

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616.71-001.5-007.234-089.819.843-092.9

Плехова Н.Г.^{1,2}, Зиновьев С.В.¹, Радьков И.В.¹, Шуматов В.Б.¹

Поведенческая реакция крыс и хромофилия эритроцитов при экспериментальной черепно-мозговой травме

¹ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России,

690002, Владивосток, Россия, пр. Острякова, д. 2;

²Институт химии Дальневосточного отделения Российской академии наук,

690022, Владивосток, Россия, пр. 100-летия Владивостока, д. 159

Введение. Патогенетические основы изменения микроциркуляции крови в головном мозге вследствие черепно-мозговой травмы (ЧМТ) изучены не в полной мере по причине высокой инвазивности нейроморфологических методов. **Цель исследования** – изучение поведенческого статуса и информативности цитохимических критериев хромофилии эритроцитов в качестве маркеров вазореактивности микрососудов головного мозга при черепно-мозговой травме у крыс.

Методика. Объектом исследования являлись 3-месячные аутбредные крысы Wistar массой 250-270 г. Легкую и средней тяжести ЧМТ воспроизводили с применением модифицированной модели падающего груза для взрослых крыс. Через 2 ч, 1, 2, 8 и 14 сут после моделирования ЧМТ проводили неврологическое обследование животных по модифицированной шкале Neurological Severity Scores (mNSS), сенсомоторное – по степени тревожности в тесте «свет–темнота», поведение анализировали с использованием теста условной реакции пассивного избегания. С помощью хромофинной реакции исследовали функциональное состояние эритроцитов. Срезы тканей головного мозга, окрашивали по Ниссли и гематоксилин–эозином, микроскопировали, проводили морфометрию цифровых изображений.

Результаты. Неврологическое обследование при среднетяжелой ЧМТ показало очаговую симптоматику, соответствующую выраженным неврологическим расстройствам, тогда как после ЧМТ легкой степени у крыс отмечались незначительные нарушения координации. В тесте условной реакции пассивного избегания на 7-е сут у этих животных выявлено состояние повышенной тревожности. Морфометрический анализ препаратов головного мозга травмированных животных показал уменьшение диаметра просвета капилляров и выявил признаки гипоксии нейронов. Цитохимическая оценка эритроцитов, с привлечением количественного определения степени флуоресценции, выявила особенности окислительного метаболизма в клетках у травмированных крыс. Эти показатели коррелировали с морфологическими признаками гипоксии головного мозга.

Заключение. В начальный посттравматический период отмечено уменьшение диаметра просвета капилляров нервной ткани, наличие морфологических признаков компенсации нейронов, что является локальной ответной реакцией клеток на ишемию головного мозга. В капиллярах определяется нарушение гемореологии, что является следствием изменения окислительно-восстановительных процессов вследствие гипоксии при внутричерепной травме.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма; поведенческий статус; эритроциты; хромофинная реакция

Для цитирования: Плехова Н.Г., Зиновьев С.В., Радьков И.В., Шуматов В.Б. Поведенческая реакция крыс и хромофилия эритроцитов при экспериментальной черепно-мозговой травме. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(4): 17-25.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.17-25

Для корреспонденции: Плехова Наталья Геннадьевна, e-mail: pl_nat@hotmail.com

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Плехова Н.Г., Шуматов В.Б.; сбор и обработка материала – Радьков И.В., Зиновьев С.В.; подготовка иллюстративного материала – Плехова Н.Г., Зиновьев С.В., Радьков И.В.; статистическая обработка – Зиновьев С.В., Радьков И.В.; написание и редактирование текста – Плехова Н.Г., Зиновьев С.В.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке по программе внутривузовских грантов ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 27.01.2021

Принята к печати 02.11.2021

Опубликована 20.12.2021

Plekhova N.G.^{1,2}, Zinoviev S.V.¹, Radkov I.V.¹, Shumatov V.B.¹**Behavioral response and erythrocyte chromophilia of rats in experimental traumatic brain injury**¹Pacific State Medical University,
Prospekt Ostryakova 2, Vladivostok 690002, Russian Federation;²Institute of Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences,
Prospekt 100-Itiya Vladivostoka 159, Vladivostok 690022, Russian Federation

The pathogenetic basis of changes in blood microcirculation in the brain due to traumatic brain injury (TBI) has not been fully studied due to the highly invasive nature of neuromorphological methods. **Aim:** To study the behavioral status and informative value of cytochemical criteria for erythrocyte chromophilia as markers of cerebral microvessel vasoreactivity in rats with TBI.

Methods. The study was conducted on 3-month-old Wistar albino, outbred rats weighing 250-270 g. Mild to moderate TBI was simulated using a modified falling weight model for adult rats. At 2 hrs, 1, 2, 8, and 14 days after TBI, a neurological examination was performed according to the modified Neurological Severity Score (mNSS) modified scale and a sensorimotor examination was performed according to the degree of anxiety in the light-dark test. Behavior was analyzed using the conditioned passive avoidance response test. The functional state of erythrocytes was studied using the chromaffin reaction. Brain tissue samples stained by Nissl and with hematoxylin–eosin were evaluated under a microscope, digital images were obtained, and morphometric processing was performed.

