

## Влияние перфторана на наноструктуру мембран дискоцита и стоматоцита после острой кровопотери

В. В. Мороз<sup>1</sup>, И. С. Новодержкина<sup>1</sup>, А. В. Афанасьев<sup>1</sup>,  
Ю. В. Заржецкий<sup>1</sup>, И. А. Рыжков<sup>1</sup>, Е. К. Козлова<sup>1,2</sup>, А. М. Черныш<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского, ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии  
Россия, 10703, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

<sup>2</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России,  
Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

## Effect of Perftoran on Membrane Nanostructure of Discocyte and Stomatocyte after Acute Blood Loss

Victor V. Moroz<sup>1</sup>, Irina S. Novoderzhkina<sup>1</sup>, Alexander V. Afanasyev<sup>1</sup>, Yury V. Zarzhetsky<sup>1</sup>,  
Ivan A. Ryzhkov<sup>1</sup>, Elena K. Kozlova<sup>1,2</sup>, Alexander M. Chernysh<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,  
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation,  
<sup>2</sup> I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia,  
8 Trubetskaya Str., Build. 2, Moscow 119991, Russia

**Цель работы:** оценить влияние перфторана на наноструктуру мембран дискоцитов и стоматоцитов после острой кровопотери.

**Материалы и методы.** Работа выполнена на белых крысах-самцах. Нембутал в дозе 25 мг/кг вводили внутривенно. Моделью служила острая кровопотеря с последующей гипотензией в течение 60 мин при удержании АД на уровне 40 мм рт. ст. с последующей реинфузией выпущенной крови. Пробы крови из хвостовой артерии брали до кровопотери и через 2 часа после реинфузии. Перфторан (ПФ) в дозе 3 мл/кг массы тела вводили интравенно, сразу после возмещения кровопотери. Контролем служили животные без введения ПФ. С помощью атомного силового микроскопа «Femtoscan» исследовали структуру мембран эритроцита в диапазонах с разными пространственными периодами. Выделение диапазонов выполняли с помощью спектральных окон Фурье-преобразований. Для каждого спектрального окна по выделенным профилям поверхности мембраны рассчитывались периоды (T) и высоты (h) шероховатостей поверхности эритроцита.

**Результаты.** Дискоциты и стоматоциты в исходном состоянии имеют различные структурные характеристики клеточной мембраны эритроцита в пространственном диапазоне 600–1200 нм в виде большего периода колебаний у стоматоцитов по сравнению с дискоцитами. Гиповолемия и последующая реинфузия аутокрови оказывают воздействие на данный показатель, увеличивая период пространственных колебаний как у дискоцитов, так и у стоматоцитов по сравнению с исходным состоянием. Введение ПФ приводит к существенному уменьшению периода пространственных колебаний клеточной мембраны как у дискоцитов, так и у стоматоцитов по сравнению с эритроцитами животных, перенесших гиповолемию и реинфузию без введения ПФ, а также по сравнению с величинами этого показателя в исходном состоянии.

**Заключение.** Величина периода колебаний в пространственном диапазоне 600–1200 нм, отражающего состояние липидного бислоя клеточной мембраны эритроцита, не связана с трансформацией дискоцита в стоматоцит. Высказано предположение о том, что уменьшение периода колебаний в данном пространственном диапазоне при воздействии ПФ сопряжено с увеличением способности эритроцита к деформированию.

**Ключевые слова:** гиповолемия; реперфузионный период; перфторан; стоматоцит; дискоцит; наноструктура мембран эритроцитов

**The purpose of the study:** to evaluate the effect of Perftoran (PF) on the membrane nanostructure of discocytes and stomatocytes after acute blood loss.

**Materials and methods.** The study was performed in white male rats. Nembutal was administered intraperitoneally at a dose of 25 mg/kg. The study model was as follows: acute blood loss followed by hypotension for 60 min with the BP maintained at the level of 40 mm Hg with subsequent reinfusion of lost blood. Blood samples were collected from the tail artery before the blood loss and 2 hours after reinfusion. PF was administered intraarterially at a dose 3 ml/kg of body mass immediately after the blood loss replacement. Animals who did not receive

### Адрес для корреспонденции:

Ирина Новодержкина  
E-mail: novodergkina@yandex.ru

### Correspondence to:

Irina Novodergkina  
E-mail: novodergkina@yandex.ru

Perftoran served as a reference group. The RBC membrane structure was studied using the Femtoscan atomic force microscope at ranges with different spatial periods. The ranges were selected using the Fourier transform and spectral windowing. Periods (T) and heights (h) of RBC surface corrugation were calculated for each spectral window according to the isolated profiles of the membrane surface.

**Results.** At a baseline; discocytes and stomatocytes exhibited different structural characteristics of RBC membrane at a spatial range of 600–1200 nm in the form of a higher period of vibration of stomatocytes vs. discocytes. Hypovolemia and subsequent reinfusion of autologous blood affected studied parameters by increasing the period of spatial oscillation both in discocytes and stomatocytes as compared to the initial state. Administration of PF significantly decreased the period of spatial oscillation of the cell membrane both in discocytes and stomatocytes as compared to animal RBCs who underwent hypovolemia and reinfusion without PF administration and baseline parameters.

**Conclusion.** The period of vibration within the range of 600-1200 nm reflecting the state of the bilayer of RBC membrane is not related to the discocyte transformation into the stomatocyte. Data suggest that the PF-induced shortage in vibration within this range was associated with the increased ability of a RBC to deform.

**Key words:** hypovolemia; reperfusion period; perftoran; stomatocyte; discocyte; nanostructure of RBC membrane

DOI:10.15360/1813-9779-2017-2-32-39

## Введение

Известно, что одним из важных патогенетических факторов нарушения микроциркуляции при острой кровопотери является изменение клеток красной крови, то есть микрореологии [1, 2]. Для осуществления обмена на уровне капилляра необходима деформация этих клеток, которая определяется состоянием их мембран. Из многочисленных работ также известно, что перфторан способствует улучшению обмена между капилляром и тканью [3–5].

