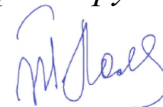


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Ломановская Татьяна Александровна

**Компьютерный морфоденситометрический анализ эритроцитов при
гипервитаминозе А**

03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент
Боронихина Татьяна Владимировна

Москва - 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Плазмолемма эритроцитов. Способность эритроцитов к деформации.....	10
1.1.1. Молекулярная организация и свойства плазмолеммы эритроцитов.....	10
1.1.2. Изменения плазмолеммы эритроцитов в зависимости от возраста клетки.....	19
1.1.3. Деформация эритроцитов.....	24
1.1.4. Факторы, определяющие деформируемость эритроцитов.....	27
1.2. Ретиноиды.....	31
1.2.1. Всасывание и метаболизм витамина А.....	31
1.2.2. Гипервитаминоз А и токсичность ретиноидов.....	32
1.2.3. Система крови при передозировке ретиноидов.....	35
1.3. Заключение.....	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	38
2.1. Экспериментальные животные.....	38
2.2. Модель гипервитаминоза А.....	38
2.3. Гистологические исследования.....	40
2.4. Подготовка мазков крови.....	40
2.5. Учет количества типичных и атипичных форм эритроцитов.....	40
2.6. Морфоденситометрия дискоцитов.....	41
2.7. Планирование объема выборок и статистический анализ результатов.....	43
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	47
3.1. Морфология эритроцитов интактных крыс Вистар.....	47
3.1.1. Стандартные морфоденситометрические параметры дискоцитов.....	47
3.1.2. Параметры профиля дискоцитов.....	49
3.1.3. Корреляционно-регрессионный анализ морфоденситометрических параметров дискоцитов	50
3.1.4. Субпопуляционный анализ дискоцитов	53
3.1.5. Распределение эритроцитов по форме.....	58
3.2. Морфология эритроцитов крыс, получавших масляную основу раствора ретинола пальмитата.....	59
3.2.1. Распределение эритроцитов по форме.....	59
3.2.2. Морфоденситометрические параметры дискоцитов.....	62
3.3. Экспериментальная модель гипервитаминоза А.....	62

3.4. Морфология эритроцитов крыс, получающих ретинола пальмитат.....	67
3.4.1. Распределение эритроцитов по форме.....	67
3.4.2. Стандартные морфоденситометрические параметры дискоцитов.....	69
3.4.3. Параметры профиля дискоцитов.....	71
3.5. Динамика морфологических изменений эритроцитов крыс, получавших ретинола пальмитат в дозе 0,64 мг/г	74
3.5.1. Масса тела и состояние животных, получавших ретинола пальмитат.....	74
3.5.2. Сопоставление морфологических изменений эритроцитов при введении ретинола пальмитата со степенью выраженности гипервитаминоза А.....	76
3.5.3. Информативность МДМ параметров эритроцитов при гипервитаминозе А...	82
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	84
4.1. Субпопуляции дискоцитов интактных крыс.....	84
4.2. Влияние масляной основы раствора ретинола пальмитата на эритроциты.....	87
4.3. Адекватность модели гипервитаминоза А.....	90
4.4. Характер и возможные причины изменений эритроцитов при введении избыточных доз ретинола пальмитата.....	93
4.5. Динамика и диагностическая значимость морфологических изменений эритроцитов при передозировке ретинола пальмитата.....	100
Заключение.....	102
Выводы.....	104
Список сокращений и условных обозначений.....	105
Список литературы.....	106

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Витамин А (ретинол), а также его естественные аналоги и синтетические производные, вместе именуемые как «ретиноиды» [73], влияют на пролиферацию, дифференцировку и естественную гибель клеток, участвуют в регуляции процессов гистогенеза и органогенеза, обеспечивают структурную целостность и оптимальное функционирование эпителиальных барьеров организма, задействованы в реализации иммунной защиты, играют важную роль в функционировании органа зрения и органов репродукции [обзоры: 37, 51, 73, 123]. Обладая широким спектром биологических свойств, ретинол и его аналоги применяются в клинической практике с целью коррекции нарушений, возникающих при авитаминозе А, используются в качестве канцеропротекторных и иммуномодулирующих средств, при лечении некоторых форм лейкозов и наиболее широко – в дерматологии [18, 33, 37, 41, 73, 114]. При кратковременном использовании в высоких дозах либо при длительном применении в низких дозах ретиноиды способны оказывать токсическое действие на организм, что является причиной развития гипервитаминоза А. Проявления острой и хронической токсичности ретиноидов у человека и животных изучены и описаны достаточно подробно [53, 54, 123, 250]. Вместе с тем показано, что ретинол в повышенных дозах может оказывать негативное воздействие на клетки и ткани организма до появления клинических признаков гипервитаминоза А [176, 203, 204]. В связи с этим актуальным является поиск методов прогноза развития данного состояния при лечении больных. Своевременная диагностика доклинической (субтоксической) стадии гипервитаминоза А востребована также при разработке и исследовании новых лекарственных веществ, создаваемых на основе ретиноидов.

Объектом воздействия многих физических и химических факторов являются мембранные структуры клеток. Обладая липофильными свойствами, биологически активные формы витамина А являются мембранотропными соединениями [37, 114]. При исследовании цитотоксичности мембранотропных ксенобиотиков в качестве модели часто используются эритроциты [126, 241]. В норме двояковогнутые эритроциты способны к обратимой деформации, что определяется состоянием цитоскелета и вязкоупругими свойствами их мембраны [65, 245]. Под влиянием внешних факторов эта способность, как правило, меняется, следствием чего могут быть изменение размера, формы и других характеристик эритроцитов [51, 101, 144, 244, 264].

Для объективной оценки реакции эритроцитов на внешние стимулы применяют анализ их морфоденситометрических параметров, совокупность которых позволяет получить интегральную характеристику морфологической и функциональной сохранности клеток [118, 132, 187]. Изучение характера и степени выраженности морфофункциональных изменений

эритроцитов, возникающих в ответ на введение в организм ретинола, является актуальной задачей, поскольку его результаты могут служить индикатором дозозависимой токсичности препарата и быть использованы в качестве прогностических критериев развития гипервитаминоза А.

Степень разработанности темы исследования. Из анализа литературы следует, что ретинол и его аналоги в высоких дозах вызывают гемоглобинемию и анемию в результате снижения осмотической резистентности эритроцитов и их гемолиза [178, 251]. Исследования морфологических изменений эритроцитов под действием ретиноидов немногочисленны. Показано, что при инкубации эритроцитов кролика [148] и человека [215] с ретинолом в течение 20 минут имеет место снижение электронной плотности цитоплазмы эритроцитов и ее вакуолизация, инвагинация плазмолеммы и стоматоцитарная трансформация клеток с последующим их набуханием и гемолизом. Трансформация дискоцитов в стоматоциты [49] либо эхиноциты [32] возникает также через сутки после однократного внутрибрюшинного введения крысам ретиноевой кислоты в высоких дозах. При продолжительном внутрибрюшинном введении мышам некоторых синтетических аналогов ретинола интенсивность окрашивания эритроцитов паральдегидфуксином постепенно снижается. Помимо ограниченного объема информации эти исследования не позволяют в полной мере судить о состоянии эритронов в условиях естественного поступления в организм витамина А через желудочно-кишечный тракт с последующим его метаболизированием в печени [111]. В цитируемых работах отсутствует морфометрический анализ эритроцитов с соответствующей статистической обработкой результатов, не проанализирована степень выраженности морфологических изменений эритроцитов в динамике развития гипервитаминоза А. В изученной литературе не обнаружено также сведений о возможном влиянии на эритроциты компонентов масляной основы, используемой для растворения ретинола или его эфиров. Эти знания необходимы для выбора адекватного контроля в экспериментах с передозировкой биологически активных форм витамина А.

Цель исследования – провести компьютерный морфоденситометрический анализ эритроцитов при экспериментальном гипервитаминозе А.

Задачи исследования:

1. Оценить состав эритронов периферической крови интактных крыс и сравнить морфоденситометрические (МДМ) параметры в субпопуляциях дискоцитов.
2. Обосновать наличие либо отсутствие морфологических изменений эритроцитов при потреблении крысами масляной основы (МО), используемой для приготовления раствора ретинола пальмитата (РП).
3. Подобрать дозу РП, позволяющую за относительно короткий период времени вызвать у

крыс состояние гипервитаминоза А.

4. Проанализировать характер морфологических изменений эритроцитов при использовании различных доз РП.

5. Изучить динамику изменений МДМ параметров эритроцитов при передозировке РП и оценить их диагностическую значимость для прогноза возникновения гипервитаминоза А.

Научная новизна работы. В результате проведенного исследования впервые:

- с помощью компьютерного МДМ анализа эритроцитов получены данные о характере и динамике их морфологических изменений в условиях гипервитаминоза А, смоделированного у крыс передозировкой РП; показано, что в этих условиях снижается оптическая плотность дискоцитов, меняются МДМ параметры их профиля, что сопровождается сдвигом соотношения истинных дискоцитов и дискосфероцитов в сторону последних и последующим увеличением числа атипичных форм эритроцитов;

- на основе сопоставления динамики развития гипервитаминоза А с динамикой морфологических изменений дискоцитов выявлены МДМ параметры их профиля, меняющиеся до появления признаков передозировки РП (Grad1, Grad2, Grad3, Cur2, Dy, L_er, Surface, Volume);

- дана сравнительная оценка информативности изменений МДМ параметров профиля дискоцитов крыс при использовании избыточных доз РП; установлено, что на доклинической стадии развития гипервитаминоза А прогностическими критериями могут служить увеличение Cur2, снижение Surface и Dy дискоцитов;

- изучен характер изменений эритроцитов при ежедневном введении крысам per os МО, используемой для приготовления растворов РП; установлено, что в этих условиях возрастает оптическая плотность цитоплазмы дискоцитов, а также увеличиваются их Surface и ее соотношение с Volume;

- предложен критерий разделения дискоцитов крыс на субпопуляции истинных дискоцитов и дискосфероцитов (величина Pallor/Area) и охарактеризованы различия МДМ параметров в этих субпопуляциях.

Научно-практическая значимость работы. Обоснована эффективность использования компьютерной морфоденситометрии для оценки неспецифических морфологических изменений эритроцитов при гипервитаминозе А. Показано, что на основе анализа морфоденситометрических параметров дискоцитов возможен прогноз возникновения и оценка степени тяжести гипервитаминоза А.

В качестве прогностических критериев передозировки РП предложен перечень информативных признаков морфологических изменений эритроцитов. Использование этих

критериев при проведении аналогичных экспериментальных исследований позволит ограничить число анализируемых морфоденситометрических параметров и сократить время объективной оценки состояния эритроцитов.

Охарактеризованы морфологические изменения эритроцитов крыс при введении per os смеси рапсового масла с антиоксидантами – бутилгидрокситолуолом и бутилгидроксианизолом. Тем самым обоснована необходимость использовать при изучении эффектов биологически активных форм витамина А в качестве группы сравнения животных, получающих МО, применяемую для растворения субстанции ретинола или его эфиров.

Выявлены различия морфоденситометрических параметров профиля в субпопуляциях дискоцитов интактных животных. Установлено, что соотношение истинные дискоциты/дискосфероциты в периферической крови меняется при передозировке РП. Предложено при оценке состояния эритрона в экспериментальных и клинических исследованиях учитывать в качестве критериев не только количество типичных и атипичных форм эритроцитов, но также оценивать объем и соотношение субпопуляций дискоцитов.

Методология исследования. Моделирование гипервитаминоза А осуществлялось путем перорального введения крысам самцам Вистар масляного раствора ретинола пальмитата. Группой сравнения были животные, получавшие масляную основу. В работе использован способ автоматизированного количественного анализа изображений [14, 187], позволяющий измерить комплекс геометрических и оптических параметров эритроцитов (дискоцитов) периферической крови и объективно оценить их морфофункциональное состояние. Применительно к цели и задачам настоящей работы подобная методика исследования эритроцитов использована впервые, что дало возможность количественно оценить ранние проявления и характер реакции эритроцитов на воздействие и использовать эти показатели для прогноза развития гипервитаминоза А.

Положения, выносимые на защиту:

1. У интактных крыс вариабельность геометрических и оптических параметров дискоцитов обусловлена неоднородностью их популяции, включающей субпопуляции истинных дискоцитов и дискосфероцитов. МДМ параметры дискоцитов двух субпопуляций имеют значимые различия.

2. Ежедневное потребление крысами МО (рапсовое масло с антиоксидантами БОТ и БОА) в объемах, сопоставимых с объемом раствора РП, используемого для достижения необходимой дозы, ведет к изменениям МДМ параметров дискоцитов, которые в совокупности указывают на возрастание газотранспортной и газообменной функций эритроцитов.

3. При передозировке РП МДМ параметры дискоцитов изменяются в зависимости от дозы и продолжительности использования препарата, при этом увеличивается объем субпопуляции

дискосфероцитов и нарастает число атипичных форм эритроцитов. Время возникновения признаков неспецифических морфологических изменений эритроцитов при передозировке РП неодинаково. Оценка информативности таких признаков позволяет отобрать наиболее диагностически значимые и использовать их для прогноза возникновения и динамики развития гипервитаминоза А.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов диссертационной работы подтверждается достаточным количеством наблюдений (число животных, число клеток), рассчитанным при планировании эксперимента, а также использованием методов исследования, которые соответствуют поставленным в работе целям и задачам. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, обоснованы фактическими данными, проанализированными с использованием адекватных методов статистического анализа и представленными в таблицах и рисунках.

Результаты диссертационного исследования были доложены и обсуждены на: X Конгрессе международной ассоциации морфологов, Ярославль, 2010 г. (доклад и стендовое сообщение); 8-й Всероссийской научной конференции «Бабухинские чтения в Орле», 2011г. (доклад); XI Конгрессе международной ассоциации морфологов, Самара, 2012 г. (стендовое сообщение); 9-й Всероссийской научной конференции «Бабухинские чтения в Орле», 2015 г. (стендовое сообщение); 10-й Международной научной конференции «Бабухинские чтения в Орле», 2017 г. (доклад); XIV Конгрессе международной ассоциации морфологов, Астрахань, 2018 г. (стендовое сообщение); VIII Российском съезде научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов, Воронеж, 2019 г. (доклад); XV Конгрессе международной ассоциации морфологов, Ханты-Мансийск, 2020 г. (стендовое сообщение); заседании научного отдела АО «Ретиноиды», научных конференциях кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии медицинского института ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургеньева» и используются в научно-практической работе АО «Ретиноиды».

Личный вклад автора в выполнение работы. Диссертантом лично выполнена экспериментальная часть исследования, в ходе которой была подобрана доза ретинола пальмитата, оптимальная для моделирования гипервитаминоза А, реализованы все этапы забора и подготовки материала для микроскопического анализа. Проведена морфоденситометрия эритроцитов в контрольных и экспериментальных группах животных, выполнена

статистическая обработка полученных данных, проанализированы и обобщены результаты исследования. Проведен анализ и отбор отечественной и мировой литературы по теме исследования. Подготовлены лично и в соавторстве публикации по материалам проведенного исследования.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Основные научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология, а именно областям исследования согласно пунктам 5 и 7.

Публикации. По результатам исследования автором опубликовано 16 печатных работ, в том числе 3 научных статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; из них 1 статья в изданиях, индексируемых в международных базах (Scopus), 3 иные публикации по результатам исследования, 10 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 132 страницах машинописного текста, содержит 24 таблицы, 41 рисунок и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 317 источников, в том числе 49 отечественных и 268 зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Плазмолемма эритроцитов. Способность эритроцитов к деформации

1.1.1. Молекулярная организация и свойства плазмолеммы эритроцитов

Плазмолемма эритроцитов обладает исключительной прочностью и высокими эластическими свойствами, что позволяет им поддерживать свою структурную целостность и переносить значительные деформации в течение четырехмесячного пребывания в кровотоке. Отсутствие у эритроцита ядра и органелл делает плазмолемму основной структурой, вовлеченной во все процессы жизнедеятельности клетки. Плазмолемма эритроцита служит барьером проницаемости с повышенной степенью избирательности, обеспечивая поддержание внутриклеточного гомеостаза в условиях существующих различий химического состава цитоплазмы клеток и плазмы крови. Плазмолемма является ключевой структурой газообмена, способствуя выполнению важнейшей функции эритроцитов – транспорту O_2 и CO_2 от легких к тканям и обратно. Структурные и функциональные связи эритроцитарной мембраны с гликолитическими ферментами делают ее активным участником энергетического обмена. Благодаря множеству рецепторов на своей поверхности, плазмолемма эритроцитов участвует в переносе различных веществ, попадающих в плазму крови: гормонов (инсулин, СТГ, кортикостероиды, катехоламины), ферментов (аспарагиназа, алкогольдегидрогеназа, альдегидде-гидрогеназа), регуляторных пептидов (эритропоэтины, интерлейкины), нуклеотидов, а также лекарственных средств (антибиотики, противоопухолевые препараты). Доставка эритроцитами фармакологических агентов к клеткам-мишеням снижает побочные эффекты и усиливает местное действие препаратов. [6, 60, 65, 72, 154, 197, 218, 220, 224, 271].

Плазмолемма эритроцита состоит из собственно мембранного слоя, подмембранного слоя, образованного белками цитоскелета, и надмембранного слоя – гликокаликса.

Мембранный слой плазмолеммы. Мембрана эритроцита содержит приблизительно одинаковое по массе количество липидов и белков [6]. Липидный бислой мембраны представлен фосфолипидами (фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол), гликолипидами (гликозилцерамид, галактозилцерамид, дигалактозилглюкозилцерамид), сфинголипидами (сфингомиелин) и стероидами (холестерин). Холестерин составляет 20–40% от веса всех липидов мембраны, а соотношение холестерин/фосфолипиды = 1,28 [137, 182]. Холестерин регулирует упаковку липидных молекул, увеличивает упругость и механическую прочность бислоя, контролирует активность мембраносвязанных ферментов, отвечает за текучесть бислоя, которая является важным

фактором обратимой деформации эритроцитов и способствует быстрой ликвидации дефекта мембраны при ее повреждении. Нарушения соотношения холестерина/фосфолипиды в мембране эритроцитов ведут к появлению морфологически аномальных форм клеток с укороченной продолжительностью жизни [6, 137, 182, 297].

Липидный бислой мембраны содержит участки более компактно упакованных молекул, называемые плотами или рафтами. В их составе определяются преимущественно сфинголипиды (сфингомиелин) и значительное количество холестерина (в 3-5 раз больше, чем в участках между ними), а также специфические белки флотиллины и стоматин, связанные с мембранными рецепторами. Рафты имеют размер 10-20 нм, могут сливаться, образуя платформы – больше 100 нм. Эти образования, свободно плавающие в бислое, рассматривают как функциональные кластеры, отвечающие за регуляцию сигнальных путей, проницаемость ионных каналов, клеточную адгезию, взаимодействие мембраны с цитоскелетом, везикуляцию плазмолеммы, деформируемость эритроцитов [109, 137, 195, 297].

Расположение липидов в мембране эритроцитов характеризуется асимметрией. Аминофосфолипиды, такие как фосфатидилсерин и фосфатидилэтанолламин, локализованы преимущественно во внутреннем монослое мембраны, тогда как холинофосфолипиды – фосфатидилхолин и сфингомиелин расположены в ее наружном монослое. Холестерин практически равно распределен между двумя слоями [65, 137, 193, 220]. Поддержание асимметричного расположения липидов в бислое контролируется ферментами (флиппаза, флопаза, скрамблаза), ответственными за перемещение липидов из одного слоя в другой. Флиппаза отвечает за липиды внутреннего слоя, она способна переносить их из наружного слоя против электрохимического градиента. Флопаза переносит липиды из внутреннего слоя во внешний. Скрамблаза способна перемещать липиды в обоих направлениях, но в физиологических условиях не функционирует. Активность этих ферментов модифицируется ионами Ca^{2+} . Регуляторами внутримембранного движения липидов являются также церамиды, образующиеся в результате отделения от сфингомиелинов ферментом кислой сфингомиелиназой. Ассиметрия липидного бислоя является необходимым условием поддержания механических свойств мембраны и формы эритроцитов, а также их способности к деформации [6, 75, 130, 137, 191, 192, 167, 220, 265].

Нарушение асимметрии эритроцитарной мембраны возникает при перемещении фосфатидилсерина из внутреннего монослоя в наружный липидный слой, что является следствием повышения внутриклеточной концентрации ионов Ca^{+2} , активизации скрамблазы и одновременной инактивации флиппазы [6, 75, 77, 306]. Повышение уровня церамидов при активации сфингомиелиназы также способствуют перемещению фосфатидилсерина на наружную поверхность плазмолеммы [192, 265]. Экспозиция фосфатидилсерина на наружной поверхности

плазмолеммы является триггером таких событий как агглютинация эритроцитов, их адгезия к эндотелию сосудов, гибель старых эритроцитов, эриптоз, а распознавание этой молекулы макрофагами работает как сигнал к элиминации патологически измененных клеток. Существенные нарушения ассиметричной локализации липидных молекул ведут к появлению пойкилоцитозных форм, а повышение уровня экспрессии фосфатидилсерина на мембране морфологически аномальных клеток является одним из факторов сокращения продолжительности их жизни [43, 65, 117, 130, 191, 296, 315].

Белки плазмолеммы эритроцитов многочисленны и разнообразны: известно около 20 основных и 850 минорных белков [60, 275] – трансмембранных и периферических, большую часть из которых составляют структурные белки (Рисунок 1).

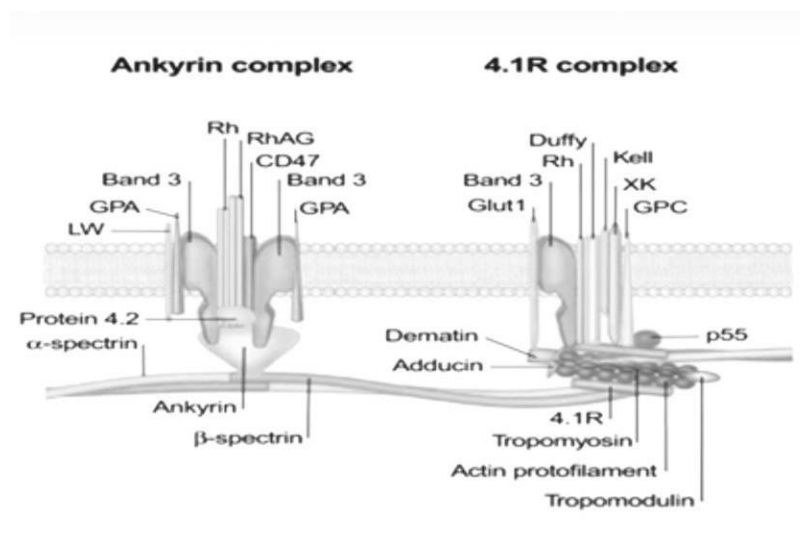


Рисунок 1 – Схема молекулярной организации эритроцитарной мембраны [220]. Пояснения приведены в тексте.