Results. Neurological examination after moderate TBI showed focal symptoms corresponding to severe neurological disorders, while after mild TBI, rats had minor coordination disorders. In the conditioned passive avoidance response test on the 7th day, the rats showed a state of increased anxiety. Morphometric analysis of the brains showed a decrease in the diameter of capillary lumen and changes in neurons, indicating signs of hypoxia. The cytochemical assessment of erythrocytes, involving a quantitative determination of the degree of fluorescence, revealed features of cell oxidative metabolism in injured rats. Moreover, these indicators correlated with morphological signs of hypoxia in brain neural tissue.

Conclusion. In the initial post-traumatic period, there was a decrease in the capillary lumen diameter of the brain neural tissue and the presence of morphological signs of neuronal compensation, which is a local response of cells to cerebral ischemia. Disorders of hemorheology were found. These changes were a consequence of altered redox processes due to hypoxia after intracranial injury.

Keywords: traumatic brain injury; behavioral status; erythrocytes; chromaffin reaction

For citation: Plekhova N.G., Zinoviev S.V., Radkov I.V., Shumatov V.B. Behavioral response and erythrocyte chromophilia of rats in experimental traumatic brain injury. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(4): 17-25. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.17-25

For correspondence: **Natalia G. Plekhova**, Doctor of Biological Sciences, Head of the Central Research Laboratory Pacific State Medical University, e-mail: pl_nat@hotmail.com

Contribution: research concept and design – Plekhova N.G., Shumatov V.B.; collection and processing of material – Radkov I.V., Zinoviev S.V.; preparation of illustrative material – N.G. Plekhova, Zinoviev S.V., Radkov I.V.; statistical processing – S.V. Zinoviev, Radkov I.V.; text writing and editing – Plekhova N.G., Zinoviev S.V.

Financing. The work was supported by the program of intra-university grants of the Pacific State Medical University.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Information about the authors:Plekhova N.G., <https://orcid.org/0000-0002-8701-7213>Zinoviev S.V., <https://orcid.org/0000-0001-6022-6130>Radkov I.V., <https://orcid.org/0000-0002-4788-5489>

Received 27.01.2021

Accepted 02.11.2021

Published 20.12.2021

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, черепно-мозговая травма (ЧМТ) является основной причиной смертности молодых людей и согласно прогнозу к 2020 г. среди населения займёт третье место в ряду причин инвалидности [1]. В результате воздействия на голову сил ударного и/или трансляционного ускорения, а также сил ускорения/замедления по-

сле ЧМТ происходит повреждение тканей головного мозга (ГМ) и нарушение его кровообращения [2]. Показано, что посттравматические цереброваскулярные расстройства происходят при формировании циркуляторно-гипоксемической или венозной энцефалопатии с нарушением функционирования центральной нервной системы [3]. В дальнейшем, подобные дисфункции инициируют когнитивные расстройства, которые

рассматриваются в качестве независимого предиктора нарушений, характерных для посттравматического синдрома при ЧМТ. Причем, дисфункции нейронных связей приводят к изменениям в поведении, которые включают в себя исполнительные функции и нарушения памяти, сохранение страха и другие когнитивные изменения. Использование экспериментальных моделей воспроизведения ЧМТ позволяет патофизиологам изучать этиологию подобного состояния.

Патологические посттравматические изменения микроциркуляции крови в ГМ вследствие ЧМТ изучены не в полной мере по причине высокой инвазивности нейроморфологических методов.

Циркуляторная гипоксия после ЧМТ характеризуется изменением окислительно-восстановительных процессов в клетках, поэтому как один из вариантов косвенной оценки функционального состояния микрососудистой сети можно рассматривать исследование эритроцитов периферической крови [4]. Известен классический метод диагностики мегалобластной анемии — реакция Кассу, где используется окраска эритроидных клеток антрахиноновым красителем ализаринным красным С (АКС, $C_{14}H_7NaO_7S$), который является кислотно-основным индикатором ряда оксиантрахинонов. Указывается, что окраска АКС клеток крови с добавлением бихроматов даёт более объективную оценку количественных особенностей окисления биогенных аминов в эритроцитах, при этом изменение метаболизма эритроцитов сопровождается патологические изменения головного мозга [5]. Таким образом, определенный интерес представляет изучение хромофилии эритроцитов в патогенезе ЧМТ, которая сопровождается нарушением микроциркуляции и возникновением гипоксии головного мозга.

Цель исследования — изучение поведенческого статуса и информативности цитохимических критериев функционального состояния эритроцитов в качестве маркеров вазореактивности микрососудов головного мозга при черепно-мозговой травме у крыс.