Цель исследования: оценить влияние перфторана на наноструктуру мембран дискоцитов и стоматоцитов после острой кровопотере.

## Материал и методы

Работа выполнена на 20 наркотизированных белых крысах-самцах массой 250–350 г. Нембутал в дозе 25 мг/кг вводили внутривенно. Моделью терминального состояния служила острая кровопотеря с последующей гипотензией в течение 60 минут при удержании АД на уровне 40 мм рт. ст. Эксфузию крови проводили из хвостовой артерии с предварительной гепаринизацией в дозе 50 МЕ/кг. После периода гипотензии осуществляли реинфузию выпущенной кровью. Пробы крови из хвостовой артерии брали до кровопотери и через 2 часа после реинфузии. Перфторан (ПФ) в дозе 3 мл/кг массой тела вводили внутривенно, сразу после возмещения кровопотери. Контролем служили животные без введения ПФ.

Морфологический анализ эритроцитов проводили в сухих мазках, в монослое, без окрашивания, с использованием светового микроскопа Olimpus-BX-50. Цитометрическое исследование проводили при помощи программы ImageScope при увеличении 1000 (100×10). Подсчитывали 1000 клеток на мазок и на основании классификации Bessis M. [6] рассчитывали процентное содержание дискоцитов и стоматоцитов. Обычный вид стоматоцита — форма спущенного мяча с одним или несколькими углублениями (стомами). В зависимости от положения в сухом мазке они могут выглядеть как округлые клетки с большим щелевид-

## Introduction

It is known that red blood cells (RBC) change is an important factor in the pathogenesis of microcirculatory disturbances in acute blood loss [1, 2]. The RBC deformation is required for capillary exchange, and it is determined by the state of the membranes. Numerous studies have shown that Perftoran contributes to improving the transcapillary exchange between blood and tissue [3–5].

The purpose of the study: to evaluate the effect of Perftoran on the membrane nanostructure of discocytes and stomatocytes after acute blood loss.

## Materials and Methods

Experiments were carried out on 20 narcotized male white rats weighing 250 g to 350 g. Nembutal was administered by intraperitoneal injection at a dose of 25 mg/kg. As a model of a critical state, we used acute blood loss followed by hypotension within 60 minutes while keeping the blood pressure at 40 mmHg. Blood was sampled from the tail artery after pretreatment with heparin at a dose of 50 IU/kg. The collected blood was reinfused after the period of hypotension. Blood samples were withdrawn from the tail artery before blood loss and 2 hours after the reinfusion. Perftoran (PF) was administered intraarterially at a dose of 3 ml/kg body weight immediately after blood reinfusion. Animals without PF administration served as a reference group.

A morphological analysis of RBCs in monolayer dried unstained blood smear slides was performed using the Olympus BX50 (Japan) light microscope. Cytometry was carried out using the ImageScope software at a 1000 magnification (10×100); 1000 cells were counted per smear. Using the classification of Bessis M. [6], the percentage of discocytes and stomatocytes was calculated. Stomatocyte generally has a shape of deflated ball with one or more recesses (stoma). Depending on the position in a dry smear it may appear as a rounded cell with a large slit-like pellor (top view), or as a «helmet» cell [7].

The images of fragments of RBC membrane surface were obtained using an atomic force microscope (AFM) (NTEGRA Prima, NT-MDT, Russia) and Femtoscan software. Three orders of surfaces were determined: the struc-

## Injury, Blood Loss

ным пэллором (вид сверху), либо как «шлемовидные» клетки [7].

Изображение фрагментов структуры поверхности мембраны эритроцитов получали с помощью атомного силового микроскопа (АСМ) (NTEGRA Prima, NT-MDT, Россия) и программного обеспечения «Femtoscan». Были выделены поверхности трех порядков: структуры с пространственными периодами 600–1200 нм соответствовали 1-му порядку, с периодами 250–350 нм — 2-му порядку и с периодами 50–250 нм — 3-му порядку. Выделение поверхностей 1, 2 и 3 порядков выполняли с помощью спектральных окон Фурье-преобразований [8]. Выбор диапазонов определялся известными в литературе данными о размере колебаний липидного бислоя клеточной мембраны эритроцита (фликкера) — 1-й порядок, о конфигурации спектрина — 2-й порядок и протеиновых узлов соединения — 3-й порядок [9–11]. Для статистического анализа использовали усредненные значения периода и высоты колебаний по трем участкам поверхности одного эритроцита.

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 7.0. Для оценки достоверности различий между группами использовали критерий U Вилкоксона-Манна-Уитни. Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Анализируемые величины представлены в виде: Me (25%; 75%).

### Результаты и обсуждение

В исходном состоянии процентное содержание стоматоцитов в крови составило 4,0% (2; 4). У крыс контрольной группы к 2 часам реперфузионного периода произошло увеличение процентного содержания в крови стоматоцитов до 22,5% (20; 28) ( $p < 0,01$ ). Такие же изменения, но более выраженные, наблюдали у животных с введением ПФ. В этой группе процентное содержание стоматоцитов в крови составило 90,0% (75; 92) ( $p < 0,01$  при сравнении с исходом и контролем) (рис. 1, 2).

В исходном состоянии структурные различия поверхности дискоцитов и стоматоцитов по исследуемым параметрам характеризовались меньшей величиной T1 у дискоцитов по сравнению со стоматоцитами (табл.). Такое же различие между дискоцитами и стоматоцитами наблюдали у крыс контрольной группы через 2 часа восстановительного периода. Вместе с тем, как дискоциты, так и стоматоциты животных группы контроля через 2 часа после реперфузии характеризовались увеличением значения T1 по сравнению с исходом. Таким образом, 60-минутная гипотензия с последующей реперфузией в течение 2 часов восстановительного периода приводила к увеличению процентного содержания стоматоцитов и к изменению структурной поверхности клеточной мембраны эритроцитов в виде возрастания T1 как у дискоцитов, так и у стоматоцитов.