Протеины обеспечивают единство липидного бислоя и белков цитоскелета за счет создания макромолекулярных комплексов. Интегральные белки мембраны являются транспортными каналами и задействованы в обмене веществ между плазмой и внутренним содержимым эритроцита. [60, 180, 254, 275].

Главным интегральным белком эритроцитарной мембраны является белок полосы 3 (Band 3, SLC4A1, AE1). Он составляет от 25% [275] до 50% [68] массы всех белков мембраны эритроцита и представляет собой трансмембранный гликопротеин, полипептидная цепь которого 14 раз пересекает бислой липидов. В каждой клетке насчитывается 1,2 миллиона копий этого белка [267, 275]. Молекула белка полосы 3 имеет два домена.

С-домен является интегральным структурным мембранным белком, который одновременно функционирует как анионный канал, вовлеченный в обмен Cl^- и HCO_3^- . Обмен

этих анионов играет важнейшую роль в обмене и транспорте газов, прежде всего CO_2 [68, 267, 262].

N-домен является периферическим белком мембраны и служит для прикрепления цитоскелета, а также связывания гликолитических ферментов и диоксигемоглобина. Гликолитические ферменты образуют функциональный метаболический комплекс – метаболон. С N-доменом непосредственно соединяются 3 фермента (фосфофруктокиназа, альдолаза и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа), остальные энзимы комплекса (энолаза, лактат дегидрогеназа) не имеют прямых контактов с белком полосы 3. [189, 257, 263, 275]. N-домен белка полосы 3 образует множественные связи с другими протеинами плазмолеммы на ее цитоплазматической поверхности, где формируются комплексы для прикрепления цитоскелета эритроцита [60, 87, 91, 115, 254, 263, 275, 301]. Мутации белка полосы 3 приводят к нарушениям механических свойств мембран эритроцитов и к врожденному пойкилоцитозу (стоматоцитозу, сфероцитозу). Одновременно изменяются транспортные функции этого белка – из анионного переносчика он становится катионным каналом, через который происходит потеря клеткой положительно заряженных ионов [68, 90, 91, 93, 263, 308].

Гликофорин (GP) – трансмембранный белок, обнаруженный только в эритроцитах и составляющий 2% от массы их мембранных белков [62, 275]. Различают гликофорины А, В, С и D, из которых гликофорины С и D прочно связаны с цитоскелетом, а гликофорины А и В лишены такой связи, что позволяет им легко высвободиться из мембраны [62]. Гидрофобный α -спиральный участок молекулы гликофорина пронизывает липидный бислой, гидрофильный С-концевой участок погружен в цитоплазму, а гидрофильный N-концевой участок, составляющий большую часть молекулы, выступает на наружной поверхности мембраны (Рис 1.1.). К N-концевому участку присоединены отрицательно заряженные олигосахаридные цепи, формирующие гликокаликс эритроцита. При мутациях или дефиците гликофоринов С и D эритроциты приобретают аномальную форму [6, 62, 212, 239, 254, 275].

Rh-фактор экспонирован на мембране эритроцитов и образует комплексы с (белком полосы 3, анкирином, белком 4.2, спектрином, что делает его также ответственным за механические свойства плазмолеммы. Некоторые изоформы этого белка могут участвовать в газообмене или работать как транспортеры ионов аммония (NH_3^+ и NH_4^+) [92, 93, 139, 303].

В мембране эритроцитов обнаружен также структурный интегральный белок стоматин, отсутствие которого приводит к стоматоцитозу. Его место в сложных межмолекулярных комплексах плазмолеммы и функции остаются неизученными. Предполагается, по аналогии с таким же протеином в мембране нейроцитов, что стоматин может участвовать в регуляции ионного обмена [312].

В плазмолемме эритроцитов есть структурные протеины, которые стабилизируют

интегральные белки, соединяя их с молекулами фосфолипидов на наружной поверхности мембраны. Основным белком считается гликозилфосфатидилинозитол (GPI) [247]. Значительно больше известно о периферических белках, расположенных на цитоплазматической поверхности мембраны и обеспечивающих ее прикрепление к цитоскелету эритроцита. Среди них – анкирин, ключевой участник макромолекулярного комплекса, соединяющего β -субъединицы спектрина с N-доменом белка полосы 3. Мутации анкирина приводят к развитию врожденного сфероцитоза. Имеются сведения о возможном вовлечении этого белка в трансмембранный перенос ионов [69, 110]

Протеин 4.1 (4.1R) также работает, как транспортный ионный канал, но его главная функциональная задача состоит в организации макромолекулярного комплекса, соединяющего цитоскелет с белками мембраны – гликофорином C и белком полосы 3. Соединяясь со спектрином и актином, он способствует укреплению достаточно слабой связи этих белков. При взаимодействии с гликофорином C он может образовывать комплекс с белком p55, а при соединении тетрамеров спектрина с актиновыми филаментами – с тропомиозином. Мутации белка 4.1 или его отсутствие ведут к появлению эллиптоцитоза. [58, 69, 212, 239]. Белок 4.1 также участвует в прикреплении спектрина к фосфолипидам мембраны, хотя некоторые авторы не исключают и наличие прямых контактов. [275].

Существенную роль в поддержании стабильности мембраны эритроцита играет один из самых многочисленных ее белков – протеин 4.2. Считается, что он связывает белок полосы 3 с анкирином или с Rh-фактором. Следствием отсутствия этого протеина является развитие врожденного сфероцитоза [277].

Помимо структурных белков, в плазмолемме эритроцита обнаружены протеины, выполняющие преимущественно транспортные функции: аквапорин 1 – AQP1 (транспорт воды), GLUT1 (транспорт глюкозы и L-дегидроаскорбиновой кислоты), белок антигена Kidd (транспорт мочевины), белки PIEZO1 (транспорт Na^+), PMCA (транспорт Ca^{2+}), KCNN4, ABCB6 (транспорт K^+) и др. [55, 60, 72, 164, 167, 172, 197, 220, 224].

Известны адгезивные белки плазмолеммы (ламинин-связывающий белок, ICAM-4, CD 242) ответственные за взаимодействия эритроцитов с другими форменными элементами крови, с эндотелием сосудов, а также веществами межклеточного матрикса, например, гиалуроновой кислотой и фибриногеном [48, 113], а также рецепторные белки, обеспечивающие возможность переноса эритроцитами различных веществ с целью их доставки к клеткам-мишеням [48, 154, 218, 271]. Среди таких протеинов описаны рецепторы к белкам системы комплемента (CR1, CD35, CD55, CD59), что указывает на вовлечение эритроцитов в транспорт и удаление антигенов в случае развития аутоиммунных и инфекционных заболеваний [48, 269].

Подмембранный слой плазмолеммы. Подмембранный слой плазмолеммы содержит протеины, образующие цитоскелет эритроцитов, к которым, прежде всего, относятся спектрин и актин, а также ассоциированные с ними белки (тропомиозин, тропомодулин, аддуцин, дематин, протеины p55, 4.1R, 4.2, анкирин и др. [275].

Основным скелетообразующим белком является спектрин, составляющий около 30% от массы всех мембранных белков эритроцита [6]. Молекула спектрина представляет собой тетрамер – длинную фибриллу, состоящую из двух перекрученными цепей – димеров. Каждая цепь образована α - и β - субъединицами спектрина, ориентированными в противоположных направлениях. Каждая молекула имеет «головной» домен, ответственный за димер-тетрамер организацию и за контакт с анкирином, и «хвостовой» домен, присоединяющийся к протеину 4.1, протеину 4.2, к протофиламентам актина и к другим белкам. Изолированные α - и β - субъединицы образуют друг с другом электростатические связи в зоне нуклеации, расположенной ближе к «хвостовому» домену, после чего закручиваются друг относительно друга. В димере α -цепь длиннее и образует складки, которые придают эластичность молекуле спектрина, цитоскелету и плазмолемме в целом. Взаимодействия цепей за пределами зоны нуклеации достаточно слабые, что позволяет им скользить относительно друг друга, когда молекула спектрина изгибается или вытягивается при деформации мембраны. Гетеродимеры самопроизвольно агрегируются в тетрамеры, но слабые химические связи между цепями позволяют тетрамерам диссоциировать и вновь организовываться, что также способствует деформации клетки [6, 65, 232, 234]. При наследственных аномалиях спектрина или при его недостаточном содержании эритроциты принимают сферическую (сфероциты), реже эллиптическую (овалоциты) форму, что сопровождается развитием гемолитических анемий [6, 83, 122, 185, 248].

Актин эритроцитов принадлежит к немышечному типу (β - актин) и существует в виде коротких, двойных, спиралевидных протофиламентов. Они располагаются параллельно плоскости мембраны и ориентированы в разных направлениях. В каждой клетке содержится от 30000 до 40000 протофиламентов, в каждой актиновой нити насчитывается по одним данным от 6 до 8 мономеров [275, 65] по другим – 12-14 мономеров [234].

Тропомиозин эритроцитов представляет собой длинный γ -димер, состоящий из α - и γ -изоформ. Один димер тропомиозина соединяется с каждой из двух нитей актинового протофиламента, таким образом, что покрывает 7 актиновых мономеров. Соединение этих двух белков опосредуется ионами магния. Плазмолемма эритроцита, лишенная тропомиозина, становится хрупкой и нестабильной [60, 275].

Белок тропомодулин 1 участвует в прикреплении актинового протофиламента к спектрину. Его молекула образует комплексы одновременно с актином и тропомиозином.

Отсутствие тропомодулина 1 приводит к появлению актиновых протофиламентов различной длины и образованию дефектов в цитоскелете. При этом, как считают компенсаторно, в цитоплазме появляется тропомодулин 3, в норме отсутствующий в зрелых клетках [60, 275].

Аддуцин – сложный мультифункциональный протеин, содержащий α -, β - или γ субъединицы. Преобладающей формой является $\alpha\beta$ -гетеродимер. В каждом эритроците насчитывается 30000 димеров этого протеина. Каждая субъединица аддуцина имеет глобулярный «головной» и вытянутый гибкий «хвостовой» домены. Аддуцин участвует в прикреплении цитоскелета к мембране эритроцита, взаимодействуя с белком полосы 3 и транспортером глюкозы 1, а также укрепляет соединение спектрина и актина. [275].

Дематин также укрепляет спектрин-актиновые связи и является посредником между актиновыми протофиламентами и мембраной, взаимодействуя с транспортером глюкозы 1 [275].

Белок p55 (мембранный пальмитированный протеин 1 – MPP1) участвует в прикреплении цитоскелета к мембране, соединяясь одним доменом с белком 4.1R, а другим доменом с гликофорином C. Предполагается, что пальмитирование этого белка и его последующее взаимодействие с флотиллинами являются ключевыми событиями образования мембранных плотов (рафтов), что позволяет рассматривать его в качестве организатора рафтов в мембране эритроцитов. Обнаружены контакты MPP1 с липидами бислоя, преимущественно с холестеринном [297].

Вышеперечисленные белки образуют цитоскелет эритроцита, который представляет собой гибкую сетевидную структуру толщиной от 40 до 90 нм, подстилающую цитоплазматическую поверхность мембраны и прикрепленную к ней с помощью сложных макромолекулярных комплексов. Морфологической единицей скелета является структура псевдогексогональной формы, в центре которой находится короткий протофиламент актина (образованный актином, тропомиозином и тропомодулином 1), от которого радиально расходятся 6 молекул спектрина. В каждой клетке таких структур насчитывается около 33000, они соединяются друг с другом с помощью периферических участков спектрина. Соединения актина и спектрина, формирующие горизонтальными связи цитоскелета, достаточно слабые, в их усилении участвуют аддуцин, протеины 4.1 и 4.2, дематин, тропомодулин 1, тропомиозин [65, 234, 275].

Прикрепление цитоскелета эритроцита к его мембране (вертикальные связи цитоскелета) осуществляется с помощью макромолекулярных комплексов двух видов [60, 65, 70, 220, 234, 275]. Первый из них, анкириновый комплекс, в котором белок анкирин прикрепляет β -субъединицу спектрина к N-домену белка полосы 3 (вертикальная связь). В формировании анкиринового комплекса также участвуют гликофорин А или В, протеин 4.2, Rh фактор, антигены группы крови. Во втором комплексе белок 4.1 связывает β -субъединицу спектрина с

гликофорином С и белком полосы 3 (вертикальная связь). Есть мнение [275], что в этом комплексе актиновые протофиламенты или актин-связывающие концы спектрина прикрепляются непосредственно к белку полосы 3, что позволяет называть комплекс «актиновым» хотя большинство исследователей признает посредническую роль протеина 4.1. В формировании второго макромолекулярного комплекса участвуют также белок p55, транспортер глюкозы¹, гликофорины С и D, аддуцин, дематин, стоматин, кальдодулин и другие белки. Ключевыми молекулами комплексов, образующими вертикальные связи, являются анкирин и проеин 4.1, которые оба взаимодействуют с N-доменом белка полосы 3 и взаимно подавляют прикрепление конкурента [275]. В составе обоих комплексов определяют также гликолитические ферменты, формирующие метаболон [58, 60, 65, 110, 168, 180, 220, 234, 275,].

Цитоскелет эритроцита может быть связан с рафтами липидного бислоя через белок p55, который взаимодействует с маркерными белками пласта – флотиллином 1 и флотиллином 2. [297]. Допускается также возможность прикрепления цитоскелета напрямую к фосфолипидам мембраны [57, 65].

Цитоскелет эритроцита является полифункциональным образованием, играющим одну из ключевых ролей в жизнедеятельности клетки. Он поддерживает структурную стабильность плазмолеммы и двояковогнутую дисковидную форму эритроцита. Мутации, повреждающие вертикальные и горизонтальные взаимодействия белков в макромолекулярных комплексах, проявляются врожденным пойкилоцитозом. По мнению одних авторов, нарушения связей между актиновыми протофиламентами и спектрином приводят к врожденному сфероцитозу, а нарушения связей между белками цитоскелета и мембраны – к врожденному эллиптоцитозу [60]. Согласно иной точке зрения, нарушения в горизонтальных связях проявляются эллиптоцитозом, а в вертикальных связях – сфероцитозом [198]. Утверждается также, что дефекты в контактах между спектрином и анкирином могут приводить к сфероцитозу и к эллиптоцитозу [168], а врожденный сфероцитоз может быть результатом патологии как вертикальных, так и горизонтальных межбелковых взаимодействий в цитоскелете [138]. Поскольку подавляющее большинство структурных протеинов выполняет также транспортные функции, патологические деформации эритроцитов всегда сопровождаются изменениями проницаемости ионных каналов, потерей воды, уменьшением объема клеток и их преждевременной гибелью [59, 83, 90, 122, 185].

Цитоскелет обеспечивает возможность обратимой деформации клеток, необходимой при прохождении эритроцитов через узкие капилляры или поры венозных синусов красной пульпы селезенки. Высокую пластичность цитоскелета связывают с особенностями строения спектрина, а именно складчатостью α -цепи, слабыми взаимодействиями в молекуле димера, способностью тетрамеров к диссоциации и реорганизации [65, 232, 234]. Все это позволяет

спектрину при деформации эритроцита распрямляться и вытягиваться в одних участках, а в других скручиваться сильнее, благодаря чему происходит изменение формы эритроцита без изменения площади его поверхности. Допускается также возможность краткосрочного ослабления связи цитоскелета с мембраной, вплоть до его локального отделения. Отсоединение и обратное прикрепление спектрина к мембране регулируется фосфорилированием и дефосфорилированием белка 4.1. Известно, что сепарация цитоскелета является энергозависимым процессом и более характерна для периферических участков мембраны тора [34, 76, 128, 189, 243, 288, 317].

Цитоскелет участвует в регуляции проницаемости мембраны эритроцитов для газов (O_2 , CO_2 и NO), интенсивность транспорта которых зависит от размера пор между белками цитоскелета. Укрепление белковых связей «подтягивает» скелет к мембране, что уменьшает поры и снижает процесс диффузии. Модулятором описанных изменений может быть связанный с мембраной гемоглобин [189, 198].

Состояние цитоскелета и в целом плазмолеммы эритроцитов регулируется активностью ряда протеинкиназ, отвечающих за степень фосфорилирования белков [48, 212]. В наибольшей степени фосфорилированы белок полосы 3, белок 4.1, спектрин, анкирин, аддуцин. Увеличение уровня фосфорилирования белков цитоскелета в большинстве случаев приводит к уменьшению сродства между их молекулами. Зависимость межмолекулярных взаимодействий белков цитоскелета от уровня фосфорилирования их молекул указывает на возможность регуляции стабильности мембран эритроцитов и их способности к деформации посредством влияния на протеинкиназные системы, активность которых модулируется ионами кальция, кальмодулином, а также связанным с мембраной гемоглобином [48, 128, 189, 198, 275, 288].

Помимо цитоскелета эритроцита, который прикрепляется к его мембране, обнаружен эндоскелет, расположенный в цитоплазме клетки и состоящий из коротких актиновых филаментов и нейрофиламентов. Эндоскелет имеет наружный слой, где актиновые филаменты ориентированы перпендикулярно мембране и соединяются с цитоскелетом, и внутренний слой, в котором актиновые филаменты расположены хаотично. Нейрофиламенты обнаруживаются преимущественно в области восходящей части тора, где они локализуются параллельно мембране [150, 234, 294].

Эритроциты содержат также тубулины, не образующие типичных микротрубочек. Выделяют три фракции этих белков: связанные с мембраной, соединенные со спектрином и свободно лежащие в цитозоле. Тубулины всех трех фракций образуют множественные связи с другими белками, а также с ферментами, что предполагает их вовлеченность в трансмембранный перенос, сигналинг и метаболизм эритроцитов. Показано, что увеличение мембраносвязанных тубулинов снижает деформируемость эритроцитов и может вызвать

повышение давления и даже закупорку мелких сосудов [56, 223, 233, 234]. Контакты актиновых филаментов эндоскелета и тубулинов с мембраносвязанным скелетом позволяют рассматривать их как компоненты единой функциональной системы эритроцита.

Надмембранный слой плазмолеммы. Надмембранный слой плазмолеммы, гликокаликс, представлен олигосахаридами, ковалентно присоединенными к белкам (гликопротеины) и в меньшей степени к липидам (гликолипиды) мембраны эритроцита. Масса углеводов составляет от 2 до 10% всей массы мембраны [6]. Подавляющую часть углеводов клеточной поверхности несут на себе молекулы гликофоринов, каждая из которых связана с 16 олигосахаридными цепями, в сумме содержащими около 100 моносахаридных остатков [62], среди которых с помощью лектинов выявлены манноза, глюкоза, N-ацетил-D-глюкозамин, сиаловая кислота [6, 62].

Молекулы гликокаликса определяют антигенные свойства эритроцитов (антигены Rh, агглютиногены групп крови), играют важную роль в межклеточных взаимодействиях эритроцитов, а также служат рецепторами для транспорта различных веществ: инсулина, СТГ, ацетилхолина, катехоламинов, простагландинов, иммуноглобулинов (Fc-рецепторы) и белков системы комплемента (C-рецепторы). Гликокаликс эритроцитов способен адсорбировать и переносить аминокислоты, холестерин, глюкозу, витамины С и группы В, а также ряд вирусов, бактерий и токсических веществ [6, 48]. Олигосахаридами придают мембране высокий отрицательный заряд, благодаря которому эритроциты в кровотоке отталкиваются друг от друга. Гликофорины ответственны примерно за 60% отрицательного заряда на поверхности эритроцитов, благодаря наличию в углеводных цепях большого количества остатков сиаловой кислоты. Потеря заряда плазмолеммой эритроцитов приводит к агглютинации эритроцитов с образованием «монетных столбиков» или сладжей. [6, 254]. Возрастное уменьшение количества сиаловой кислоты вносит свой вклад в большую склонность к тромбообразованию у пожилых и старых людей [149, 175, 268].

1.1.2. Изменения плазмолеммы эритроцитов в зависимости от возраста клетки

Строение и химический состав плазмолеммы эритроцитов претерпевает значительные изменения в течение жизни клетки [7]. В процессе гемопоэза, начиная со стадии проэритробласта, происходит последовательное накопление трансмембранных и цитоскелетных белков, причем первыми начинают синтезироваться молекулы спектрина (сначала α -, а затем β -субъединицы), актина и аддуцина. Синтез белка полосы 3 начинается со стадии полихроматофильных и оксифильных эритробластов, в последних образуются анкирин и белок 4.1, после чего становится возможной фиксация спектрин-актиновой сети к

цитоплазматической поверхности мембраны. Экспрессия гликофорина на клетках эритроидного ряда происходит на поздних стадиях эритропоэза. Интенсивное накопление ферментов гликолиза (фосфофруктокиназы и пируваткиназы) начинается у эритробластов и характеризуется чередованием экспрессии нескольких изоферментов на различных стадиях их дифференцировки. Одновременно содержание адгезивных молекул в плазмолемме последовательно снижается [48, 60, 100, 106, 234].