Методика

Эксперимент проводили на половозрелых крысах-самцах Wistar, (200-250 гр) в соответствии с положениями Хельсинкской декларации и рекомендациями Директивы Европейского сообщества (86/609 Г.С), дизайн исследования одобрен междисциплинарным этическим комитетом ФГБОУ ВО ТГМУ (Протокол № 3 от 20.09.2017). Животные были распределены на 4 группы: 1-я — контрольная, интактные животные ($n=10$); 2-я — животные с моделированием ЧМТ легкой степени ($n=30$) и среднетяжелой ($n=30$). Все по-

тенциально болезненные вмешательства в проводимых экспериментах, а также эвтаназия осуществлялись под комбинированным инъекционным наркозом: золетил 0,003 мг/гр («Virbac» Франция), ксиланит 0,008 мг/гр (ЗАО «НИТА-ФАРМ», Россия, г. Саратов), раствор атропина сульфат 0,1% — 0.01 мл на 100 г.

Для воспроизведения ЛЧМТ использовали модифицированную модель падающего груза «weight-drop model» Muchasiuk и соавт., адаптированную для взрослых крыс¹ [6, 7]. Для нанесения травмы применяли установку, включающую штатив с направляющей падение груза (масса 200 г, высота конуса 1 см, площадь бойка 3,14 мм²) трубкой, который падает с высоты 1 м на затылочную область головы животного. Для исключения сопротивления от твердой поверхности использовали контейнер, внизу которого был помещен мягкий материал, а его верхняя часть покрыта фольгой, выдерживающий массу крысы в состоянии покоя, но разрывающийся при нанесении удара по голове. Ускорение и падение, вызванное ударом, включало горизонтальное вращение тела животного на 180°. С целью воспроизведения средней степени или среднетяжелой ЧМТ (СЧМТ) из описанной выше модели был исключён элемент падения животного в резервуар после удара. Травма наносилась по голове нефиксированного животного, свободно лежащего на поверхности при которой допускалось отклонение головы в сторону после удара.

Проводили неврологическое и сенсомоторное обследование, изучали тревожность в тесте «свет—темнота» и способность к обучению при формировании условной реакции пассивного избегания (УРПИ) животных через 2 ч, 1, 2, 8 и 14 сут после моделирования ЧМТ. После выхода из наркоза неврологический статус животных оценивался по шкале mNSS (Modified Neurological Severity Scores), которая включала тесты на выявление расстройств двигательной активности (мышечный статус и неестественные движения), чувствительной сферы (зрительной, тактильной и проприоцептивной), рефлексов и координации движений. Оценка проводилась по балльной системе от 0 до 10 в модификации для крыс [8]. Исследование тревожности проводили в тесте «свет—темнота», используя систему мониторинга активности (TSE, «PhenoMaster», США). Фиксировали латентный период первого захода в темный отсек, время нахождения животного в светлом и темном отсеках, а также количество переходов между отсеками. При оценке УРПИ регистрировался латентный период первичного захо-

¹Патент Ru 2725287 2020.

да в темный отсек, после чего он закрывался и на дно его подавалось 12 ударов тока (50Гц, 1,5 мА, 1 с) с интервалами в 5 с, затем крысу возвращали в «жилую» клетку. Через 3 ч после обучения животное обследовалось повторно с регистрацией времени повторного захода в темный отсек, если таковой имел место. Подсчет анализируемых показателей осуществляли в течение 5 мин после адаптации животных к условиям эксперимента. Через 1 и 14 сут после травмы исследовали уровень тревожности в приподнятом крестообразном лабиринте (PhenoMaster, США) [9]. Время тестирования составило 3 мин; регистрируемые показатели: время пребывания в закрытых, открытых рукавах и на центральной площадке, количество заходов в них и свешиваний с рукава. Видеофиксация проводилась в режиме реального времени с использованием цифровой видеосистемы EthoVision® XT (США).

Цитохимическое исследование эритроцитов проводили с помощью хромаффинной реакции² с использованием ализарина красного S (АКС).

Мазки крови животных, окрашивали 5 % раствором АКС (Sigma-Aldrich, США) на основе 96° этилового спирта и водного раствора бихромата калия (БК, $K_2Cr_2O_7$, Sigma-Aldrich, США). Флуоресцентную микроскопию окрашенных препаратов изучали с помощью сканирующего конфокального микроскопа (Zeiss LSM 710, Германия) максимальная флуоресценция оценивалась в диапазоне длины волн 620–680 нм. В препарате изучали 300 клеток, после чего рассчитывали средний цитохимический коэффициент (СЦК) по формуле:

$$СЦК = \frac{1 \text{ балл} \times N_1 + 2 \text{ балла} \times N_2 + 3 \text{ балла} \times N_3 + 4 \text{ балла} \times N_4 + 5 \text{ баллов} \times N_5}{300}$$

где: N_1 – количество эритроцитов; 1 балл – эритроциты без свечения; 2 балла – гранулярная флуоресценция цитоплазмы (1–5 гранул); 3 балла – неполная гранулярная флуоресценция периферической части цитоплазмы; 4 балла – полная флуоресценция периферической части цитоплазмы с гранулярной зернистостью менее 0.5 мкм в диаметре; 5 баллов – полноценная гранулярная флуоресценция цитоплазмы эритроцитов с зернистостью более 0.5 мкм в диаметре.