В группе с введением ПФ, в отличие от контрольной группы и исходного состояния, к 2 часам реперфузионного периода между дискоцитами и

tures with the spatial period of 600–1200 nm corresponded to the surface of 1<sup>st</sup> order (T1), the period of 250–350 nm corresponded to the surface of 2<sup>nd</sup> order (T2), and the period of 50–250 nm to the surface of 3<sup>rd</sup> order (T3). Selection of the surfaces of 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> orders was performed using appropriate spectral windows of Fourier transform [8]. The choice of the spectral windows was determined by data known from the literature regarding the extent of fluctuations of RBC membrane lipid bilayer, i.e. flickering (1<sup>st</sup> order), the configuration of spectrin matrix (2<sup>nd</sup> order) and protein junction sites (3<sup>rd</sup> order) [9–11]. The averaged values of the period and heights of oscillations in three areas of one RBC membrane surface were used for statistical analysis.

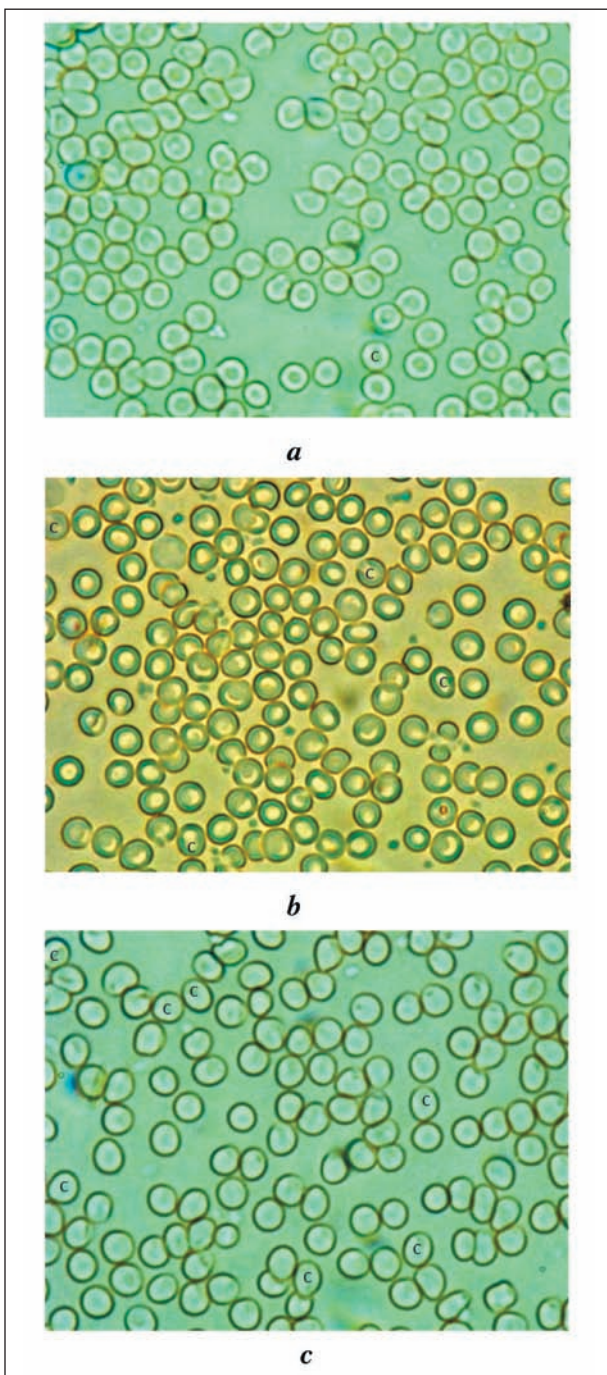
Statistical processing of the data was performed using the Statistica 7.0 software. The significance of differences between the groups was assessed by the Wilcoxon-Mann-Whitney U test. The difference was considered statistically significant at  $P < 0.05$ . The analyzed values are presented as Me (25%; 75%).

### Results and Discussion

At a baseline, the percentage of stomatocytes in the blood was 4.0% (2; 4). In reference group the percentage of stomatocytes in the blood increased to 22.5% (20; 28) ( $P < 0,01$ ) 2 hours after reperfusion. Similar and even more pronounced changes were observed in the animals of the PF group. In this group, the percentage of stomatocytes in the blood was 90.0% (75; 92) ( $P < 0.01$ ) as compared to baseline or reference group (Fig. 1, 2).

At a baseline, the structural differences in discocytes and stomatocytes membrane surface parameters were characterized by lower value of T1 in discocytes compared to stomatocytes (Table). The same difference between discocytes and stomatocytes were observed in the reference group rats 2 hours after reperfusion. At the same time, both discocytes and stomatocytes in animals of the reference group were characterized by increased value of T1 2 hours after reperfusion vs. the baseline. Thus, a 60-minute hypotension followed by reperfusion during the 2 hours of recovery period resulted in an increase in the percentage of stomatocytes and changes in the structure of the RBC membrane surface in the form of T1 rise both in discocytes and stomatocytes.

