

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-3-20-23

ДЕЙСТВИЕ ЦИТОФЛАВИНА НА ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКИЕ И АГРЕГАЦИОННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭРИТРОЦИТОВ В ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИЙ ПЕРИОД ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

А. В. Шумилова¹, А. В. Дерюгина¹, С. Ю. Гордлеева¹, Г. А. Бояринов²

Цитофлавин (0,2 мл/сут, 10 сут, внутривенно) вызывает восстановление электрофоретической подвижности к 3 сут и агрегации эритроцитов к 7 сут посттравматического периода после моделирования черепно-мозговой травмы у крыс, тогда как в контрольной группе аналогичные изменения зафиксированы только к 12 сут исследования. Построение математической модели методом аппроксимации экспериментальных данных показывает возможность использования цитофлавина в качестве корректора реологических показателей крови и микроциркуляции за счет повышения электроотрицательности мембраны эритроцитов и сдерживания формирования эритроцитарных агрегатов, образование которых является типичным патофизиологическим процессом. Математическая модель агрегационных свойств эритроцитов выявляет эффективность использования цитофлавина в снижении агрегации клеток, что позволяет говорить о возможности использования данного препарата в коррекции адекватного кровоснабжения органов и тканей, расширяет показания к применению цитофлавина в терапии.

Ключевые слова: цитофлавин; эритроциты; агрегация; электрофоретическая подвижность эритроцитов; черепно-мозговая травма; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является сложной мультидисциплинарной медицинской, биологической и социальной проблемой. Значимость проблемы обусловлена массовостью её распространения (30 – 40 % всех видов травм), высокой летальностью (до 60 % травмированных), последующей инвалидизацией пострадавших (до 25 % выживших больных), и, как следствие, стойкой или временной утратой трудоспособности. В развитых странах травматизм в структуре причин смерти населения следует за сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями, а по наносимому обществу суммарному экономическому и медико-социальному ущербу ЧМТ занимает первое место [6, 12].

По данным последних лет, в остром периоде ЧМТ преобладающее значение имеют цереброваскулярные нарушения и возникающее несоответствие между энергетическими запросами мозга и кровотоком, при-

водящее к окислительному стрессу [7, 10]. Было показано, что в раннем посттравматическом периоде ЧМТ формируются нарушения архитектоники микроциркуляторного русла миокарда левого желудочка в сочетании с понижением электрофоретической подвижности эритроцитов (ЭФПЭ), повышением агрегации эритроцитов и тромбоцитов, активацией процессов липопероксидации и свертывания крови [3]. Эти изменения приводят к закупорке капилляров, затрудняют кровоток в коронарных сосудах, препятствуют поступлению в митохондрии кардиомиоцитов глюкозы, свободных жирных кислот и кислорода, необходимых для синтеза АТФ. Установленные расстройства сердечно-сосудистой системы развиваются уже в первые сутки посттравматического периода и являются важными внечерепными факторами вторичного повреждения мозга при ЧМТ [2]. Очевидно, что изучение микрореологических процессов, связанных, прежде всего, с эритроцитами на фоне применения препаратов для нейропротекции, важно для раскрытия механизмов коррекции этими лекарственными средствами вторичных гипоксически-ишемических повреждений головного мозга при ЧМТ. ЭФПЭ, являясь функцией клеточных мембран эритроцитов, характеризует агрегационные свойства клеток и служит чувствительным индикатором состояния организма [3]. Однонаправленность из-

¹ ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Россия, 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23; e-mail: kfg.unn@mail.ru

² ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия, Россия, 603005, Нижний Новгород, пл. Минина, д.10/1.

менения ЭФПЭ при различных экстремальных воздействиях и патологических состояниях проявляется ее снижением и является общей неспецифической реакцией организма [4]. От структурной организации мембран эритроцитов во многом зависит их агрегационная активность и деформируемость, что определяет способность клеток к микроциркуляции.