Для гистологического исследования тканей головного мозга образцы фиксировали в 4% нейтральном формалине, готовили парафиновые срезы по классической технологии с последующим окрашиванием по Нисслию и гематоксилин–эозином. Препараты оценивали с помощью микроскопа СХ41, оснащен-

ного цифровой камерой (Olympus, Япония). Морфометрическую обработку изображений осуществляли с помощью программы NIS-Elements Imaging Software (Nikon, Япония), подсчитывали нейроны, распределяя на следующие группы: 1 – нормохромные; 2 – гипохромные; 3 – гиперхромные.

Статистический анализ результатов проводили с помощью Statistica 6.0 (StatSoft, США). Все значения представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Данные по группам проанализированы с помощью t-критерия Стьюдента (ненаправленного) и Ньюмана-Кейлса для множественных сравнений. Для корреляции признаков использовали линейный регрессионный анализ с вычислением критерия Пирсона. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

При воспроизведении ЛЧМТ и СЧМТ у животных отсутствовали летальные исходы и существенные двигательные расстройства. При анализе физиологических параметров, включающих время выхода из наркоза и оценку неврологического статуса по шкале mNSS, установлено, что у животных через несколько минут после нанесения легкой ЧМТ (ЛЧМТ) показатели были статистически значимо ($p=0.005$) выше, чем у здоровых (рис. 1). Так, если здоровые животные после наркоза переворачивались на задние лапы через 77.8 ± 8.8 с, то пробуждение после нанесения ЛЧМТ составляло 110.73 ± 9.1 с, а при СЧМТ 151.8 ± 12.7 . Оценка состояния согласно шкале mNSS показала, что у крыс в первые часы динамики ЛЧМТ отмечались нарушения координации, без четких двигательных расстройств, при значении общего среднего балла 1.4 ± 0.31 , сравнимого с показателем для здоровых животных (1.4 ± 0.3 , $p=0.005$).

При изучении ситуативного поведения животных в тесте «черно-белая камера» определено, что время входа здоровых крыс в темную камеру составило 17.9 ± 2.1 с, после обучения они не посещали темный отсек до 90 с и более, что было принято нами за норму для кратковременной памяти. После нанесения ЛЧМТ не было установлено различия с контролем между показателями латентного времени перехода в темный отсек ($p=0.64$) и количеством переходов между отсеками ($p=0.14$). Необходимо отметить, у крыс после ЛЧМТ, по сравнению со здоровыми (204.7 ± 15.2 с), время нахождения в темном отсеке было более продолжительным (276.1 ± 15.2 с, $p=0.03$), что указывало на повышенную тревожность. После ЛЧМТ у животных изменение показателей было за-

²Патент 2709212. Ru; 2019.

регистрировано на 7-е сут ($p < 0.001$): среднее время захода в тёмную камеру при обучении составило 9.38 ± 0.9 с, также было зарегистрировано угасание УРПИ, указывающее на нарушение кратковременной памяти. Среднее время повторного захода составило 37.65 ± 3.8 с. У животных на 7-е сут после нанесения СЧМТ среднее время захода в тёмную камеру при обучении составило 11 с, а угасание УРПИ зарегистрировано у 4 из 5 животных, которые повторно заходили в тёмную камеру в среднем через $54,86 \pm 5,6$ с (рис. 1). Общее среднее время повторного посещения тёмной камеры у животных с СЧМТ составило 65 с. При исследовании поведения животных в приподнятом крестообразном лабиринте определено нарастание уровня тревожности к 14-м сут после ЛЧМТ. Количество посещений открытых рукавов снизилось с 4 до 0, а закрытых рукавов повысилось с 8 до 13 на фоне повышения времени нахождения в них животных с 101.2 ± 11.3 до 167 ± 14.3 с.

В неокортексе через 1 сут после нанесения ЛЧМТ обнаружено сужение капилляров, значительное увеличение содержания гиперхромных нейронов и количества клеток с 2 ядрышками (таблица). Восстановление просвета капилляров с повышением