Unlike the reference group and baseline values, in the PF group there were no differences between discocytes and stomatocytes for all investigated parameters two hours after reperfusion (Fig. 3, 4). The comparison of the reference group with the PF group showed that T1 values both in the discocytes and stomatocytes of the reference group rats were greater than those in the corresponding forms of RBCs in the PF group. At the same time, the h1 and h2 values in the stomatocytes of reference group rats were higher than those in the stomatocytes of the PF group (Table), indicating an increase in corrugation of stomatocytes 2 hours after reperfusion. It should



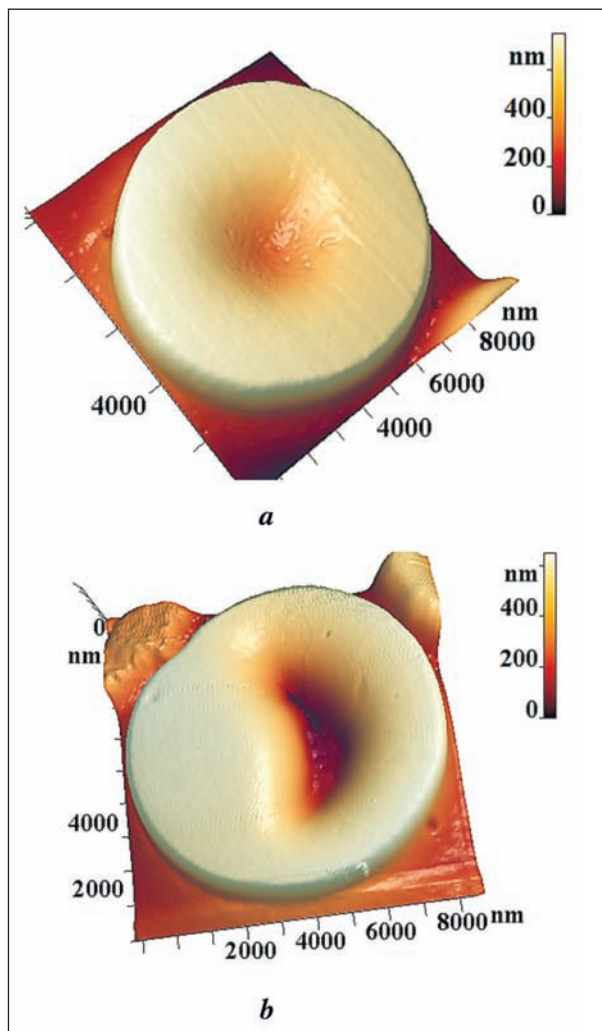
**Рис. 1.** Морфологические изменения эритроцитов на фоне перфторана и без него.

**Fig. 1.** Morphological changes in red blood cells on the background of perfloran administration and without it.

**Notes.** *a* – Baseline; *b* – 2 hours after reperfusion; *c* – 2 hours after reperfusion with perfloran administration; C – stomatocyte.

**Примечание.** *a* – исход; *b* – через 2 часа после реперфузии; *c* – через 2 часа после реперфузии и введения перфторана; C – стоматоцит.

стоматоцитами отсутствовали различия по всем исследуемым показателям (рис. 3, 4). Сравнение группы контроля и группы с введением ПФ показало, что значения T1 как у дискоцитов, так и у стоматоцитов крыс группы контроля больше, чем у



**Рис. 2.** Изображения дискоцита (*a*) и стоматоцита (*b*) в поле АСМ в формате 3D.

**Fig. 2.** Images of discocyte (*a*) and stomatocyte (*b*) in the field of atomic force microscope in 3D.

also be noted that the values of T2 in discocytes and T1 in stomatocytes of the animals after PF administration were lower than the corresponding values in rats at baseline. The results demonstrate the effect of PF on the membrane structure of RBCs exposed to hypoxia and subsequent reperfusion.

Thus, the results of this work showed: a) at a baseline, the value of T1 in discocytes is less than that in stomatocytes; b) hypoxic and subsequent reperfusion exposure leads to alteration of RBC membrane surface in the form of T1 increasing both in discocytes and stomatocytes compared to the baseline; c) PF administration in the early reperfusion period has an effect on RBC membrane surface reducing the value of T1 in stomatocytes and discocytes as compared to the data acquired from the baseline and the discocytes of a reference group. However, hypovolemia and subsequent reperfusion lead to an increase in the percentage of stomatocytes in the blood.

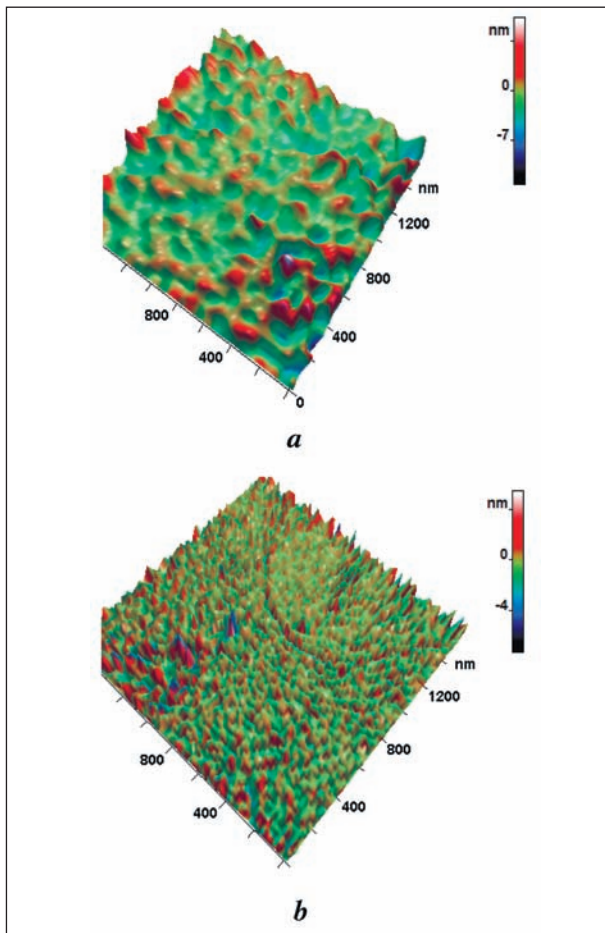


Рис. 3. Наноструктура мембраны дискоцита через 60 минут гипотензии, до введения перфторана.

Fig. 3. Membrane nanostructure of discocyte 60 minutes after hypotension, before perfortan administration.

Note. *a* – the surface of 2<sup>nd</sup> order; *b* – the surface of 3<sup>rd</sup> order.

