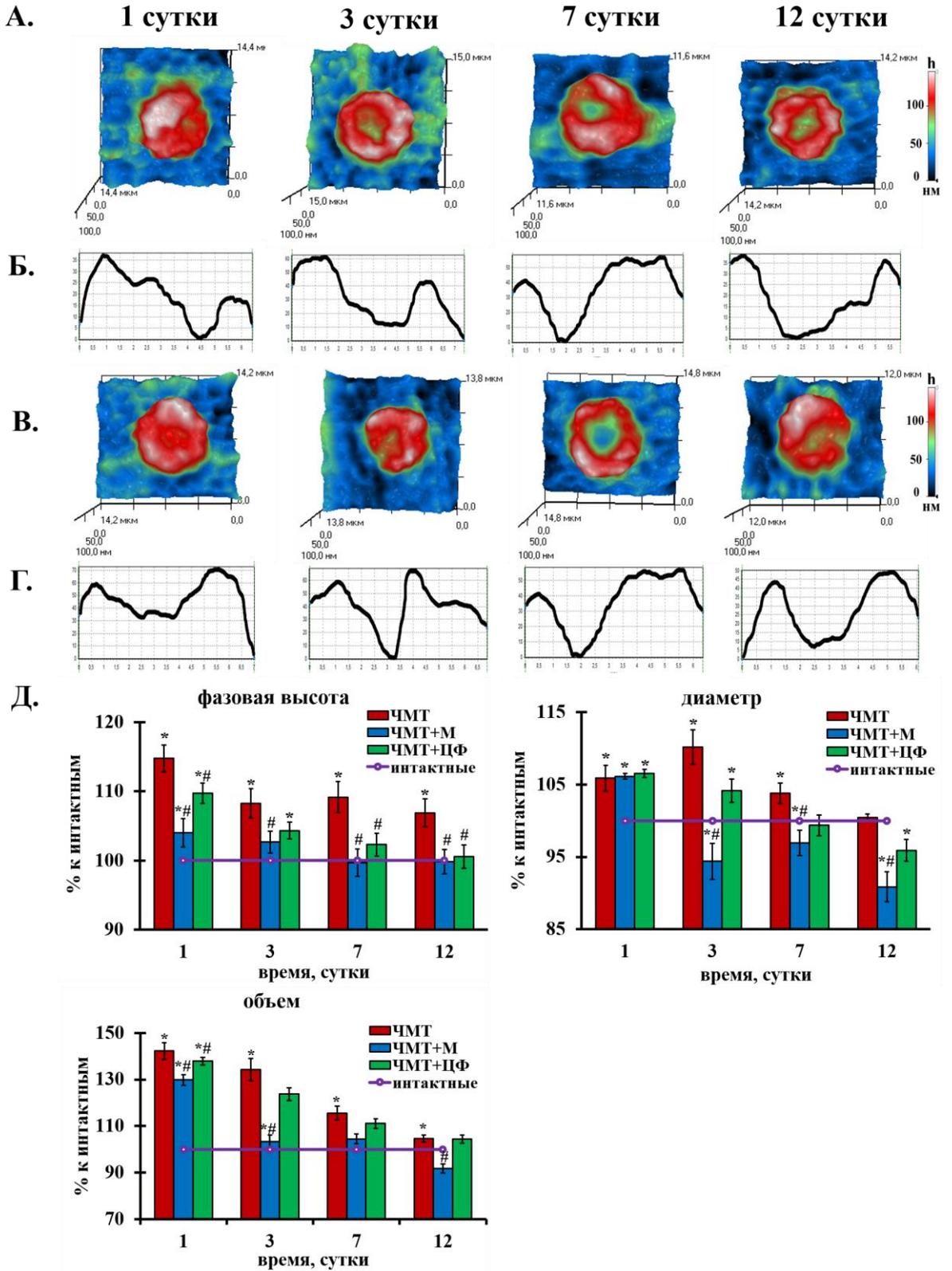


Рисунок 8. Динамика морфометрических показателей эритроцитов крыс в посттравматический период ЧМТ при действии цитопротекторов (А – типичные фазово-интерференционные изображения эритроцитов крыс при действии цитофлавина, Б – профиль эритроцитов при действии цитофлавина, В – типичные

фазово-интерференционные изображения эритроцитов крыс при действии мексикора, Г – профиль эритроцитов при действии мексикора, Д – диаграммы морфометрических размеров). Среднее \pm SEM, обсчет проводили по 50 – 75 клеткам для каждой временной точки. «*» – статистически значимые различия относительно значений интактной группы, $p \leq 0.05$; «#» – статистически значимые различия опыта от контроля, $p \leq 0.05$. Сокращения: М – мексикор, ЦФ – цитофлавин.

Таблица 7. Морфометрические показатели эритроцитов крыс на фоне экспериментальной черепно-мозговой травмы в динамике посттравматического периода при действии мексикора и цитофлавина

Показатель	Интактные	Группа	Этапы исследования, сутки			
			1	3	7	12
Фазовая высота, нм	88.26 \pm 3.16	ЧМТ+М	91.82 \pm 3.82*#	90.63 \pm 3.71#	87.98 \pm 3.75#	88.13 \pm 4.15#
		ЧМТ+ЦФ	96.85 \pm 3.43*#	92.08 \pm 2.81*	90.29 \pm 3.16#	88.76 \pm 3.27#
Геометрическая высота, мкм	0.88 \pm 0.32	ЧМТ+М	0.92 \pm 0.38*#	0.91 \pm 0.37#	0.88 \pm 0.38#	0.88 \pm 0.42#
		ЧМТ+ЦФ	0.97 \pm 0.34*#	0.92 \pm 0.28*	0.90 \pm 0.32#	0.89 \pm 0.33#
Диаметр, мкм	6.28 \pm 0.07	ЧМТ+М	6.67 \pm 0.08*	5.93 \pm 0.08*#	6.09 \pm 0.08*#	5.71 \pm 0.05*#
		ЧМТ+ЦФ	6.69 \pm 0.06*	6.54 \pm 0.07*	6.24 \pm 0.08	6.02 \pm 0.08*
Периметр, мкм	21.97 \pm 0.31	ЧМТ+М	23.71 \pm 0.47*	20.36 \pm 0.41*#	22.33 \pm 0.76	18.97 \pm 0.28*#
		ЧМТ+ЦФ	22.64 \pm 0.32	21.36 \pm 0.41#	22.32 \pm 0.51	20.07 \pm 0.45*#
Площадь, мкм²	28.04 \pm 0.59	ЧМТ+М	34.92 \pm 1.05*	28.10 \pm 0.91*	29.37 \pm 1.04#	25.83 \pm 0.67*#
		ЧМТ+ЦФ	35.18 \pm 1.03*	33.27 \pm 1.02*	30.56 \pm 1.03*#	29.03 \pm 0.91
Объем, мкм³	24.74 \pm 1.12	ЧМТ+М	32.13 \pm 2.03*#	25.57 \pm 1.08*#	25.85 \pm 1.33	22.73 \pm 1.11#
		ЧМТ+ЦФ	34.12 \pm 1.48*#	30.61 \pm 1.82	27.50 \pm 2.12	25.84 \pm 1.87

Примечание: Среднее \pm SEM, обсчет проводили по 50 – 75 клеткам для каждой временной точки. «*» - статистически значимые различия ($p \leq 0.05$) с

интактными животными, «#» - статистически значимые различия ($p \leq 0.05$) с животными, получавшими физиологический раствор. Сокращения: М – мексикор, ЦФ – цитофлавин.

Исследование функциональных показателей эритроцитов при действии цитофлавина и мексикора выявило, что влияние препаратов сопровождалось повышением ЭФПЭ, снижением агрегации эритроцитов и концентрации МДА на фоне увеличения активности каталазы и Na-K-АТФазы (таблица 8).

Таблица 8. Функционально-метаболические показатели эритроцитов крови крыс на фоне экспериментальной черепно-мозговой травмы в динамике посттравматического периода при действии мексикора и цитофлавина

Показатель	Интактные крысы	Группа	Этапы исследования, сутки			
			1	3	7	12
ЭФПЭ, мкм·см·В- 1·с ⁻¹	1.19 ±0.03	ЧМТ+ М	1.02 ±0.02*▲	1.07 ±0.03*▲	1.08 ±0.03*▲	1.11 ±0.02*▲
		ЧМТ+ ЦФ	0.84 ±0.01*	1.18 ±0.05▲	1.2 ±0.08▲	1.21 ±0.04▲
Агрегация эритроцитов, %	36.85 ±1.17	ЧМТ+ М	87.82 ±3.79*	49.84 ±5.81*▲	44.22 ±2.51*▲	38.19 ±1.18▲
		ЧМТ+ ЦФ	74.12 ±0.54*▲	55.12 ±0.73*▲	43.76 ±0.77*▲	34.78 ±0.56▲
МДА, нМоль/мл	0.08 ±0.01	ЧМТ+ М	0.20 ±0.04*	0.09 ±0.02*▲	0.08 ±0.04▲	0.10 ±0.04▲
		ЧМТ+ ЦФ	0.21 ±0.02*	0.18 ±0.04*▲	0.06 ±0.01▲	0.08 ±0.02▲
Каталаза, ед/гНв·мин	28.23 ±0.66	ЧМТ+ М	38.63 ±1.98*▲	41.59 ±1.97*▲	29.79 ±1.34▲	34.61 ±1.58*▲
		ЧМТ+ ЦФ	17.42 ±0.17*▲	23.72 ±0.71*▲	28.52 ±0.55▲	35.71 ±0.65*▲
АТФ, мкмольРн/ мл клеток	1.78 ±0.17	ЧМТ+ М	1.27 ±0.17*▲	2.17 ±0.13*	2.72 ±0.21*▲	2.85 ±0.39*
		ЧМТ+ ЦФ	1.49 ±0.17*	2.43 ±0.19	3.19 ±0.19*	2.94 ±0.11*
2.3-ДФГ, мкмольРн/ мл клеток	2.99 ±0.25	ЧМТ+ М	5.16 ±0.42*	6.68 ±0.23*▲	5.68 ±0.26*▲	4.46 ±0.28*
		ЧМТ+ ЦФ	4.73 ±0.13*	6.65 ±0.19*▲	5.74 ±0.23*▲	5.07 ±0.21*

Na-K- АТФаза, нМольРн/мг белка·мин	14 ±1.45	ЧМТ+ М	7.07 ±0.75*	27.52 ±1.04*▲	17.24 ±0.71*▲	11.42 ±0.80▲
		ЧМТ+ ЦФ	6.39 ±0.60*	18.49 ±1.56*▲	12.44 ±1.10▲	11.06 ±1.52

Примечание: Среднее ± SD. «*» – статистически значимые различия относительно значений интактной группы, $p \leq 0.05$; «▲» – статистически значимые различия опыта от контроля, $p \leq 0.05$. Сокращения: М – мексикор, ЦФ – цитофлавин.

При внутрибрюшинном введении цитофлавина к 3 суткам эксперимента регистрировалось восстановление ЭФПЭ до значений интактной группы и сохранение на этом уровне до конца эксперимента. При введении мексикора ЭФПЭ на 1 сутки увеличивалось значительно по сравнению с действием цитофлавина, тогда как далее рост показателя был менее выражен: на 14.3%, 10% и 9.2% на 1, 3 и 7 сутки соответственно относительно значений интактной группы. Нормализация показателя наблюдалась к 12 суткам эксперимента (рисунок 9 А, таблица 8). Уменьшение агрегации эритроцитов при действии цитопротекторов было значительно выражено на 3 сутки и к 12 суткам восстанавливалось до значений интактной группы при сохранении повышенных значений в контроле (рисунок 9 Б, таблица 8).

Известно, что одним из возможных механизмов сохранения заряда при действии цитопротекторов может быть повышение препаратом стабильности структуры мембраны, которая во многом определяется процессами ПОЛ (Дерюгина и др., 2018). Так, в ходе анализа экспериментальных данных было установлено, что возросшая концентрация МДА после ЧМТ, при действии препаратов уменьшалась, по сравнению с показателями контроля, что говорит об уменьшении выраженности окислительного стресса. При внутрибрюшинном введении мексикора с 3 суток наблюдения отмечалось снижение МДА в 2 раза относительно контрольных значений (рисунок 9 В, таблица 8). При действии цитофлавина на 7 сутки концентрация МДА восстанавливалась до показателей нормы.

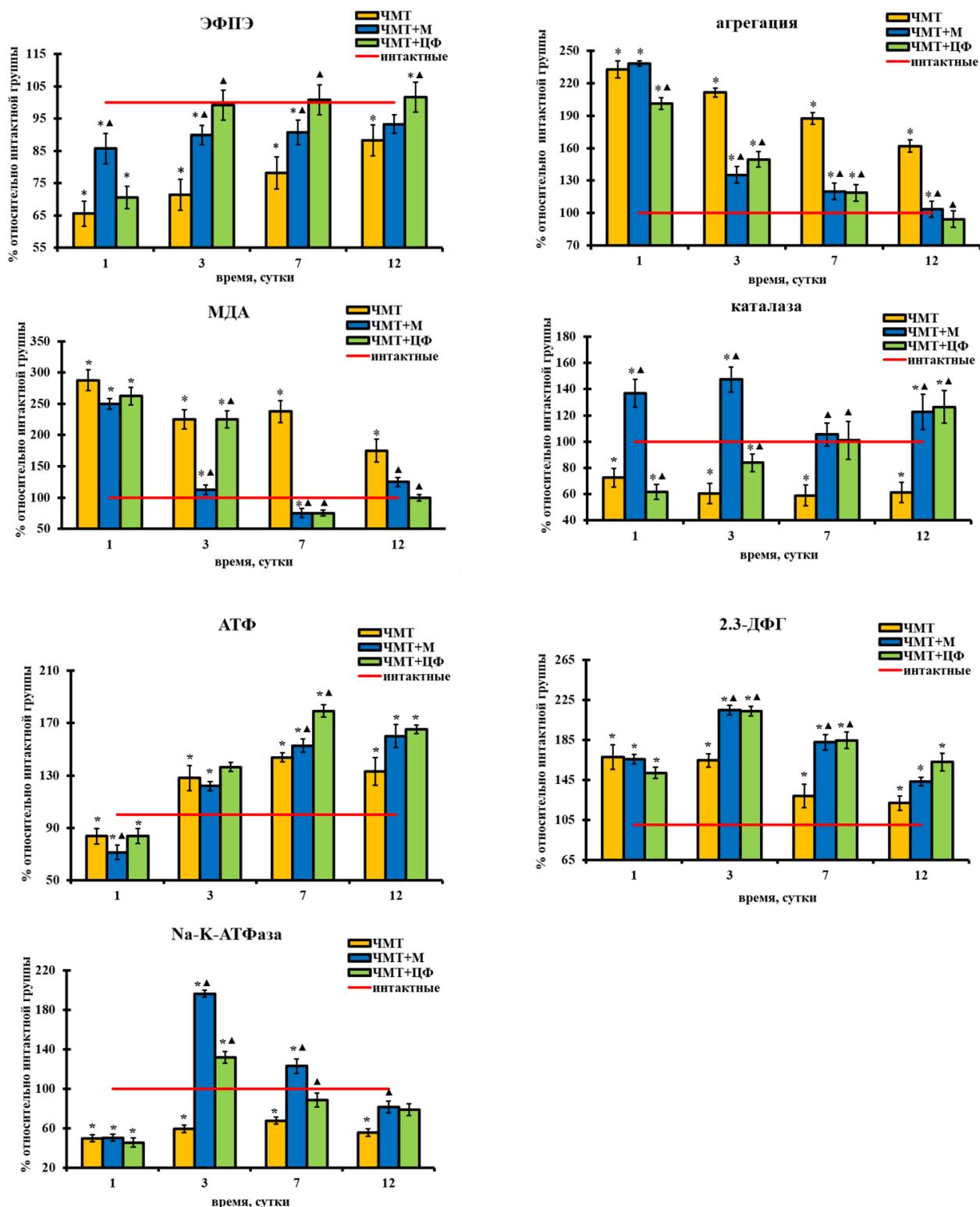


Рисунок 9. Изменение функциональных показателей эритроцитов при действии мексикора и цитофлавина в посттравматический период ЧМТ. Среднее \pm SD. «*» – статистически значимые различия относительно значений интактной группы, $p \leq 0.05$; «▲» – статистически значимые различия опыта от контроля, $p \leq 0.05$. Сокращения: М – мексикор, ЦФ – цитофлавин.

Восстановление концентрации МДА в эритроцитах связано с активацией антиоксидантной системы. При внутрибрюшинном введении мексикора регистрировали увеличение активности каталазы с 1 суток исследования на 30% (рисунок 9 Г, таблица 8). К 7 суткам исследования отмечалось снижение активности фермента до исходного уровня. При действии цитофлавина активность каталазы начинала расти с 3 суток относительно контрольной группы и продолжала увеличиваться до 12 суток посттравматического периода.

Выявленная положительная динамика ПОЛ при действии цитопротекторов, по всей видимости, определила восстановление липидного компонента эритроцитарных мембран и изменение работы Na-K-АТФазы. Так, при введении мексикора с 3 суток исследования регистрировали значимое увеличение активности Na-K-АТФазы на 96%, при введении цитофлавина на 32% относительно значений интактных животных. С 7 суток исследования регистрировалось постепенное уменьшение активности фермента до значений нормы при действии цитофлавина. При действии мексикора сохранялась высокая активность фермента (была выше на 23% относительно нормы) до 7 суток, к 12 суткам отмечалось восстановление активности Na-K-АТФазы (рисунок 9 Д, таблица 8).

Анализ метаболической активности эритроцитов выявил, что действие цитопротекторов способствовало пролонгированному увеличению содержания АТФ в эритроцитах с 7 суток посттравматического периода, наиболее выраженному при действии цитофлавина (рисунок 9 Д, Е). При этом на 1-3 сутки посттравматического периода регистрировали рост концентрации 2,3-ДФГ на 72.6% и 123.4% при действии цитофлавина соответственно относительно нормы, начиная с 7 суток исследования отмечали снижение концентрации 2,3-ДФГ (рисунок 9 Е).

Следует отметить, что внутрибрюшинное введение цитофлавина вызывало наиболее выраженное положительное влияние на поверхностно-структурные и метаболические показатели эритроцитов. Данный эффект подтверждается

высокой корреляционной зависимостью, связанной с увеличением ЭФПЭ от снижения агрегации эритроцитов ($r=0.91$) и увеличения концентрации АТФ ($r=0.92$) в клетке. Тогда как при действии мексикора отмечали значительное уменьшение концентрации МДА, что коррелировало с повышением электроотрицательности эритроцитов ($r=0.98$) и уменьшением агрегации эритроцитов ($r=0.98$).

На 1 сутки посттравматического периода при действии мексикора регистрировали увеличение числа эритроцитов и повышение концентрации гемоглобина в цельной крови на 8.8% и 9.1% соответственно (таблица 9). С 3 суток эксперимента наблюдали восстановление исследуемых показателей до значений интактной группы.

Таблица 9. Гематологические показатели крыс на фоне экспериментальной черепно-мозговой травмы в посттравматический период черепно-мозговой травмы при действии мексикора и цитофлавина

Показатель	Интактные крысы	Группа	Время после ЧМТ (сутки)			
			1	3	7	12
Количество эритроцитов, $10^{12} \cdot \text{л}^{-1}$	5.81 ± 0.4	ЧМТ+М	6.32 $\pm 0.26^{\blacktriangle}$	5.83 $\pm 0.16^{\blacktriangle}$	5.86 $\pm 0.14^{\blacktriangle}$	5.27 $\pm 0.18^{\blacktriangle}$
		ЧМТ+ЦФ	6.78 $\pm 0.23^{*\blacktriangle}$	6.34 $\pm 0.64^{\blacktriangle}$	5.87 $\pm 0.32^{\blacktriangle}$	5.85 $\pm 0.38^{\blacktriangle}$
Гемоглобин, $\text{г} \cdot \text{л}^{-1}$	104.6 ± 2.24	ЧМТ+М	114.14 $\pm 2.13^*$	99.3 $\pm 1.23^{*\blacktriangle}$	103.63 $\pm 2.26^{\blacktriangle}$	107.67 $\pm 2.41^{\blacktriangle}$
		ЧМТ+ЦФ	112.23 $\pm 2.13^{*\blacktriangle}$	109.67 $\pm 4.97^{\blacktriangle}$	106.25 $\pm 2.76^{\blacktriangle}$	105.83 $\pm 3.43^{\blacktriangle}$

Примечание: Среднее \pm SD. «*» – статистически значимые различия относительно значений интактной группы, $p \leq 0.05$; « \blacktriangle » – статистически значимые различия опыта от контроля, $p \leq 0.05$. Сокращения: М – мексикор, ЦФ – цитофлавин.