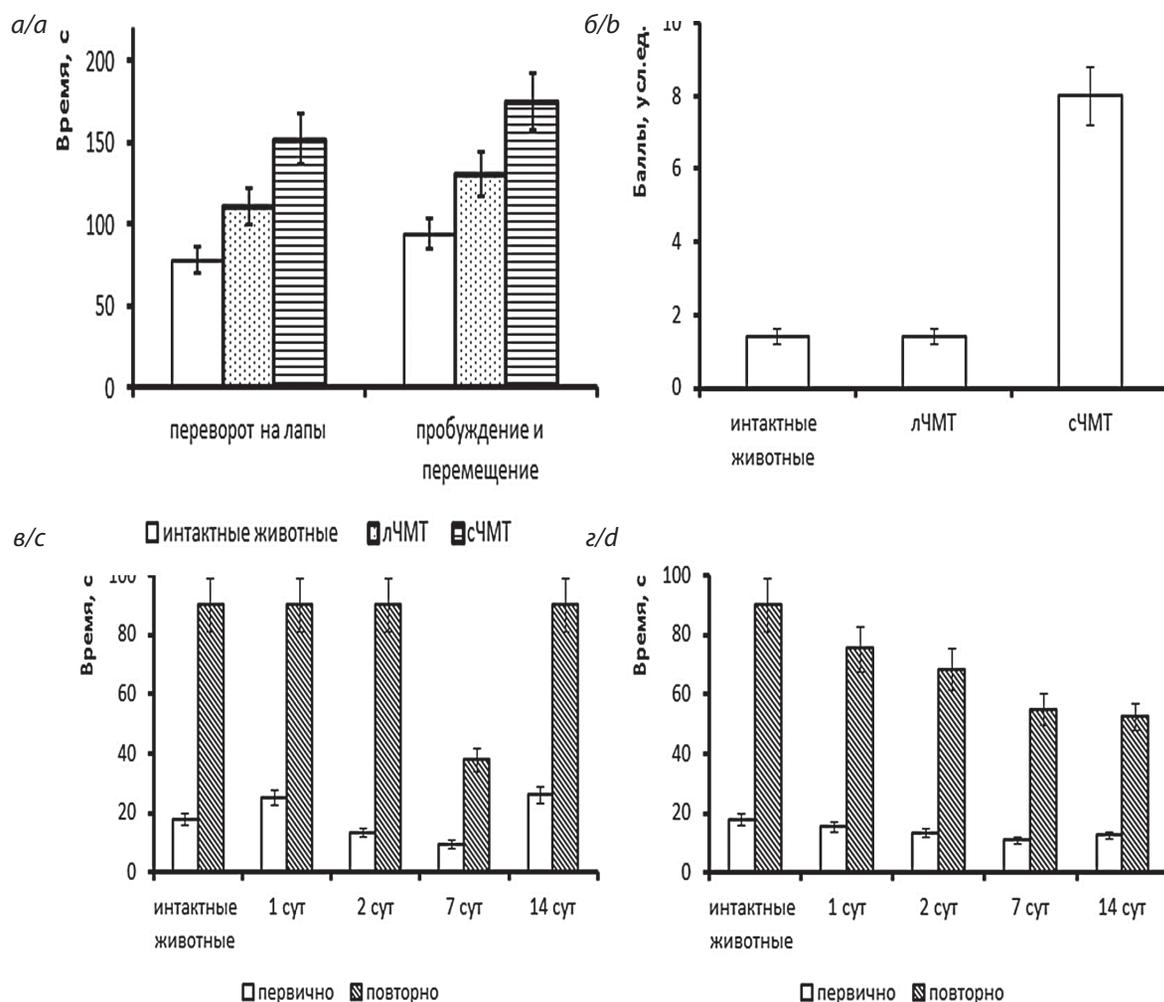


Рис. 1. Неврологический и поведенческий статус животных при черепно-мозговой травме: а – показатели время выхода из наркоза (ось абсцисс, с); б – количество баллов по шкале mNSS (ось абсцисс, баллы, усл. ед.); в, г – время входа в темную камеру в тесте «черно-белая камера» животных после ЛЧМТ и СЧМТ соответственно (ось абсцисс, с).

Fig. 1. Neurological and behavioral status of animals with traumatic brain injury: а: time of recovery from anesthesia (abscissa, sec); б: mNSS scale score (abscissa, score in conventional units); в, г – time of entry into the dark chamber in the “black-and-white chamber” test after TBI, respectively (abscissa, sec).

ем количества гипохромных нейронов и увеличением диаметра ядрышек отмечалось к 7-м сут, тогда как к 14-м сут, напротив, обнаруживалось повышение содержания гиперхромных нейронов с 2 ядрышками. Снижение осмолярности цитоплазмы нейронов при изменении соотношения ионов калия морфологически проявляется гиперхромией. У травмированных животных увеличение количества гиперхромных нейронов и клеток с 2 ядрышками обнаружено к концу 2-й нед при высоком уровне тревожности животных (таблица).

В настоящем исследовании для выявления состояния окислительного метаболизма в эритроцитах применялся метод, основанный на свойстве амидных групп взаимодействовать с бихроматом калия (БК) и АКС. При длине волны спектра возбуждения 615 нм с помощью флуоресцентной. При микроскопии препаратов крови здоровых животных отмечалась незначительная флуоресценция эритроцитов (рис. 2, а, СЦК=2.735±0.064). На фоне стрессорной реакции организма отмечалась интенсивная хромаффинная реакция в эритроцитах травмированных животных через 2 ч после нанесения ЛЧМТ (3.383±0.144) и СЧМТ (3.853±0.214) (рис. 2, б, в). Затем показатели хромаффинной реакции эритроци-