Примечание. *a* – второй порядок; *b* – третий порядок.

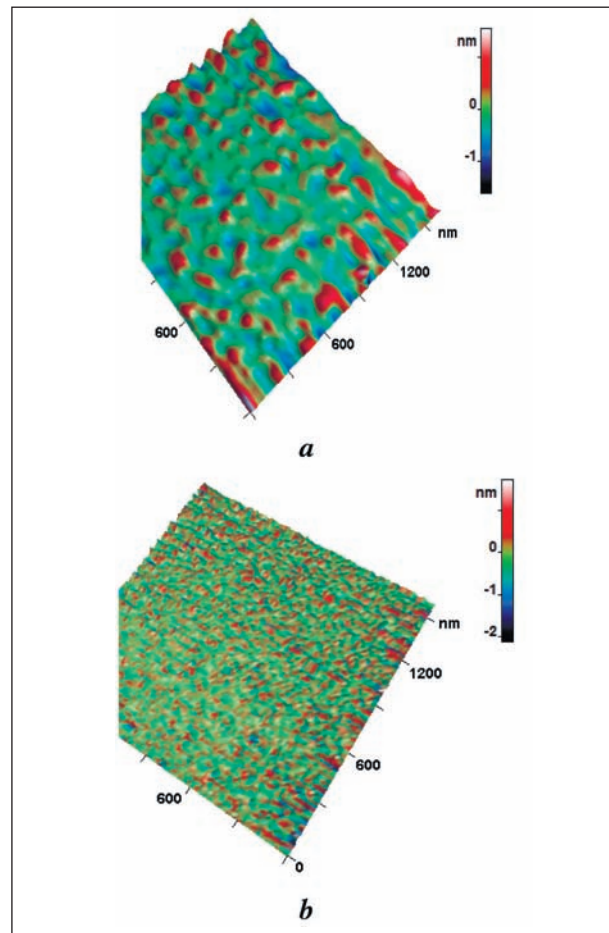


Рис. 4. Наноструктура мембраны дискоцита через 2 часа после реперфузии и введения перфторана.

Fig. 4. Membrane nanostructure of discocyte 2 hours after reperfusion and perfortan administration.

Note. *a* – the surface of 2<sup>nd</sup> order; *b* – the surface of 3<sup>rd</sup> order.

Примечание. *a* – второй порядок; *b* – третий порядок.

соответствующих форм эритроцитов животных с введением ПФ. При этом величины  $h_1$  и  $h_2$  стоматоцитов, свидетельствующие об увеличении шероховатости стоматоцитов к 2 часам реперфузионного периода, у крыс контрольной группы выше, чем у крыс с введением ПФ (табл.). Следует также отметить, что значения T2 дискоцитов и T1 стоматоцитов животных после введения ПФ оказались меньше, чем соответствующие величины у крыс в исходном состоянии. Результаты свидетельствуют о влиянии ПФ на структуру поверхности эритроцитов, подверженных гипоксическому и последующему реперфузионному воздействию.

Итак, результаты настоящей работы показали, что: а) в исходном состоянии у дискоцитов величина T1 меньше, чем у стоматоцитов; б) гипоксическое и последующее реперфузионное воздействие приводит к изменению поверхности клеточной мембраны эритроцитов в виде увеличения периода 1-го порядка как у дискоцитов, так и у стоматоцитов по сравнению с исходным со-

It is noteworthy, that stomatocyte membranes in the reference group and the PF group were characterized by opposite changes of T1 vs. the baseline (Table). These results, as well as the lack of differences between discocytes and stomatocytes for all investigated parameters in the PF group, allow to conclude that the parameters of RBC membrane surface investigated in the present study are not associated with changes in RBC shape, i.e. with the transformation of discocyte into stomatocyte.

On the other hand, the differences between discocytes and stomatocytes in T1 values, which characterize the state of lipid bilayer, allow to suggest that changes in the lipid bilayer occur during the transformation of discocyte into stomatocyte and RBC exposure to hypovolemia and reperfusion.

We can assume that PF effect on the membrane lipid bilayer is associated with increased NO oxidation [12, 13], that reduces the rate of NO transport into a RBC [14, 15] and the process of transformation of  $Fe^{2+}$  into  $Fe^{3+}$  [16, 17]. It is confirmed by a

**Периоды (T, нм) и высоты (h, нм) шероховатостей клеточной мембраны эритроцита [Me (25%; 75%)].  
Periods (T, nm) and heights (h, nm) of RBC membrane corrugations [Me (25%; 75%)].**

Stage of experiment	RBC forms	T1	T2	T3	h1	h2	h3
Baseline	Discocytes	774.0	266.0	55.0	2.8	1.7	0.2
	<i>n</i> =7	(751.0; 840.0)	(257.0; 304)	(41.0; 74.0)	(2.0; 4.1)	(0.9; 2.2)	(0.1; 0.4)
	Stomatocytes	894.5 <sup>#</sup>	259.0	44.0	5.8	1.0	0.3
	<i>n</i> =6	(817.0; 964.0)	(236.0; 276)	(40.0; 52.0)	(1.8; 8.3)	(0.7; 2.2)	(0.1; 0.7)
2 hours after reinfusion, reference group	Discocytes	904.5 <sup>*</sup>	250.0	50.0	7.9	1.4	0.55
	<i>n</i> =4	(855.0; 989.0)	(228.0; 267.0)	(48.0; 52.0)	(4.8; 8.2)	(1.1; 2.6)	(0.15; 1.45)
	Stomatocytes	1011.5 <sup>##</sup>	256.0	50.5	8.2	1.6	0.25
	<i>n</i> =8	(966.5; 1043.0)	(250.0; 264.0)	(44.0; 63.5)	(6.8; 12.5)	(1.1; 2.0)	(0.2; 0.3)
2 hours after reinfusion, PF group	Discocytes	764.0 <sup>##</sup>	240.0 <sup>##</sup>	49.0	1.6	1.1	0.4
	<i>n</i> =5	(752.0; 782.0)	(235.0; 253.0)	(41.0; 49.0)	(1.4; 2.1)	(0.6; 2.0)	(0.4; 0.5)
	Stomatocytes	797.0 <sup>##</sup>	250.0	49.0	2.1 <sup>##</sup>	1.0 <sup>##</sup>	0.3
	<i>n</i> =7	(742.0; 836.0)	(235.0; 282.0)	(39.0; 62.0)	(1.4; 3.7)	(0.6; 1.5)	(0.2; 0.5)