При действии цитофлавина на 1 и 3 сутки посттравматического периода отмечали повышение количества эритроцитов на 16.7% и 9.1%, увеличение

концентрации гемоглобина в цельной крови на 7.3% относительно показателей интактной группы животных.

Анализ морфометрических показателей эритроцитов, полученных методом интерференционной микроскопии от функциональных характеристик, выявил, что уменьшение фазовой высоты и диаметра эритроцитов сочеталось с увеличением концентрации гемоглобина и коррелировало с уменьшением окислительных процессов. Так, при действии цитофлавина наблюдалась зависимость, связанная с уменьшением фазовой высоты и диаметра от уменьшения концентрации МДА ($r=0.69$ и $r=0.97$ соответственно) и увеличения активности каталазы ($r=0.75$ и $r=0.99$). При действии мексикора отмечали уменьшение фазовой высоты и диаметра от снижения концентрации МДА ($r=0.79$ и $r=0.91$ соответственно) и фазовой высоты от увеличения активности каталазы ($r=0.81$). При этом изменение диаметра коррелировало с изменением ЭФПЭ и агрегации клеток при действии мексикора ($r=0.96$ и $r=0.95$ соответственно) и при действии цитофлавина ($r=0.76$ и $r=0.96$ соответственно).

Восстановление морфофункционального статуса эритроцитов при действии мексикора и цитофлавина сопровождалось снижением интенсивности гемостаза и уменьшением количества фибриногена (таблица 10).

Таблица 10. Свертывание крови крыс на фоне экспериментальной черепно-мозговой травмы в посттравматический период черепно-мозговой травмы при действии мексикора и цитофлавина

Показатель	Интактные	Группа	Время после ЧМТ (сутки)			
			1	3	7	12
Цельная кровь						
Начало свертывания, с	112±5.83	ЧМТ+ М	76.67±13.33*▲	115.00±6.48▲	98.33±5.03*▲	107.0±3.42▲
		ЧМТ+ ЦФ	148.33±8.07*▲	163.33±9.74*▲	81.67±9.46*	94.00±4.28*▲

Конец свертывания, с	182± 7.44	ЧМТ+ М	166.7± 15.15▲	175.00± 9.79▲	168.33±1 1.14▲	170.0± 8.56
		ЧМТ+ ЦФ	248,33± 17.19*▲	270.00± 13.07*▲	146.0± 10.9*▲	170.00± 13.1*
Продолжительность процесса свертывания, с	60± 7.07	ЧМТ+ М	81,67± 8,02*▲	50,00± 5,16▲	65,00± 3,19▲	65,00± 3,06▲
		ЧМТ+ ЦФ	130,00± 14,61*▲	106,67± 13,62*	58,33± 6,54▲	77,47± 4,82*▲
Начало ретракции и фибринолиза, с	570± 17.03	ЧМТ+ М	630.00± 17.32*▲	656.67± 21.41*▲	536.67± 18.09	650.00± 15.44*
		ЧМТ+ ЦФ	713.33± 23.02*▲	711.67± 18.37*▲	521.67± 16.5*	605.00± 16.67*
Плазма крови						
Активированное частичное тромбопластиновое время, с	17.94 ± 0.87	ЧМТ+ М	14.85 ±0.25*	17.63 ±0.41▲	19.24 ±0.27▲	18.44 ±0.19▲
		ЧМТ+ ЦФ	22.93 ±0.54*▲	21.07 ±0.52*▲	18.76 ±0.57▲	17.43 ±0.3▲
Протромбиновое время, с	22.93 ± 1.35	ЧМТ+ М	24.84 ±0.67▲	23.6 ±0.47▲	20.68 ±0.38▲	22.13 ±29▲
		ЧМТ+ ЦФ	27.82 ±1.1*▲	24.5 ±0.53▲	21.88 ±1.76▲	22.45 ±0.4▲
Фибриноген, г/л	2.62 ±0.1	ЧМТ+ М	5.52 ±0.23*▲	4.42 ±0.31*▲	2.18 ±0.18*▲	2.39 ±0.26▲
		ЧМТ+ ЦФ	6.09 ±0.59*▲	5.36 ±0.28*▲	3.57 ±0.22▲	2.64 ±0.55

Примечание: Среднее ± SD. «*» – статистически значимые различия относительно значений интактной группы, $p \leq 0.05$; «▲» – статистически значимые различия опыта от контроля, $p \leq 0.05$. Сокращения: М – мексикор, ЦФ – цитофлавин.

Анализ показателей свертывания цельной крови показал, что при внутрибрюшинном введении мексикора с 1 суток исследования продолжительность свертывания цельной крови увеличивалась на 36%, хотя

время начала и конца процесса свертывания крови были снижены на 32% и 8% соответственно (рисунок 10 А, таблица 10). Время ретракции и фибринолиза возросло на 10% по сравнению с интактной группой животных. С 3 - 7 суток изучаемые показатели свертывания цельной крови восстановились до значений интактной группы и поддерживались на этом уровне до конца исследования.

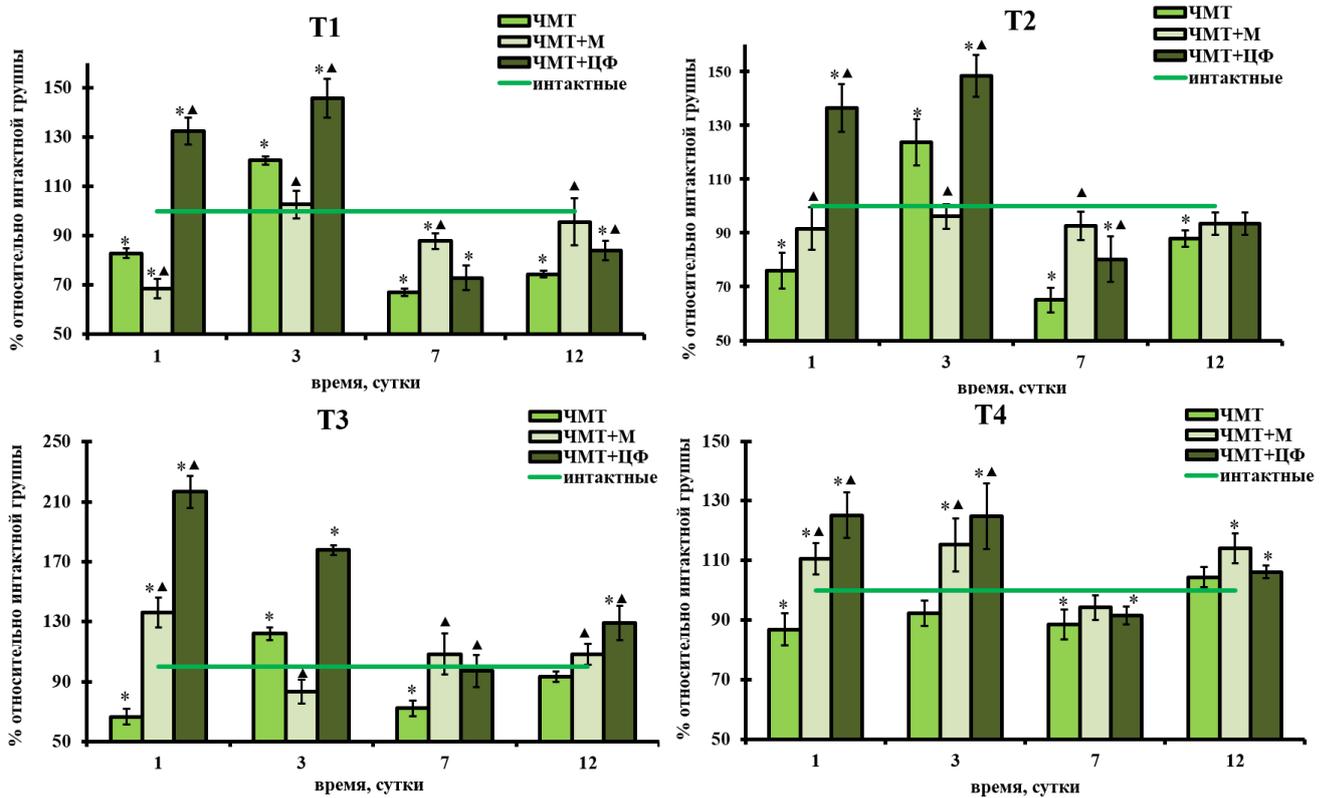


Рисунок 10. Динамика изменения гемостатических показателей крови в посттравматический период ЧМТ крыс при действии цитопротекторов (А – изменение показателей свертывания цельной крови при действии мексикора; Б – изменение показателей свертывания цельной крови при действии цитофлавина). Среднее \pm SD. «*» – статистически значимые различия относительно значений интактной группы, $p \leq 0.05$; «▲» – статистически значимые различия опыта от контроля, $p \leq 0.05$. Сокращения: М – мексикор, ЦФ – цитофлавин. Т1 – начало свертывания крови, Т2 – конец свертывания крови, Т3 – продолжительность свертывания крови, Т4 – время ретракции и фибринолиза.

Действие цитофлавина на 1 и 3 сутки посттравматического периода вызывало увеличение начала, конца свертывания крови и продолжительности процесса свертывания крови, а также времени начала ретракции и фибринолиза в 1,5 – 2 раза относительно интактных животных. С 7 суток наблюдалось восстановление исследуемых параметров до значений интактной группы (таблица 10, рисунок 10 Б).

Анализ показателей свертывания плазмы крови показал, что увеличение АЧТВ на 17% и нормализацию протромбинового времени при действии мексикора на 3 сутки после травмы, уменьшение количества фибриногена до значений интактной группы на 7 сутки исследования (таблица 10). При действии цитофлавина на 1 сутки исследования было выявлено увеличение АЧТВ на 28%, протромбинового времени на 21% относительно значений интактной группы. К 12 суткам после травмы уровень фибриногена снизился до нормы.

Полученные результаты свидетельствуют, что цитофлавин в сравнении с мексикором оказывал более выраженное действие на показатели свертывания крови. Так, внутрибрюшинное введение мексикора увеличивало время свертывания крови в первую фазу гемостаза на протяжении всего периода исследования, тогда как цитофлавин увеличивал продолжительность свертывания крови как в первую, так и во вторую фазу. Однако мексикор уменьшал содержание фибриногена в плазме крови с 3 суток исследования, тогда как цитофлавин с 7 суток. Следует отметить, что снижение фибрина в плазме крови коррелировало с уменьшением агрегационной способности эритроцитов при действии цитофлавина ($r=0.95$) и мексикора ($r=0.86$), а снижение гиперсвертываемости крови с восстановлением морфологии клеток.

Таким образом, использование цитопротекторов в посттравматическом периоде ЧМТ снижало скорость протекания дезинтеграционных процессов в эритроцитах с последующей компенсацией коагулянтных каскадов. Эффекты действия цитофлавина и мексикора регистрировались на всем протяжении

исследования, что позволяет предположить, как непосредственное действие препаратов на эритроциты, так и опосредованное их влияние. Обсуждая выявленные эффекты сукцинатсодержащих препаратов мексикора и цитофлавина, следует отметить, что антигипоксическое действие сукцината пролонгируется его влиянием на стабильность и активность чувствительного к гипоксии фактора HIF-1 α . Этот фактор является кислород-чувствительным протеиновым комплексом и запускает экспрессию целого ряда пептидов, в том числе эритропоэтина (EPO), белков-транспортёров глюкозы (GLUT 1, 3), ферментов гликолиза (Liu et al., 2020). Наличие сукцинатных рецепторов на эритроидных клетках-предшественниках, действие которых сопряжено с G-белками и определяет повышение концентрации внутриклеточного Ca²⁺ (Grimolizzi, 2018). По всей видимости, введение сукцинатсодержащих препаратов крысам в посттравматическом периоде стимулирует эритропоэз и метаболизм клеток, что отражается на динамике морфофункциональных показателей эритроцитов.

Для выявления возможности непосредственного действия цитофлавина и мексикора на эритроциты далее были проведены эксперименты *in vitro* с моделированием процессов, сопровождающих развитие ЧМТ: гипердреналемии, окислительного стресса и лактоацидоза.

3.3. Механизмы ответной реакции эритроцитов в условиях гипердреналемии, окислительного стресса и лактоацидоза при действии цитофлавина и мексикора *in vitro*

Моделирование гипердреналемии, окислительного стресса и лактоацидоза сопровождалось снижением ЭФПЭ, увеличением агрегации при усилении липопероксидации и энергодефицита (рисунок 11, таблица 11).

Наиболее выраженные изменения функциональных показателей эритроцитов были выявлены в условиях гипердреналемии, что выражалось в снижении на 36.4% ЭФПЭ, увеличении агрегации эритроцитов на 34.3%, концентрации МДА на 66.6%, снижении АТФ и 2.3-ДФГ на 21% и 10% относительно значений интактной группы животных (таблица 11).

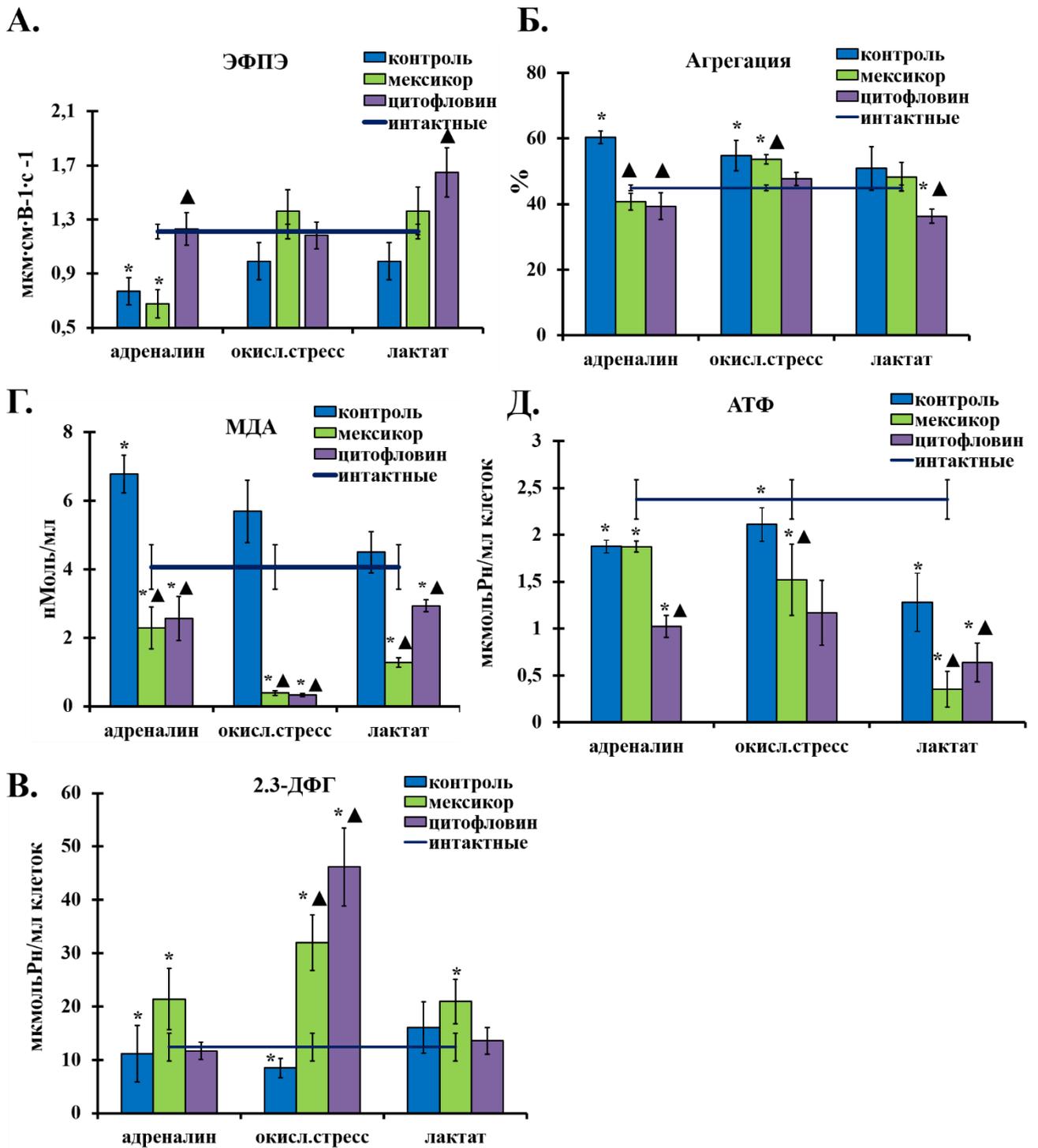


Рисунок 11. Динамика изменения функциональных показателей эритроцитов при разных видах стресса на фоне действия цитофлавина и мексикора. Среднее \pm SD. «*» – статистически значимые различия относительно значений интактной группы, $p \leq 0.05$; «▲» – статистически значимые различия опыта от контроля, $p \leq 0.05$.

Таблица 11. Динамика функционально-метаболических показателей эритроцитов крови крыс при разных видах стресса *in vitro*

Показатель	Интактные крысы	Группа	Модель стресса		
			гиперадреналемия	окислительный стресс	лактоацидоз
ЭФПЭ, мкм·см·В-1·с⁻¹	1.21 ±0.06	контроль	0.77±0.1*	0.99±0.14	0.99±0.14
		мексикор	0.68±0.1*	1.36±0.16	1.36±0.18
		цитофлавин	1.23±0.12#	1.18±0.1	1.65±0.18#
Агрегация эритроцитов, %	44.96 ±0.84	контроль	60,36±1.94*	54.6±4.59*	50.94±6.63
		мексикор	40.4±2.52#	53.62±1.43*#	48.3±4.37
		цитофлавин	39.38±4.09#	47.72±1.97	36,34±2.11*#
МДА, нМоль/мл	4.07 ±0.65	контроль	6.78±0.55*	5.69±0.91	4.5±0.61
		мексикор	2.29±0.61*#	0.39±0.06*#	0.32±0.14*#
		цитофлавин	2.56±0.64*#	0.39±0.05*#	1.28±0.14*#
АТФ, мкмольРн/мл клеток	2.38 ±0.21	контроль	1.88±0,07*	2.11±0.18*	0.28±0.31*
		мексикор	1.87±0.06*	1.52±0.38*#	0.35±0.19*#
		цитофлавин	1.02±0.12*#	1.17±0.34	0.64±0.2*#
2.3-ДФГ, мкмольРн/мл клеток	12.40 ±2.57	контроль	11.15±2.28*	8.48±1.83*	16.04±4.81
		мексикор	21.41±5.77*	32.0±5.18*#	20.93±4.2*
		цитофлавин	11.68±1.62	46.18±7.31*#	13.58±2.49

Примечание: Среднее ± SD. «*» – статистически значимые различия относительно значений интактной группы, $p \leq 0.05$; «#» – статистически значимые различия опыта от контроля, $p \leq 0.05$.