Ретикулоциты образуются в процессе энуклеации, которая происходит в эритробластических островках красного костного мозга. Созревание ретикулоцитов происходит в течение примерно 72 часов, две трети этого времени - в костном мозге, и одна треть - в кровотоке. Процесс созревания включает избавление клетки от остатков органелл, от большого количества тубулинов, от цитоплазматических ферментов, участвующих в синтезе гемоглобина. Не менее важным является обширное ремоделирование плазматической мембраны ювенильной формы эритроцитов с прогрессирующей потерей «избыточных» мембранных липидов и белков. Более 650 различных белков удаляются на поздних стадиях созревания ретикулоцитов [141], среди которых рецептор трансферрина (TfR), поскольку железо для синтеза гема больше не требуется; рецепторы адгезии, такие как β 1-интегрин, присутствие которых могло бы вызвать адгезию циркулирующих эритроцитов к эндотелию сосудов; тропомодулин 3, играющий важнейшую роль в энуклеации и во взаимодействии эритроидных клеток с макрофагами-няньками; водный транспортер аквапорин-1, удаление которого позволяет клетке адаптироваться к иным, чем в красном костном мозге осмотическим условиям. Одновременно содержание в мембране ретикулоцитов белка полосы 3 и спектрина увеличивается [60, 80, 141, 275]. В результате происходит окончательное формирование молекулярной архитектоники мембраны, уменьшаются объем клетки и площадь ее поверхности, стандартизируются соотношения площадь/объем, уплощается и становится истинно дисковидной форма клеток, повышается индекс деформируемости [80, 81, 234, 238].

Освобождение ретикулоцитов от балластных для будущего функционирования веществ происходит путем образования и отделения от плазмолеммы большого количества везикул [80, 81, 234, 238]. Описаны механизмы везикуляции ретикулоцитов, именуемые биогенезом экзосом [81]. Первый из них интралюминальный представляет собой образование везикул на внутренней поверхности мембраны, что позволяет удалять цитоплазматические белки и мембраносвязанные ферменты. Второй механизм, биогенез везикул непосредственно в мембране, служит для удаления излишних интегральных белков и липидов из бислоя. Полагают, что этот процесс происходит на базе липидных плотов (рафтов), так как отделившиеся везикулы содержат характерные для плотов белки – флотиллины и стоматин. Третий механизм,

формирование везикул на наружной поверхности плазмолеммы, позволяет избавляться от гликолипидов и гликопротеинов, а, следовательно, от избыточных рецепторных и адгезивных молекул. Считается, что триггером везикуляции выступает локальное нарушение асимметрии липидного бислоя, а именно экспозиция фосфатидилсерина на наружной поверхности плазмолеммы. Описаны также белковые комплексы, регулирующие сортировку веществ и ответственные за образование и отделения везикул от мембраны [81].

В течение 120 дней жизни эритроцита в его плазмолемме постепенно накапливаются химические изменения, затрагивающие ее липидный, белковый и углеводный компоненты, такие как увеличение экспозиции фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина на наружной поверхности мембраны, уменьшение содержания холестерина в бислое, изменения соотношения мембранных белков, снижение количества сиаловых кислот в углеводных цепях гликокаликса, модификация активности трансмембранных переносчиков и ферментных систем. [61, 63, 68, 87, 106, 134, 193, 207, 242]. Возрастные изменения в работе транспортных белков плазмолеммы эритроцитов приводят к нарушениям водно-электролитного гомеостаза и повышению вязкости цитоплазмы. Так, снижается активность натриевого насоса, что приводит к изменению ионной композиции цитоплазмы (увеличение концентрации Na^+ и снижение K^+), к дегидратации клетки, уменьшению ее объема, сморщиванию и потере деформируемости [139, 196, 197]. С возрастом снижается работа транспортера, удаляющего кальций из клетки [182]. Существенно возрастающий интрацитоплазматический уровень Ca^{2+} ингибирует натриевый насос, стимулирует ферменты, ответственные за нарушение асимметрии липидного бислоя и экспозицию фосфатидилсерина на наружной поверхности, а также энзимы, ответственные за протеолиз спектринов и реорганизацию цитоскелета [6, 12, 45, 106, 134, 196]. В стареющих эритроцитах снижается транспорт анионов через белок полосы 3, активность K^+/Cl^- -котранспорта, транспорт глюкозы (в 2,5 раза) и ее концентрация в цитоплазме эритроцита, вследствие чего уменьшаются содержание АТФ и энергетические возможности клетки [65, 134, 197].

Основными факторами, повреждающими структуру эритроцитов и нарушающими их жизнедеятельность, считаются активные формы кислорода (АФК), воздействию которых эритроциты постоянно подвергаются при четырехмесячном функционировании в кровотоке. Экзогенные АФК выделяются в плазму нейтрофилами, макрофагами, эндотелиальными клетками и могут быть захвачены эритроцитами. Эндогенные АФК (супероксид, перекись водорода) непрерывно образуются в результате медленного самоокисления гемоглобина и превращения его в метгемоглобин, преимущественно связанный с мембраной через белок полосы 3. Собственно окислению подвергается ион железа, который в гемоглобине существует в состоянии Fe^{2+} , а в метгемоглобине – в состоянии Fe^{3+} [221, 229, 230]. Чтобы свести к

минимуму эффект АФК и возникающий в результате окислительный стресс, эритроциты имеют мощную антиоксидантную систему, включающую ферменты, в том числе гликолитические, (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа и др.) и неферментативные низкомолекулярные вещества (глутатион, аскорбиновая кислота). Цитозольная локализация этой системы ограничивает ее эффективность относительно образовавшихся в мембране АФК, которые вызывают перекисное окисление липидов и патологическую деформацию белков плазмолеммы, снижая ее эластические свойства. Накапливающийся метгемоглобин, а также его производные гемихромы не обладают сродством к кислороду, вследствие чего редуцируется транспортная способность эритроцитов. Кроме того, эти вещества вызывают антигенную трансформацию белка полосы 3, что инициирует процесс элиминации стареющих эритроцитов макрофагами. Окислительные реакции активирует каспазу 3, способную частично разрушать белок полосы 3, способствуют перемещению фосфатидилсерина на внешнюю поверхность мембраны, ингибируют транспортный канал, ответственный за ограничение внутриклеточной концентрации кальция. Следствием окислительного стресса являются нарушения водно-электролитного баланса стареющих эритроцитов; уменьшение их объема, площади поверхности и ее отношения к объему; увеличение концентрации гемоглобина и вязкости цитоплазмы; разрушение цитоскелета и его связей с плазмолеммой; снижение деформируемости мембраны; увеличение числа антигенов к иммуноглобулинам, белкам системы комплимента и макрофагам. Кроме того, было показано, что АФК эритроцитов могут повреждать другие клетки, с которыми эритроциты контактируют, например, эндотелий [61, 63, 68, 87, 88, 134, 142, 207, 221, 230, 242]. В течение жизненного цикла эритроциты подвергаются хроническому воздействию глюкозы, которое вызывает гликирование (гликозилирование) их белков, прежде всего гемоглобина. Неферментативное гликирование обусловлено способностью глюкозы связываться с аминокетильными группами белков, изменяя их структурные и функциональные свойства. Скорость образования необратимых конечных продуктов гликозилирования зависит от уровня и длительности экспозиции глюкозы. У здоровых людей реакция протекает медленно, количество гликированных белков незначительно, но в случае хронической гипергликемии высокий уровень именно этих веществ приводит к развитию диабета и его осложнений. Гликированные молекулы подвержены активному окислению с образованием свободных радикалов, что усугубляет развитие окислительного стресса, особенно разрушительного у больных с диабетом. Помимо гемоглобина, глюкоза образует комплексы с мембранными белками эритроцитов. Показано, что у больных сахарным диабетом гликирование белков-транспортёров ионов Ca^{+2} , K^{+} и Na^{+} подавляет их активность, изменяя водно-электролитный баланс в эритроцитах со всеми вытекающими последствиями [137].

Возрастные биохимические перестройки плазмолеммы эритроцита сопровождаются ее везикуляцией, приводящей к уменьшению объема клетки (на 25%) и площади ее поверхности (на 17%) [106, 147]. Образование мембранных пузырьков особенно активно идет при депонировании крови, например, в селезенке. Ключевая роль в процессе везикуляции отводится антигенной модификации белка полосы 3, которая инициируется метгемоглобином и гемихромами, а также повышению экспозиции фосфатидилсерина на наружной поверхности плазмолеммы [64, 65, 87, 106]. При везикуляции метгемоглобин, связанный с белком полосы 3, ослабляет его якорные свойства, что приводит к локальному отделению цитоскелета от липидного бислоя в области расположения рафтов [195, 317]. В составе этих пузырьков находили гемоглобин и мембранные белки, включая белок полосы 3 и гликофорин, но никогда – белки цитоскелета: спектрин, белок 4.1 и анкирин. Цитоскелетные белки, содержание которых уменьшается параллельно со снижением площади мембраны, удаляются из клетки путем разложения на фрагменты с помощью убиквитин-протеасомных энзимов [106]. Предполагается, что везикуляция позволяет клеткам избавляться от дефектных белков и ферментов апоптоза, избегая гибели и продлевая свою жизнь в кровотоке. [8, 12, 65, 87, 106, 307, 317]. Описано усиление везикуляции эритроцитов при врожденных пойкилоцитозах (талассемия, серповидноклеточная анемия, врожденные сфероцитоз, эхиноцитоз, стоматоцитоз и др.), что позволяет эритроцитам с укороченным сроком жизни пролонгировать свое существование и функционирование [162, 307].

Эритроциты завершают функционирование в красной пульпе селезенки и частично в печени. В норме у человека за 1 секунду разрушается 5 млн эритроцитов, за сутки — более 360 млрд [48]. Механизм гибели, часто называемый в литературе «внутриклеточным гемолизом», представляется следующим образом. В старых эритроцитах метгемоглобин и гемихромы, прикрепляясь к цитоплазматическому домену белка полосы 3, вызывают кластеризацию и антигенную трансформацию этого протеина. Модифицированный белок полосы 3 распознается иммуноглобулинами (IgG) и белками системы комплимента, что ведет к опсонизации эритроцита и его дальнейшей элиминации макрофагами. Кроме того, возросшая экспозиция фосфатидилсерина на наружной поверхности мембраны старых эритроцитов также стимулирует фагоцитарную активность макрофагов. [48, 61, 63, 68, 87, 134, 207, 242].

Физиологический эритродиерез на 10–20% обеспечивается также внутрисосудистым гемолизом, то есть гибелью эритроцитов в кровотоке, что характерно для физически поврежденных клеток или инвазированных паразитами. Внутрисосудистый гемолиз характерен для патологически деформированных эритроцитов, вследствие чего врожденные пойкилоцитозы всегда сопровождаются гемолитическими анемиями. При гемолизе нарушается проницаемость плазмолеммы, приводящая к возрастанию цитоплазматической воды,

увеличению объема клетки вплоть до критического (146% от первоначального значения), ее разрушению и выходу гемоглобина в плазму [7, 48, 137, 192, 265].

Часть эритроцитов погибает в кровотоке путем эриптоза. Морфологически эриптоз проявляется везикуляцией плазмолеммы и сморщиванием клетки. Образующиеся везикулы, по сути апоптозные тельца, крупнее тех, что наблюдаются при старении эритроцитов [12]. Триггерами эриптоза считают образование простагландина E и/или активацию каспаз, хотя в эритроцитах отсутствует ключевой фермент апоптоза – каспаза 9, а обнаружены только каспазы 3 и 8 [48, 74]. Оба события ведут к изменению проницаемости ионных каналов для кальция и внутриклеточному повышению его концентрации в цитоплазме клетки. Это, в свою очередь, изменяет трансмембранный перенос ионов калия и хлора, приводящий к обезвоживанию, сморщиванию эритроцита и пузырению его мембраны. Внутриклеточная гиперкальцемия активизирует скрамблазу, которая увеличивает экспозицию фосфатидилсерина на поверхности плазмолеммы, нарушая асимметрию липидного бислоя. Фосфатидилсерин распознается макрофагами, уничтожающими апоптозные тельца. Цитозольное повышение уровня кальция стимулирует различные протеазные системы, разрушающие мембранные и скелетные белки эритроцита. Одновременно повышается активность кислой сфингомиелиназы, отделяющей церамиды от сфингомиелинов. Церамиды усиливают чувствительность калиевых каналов к ионам кальция, способствуя сморщиванию клетки, а также участвуют в перемещении фосфатидилсерина в наружный слой плазмолеммы. В инициации эриптоза участвует также метгемоглобин, который, увеличивая фосфорилирование белка полосы 3, нарушает его связь с цитоскелетом и способствует везикуляции мембраны [8, 12, 74, 78, 89, 90, 130, 189, 191, 192, 265].

Биологическое значение эриптоза заключается в том, что он позволяет вывести из кровотока поврежденные эритроциты, препятствуя гемолизу и его последствиям, прежде всего повреждению почек [137, 192, 265].

1.1.3. Деформация эритроцитов

Деформация эритроцитов – способность изменять форму в ответ на внешний стресс, которому клетки подвергаются при прохождении через узкие капилляры и через поры венозных синусов селезенки. Деформация может включать изменение кривизны, деформацию вокруг одной оси, расширение площади.

Различают физиологическую и патологическую деформацию эритроцитов. Физиологическая деформация обратима и носит адаптивный характер, способствуя увеличению транспортной активности эритроцитов и повышению снабжения тканей кислородом.

Патологическая деформация необратима, снижает транспортную активность эритроцитов, их способность к физиологической деформируемости и, как следствие, уровень тканевого дыхания. Причинами обратимой и необратимой трансформации эритроцитов могут быть как модификации внутриклеточного обмена, так и воздействие внешних факторов (физико-химических, иммунологических, токсических и др.) [6, 9, 129, 182, 243, 260, 287].

Физиологическая деформация. Основной субпопуляцией эритроцитов в крови здорового человека являются дискоциты (85-97%) [6, 9, 287]. Иную, отличную от дисковидной, форму могут иметь 3–15% эритроцитов периферической крови. Они представлены эхиноцитами и стоматоцитами, которые могут превращаться в дискоциты и наоборот. Трансформация стоматоциты–дискоциты–эхиноциты (СДЭ-трансформация) предотвращает гемолиз эритроцитов при колебаниях химического состава плазмы крови (осмомолярность, кислотно-щелочной баланс, концентрация анионных и катионных амфифилов), имеющих место в физиологических условиях [76, 182, 292, 314]. Другие пойкилоцитозные формы эритроцитов встречаются преимущественно при патологии [202, 287, 292, 314].

Дискоциты являются исключительно эластичными клеточными элементами и в кровеносном русле постоянно изменяют свою конфигурацию, приспособляясь к размерам сосуда или трансформируясь под действием текущей плазмы. При этом объем эритроцита и площадь его поверхности остаются неизменными [6, 65, 76]. Перемещаясь в кровотоке, эритроциты находятся в постоянном вращательном движении вокруг своей оси [48]. Одновременно отмечается ротация плазмолеммы относительно внутриэритроцитарного содержимого – «феномен гусеница танка» [249, 309]. Существенные изменения формы происходят при прохождении эритроцитов через капилляры, диаметр которых меньше размеров статистического эритроцита. При этом эритроциты выстраиваются вдоль оси капилляра, вращение прекращается, ротация сохраняется и возрастает деформация типа растяжения – контур сечения эритроцитарного диска в сагиттальной плоскости увеличивается более чем в два раза, а в горизонтальной и вертикальной плоскостях во столько же раз уменьшается [121]. Известно, что мембрана эритроцита сопротивляется трем видам деформации: растяжение-сжатие с изменением площади мембраны, деформации сдвига при постоянной площади и деформации изгиба [6].

Способностью к физиологической деформации эритроциты обязаны высокой текучести липидного бислоя мембраны, эластическим свойствам белков цитоскелета, прежде всего, спектрина, возможностям изменения силы связи между белками в макромолекулярных комплексах, а также процессам, контролирующим водно-электролитный гомеостаз цитоплазмы и поддерживающим объем клетки [128, 162, 189, 243, 288, 317]. При физиологической деформации повышается внутриклеточная концентрация кальция, активирующая протеазы,

которые могут усиливать фосфорилирование белков мембраны и цитоскелета, уменьшая их сродство друг к другу и делая плазмолемму более податливой. Кроме того, ферменты способны кратковременно разрушать мембранные белки и связи между ними, примером чему является гиперфосфорилирование белка 4.1, ослабляющее его связи со спектрином и белком полосы 3 и приводящее к локальному отделению цитоскелета от эритроцитарной мембраны. Вышеописанные процессы являются энергозависимыми, что объясняет повышение содержания АТФ в эритроцитах при физиологической деформации [6, 34, 45, 243].

Способность к деформации обеспечивает выход молодых эритроцитов из красного костного мозга в кровоток, а также является одним из лимитирующих факторов продолжительности жизни эритроцитов. Пластичные клетки способны достаточно легко проходить через поры венозных синусов селезенки, тогда как старые и ригидные эритроциты задерживаются в красной пульпе, где подвергаются деструкции [65, 234, 260].

Изменение формы эритроцитов улучшает вязкостно-эластические свойства плазмолеммы, активирует трансмембранный перенос газов, повышает гидродинамическое перемешивание цитоплазмы эритроцита, благоприятствует внутриэритроцитарному транспорту кислорода, в результате чего достигается высокий коэффициент переноса кислорода при относительно низком коэффициенте диффузии [113]. Физиологическая деформация эритроцитов является важным фактором поддержания необходимой перфузии в микроциркуляторном русле, особенно при низких градиентах артериального давления, а ухудшение этого свойства обуславливает развитие застойных явлений и возникновение тканевой гипоксии [133]. Кроме того, деформационные свойства эритроцитов влияют на реологические свойства крови и гемодинамику, поскольку степень ригидности эритроцитов определяет вязкость крови и, следовательно, уровень кровяного давления [182].

Способность эритроцитов деформироваться в кровеносном русле присуща лишь безъядерным клеткам млекопитающих и с точки зрения эволюции является ароморфозом, позволяющим значительно увеличить плотность капиллярного русла, площадь активной диффузии и интенсивность метаболических процессов в тканях [275].

Патологическая деформация. Патологическая деформация эритроцитов является результатом токсического действия различных веществ, находящихся в плазме крови (повышение уровня холестерина, глюкозы, экзогенных АФК, нарушение осмолярности), либо дисфункции (недостаток или мутации) гемоглобина, белков мембраны и цитоскелета, а также изменениями липидного состава мембраны, снижением содержания АТФ, повышением внутриклеточной концентрации ионов кальция. Аномальность формы эритроцита приводит к нестабильности мембраны, нарушению ее проницаемости, изменению водно-электролитного состава цитоплазмы, снижению способности клеток к деформируемости, укорочению времени

их жизни, гемолизу и развитию гемолитических анемий. При патологической деформации эритроцитов наблюдается усиление процесса везикуляции мембраны, что, как полагают, позволяет пролонгировать их существование в кровотоке [163, 307]. Пойкилоцитозы нередко сопровождаются изменениями размеров эритроцитов (макро- и микроцитоз), ростом дисперсии размеров (анизоцитоз), колебаниями содержания гемоглобина (гипер- и гипохромия), а также изменениями его внутриклеточного распределения (анизохромия) [6, 9, 17, 38, 60, 138, 162, 209, 287].

1.1.4. Факторы, определяющие деформируемость эритроцитов

Способность эритроцитов к деформации является довольно лабильным свойством, которое зависит как от морфофункциональных характеристик самой клетки (форма, размер, реология мембраны, цитоскелет, гомеостаз цитоплазмы), так и от химического состава плазмы (осмотическая концентрация, кислотно-щелочной баланс, гипергликемия, гиперхолестеринемия) и состояния организма в целом (температура, возраст, наличие заболеваний).

Основным фактором, определяющим способность эритроцита к деформации, является его геометрия. Большинство эритроцитов имеют форму двояковогнутых дисков (дискоциты) с диаметром 7,5–8,7 мкм (нормоциты). Около четверти популяции составляют микроциты (с диаметром меньше 7,5 мкм) и макроциты (9–12 мкм в диаметре). Толщина эритроцитов колеблется от 1,7–2,5 мкм в сухом до 1,5–1,7 мкм во влажном препарате мкм³ [17]. Тор, наружная часть эритроцитарного диска, имеет толщину 2,6 мкм, а пэллор, его внутренняя часть, – 0,8 мкм [67]. Диаметр пэллора может составлять от 35% до 55% от общего диаметра клетки. Считается, что клетки с большими размерами обладают более высокой деформируемостью [88]. Площадь поверхности дискоцитов составляет 128–160 мкм², а объем – 76–96 мкм³ [17]. Эти параметры наделяют эритроциты специфическим отношением площади поверхности к объему клетки (1,5–1,9), которое делает их высоко эластичными и деформируемыми [6, 34, 182]. Любые изменения, влияющие на объем и избыточную площадь поверхности дискоцитов сказываются на их способности к деформации. Так, процесс везикуляции мембраны приводит к снижению эластических свойств стареющих эритроцитов [219, 304]. Все пойкилоциты характеризуются ригидностью вследствие снижающегося отношения площадь поверхности/объем, минимальные значения которого характерны для сфероцитов, практически лишенных деформационных возможностей. [162, 182].

Ключевое значение для способности эритроцитов изменять свою форму имеют

реологические свойства их плазмолеммы (вязкость, упругость), которые определяются состоянием липидного и белкового компонентов мембраны, а также их связей с цитоскелетом [162, 182]. Липидный бислой эритроцитарной мембраны определяет ее вязкость, текучесть и жесткость при изгибе. Эти качества напрямую зависят от количества присутствующего в мембране холестерина. Показано, что повышение соотношения холестерин/фосфолипиды снижает текучесть мембраны и ее способность к деформации, а дальнейшее увеличение количества холестерина способно трансформировать клетку в сфероцит [6, 162, 182, 297]. Важнейшим условием для поддержания формы эритроцитов и их способности деформироваться является асимметрия липидного бислоя, существенные нарушения которой приводят к появлению атипичных форм с повышенной ригидностью плазмолеммы [6, 65, 75, 167, 265].

Согласно «bilayer-couple» модели [282], варианты трансформации дискоцита зависят от состояния наружного либо внутреннего листка билипидного слоя мембраны, что в последующем было неоднократно подтверждено [165, 202, 220, 287, 291, 292]. Молекулы амфифильных веществ, к которым относятся, в частности, ретинол и его производные, имеют полярные (гидрофильные) и неполярные (гидрофобные) участки и способны избирательно связываться с липидами наружного (кренаторы) либо внутреннего (капформеры) листков билипидного слоя мембраны. Это ведет к асимметричному расширению или сжатию площади соответствующей поверхности бислоя. Кренаторы содержат, как правило, анионные группы и индуцируют увеличение внешней поверхности бислоя относительно его внутренней поверхности с образованием на мембране шиповидных выростов, в результате чего дискоциты трансформируются в эхиноциты-сфероциты. Капформеры, имеющие реакционноспособные катионные группы, способствуют увеличению внутренней поверхности мембраны, которая при этом инвагинирует, подвергается везикуляции и, в результате, дискоциты становятся стоматоцитами-сфероцитами [291, 292].