**Note.** T1, T2, T3 – the periods of 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> orders, respectively; h1, h2, h3 – the heights of 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> orders, respectively; *n* – number of animals; \* – *P*<0.05 vs. the corresponding value at the baseline; ## – *P*<0.05 vs. the corresponding value in the reference group; # – *P*<0.05 vs. the value of T1 of discocytes in the same group.

**Примечание.** Stage of experiment – этап наблюдения; Baseline – исходное состояние; 2 hours after reinfusion, reference group – 2 часа после реинфузии, контрольная группа; PF group – группа с введением перфторана; RBC forms – форма эритроцитов; Discocytes – дискоциты; Stomatocytes – стоматоциты. T1, T2, T3 – периоды 1, 2 и 3 порядка соответственно; h1, h2, h3 – высоты 1, 2 и 3 порядка соответственно; *n* – число животных; \* – *p*<0,05 по сравнению с соответствующим показателем в исходном состоянии; ## – *p*<0,05 по сравнению с соответствующим показателем в контрольной группе; # – *p*<0,05 по сравнению с показателем T1 дискоцитов в той же группе.

стоянием; в) применение ПФ в раннем реперфузионном периоде оказывает воздействие на поверхность клеточной мембраны эритроцита, уменьшая значения T1 у дискоцитов и стоматоцитов как по сравнению с исходом, так и по сравнению с дискоцитами животных контрольной группы. При этом гиповолемия и последующая реперфузия приводят к увеличению процентного содержания стоматоцитов в крови.

Обращает на себя внимание то, что поверхность стоматоцитов в группе контроля и в группе с введением ПФ характеризовалась разнонаправленностью изменений T1 относительно исходного состояния (табл.). Эти результаты, а также отсутствие различий между дискоцитами и стоматоцитами по всем исследуемым параметрам в группе с введением ПФ, позволяют сделать заключение о том, что регистрируемые в настоящем исследовании показатели состояния поверхности клеточной мембраны эритроцита не связаны с изменением формы эритроцита: трансформацией дискоцита в стоматоцит.

С другой стороны, различия между дискоцитами и стоматоцитами в величинах периодов 1-го порядка, характеризующего состояние липидного бислоя, позволяет предположить, что при трансформации дискоцита в стоматоцит, воздействию на эритроцит гиповолемии и реперфузии происходят изменения в липидном бислое.

Можно полагать, что влияние ПФ на липидный бислой мембраны связан с усилением окисления NO [12, 13], в связи с чем уменьшается поступление NO в эритроцит [14, 15], и процесс перехода

decrease in the severity of anemia during PF administration [18].

Changes in the membrane lipid bilayer are likely to lead to an improvement in the ability of cell deformation; this fact has been supported by S.M. Radaev's study [19]. It studied the ability of RBC to pass through the cylindrical pores at a diameter comparable to the diameter of the capillary. This work demonstrated that PF improved the RBC filterability, despite the fact that the amount of stomatocytes in patients after trauma and blood loss significantly increased after PF administration. The literature data cited above lead to the assumption that changes in T1 values in discocytes and stomatocytes during PF administration found in this study are associated with changes in the membrane lipid bilayer, which increased the RBC deformability. PF prevents changes typical for hypoxic exposure and reperfusion.

## Conclusion

The study showed that at baseline discocytes and stomatocytes possess different structural characteristics of RBC membrane in the spatial period of 600–1200 nm in the form of a longer period of space oscillations in stomatocytes vs. discocytes. Hypovolemia followed by the reinfusion of autoblood affects this parameter increasing the period of space oscillations both in discocytes and stomatocytes vs. the baseline. PF administration immediately after autoblood reinfusion at a dose of 3 ml/kg body weight leads to a significant reduction in the period of RBC membrane space oscillations both in discocytes

$Fe^{2+}$  в  $Fe^{3+}$  [16, 17] Об этом свидетельствует снижение выраженности анемии при введении ПФ [18].

Изменение липидного бислоя мембраны, вероятно, ведет к улучшению способности эритроцитов к деформации, что находит подтверждение в работе Радаева С.М. [19] по исследованию способности клетки проходить через цилиндрические поры, диаметр которых сопоставим с диаметром капилляра. Так, в этой работе было показано, что ПФ улучшает фильтруемость эритроцитов, несмотря на то, что количество стоматоцитов у больных, перенесших травму и кровопотерю, при введении ПФ значительно увеличивалось. Приведенные выше данные литературы позволяют сделать предположение о том, что установленные в настоящей работе изменения T1 дискоцитов и стоматоцитов при воздействии ПФ связаны с изменением липидного бислоя клетки, что способствует увеличению ее деформируемости. ПФ предотвращает изменения, свойственные гипоксическому и реперфузионному воздействию.

### Заключение

Проведенное исследование показало, что дискоциты и стоматоциты в исходном состоянии имеют различные структурные характеристики клеточной мембраны эритроцита в пространственном диапазоне 600–1200 нм в виде большего периода колебаний у стоматоцитов по сравнению с дискоцитами. Гиповолемия и последующая реинфузия аутокрови оказывают воздействие на данный показатель, увеличивая период пространственных колебаний как у дискоцитов, так и у стоматоцитов по сравнению с исходным состоянием. Введение ПФ в дозе 3 мл/кг массы тела сразу после реинфузии аутокрови к 2 часам реперфузионного периода приводит к существенному умень-

and at stomatocytes. This effect was observed not only in comparison with the RBCs of animals who underwent hypovolemia and blood reinfusion without PF administration, but also in comparison with the values of this parameter at the baseline.