Инкубация эритроцитов с цитофлавином и мексикором приводила к однотипным функциональным изменениям эритроцитов – снижению концентрации МДА, повышению ЭФПЭ и уменьшению агрегации. При этом действие мексикора в большей степени вызывало снижение концентрации МДА, а действие цитофлавина – рост ЭФПЭ и уменьшение агрегации эритроцитов. Моделирование гиперадреналемии и лактоацидоза при действии цитофлавина и мексикора не вызывало изменения концентрации 2.3-ДФГ относительно контроля

и только на фоне окислительного стресса регистрировался значительный рост данного показателя при действии цитопротекторов. При этом в исследуемых модельных системах препараты усугубляли энергодефицит в эритроцитах. Наиболее выраженные нарушения метаболизма наблюдали при инкубировании эритроцитов с молочной кислотой, что выразалось в значимом снижении концентрации АТФ.

Увеличение количества адреналина в крови происходит у пациентов с ЧМТ на фоне гипоксии и ацидоза. Известно, что в области первичного повреждения в течение первых трёх часов резко снижается концентрация АТФ, в течение шести часов нарастает уровень эксайтотоксичности, кальция и молочной кислоты, что приводит к развитию выраженного окислительного стресса через 12 – 36 часов и запуску программы апоптоза клеток через 48 часов (Candelario, 2009; Greve et al., 2009). Вследствие развивающегося энергодефицита и увеличения концентрации молочной кислоты в организме пациентов формируется метаболический ацидоз, который приводит к снижению активности ферментов метаболических и метгемоглобинредуктазных систем (Кленова, 2003, Черний и др., 2015). Развитие лактоацидоза с повышением лактата в ткани мозга и спинномозговой жидкости значительно ускоряет процессы дезинтеграции и гибели эритроцитов в результате чрезмерного окисления липидов и аутоокисления гемоглобина (Кармен и др., 2011). Быстро развивающийся окислительный стресс и лактоацидоз приводят к появлению гидрофильных включений в гидрофобном слое, образованию водных пор, нарушая целостность мембраны (Кленова, 2003).

Цитофлавин и мексикор, действуя на эритроциты в условиях гипердреналемии, окислительного стресса и лактоацидоза, вызывают изменения подобные тем, что регистрируются в условиях *in vivo* на начальном этапе ЧМТ, т.е. снижают интенсивность липопероксидации, и падение агрегации на фоне энергодефицита. Однако, в динамике посттравматического периода в исследовании *in vivo* действие мексикора и цитофлавина вызывало увеличение энергетического потенциала клеток, что, вероятно, обусловлено наличием

цитопротекторной активности мексикора и цитофлавина в обеспечении регенерации эритроидного ростка костного мозга и увеличении в крови количества высокорезистентных эритроцитов.

Таким образом, полученные результаты доказывают целесообразность использования мексикора и цитофлавина в качестве корректора морфоструктурных и функциональных показателей эритроцитов, что связано, в том числе и с уменьшением восстановительного периода функциональных показателей красной крови. Проведенное экспериментальное исследование позволяет наметить новое направление использования мексикора и цитофлавина в качестве корректора структурно-функциональных показателей в посттравматический период ЧМТ.

3.4. Исследование морфофункционального состояния головного мозга и моторной функции крыс в посттравматический период ЧМТ

Для подтверждения эффективности применения мексикора и цитофлавина при ЧМТ были проведены исследования микроциркуляции, морфофункционального состояния мозга и моторной функции крыс. По данным гистологического исследования закрытая ЧМТ приводила к острому расстройству кровообращения в коре головного мозга, появлению мелкоочаговых кровоизлияний, разрыву целостности стенки сосудов и выходу эритроцитов за пределы сосудистого русла в области первичной травмы (рисунок 12 А, Б, В).

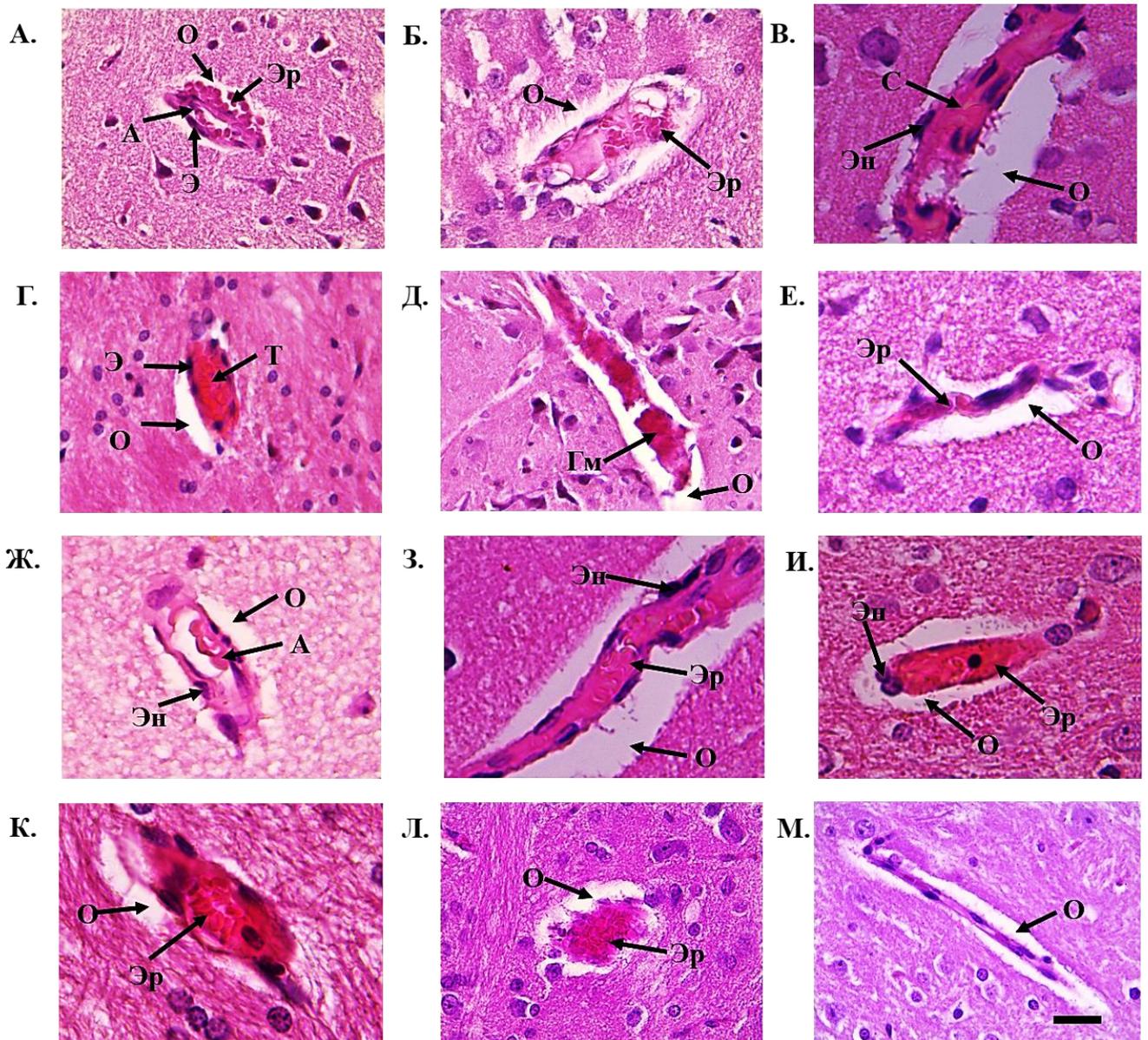


Рисунок 12. Структура микроциркуляторного русла головного мозга крыс контрольной группы после черепно-мозговой травмы. (А – Артериола. На 1 сутки после травмы отмечалось полнокровие сосудов, единичные периваскулярные кровоизлияния, агрегаты из эритроцитов, формировался сильно выраженный периваскулярный отек; Б – Венола. На 1 сутки после травмы наблюдали диапедез, сладжируемые эритроциты, формировался сильно выраженный периваскулярный отек; В – Капилляр. На 1 сутки после травмы в капиллярах эритроциты были расположены в виде сладжей, эндотелий отёчный, сильный перикапиллярный отёк; Г – Артериола. На 3 сутки после травмы в просвете артериол встречались красные и гиалиновые тромбы, формировался сильно выраженный периваскулярный отек;

Д – Венола. На 3 сутки после травмы в просвете венул выявлялись сладжируемые эритроциты и гиалиноподобные массы, отмечался сильно выраженный отек эндотелия и периваскулярный отёк; Е – Капилляр. На 3 сутки после травмы в просвете отмечались сладжированные эритроциты, отек эндотелия, сильно выраженный периваскулярный отек; Ж - Артериола. Через 7 суток после травмы в артериолах встречались пристеночные агрегаты эритроцитов. Определялся умеренный отек эндотелия и сильно выраженный периваскулярный отек; З - Венола. Через 7 суток после травмы в просвете некоторых венул выявлялись гомогенные массы розового цвета, сладжированные эритроциты и тромбы, умеренный отек эндотелия повсеместно определялся умеренно выраженный периваскулярный отек; И – Капилляр. Через 7 суток после травмы в капиллярах отмечалось полнокровие, сохранялся сильно выраженный эндотелиальный и периваскулярный и отек; К – Артериола. К 12 суткам после ЧМТ в просвете артериолы эритроциты, умеренный периваскулярный отек; Л - Венола. К 12 суткам после ЧМТ в просвете венолы определяются свободно лежащие эритроциты, отек эндотелия не выражен, определяется умеренно выраженный периваскулярный отек; М – Капилляр. К 12 суткам после ЧМТ в просвете капилляра свободно лежащие эритроциты, умеренный отек эндотелия и умеренный периваскулярный отек). Сокращения: А – агрегация эритроцитов, Гм – гиалиновые массы, О – отёк, Т – тромб, Эн – эндотелиоциты, Эр – эритроциты. Масштабная линейка 100 мкм, исходное увеличение $\times 200$ для артериол. Масштабная линейка 50 мкм, исходное увеличение $\times 400$ для венул и капилляров.

Вне очага первичного повреждения на уровне артериол, вен и капилляров выявлялась неравномерность кровенаполнения сосудов, полное спадание просвета одних (рисунок 12 В) и переполнение кровью других, отек стенки сосудов и эндотелиальных клеток. Выявленные нарушения сопровождались диапедезом, тромбами, сладжами и агрегатами из эритроцитов, набуханием ядер эндотелиоцитов, увеличением площади периваскулярного и перикапиллярного отека относительно нормы (рисунок 13).



Рисунок 13. Структура микроциркуляторного русла головного мозга интактных крыс. (А - Артериола. В просвете большинства артериол определялись свободно лежащие эритроциты, эндотелий был без отека. Периваскулярный отек отсутствует; Б – Венула. Просвет свободный от форменных элементов крови. Отек эндотелия и периваскулярный отек отсутствует; В – Капилляр. В просвете свободно лежащие эритроциты в виде цепочек. Периваскулярный отек отсутствует). Сокращения: Эр – эритроциты. Масштабная линейка 100 мкм, исходное увеличение $\times 200$ для артериолы и капилляров. Масштабная линейка 200 мкм, исходное увеличение $\times 100$ для венулы.

Морфометрический анализ микроциркуляторного русла коры головного мозга крыс контрольной группы показал увеличение площади перикапиллярного отека в 2.7 раза, уменьшение диаметра капилляров на 40%, и как следствие уменьшение площади капиллярного русла в 2 раза относительно показателей интактной группы (таблица 12). Вероятно, сужение диаметра капилляров связано с набуханием клеток эндотелия, формированием эндотелиальной дисфункции, отеком глиальной ткани и механическим сдавлением извне. Максимальные изменения морфологического состояния сосудистого русла головного мозга отмечали на 1 - 3 сутки после травмы в зоне первичного повреждения.

Таблица 12. Сравнительная характеристика морфометрических показателей головного мозга крыс в посттравматическом периоде черепно-мозговой травмы в исследуемых группах

Показатель	Интактные крысы	Группа	Этапы исследования, сутки			
			1	3	7	12
Диаметр капилляров, мкм ²	5.5 5±0.0 6	ЧМТ	3.25±0.05 *	3.95±0.06 *	5.21±0.05 *	5.94±0.03 *
		ЧМТ+М	3.53±0.04 *	3.49±0.05 *	4.75±0.03 *▲	5.19±0.04 *▲
		ЧМТ+ЦФ	3.45±0.07* *	3.36±0.04 *	4.25±0.06 *▲	4.86±0.05 *▲
Площадь перекапиллярного отека, мкм ²	124.2 ±12.8 3	ЧМТ	375.79 ±27.51*	533.86 ±34.71*	277.04 ±28.08*	194.64 ±24.18*
		ЧМТ+М	345 ±26.82 *	262.82 ±14.54 *▲	144.29 ±11.05 ▲	117.75 ±12.47 ▲
		ЧМТ+ЦФ	366.39 ±25.17*	394.96 ±21.75*▲	242.19 ±16.1**	156.2 ±18.34*▲
Площадь капиллярного русла, мм ²	628±3 2.24	ЧМТ	456 ±26.01*	954 ±41.64*	748±34*	560±29*
		ЧМТ+М	904.65 ±38.32*▲	1 118.2± 35.26*▲	884±31*	630±33▲
		ЧМТ+ЦФ	750 ±34.47*	998 ±38.15*	956 ±31.84*▲	784 ±28.93*▲

Примечание: Среднее ± SD, обсчет проводили по 10 полям зрения для каждой временной точки. «*» – статистически значимые различия относительно значений интактной группы, $p \leq 0,05$; «▲» – статистически значимые различия опыта от контроля, $p \leq 0,05$. Сокращения: М – мексикор, ЦФ – цитофлавин.

К 7 суткам исследования у животных контрольной группы отмечали достоверную тенденцию уменьшения плотности капиллярного русла на фоне увеличение среднего диаметра капилляров, что свидетельствует об уменьшении площади обменной поверхности относительно 3 суток. При этом в капиллярах сохранялось полнокровие, сильно выраженный эндотелиальный и периваскулярный отек (рисунок 12 И). В артериолах встречались пристеночные агрегаты эритроцитов, определялся умеренный отек эндотелия и сильно

выраженный периваскулярный отек (рисунок 12 Ж). В просвете некоторых венул выявлялись свободнолежащие эритроциты, но в большинстве венул определялись белковые массы, сладжированные эритроциты и тромбы, умеренно выраженный отек эндотелия и периваскулярный отек (рисунок 12 З).

С 12 суток исследования у крыс наблюдали восстановление кровообращения в коре головного мозга. В просвете артериол (рисунок 12 К) и венул (рисунок 12 Л) определялись свободно лежащие эритроциты, отёк эндотелия не выражен, однако сохранялись единичные тромбы и повсеместно умеренно выраженный периваскулярный отёк. Площадь периваскулярного отека артериол и венул уменьшилась в 2 раза относительно значений на 1 сутки. При исследовании капиллярного русла было установлено, что в просвете капилляров отмечали свободно лежащие эритроциты, сохранялся умеренный отек эндотелия и умеренный перикапиллярный отек (рисунок 12 М). Средний диаметр капилляров был увеличен на 8% относительно показателей интактной группы, плотность капиллярного русла снизилась на 28% относительно показателей на 7 сутки, но была на 10% ниже показателей нормы (таблица 12).

У животных получавших мексикор и цитофлавин на 1 сутки после ЧМТ так же, как и в контрольной группе наблюдали участки фрагментарного отслоения сосудистых оболочек головного мозга, вакуолизацию межклеточного пространства и мелкоочаговые геморрагические пропитывания мозговой ткани. В сосудах микроциркуляторного русла встречали пристеночные агрегаты из эритроцитов, микротромбы, гиалиноподобные массы, сильно выраженный отек эндотелия и периваскулярный отек (рисунок 14, 15, 16).

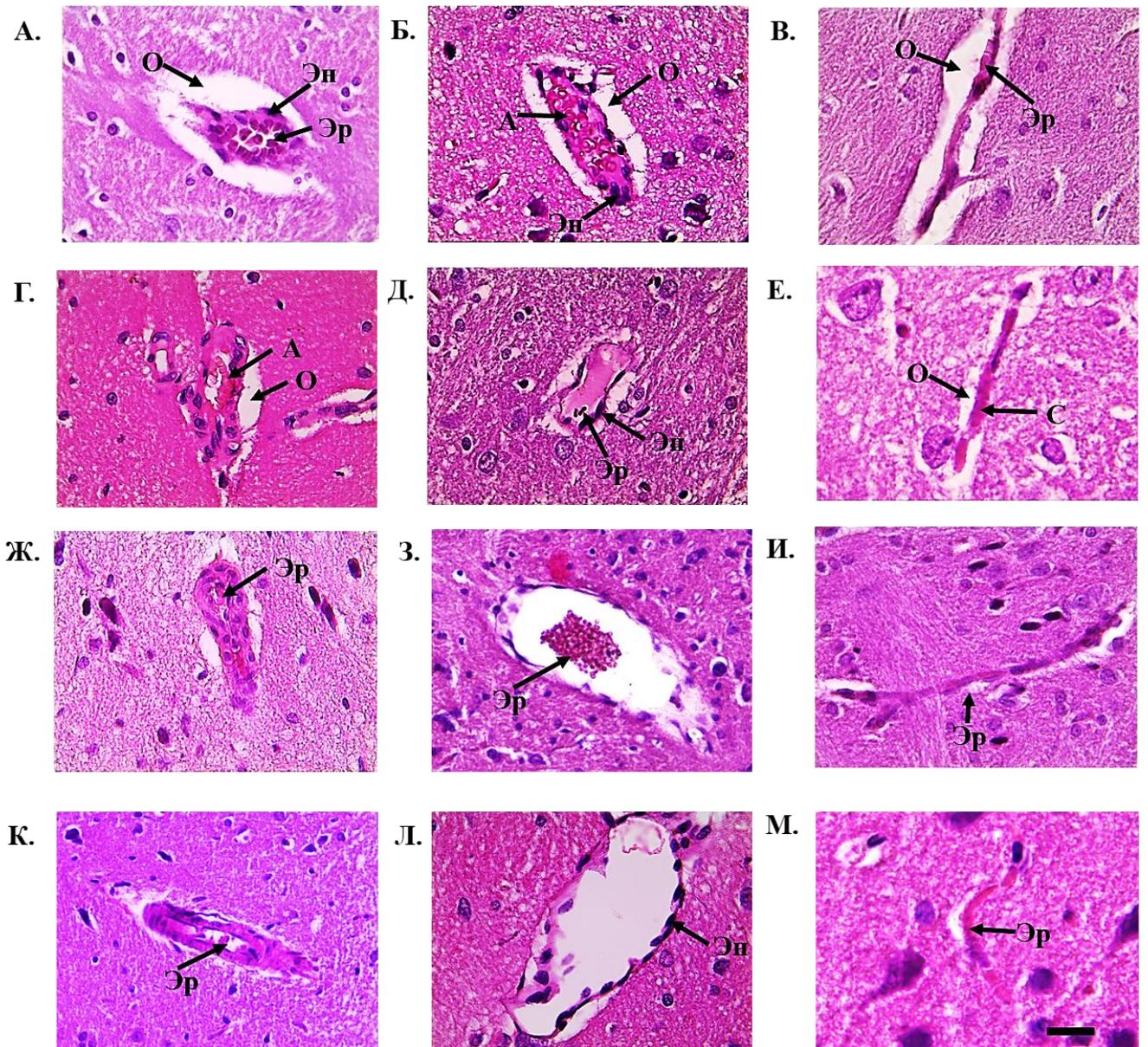


Рисунок 14. Структура микроциркуляторного русла головного мозга крыс после черепно-мозговой травмы при действии мексикора. (А – Артериола. На 1 сутки после ЧМТ в просвете артериолы единичные эритроциты, умеренный отек эндотелия, сильно выраженный периваскулярный отек; Б – Венола. На 1 сутки после ЧМТ в просвете венолы агрегаты из эритроцитов, умеренный отек эндотелия, сильно выраженный периваскулярный отек; В – Капилляр. На 1 сутки после ЧМТ в просвете капилляра сладжи из эритроцитов, умеренный отек эндотелия, сильно выраженный периваскулярный отек; Г – Артериола. На 3 сутки после травмы в просвете артериол встречались пристеночные агрегаты из эритроцитов. Определялся умеренный отек эндотелия и периваскулярный отек; Д

– Вenuла. На 3 сутки после травмы в венах наблюдался умеренный отек эндотелия, в просвете большинства из них определялись свободно лежащие единичные эритроциты; Е – Капилляр. На 3 сутки после травмы в капиллярах определялись сладжи эритроцитов, умеренный перекапиллярный отек; Ж – Артериола. Просвет артериолы частично спавшийся, в его просвете единичные эритроциты. Периваскулярный отек был слабо выражен; З – Вenuла. В просвете большинства венул определялись свободно лежащие форменные элементы крови. Повсеместно определялся слабо выраженный периваскулярный отёк; И – Капилляр. В просвете капилляра свободно лежащие эритроциты, периваскулярный отек не выражен; К – Артериола. К 12 суткам после ЧМТ в просвете большинства артериол встречались единичные форменные элементы крови, эндотелий был без признаков отека. Периваскулярный отек был слабо выражен; Л – Вenuла. К 12 суткам после ЧМТ в просвете большинства венул отсутствовали форменные элементы крови или встречались единичные свободно лежащие эритроциты, эндотелий был со слабо выраженным отеком. Периваскулярный отек был слабо выражен; М – Капилляр. К 12 суткам после ЧМТ в просвете капилляров выявлялись свободно лежащие эритроциты. Вокруг большинства из них отсутствовал периваскулярный отек). Сокращения: А – агрегация эритроцитов, О – отёк, С – сладж эритроцитов, Эн – эндотелиоциты, Эр – эритроциты. Масштабная линейка 100 мкм, исходное увеличение $\times 200$ для артериол и венул. Масштабная линейка 50 мкм, исходное увеличение $\times 400$ для капилляров.