В последние годы предметом специальных исследований стало изучение различных механизмов действия нейропротектора, антигипоксанта и антиоксиданта цитофлавина при терапии последствий травмы [1, 5]. Однако механизмы микрореологических изменений, как в патогенезе, так и в терапии ЧМТ мало освещены в современной литературе, хотя оценка этих показателей у пострадавших в посттравматическом периоде имеет большое значение для прогноза характера течения заболевания и контроля эффективности проводимой терапии.

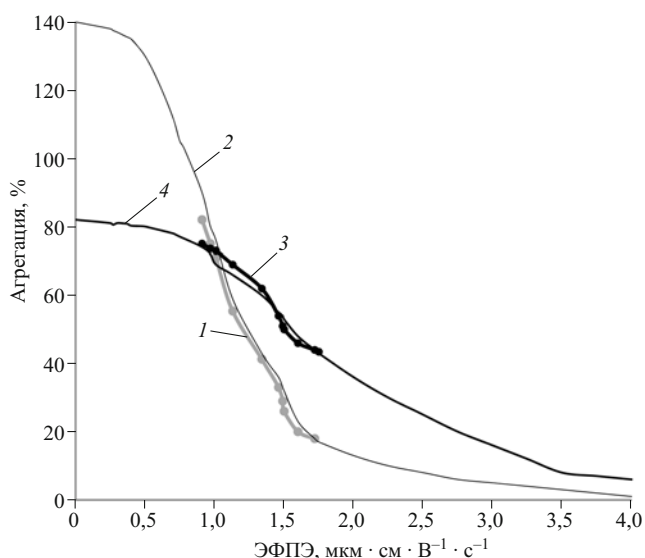
Цель работы — анализ действия цитофлавина на электрокинетические и агрегационные свойства эритроцитов у крыс в посттравматическом периоде ЧМТ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на 30 нелинейных белых крысах-самках массой 180 – 200 г (питомник г. Крюково). Содержание животных, находящихся на стандартном рационе вивария, соответствовало правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Содержание и оперативные вмешательства осуществляли в соответствии с нормативами и требованиями Приказа Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики”.

Животные были разделены на 2 группы по 15 особей в группе. Крысам, фиксированным на специальном планшете, моделировали ЧМТ путем свободного падения груза массой 100 г с высоты 80 см на теменно-затылочную область головы [11]. Крысам опытной группы (после ЧМТ) в течение 10 сут ежедневно внутривенно вводили цитофлавин (раствор для внутривенного введения, ООО “НТФФ “ПОЛИСАН”, Санкт-Петербург) в дозе 0,2 мл/кг, в контрольной группе — физиологический раствор в том же объеме. Первое введение препарата осуществляли через 1 ч после нанесения животным ЧМТ. Забор крови у животных опытной и контрольной групп производили из подъязычной вены на 1, 3, 7 и 12 сут после ЧМТ. Уровень физиологической нормы исследуемых показателей измеряли у интактных животных до моделирования у них ЧМТ.

ЭФПЭ определяли методом микроэлектрофореза с использованием цитоферометра в нашей модификации [2]. Регистрировали время прохождения эритроцитами расстояния 100 мкм в трис-НСl буфере с pH 7,4 при силе тока 8 мА. Величину ЭФПЭ определяли по формуле:



Расчетные зависимости степени агрегации эритроцитов от ЭФПЭ при моделировании ЧМТ.

Экспериментальные данные: 1 — контрольной группы животных, 3 — опытной группы животных. Аппроксимация (см. уравнение 1) экспериментальных данных: 2 — контрольной группы животных, 4 — опытной группы животных.

$$U = S/TH,$$

где S — расстояние, на которое перемещались клетки; T — время перемещения клеток на расстояние S ; H — градиент потенциала. Величину градиента потенциала определяли по формуле:

$$H = I/g\chi,$$

где I — сила тока; g — поперечное сечение камеры; χ — удельная электропроводимость среды.