тов снижались, и минимальное значение СЦК отмечалось через 2 сут при ЛЧМТ (1.1±0.033) и СЧМТ (1.918±0.12). В этот период преимущественно обнаруживались клетки с диффузной флуоресценцией цитоплазмы. Если принять во внимание, что в низкодифференцированных эритроидных клетках не определяется флуоресценция (рис. 2, г), а гранулярное свечение отмечается после энуклеации оксифильных нормоцитов, можно высказать предположение, что при гипоксии и развитии окислительного стресса после ЧМТ в периферической крови преобладают низкодифференцированные эритроциты. В таких условиях существенно изменяется способность эритроцитов к восстановлению Cr (VI), что отражает особенности их метаболизма. Корреляционный анализ показал статистически значимую связь между показателями морфометрического анализа и показателем СЦК хромаффинной реакции эритроцитов. Согласно шкале Чеддока сильная положительная связь определена между показателями диаметра сосудов головного мозга и СЦК. Коэффициент корреляции для показателей диаметра прекапилляров, капилляров, посткапилляров и СЦК хромофильной реакции эритроцитов составил 0.896, 0.984 и 0.993 соответственно (p<95%).

Таблица/Table

Параметры морфометрического анализа неокортекса

Parameters of the neocortex morphometric analysis

Показатель Parameters	Контроль Control	1 сут после ЛЧМТ 1 day after mTBI	8 сут после ЛЧМТ 8 day after mTBI	14 сут после ЛЧМТ 14 day after mTBI
Диаметр прекапилляров, мкм Precapillary diameter, μm	9.4±0.51	7.40±0.51*	7.8±0.4*	9.8±0.4*
Диаметр капилляров, мкм Capillary diameter μm	5.0±0.05	3.780±0.116*	4.2±0.07*	4.9±0.06
Диаметр посткапилляров, мкм Postcapillary diameter, μm	8.5±0.2	6.92±0.116*	7.5±0.2*	8.4±0.2
Количество гипохромных нейронов, % Number of hypochromic neurons, %	5.2±0.6	6.2±1.53*	19.0±4.5*	5.8±1.2
Количество гиперхромных нейронов, % Number of hyperchromic neurons, %	5.0±0.6	61.56±15.52*	22.9±6.7*	23.7±8.1*
Количество нормохромных нейронов, % Number of normochromic neurons, %	89.8±0.9	32.54±11.38*	58.1±9.7*	70.5±7.4
Размер ядрышек нейронов, мкм The size of the nucleoli of neurons, μm	0.5±0.03	0.68±0.05*	0.7±0.1*	0.6±0.03
Количество клеток с двумя ядрышками, % Number of cells with two nucleoli, %	4.5±1.7	7.5±1.2*	10.0±1.2*	10.0±2.2*

Примечание. * – статистическая достоверность различия выборок животных (p<0,05).

Note. * – statistical significance of the difference between animal samples (p<0,05).

Обсуждение

Согласно нашим данным при моделировании ЧМТ выявляются значимые изменения неврологического и поведенческого статуса. У этих крыс обнаруживались нарушения координации и небольшие двигательные расстройства. Ситуативное поведение животных изменялось при наличии повышенной тревожности и нарушении кратковременной памяти. Причем, неврологические и поведенческие расстройства у крыс развивались на фоне дисциркуляции мозгового кровообращения. Эти данные подтверждаются другими авторами [10]. В ответ на локальные механизмы развития ЛЧМТ формируется генерализованный ответ целостного организма. При цитохимическом исследовании эритроцитов периферической крови было показано, что во время экспериментальной ЛЧМТ обнаруживаются данные говорящие о генерализованной реакции организма в ответ на повреждение

ЦНС. Это обусловлено, тем, что повреждение ЦНС приводит к дестабилизации механизма регуляции физиологических и метаболических процессов, которые поддерживают гомеостаз. На эту точку зрения указывает то, что при ЛЧМТ происходит нейрогенная модуляция окислительно-восстановительных процессов обмена производных тирозина в цитоплазме эритроцитов периферической крови. В целях оценки дисфункции микроциркуляции во время ЛЧМТ нами были использованы новый метод исследования эритроцитов периферической крови. Выбор этого метода обусловлен тем, что сейчас существенно пересмотрены механизмы флуоресценции целого ряда красителей, а также адгезия флуорохрома на объектах исследования [11]. Для флуоресценции физических тел выявлена существенная роль переноса электронов в химической системе [12]. Новыми видами флуоресценции являются: 1. Фотоиндуцированный перенос электронов; 2. Электронный обмен или взаимодействия ти-