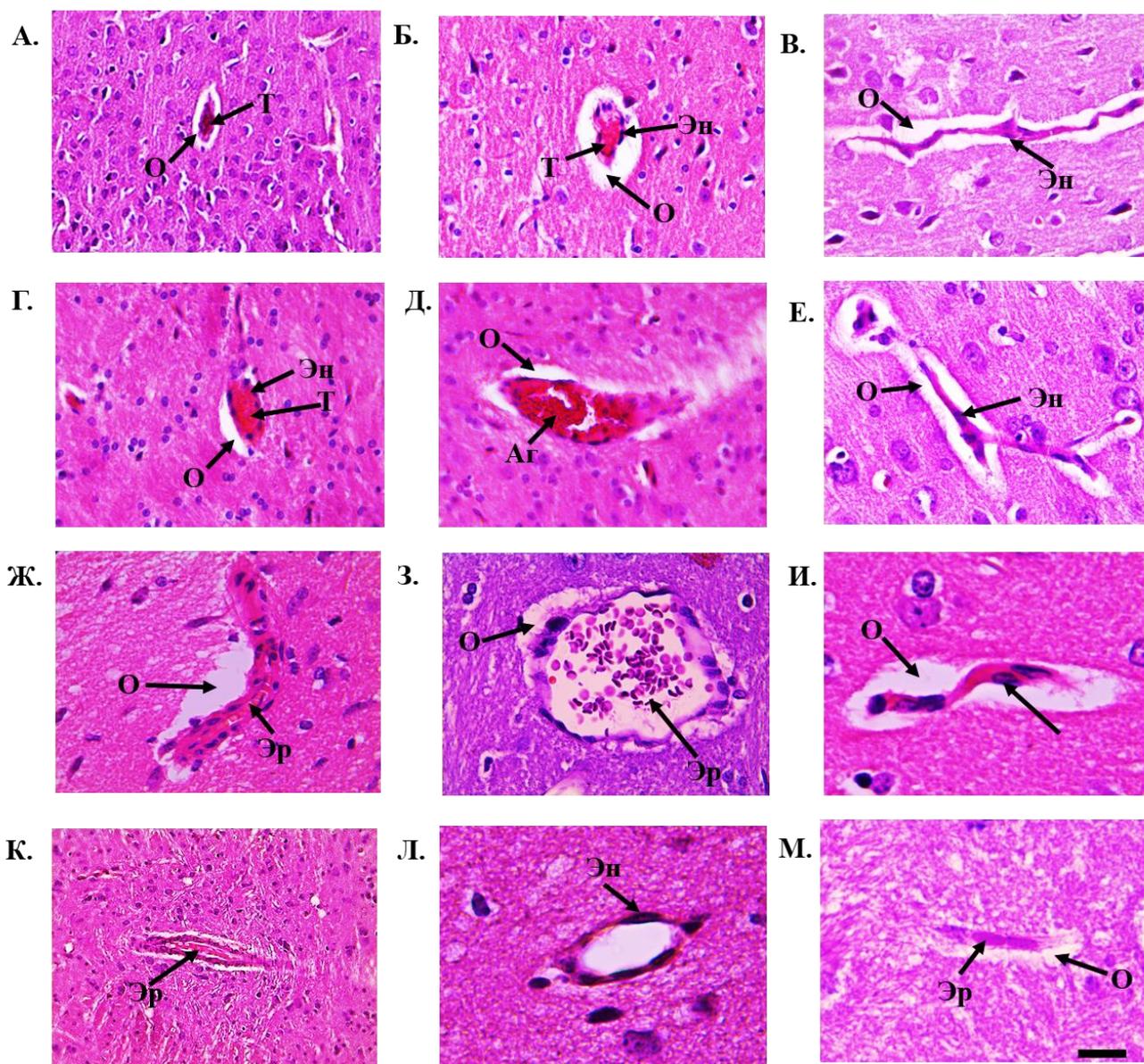


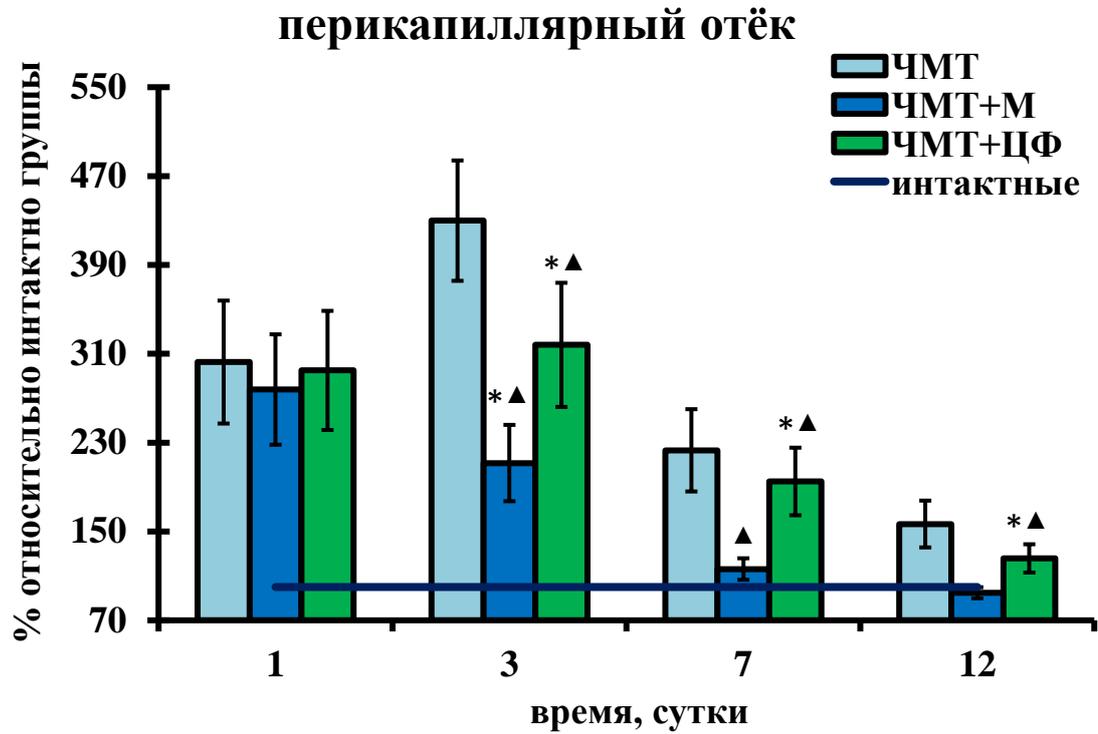
Рисунок 15. Структура микроциркуляторного русла головного мозга крыс после черепно-мозговой травмы при действии цитофлавина. (А – Артериола. На 1 сутки после ЧМТ в просвете артериолы отмечали красные тромбы, выраженный отек эндотелия и периваскулярный отек; Б – Венола. На 1 сутки после ЧМТ в просвете отмечали агрегаты из эритроцитов, тромбы, сильно выраженный отек эндотелия и периваскулярный отек; В – Капилляр. На 1 сутки после ЧМТ в капиллярах определялись эритроциты, расположенные в виде цепочек, сильно выраженный периваскулярный отек; Г - Артериола. На 3 сутки после травмы в просвете большинства артериол наблюдались агрегаты эритроцитов, гиалиновые тромбы, умеренный периваскулярный отек; Д – Венола. На 3 сутки после травмы

в просвете большинства венул определялись скопления эритроцитов, отмечался умеренный периваскулярный отек; Е – Капилляр. На 3 сутки после травмы в просвете определялись эритроциты, умеренно выраженный отек эндотелия, сильно выраженный периваскулярный отек; Ж - Артериола. Через 7 суток после травмы в просвете большинства артериол встречались единичные форменные элементы крови, эндотелий был без признаков отека. Периваскулярный отек умеренно выражен; З - Венула. Через 7 суток после травмы в просвете большинства венул определялись свободно лежащие форменные элементы крови. Повсеместно определялся слабо выраженный периваскулярный отёк; И – Капилляр. Через 7 суток после травмы в просвете определялись отдельные эритроциты, отек эндотелия был умеренно выражен, определялся умеренный периваскулярный отек; К - Артериола. Через 12 суток после травмы в просвете большинства артериол определялись свободно лежащие форменные элементы крови, эндотелий был без отека. Периваскулярный отек был слабо выражен; Л – Венула. Через 12 суток после травмы просвет свободный от форменных элементов крови. Умеренный отек эндотелия, периваскулярный отек отсутствует; М – Капилляр. Через 12 суток после травмы в просвете два свободно лежащих эритроцита. Периваскулярный отек отсутствует. Сокращения: А – агрегация эритроцитов, О – отёк, С – сладж эритроцитов, Т – тромб, Эн – эндотелиоциты, Эр – эритроциты. Масштабная линейка 100 мкм, исходное увеличение $\times 200$ для артериол и венул. Масштабная линейка 50 мкм, исходное увеличение $\times 400$ для капилляров.

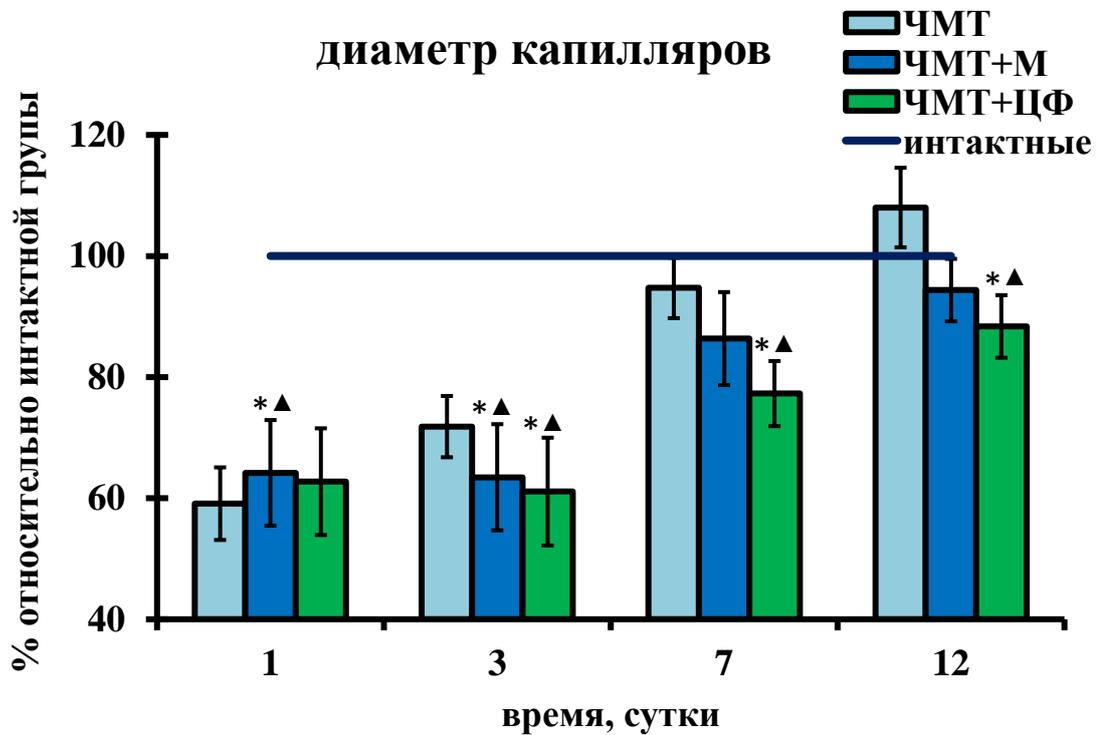
В капиллярном русле отмечали уменьшение среднего диаметра капилляров на 40% относительно значений интактной группы (рисунок 16). Однако, несмотря на сужение просвета капилляров после травмы, большинство капилляров находилось в функционально активном состоянии, что подтверждает морфометрический анализ (таблица 14), свидетельствующий о том, что при действии мексикором и цитофлавином площадь капиллярного русла была

статистически значимо выше относительно аналогичных значений контрольной группы крыс.

А.



Б.



В.

площадь капиллярного русла

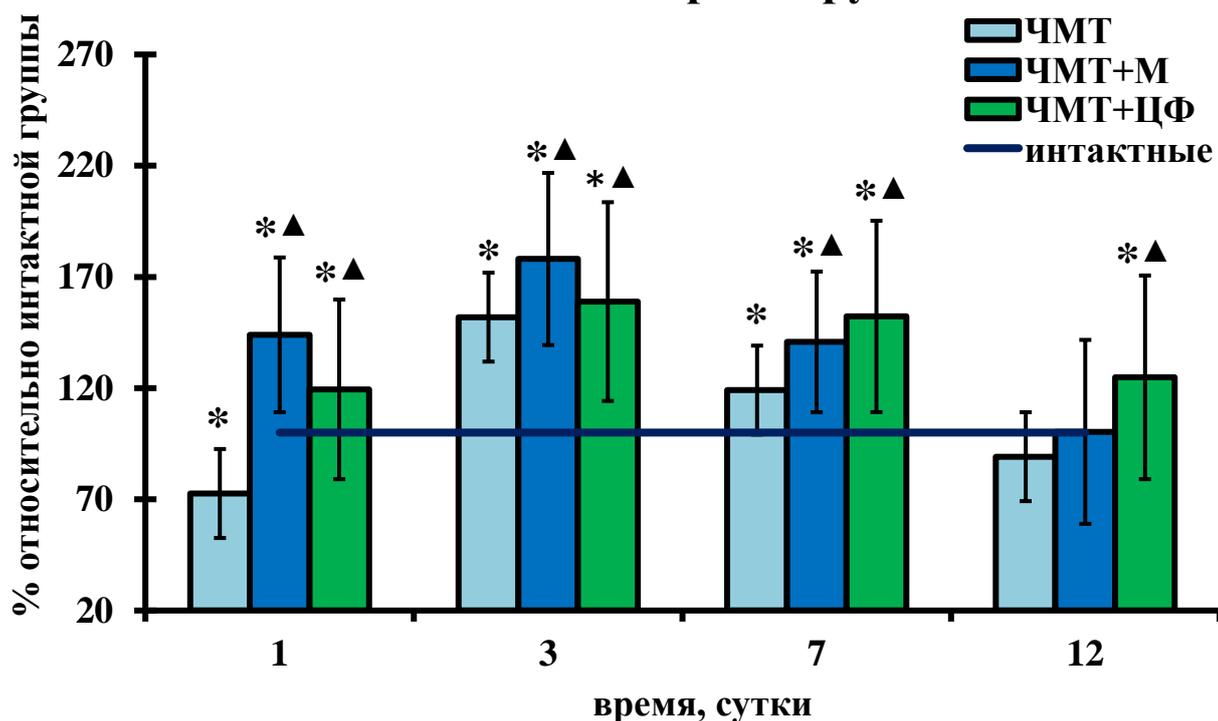


Рисунок 16. Динамика изменений морфометрических показателей капиллярного русла в исследуемых группах. Среднее \pm SD. «*» – статистически значимые различия относительно значений интактной группы, $p \leq 0.05$; «▲» – статистически значимые различия опыта от контроля, $p \leq 0.05$. Сокращения: М – мексикор, ЦФ – цитофлавин.

В ходе сравнительной цитопротекторной терапии с 3 суток отмечали тенденцию к снижению перикапиллярного отёка и увеличению площади капиллярного русла за счет вовлечения «плазматических» капилляров в ответ на возросшую кислородную потребность мозга, однако просветы сосудов оставались сужеными (таблица 12, рисунок 14 Е, рисунок 15 Е). Так, на фоне антиоксидантного действия мексикора увеличилась площадь капиллярного русла на 20%, а при действии цитофлавином на 5% относительно показателей в контрольной группе в этот период исследования (рисунок 16). При действии мексикора уменьшался периваскулярный отек артериол и у венул относительно показателей на 1 сутки после травмы, в то время как при действии цитофлавина статистически значимое снижение отёчности не было выявлено. При действии

мексикора в просвете большинства артериол и венул определяли свободно лежащие эритроциты, в некоторых сохранялись пристеночные агрегаты из эритроцитов и микротромбы (рисунок 14 Г, Д). Тогда как при действии цитофлавином в просвете большинства артериол и венул сохранялись агрегаты из эритроцитов и гиалиновые тромбы (рисунок 15 Г, Д).

На 7 сутки посттравматического периода при действии мексикором проявлялись выраженные репаративные изменения с тенденцией к нормализации структуры микроциркуляторного русла. В просвете артериол и венул определялись свободнолежащие эритроциты, в 30% сосудов отмечался отёчный эндотелий, повсеместно определялся слабо выраженный периваскулярный отек (рисунок 14 Ж, З). Площадь периваскулярного отёка артериол и венул снизилась на 25% и 50% соответственно относительно показателей интактной группы. В капиллярном русле: диаметр капилляров и площадь капиллярного русла восстанавливались до показателей нормы на фоне снижения перикапиллярного отека (рисунок 14 И, рисунок 16). Кроме того, нормализация состояния микроциркуляторного русла могла происходить за счет восстановления состояния эндотелиоцитов. При действии цитофлавином в просвете большинства артериол и венул определялись свободно лежащие эритроциты, эндотелий без признаков отека, вокруг умеренно выраженный периваскулярный отек (рисунок 15 Ж, З). Диаметр капилляров расширился на 23% относительно 1 суток, в результате чего отмечали снижение перикапиллярного отёка на 26% и увеличение площади капиллярного русла на 27% относительно показателей контрольной группы (рисунок 15 И, рисунок 16).

К 12 суткам исследования при действии цитопротекторов в просвете артериол отсутствовали форменные элементы крови или встречались единичные свободно лежащие эритроциты, сосудистый эндотелий и периваскулярный отёк слабо выражены. При действии мексикора диаметр капилляров достоверно не отличался от показателей нормы, в просвете выявлялись свободнолежащие эритроциты, отсутствовал перикапиллярный отек (рисунок 14 М, рисунок 16 Б).

Тогда как при действии цитофлавином диаметр капилляров оставался суженным (был меньше на 12% относительно показателей нормы), в единичных капиллярах встречались микроагрегаты и сохранялся небольшой перикапиллярный отек (рисунок 15 М, рисунок 16 Б).