The results allowed to conclude that the value of the spatial period of oscillations in the range of 600–1200 nm reflecting the state of the lipid bilayer of RBC membrane was not associated with the transformation of discocyte into stomatocyte.

The literature data and findings of the present study led to the assumption that the reduction of the period of RBC membrane oscillations in the described space range was associated with a change in the lipid bilayer of the cell under the effect of PF, thus improving the deformability of the cells.

шению периода пространственных колебаний клеточной мембраны как у дискоцитов, так и у стоматоцитов не только по сравнению с эритроцитами животных, перенесших гиповолемию и реинфузию без введения ПФ, но и по сравнению с величинами этого показателя в исходном состоянии.

Совокупность результатов позволила сделать заключение о том, что величина пространственного периода в диапазоне 600–1200 нм, отражающего состояние липидного бислоя клеточной мембраны эритроцита, не связана с трансформацией дискоцита в стоматоцит.

Данные литературы и результаты настоящего исследования позволили сделать предположение о том, что уменьшение периода колебаний поверхности клеточной мембраны эритроцитов в данном пространственном диапазоне при воздействии ПФ сопряжены с изменением липидного бислоя клетки, что способствует улучшению деформируемости клеток.

### Литература

1. Мороз В.В., Новодержкина И.С., Антошина Е.М., Афанасьев А.В., Рыжков И.А., Заржецкий Ю.В. Коррекция пойкилоцитоза и биохимических показателей крови при острой кровопотере. *Общая реаниматология*. 2015; 11 (3): 6–15. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2015-3-6-15>
2. Сергунова В.А., Манченко Е.А., Гудкова О.Е. Гемоглобин: модификация, кристаллизация, полимеризация (обзор). *Общая реаниматология*. 2016; 12 (6): 49–63. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2016-6-49-63>
3. Лазаренко Д.Ю., Ханевич М.Д., Софронов Г.А., Андреева Н.Б., Поддубский Г.А. Влияние перфторана на микроциркуляцию и реологические свойства крови у больных с гастродуоденальными кровотечениями. В кн.: Перфторуглеродные соединения в медицине и биологии. Пушchino; 2002: 30–35.
4. Кузнецова И.Н., Волкова С.Д., Рыбакова Л.П., Юрченко В.С., Кочеткова Г.А. Эмульсии перфторуглеродов влияют на морфо-функциональное состояние клеток крови – эритроцитов и лейкоцитов *in vitro*. *Вестн. службы крови России*. 2009; 2: 23–26.
5. Терешина Е.В., Афонин Н.Н. Особенности взаимодействия частиц эмульсий перфторсоединений с липидами в процессе циркуляции в кровеносном русле. *Хим.-фарм. журн.* 1994; 28 (8): 12–15.
6. Bessis M. Atlas of red blood cell shapes. N.-Y.: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1974: 21–101.
7. Карташова Н.М., Кидалов В.Н., Наумова Э.М., Хадартцев А.А., Цоголев А.С. К вопросу о физиологической значимости изменений фор-

### References

1. Moroz V.V., Novoderzhkina I.S., Antoshina E.M., Afanasyev A.V., Ryzhkov I.A., Zarzhetsky Y.V. Correction of poikilocytosis and blood biochemical indicators in acute blood loss. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2015; 11 (3): 6–15. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2015-3-6-15>. [In Russ., In Engl.]
2. Sergunova V.A., Manchenko E.A., Gudkova O.Y. Hemoglobin: modification, crystallization, polymerization (review). *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2016; 12 (6): 49–63. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2016-6-49-63>. [In Russ., In Engl.]
3. Lazarenko D.Yu., Khanevich M.D., Sofronov G.A., Andreyeva N.B., Poddubsky G.A. Effects of perftoran on microcirculation and blood rheology in patients with gastroduodenal bleeding. In: Perfluorocarbon compounds in medicine and biology. Pushchino; 2002: 30–35. [In Russ.]
4. Kuznetsova I.N., Volkova S.D., Rybakova L.P., Yurchenko V.S., Kochetkova G.A. Emulsions of perfluorocarbons affect the morphological and functional state of blood cells – red blood cells and white blood cells *in vitro*. *Vestnik Sluzhby Krovi Rossii*. 2009; 2: 23–26. [In Russ.]
5. Tereshina E.V., Afonin N.N. Features of the interaction of particles with the lipids PFCs emulsion during circulation in the bloodstream. *Khimiko-Farmatsevtichesky Zhurnal*. 1994; 28 (8): 12–15. [In Russ.]
6. Bessis M. Atlas of red blood cell shapes. N.-Y.: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1974: 21–101.
7. Kartashova N.M., Kidalov V.N., Naumova E.M., Khadartsev A.A., Tsogolev A.S. On the question of the physiological significance of