Деформабельные свойства эритроцитов зависят от состояния протеинов мембраны, белков цитоскелета и их связей друг с другом. Дефицит или мутации белка полосы 3 [68, 90, 91, 93, 263, 308], гликофоринов C и D [6, 212, 239, 254, 275], анкирина [70, 110], белка 4.1 [58, 69, 212, 239], белка 4.2 [277], спектрина [6, 83, 122, 185, 248], а также нарушения вертикальных и горизонтальных связей в макромолекулярных комплексах [60, 138, 168, 198] являются причиной врожденных сфероцитоза, стоматоцитоза, эллиптоцитоза. Свой вклад в деформируемость эритроцитов вносят также цитоплазматические белки, например, тубулины, увеличение количества которых снижает реологические свойства клеток [56, 223, 233, 234].

Способность эритроцита к изменению своей формы находится в обратной зависимости от вязкости его цитоплазмы, которая определяется, в основном, присутствием гемоглобина. Если

содержание гемоглобина колеблется в пределах физиологической нормы (130–160 г/л), его влияние на вязкость незначительно, однако, начиная с концентрации 370 г/л и более, показатели вязкости возрастают экспоненциально, что негативно сказывается на деформируемости клеток [6, 317]. Повышение концентрации гемоглобина имеет место при старении эритроцитов, в гипертонических растворах, при врожденном (сфероцитозе [6, 182, 317, 283]). Внутриэритроцитарная вязкость зависит также от вида гемоглобина, примером чего является HbS при серповидноклеточной анемии. Для восстановленной формы этого гемоглобина характерно снижение растворимости, ведущее к образованию геля высокой вязкости, что сочетается с деградацией гема, нестабильностью гемоглобина и его склонностью к агрегации. Подобные изменения характерны также для других патологических форм гемоглобина, что вносит свой вклад в развитие пойкилоцитоза со снижением деформируемости эритроцитов при различных формах гемоглобинопатий [6, 162, 209, 221, 229, 230, 296, 304]. При сахарном диабете увеличение гликозилированного гемоглобина, связанного с мембранной через глюкозу, повышает резистентность клеток и служит причиной диабетических ангиопатий [52, 182].

Важнейшим фактором деформируемости эритроцитов является внутриклеточный водно-солевой баланс. Главными гомеостатическими элементами этой системы выступают ионы натрия и калия, градиент концентрации которых поддерживает объем клетки и ее форму. Мутации гена белка PIEZO1, ответственного за экспорт натрия, являются причиной развития врожденного дегидратирующего стоматоцитоза с гемолитической анемией [55, 162]. При снижении активности натриевого насоса (старение клеток, сахарный диабет) концентрация Na^+ в цитоплазме возрастает, а концентрация K^+ снижается, следствием чего является дегидратация клетки, уменьшение ее объема, сморщивание мембраны и потеря деформируемости [52, 162, 196, 197]. Основным супрессором натриевого транспортера и триггером вышеописанных событий является повышение концентрации Ca^{2+} , которое не только изменяет ионный гомеостаз, но и активирует различные ферментные системы эритроцита. К ним относятся энзимы, нарушающие асимметрию липидного бислоя, а также протеазы, ответственные за разрушение связей между белками мембраны и цитоскелета [6, 12, 45, 52, 106, 134, 182, 196, 197]. Возрастание уровня цитозольного кальция может способствовать трансформации дискоцитов в эхиноцит [6].

Для поддержания нормальных физико-химических свойств мембраны необходима АТФ. Уменьшение ее содержания в эритроцитах, например, при их старении, отражается на вязкоэластических свойствах плазмолеммы и снижает деформируемость. Недостаток АТФ может приводить к трансформации дискоцитов в пойкилоцитарные формы, характеризующиеся высокой ригидностью плазмолеммы. В качестве причин подобных нарушений рассматриваются

подавление АТФ-зависимых систем фосфорилирования белков мембраны и цитоскелета, изменения характера их взаимодействия, а также снижение активного транспорта ионов и изменения внутриклеточного водно-электролитного баланса [6, 34, 65, 134, 162, 182, 197].

Способность эритроцитов изменять свою форму существенно зависит от их возраста. При старении клетки происходит накопление АФК и усиление окислительных реакций в мембране, вследствие чего нарушается водно-электролитный баланс, изменяется геометрия клетки, увеличивается концентрация гемоглобина и вязкости цитоплазмы, разрушаются белки цитоскелета и его связи с плазмолеммой, что значительно снижает деформируемость последней. Сходные изменения эритроцитов наблюдаются при консервировании крови [61, 63, 68, 87, 88, 134, 182, 207, 221, 230, 242].

На способность эритроцитов к деформации существенное влияние оказывают физико-химические характеристики плазмы крови – осмолярность и кислотно-щелочной баланс. Изменение этих показателей вызывает повышение ригидности клеток и пойкилоцитоз. В гипоосмолярных средах усиливается деформация дискоцитов в стоматоциты, реже в сфероциты, а в гиперосмолярных средах – в эхиноциты [76, 182, 287, 292]. Повышение кислотности плазмы способствует образованию стоматоцитов, а защелачивание среды – эхиноцитов [17, 76, 182, 287, 292, 314].

Деформируемость эритроцитов снижается при уменьшении концентрации в плазме оксида азота [182], при гипергликемии [52, 283, 66] и гиперхолестеринемии [6, 66, 133]. Продемонстрирована зависимость деформационной способности эритроцитов от температурного режима [182].

Реологические свойства эритроцитов изменяются в течении жизни. У фетальных эритроцитов способность к деформации гораздо выше, чем у клеток материнского организма, что диктуется необходимостью эффективной доставки кислорода в ткани плода. У новорожденных высокое содержания гемоглобина в клетках, большое количество пойкилицитарных форм (стоматоциты, сфероциты, эхиноциты) сочетаются с меньшей эластичностью и ригидностью эритроцитарной мембраны [143]. В пожилом и старческом возрастных периодах способность эритроцитов к обратимой деформации ухудшается. Это сопровождается снижением активности системы антиоксидантной защиты, изменением состава липидного, белкового компонентов и реологических свойств мембран, недостатком АТФ, увеличением количества атипичных форм эритроцитов [6, 16, 23, 149, 175, 268].

1.2. Ретиноиды

Ретиноиды представляют собой естественные или искусственные аналоги витамина А. Термин витамин А применим к ретинолу, ретинальальдегиду и ретиноевой кислоте [205].

1.2.1. Всасывание и метаболизм витамина А

Витамин А – жирорастворимый витамин встречается в природе в виде ретинола и его эфиров и содержится в продуктах животного происхождения, а также в виде провитамина β-каротина в продуктах растительного происхождения. В кишечнике всасывается 70–90% содержащегося в пище ретинола, менее эффективно всасывается β-каротин – только 20–50% [123, 125, 205].

Витамин А из животной и растительной пищи поступает из желудка в 12-перстую кишку в составе жировых глобул. В присутствии желчи компоненты глобул обрабатываются панкреатическими ферментами, при этом гидролазы расщепляют эфиры ретинола и свободный ретинол всасывается кишечным эпителием. В цитоплазме энтероцитов ретинол вновь этерифицируется, комбинируясь с жирными кислотами, преимущественно с пальмитиновой кислотой (ретинола-пальмитат), и включается в хиломикроны, которые транспортируются в лимфу и с нею попадают в кровоток [125]. Имеются сведения о возможности дополнительного всасывания неэтерифицированного ретинола в портальную кровь [156].

В кровотоке хиломикроны постепенно разрушаются и эфиры ретинола, захватываются паренхиматозными клетками печени. В цитоплазме гепатоцитов эфиры вновь гидролизуются до ретинола, который, в зависимости от потребностей организма, либо запасается, либо выделяется в кровь и транспортируется к тканям [125]. Транспорт осуществляется при участии синтезируемого гепатоцитами ретинол-связывающего белка (РСБ) [205]. Витамин А, ретинол, циркулирует в крови, связанный с ретинол-связывающим белком (РСБ), который в крови связан с другим белком плазмы, транстретином. В некоторых тканях РСБ распознается рецептором плазматической мембраны, который стимулируется ретиноевой кислотой 6 или белком STRA6. Это трансмембранный клеточный рецептор для РСБ который выполняет двойную роль: он опосредует транспорту ретинола в клетки и действует как рецептор цитокинов. [214]

Метаболизм витамина А в клетках-мишенях включает этерификацию и депонирование, превращение в активные метаболиты (ретинол системы цитохрома P450, ретиналь зрительного пигмента, ретиноевая кислота), образование ковалентных связей с клеточными белками, а также катаболизм в формы, подлежащие выведению из организма [205].

Из 80% абсорбированного в тонкой кишке ретинола, приблизительно 20%–50%

конъюгируется или окисляется, после чего выводится из организма в течение недели, остальная часть поглощенного витамина А депонируется в организме [157]. Около 80% – 90% витамина А депонируется в печени, остальное – в почках и надпочечниках. В печени ретинол запасается преимущественно липоцитами (клетки Ито, звездчатые клетки, перисинусоидальные клетки) [53, 250, 279]. Плазмолемма этих клеток имеет рецепторы к РСБ, благодаря которым комплекс ретинола и РСБ поглощается эндоцитозом и накапливается в липидных каплях цитоплазмы, при этом возможна этерификация ретинола. Считается, что запасающая способность липоцитов меньше на периферии и в центре классической дольки, а наибольшая – в ее середине [279].

Запаса витамина А в организме хватает на несколько недель или месяцев, что, несмотря на ежедневные колебания в его потреблении, гарантирует устойчивый уровень витамина в плазме крови [205, 250]. При этом концентрация ретинола в плазме не коррелирует с его содержанием в печени, так как находится под гомеостатическим контролем, включающим не только способность депонирующих клеток регулировать мобилизацию ретинола, но и образование печенью и другими органами дериватов ретинола, главным образом его эфиров. Содержание эфиров ретинола в плазме может значительно возрастать после приема ретиноидов или пищи богатой витамином А [250].

1.2.2. Гипервитаминоз А и токсичность ретиноидов

Широкие биологические свойства ретиноидов обеспечивают их успешное клиническое применение в качестве терапевтических препаратов, особенно при лечении дерматологических заболеваний, таких как нейродермит, экзема, ихтиоз, атопический дерматит, себорейный дерматит и др. [41, 42]. Однако проблемой фармакологического использования препаратов витамина А остается появление признаков его токсического действия при передозировке (гипервитаминоза А), приводящего в тяжелых формах к циррозу печени [105].

Важнейшими патогенетическими факторами в развитии побочных эффектов ретиноидной терапии является неспособность организма человека и животных эффективно выводить избыток витамина А, а также нарастающий при этом дефицит РСБ. Показано, что при избытке поступления ретинола концентрация РСБ в крови и в печени падает в результате снижения его синтеза и секреции гепатоцитами. Свободный ретинол при этом усиленно этерифицируется, что приводит к повышению уровня эфиров ретинола в плазме крови. При снижении уровня РСБ эфиры ретинола связываются с неспецифическими транспортерами – липопротеинами плазмы, доставляются к мембранам клеток, взаимодействуют с ними и вызывают разрушение их структуры. Именно эти соединения считаются токсическими метаболитами, ответственными за развитие признаков гипервитаминоза А [251].

Уровень сывороточного витамина А может увеличиться, если относительно небольшое количество витамина А поступает в организм в течение длительного периода, и может быть низким, если большое количество витамина А поступает в течение очень короткого периода. Подобная закономерность объясняется тем, что на ранних стадиях интоксикации большая часть витамина А резервируется в печени, но как только «накопительный ресурс» печени исчерпан, содержание витамина А в плазме крови резко и быстро увеличивается [205, 250].

Симптомы гипервитаминоза А у крыс и мышей (выпадение волос, кахексия, паралич задних конечностей) впервые описал в 1925 году К. Takahashi с соавторами (цит. по 270). Проведенные в последующие годы многочисленные исследования дополнили и конкретизировали внешние признаки данного состояния у животных и человека, а также уточнили характер изменений внутренних органов и систем, возникающих при избыточном поступлении в организм ретинола [53, 103, 123, 125, 250, 251, 293].

Различают субтоксичность (гипервитаминоз до появления клинических симптомов), острую и хроническую токсичность [250]. Острая токсичность в основном возникает от употребления больших доз витамина А за короткий период времени [181]. Признаки острой токсичности у людей включают снижение веса, тошноту, рвоту, диарею, анорексию, увеличение внутричерепного давления, головную боль, раздражительность, атаксию, головокружение, снижение остроты зрения, шелушение кожи, потерю волос, шелушение и растрескивание губ, параличи конечностей.

Для развития хронической токсичности в основном требуются недели и месяцы с потреблением больших доз витамина А [228]. Описаны признаки хронической токсичности у взрослых людей, получавших витамин А в дозе 1000000 МЕ в течение 14 и 25 дней или 25000–50000 МЕ в день в течении 6 месяцев [157]. Особенно уязвимы дети и беременные женщины, у которых картина гипервитаминоза наблюдалась при приеме меньших доз и/или в более короткий промежуток времени. Имеются сведения о развитии интоксикации у ребенка первого года жизни, получавшего витамин А в дозе 62000 МЕ в день в течение 80 дней [251].

В случае развития хронической токсичности в дополнение к выше описанным симптомам присоединяется увеличение селезенки и печени, ригидность мышц, слабость и боли в мышцах, полиартралгия, множественные кровоизлияния на коже и во внутренних органах [53, 103, 157, 251]. У людей и экспериментальных животных наблюдались множественные симптомы повреждения костей: резорбция костной ткани, остеопороз, подавление образования костного матрикса, замедление роста костей и раннее закрытие эпифизарных пластинок, укорочение и искривление конечностей, возникновение спонтанных переломов [79, 179, 272]. Все вышеописанное сопровождалось повышением уровня кальция в крови. Предполагается, что эти повреждения являются результатом прямого действия витамина А на костную ткань, так как

известно его регулирующее влияние на дифференцировку и функциональную активность остеобластов и остеокластов. Вместе с тем, не исключается опосредованный эффект длительного применения ретиноидов, поскольку имеются сведения о нарушении метаболизма кальций-регулирующих гормонов при хроническом гипервитаминозе А [240].

Для хронической токсичности характерно усугубление неврологической симптоматики: поражения афферентных нервов с нарушениями чувствительности, судороги, эпилептические припадки, параличи и парезы конечностей [105]. Возникновение патологии со стороны нервной системы связывают с нарушениями проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), поскольку известно, что витамин А легко проходит ГЭБ и проникает в мозг, где регулирует активность множества ферментов, а также экспрессию генов в нервных и глиальных клетках.

В биоптатах печени экспериментальных животных и у больных с хроническим гипервитаминозом А выявляются лимфоцитарные инфильтраты, портальный и перисинусоидальный фиброз, признаки развития цирроза печени [97, 108]. Развитие фиброза связывают с пролиферацией и гипертрофией липоцитов, количество которых так велико, что они мигрируют из перисинусоидальных пространств в портальные области долек печени [131]. В гепатоцитах обнаруживают увеличение липидных капель, повышение активности ферментов, участвующих в этерификации ретинола и экскреции его эфиров, снижение активности ферментов, участвующих в метаболизме белков и реакциях детоксикации. Показано, что гипервитаминоз А активизирует клетки Купффера и стимулирует их к выработке множества медиаторов воспаления, которые, в свою очередь, усугубляют повреждения гепатоцитов. Электронномикроскопически обнаружены также повреждения печеночных синусоидов (разбухание эндотелиоцитов, осветление их цитоплазмы, увеличение количества пор, расширение перисинусоидальных пространств), свидетельствующие о нарушениях гистогематического барьера, которые рассматриваются авторами как важнейший патогенетический фактор поражения печени при гипервитаминозе А. Значительные повреждения функционального состояния печени подтверждаются данными биохимического состава крови, где зарегистрировано возрастание уровней свободных жирных кислот, липидов, триглицеридов, холестерина, а также ферментов: щелочной фосфатазы, аспартаттрансаминазы, аланинаминотрансферазы, глутамилтрансферазы и др. [157, 298].

Имеются данные о повреждении гистоструктуры других внутренних органов: сетчатки глаза, сердца, легких, надпочечников, щитовидной железы, панкреатических островков, семенников, а также почек вплоть до появления гематурии и протеинурии. Диета с высоким содержанием витамина А особенно опасно для беременных женщин, так как может вызвать нарушения течения беременности и родов, а также нарушение развития многих органов и систем плода – нервной системы, скелета, выделительной, репродуктивной, дыхательной и

пищеварительной систем [123]. Мощный тератогенный эффект гипервитаминоза А связывают с практически свободным транспортом ретиноидов через гемато-плацентарный барьер.

Выраженность симптомов острой и хронической токсичности имеет дозозависимый эффект. Применение высоких доз витамина А может привести к летальному исходу, что наблюдалось в ряде исследований на животных [157]. Случаев смерти человека от гипервитаминоза А в литературе не имеется. Токсическое действие витамина А обратимо, так как он не активирует апоптоз и не наносит непоправимых повреждений длительно живущим непролиферирующим клеткам [251]. При отмене содержащих ретинол препаратов симптомы токсичности исчезают в течение недели, а полное выздоровление наступает через нескольких недель или месяцев [53, 251].

1.2.3. Система крови при передозировке ретиноидов

Большинство авторов, изучавших проявления гипервитаминоза А, отмечали развитие у животных и человека анемии и гемоглобинемии, падение СОЭ, снижение осмотической резистентности и гемолиз эритроцитов [18, 178, 251]. Работ, авторы которых прицельно изучали действие ретиноидов на морфологию эритроцитов, в литературе немного.

Первые из таких исследований выполнены в экспериментах *in vitro*, в которых инкубировали эритроциты кролика [148] или человека [227] с добавлением в культуральную среду различных форм витамина А. Для наблюдений использовали светооптическую и электронную микроскопию. В обеих работах получены сходные результаты: описано появление складок и вакуолей мембраны эритроцитов, изменение их формы с дисковидной на сфероцитарную, гемолиз и лизис клеток. Авторы объяснили свои данные мембранотропным эффектом витамина А, вызывающим повреждения плазмолеммы эритроцитов. Образование складок и вакуолей связывали с увеличением площади поверхности клеток без увеличения их объема. Гемолиз рассматривали как следствие нарушения целостности плазмолеммы, скорее всего ее липидного компонента, и образования множественных дефектов, способствующих потере гемоглобина и лизису клеток. Обоснованность такого предположения была подтверждена данными биохимических исследований, выявивших нарушения архитектоники плазмолеммы эритроцитов под влиянием ретиноидов, а именно преобразование липидов из бислойной фазы в гексагональную [30].

Более поздние исследования были выполнены в экспериментах *in vivo*. Так изучали морфофункциональное состояние эритроцитов мышей с хроническим гипервитаминозом А, который развивался в результате внутрибрюшинного введения животным различных ретиноидов 1 раз в неделю в течение 87 дней [3]. Были описаны эритропения, гемоглобинемия,

понижение осмотической резистентности эритроцитов, увеличение клеток с измененной клеточной поверхностью, что объяснялось нарушениями структурной целостности эритроцитарных мембран. Авторы обнаружили также в крови и лимфоидных органах увеличенное число лимфоцитов и макрофагов, которое объяснили необходимостью элиминации поврежденных эритроцитов. В другой работе исследовали состояние эритроцитов мышей после однократного внутрибрюшинного введения ретиноевой кислоты в разных дозах [49]. Через сутки в крови животных был отмечен выраженный пойкилоцитоз – значительно увеличивалось количество стоматоцитов и сфероцитов. С помощью компьютерной морфоденситометрии было показано, что у эритроцитов-дискоцитов изменяется их профиль, уменьшается площадь поверхности и увеличивается объем, что свидетельствовало о начальном этапе трансформации дискоцитов в дискосфероциты [25, 31]. Одновременно отмечено снижение интегральной оптической плотности цитоплазмы, вследствие уменьшения среднего содержания в ней гемоглобина. Авторами предложено использование данного метода для оценки биологического (токсического) действия ретиноидов на организм. Во всех исследованиях отмечалась зависимость выраженности обнаруженных изменений эритроцитов от дозы ретиноидов, а также от времени инкубации *in vitro* или продолжительности введения препарата животным.

Данные о состоянии гемопоэза в условиях гипервитаминоза А малочисленны и противоречивы. Так, у морских свинок, получавших в течение 3 месяцев внутрибрюшинные инъекции ретинол пальмитата в дозе 35000 МЕ/день, в красном костном мозге, селезенке, лимфатических узлах и печени были обнаружены интенсивно пролиферирующие атипичные мононуклеарные клетки, а также большое число лимфоцитов и плазмоцитов с ультраструктурными признаками активного биосинтеза [253]. Авторы предположили, что ретинол, как мощный митоген и иммуномодулятор, стимулировал размножение и дифференцировку иммунокомпетентных клеток. Вывод о повышении уровня пролиферации косвенно подтверждался увеличением лейкоцитов и ретикулоцитов (на фоне анемии) в периферической крови [253].

Противоположного мнения, а именно, о подавлении ретинолом митотической активности гемопоэтических клеток, придерживаются авторы, обнаружившие снижение количества клеток эритроидного ряда и мегакариоцитов в красном костном мозге ребенка грудного возраста, получавшего 62000 МЕ/день витамина А в течение 80 дней. В периферической крови были зарегистрированы анемия, анизо- и пойкилоцитоз, тромбоцитопения. Дополнительное исследование действия ретинола на развитие гемопоэтических клеток костного мозга *in vitro* подтвердило митозингибирующий эффект витамина А который вероятно опосредуется через подавление циклинзависимой киназы [251].