Цитопротекторная терапия способствовала проходимости сосудисто-капиллярной сети и сохранению структурно-функциональной целостности эндотелиальной выстилки, являющейся основным клеточным компонентом системы регуляции агрегатного состояния крови, а также источником и главной мишенью активных форм кислорода в раннем посттравматическом периоде ЧМТ. «Включение» компенсаторных механизмов, способствующих уменьшению отека и деформации эндотелия при действии мексикора отмечали на 3-7 сутки, а при действии цитофлавином на 7-12 сутки исследования. Можно предположить, что наблюдаемые эффекты, связаны с антиоксидантным действием сукцината, который активирует фактор HIF-1 α , и вызывает повышение эндотелиального фактора роста (VEGF) (Ke, 2006). VEGF действует селективно на сосудистый эндотелий, обеспечивая его стабильность, способствуя пролиферации, миграции и формированию тубул эндотелиальных клеток (Losordo, 2004), тем самым оказывая влияние на ангиогенез. Снижение уровня VEGF обуславливает апоптоз эндотелия, ведущий к обструкции просвета сосудов (Tsutsumi, 2005). Кроме того, в поддержании в стабильном состоянии эндотелия участвует NO. VEGF взаимодействует с эндотелиальной NO-синтазой (eNOS) в кавеолах эндотелиальных клеток, регулируя ее активность и тем самым способствуя продукции NO. Оксид азота является мощным вазодилатором (Wan et al., 2011). По всей видимости, введение сукцинатсодержащих препаратов крысам в посттравматический период ЧМТ способствуют повышению антитромбогенного потенциала эндотелия через VEGF и стимулирует «включение» компенсаторных механизмов, что отражается на динамике морфоструктурных показателей сосудов.

Выявленные морфоструктурные изменения эритроцитов и микроциркуляторного русла коры головного мозга оказывали влияние на состояние нейронов, клеток глии и паренхимы головного мозга при экспериментальной ЧМТ и в динамике посттравматического периода (рисунок 17).

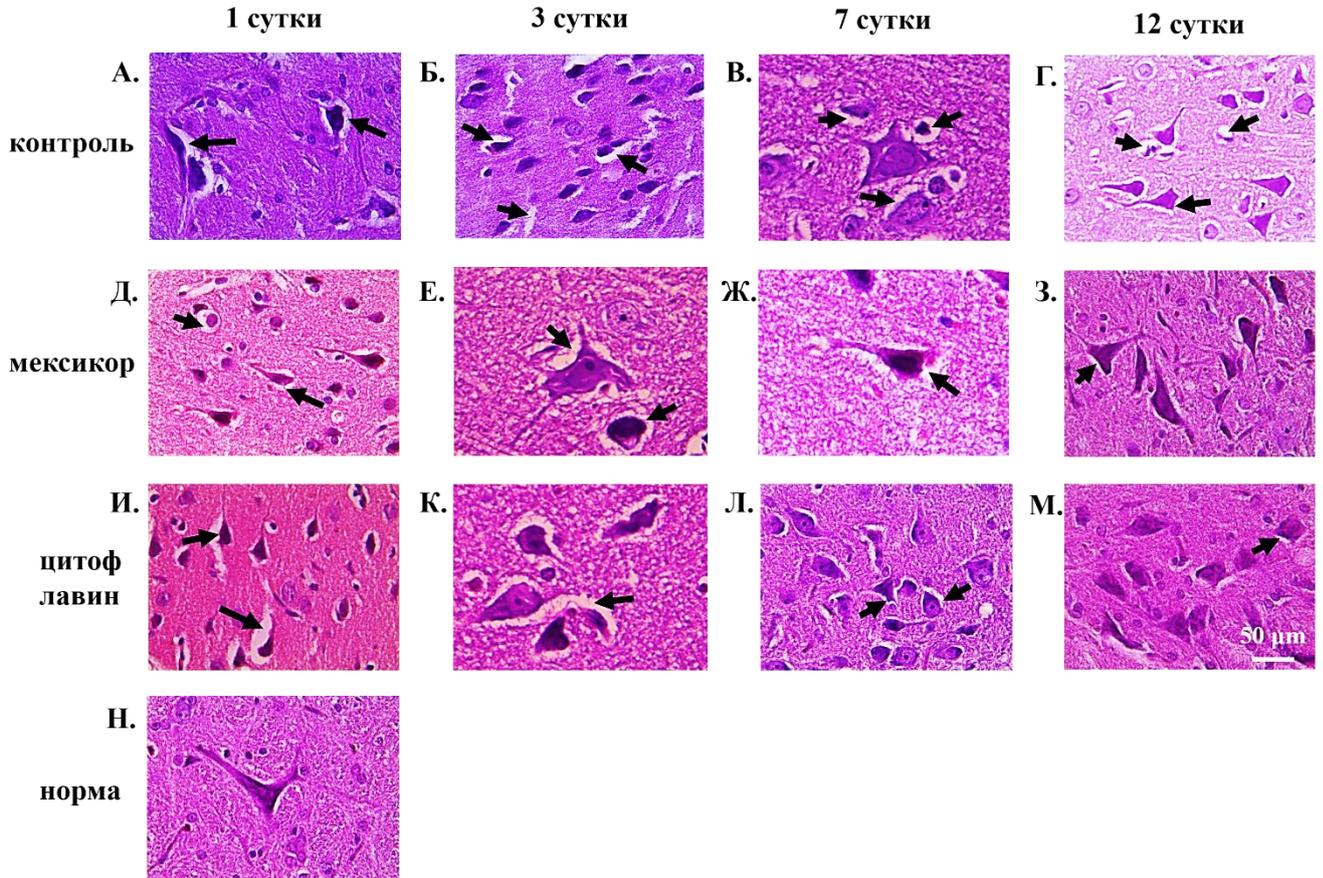


Рисунок 17. Нейроны коры головного мозга крыс после черепно-мозговой травмы в исследуемых группах. (А – на 1 сутки посттравматического периода нейроны и клетки глии с сильно выраженным перичеселлюлярным отеком. Межклеточное вещество сильно вакуолизировано; Б – 3 сутки посттравматического периода сильно выраженный перичеселлюлярный отек нейронов и клеток глии. Умеренное количество вакуолей в межклеточном веществе; В – 7 сутки посттравматического периода умеренный перичеселлюлярный отек нейронов и клеток глии. Небольшое количество вакуолей в межклеточном веществе; Г – 12 сутки посттравматического периода умеренный перичеселлюлярный отек нейронов и клеток глии. Единичные вакуоли в

межклеточном веществе; Д – 1 сутки посттравматического периода нейроны и клетки глии с сильно выраженным перичеллюлярным отеком. Умеренное количество вакуолей в межклеточном веществе; Е – 3 сутки посттравматического периода умеренно выраженный перичеллюлярный отек нейронов и клеток глии. Умеренное количество вакуолей в межклеточном веществе; Ж – 7 сутки посттравматического периода Слабо выраженный перичеллюлярный отек нейронов и клеток глии. Единичные вакуоли в межклеточном веществе; З – 12 сутки посттравматического периода Перичеллюлярный отек нейронов и клеток глии отсутствует. Межклеточное вещество не вакуолизировано; И – 1 сутки посттравматического периода. Нейроны и клетки глии с сильно выраженным перичеллюлярным отеком. Межклеточное вещество с умеренным количеством вакуолизировано; К – 3 сутки посттравматического периода. Сильно выраженный перичеллюлярный отек нейронов и клеток глии. Умеренное количество вакуолей в межклеточном веществе; Л – 7 сутки посттравматического периода. Умеренно выраженный перичеллюлярный отек нейронов и клеток глии. Умеренное количество вакуолей в межклеточном веществе; М – 12 сутки посттравматического периода. Умеренно выраженный перичеллюлярный отек нейронов и слабо выраженный перичеллюлярный отек клеток глии. Единичные вакуоли в межклеточном веществе; Н - Вокруг нейронов и глиальных клеток интактных животных перичеллюлярный отек отсутствовал, межклеточное вещество было не вакуолизировано). Масштабная линейка 50 мкм, исходное увеличение $\times 400$. Примеры перичеллюлярного отека вокруг нейронов и клеток глии обозначены стрелками.

В контрольной группе животных на протяжении всего исследуемого посттравматического периода (12 суток) регистрировали обратимые дегенеративно-дистрофическими изменения нейронов коры головного мозга. Максимальные изменения отмечались на 1 и 3 сутки. На 1 сутки после ЧМТ общая численность нейронов снизилась относительно интактной группы животных. При этом встречались нейроны с деформированными отростками, без

ядра и ядрышка и в состоянии карิโอплазмоцитоллиза. Площадь отека нейронов была на 80% больше в сравнении с нормой (рисунок 18). Вокруг элементов глии также отмечался выраженный и резко выраженный перицеллюлярный отек.

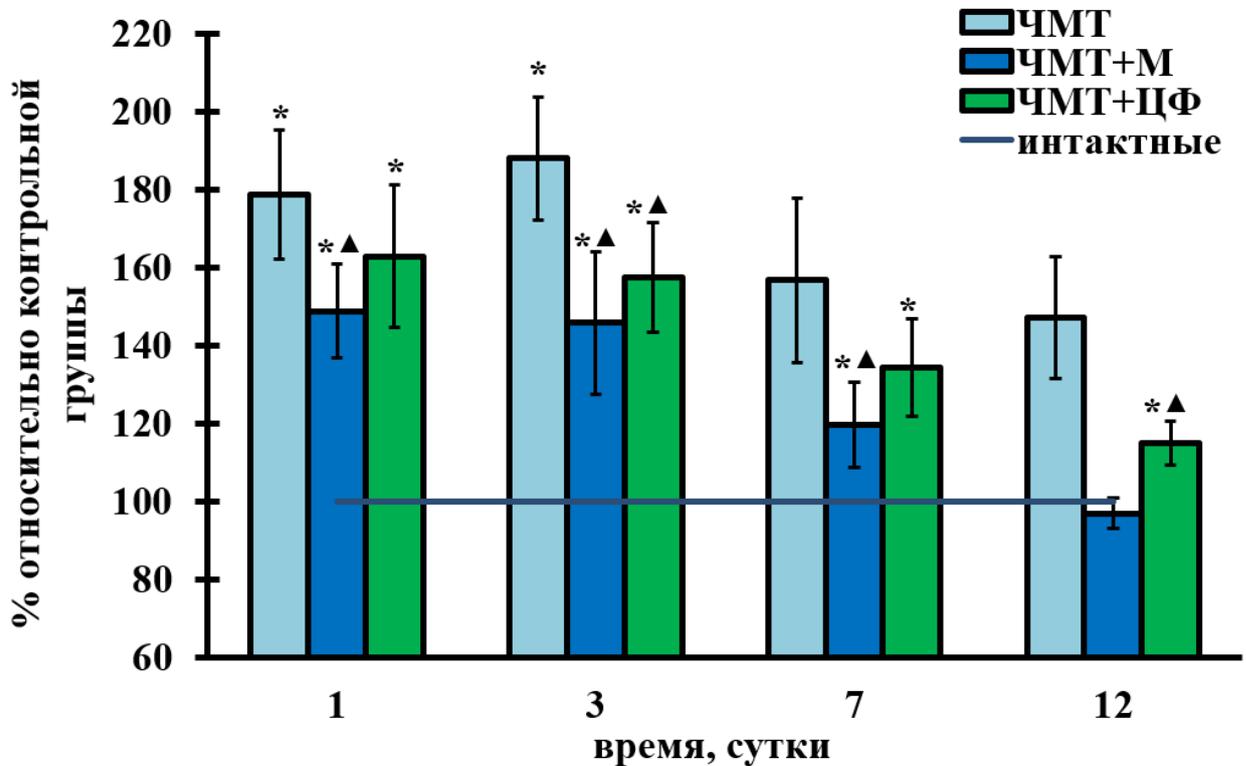


Рисунок 18. Площадь перицеллюлярного отека нейронов крыс в посттравматический период ЧМТ в исследуемых группах. Среднее \pm SD. «*» – статистически значимые различия относительно значений интактной группы, $p \leq 0.05$; «▲» – статистически значимые различия опыта от контроля, $p \leq 0.05$. Сокращения: М – мексикор, ЦФ – цитофлавин.

На 3 сутки посттравматического периода сохранялись выраженные дистрофические изменения нейроцитов: определялись нейроны с кариолизисом, в состоянии нейроцитоллиза, с вакуолизированной цитоплазмой, деформированной клеточной мембраной и сильно выраженным перицеллюлярным отеком (на 88% больше относительно показателей интактной группы). Общая численная плотность нейронов снижалась, но увеличивалось число гиперхромных сморщенных нейронов и клеток-теней. Клетки глии светлые, округлой формы с интенсивно окрашенным ядрышком, вокруг сохранялся

выраженный перицеллюлярный отек. Следует отметить, что основная масса измененных нейронов находилась в областях, удаленных от капилляров. В ткани головного мозга в зоне первичного повреждения отмечалась вакуолизация и расширение периваскулярных и перинейрональных пространств, которые отражали явления диффузного отека мозга.

На 7 сутки в контрольной группе животных часть нейронов сохранялась в сморщенном состоянии, с кариорексисом, в виде «тающих» нейронов и клеток-теней. Площадь перицеллюлярного отека уменьшалась на 13.4% относительно 1 суток. При этом плотность клеток на единицу площади увеличивалась относительно показателей на 3 сутки исследования. Клетки глии сохраняли правильную форму тела, иногда имели неровные границы, ядро их было интенсивно окрашено, вокруг отмечался сильно выраженный перицеллюлярный отек. К 12 суткам исследования наблюдали восстановление ткани головного мозга, уменьшение отека вокруг нейронов на 21.2%, снижение числа гиперхромных сморщенных нейронов и клеток-теней относительно 1 суток исследования.

На фоне цитопротекторной терапии через сутки после нанесения ЧМТ у животных также, как и в контрольной группе отмечались гидропические изменения в клетках головного мозга, но менее выраженные. В осветленной нейроплазме обнаруживалась губчатая пенистость, отдельные вакуоли, ядра были эктопированы, измененной формы, осветленные либо пикнотичные, некоторые из них утратили ядрышко (рисунок 17). В нейроплазме регистрировали пенистость, отдельные вакуоли, эктопию или пикнотичность ядер (рисунок 17). Численная плотность нейронов была снижена относительно нормы, но по сравнению с контролем выпадение нейронов было менее выраженным. Вокруг нейронов и клеток глии формировался сильно выраженный перицеллюлярный отек.

На 3 сутки посттравматического периода при действии цитопротекторов по сравнению с контролем структурные изменения ткани мозга были менее

выраженными: численная плотность нейронов увеличивалась, перинуклеарный отек был слабо выраженный и снизилась площадь перицеллюлярного отека на 22.5% при действии мексикора и на 10% при действии цитофлавина (рисунок 17).

На 7 сутки после травмы у крыс отмечалось уменьшение выраженности перицеллюлярного отека, повышение плотности нейронов в поле зрения. В исследуемых полях зрения при действии мексикора преобладали нейроны с хорошо выраженным ядром и ядрышком, длинными отростками, с умеренно выраженным перицеллюлярным отёком. Клетки глии светлые, округлой формы с интенсивно окрашенным ядрышком, со слабо выраженным перицеллюлярным отёком (рисунок 17). Обнаруженная ультраструктурная картина, свидетельствует о регрессе патологических изменений в нейронах и клетках глии. Тогда как при действии цитофлавином в 30% случаев определялись нейроны и клетки глии с деформированной клеточной мембраной и выраженным перицеллюлярным отеком. Также следует отметить, что при действии мексикора паренхима головного мозга была без признаков отёка, тогда как при действии цитофлавина местами сохранялась отёчность. На 12 сутки посттравматического периода у животных, получавших мексикор, наблюдалось восстановление нейронов и глиальных клеток, но вокруг единичных клеток сохранялся слабо выраженный перинуклеарный отек. При действии цитофлавином большинство нейронов имели хорошо выраженное ядро и ядрышко, умеренный перицеллюлярный отёк.

Таким образом, при действии мексикора на начальном этапе посттравматического периода (1-3 сутки после ЧМТ) наблюдали нейрорегенераторные изменения, тогда как при действии цитофлавина на вторичном этапе посттравматического периода (3-7 сутки после ЧМТ). Улучшение кислородтранспортной функции крови, показателей гемостаза, восстановление ангио-, цитоархитектоники коры головного мозга при действии цитофлавина и мексикора оказывало положительное влияние на восстановление моторной функции крыс в посттравматический период.

Анализ моторной функции крыс показал, что на фоне экспериментальной ЧМТ у крыс регистрировали снижение двигательных реакций (таблица 13).

Таблица 13. Анализ двигательной активности крыс в сравниваемых группах в посттравматический период черепно-мозговой травмы при действии мексикора и цитофлавина

Показатель	Интактные крысы	Группа	Этапы исследования, сутки			
			1	3	7	12
Передвижение по бруску, баллы	2.5±0.1	ЧМТ	6.8±0.9*	5.7±0.9*	4.9±0.5*	4.5±0.7*
		ЧМТ+М	4.2±0.8*^	4.0±0.4*	2.9±0.3^	2.6±0.4^
		ЧМТ+ЦФ	4.5±0.56*^	3.6±0.3*^	3.3±0.3*^	2.3±0.1^
Частота соскальзывания лап, баллы	1.0±0.1	ЧМТ	3.6±0.7*	2.8±0.6*	2.0±0.5	2.2±0.5*
		ЧМТ+М	1.6±0.7*	1.3±0.4*	1.1±0.2*	0.8±0.2^
		ЧМТ+ЦФ	2.0±0.4*^	1.7±0.3*^	1.5±0.3^	1.0±0.1^
Время движения по бруску, баллы	1.5±0.1	ЧМТ	3.4±0.4*	2.9±0.3*	2.2±0.2*	2.0±0.4
		ЧМТ+М	1.8±0.2*^	1.6±0.2^	1.4±0.2^	1.4±0.2^
		ЧМТ+ЦФ	1.9±0.2*^	1.8±0.1*^	1.8±0.2*	1.4±0.1^

Примечание: Среднее ± SD. «*» – статистически значимые различия относительно значений интактной группы, $p \leq 0.05$; «^» – статистически значимые различия опыта от контроля, $p \leq 0.05$. Сокращения: М – мексикор, ЦФ – цитофлавин.

Сразу после нанесения ЧМТ у животных в течение 2-4 с наблюдались тонические и клонические судороги, утрата реакции на окружающее, боковое положение сохранялось 10–20 с. В контрольной группе животных на протяжении всего периода исследования регистрировали увеличение времени, затрачиваемого на передвижение по бруску, и частоты соскальзывания лап относительно значений интактной группы (рисунок 18).