Агрегацию эритроцитов изучали методом оптической микроскопии подсчетом одиночных эритроцитов и их агрегатов [4]. В качестве стимулятора агрегации использовали раствор голубого декстрана Т-2000 (GE Healthcare, 20 мг/мл) в трис-НСl буфере (pH 7,4). Отмытые эритроциты разводили раствором декстрана (в соотношении 1:10 по объему) и в камере Горяева подсчитывали число неагрегированных эритроцитов. Общее число эритроцитов в пробе считали в изотоническом растворе NaCl. Уровень агрегации A рассчитывали по формуле:

$A = 100\%$ — (число свободных (неагрегированных) эритроцитов \times общее число эритроцитов⁻¹ $\times 100\%$).

Полученные данные обработаны с помощью пакетов прикладных программ BIOSTAT и Microsoft Excel с использованием методов одномерной статистики. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое, m — стандартная ошибка среднего. Достоверность различий средних определяли по t -критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что через 24 ч после ЧМТ у крыс наблюдали снижение ЭФПЭ и усиление агрегации эритроцитов по сравнению с интактными животными (таблица). К 3 сут эксперимента у животных, “защищенных” цитофлавином, регистрировали восстановление ЭФПЭ до значений интактной группы и снижение степени агрегации эритроцитов на 26 % относительно показателей 1 сут. Между тем, в контрольной группе отмечали повышение ЭФПЭ и снижение степени агрегации эритроцитов лишь на 10 %. К 7 сут посттравматического периода у животных опытной группы сохранялись более высокие значения ЭФПЭ и статистически значимо низкое процентное содержание агрегатов эритроцитов в крови, по сравнению с контрольной группой. К 12 сут исследования наблюдали выравнивание исследуемых показателей в группах до значений нормы. Следует отметить, что наиболее выраженное влияние цитофлавина проявилось на начальном этапе посттравматического периода (3 – 7 сут после ЧМТ).

Таким образом, снижение отрицательного заряда и, следовательно, ЭФПЭ коррелирует с ускорением процесса агрегации эритроцитов, свидетельствуя о нарушении реологических свойств и гемостаза в целом [14]. Применение цитофлавина оказывало позитивное действие на микрореологические показатели крови животных, начиная с 3 сут посттравматического периода. Препарат вызывал повышение ЭФПЭ и снижение степени агрегации эритроцитов, что препятствует образованию конгломератов, блокирующих кровотоки и вызывающих нарушение транскапиллярного обмена.

Методом аппроксимации полученных экспериментальных данных была построена математическая модель зависимости агрегационной устойчивости эритроцитов от ЭФПЭ.

Аппроксимирующие кривые, представленные на рисунке, описываются следующим уравнением, которое является функцией Хилла:

$$A = A_0 \frac{K^n}{K^n + Q^n}, \quad (1)$$

где A_0 — максимальная агрегация эритроцитов; K — сопротивление среды от агрегации; Q — заряд на мембране эритроцита; n — коэффициент Хилла.

Построенная математическая модель позволяет исследовать агрегационную устойчивость эритроцитов при различных значениях ЭФПЭ у крыс в посттравматический период ЧМТ (рисунок). Математическая модель показывает, что внешний заряд на мембране эритроцита (ЭФПЭ) и агрегация эритроцитов находятся в обратной пропорциональной зависимости. Модели, описывающие микрореологические изменения в контрольной и опытной группе, отличаются коэффициентами A_0 и Q .

Коэффициенты для контрольной группы животных — $A_0 = 140$, $K = 1$, $n = 3$. Коэффициенты для животных, защищенных цитофлавином, — $A_0 = 80$, $K = 1,8$, $n = 3$. Численные значения коэффициентов получены для аппроксимирующих кривых с помощью математического пакета OriginPro 8.0.