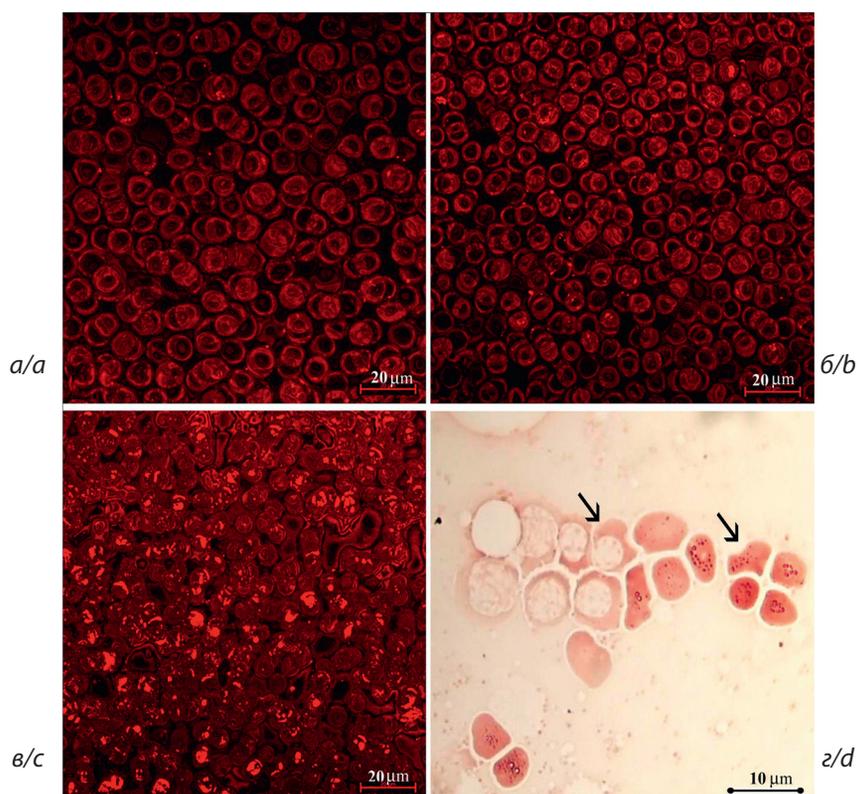


Рис. 2. Хромаффинная реакция в эритроцитах. *a* – контрольных животных; *b*, *v* – через 2 ч после легкой и среднетяжелой черепно-мозговой травмы; *z* – красный костный мозг здоровых животных, незрелые эритроидные клетки и эритроциты с отрицательной хромаффинной реакцией и зрелые с положительной. *a-v* – конфокальная микроскопия, *z* – световая микроскопия, окраска ализариновым красным и бихроматом калия.

Fig. 2. The chromaffin reaction of red blood cells: *a*: control animals; *b*, *v*: at 2 h after mild and moderate traumatic brain injury, respectively; *d*: red bone marrow of healthy animals, immature erythroid cells and erythrocytes with a negative chromaffin reaction and mature cells with a positive chromaffin reaction. *a-c*: confocal microscopy, *D*: light microscopy, staining with alizarin red and potassium dichromate.

па Декстера; 3. Эмиссия индуцированной агрегацией (AIE); 4. Усиление флуоресценции инкапсулированных красителей. АКС является широко известным биохимическим маркером состояния функции доноров и акцепторов электронов в биологической системе, содержащей кислоты и основания Льюиса [13]. Также изучается эксимерная флуоресценция АКС, которая характеризует образование радикалов фотодимеров этого красителя [14]. Установлен фото-зависимый характер контакта АКС с оксидами металла, который инициирует образование активных форм кислорода – антрахиноновый процесс [15]. Поэтому для маркирования оксидации производных тирозина в эритроцитах использовали ализарин красный С и бихромат калия, которые образуют химические связи с ароматическими аминокислотами. На специфичность этой реакции указывает, как известно, то, что производные тирозина имеют основное значение в качестве важнейших мишеней для воздействия активных форм кислорода. Эта точка зрения сейчас подтверждена в большом количестве исследований конструкции современных хемосенсоров [16]. Следовательно, полученные нами данные об изменении метаболизма в эритроцитах животных после ЧМТ, сопряженной с гипоксией тканей головного мозга, подтверждают нарушение гемореологии, способствующей развитию генерализованного оксидативного стресса. Корреляционный анализ морфометрических данных и СЦК хромофильной реакции эритроцитов показал статистически значимую связь между ними. Была установлена согласно шкале Чеддока сильная положительная связь между показателями диаметра сосудов головного мозга и СЦК. Коэффициент корреляции для показателей диаметра прекапилляров, капилляров, посткапилляров и СЦК хромофильной реакции эритроцитов был равен 0.896, 0.984 и 0.993 соответственно ($p < 0,05$).

Заключение

Морфометрия капилляров нервной ткани показала уменьшение диаметра просвета в начальный посттравматический период, при этом отмечалась морфохимическая компенсация нейронов, которая является локальной ответной реакцией клеток на ишемию головного мозга. При внутричерепной травме следствием изменения окислительно-восстановительных процессов в эритроцитах является генерализованное нарушение гемореологии. Изменение этого показателя в динамике патологического процесса отражало наличие инициирующего воздействия нейродинамических повреждающих факторов на возникно-

вание генерализованных гемодинамических сдвигов в организме крыс.