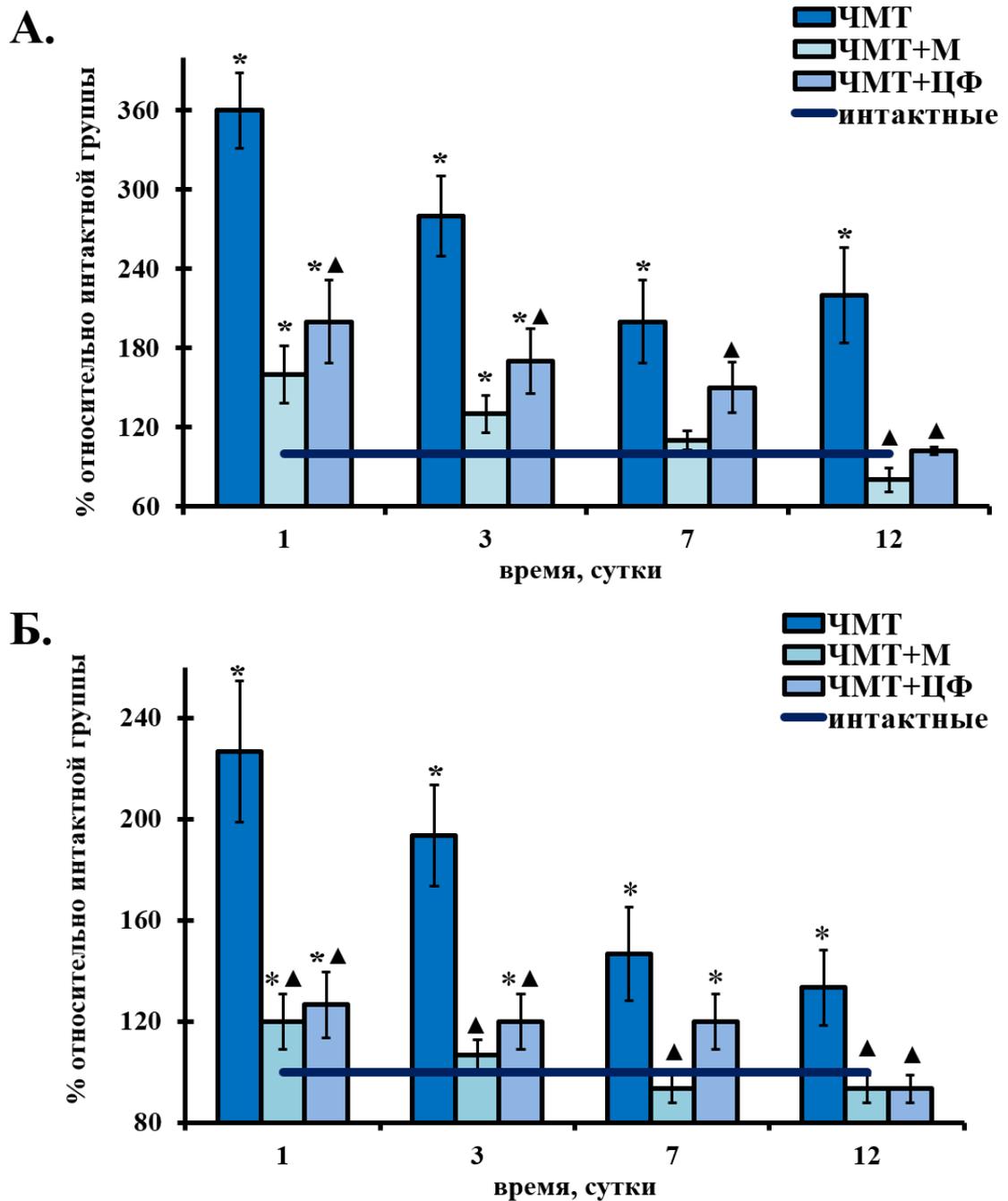


Рисунок 18. Динамика изменения двигательной активности крыс в посттравматический период черепно-мозговой травмы. (А – динамика времени передвижения по бруску, Б – частоты соскальзывания лап крыс в тесте «метод передвижения по бруску» при действии мексикора (М) и цитофлавина (ЦФ) на фоне моделирования черепно-мозговой травмы). Среднее \pm SD. «*» – статистически значимые различия относительно значений интактной группы, $p \leq 0.05$; «▲» – статистически значимые различия опыта от контроля, $p \leq 0.05$. Сокращения: М – мексикор, ЦФ – цитофлавин.

Мексикор и цитофлавин приводили к нормализации равновесия и ходьбы, что выражалось в сокращении частоты соскальзывания лап и времени, затрачиваемого на передвижение по бруску, причем эффект мексикора был более выражен (рисунок 18). У животных, при использовании мексикора уже на 1 сутки исследования частота соскальзывания лап сократилась на 44% и время передвижения по бруску уменьшилось на 53% относительно контроля. Положительная динамика показателей двигательной активности наблюдалась уже к 1 суткам применения мексикора и цитофлавина, значительное улучшение двигательных реакций регистрировалось к 3 суткам после введения препаратов и достигало значений интактных животных к 7 суткам эксперимента при терапии мексикором и к 12 суткам при применении цитофлавина.

Таким образом, в ответ на ЧМТ в эритроцитах запускается процесс дезинтеграции мембран и нарушение метаболизма, и, как следствие, в токе крови в большом количестве появляются морфологически измененные формы клеток. В то время как при действии мексикора и цитофлавина происходит вовлечение адаптационных систем клеток и организма в целом, что приводит к восстановлению морфометрических показателей эритроцитов с повышением их энергетического потенциала. Восстановление состояния эритроцитов сопровождается улучшением состояния микроциркуляторного русла, снижением вакуолизации межклеточного пространства и отёчности коры головного мозга, восстановлением кровотока, сохранением нейронов и клеток глии и как следствие уменьшение дефектов двигательной функции и координации движений крыс в посттравматическом периоде.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследовании впервые был проведен комплексный анализ морфофункционального состояния эритроцитов, микроциркуляции, гистологический анализ структур головного мозга и двигательной активности крыс при ЧМТ и действии цитопротекторов (мексикора и цитофлавина). С помощью лазерной модуляционной интерференционной микроскопии выявлено, что в ответ на ЧМТ в эритроцитах запускается процесс дезинтеграции мембран и нарушение метаболизма, и, как следствие, в токе крови в большом количестве появляются морфологически измененные формы клеток. На фоне вовлечения адаптационных систем клеток и организма в целом при действии мексикора и цитофлавина происходит восстановление морфоструктурных показателей эритроцитов с повышением их энергетического потенциала. Восстановление состояния эритроцитов сопровождается улучшением состояния микроциркуляторного русла, снижением вакуолизации межклеточного пространства и отёчности коры головного мозга, восстановлением кровотока в зоне пенумбры, сохранением нейронов и клеток глии в посттравматическом периоде ЧМТ при использовании цитопротекторов.

Таким образом, восстановление морфоструктурного и функционального состояния эритроцитов при действии цитофлавина и мексикора способствует сохранению морфофункционального состояния микроциркуляторного русла коры головного мозга в посттравматическом периоде, что может быть отправной точкой для определения компенсаторных механизмов, направленных на увеличение кислородтранспортной функции крови, уменьшение нарушений ангио- и цитоархитектоники коры головного мозга, дефектов двигательной функции и координации движений (рисунок 20).

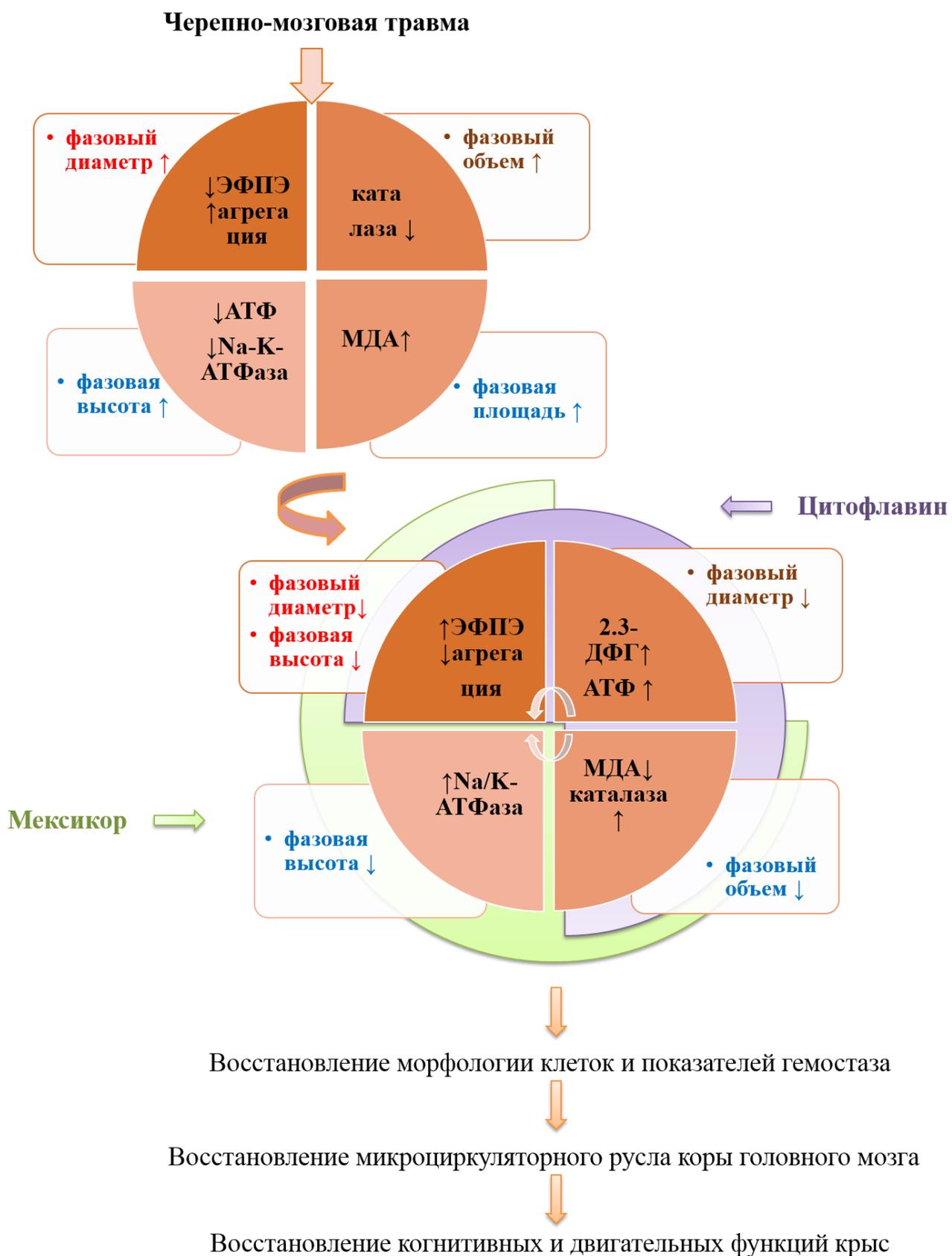


Рисунок 20. Взаимосвязь морфоструктурных показателей эритроцитов с их функциональными характеристиками в посттравматический период ЧМТ.

ВЫВОДЫ

1. Усиление процессов липопероксидации, уменьшение содержания АТФ, гемоглобина, снижение активности Na-K-АТФазы и каталазы сочетались с увеличением фазовых параметров эритроцитов, нарушением микроморфологии, вызывая падение ЭФПЭ и увеличение агрегации эритроцитов. Выявленные морфоструктурные и функциональные изменения эритроцитов сопровождались нарушениями в системе гемостаза. Действие мексикора и цитофлавина сохраняло морфологию, снижало скорость протекания дезинтеграционных процессов и вызывало увеличение энергетического потенциала в эритроцитах с последующей компенсацией коагулянтных каскадов.

2. Окислительный стресс, лактоацидоз и гипердреналемия приводили к снижению ЭФПЭ, увеличению агрегации на фоне усиления процессов липопероксидации и развития энергодефицита. Применение мексикора и цитофлавина способствовало повышению ЭФПЭ, снижению концентрации МДА, АТФ и агрегации эритроцитов.

3. Острый период ЧМТ крыс характеризовался выраженными макро- и микроциркуляторными нарушениями коры головного мозга в ответ на возросшую вследствие травмы кислородную потребность. Действие цитопротекторов вызывало уменьшение перикапиллярного и периваскулярного отёка, агрегации и тромбообразования, увеличение среднего диаметра капилляров и сохранение структурной целостности эндотелиальной выстилки при действии мексикора на 3-7 сутки, при действии цитофлавином на 7-12 сутки исследования. Быстрое и своевременное восстановление кровотока в зоне пенумбры обеспечивало сохранение ультраструктуры большинства нейронов.

4. Выявленные механизмы стабилизации и защиты эритроцитов мексикором и цитофлавином в ранние сроки посттравматического периода ЧМТ позволяют сдерживать нарушения двигательных функций и предотвращать

развитие вторичных повреждений головного мозга начиная с 1 суток посттравматического периода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андрианова, Е.Н. Гемомикроциркуляция и гемореология: характеристика, клиническое значение, методы исследования / Е.Н. Андрианова, А.И. Рывкин // Вестник Ивановской медицинской академии. – 2008. – Т.13, № 1-2. – С. 80 – 85.
2. Боровская, М.К. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменения при патологиях разного генеза / М.К. Боровская, Э.Э. Кузнецова, В.Г. Горохова // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – Т. 3. – № 73. – С. 334 – 354.
3. Бояринов, Г.А. Применение цитопротектора мексикор у больных с острыми формами ИБС / Г.А. Бояринов, И.С. Котлов, Ю.Д. Бричкин – Методические рекомендации. – Н. Новгород, 2010. – 44 с.
4. Бояринов, Г.А. Роль вторичных факторов повреждения мозга в активации сосудисто-тромбоцитарного гемостаза при черепно-мозговой травме // Г.А. Бояринов, Л.В. Бояринова, А.В. Дерюгина, О.Д. Соловьева, Р.Р. Зайцев, О.В. Военнов, Е.В. Мошнина, А.В. Шумилова // Общая реаниматология. – 2016. – Т. 12, № 5. – С. 42 – 51.
5. Браже, А.Р. Исследование клеточной динамики с помощью интерференционной микроскопии с применением вейвлет-анализа / А.Р. Браже, Н.А. Браже, О.В. Сосновцева, А.Н. Павлов, Э.Мозекильде, Г.В. Максимов // Компьютерные исследования и моделирование. – 2009. Т. 1, № 1. – С. 77–83.
6. Брызгалова, Н.Ю. Роль цитоплазматических структур эритроцита в изменении сродства гемоглобина к кислороду / Н.Ю. Брызгалова, Н.А. Браже, А.И. Юсипович // Биофизика. – 2009. – Т. 54, №. 3. – С. 442 – 447.
7. Булавкин, Ю. В. Динамика показателей гемокоагуляции и фибринолиза у больных раком молочной железы в процессе лечения / Ю.В. Булавкин, Л.В. Курашвили, С.А. Ситников, Н.Ф. Беседина, В.Э. Олейников // Казанский медицинский журнал. – 2003. – Т. 84, № 6. – С. 433 – 436.

8. Ващенко, В.И. Эриптоз (квазиапоптоз) эритроцитов человека и его роль в лекарственной терапии / В.И. Ващенко, В.Н. Вильянинов // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* – 2019. – Т. 17. – № 3. – С. 5 – 38.

9. Винник, Ю.С. Эндотелиальная дисфункция и развитие органной недостаточности при остром панкреатите / Ю.С. Винник, С.С. Дунаевская, Д.А. Антюфриева, В.В. Деулина. – 2018. – *Современные проблемы науки и образования.* – 5.

10. Виноградова, И.Л. Метод одновременного определения 2,3 ДФГ и АТФ в эритроцитах / И.Л. Виноградова, С.Ю. Багрянцева, Г.В. Дервиз // *Лабораторное дело.* – 1980. – №7. – С. 424 – 426.

11. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю.А. Владимиров // *Соросовский образовательный журнал.* – 2000. – Т. 6, № 12. – С. 13 – 19.

12. Герасимов, Л.В. Микрореологические нарушения при критических состояниях / Л.В. Герасимов, В.В. Мороз, А.А. Исакова // *Общая реаниматология.* – 2010. – Т. 1, № 1. – С. 74 – 78.

13. Головецкий, И.Я. Электрофоретическая подвижность эритроцитов у больных с тяжелыми формами интоксикации / И.Я. Головецкий, В.В. Мороз, Л.С. Бирюкова, Г.И. Козинец, О.В. Попова // *Общая реаниматология.* – 2007. – Т.3, № 5-6. – С. 75 – 79.

14. Гречко, А.В. Дефекты мембран эритроцитов у пациентов с нарушениями функции головного мозга (пилотное исследование) / А.В. Гречко, И.В. Молчанов, В.А. Сергунова, Е.К. Козлова, А.М. Черныш // *Общая реаниматология.* – 2019. – Т. 15, № 6. – С. 11 – 20.

15. Дерюгина, А.В. Влияние убихинона-10 и янтарной кислоты на функциональные характеристики эритроцитов крыс при адреналовой токсемии // А.В. Дерюгина, Е.В. Крылова, Л.Д. Лукьянова // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2006. – Т. 141, № 4. – С. 397 – 399.

16. Дерюгина, А.В. Использование Мексикора для коррекции функциональных показателей эритроцитов крови крыс при моделировании черепно-мозговой травмы / А.В. Дерюгина, А.В. Шумилова А.В, Е.С. Филиппенко, Л.В. Бояринова, О.Д. Соловьева // Экспериментальная клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78, № 8. – С. 14 – 17.

17. Дерюгина, А.В. Исследование типовых изменений электрокинетических свойств эритроцитов в норме и при альтерации функций организма: автореф. дис. ... докт. биол. наук: 03.03.01 / Дерюгина Анна Вячеславовна. – Н.Н., 2012. – 47 с.

18. Дерюгина, А.В. Трансляционные исследования электрофоретической подвижности и фазового портрета эритроцитов с учетом развития стрессовой реакции в условиях патологического процесса / А.В. Дерюгина, М.Н. Иващенко, П.С. Игнатъев, А.Г. Самоделкин // Альманах клинической медицины. – 2018. – Т. 46, № 8. – С. 765-771.

19. Джумагазиев, А.А. Применение метаболических препаратов для реабилитации новорожденных с церебральной ишемией / А.А. Джумагазиев, Л. Р. Рахимова // Доктор.Ру. – 2015. – Т. 5, № 106 – Т. 6, № 107. – С. 63 – 66.

20. Завалий, Л.Б. Метаболическая терапия при ишемическом инсульте / Л.Б. Завалий, С.С. Петриков, А.В. Щеголев // Журнал им. Н.В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь». – 2018. – Т. 7, № 1. – С. 44 – 52.

21. Землянских, Н.Г. Образование активных форм кислорода в эритроцитах человека при криоконсервировании с глицеролом и полиэтиленгликолем / Н.Г. Землянских, Л.А. Бабийчук // Биофизика. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 706 – 715.

22. Зинчук, В.В. Деформируемость эритроцитов: физиологические аспекты / В.В. Зинчук / Успехи физиологических наук. – 2001. – Т. 32. №3. – С. 66 – 78.

23. Казеннов, А.М., Исследование активности Na,K-АТФазы в эритроцитах млекопитающих / А.М. Казеннов, М.Н. Маслова, А.Д. Шалабодов // Биохимия. – 1984. – Т. 49, № 7. – С. 1089 – 1094.

24. Кан, С.Л. Сравнительный анализ и коррекция нарушений микроциркуляции при изолированной тяжелой черепно-мозговой и политравме / С.Л. Кан, Ю.А. Чурляев, А.А. Косовских, О.Г. Фомкин, Д.Г. Данцигер // Политравма. – 2015. – №3. – С. 31 – 39.

25. Кармен, Н.Б. Механизмы вторичного повреждения нейронов при тяжелой черепно-мозговой травме (Часть 1) / Н. Б. Кармен, В. В. Мороз, Е. И. Маевский // Общая реаниматология. – 2011. – Т. 7, № 4. – С. 56 – 59.

26. Карпун, Н.А. Инфекционная защита пострадавших с тяжёлой сочетанной травмой / Н.А. Карпун, Е.А. Евдокимов, Н.И. Чаус // Медицинский алфавит. Неотложная медицина. – 2013. – №4. – С. 38 – 41.

27. Кленова, Н.А. Биохимические механизмы дезинтеграции эритроцитов человека в различных условиях функционирования: автореф. дис. ... докт. биол. наук: 03.00.04 / Кленова Наталья Анатольевна. – Тюмень, 2003. – 37 с.

28. Кленова, Н.А. Строение, метаболизм и функциональная активность эритроцитов человека в норме и патологии / Н.А. Кленова, Р.О. Кленов. – Самара: Изд-во Самарский университет, 2009. – 116 с.

29. Коваленко, А.Л. Фармакологическая активность оригинальных лекарственных препаратов на основе 1-дезоксиглюцитозила : автореф. дис. ... докт. биол. наук: 14.00.25 / Коваленко Алексей Леонидович. – Санкт-Петербург, 2005. – 52 с.

30. Корж, А.Н. Значение эндотелиальной дисфункции в развитии заболеваний сердечно-сосудистой системы / А.Н. Корж // Международный медицинский журнал. – 2003. – №3. – С.10 – 14.