1.3. Заключение

Широкое клиническое применение ретиноидов в качестве терапевтических средств и возникновение симптомов гипервитаминоза А при их неограниченном использовании делают актуальным поиск способов раннего выявления признаков передозировки соединений этой группы, желательно еще на субтоксической стадии заболевания. Наиболее удобными в практическом отношении тестами могут быть показатели крови, так как ее форменные элементы одними из первых подвергаются действию повышенных доз ретиноидов. Особый интерес в этом отношении представляют эритроциты, плазмолемма которых является мишенью для обладающего мембранотропным действием витамина А. Как следует из анализа литературы, сведения о морфологических изменениях эритроцитов в условиях гипервитаминоза А малочисленны, получены из работ 30–40-летней давности и не отвечают требованиям ранней доклинической диагностики. Это послужило основанием для выполнения данного исследования. При этом перспективным представлялось использование современного метода компьютерной морфоденситометрии, позволяющего обнаружить изменения параметров профиля дискоцитов значительно раньше, чем появляются видимые признаки патологической деформации эритроцитов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Экспериментальные животные

Работа выполнена на крысах самцах Вистар, полученных из филиала «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России и выдержанных в карантине в течение одной недели до начала экспериментов. Крысы содержались в клетках по 6 штук и получали стандартный брикетированный корм и воду без ограничения. Манипуляции с животными и выведение их из опытов осуществляли согласно Правилам надлежащей лабораторной практики (Приказ Минздрава РФ №199н от 01.04. 2016 г.) и в соответствии с решением локального этического комитета (протокол № 02-20 от 05.02.2020). Было проведено две серии экспериментов. В первой серии отработывали модель гипервитаминоза А и оценивали реакцию эритроцитов на введение ретинола пальмитата, во второй – анализировали динамику морфологических изменений эритроцитов и оценивали информативность морфоденситометрических параметров, меняющихся в условиях избытка ретинола. Исходная масса тела крыс, использованных в первом эксперименте, составила в среднем $128,3 \pm 2,5$ г, а во втором – $120 \pm 2,6$ г. Выбор животных с указанной массой определялся необходимостью минимизировать объем препарата, вводимого перорально. Количество животных и их распределение по сериям экспериментов и по группам представлено в таблице 2.1.

2.2. Модель гипервитаминоза А

В качестве источника витамина А использовали масляные растворы ретинола пальмитата (РП). Выбор РП был обусловлен его принадлежностью к биологически активным формам витамина А, меньшей токсичностью в сравнении со многим другими ретиноидами, а также широким его применением в качестве лекарственного средства [37, 123, 125, 157]. Готовые растворы РП, имевшие исходную концентрацию 180000 МЕ/мл (первая серия) и 500000 МЕ/мл (вторая серия), фасовали во флаконы темного стекла по 10 мл и хранили при $t^{\circ} = 4^{\circ}\text{C}$. Остаточный воздух во флаконах замещали азотом. Вспомогательными веществами являлись низкоэруковое рапсовое масло и антиоксиданты – по 0,1 мг на 100 мл масла бутилгидрокситолуола и бутилгидроксианизола (масляная основа – МО)¹.

Экспериментальным группам крыс РП вводили ежедневно *per os* в объемах, соответствующих дозам, указанным в таблице 2. При расчете дозы и соответствующего

¹ Растворы РП и МО были приготовлены и предоставлены сотрудниками АО «Ретиноиды».

объема вводимого раствора учитывали изменение массы тела животных. В первом эксперименте взвешивание производили на 7 и 11 дни опыта, в ходе второго эксперимента – через день. В пересчете на крысу, суточная доза РП варьировала в среднем: в начале опыта – от 95000 МЕ (при дозе 0,41 мг/г) до 190000 МЕ (при дозе 0,82 мг/г) и в конце эксперимента – от 85000 МЕ до 133000 МЕ соответственно. В качестве контроля использовали интактных животных и крыс группы сравнения, которым вводили ежедневно *per os* МО с учетом массы их тела в объемах, сопоставимых с объемом раствора РП, используемого для достижения дозы 0,82 мг/г (1-я серия эксперимента) и 0,64 мг/г (2-я серия эксперимента).

Таблица 1 – Распределение животных по сериям экспериментов и по группам

Серии экспериментов	Группы крыс	Количество животных, использованных для анализа			
		всего	мазков крови	гистологии печени	
				7 день	11 день
№ 1	интактные	6	6	-	3
	МО	6	6	-	3
	РП - 0,41 мг/г	6	6	-	3
	РП - 0,64 мг/г	6	-	-	-
	РП – 0,82 мг/г	6	6	-	3
№ 2	интактные	6	6	-	-
	МО	12	6	3	3
	РП - 0,64 мг/г	12	6	3	3
Всего:		60	42	6	18

Таблица 2 – Используемые в работе дозы ретинола пальмитата

Дозы(ежедневно)		
мг/г	МЕ/г	от LD ₅₀ *
0,41	745	0,05
0,64	1163	0,08
0,82	1490	0,10

* При введении ретинола пальмитата *per os* LD₅₀ для крыс составляет 7,910 мг/г [152].

С целью анализа динамики развития гипервитаминоза А в каждой экспериментальной группе ежедневно регистрировали долю крыс с соответствующими симптомами, а также оценивали выраженность этих симптомов в баллах: 0 – отсутствует, 1 – умеренно выражен, 2 – сильно выражен. По результатам оценки рассчитывали средний балл по группе за день (СБ_д) и вычисляли индекс гипервитаминоза А как отношение СБ_д / СБ_{общ}, где СБ_{общ} – средний балл по группе за все дни наблюдения. В первой серии экспериментов на 7 и 11 день учитывали также объем потребляемого корма крысами контрольных и экспериментальных групп.

2.3. Гистологические исследования

Кроме регистрации симптомов гипервитаминоза А токсический эффект РП оценивали также путем сравнения микроструктуры печени экспериментальных и контрольных животных на 7 и 11 дни наблюдения. Образцы, вырезанные из идентичных участков органа, фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина на фосфатном буфере (рН 7,4) и заливали в парафин. Срезы толщиной 6-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Все процедуры выполняли по стандартным методикам [30].

2.4. Подготовка мазков крови

Предметные стекла толщиной 1,0 мм, использованные для приготовления мазков, предварительно погружали в смесь 96% этанола и эфира 1:1 на срок не менее суток, затем протирали и проводили над пламенем горелки 2-3 раза с обеих сторон для снятия электростатического заряда. Кровь для изготовления мазков получали из прокола вены хвоста стерильным скарификатором с глубиной прокола 2,0 мм. До забора крови место прокола обрабатывалось 96% этанолом и высушивалось, а после забора крови – 2% спиртовым раствором бриллиантовой зелени. После высушивания мазки фиксировали 15 мин в 96% этаноле. Мазки крови экспериментальных и контрольных групп животных окрашивали одновременно раствором Лейшмана (эозин - метиленовый синий) по схеме: 1) концентрированный р-р красителя – 2 мин., 2) концентрированный р-р красителя + дистиллированная вода 1:2 – 10 мин., 3) дистиллированная вода – 5 мин. Время фиксации и окраски мазков, позволяющие получить максимальную контрастность фон-объект, были выбраны в соответствии с рекомендациями [46].

2.5. Учет количества типичных и атипичных форм эритроцитов

В периферической крови человека и животных наряду с нормоцитами (торообразные, в форме двояковогнутого диска – дискоциты) встречаются разнообразные атипичные формы эритроцитов [9, 101]. Собственные исследования показали, что популяция дискоцитов крыс неоднородна. Это явилось основанием для выделения субпопуляций истинных дискоцитов и дискосфероцитов (см. раздел 3.1.4). Поэтому одним из критериев реакции эритроцитов на избыток РП служило относительное содержание в мазках крови их различных форм – дискоцитов (суммарное число истинных дискоцитов и дискосфероцитов) и атипичных (эхиноцитов, стоматоцитов, сфероцитов и других форм). Истинными дискоцитами считали

клетки с площадью пэллора более 25% площади проекции, а дискофероцитами – клетки с площадью пэллора менее 25% площади проекции. К эхиноцитам относили клетки со спикулами, к стоматоцитам – клетки с неровным пэллором, к сфероцитам – клетки без четко выраженного пэллора. Редко встречающиеся овалоциты, кодоциты и неидентифицируемые клетки суммарно относили к другим формам (Рисунок 2). В мазках под иммерсией (объектив $\times 90$, окуляр $\times 10$) определяли долю каждого типа эритроцитов из расчета на 200 клеток, учтенных у одного животного.

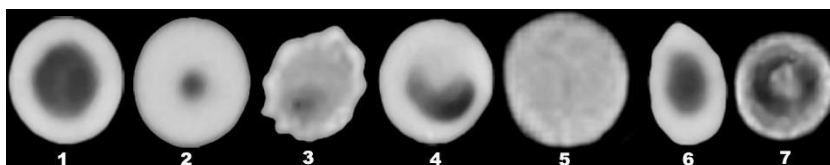


Рисунок 2 – Морфологические типы эритроцитов периферической крови крыс: 1 – истинный дискоцит, 2 – дискофероцит, 3 – эхиноцит, 4 – стоматоцит, 5 – сфероцит, 6 – овалоцит, 7 – кодоцит. Инвертированное изображение

2.6. Морфоденситометрия дискоцитов

Для анализа дискоцитов использовали компьютерную морфоденситометрию (МДМ), реализуемую с помощью аппаратно-программного комплекса DiaMorph Cito (ЗАО «ДиаМорф», Россия). Данный метод, основанный на комплексном алгоритме анализа изображений [14, 187], позволяет оценить стандартные морфоденситометрические параметры (СМДМП) (Таблица 3) и набор параметров, описывающих количественно профиль (ПП) дискоцитов в целом и его отдельные участки (Таблица 4, Рисунок 3Д).

Таблица 3 – Стандартные морфоденситометрические параметры дискоцитов

№	Обозначение	Название	
1	морфометрические (геометрические)	Area	площадь проекции на плоскость
2		Pallor	площадь центрального участка цитоплазмы
3		Pallor/Area	отношение площади пэллора к площади проекции
4		FF	фактор формы круга
5	денситометрические (оптические)	Od	средняя оптическая плотность
6		Iod	интегральная оптическая плотность

Методика компьютерной МДМ включает следующие этапы: 1) Калибровка изображения (оптическая и геометрическая), его захват и вывод на экран монитора (Рисунок 3А); 2) Бинаризация изображения и измерение СМДМП дискоцитов (Рисунок 3Б); 3) Проведение линии сканирования через центр дискоцита (Рисунок 3В); 4) Построение оптического

Таблица 4 – Параметры профиля дискоцитов (см. рисунок 3Д)

№	Обозначение	Название
1	Bend	точка перегиба топ/пэллор
2	Radius	радиус
3	Grad1	градиент оптической плотности восходящей части тора
4	Grad2	градиент оптической плотности нисходящей части тора
5	Grad3	градиент оптической плотности пэллора
6	Cur1	кривизна восходящей части тора
7	Cur2	кривизна нисходящей части тора
8	Cur3	кривизна пэллора
9	G1/G2	отношение Grad1 к Grad2
10	Dy	показатель контрастности
11	Dx	показатель формы (асимметрии)
12	L_er	длина профиля по линии сканирования
13	Surface	площадь поверхности
14	Volume	объем
15	Surface/Volume	отношение площади поверхности к объему

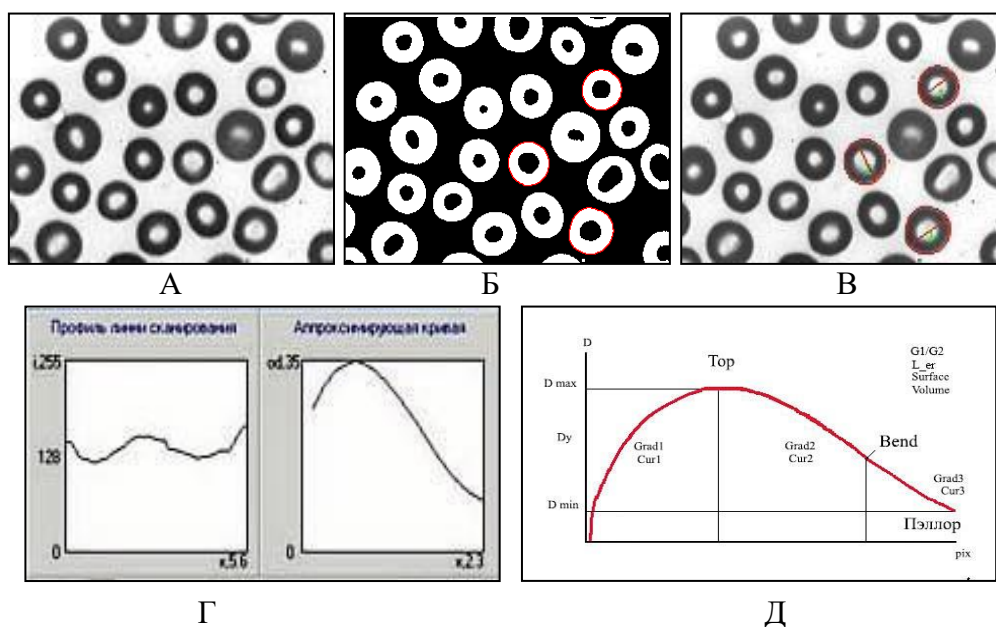


Рисунок 3 – Этапы обработки изображений мазков крови на аппаратно-программном комплексе DiaMorph Cito (А-Г) и анализируемые участки профиля дискоцитов (Д)

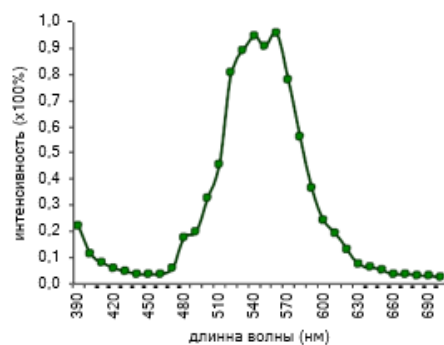


Рисунок 4 – Спектральная кривая пропускания светофильтра, использованного при морфоденситометрии мазков крови

профиля дискоцита по вектору сканирования и расчет ПП на основе модельной аппроксимации (Рисунок 3Г); 5) Сохранение результатов измерений в памяти компьютера с целью их последующей статистической обработки. В АПК DiaMorph Cito этапы 3 и 4 реализуются в автоматическом режиме, значения Area и Pallor рассчитываются в кв. мкм, остальных параметров – в усл. единицах.

Полутоновые изображения мазков крови получали с помощью ч/б аналоговой видеокамеры Sony UM-112H с CCD матрицей 1/3", чувствительностью 0,03 lux и разрешением 660 TVL, установленной на микроскопе Микмед-6 (ЛОМО). Известно, что дезоксигемоглобин имеет максимум поглощения при $\lambda = 554$ нм, а оксигемоглобин – при $\lambda = 540$ нм и $\lambda = 578$ нм [5]. Поэтому для увеличения контраста изображений эритроцитов использовали зеленый светофильтр с максимумом пропускания в интервале от $\lambda = 530$ нм до $\lambda = 580$ нм (Рисунок 4).

Используя иммерсионный объектив $\times 90$, измеряли МДМ параметры не менее чем у 30 дискоцитов, расположенных в соседних полях зрения центрального участка мазка крови. От каждого контрольного и экспериментального животного использовали по одному мазку. При определении минимального числа анализируемых клеток, достаточного для получения объективных результатов, исходили из рекомендаций авторов [21, 46], подтвержденных собственными расчетами планируемого объема выборок.

2.7. Планирование объема выборок и статистический анализ результатов

Планирование проводили по результатам предварительного анализа пробной выборки, включавшей по 30-40 дискоцитов от 10 интактных животных. Дисперсию по эмпирической выборке ($\sigma^2_{выб}$) рассматривали как $\sigma^2_{выб} = \sigma^2_{инд} + \sigma^2_{гр}$, где $\sigma^2_{инд}$ – индивидуальная и $\sigma^2_{гр}$ – групповая (межиндивидуальная) дисперсии. Методическая погрешность ($\sigma^2_{метод}$), влияющая на $\sigma^2_{выб}$ при ручных измерениях объектов, в работе не учитывалась, так как при повторных измерениях одного дискоцита в автоматическом режиме анализа откалиброванных изображений значения параметров идентичны и, следовательно, методическая погрешность равна нулю. Дисперсию по выборке ($\sigma^2_{выб}$) для каждого МДМ параметра оценивали по результатам измерений эритроцитов у всех включенных в выборку крыс. Индивидуальную дисперсию ($\sigma^2_{инд}$) рассчитывали как $\sigma^2_{инд1} + \sigma^2_{инд2} + \sigma^2_{инд3} \dots + \sigma^2_{инд n} / n$, где $\sigma^2_{инд1} \dots \sigma^2_{инд n}$ – дисперсия у каждого животного, а n – число животных. Групповую дисперсию ($\sigma^2_{гр}$) находили как $\sigma^2_{гр} = \sigma^2_{выб} - \sigma^2_{инд}$.

Планируемый объем выборки (V) рассчитывали по формуле $V = CV^2 / \delta^2$, где CV – коэффициент вариации, а δ – коэффициент точности (допустимой погрешности) V

морфометрических исследованиях допустимой считается погрешность в 5-15% [2]. Для определения объема выборки было принято ее среднее значение. Индивидуальные и групповые коэффициенты вариации для каждого измеренного параметра находили по стандартной формуле $CV = \sigma / \bar{X} * 100$. При расчете объема выборок использовали усредненные для всех параметров коэффициенты (Таблица 5).

Таблица 5 – Коэффициенты вариации (CV) стандартных морфоденситометрических параметров и параметров профиля дискоцитов в пробной выборке

Параметры	CV			
	индивидуальные	среднее значение	групповые	среднее значение
Area	17,37	54,31	0,78	24,23
Pallor	37,54		7,41	
FF	1,65		0,17	
Od	11,86		1,68	
Iod	18,58		1,50	
Bend	23,49		1,82	
Radius	9,78		0,40	
Grad1	29,57		3,30	
Grad2	22,74		6,34	
Grad3	56,70		2,20	
Cur1	234,00		6,50	
Cur2	53,68		3,85	
Cur3	223,25		5,19	
G1/G2	151,94		430,32	
Dy	68,37		11,83	
Dx	26,74		1,80	
L_er	20,54		4,16	
Surface	27,27		4,42	
Volume	22,41		1,77	
Surface/ Volume	28,77		2,21	

В результате, для достижения принятой допустимой погрешности выборка должна была включать: $v_{gp} = CV_{gp}^2 / \delta^2 = 24,23^2 / 10^2 = 5,9$ крыс в группе, у каждой из которых необходимо было измерить: $v_{инд} = CV_{инд}^2 / \delta^2 = 54,31^2 / 10^2 = 29,5$ дискоцитов. На основании приведенных расчетов контрольные и экспериментальные группы формировали не менее чем из 6 животных, и у каждого из них измеряли параметры не менее 30 дискоцитов.

Для всех количественных показателей вычисляли значения среднего арифметического (Mean, \bar{X}), предельную ошибку выборки (Std. Error, m) и доверительный интервал ($\pm \Delta = tm$). Степень разброса переменных оценивали по дисперсии (Variance, σ^2) и коэффициенту вариации (CV). Определяли также асимметрию (Skewness) и эксцесс (Kurtosis) вариационных рядов. О соответствии формы выборочных распределений нормальному распределению судили по их

асимметрии, эксцессу и проверяли с помощью теста Колмогорова-Смирнова для одной выборки. Поскольку этому условию удовлетворяла лишь часть распределений переменных, при проверке гипотезы о равенстве средних в выборках применяли непараметрические методы статистики (критерии Колмогорова-Смирнова для двух независимых выборок, Манна-Уитни и Кендалла). Для сравнения множественных выборок использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорными тестами Левена (проверка равенства дисперсий) и Дункана (проверка гомогенности групп). Попарное сравнение частот, долей и отношений производили с помощью точного решения Фишера χ^2 . Для оценки связи между количественными признаками использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмана. Статистическую зависимость переменных определяли методом линейной регрессии. Группировку дискоцитов в субпопуляции проводили с использованием квартильного анализа переменных Pallor и Pallor/Area. Субпопуляции характеризовали по результатам регрессионного и дискриминантного анализа их МДМ параметров. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень доверительной вероятности принимался равным не менее 95% ($p \leq 0,05$). Абсолютные значения большинства МДМ параметров дискоцитов приведены в таблицах и графиках в условных единицах, для Area и Pallor – в кв. мкм, относительные значения – в долях единицы или в процентах. Для иллюстрации динамики изменений МДМ параметров дискоцитов использовали относительный показатель – индекс динамики, рассчитанный как \bar{X}_j / \bar{X}_1 , где \bar{X}_j – среднее значение МДМ параметра в соответствующий день наблюдения, а \bar{X}_1 – среднее значение параметра в первый день эксперимента. Информативность (диагностическую значимость) изменений МДМ параметров дискоцитов при гипервитаминозе А оценивали по коэффициенту информативности (I), рассчитанному по формуле Кульбака, видоизмененной Гублером [13]. Этот показатель основан на частотной характеристике признака и позволяет оценить степень различий между его распределениями в двух выборках. Признаком считали статистически значимое изменение (увеличение или уменьшение) среднего значения конкретного МДМ параметра дискоцитов при передозировке РП в сравнении с контрольной группой в сопоставимые сроки наблюдения. Частотной характеристикой признака служила доля дискоцитов со значениями параметра, распределенными выше или ниже доверительных интервалов среднего арифметического, рассчитанного до начала эксперимента для выборки, включавшей контрольную и экспериментальную группы животных (\bar{X}_0). При планировании эксперимента предполагалось, что характер изменений параметров дискоцитов у крыс экспериментальной группы может быть результатом не только воздействия РП, но иных факторов, например, компонентов МО. Поэтому, если на фоне введения РП среднее значение параметра снижалось, то в экспериментальной (РП) и в контрольной (МО) группах учитывали

долю дискоцитов с распределением ниже $\bar{x}_0 - tm$. При увеличении значения параметра находили долю дискоцитов с распределением выше $\bar{x}_0 + tm$ в одной и другой группе. При расчете I попарно сравнивали доли дискоцитов с изменившимися значениями МДМ параметров. Информативным считали признак с величиной $I \geq 0,5$. Статистический анализ и построение гистограмм проводили с помощью прикладных программ IBM PASW Statistics v.18.0 и Microsoft Office Excel. Для реконструкции 3D профиля дискоцитов использовали программу IPSO (ЗАО «ДиаМорф»).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Морфология эритроцитов интактных крыс Вистар

Перед тем как приступить к оценке изменений эритроцитов в условиях эксперимента представлялось целесообразным проанализировать стандартные морфоденситометрические параметры (СМДМП) и параметры профиля (ПП) в выборке дискоцитов ($n=761$), сравнить эти параметры в субпопуляциях дискоцитов, а также оценить соотношение типичных и атипичных форм эритроцитов у интактных животных ($n=23$).