Литература

(п.п. 1-3; 6; 8-10; 12-16 см. References)

1. Зиновьев С.В., Целуйко С.С. Цитохимическая характеристика эритроцитов при экспериментальном антиортостатическом вывешивании крыс. *Амурский медицинский журнал*. 2017; 2(18): 54-7.
2. Глуткина Н.В., Пырошкин В.М. Кислородтранспортная функция и прооксидантноантиоксидантное состояние крови у пациентов с перенесенным инфарктом миокарда. *Кардиология в Беларуси*. 2012; 4: 95-106.
3. Плехова Н.Г., Радков И.В., Зиновьев С.В., Дюйзен И.В., Барышев А.Н., Шуматов В.Б. Поведенческая реакция животных и морфологическая структура неокортекса при экспериментальной черепно-мозговой травме лёгкой степени. *Бюл. экпер. биол. и мед.* 2020; 170(11): 640-5.
4. Реутов В.П., Черток В.М. Новые представления о роли вегетативной нервной системы и систем генерации оксида азота в сосудах мозга. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2016; 26: 10-20.

References

1. Hyder A.A., Wunderlich C.A., Puvanachandra P., Gururaj G., Kobusingye O.C. The impact of traumatic brain injuries: a global perspective. *NeuroRehabilitation*. 2007; 22(5): 341-53.
2. Dadas A., Washington J., Diaz-Arrastia R., Janigro D. Biomarkers in traumatic brain injury (TBI): a review. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2018; 14: 2989-3000.
3. Dang B., Chen W., He W., Chen G. Rehabilitation treatment and progress of traumatic brain injury dysfunction. *Neural Plast*. 2017; 2017: 1582182.
4. Zinoviev S.V., Tseluyko S.S. Cytochemical characterization of erythrocytes during experimental antiarthostatic stiffening of rats. *Amurskiy meditsinskiy zhurnal*. 2017; 2(18): 54-7. (in Russian)
5. Glutkina N.V., Pyrochkin V.M. Oxygen transport functions and prooxidant antioxidant state of blood in patients with myocardial infarction. *Kardiologiya v Belarusi*. 2012; 4: 95-106. (in Russian)
6. Kane M.J., Angoa-Pérez M., Briggs D.I., Viano D.C., Kreipke C.W., Kuhn D.M. A mouse model of human repetitive mild traumatic brain injury. *J Neurosci Methods*. 2012; 203(1): 41-9.
7. Plekhova N.G., Radkov I.V., Zinoviev S.V., Dyuzhen I.V., Baryshav A.N., Shumatov V.B. Behavioral reaction of animals and the morphological structure of the neocortex in mild experimental traumatic brain injury. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2020; 170(11): 640-5. (in Russian)
8. Zhou J., Zhuang J., Li J., Ooi E., Bloom J., Poon C., et al. Long-term post-stroke changes include myelin loss, specific deficits in sensory and motor behaviors and complex cognitive impairment detected using active place avoidance. *PLoS ONE*. 2013; 8(3):e57503. 2013.
9. Walf A.A., Frye Ch.A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2007; 2(2): 322-8.
10. Khaydarov F.G., Khasanova D.A. Study of behavioral and morphological disorders in animals with modeled pathology of mild traumatic brain injury. *Am J Medicine and Medical Sci*. 2020; 10(10): 803-8.

11. Reutov V.P., Chertok V.M. The new understanding of the autonomic nervous system role and the nitric oxide generating system in the brain vessels. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2016; 26: 10–20. (in Russian)
12. Mako T.L., Racicot J.M., & Levine M. (2018). Supramolecular Luminescent Sensors. *Chem Rev*. 2019; 119(1): 322-477.
13. Scarano W., Lu H., Stenzel M.H. Boronic acid ester with dopamine as a tool for bioconjugation and for visualization of cell apoptosis. *Chem Commun*. 2014; 50: 6390-3.
14. Haichao Liu, Dengli Cong, Bao Li, Ling Ye, Yunpeng Ge, Xiaohui Tang, at al. Discrete Dimeric Anthracene Stackings in Solids with Enhanced Excimer Fluorescence. *Cryst Growth Des*. 2017; 17(6): 2945–9.
15. Underwood Timothy M., Robinson Ross S. Enhancing the photo-efficacy of an organic visible-light-activated chromophore (alizarin red S) on zinc oxide with a Ag–Na electrolyte to photo-transform aromatic and aliphatic alcohols. *RSC Adv*. 2019; 9: 24259-66.
16. Zhang X., Wei Y., Ding Y. Electrocatalytic oxidation and voltammetric determination of ciprofloxacin employing poly(alizarin red)/graphene composite film in the presence of ascorbic acid, uric acid and dopamine. *Anal Chim Acta*. 2014; 835: 29-36.

Сведения об авторах:

Плехова Наталья Геннадьевна, доктор биол. наук, зав. Центральной научно-исследовательской лаб. ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, e-mail: pl_nat@hotmail.com;

Зиновьев Сергей Викторович, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. Центральной научно-исследовательской лаб. ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России;

Радьков Иван Валерьевич, аспирант Центральной научно-исследовательской лаб. ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России;

Шуматов Валентин Борисович, доктор мед. наук, проф., ректор ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России.