Наиболее интересным результатом модели является поведение процесса агрегации эритроцитов при малых значениях ЭФПЭ, а именно — связанной с потерей заряда эритроцитами, приводящей к гиперагрегации. Так, уменьшение ЭФПЭ ниже $1,00 \text{ мкм} \cdot \text{см} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ вызывает усиленную агрегацию (аппроксимирующая кривая экспериментальных данных контрольной группы), что является патофизиологическим механизмом микрореологических расстройств. Изменение этих показателей приводит к нарушению капиллярной перфузии, усугубляя проявление гипоксии и уменьшая качество репаративных реакций в целом. При этом в рамках синдрома адаптации повышение агрегации эритроцитов является гемостатической функцией в ответ на действие такого экстремального фактора, как ЧМТ [9]. Следует подчеркнуть, что при малых значениях ЭФПЭ (ниже $1,00 \text{ мкм} \cdot \text{см} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$) при действии цитофлавина в посттравматический период степень агрегации значительно меньше выражена, по сравнению с контролем (аппроксимирующая кривая экспериментальных данных опытной группы животных). Такое поведение системы, по всей видимости, объясняется тем, что цитофлавин оказы-

Действие цитофлавина (0,2 мл/сут/кг, 10 сут, внутривенно) на электрофоретическую подвижность эритроцитов и их агрегацию при моделировании ЧМТ у крыс ($M \pm m$)

Время после ЧМТ, сут	ЭФПЭ $\text{мкм} \cdot \text{см} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$		Агрегация %	
	контроль, ЧМТ	опыт, ЧМТ + цитофлавин	контроль, ЧМТ	опыт, ЧМТ + цитофлавин
1	$0,91 \pm 0,03^*$	$0,97 \pm 0,03^*$	$79,69 \pm 0,92^*$	$73,61 \pm 0,54^{*\#}$
3	$1,01 \pm 0,06^*$	$1,46 \pm 0,05^\#$	$70,94 \pm 0,95^*$	$54,74 \pm 0,73^{*\#}$
7	$1,13 \pm 0,05^*$	$1,49 \pm 0,08^\#$	$55,4 \pm 0,64^*$	$43,46 \pm 0,77^{*\#}$
12	$1,34 \pm 0,07$	$1,5 \pm 0,04$	$41,28 \pm 0,74^*$	$34,54 \pm 0,56^{*\#}$

Примечание: ЧМТ + цитофлавин — введение цитофлавина при моделировании ЧМТ (опытная группа).

* Статистически значимые различия со значениями до воздействия, $p < 0,05$;

статистически значимые различия относительно контроля, $p < 0,05$.

ЭФПЭ интактных животных ($1,47 \pm 0,04$) $\text{мкм} \cdot \text{см} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, агрегация ($36,59 \pm 0,64$) %.

вал дезагрегирующий эффект за счет повышения электроотрицательности эритроцитов. Повышение электроотрицательности способствует электрическому отталкиванию между эритроцитами и поддержанию суспензионной стабильности крови [13]. Следовательно, согласно математической модели, использование цитофлавина будет эффективно при различных патологических процессах, связанных с усилением процессов агрегации эритроцитов. Высокие значения ЭФПЭ не приводят к полной дезагрегации эритроцитов, так как эритроциты в норме тоже могут образовывать между собой небольшие агрегаты, которые, не затрудняя движение крови по сосудам, достаточно снабжают кислородом ткани и органы [8].

Таким образом, использование цитофлавина способствует увеличению поверхностного отрицательного заряда эритроцитов и уменьшению агрегации в посттравматический период ЧМТ, позитивно влияя на реологические свойства крови, что, по-видимому, увеличивает газообмен в тканях, снижая гиповолемию, гемоконцентрацию и отек тканей.

ВЫВОДЫ

1. Цитофлавин (0,2 мл/сут, 10 сут ежедневно, внутривенно) восстанавливает электрофоретическую подвижность эритроцитов до нормальных значений к 3 сут посттравматического периода, снижает агрегацию эритроцитов на 3 – 7 сут, по сравнению с животными контрольной группы, у которых исследуемые показатели восстанавливаются только к 12 сут после ЧМТ.