3.1.1. Стандартные морфоденситометрические параметры дискоцитов

Между средними значениями СМДМП дискоцитов отдельных крыс выявлены статистически значимые различия (примеры см. на Рисунке 5), что обусловлено вариабельностью данных параметров в целом по выборке. Среди СМДМП наибольший коэффициент вариации был характерен для Pallor и Iod дискоцитов (Таблица 6).

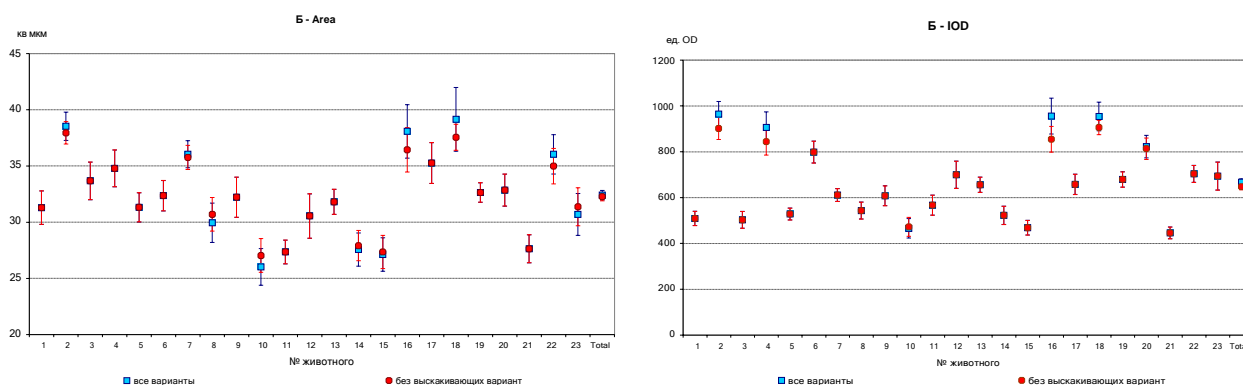


Рисунок 5 – Средние значения площади проекции (Area) и интегральной оптической плотности (IOD) дискоцитов интактных крыс. Линии погрешности – доверительный интервал

Таблица 6 – Статистики СМДМП дискоцитов интактных крыс

	Mean	Std. Error	Std. Deviation	Min.	Max.	Cv
Area	32,25	,19	5,11	21,24	44,03	15,8%
Pallor	6,95	0,09	2,61	1,46	14,14	37,5%
FF	0,92	,0004	0,01	0,89	0,96	1,1%
Od	20,20	0,14	3,69	12,64	28,43	14,6%
Iod	647,26	6,59	178,41	262,09	1078,55	23,0%

С целью проверить возможное влияние методических погрешностей на результаты морфометрии, было проведено независимое четырехкратное измерение СМДМП дискоцитов в мазках крови крыс, имевших статистически значимые различия средних (№№ 2, 9, 21 на

Рисунок 5). В результате, несмотря на некоторые отклонения данных в каждом из четырех измерений, различия между средними значениями СМДМП дискоцитов у отдельных животных были аналогичны ранее установленным (Рисунок 6). Увеличение числа анализируемых клеток снижало дисперсию, но не сказывалось существенно на средних значениях измеряемых параметров, которые оставались в пределах соответствующих доверительных интервалов (Рисунок 7).

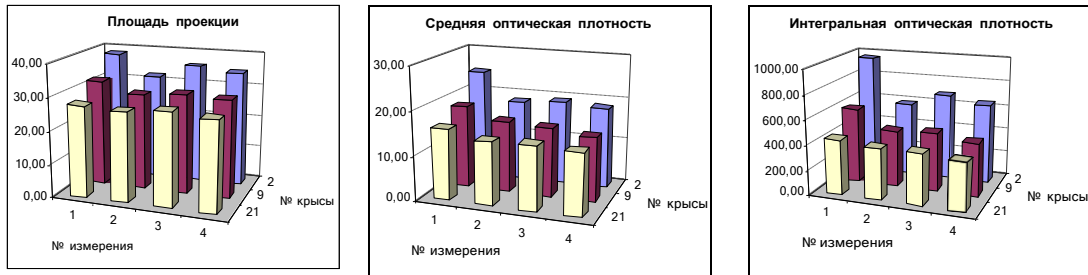


Рисунок 6 – Средние значения СМДМП дискоцитов intactных крыс по результатам четырех независимых измерений

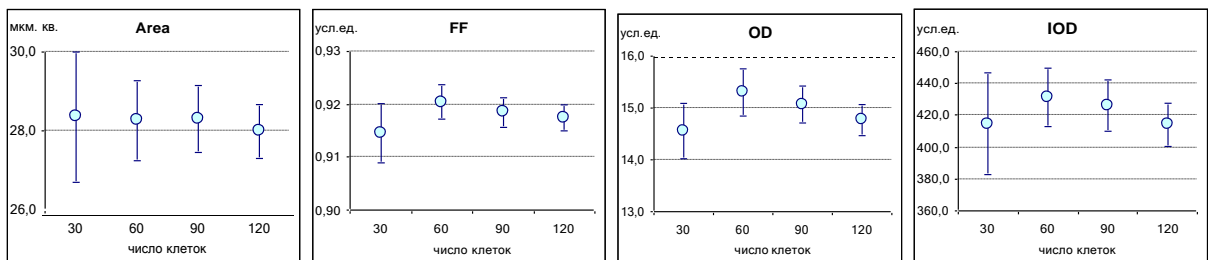


Рисунок 7 – Средние значения геометрических (Area, FF) и оптических (Od, IOD) СМДМП дискоцитов intactных крыс при разном числе проанализированных клеток

Вариабельность геометрических и оптических параметров дискоцитов связана как с индивидуальной, так и с внутригрупповой (межиндивидуальной) дисперсией переменных. У геометрических параметров более выражена индивидуальная дисперсия. Для оптических параметров дискоцитов более характерна групповая изменчивость и в меньшей степени – индивидуальная (Рисунок 8).

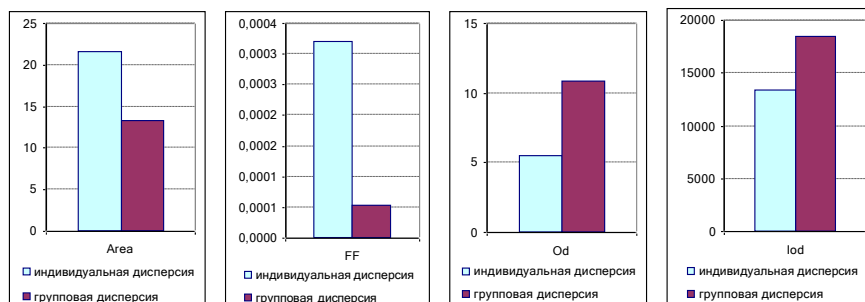


Рисунок 8 – Индивидуальная и групповая дисперсии геометрических (Area, FF) и оптических (Od, IOD) параметров дискоцитов intactных крыс

При анализе формы распределения переменных в выборке установлено, что значения Area дискоцитов интактных крыс соответствовали нормальному распределению (тест Колмогорова-Смирнова, $p > 0,05$). Для остальных СМДМП дискоцитов отклонения значений от нормального распределения являлись существенными (тест Колмогорова-Смирнова, $p < 0,05$).

3.1.2. Параметры профиля дискоцитов

Средние значения ПП дискоцитов у отдельных крыс имели статистически значимые различия (Рисунок 9) и в целом по выборке большинство переменных, описывающих профиль дискоцитов, характеризовались очень высокой вариабельностью (Таблица 7).

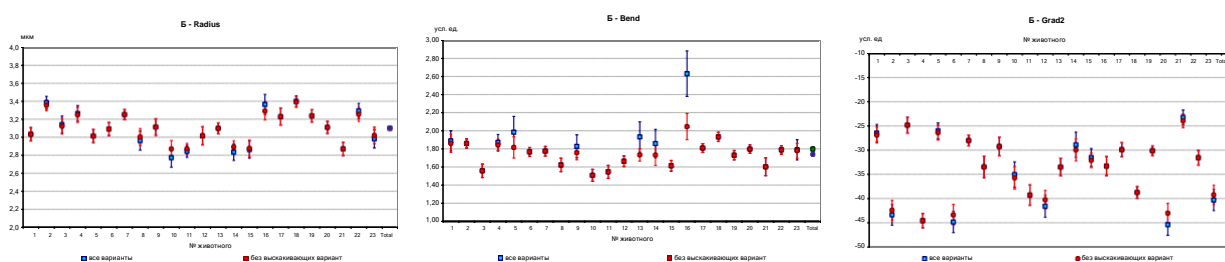


Рисунок 9 – Средние значения некоторых ПП дискоцитов интактных крыс. Линии погрешности – доверительный интервал

Таблица 7 – Статистики ПП дискоцитов интактных крыс

Параметры	Mean	Std. Error of Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Cv
Bend	1,74	0,01	0,23	1,09	2,51	13,1
Radius	3,10	0,01	0,27	2,55	3,62	8,6
Grad1	48,95	0,64	17,13	9,57	87,33	35,0
Grad2	-33,78	0,29	7,74	-50,92	-17,11	-22,9
Grad3	-17,76	0,30	7,97	-39,62	1,24	-44,9
Cur1	-0,03	0,01	0,21	-3,93	0,003	-612,5
Cur2	-103,19	1,49	40,33	-195,98	-15,33	-39,1
Cur3	1,11	0,08	2,07	0,002	9,97	187,2
G1/G2	-3,00	0,06	1,60	-10,04	3,38	-53,2
Dy	0,17	0,001	0,09	-0,05	0,40	54,2
Dx	0,33	0,001	0,06	0,15	0,50	18,0
L_er	114,14	1,16	31,38	47,42	184,70	27,5
Surface	2920,45	33,08	894,38	1017,14	4974,37	23,4
Volume	1461,71	15,66	423,50	581,05	2475,58	24,2
Surface/Volume	2,02	0,01	0,30	1,28	2,72	14,7

Как и в случае СМДМП, различия средних значений ПП дискоцитов между отдельными животными не были связаны с возможными методическими погрешностями, что следовало из результатов независимых повторных измерений одних и тех же параметров (Рисунок 10). Вариабельность ПП дискоцитов также характеризовалась индивидуальной и внутригрупповой

изменчивостью признаков. При этом для большинства ПП выявлена более высокая индивидуальная дисперсия. Исключением являются параметры L_{er} , Surface и Volume дискоцитов, для которых характерна преимущественно групповая изменчивость (Рисунок 11).

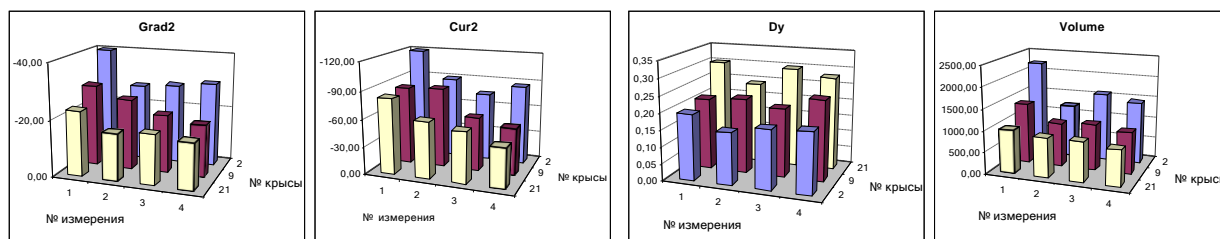


Рисунок 10 – Средние значения некоторых ПП дискоцитов интактных крыс по результатам четырех измерений

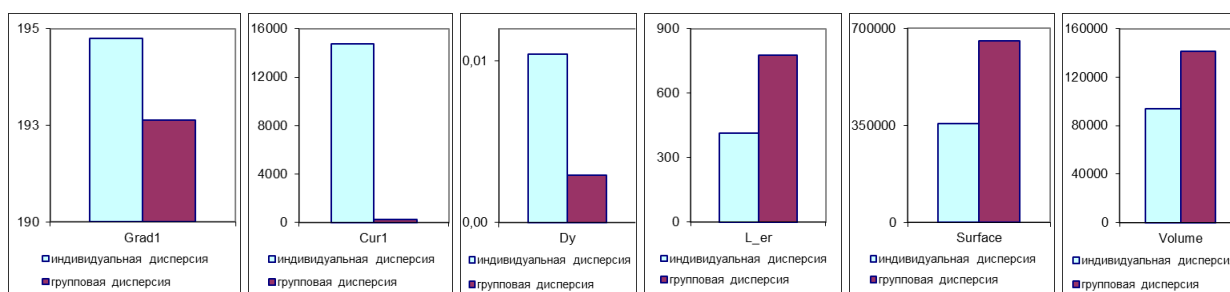


Рисунок 11 – Индивидуальная и групповая дисперсии некоторых параметров профиля дискоцитов интактных крыс

При оценке формы распределения ПП дискоцитов установлено, что значения абсолютного большинства переменных имели существенное отклонение от нормального распределения (тест Колмогорова-Смирнова, $p < 0,05$).

3.1.3. Корреляционно-регрессионный анализ морфоденситометрических параметров дискоцитов

Применение методов многомерной статистики позволило оценить распределение и взаимосвязь МДМ параметров дискоцитов. Из матрицы множественных корреляций (Таблица 8) следует, что большинство МДМ параметров дискоцитов в анализируемой выборке характеризуются положительной либо отрицательной связью разной степени выраженности – высокой ($\rho \geq 0,7$), умеренной ($\rho < 0,7$ и $> 0,4$) и слабой ($\rho \leq 0,4$). Приведенные в таблице коэффициенты корреляции свидетельствуют о высокой связи между стандартными МДМ параметрами (Area, Pallor, Od, Iod) и о взаимосвязи отдельных параметров, описывающих профиль дискоцитов (D_x , L_{er} , Surface, Volume и др.). Высокий уровень корреляции имеет

место также между СМДМП и многими ПП дискоцитов. Вместе с тем, градиенты оптической плотности и кривизна различных участков профиля дискоцитов (Grad, Cur), имеющие высокую или умеренную связь с другими ПП дискоцитов, характеризуются относительно низкой сопряженностью с СМДМП.

Таблица 8 – Коэффициенты корреляции Спирмана (полужирным шрифтом отмечены высокие и умеренные связи МДМ параметров дискоцитов)

Параметры дискоцитов	Pallor/Area	Area	Pallor	OD	IOD	Bend	Radius	Grad1	Grad2	Grad3	Cur1	Cur2	Cur3	G1/G2	Dy	Dx	L_er	Surface	Volume	
Pallor/Area	1																			
Area	-,18**	1																		
Pallor	,92**	,18**	1																	
OD	-,88**	,21**	-,77**	1																
IOD	-,68**	,75**	-,40**	,78**	1															
Bend	-,67**	,27**	-,55**	,50**	,50**	1														
Radius	-,19**	,88**	,14**	,26**	,72**	,29**	1													
Grad1	-,30**	-,05	-,31**	,45**	,27**	-,15**	-,01	1												
Grad2	-,09	,28**	-,01	-,12**	,10**	,45**	,27**	-,72**	1											
Grad3	,48**	,31**	,59**	-,38**	-,06	-,63**	,35**	-,11**	,05	1										
Cur1	-,37**	,04	-,33**	,49**	,33**	,09	,09	,78**	-,48**	-,22**	1									
Cur2	-,37**	,25**	-,27**	,16**	,26**	,83**	,25**	-,63**	,78**	-,41**	-,33**	1								
Cur3	,46**	,18**	,52**	-,28**	-,07	-,63**	,24**	,13**	-,26**	,70**	-,07	-,57**	1							
G1/G2	,18**	,20**	,26**	,01	,14**	-,59**	,27**	,62**	-,50**	,66**	,37**	-,78**	,64**	1						
Dy	-,50**	,29**	-,40**	,55**	,53**	,20**	,32**	,07	,25**	,29**	,03	,12**	-,01	,24**	1					
Dx	-,78**	-,02	-,78**	,61**	,40**	,79**	-,03	,28**	,13**	-,73**	,40**	,45**	-,65**	-,37**	,27**	1				
L_er	-,30**	,14**	-,23**	,50**	,42**	-,05	,20**	,90**	-,74**	-,57**	,74**	-,50**	,11**	,54**	-,01	,22**	1			
Surface	-,05	,44*	,13**	,27**	,47**	-,18**	,52**	,69**	-,59**	,22**	,54**	-,50**	,40**	,69**	-,02	-,12**	,86**	1		
Volume	-,58**	,70**	-,29**	,72**	,93**	,47**	,81**	,28**	,07	-,02	,35**	,24**	-,01	,17**	,46**	,31**	,47**	,56**	1	
SV	,60**	-,33**	,47**	-,52**	-,55**	-,74**	-,36**	,37**	-,69**	,27**	,14**	-,80**	,44**	,50**	-,55**	-,50**	,37**	,36**	-,52**	1

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Распределение и взаимозависимость ПП дискоцитов проверяли с помощью регрессионного анализа, используя модель парной линейной регрессии. О приемлемости данной модели для анализа выборки свидетельствовали достаточно высокие коэффициенты корреляции ($\rho > 0.7$) между соответствующими парами переменных, а также коэффициенты детерминации ($R^2 = 50\%$ и более), приведенные на диаграммах рассеяния (Рисунок 12). Высокий коэффициент детерминации (80% и более) имели пары Volume – Iod, L_er – Surface, L_er – Grad1, L_er – Grad2, Grad1 – Grad2. Коэффициент детерминации для остальных сравниваемых пар варьировал от 50% до 70%. Величина R^2 дала возможность оценить вклад независимой переменной (ось X на графиках) в дисперсию зависимой переменной (ось Y на

графиках). Результаты корреляционно-регрессионного анализа параметров дискоцитов интактных крыс были учтены при прогнозировании и оценке изменений дискоцитов в эксперименте.

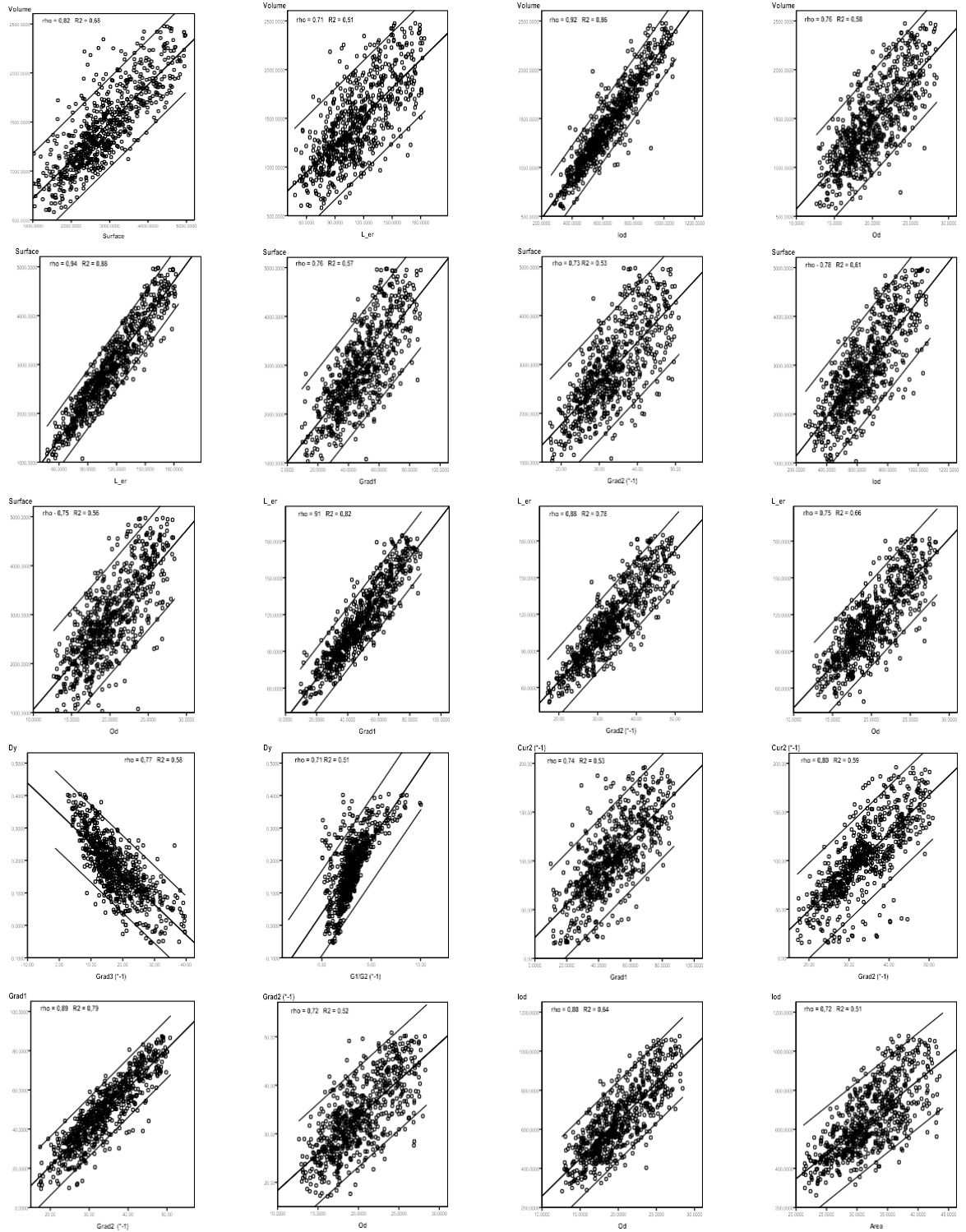


Рисунок 12 – Диаграммы рассеяния значений параметров профиля дискоцитов интактных крыс. Ось X – независимые переменные, ось Y – зависимые переменные; ρ – коэффициент корреляции Спирмена; R^2 – коэффициент детерминации

3.1.4. Субпопуляционный анализ дискоцитов

Коэффициенты вариации многих МДМ параметров дискоцитов интактных крыс превышали критичное значение 33% (Таблицы 6 и 7). Это свидетельствовало о разнообразии распределений МДМ параметров и предположительно указывало на неоднородность популяции дискоцитов. При микроскопии мазков крови обращает на себя внимание варибельность размера Pallor в дискоцитах, визуально мало отличающихся по Area (Рисунок 13).