- мы, ультраструктуры и флуоресценции эритроцитов периферической крови, трансформирующихся в стоматоциты. *Вестн. новых мед. технологий*. 2005; 12 (1): 8–11.
8. Kozlova E.K., Chernysh A.M., Moroz V.V., Kuzovlev A.N. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *Micron*. 2013; 44: 218–227. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2012.06.012>. PMID: 22854216
  9. Кононенко В.Л. Фликкер эритроцитов. 2. Результаты экспериментальных исследований. *Биол. мембраны*. 2009; 26 (6): 451–467.
  10. Мороз В.В., Черныш А.М., Козлова Е.К., Кирсанова А.К., Новодержкина И.С., Александрин В.В., Борщеговская П.Ю., Близинок У.А., Рысаева Р.М. Атомная силовая микроскопия структуры мембран эритроцитов при острой кровопотере и реинфузии. *Общая реаниматология*. 2009; 5 (5): 5–15. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2009-5-5>
  11. Takeuchi M., Miyamoto H., Sako Y., Komizu H., Kusumi A. Structure of the erythrocyte membrane skeleton as observed by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 1998; 74 (5): 2171–2183. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77926-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77926-3). PMID: 9591644
  12. Rafikova O., Sokolova E., Rafikov R., Nudler E. Control of plasma nitric oxide bioactivity by perfluorocarbons: physiological mechanisms and clinical implications. *Circulation*. 2004; 110 (23): 3573–3580. <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.0000148782.37563.F8>. PMID: 15557364
  13. Стародубцева М.Н. Термохимические свойства мембран эритроцитов при окислительном стрессе. *Журн. Гродненского ГМУ*. 2009; 2: 66–67.
  14. Pacher P., Beckman J.S., Zander J. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 2007; 87 (1): 315–424. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>. PMID: 17237348
  15. Kosaka H., Seiyama A. Physiological role of nitric oxide as an enhancer of oxygen transfer from erythrocytes to tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 218 (3): 749–752. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1996.0133>. PMID: 8579585
  16. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Sergunova V., Zavalova A., Kuzovlev A. Nanoparticles of perfluorocarbon emulsion contribute to the reduction of methemoglobin to oxyhemoglobin. *Int. J. Pharm.* 2016; 497 (1–2): 88–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.11.035>. PMID: 26626224
  17. Зинчук В.В. Газотранспортная функция крови и NO. *Журн. Гродненского ГМУ*. 2009; 2: 34–37.
  18. Мороз В.В., Новодержкина И.С., Антошина Е.М., Афанасьев А.В., Рыжков И.А., Заржецкий Ю.В. Коррекция пойкилоцитоза и биохимических показателей крови при острой кровопотере. *Общая реаниматология*. 2015; 11 (3): 6–15. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2015-3-6-15>
  19. Мороз В.В., Атауллаханов Ф.И., Радаев С.М., Остапченко Д.А., Лисовская И.Л., Розенберг Ю.М. Влияние перфторана на морфологию и реологические свойства эритроцитов у больных с тяжелой травмой и кровопотерей. *Анестезиология и реаниматология*. 2001; 6: 22–25. PMID: 11855054
- Поступила 20.01.17**
8. Kozlova E.K., Chernysh A.M., Moroz V.V., Kuzovlev A.N. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *Micron*. 2013; 44: 218–227. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2012.06.012>. PMID: 22854216
  9. Kononenko V.L. Flicker of erythrocytes. 2. Results of experimental studies. *Biochemistry (Moscow) Suppl. Series A: Membrane and Cell Biology*. 2009; 3 (4): 372–387. <http://dx.doi.org/10.1134/S1990747809040035>. [In Russ., In Engl.]
  10. Moroz V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Kirsanova A.K., Novoderzhkina I.S., Aleksandrin V.V., Borshchegovskaya P.Yu., Bliznyuk U.A., Rysaeva R.M. Atomic force microscopy of the structure of red blood cell membranes in acute blood loss and reinfusion. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2009; 5 (5): 5–15. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2009-5-5>. [In Russ., In Engl.]
  11. Takeuchi M., Miyamoto H., Sako Y., Komizu H., Kusumi A. Structure of the erythrocyte membrane skeleton as observed by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 1998; 74 (5): 2171–2183. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77926-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77926-3). PMID: 9591644
  12. Rafikova O., Sokolova E., Rafikov R., Nudler E. Control of plasma nitric oxide bioactivity by perfluorocarbons: physiological mechanisms and clinical implications. *Circulation*. 2004; 110 (23): 3573–3580. <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.0000148782.37563.F8>. PMID: 15557364
  13. Starodubtseva M.N. Temperature dependent mechanical properties of erythrocyte membranes in oxidative stress. *Zhurnal Grodnenskogo GМУ*. 2009; 2: 66–67. [In Russ.]
  14. Pacher P., Beckman J.S., Zander J. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 2007; 87 (1): 315–424. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>. PMID: 17237348
  15. Kosaka H., Seiyama A. Physiological role of nitric oxide as an enhancer of oxygen transfer from erythrocytes to tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 218 (3): 749–752. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1996.0133>. PMID: 8579585
  16. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Sergunova V., Zavalova A., Kuzovlev A. Nanoparticles of perfluorocarbon emulsion contribute to the reduction of methemoglobin to oxyhemoglobin. *Int. J. Pharm.* 2016; 497 (1–2): 88–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.11.035>. PMID: 26626224
  17. Zinchuk V.V. Blood oxygen transport and NO. *Zhurnal Grodnenskogo GМУ*. 2009; 2: 34–37. [In Russ.]
  18. Moroz V.V., Novoderzhkina I.S., Antoshina E.M., Afanasyev A.V., Ryzhkov I.A., Zarzhetsky Yu.V. Correction of poikilocytosis and blood biochemical indicators in acute blood loss. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2015; 11 (3): 6–15. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2015-3-6-15>. [In Russ., In Engl.]
  19. Morozov V.V., Ataulkhanov F.I., Radaev S.M., Ostapchenko D.A., Lisovskaia I.L., Rozenberg Iu.M. Effect of perfloran on morphology and rheologic properties of erythrocytes in patients with severe trauma and blood loss. *Anesteziologiya i Reanimatologiya*. 2001; 6: 22–25. PMID: 11855054. [In Russ.]

Received 20.01.17

**Диссертации на соискание ученой степени доктора наук без опубликования основных научных результатов в ведущих журналах и изданиях, перечень которых утвержден Высшей аттестационной комиссией, будут отклонены в связи с нарушением п. 10 Положения о порядке присуждения ученых степеней.**

Перечень журналов ВАК, издаваемых в Российской Федерации по специальности 14.01.20 «Анестезиология и реаниматология», в которых рекомендуется публикация основных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата медицинских наук:

- *Анестезиология и реаниматология*;
- *Общая реаниматология*.