31. Костин, Д.Г. Изменение асимметрии липидов и транспорта конъюгатов глутатиона в эритроцитах человека под влиянием ионов кальция /

Д.Г. Костин, Н.М. Козлова, Е.И. Слобожанина // Биофизика. – 2004. – Т. 49, № 4. – С. 685 – 692.

32. Крылов, В.Н. Электрофоретическая подвижность и активность Na, K-АТФазы эритроцитам у крыс при стрессе / В.Н. Крылов, А.В. Дерюгина, А.И. Константинова // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2014. – Т.100, № 11. – С. 1297 – 1302.

33. Крылов, В.В. Патологические механизмы вторичного повреждения мозга при черепно-мозговой травме / В.В. Крылов, Ю.В. Пурас // Неврологический журнал. – 2013. – № 4. - С. 4 – 7.

34. Крылов, В.Н. Изменение электрофоретической подвижности эритроцитов и липидного спектра их мембран при различных стрессовых воздействиях / В.Н. Крылов, А.В. Дерюгина, А.А. Гришина // Гематология и трансфузиология. – 2010. – № 3. – С. 40 – 44.

35. Кудрявцева, М.Г. Влияние плазменных факторов микроциркуляции на состояние суммарного поверхностного заряда мембраны эритроцитов у больных метаболическим синдромом: автореф. дис. ...канд. мед. наук: 14.01.05. / Кудрявцева Марина Георгиевна. – М. 2018. – 24с.

36. Кузник, Б.И. Физиология и патология системы крови: Руководство для студентов лечебного, педиатрического и стоматологического факультетов / Б.И. Кузник – Москва: Вузовская книга, 2004. – 296 с.

37. Лившиц, В.М. Медицинский лабораторно-аналитический справочник // В.М. Лившиц, В.И. Седельникова – Москва: Триада Х, 2007. – 312 с.

38. Лихтерман, Л.Б. Последствия черепно-мозговой травмы / Л.Б. Лихтерман, А.А. Потапов, В.А. Клевно, А.Д. Кравчук, В.А. Охлопков // Судебная медицина. – 2016. – Т. 2, № 4. – С. 4 – 20.

39. Лунева, О.Г. Эритроциты как регуляторы сосудистого тонуса / О.Г. Лунева, С.В. Сидоренко, Г.В. Максимов, Р. Григорчик, С.Н. Орлов // Биологические мембраны. – 2015. Т. 32, № 4. – С. 223 – 234.

40. Миронов, В.А. Влияние биназы на некроз и апоптоз макрофагов в модели окислительного стресса / В.А. Миронов, А.В. Филиппов, Ф.В. Ширшиков, Г.В. Черепнев, Н.В. Калачева // Ученые записки казанского университета. – 2012. – Т. 154, № 2. – С. 66 – 76.

41. Мороз, В.В. Морфологические особенности эритроцитов у больных с тяжелой сочетанной травмой / В.В. Мороз, Е.А. Мягкова, В.А. Сергунова, О.Е. Гудкова, Д.А. Остапченко, А.М. Черныш, В.И. Решетняк // Общая реаниматология. – 2013. – Т. 9, № 3. – С. 14 – 23.

42. Мороз, В.В. Острая кровопотеря: регионарный кровоток и микроциркуляция (обзор, часть I) / В.В., Мороз, И.А. Рыжиков // Общая реаниматология. – 2016. – Т. 12, № 2. – С. 66 – 89.

43. Мороз, В.В. Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях / В. В. Мороз, А. М. Голубев, А. В. Афанасьев, А. Н. Кузовлев, В. А. Сергунова, О. Е. Гудкова, А. М. Черныш // Общая реаниматология. – 2012. – Т. 8, № 1. – С. 52 – 60.

44. Муравлёва, Л.Е. Белки эритроцитов. Миниобзор / Л.Е. Муравлёва, В.Б. Молотов-Лучанский, Д.А. Ключев, О.А.Понамарева, А.С. Калина, Г.Т. Колебаева // *Advances in Current Natural Sciences*. – 2013. - № 4. – С. 28 – 31.

45. Муравьев, А.В. Деформируемость эритроцитов: основные механизмы срочной адаптации / А.В. Муравьев, Е.В. Ройтман, И.А. Тихомирова, А.А. Муравьев, С.В. Булаева, П.В. Михайлов // *Тромбоз, гемостаз и реология*. – 2013. – Т. 55, № 3. – С. 4 – 7.

46. Муравьев, А.В. Микромеханические ответы эритроцитов человека на стимулирование мембранных рецепторов, ионных каналов и ферментов / А.В. Муравьев, И.А. Тихомирова, А.А. Ахапкина, С.В. Булаева, П.В. Михайлов, А.А. Муравьев // *Российский журнал биомеханики*. – 2016. – Т. 20, № 1. – С. 28 – 36.

47. Муравьев, А.В. Роль протеинкиназ мембраны эритроцитов человека в изменениях их деформируемости и агрегации / А.В. Муравьев, А. А. Маймистова,

И.А. Тихомирова, С.В. Булаева, П.В. Михайлов, А.А. Муравьев // Физиология человека. – 2012. – Т. 38, № 2. – С. 94 – 100.

48. Немкова, С.А. Современные возможности комплексной диагностики и коррекции последствий черепно-мозговой травмы // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2019. Т. 119, № 10. С. 94 –102.

49. Новиков, В. Е. Новые направления поиска лекарственных средств с антигипоксической активностью и мишени для их действия / В. Е. Новиков, О. С. Левченкова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – Т. 76, № 5. – С. 47.

50. Оковитый, С.В. Антигипоксанты в современной клинической практике / С.В. Оковитый, Д.С. Суханов, В.А. Заплутанов, А.Н. Смагина // Клиническая медицина. – 2012. – № 9. – С. 63 – 68.

51. Павлюченко, И.И. Структурно-логический анализ лекарственных препаратов антиоксидантного и антигипоксантажного действия / И.И. Павлюченко, Н.М. Бат // Кубанский научный медицинский вестник. – 2018. – Т. 25, № 1. С. 94 – 99.

52. Потапов, А.А. Современные подходы к изучению и лечению черепно-мозговой травмы // А.А. Потапов, Л.Б. Лихтерман, А.Д. Кравчук, В.Н. Корниенко, Н.Е. Захарова // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2010. – Т.4, №1. – С. 4 – 12.

53. Пурас, Ю.В. Факторы риска развития неблагоприятного исхода в хирургическом лечении острой черепно-мозговой травмы / Ю.В. Пурас, А.Э. Талыпов, В.В. Крылов // Журнал им. Н. В. Склифосовского Неотложная медицинская помощь. – 2012. – № 2. – С. 26 – 33.

54. Рыбина, В.В. Регуляция активности Ca^{2+} - АТФ-азы ионами Ca^{2+} и кальмодулином в эритроцитах человека при различном времени хранения / В.В. Рыбина, И.А. Еленская, Н.П. Каймачников // Биологические мембраны. – 2001. – Т. 18, №. 4. – С. 287 – 293.

55. Сашенков, С.Л. Влияние различных фармакологических препаратов на поверхностный заряд мембран эритроцитов / С.Л. Сашенков, Л.В. Алачева, Н.В. Тишевская // Вестник ЮУрГУ. – 2011. – № 7. – С. 101 – 104.
56. Сейфула, Р.Д. Антиоксиданты / Р.Д. Сейфула, Е.А. Рожкова, Е.К. Ким // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – Т. 72, № 3. – С. 60 – 64.
57. Сергеева, А.С. Белки мембраны эритроцитов и метаболический синдром / А.С. Сергеева, Ю.И. Пивоваров, И.В. Бабушкина, Л.Б. Корякина, Е.О. Андреева // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2015. – Т. 104, № 4. – С. 12 – 17.
58. Сергунова, В.А. Гемоглобин: модификации, кристаллизация, полимеризация (обзор) / В.А. Сергунова, Е.А. Манченко, О. Е. Гудкова // Общая реаниматология. – 2016. – Т. 12, № 6. – С. 49 – 63.
59. Силина, Е. В. Нарушения памяти и астения / Е. В. Силина, С.А. Румянцева, А.С. Орлова – Москва: Тактик-Студио, 2014. – 180 с.
60. Скоромец, А.А. Эффективность нейрометаболического протектора Цитофлавина при инфарктах мозга (многоцентровое рандомизированное исследование) / А.А. Скоромец, С.А. Румянцева, А.И. Федин, М.А. Пирадов // Вестник СПб ГМА им. И. И. Мечникова. – 2005. – Т. 1. – С. 13–19.
61. Соколова, И.А. Агрегация эритроцитов / И.А. Соколова // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2010. – Т. 36, № 4. – С. 4 – 26.
62. Тихомирова, И. А. Физиологическая роль и механизмы объединения эритроцитов в агрегаты / И. А. Тихомирова, А. В. Муравьев // Российский физиологический журнал имени И. М. Сеченова. — 2007. — Т. 93, № 12. — С. 1382 – 1393.
63. Токмакова, Т.О. Мониторинг микроциркуляции в критических состояниях: возможности и ограничения / Т.О. Токмакова, С.Ю. Пермякова, А.В. Киселева, Д.Л. Шукевич, Е.В. Григорьев // Общая реаниматология. – 2012. – Т. 8, № 2. – С. 74 – 78.

64. Трошкина, Н.А. Эритроцит: строение и функции его мембраны / Н.А. Трошкина, В.И. Циркин, С.А. Дворянский // Вятский медицинский вестник. – 2007. – № 2-3. – С. 32 – 40.
65. Тычинский, В.П. Когерентная фазовая микроскопия внутриклеточных процессов / В.П. Тычинский // Успехи физических наук. – 2001. – Т. 171, № 6. – С. 649 – 662.
66. Тюренков, И.Н. Антиоксидантная терапия эндотелиальной дисфункции / И.Н. Тюренков, А.А. Воронко, А.А. Слиецанс, Е.Г. Доркина, Г.Л. Снигур // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2013. – Т. 11, №1. – С. 14 – 25.
67. Фирсов, А.А. Метаболическая цитопротекторная терапия в острый период ишемического инсульта / А.А. Фирсов, М.В. Смирнов, Т.А. Усанова // Поликлиника. – 2011. – Т. 1. – С. 7 – 9.
68. Фирсов, С.А. Сочетанная черепно-мозговая и скелетная травма / С.А. Фирсов, В.М. Прохаренко, П.А. Любошевский, Д.И. Синкевич // Новосибирск – Ярославль: ИПК «Индиго», 2014. – 188 с.
69. Фирсов, С.А. Эндотелиальная дисфункция и ее прогностическое значение при критических состояниях в результате дорожно-транспортного травматизма / С.А. Фирсов, Р.П. Матвеев // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – 6.
70. Царев, А.В. Состояние гемодинамики при проведении терапевтической гипотермии в комплексе интенсивной терапии тяжелой черепно-мозговой травмы / А.В. Царев // Вісник проблем біології і медицини. – 2018. – Т. 142, №1. – С. 213 – 217.
71. Цымбалюк, В.И. Экспериментальное моделирование черепно-мозговой травмы / В.И. Цымбалюк, Кочин О.В. // Украинский нейрохирургический журнал. – 2008. – № 2. – С. 10 – 12.
72. Черний, В.И. Роль и место препарата Цитофлавин в комплексном лечении тяжелой черепно-мозговой травмы в остром периоде / В.И. Черний, И.А.

Андропова, Г.А. Гордник, К.В. Назаренко, Т.В. Черный // Журнал неврологии им. Б.М. Маньковського'. – 2015. – Т. 3, № 3. – С. 21 – 33.

73. Черныш, А.М. Нелинейные локальные деформации мембран эритроцитов: действие токсинов и фармпрепаратов (Часть 2) // Общая реаниматология. – 2018. – Т. 14, № 1. – С. 29 – 39.

74. Черныш, А.М. Структурные изменения спектринового матрикса эритроцитов при воздействии различных значений pH / А.М. Черныш, Е.К. Козлова, В.А. Сергунова, Е.А. Шерстюкова, О.Е. Гудкова, В.А. Иноземцев // Жизнеобеспечение при критических состояниях: материалы Всероссийской конференции с международным участием / ООО «Московское Конгрессное Бюро»; научный редактор В.Т. Долгих. – Москва. 2020. – С. 124 – 125.

75. Чумакова, С. П. Особенности физиологии эритроцитов. Гемолиз и эриптоз / С.П. Чумакова, О.И. Уразова, А.П. Зима, В.В. Новицкий // Гематология и трансфузиология. – 2018. – Т. 63, № 4. – С. 343 – 351.

76. Шалабодов, А.Д. Влияние солубилизированных белков мембранного скелета эритроцитов на активность Na, K- АТФазы / А.Д. Шалабодов // Вестник ТюмГУ. Экология и природопользование. – 2015. – Т. 1, № 1 (1). – С. 171 – 182.

77. Шевченко, О.Г. Фосфолипидная компонента мембран эритроцитов в норме и патологии / О.Г. Шевченко // Вестник Института биологии. – 2007. – № 2. – С. 2 – 8.

78. Шилов, А.В. Адаптационные и патологические изменения эндотелия при L-NAME-индуцированной дисфункции в эксперименте / А.В. Шилов, М.В. Мнихович, Р.Е. Калинин, Л.В. Коктурский, И.А. Сучков, С.В. Рудницкий, О.И. Машковцев, Г.П. Казанцева // Вестник новых мед. технологий. – 2018. – Т. 12, № 4. – С. 282 – 286.

79. Шульгинова, А.А. Иммунные и метаболические нарушения у больных с хронической ишемией мозга; способы фармакологической дифференцированной коррекции: автореф. дис. ... докт. биол. Наук: 14.03.09 / Шульгинова Анастасия Александровна. – М., 2019. – 46 с.

80. Abdul-Muneer, P.M. Interactions of oxidative stress and neurovascular inflammation in the pathogenesis of traumatic brain injury / P.M. Abdul-Muneer, N. Chandra, J. Haorah // *Molecular neurobiology*. – 2015. – Vol. 51, N. 3. – P. 966 – 979.
81. Aird, W.C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: structure, function, and mechanisms / W.C. Aird // *Circulation research*. – 2007. – Vol. 100, N.2. – P. 158 – 173.
82. Akel A. Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by chlorpromazine / A. Akel, T. Hermle, O.M. Niemoeller // *European Journal of Pharmacology*. – 2006. – Vol. 532. – № 1-2. – P. 11 –17.
83. Alder, J. Lateral fluid percussion: model of traumatic brain injury in mice / J. Alder, W. Fujioka, J. Lifshitz, D.P. Crockett, S. Thakker-Varia // *Journal of visualized experiments : JoVE*. – 2011. – Vol. 54. – P. 3063.
84. Algattas, H. Traumatic Brain Injury Pathophysiology and Treatments: Early, Intermediate, and Late Phases Post-Injury / H. Algattas, H. Jason // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2014. – Vol. 15, N. 1. – P. 309 – 341.
85. Antipenko, E.A. Effects of nonspecific cytoprotective treatment on stress resistance and compensatory potential in patients with chronic cerebral ischemia / E.A. Antipenko, A.V. Deryugina, A.V. Gustov // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2017. – Vol. 47, N. 7. P. 817 – 820.
86. Aoki, T. A Comprehensive Review of Our Current Understanding of Red Blood Cell (RBC) Glycoproteins / T. A. Aoki // *Membranes*. – 2017. – Vol. 7, N 4. – P. 56.
87. Arashiki, N. Maintenance and regulation of asymmetric phospholipid distribution in human erythrocyte membranes: implications for erythrocyte functions // N. Arashiki, Y. Takakuwa // *Current opinion in hematology*. – 2017. – Vol. 24, N. 3. – P. 167 –172.
88. Ayala, A. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal / A. Ayala, M.F. Muñoz, S.

Argüelles // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2014. - Vol. 2014. – P. 360438

89. Baker, T.L. Targeting the Cerebrovascular System: Next-Generation Biomarkers and Treatment for Mild Traumatic Brain Injury / T.L. Baker, D.V. Agoston, R.D. Brady, B. Major, S.J. McDonald, R. Mychasiuk, D.K. Wright, G.R. Yamakawa, M. Sun, Shultz S.R. // *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* – 2021. – 10738584211012264.

90. Baskurt, O.K. Handbook of hemorheology and hemodynamics / O.K. Baskurt, M.R. Hardeman, M.W. Rampling, H.J. Meiselman // IOS Press. – 2007. – 455 p.

91. Bayır, H. Achieving Life through Death: Redox Biology of Lipid Peroxidation in Ferroptosis / H. Bayır, T.S. Anthonymuthu, Y.Y. Tyurina, S.J. Pate, A.A. Amoscato, A.M. Lamade, Q. Yang, G.K. Vladimirov, CC. Philpott, V.E. Kagan // *Cell chemical biology*. – 2020. - Vol. 27, N 4. – P. 387 – 408.

92. Beers, R.F. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase / R.F. Beers, J.W. Sizer // *Journal of Biological Chemistry*. – 1952. – Vol. 195. – P. 133 – 140.

93. Benedictus, M.R. Cognitive and Behavioral Impairment in Traumatic Brain Injury Related to Outcome and Return to Work / M.R. Benedictus, J.M. Spikman, J. van der Naalt // *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. – 2010. – Vol. 91, N. 9. – P. 1436 – 1441.

94. Bennett, V. Membrane Domains Based on Ankyrin and Spectrin Associated with Cell-Cell Interactions / V. Bennett, J. Healy // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2009. – Vol. 1, N 6. – P. a003012-a003012.

95. Betz, T. ATP-dependent mechanics of red blood cells / T. Betz, M. Lenz, J-F. Joanny, C. Sykes // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – Vol. 106, N. 36. – P. 15320 – 15325.

96. Biswas, D. Mechanism of erythrocyte death in human population exposed to arsenic through drinking water / D. Biswas, M. Banerjee, G. Sen // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2008. – Vol. 230, N. 1. – P. 57 – 66.

97. Blanco, G. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers / G. Blanco, M. Mercer // *American journal of physiology. Cell physiology*. – 2004. – Vol. 287, N. 2. – P. 246 – 256.

98. Boning, D. The bohr effect of lactic acid in vitro simulation of exercise / D. Boning, Ch. Hollnagel, A. Boecker // *31 int. Cong. Physiol. SciL, Helsinki*. – 1989. – P.256 – 257.

99. Boyarinov, G.A. Pharmacological correction of microcirculation in rats suffering from traumatic brain injury / G.A. Boyarinov, A.V. Deryugina, E.I. Yakovleva, R.R. Zaitsev, M.L. Bugrova, L.V. Boyarinoва, E.S. Filippenko, O.D.Solov'eva // *Cell and Tissue Biology* – 2017. – Vol. 11, N. 1. – P. 65 – 72.

100. Brazhe, N.A. New insight into erythrocyte through in vivo surface-enhanced Raman spectroscopy / N.A. Brazhe, S. Abdali, A.R. Brazhe, O.G. Luneva, N.Y. Bryzgalova, E.Y. Parshina, O.V. Sosnovtseva, G.V.Maksimov. New insight into erythrocyte through in vivo surface-enhanced Raman spectroscopy // *Biophysical Journal*. – 2009. – Vol. 97, N. 12. – P. 3206 – 3214.

101. Bukowska, B. The prehemolytical changes in human erythrocytes 1 treated with 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) / B. Bukowska, A. Zatorska // *Current Topics in Biophysics*. – 2003. – Vol.27, N 1-2. – P.11 – 15.

102. Butola, A. Spectrally resolved laser interference microscopy / A. Butola, A. Ahmad, V. Dubey, P. Senthilkumaran, D. S. Mehta // *Laser Physics Letters*. – 2018. – Vol. 15, N.7. – P. 075602.

103. Candelario, J.E. Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for the development of novel neurotherapeutics / J.E. Candelario // *Current opinion in investigational drugs*. – 2009. – Vol. 10, N. 7. – P. 644 – 654.