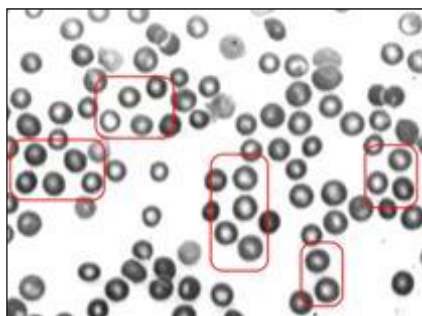


Рисунок 13 – Мазок крови интактной крысы. Окраска по методу Лейшмана. Ув.: об. × 63, ок. × 10. Обведены группы дискоцитов визуально близкие по Area и отличающиеся по площади Pallor

В связи с этим на первом этапе субпопуляционного анализа были проанализированы и сопоставлены МДМ параметры в группах дискоцитов (субпопуляции №1 – №4), сформированных по результатам квартильного анализа переменной Pallor. Установлено, что между МДМ параметрами и группами клеток с разной площадью Pallor имеется взаимосвязь разной силы и направленности (Таблица 9).

Таблица 9 – Связи между МДМ параметрами и субпопуляциями дискоцитов, сформированными по величине Pallor (коэффициенты корреляции Спирмана)

Pallor/Area	Area	Pallor	OD	IOD	Bend	Radius	Grad1	Grad2	Grad3	Cur1	Cur2	Cur3	G1/G2	Dy	Dx	L_er	Surface	Volume	Surface/Volume
,97**	-,17**	,89**	-,86**	-,65**	-,63**	-,18**	-,27**	-,09*	,45**	-,37**	-,35**	,43**	,17**	-,48**	-,73**	-,27**	-,04	-,55**	,58**

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Высокая корреляция ($\rho \geq 0,7$) с субпопуляциями дискоцитов характерна, ожидаемо, для Pallor. Также сильная связь установлена для Pallor/Area, OD и Dx. Умеренная связь ($\rho < 0,7$ и $> 0,4$) отмечена для IOD, Bend, Grad3, Cur3, Dy, Volume и Surface/Volume. Остальные МДМ параметры слабо коррелируют с номером субпопуляции дискоцитов ($\rho < 0,4$). Характер

распределения и степень зависимости МДМ параметров от величины Pallor уточнялись с помощью регрессионного анализа. На диаграммах рассеяния (Рисунок 14) представлены распределения параметров, сильно, умеренно и слабо коррелирующих со значениями Pallor. Внутри каждой субпопуляции дискоцитов распределения параметров, имеющих высокую корреляцию с Pallor, являются более компактными ($R^2 > 0,5$). Параметры, умеренно и слабо связанные с размером Pallor, отличаются выраженной дисперсией своих значений ($R^2 < 0,5$).

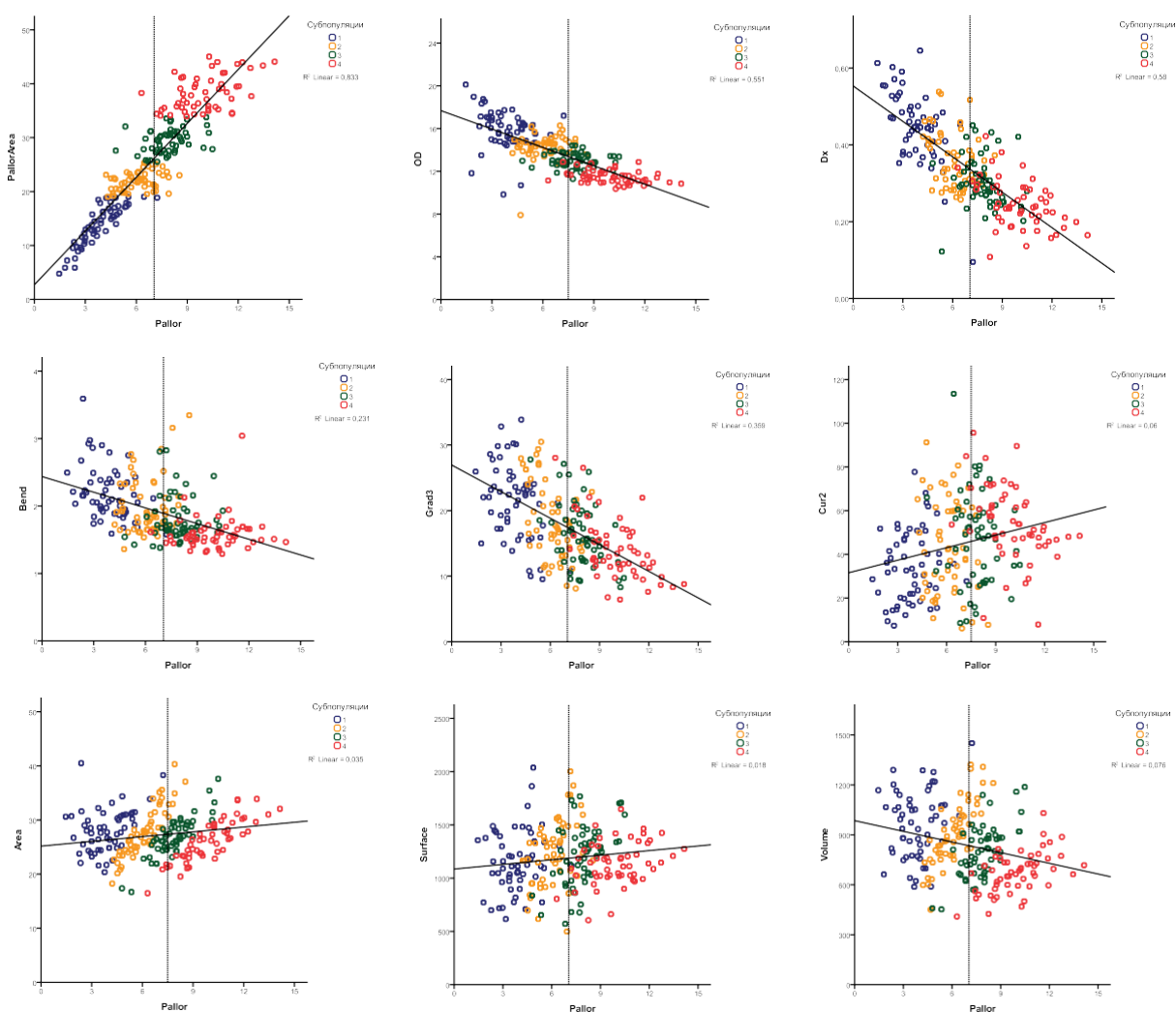


Рисунок 14 – Диаграммы рассеяния, иллюстрирующие зависимость значений МДМ параметров в субпопуляциях дискоцитов от площади Pallor. Сплошная линия – линейная регрессия. Пунктирная линия – медиана

Характер распределений МДМ параметров в субпопуляциях дискоцитов уточняли тестом Левена. Для большинства МДМ параметров, кроме Radius и Du, различия дисперсий значимы ($p < 0,01 - 0,001$) и, следовательно, дисперсии параметров в сформированных группах неодинаковы. Использование апостериорного теста Дункана позволило установить, какие именно группы значимо отличаются друг от друга.

Pallor/Area					OD					Grad3*-1				
Группы	Гомогенные подгруппы				Группы	Гомогенные подгруппы				Группы	Гомогенные подгруппы			
	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4
1	13,75				4	11,49				1	21,36			
2		21,98			3		12,97			2		18,33		
3			29,39		2			14,35		3			16,36	
4				38,32	1				15,94	4				14,13
Sig.	1,000	1,000	1,000	1,000	Sig.	1,000	1,000	1,000	1,000	Sig.	1,000	1,000	1,000	1,000

Cur2*-1					Dx					Volume				
Группы	Гомогенные подгруппы				Группы	Гомогенные подгруппы				Группы	Гомогенные подгруппы			
	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4
4	54,00				4	0,25				4	672,4			
3		47,67			3		0,30			3		799,2		
2			43,43		2			0,36		2			909,5	
1				34,40	1				0,45	1				965,0
Sig.	1,000	1,000	1,000	1,000	Sig.	1,000	1,000	1,000	1,000	Sig.	1,000	1,000	1,000	1,000

Area			Grad2*-1			Cur1*-1		
Группы	Гомогенные подгруппы		Группы	Гомогенные подгруппы		Группы	Гомогенные подгруппы	
	1	2		1	2		1	2
4	26,17		4	18,16		1	3,05	
3	26,83		2	18,11		2		0,11
2		27,80	3	18,07		4		0,02
1		28,03	1		17,18	3		0,005
Sig.	0,140	0,617	Sig.	,798	1,000	Sig.	1,000	0,851

Grad1				Cur3				L_er			
Группы	Гомогенные подгруппы			Группы	Гомогенные подгруппы			Группы	Гомогенные подгруппы		
	1	2	3		1	2	3		1	2	3
4	17,30			1	0,76			4	48,58		
3		19,14		2		3,26		3		51,87	
2			21,32	3			5,17	2			55,03
1			22,06	4			5,35	1			55,51
Sig.	1,000	1,000	0,294	Sig.	1,000	1,000	0,294	Sig.	1,000	1,000	0,653

Рисунок 15 – Результаты апостериорного теста Дункана. Для всех параметров приведено гармоническое среднее в группах. Sig. – наличие ($p < 0,05$) либо отсутствие ($p > 0,05$) значимых различий внутри гомогенных подгрупп

Из таблиц, представленных на рисунке 15, следует, что некоторые СМДМП и ряд ПП дискоцитов (Bend, Grad3, Cur2, Dy, Dx, Volume) образуют подгруппы, соответствующие числу сформированных групп, и, следовательно, выделение дискоцитов в субпопуляции по Pallor

можно рассматривать как приемлемое. Однако более половины МДМ параметров образуют две или три гомогенные подгруппы, которые значимо отличаются друг от друга и объединяют субпопуляции №1, №2 и №3, №4 либо №2, №3, №4 и №1. При этом субпопуляции в подгруппах не обнаруживают значимого различия между собой. Исходя из этих результатов, для более корректного субпопуляционного анализа дискоцитов следовало выбрать иной критерий их распределения на группы.

Значения Area и Pallor дискоцитов слабо коррелируют друг с другом (см. Таблицу 8), следовательно, клетки с большими значениями Area могут иметь небольшой по площади Pallor и наоборот. Учитывая это, а также изложенные выше результаты, следующий этап субпопуляционного анализа дискоцитов заключался в определении диапазона признаков, характеризующих две группы клеток, распределенных выше (группа 1) и ниже (группа 2) медианы переменной Pallor/Area. У дискоцитов группы 1 соотношение Pallor/Area $> 25\%$ (min 25,54% – max 45,03%), в группе 2 это отношение $\leq 25\%$ (min 4,77% – max 25,03%). Подобные различия связаны с тем, что при несущественной разнице значений Area значения Pallor в группах 1 и 2 отличаются приблизительно в два раза (соответственно $8,73 \pm 0,9$ и $4,50 \pm 0,04$).

Компьютерная реконструкция среднего 3d профиля дискоцитов наглядно демонстрирует их морфологическую неоднородность у интактных крыс (Рисунок 16 А). У дискоцитов с меньшим средним значением Pallor форма последнего из уплощенной становится воронкообразной, а профиль дискоцита вследствие изменения кривизны в его различных участках приобретает тенденцию к трансформации в сферообразный. Это послужило поводом отнести дискоциты группы 1 к субпопуляции «истинных дискоцитов», а дискоциты группы 2 – к субпопуляции «дискосфероцитов».

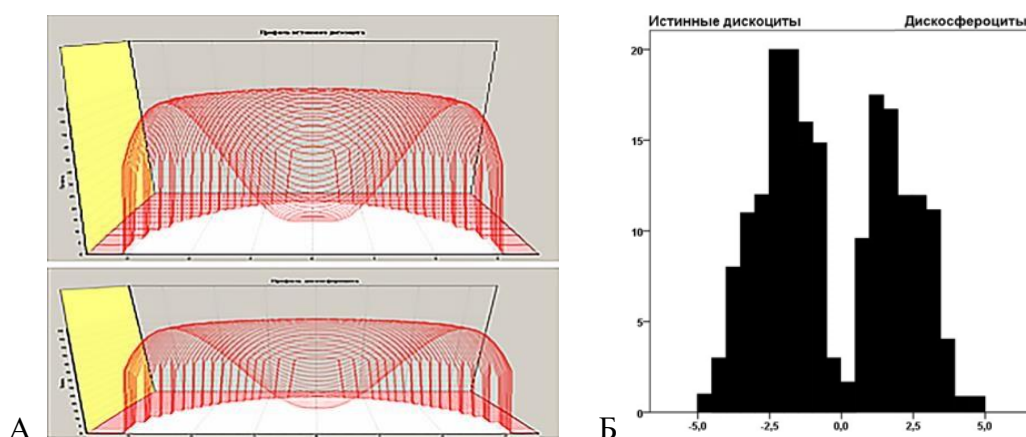


Рисунок 16 – А – Реконструкция среднего 3D профиля дискоцитов: истинные дискоциты (вверху) – среднее значение Pallor = $8,73 \pm 0,9$; дискосфероциты (внизу) – среднее значение Pallor = $4,50 \pm 0,04$. Б – бимодальное распределение значений дискриминантной функции в субпопуляциях дискоцитов

С помощью дискриминантного анализа МДМ параметров проверялась принадлежность отдельных дискоцитов выборки к соответствующей субпопуляции. Результаты свидетельствуют о неодинаковом (бимодальном) распределении значений дискриминантной функции в группах (Рисунок 16 Б). Мерой адекватности отнесения дискоцита к одной из групп явились высокий коэффициент дискриминантной функции = 0,85, значимость отличий средних значений дискриминантной функции в обеих группах = 0,001, а также достигнутая точность прогнозирования = 97,7%.

В группах дискоцитов, сформированных по значению Pallor/Area, МДМ параметры клеток коррелировали с разной силой с номером субпопуляции. Исключением являются параметры Surface и Grad2, распределение которых не имело различий в обеих группах (Таблица 10).

Таблица 10 – Связи между МДМ параметрами и субпопуляциями дискоцитов, сформированными по величине Pallor/Area (коэффициенты корреляции Спирмана)

Pallor/Area	Area	Pallor	OD	IOD	Bend	Radius	Grad1	Grad2	Grad3	Cur1	Cur2	Cur3	G1/G2	Dy	Dx	L_er	Surface	Volume	Surface/Volume
-.87**	.15**	-.80**	.78**	.59**	.55**	.18**	.26**	.06	-.39**	.37**	.30**	-.35**	-.13**	.42**	.65**	.26**	.05	.50**	-.50**

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

При сравнении средних значений МДМ параметров дискоцитов, принадлежащих к разным субпопуляциям (критерий Манна-Уитни), установлено, что дискосфероциты характеризуются тенденцией к росту Area и имеют более высокие значения оптических параметров – Od и Iod (Рисунок 17).

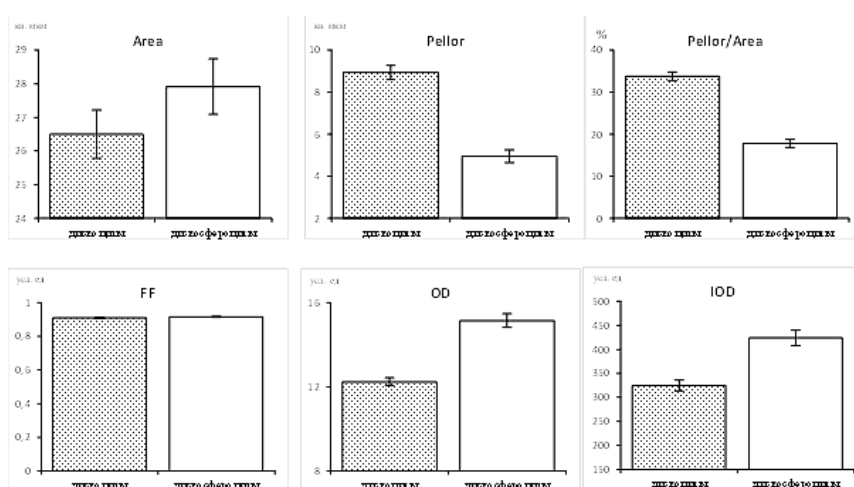


Рисунок 17 – Средние значения СМДМП в субпопуляциях дискоцитов интактных крыс

Большинство ПП в субпопуляциях дискоцитов также имеет различия (Рисунок 18). В частности, Cur1, Grad1 и Grad3 у дискоферритов значимо выше, чем в истинных дискоцитах. При дискоферритарной трансформации клеток снижаются параметры Cur2 и Cur3 при несущественных отклонениях Grad2 от значений истинных дискоцитов. Это сопровождается увеличением значений Dy и Dx. Хотя L-er в дискоферритах несколько выше, их Surface не имеет существенных различий с истинными дискоцитами. Volume дискоферритов больше, в силу чего Surface/Volume у них становится меньше в сравнении с истинными дискоцитами.

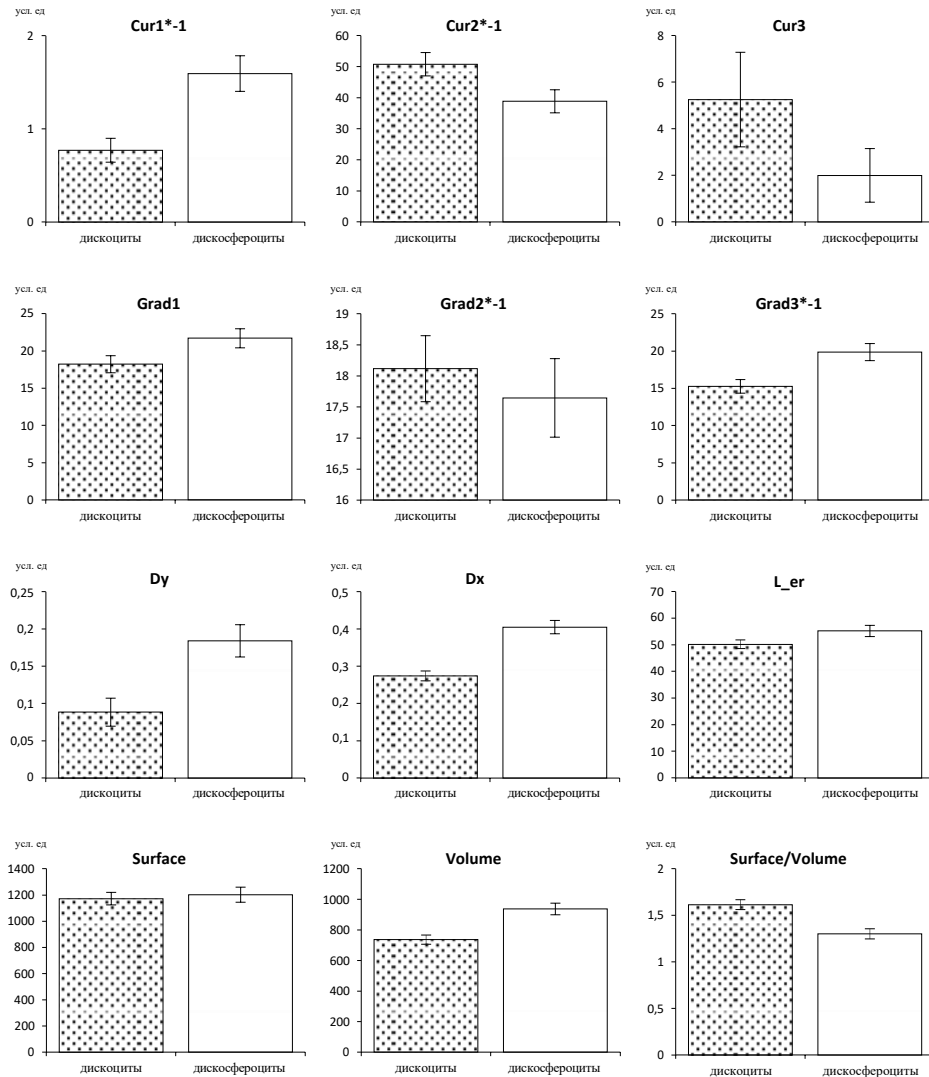


Рисунок 18 – Средние значения ПП в субпопуляциях дискоцитов интактных крыс

3.1.5. Распределение эритроцитов по форме

Исходя из результатов субпопуляционного анализа дискоцитов, была проведена визуальная оценка соотношения типичных форм эритроцитов – истинных дискоцитов и дискоферритов, а также их атипичных форм – эхиноцитов, стоматоцитов, сфероцитов и

других. Данные представлены на рисунке 19.

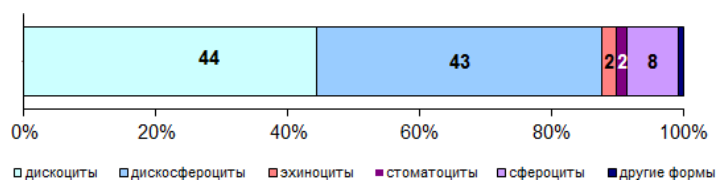


Рисунок 19 – Соотношение эритроцитов разной формы у интактных крыс (средние значения долей округлены до целого)

Суммарная доля типичных форм эритроцитов составила $87,6 \pm 1,3\%$ (истинных дискоцитов – $44,4 \pm 2,0\%$ и дискосфероцитов – $43,2 \pm 2,0\%$). Атипичные формы эритроцитов встречались редко. Среди них доля эхиноцитов составляла $2,2 \pm 0,6\%$, стоматоцитов – $1,6 \pm 0,5\%$, сфероцитов – $7,8 \pm 1,1\%$, а доля других форм была минимальна – $0,8 \pm 0,4\%$. Результаты визуальной оценки площади пэллора (меньше или больше 25% от площади проекции) при подсчете долей истинных дискоцитов и дискосфероцитов практически совпали с данными, полученными при статистическом анализе этих субпопуляций. Доли тех и других составили при визуальной оценке примерно половину от общей их численности, что послужило подтверждением объективности проведенных подсчетов.