2. Построенная математическая модель показала возможность использования цитофлавина в качестве

корректора реологических показателей крови и микроциркуляции за счет повышения электроотрицательности эритроцитов и сдерживания формирования эритроцитарных агрегатов, образование которых является типичным патофизиологическим процессом, что позволяет расширить показания к применению данного препарата в терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. С. Агафьина, А. Л. Коваленко, С. А. Румянцева и др., *Врач*, № 1, 60 – 65 (2006).
2. Г. А. Бояринов, А. В. Дерюгина, Е. И. Яковлева и др., *Цитология*, **58**(8), 610 – 617 (2016).
3. А. В. Дерюгина, А. В. Шумилова, Е. С. Филиппенко и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **78**(8), 14 – 17 (2015).
4. А. В. Дерюгина, Е. В. Крылова, Л. Д. Лукьянова, *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **141**(4), 397 – 400 (2006).
5. В. В. Иконов, А. Ю. Павленко, А. В. Белецкий и др., *Медицина неотлож. состояний*, **1**(40), 47 – 51 (2012).
6. Д. М. Овсянников, А. А. Чехонацкий, В. Н. Колесов и др., *Саратовский научно-мед. ж.*, **8**(3), 777 – 785 (2012).
7. А. А. Скоромец, Е. Л. Пугачева, *Поликлиника*, **5**, 50 – 55 (2010).
8. И. А. Соколова, *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*, **36**(4), 4 – 26 (2010).
9. И. М. Устьянцева, *Политравма*, **4**, 51 – 64 (2008).
10. А. А. Фирсов, А. В. Ховряков, В. И. Шмырёв, *Архивъ внутренней медицины*, **19**(5), 29 – 33 (2014).
11. В. И. Цымбалюк, О. В. Кочин, *Украинский нейрохирург. ж.*, **2**, 10 – 12 (2008).
12. V. V. Krylov, A. Je. Talypov, Ju. V. Puras, *Voprosy Tejrohirurgii*, **1**, 11 – 16 (2007).
13. B. Neu, *Biophys. J.*, **83**(5), 2482 – 2490 (2002).
14. M. J. Simmonds, H. J. Meiselman., O. K. Baskurt, *J. Geriatric Cardiol.*, **10**(3), 291 – 301 (2013).

Поступила 12.03.18

CYTOFLAVIN ACTION ON ELECTRO-KINETIC AND AGGREGATION INDICES OF ERYTHROCYTES IN THE POST-TRAUMATIC PERIOD OF CEREBROCRANIAL INJURY IN EXPERIMENT

A. V. Shumilova^{1*}, A. V. Deryugina¹, S. Yu. Gordleeva¹, and G. A. Boyarinov²

¹ Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, prosp. Gagarina 23, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

² Nizhny Novgorod State Medical Academy, pl. Minina i Pozharskogo 10/1, Nizhny Novgorod, 603005 Russia

* e-mail: kfg.unn@mail.ru

Effects of cytoflavin on the electrophoretic mobility of erythrocytes and their aggregation in post-traumatic period of simulated traumatic brain injury (TBI) in rats were investigated. The results showed that the administration of cytoflavin (0.2 mg/kg per day) caused recovery of the electrophoretic mobility within 3 days and normalized the aggregation of red blood cells on the 7th day of post-traumatic period after the modeling of craniocerebral trauma in rats, whereas analogous changes in the control group were only observed in 12 days. The construction of a mathematical model based on the approximation of experimental data showed the possibility of using cytoflavin as a corrector of the rheological parameters of blood and microcirculation due to an increase in the electronegativity of erythrocytes and inhibition of the formation of erythrocyte aggregates (the formation of which is a typical pathophysiological process), thus expanding the indications for drug use in the therapy. The mathematical model of the aggregation properties of erythrocytes revealed the efficacy of using cytoflavin for the reduction of cell aggregation and suggested the possibility of using this drug for the correction of adequate blood supply to organs and tissues.

Keywords: cytoflavin; erythrocytes; aggregation; electrophoretic mobility of erythrocytes; traumatic brain injury; rats.