104. Contreras, F.X. Transbilayer (flip-flop) lipid motion and lipid scrambling in membranes i / F.X. Contreras, L. Sánchez-Magraner, A. Alonso, F.M. Goñ // FEBS letters. – 2010. – Vol. 58, N. 9. – P. 1779 –1786.

105. Deryugina, A.V. Functional and biochemical parameters of erythrocytes during mexicor treatment in posttraumatic period after experimental blood loss and combined traumatic brain injury / A.V. Deryugina, A.V., Shumilova, E.S. Filippenko, Y.V. Galkina, I.S. Simutis, G.A. Boyarinov // Bulletin of experimental biology and medicine. – 2017. – Vol. 164, N. 1. – P. 26 – 29.

106. Faden, A.I. Chronic neurodegeneration after traumatic brain injury: Alzheimer disease, chronic traumatic encephalopathy, or persistent neuroinflammation? / A.I. Faden, D.J. Loane // Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics. – 2015. – Vol. 12, N.1. – P.143 – 150.

107. Fernandes, H.P. Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation / H.P. Fernandes, C.L.Cesar, L. Barjas-Castro Mde // Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy. – 2011. Vol. 33, N 4. – P. 297 – 301.

108. Flierl, M. Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device // M. Flierl, P. Stahel, K.M. Beauchamp, S.J. Morgan, W.R. Smith, E. Shohami // Nature protocols. – 2009. – Vol. 4, N. 9. – P. 1328 – 1337.

109. Foller, M. Erythrocyte programmed cell death / M. Foller, S.M. Huber, F. Lang // IUBMB Life. – 2008. – Vol. 60, N. 10. – P. 661 – 668.

110. Forman, H.J. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers / H.J. Forman, J.M. Fukuto, M. Tottes // American journal of physiology. Cell physiology. – 2004 – Vol. 287, N 2. – P. 246 – 256.

111. Förster, D. Nucleotides protect rat brain astrocytes against hydrogen peroxide toxicity and induce antioxidant defense via P2Y receptors / D. Förster, G. Reiser // Neurochemistry international. – 2016. – Vol. 94. – P. 57 – 66.

112. Fujino, H. Differential Regulation of Prostaglandin F_{2α} Receptor Isoforms by Protein Kinase C / H. Fujino, D. Srinivasan, K.L. Pierce, J.W. Regan, // *Molecular pharmacology*. – 2000. – Vol. 57, N. 2. – P. 353.

113. Ghosh, S. Changes in cytosolic Ca²⁺ levels correspond to fluctuations of lactate levels in crosstalk of astrocyte neuron cell lines / S. Ghosh, D. K. Kaushik, J. Gomes, S. Nayeem, S. Deep, A. Basu // *Indian J. Exp. Biol.* – 2010. - Vol. 48, N. 6. – P. 529 — 537.

114. Glenn, A. Physiology of red and white blood cells / A. Glenn, Armstrong C. E. // *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. – 2019. – Vol. 20, N 3. – P. 170 –174.

115. Golub, A.S. PO₂ measurements in the microcirculation using phosphorescence quenching microscopy at high magnification / A.S. Golub, R.N. Pittman // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. — 2008. — Vol. 6, № 294. — P. H2905 – H2916.

116. Goodman, S.R. The human red blood cell proteome and interactome / S.R. Goodman, A. Kurdia, L. Ammann, D. Kakhniashvili, O. Daescu // *Experimental Biology and Medicine*. – 2007. – Vol. 232, №11. – P. 1391–1408.

117. Greve, M.W. Pathophysiology of traumatic brain injury / M.W. Greve, B.J. Zink // *Mt. Sinai J. Med.* – 2009. – Vol. 76, N. 2. – P. 97—104.

118. Grimolizzi, F. Multiple faces of succinate beyond metabolism in blood / F. Grimolizzi, L. Arranz // *Haematologica*. – 2018. – Vol. 103. N. 10. – P. 1586–1592.

119. Hay, J.R. Blood-Brain Barrier Disruption Is an Early Event That May Persist for Many Years After Traumatic Brain Injury in Humans // J.R. Hay, V.E. Johnson, A.M. Young, D.H. Smith, W. Stewart // *Journal of neuropathology and experimental neurology*. – 2015. – Vol. 74. N. 12. – P. 1147 – 1157.

120. Holland, M.C. The development of acute lung injury is associated with worse neurologic outcome in patients with severe traumatic brain injury / M.C. Holland, R. C. Mackersie, D. Morabito, A.R. Campbell, V.A. Kivett, R. Patel, V.R. Erickson, J.F. Pittet // *The Journal of trauma*. – 2003. – Vol. 55, N. 1. – P. 106 – 111.

121. Hsu, J.P. Effect of cell membrane structure oh human erythrocyte on its electrophoresis / J.P. Hsu, S.H. Lin, S. Tseng // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2003. – Vol. 32, N. 3. – P. 203 – 212.

122. Ighodaro, O.M. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid / O.M. Ighodaro, O.A. Akinloye // *Alexandria Journal of Medicine* – 2018. – Vol. 54, N 4 – P. 287 – 293.

123. Itoh, Y. Cellular control of brain capillary blood flow / Y. Itoh, N. Suzuki // *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2012. – Vol. 32, N. 7. – P. 1167 – 1176.

124. Jensen, FB. Red blood cell pH, the Bohr Effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport // FB. Jensen. – 2004. – Vol. 182, N. 3. – P. 215 – 223.

125. Jiang, W. Seeing the invisible in differential interference contrast microscopy images / W. Jiang, Z. Yin // *Medical image analysis*. – 2016. – Vol. 34. – P. 65 – 81.

126. Kalsi, K.K. Temperature dependent release of ATP from human erythrocytes: mechanism for the control of local tissue perfusion / K.K. Kalsi, J. González-Alonso // *Experimental physiology*. – 2012. – Vol. 97, N. 3. – P. 419–432.

127. Kassak, P. The Response of Na⁺/K⁺-ATPase of Human Erythrocytes to Green Laser Light Treatment / P. Kassak, L. Sikurova // *Physiological Research* – 2006. – T. 55. – C. 189 – 194.

128. Ke, Q. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) / Q. Ke, M. Costa // *Molecular pharmacology*. – 2006. – Vol. 70. N. 5. – P.1469 — 1480.

129. Kenney, K. Cerebral Vascular Injury in Traumatic Brain Injury / K. Kenney, F. Amyot, M. Haber, A. Pronger, T. Bogoslovsky, C. Moore, R. Diaz-Arrastia // *Experimental neurology*. – Vol. 275, Pt. 3. – P. 353 – 366.

130. Kesarev, O.G. Study of dose-dependent effect of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine succinate on the contractile function of isolated rat heart / O.G. Kesarev, L.M. Danilenko, M.V. Pokrovskii, A.S. Timokhina, A.V. Khovanskii // *Research Result*. – 2017. – Vol. 3, N. 1. – P. 3 – 10.

131. Kinoshita, K. Traumatic brain injury: pathophysiology for neurocritical care inoshita / K. Kinoshita // *Journal of Intensive Care*. – 2016. – 4. – P. 29.

132. Klijn, E. The heterogeneity of the microcirculation in critical illness / E. Klijn, Uil C.A. Den, J. Bakker, C. Ince // *Clinics in chest medicine*. – 2008. – Vol. 29, N. 4. – P. 643- viii.

133. Kodippili, G.C. Imaging of the diffusion of single band 3 molecules on normal and mutant erythrocytes / G.C. Kodippili, J. Spector, C. Sullivan, F.A. Kuypers, R. Labotka, P. G. Gallagher, K Ritchie, P.S. Low // *Blood*. – 2009. – Vol. 113, N. 24. – P. 6237 – 6245.

134. Koshkaryev, A. Acridine orange induced translocation of phosphatidylserine of red blood cell surface / A. Koshkaryev, S. Yedgar, H. Relevy // *American journal of physiology. Cell physiology*. – 2003. – Vol. 285, N 3. – P. C720 – C722.

135. Kuhn, V. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia / V. Kuhn, L. Diederich, T.C.S. Keller 4th, C.M. Kramer, W. Lückstädt, C. Panknin, T. Suvorava, B.E. Isakson, M. Kelm, M.M. Cortese-Krott // *Antioxidants & redox signaling*. – 2017. – Vol. 26, N. 13. – P. 718 – 742.

136. Liu, Y. circ-NRIP1 Promotes Glycolysis and Tumor Progression by Regulating miR-186-5p/MYH9 Axis in Gastric Cancer / Y. Liu, Y. Jiang, L. Xu, C. Qu, L. Zhang, X. Xiao, W. Chen, K. Li, Q. Liang, H. Wu // *Cancer management and research*. – 2020. – Vol. 12. – P. 5945 – 5956.

137. Losordo, D.W. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part 1: angiogenic cytokines / D.W. Losordo, S. Diommeler // *Circulation*. – 2004. – Vol. 109. – P. 2487 – 2491.

138. Lux, S.E. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. / S.E. Lux 4th // *Blood*. – 2016. - Vol. 127, N. 2. – P. 187 – 199.

139. Maellaro, E. Erythrocyte caspase-3 activation and oxidative imbalance in erythrocytes and in plasma of type 2 diabetic patients / E. Maellaro, S. Leoncini, D. Moretti, B. Del Bello, I. Tanganelli, C. De Felice, L. Ciccoli // *Acta diabetologica*. – 2011. – Vol. 50, N 4. – P. 489 – 495.

140. Manno, S. Modulation of Erythrocyte Membrane Mechanical Function by Protein 4.1 Phosphorylation / S. Manno, Y. Takakuwa, N. Mohandas // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280, N. 9. P. 7581 – 7587.

141. Marklund, N. Animal modelling of traumatic brain injury in preclinical drug development: where do we go from here? / N. Marklund, L. Hillered // *British journal of pharmacology*. – 2011. – Vol. 164, N. 4. – P. 1207 – 1229.

142. Maurya, P.K. Age-dependent detection of erythrocytes glucose-6-phosphate dehydrogenase and its correlation with oxidative stress / P.K. Maurya, P. Kumar, P. Chandra // *Archives of physiology and biochemistry*. – 2016. – Vol. 122, N.2. – P. 61 – 66.

143. Maurya, P.K. Biomarkers of oxidative stress in erythrocytes as a function of human age / P.K. Maurya, P. Kumar, P. Chandra // *World journal of methodology*. – 2015. – Vol. 5, N. 4. – P.216 – 222.

144. McAllister, T.W. Neurobiological consequences of traumatic brain injury / T.W. McAllister // *Dialogues in Clinical Neuroscience*. – 2011. – Vol. 13, N. 3. – P. 287 – 300.

145. McDonald, S.J. The effect of concomitant peripheral injury on traumatic brain injury pathobiology and outcome / M. Sun, D.V. Agoston, S.R. Shultz // *Journal of Neuroinflammation*. – 2016. – Vol. 13 (1), N. 90.

146. Meiselman, H. J. RBC aggregation: laboratory data and models / H. J. Meiselman, B. Neu, M.W. Rampling, O.K. Baskurt // *Indian Journal of Experimental Biology*. — 2007. — Vol. 45, № 1. — P. 9 – 17.

147. Minetti, M. The microenvironment can shift erythrocytes from a friendly to a harmful behavior: pathogenetic implications for vascular diseases / M. Minetti, L. Agati, W. Malorni // *Cardiovascular Research* — 2007. — Vol. 75, N. 1. — P. 21 – 28.

148. Mohandas, N., Red cell membrane: Past, present, and future / N. Mohandas, P.G. Gallagher // *Blood*. – 2008. – Vol. 112, N. 10. – P. 3939 – 3948.

149. Montivero, A.J. Early IGF-1 gene therapy prevented oxidative stress and cognitive deficits induced by traumatic brain injury / A.J. Montivero, M.S.Gherzi, M.J. Silvero C., E. Villarmois, J. Catalan-Figueroa, M. Herrera, M.C. Becerra, B.Herenu, M.F. Perez // *Frontiers in Pharmacology*. – 2021. - Vol. 12. – P. 1551.

150. Murate, M. Revisiting transbilayer distribution of lipids in the plasma membrane / M. Murate, T. Kobayashi // *Chemistry and Physics of Lipids*. – 2016. - Vol. 194, N. 24. – P. 58 – 71.

151. Nagata, S. Exposure of phosphatidylserine on the cell surface / S. Nagata, J. Suzuki, K. Segawa, T. Fujii // *Cell Death & Differentiation*. – 2016. – Vol. 23, N. 6. – P. 952 – 961.

152. Nguyen, R. The International Incidence of Traumatic Brain Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis / R. Nguyen, K.M. Fiest, J. McChesney, C.S. Kwon, N. Jette, A.D. Frolkis, C. Atta, S. Mah, H. Dhaliwal, A. Reid, T. Pringsheim, J. Dykeman, C. Gallagher // *Canadian journal of neurological sciences*. – 2016. – Vol. 43, N. 6. – P. 774 – 785.

153. Nunomura, W. Regulation of protein 4.1R interactions with membrane proteins by Ca²⁺ and calmodulin / W. Nunomura, Y. Takakuwa // *Frontiers in Bioscience*. – 2006. - Vol.1, N.11. – P. 1522 – 1539.

154. Obenaus, A. Traumatic brain injury results in acute rarefaction of the vascular network / A. Obenaus, M. Ng, A.M. Orantes, E. Kinney-Lang, F. Rashid, M. Hamer, R.A. DeFazio, J. Tang, J.H. Zhang, W.J. Pearce // *Scientific reports*. – 2017. - Vol. 7, N. 1. – P.239.

155. Pomorski, T. Lipid flippases and their biological functions / T. Pomorski, A.K. Menon // Cellular and molecular life sciences. – 2006. – Vol. 63, N. 24. – P. 2908 – 2921.

156. Ponsford, J.L. Longitudinal follow-up of patients with traumatic brain injury: outcome at two, five, and ten years post-injury / J.L. Ponsford, M.G. Downing, J. Olver, M. Ponsford, R. Acher, M. Carty, G. Spitz // Journal Of Neurotrauma. – 2014. – Vol. 1, N. 31. – P. 64 – 77.

157. Quillinan, N. Neuropathophysiology of Brain Injury Herson / N. Quillinan, P.S. Herson, R.J. Traystman // Anesthesiology clinics. – 2016. – Vol. 34, N.3. – P. 453 – 464.

158. Reis, A. Chemistry of phospholipid oxidation / A. Reis, C.M. Spickett // Biochimica et biophysica acta. – 2012. - Vol. 1818, N.10. – P. 2374 – 2387.

159. Rodríguez-Rodríguez, A. Oxidative stress in traumatic brain injury / A. Rodríguez-Rodríguez, J.J. Egea-Guerrero, F. Murillo-Cabezas, A. Carrillo-Vico Current medicinal chemistry. – 2014. - Vol. 21, N 10. – P. 1201 – 11.

160. Roth, P. Pathophysiology of traumatic brain injury / P. Roth, K. Farls // Critical care nursing quarterly. – 2000. – Vol. 23, N.3. – P. 14 – 25.

161. Saatman, K.E. Calpain inhibitor AK295 attenuates motor and cognitive deficits following experimental brain injury in the rat / K.E. Saatman, H. Murai, R.T. Bartus, D.H. Smith, N.J. Hayward, B.R. Perri, T.K. McIntosh // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1996. – Vol. 93, N. 8. – P. 3428 – 3433.

162. Salehi, A. Response of the cerebral vasculature following traumatic brain injury / A. Salehi, J.H. Zhang, A. Obenaus // Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 2017. – Vol. 37, N. 7. – P. 2320 – 2339.

163. Salomao, M. Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: new insights into the structural organization of the red blood cell membrane / M. Salomao, X. Zhang, Y. Yang, S. Lee, J.H. Hartwig, J.A. Chasis, N. Mohandas, X. An // Proceedings of the

National Academy of Sciences of the United States of America. – 2008. – Vol. 15, N. 23. – P. 8026 – 8031.

164. Simmonds, M.J. Blood rheology and aging / M.J. Simmonds, H.J. Meiselman, O.K. Baskurt // *Journal of Geriatric Cardiology*. – 2013. – Vol. 10, N. 3. – P. 291 – 301.

165. Smith, D.H. Protein accumulation in traumatic brain injury / D.H. Smith, K. Uryu, K.E. Saatman, J.Q. Trojanowski, T.K. McIntosh // *Neuromolecular medicine*. – 2003. – Vol. 4, N.1-2. – P. 59 – 72.

166. Sridharan, M. Prostacyclin receptor-mediated ATP release from erythrocytes requires the voltage-dependent anion channel / M. Sridharan, E. A. Bowles, J. P. Richards, M. Krantic, K.L. Davis, K.A. Dietrich, A.H. Stephenson, M.L. Ellsworth, R.S. Sprague // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. – 2012. — Vol. 302, № 3. — H553 – H559.

167. Stoica, B.A. Cell death mechanisms and modulation in traumatic brain injury / B.A. Stoica, A.I. Faden // *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. – 2010. – Vol. 7, N.1. – P. 3 – 12.

168. Tellone, E. New role for an old molecule: The 2,3-diphosphoglycerate case / E. Tellone, D. Barrecaa, A. Russob, A. Galtieria, S. Ficarraa // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2019. – Vol. 1863, N. 10. – P. 1602 – 1607.

169. Tsutsumi, Y. / Double face of VEGF // Y. Tsutsumi, D.W. Losordo // *Circulation*. – 2005. – Vol. 112. – P. 1248 – 1250.

170. Tychinsky, V. Quantitative phase imaging of living cells: application of the phase volume and area functions to the analysis of "nucleolar stress" / V. Tychinsky, A. V. Kretushev, I.V. Klemyashov, V.D. Zverzhkhovskiy, T.V. Vyshenskaya, A.A. Shtil // *Journal of Biomedical Optics*. – 2013. – Vol. 18, N. 11. – P. 111413.

171. Verhoeven, A.J. Prolonged storage of red blood cells affects aminophospholipid translocase activity / A.J. Verhoeven, P.M. Hilarius, D.W. Dekkers, J.W. Lagerberg, D. de Korte // *Vox sanguinis* – 2006. – Vol. 91, N. 3. – P. 244–251.

172. Voccoli, V. Role of extracellular calcium and mitochondrial oxygen species in psychosine-induced oligodendrocyte cell death / V. Voccoli, I. Tonazzini, G. Signore, M. Caleo, M. Cecchini // *Cell Death and Disease*. – 2014. – Vol. 5. – P. 1–12.

173. Volinsky, R. Oxidized phosphatidylcholines in membrane-level cellular signaling: from biophysics to physiology and molecular pathology / R. Volinsky, P.K. Kinnunen // *The FEBS Journal*. – 2013. - Vol. 280, N.12. – P. 2806 – 2816.

174. Wan, J. Red blood cell dynamics: from cell deformation to ATP release / J. Wan, A.M. Forsyth, H.A. Stone // *Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro*. – 2011. – Vol. 3, N. 10. – P. 972 – 981.

175. Wan, J. Stone Dynamics of shear-induced ATP release from red blood cells / J. Wan, W.D. Ristenpart, A. Howard // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008.- Vol. 105. N. 43. – P. 16432 – 16437.

176. Wolin, M.S. Reactive oxygen species and the control of vascular function // M.S. Wolin // *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. – 2009. – Vol. 296, N. 3. – P. 539 – 549.

177. Würthner, F. J-aggregates: from serendipitous discovery to supramolecular engineering of functional dye materials / F. Würthner, T.E. Kaiser, C.R. Saha-Möller // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2011. – Vol. 50, N. 15. – P. 3376 – 3410.

178. Yamaguchi, T. ATP effects on response of human erythrocyte membrane to high pressure / T. Yamaguchi, S. Fukuzaki // *Biophysics and physicobiology*. – 2019. - Vol. 16. – P. 158 – 166.

179. Zarkovic, N. Pathophysiological relevance of aldehydic protein modifications / N. Zarkovic, A. Cipak, M. Jaganjac, S. Borovic, K. Zarkovic // *Journal of Proteomics*. – 2013. –Vol. 92. – P. 239 – 247.