3.2. Морфология эритроцитов крыс, получавших масляную основу раствора ретинола пальмитата

Для обоснования выбора адекватной группы сравнения в экспериментах по моделированию гипервитаминоза А была проведена предварительная оценка возможного действия на эритроциты компонентов МО, использованной для растворения субстанции РП. С этой целью сравнивали соотношение различных форм эритроцитов и сопоставляли соответствующие МДМ характеристики дискоцитов у крыс, потреблявших в течение 10 дней МО ($n=12$), и у интактных крыс ($n=12$). Объем вводимой МО соответствовал объему раствора РП, используемого для достижения дозы $0,82$ мг/г (1-я серия эксперимента) и $0,64$ мг/г (2-я серия эксперимента). Полученные в обеих сериях данные существенно не различались, поэтому они были обобщены и приведены ниже в виде итоговых результатов.

3.2.1. Распределение эритроцитов по форме

При микроскопировании мазков крови различий в морфологии дискоцитов крыс обеих групп визуально не обнаружено (Рисунок 20).

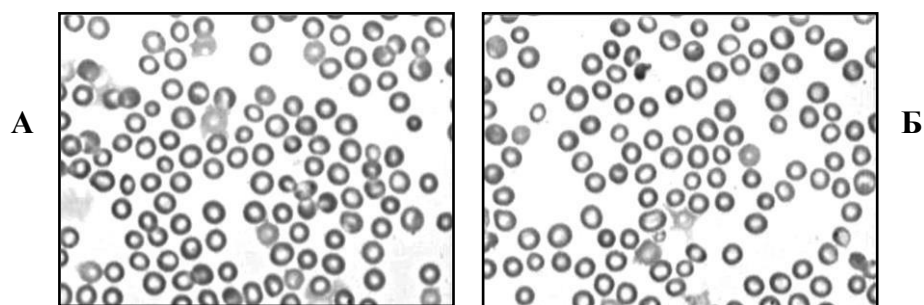
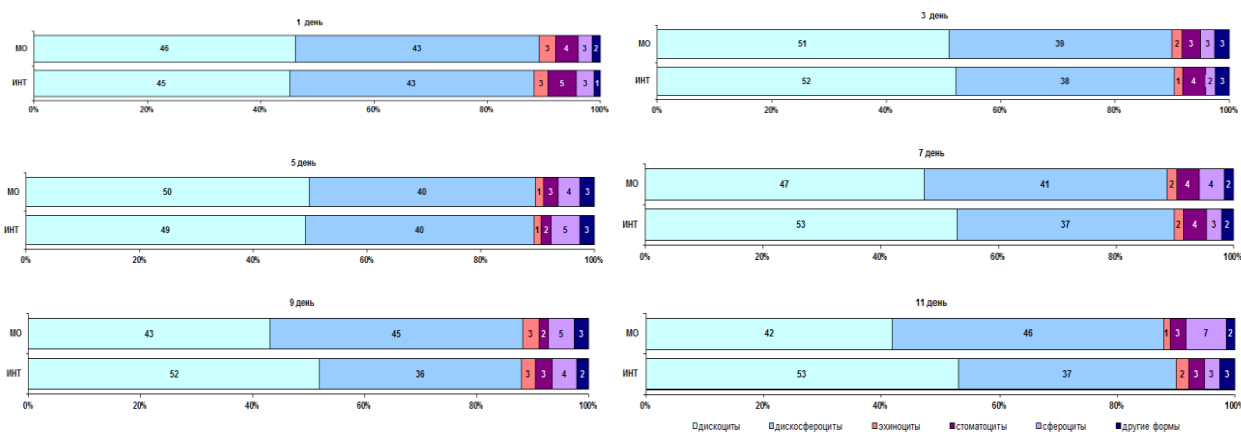
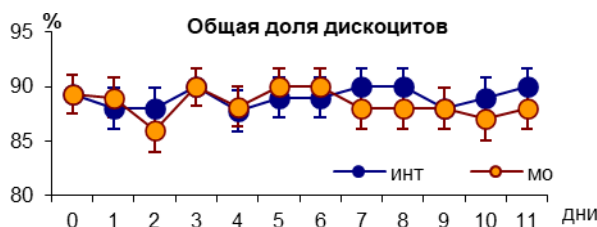


Рисунок 20 – Эритроциты в мазках крови крыс. А – интактная, Б – получавшая МО. 11 день эксперимента. Окраска по методу Лейшмана. Ув.: об. $\times 63$, ок. $\times 10$

При попарном сравнении частот тестом χ^2 в течение первой недели наблюдения значимых различий в содержании типичных и атипичных форм эритроцитов у животных двух групп также не выявлено (Рисунок 21А). С 7 дня и до конца опыта соотношение истинных дискоцитов и дискосфероцитов у крыс, получавших МО, менялось в сторону увеличения доли последних ($p < 0,01$). При этом общее количество дискоцитов оставалось практически одинаковым у интактных крыс и у животных, потреблявших МО, и варьировало в пределах ошибки измерения (Рисунок 21Б). Число атипичных форм эритроцитов было невелико. Статистически значимые различия между группами в содержании сфероцитов были зафиксированы лишь к 11 дню наблюдения ($p < 0,03$).



А



Б

Рисунок 21 – Соотношение эритроцитов разной формы (А) и общая доля дискоцитов (Б) в периферической крови интактных крыс (ИНТ) и у крыс, получавших масляную основу (МО). День «0» – начало введения МО, день 10 – последнее введение МО. Средние значения долей округлены до целого

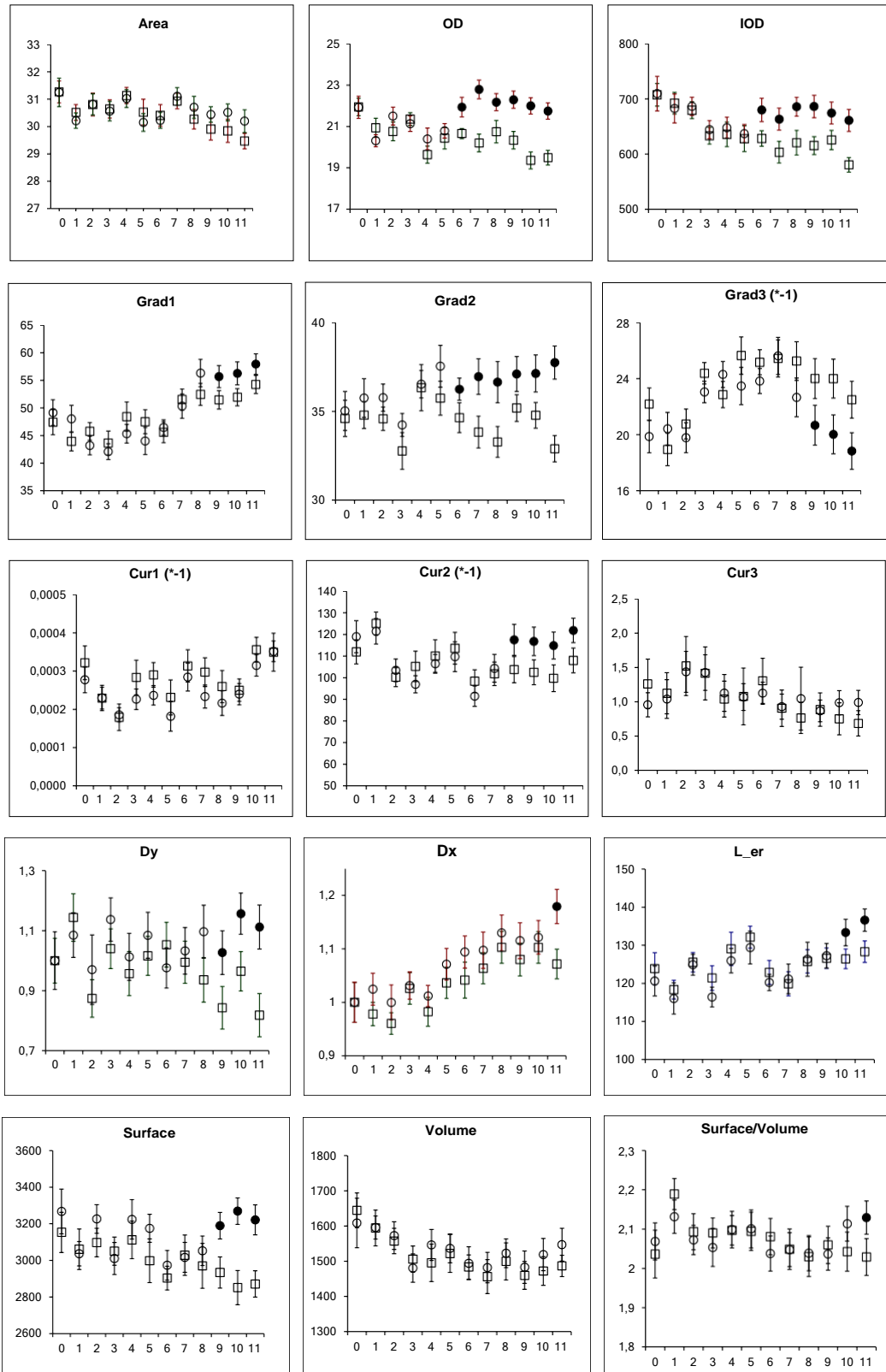


Рисунок 22 – Средние значения и доверительные интервалы (вертикальные отрезки) морфоденситометрических параметров дискоцитов у интактных крыс (прямоугольники) и у крыс, получавших МО (круги). Маркеры с заливкой указывают на значимые различия между группами ($p = 0,03 - 0,001$). Ось абсцисс – дни наблюдения: день 0 – начало введения МО, день 10 – последнее введение МО. Ось ординат – единицы измерения: Area – кв. мкм, остальные параметры – условные единицы

3.2.2. Морфоденситометрические параметры дискоцитов

В сравнении с интактными животными, у крыс, потреблявших МО, имели место изменения некоторых МДМ параметров дискоцитов, которые возникали с конца первой недели наблюдения в определенной последовательности (Рисунок 22). [24] Так, среди СМДМП наиболее рано – с 6 дня после начала введения МО значимо возрастали OD и IOD цитоплазмы клеток. При этом средние значения Area, Pallor и FF были сопоставимы с соответствующими показателями у интактных крыс на протяжении всего срока наблюдения. Отклонения средних значений этих параметров в группах находились в пределах доверительных интервалов.

Различия значений ПП дискоцитов в двух сравниваемых группах начали проявляться в основном в начале второй недели наблюдения, а по некоторым параметрам лишь на 9-11 сутки. Были зафиксированы изменения не всех, а лишь некоторых ПП дискоцитов. У крыс, потреблявших МО, увеличивались средние значения Grad1, Grad2 и снижались значения Grad3. Возрастала также величина показателя контрастности Du. Из параметров, описывающих профиль дискоцитов, заметно возрастали Cur2 и коррелирующая с ней L_er. В результате изменения длины профиля дискоцитов их Surface увеличивалась. При этом, поскольку Volume дискоцитов оставался практически неизменным, соотношение Surface/Volume в итоге возросло к 11 дню наблюдения. [24] Перечисленные факты свидетельствовали о возможном изменении формы дискоцитов, что было подтверждено при компьютерной реконструкции среднего 3D профиля клеток (Рисунок 23).

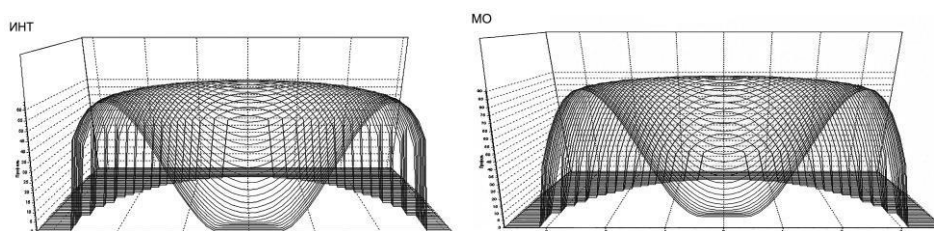


Рисунок 23 – Средний 3D профиль дискоцитов крыс интактной группы (инт.) и крыс, получавших масляную основу (мо). 11-й день эксперимента

3.3. Экспериментальная модель гипервитаминоза А

Одной из задач работы являлся выбор дозы РП, позволяющей за относительно короткий промежуток времени смоделировать состояние гипервитаминоза А. С этой целью использовали животных одного вида, пола и возраста – крыс самцов Вистар с исходной средней массой $128,3 \pm 2,5$ г, получавших ежедневно per os масляный раствор РП. Объем вводимого раствора РП с исходной концентрацией 180 000 МЕ/мл соответствовал дозам 0,41 мг/г, 0,64 мг/г и 0,82 мг/г.

Группы сравнения – интактные крысы и животные, получавшие МО.

Развитие гипервитаминоза А у крыс оценивали по характеру и времени появления описанных в литературе признаков токсического действия ретинола. Эти признаки были сходными у крыс всех экспериментальных групп. Однако время их появления, степень выраженности и доля животных с соответствующими симптомами в одни и те же дни эксперимента зависели от дозы РП (Таблица 11). Дозозависимое токсическое действие РП наглядно демонстрирует также динамика роста индексов гипервитаминоза А в разных группах экспериментальных животных (Рисунок 24).

Таблица 11 – Доля животных с признаками гипервитаминоза А в группах (n=6), получавших различные дозы РП (группа 1 – 0,41 мг/г, группа 2 – 0,64 мг/г, группа 3 – 0,82 мг/г), в соответствующие дни эксперимента

Признаки гипервитаминоза А	Экспериментальная группа	Дни эксперимента						
		5	6	7	8	9	10	11
Снижение двигательной активности	1			16,7	100	100	100	100
	2	66,7	83,3	100	100	100	100	100
	3	83,3	100	100	100	100	100	100
Изменение дыхания	1				16,7	83,3	100	100
	2	16,7	33,3	66,7	83,3	100	100	100
	3	16,7	50	83,3	83,3	100	100	100
Изменение шерстного покрова	1			16,7	33,3	50	83,3	100
	2	16,7	33,3	50	66,7	66,7	83,3	100
	3	50	83,3	83,3	100	100	100	100
Геморрагические изменения	1				16,7	66,7	100	100
	2			33,3	33,3	66,7	100	100
	3		16,7	50	83,3	100	100	100
Изменение экскрементов	1			16,7	33,3	66,7	83,3	83,3
	2			16,7	50	66,7	83,3	100
	3		16,7	33,3	66,7	83,3	100	100
Искривление конечностей и изменение походки	1					16,7	16,7	50
	2			16,7	33,3	66,7	83,3	83,3
	3			16,7	50	83,3	100	100
Гибель животных	1						-	-
	2						-	-
	3						16,7	33,3

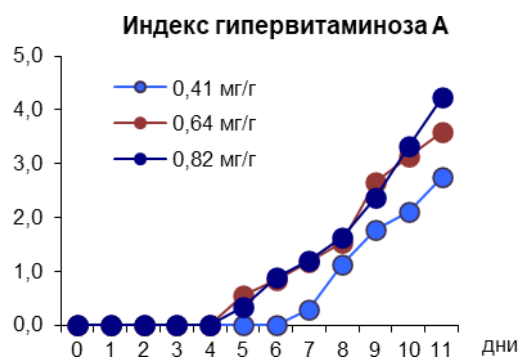


Рисунок 24 – Динамика изменений индексов гипервитаминоза А у крыс, получавших РП в разных дозах

В течение первых 4 дней эксперимента состояние крыс экспериментальных и контрольных групп не имело видимых различий. Первым проявлением развивающегося гипервитаминоза А были изменения поведенческих реакций животных, которые группировались в углу клетки, были мало активны и слабо реагировали на внешние раздражители. Эти изменения появились у части крыс, получавших РП в дозах 0,64 и 0,82 мг/г с 5 дня, а при дозе 0,41 мг/г – с 7 дня введения препарата.

Дополнительным критерием изменения состояния животных служило учащенное, а позже прерывистое дыхание. Этот симптом отмечен с 5 дня у крыс, получавших более высокие дозы РП (на 6 день – у половины животных при дозе 0,82 мг/г), а к 9 дню эксперимента стал характерным для всех животных данных групп. При дозе 0,41 мг/г подобная реакция наблюдалась лишь у части животных не ранее 8 дня опыта.

Признаками развивающегося гипервитаминоза А являлись также анорексия и задержка роста, что подтверждалось результатами учета суточного потребления корма (Таблица 12), а также массы тела животных (Таблица 13), проведенного на 7 и 11 дни эксперимента. В итоге, к концу опыта многие животные, особенно в группе, получавшей РП в дозе 0,82 мг/г, были истощены и заметно отличались по размерам от крыс контрольных групп (Рисунок 25).

Таблица 12 - Суточное потребление корма (г) крысами контрольных и экспериментальных групп

День эксперимента	Группа животных	Вес выданного корма	Потребление корма из расчета:	
			на группу	на одну крысу
7-й	интактные	500	340	56,7
	МО	500	335	55,8
	РП – 0,41 мг/г	500	310	51,7
	РП – 0,64 мг/г	500	295	49,2
	РП – 0,82 мг/г	500	270	45,0
11-й	интактные	600	365	60,8
	МО	600	370	61,7
	РП – 0,41 мг/г	600	305	50,8
	РП – 0,64 мг/г	600	245	40,8
	РП – 0,82 мг/г	600	250	41,7

Таблица 13 - Средняя масса тела (г) крыс контрольных и экспериментальных групп

Группы животных	Дни эксперимента		
	до введения РП	7-й	11-й
интактные	128,3 ± 2,5	162,0 ± 3,7 *	194,4 ± 4,1 *
МО	128,3 ± 2,5	166,7 ± 5,6 *	200,0 ± 5,3 *
РП – 0,41 мг/г	128,3 ± 2,5	120,8 ± 7,2	114,8 ± 5,2
РП – 0,64 мг/г	128,3 ± 2,5	112,7 ± 6,2 *	91,3 ± 3,8 *
РП – 0,82 мг/г	128,3 ± 2,5	107,5 ± 4,6 *	89,2 ± 5,5

* различия значимы с вероятностью 95% в сравнении с предыдущим днем взвешивания

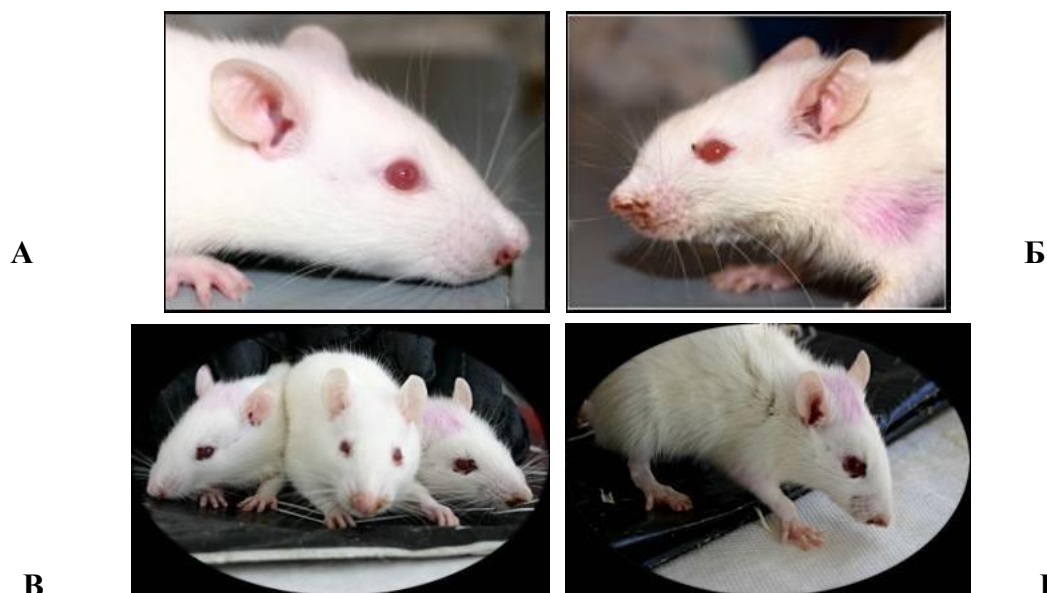


Рисунок 25. Внешний вид животных с признаками гипervитаминоза А: А – 7-й день; интактная крыса. Б – 7-й день; крыса, получавшая РП в дозе 0,82 мг/г. В – 11-й день; геморрагические корочки вокруг глаз у крыс, получавших РП в дозе 0,41 мг/г (слева) и в дозе 0,64 мг/г (справа); в центре – крыса группы сравнения, получавшая МО. Г – 11-й день; искривление передних и задних конечностей у крысы, получавшей РП в дозе 0,82 мг/г

С 5 дня введения РП в дозах 0,64 мг/г и 0,82 мг/г наблюдалось изменение шерстного покрова крыс. Изначально шерсть была вздыблена и на протяжении эксперимента постепенно приобретала неопрятный вид из-за загрязнения мочой и фекалиями. С 7-8 дня у части животных, а позже у большинства, отмечалось выпадение волос вокруг рта, носа и глаз. Позднее участки алопеции появлялись на горле, груди и внутренней поверхности передних лап. Подобные изменения возникали при дозе 0,41 мг/г с отставанием в 2-3 дня.

Избыточное потребление РП вызвало у крыс кровоизлияния и появление геморрагических корочек вокруг глаз, а также в области носа. При введении РП в дозе 0,82 мг/г геморрагические корочки были обнаружены у одной крысы уже на 6 день эксперимента (Рисунок 25Б). В последующем доля животных с таким симптомом в данной группе резко нарастала и к 9 дню составила 100%. У крыс, получавших РП в дозах 0,41 мг/г и 0,64 мг/г, геморрагии к 9 дню были обнаружены лишь в 66,7% случаев. К концу опыта этот симптом отмечался у всех животных (Рисунок 25В).

Характер экскрементов животных, получавших РП, претерпевал изменения. При введении препарата в дозе 0,82 мг/г у отдельных крыс с 6-7 дня, а затем и у остальных животных, кал становился размягченным. Через 1-2 дня после этого экскременты приобретали более жидкий характер с примесью слизи. При дозах 0,41 мг/г и 0,64 мг/г признаки диареи наблюдались у меньшего числа животных и в более поздние сроки.

Искривление конечностей и изменение походки (медленное и осторожное перемещение лап) было зафиксировано на 7 день наблюдения у отдельных крыс в группах, получавших РП в

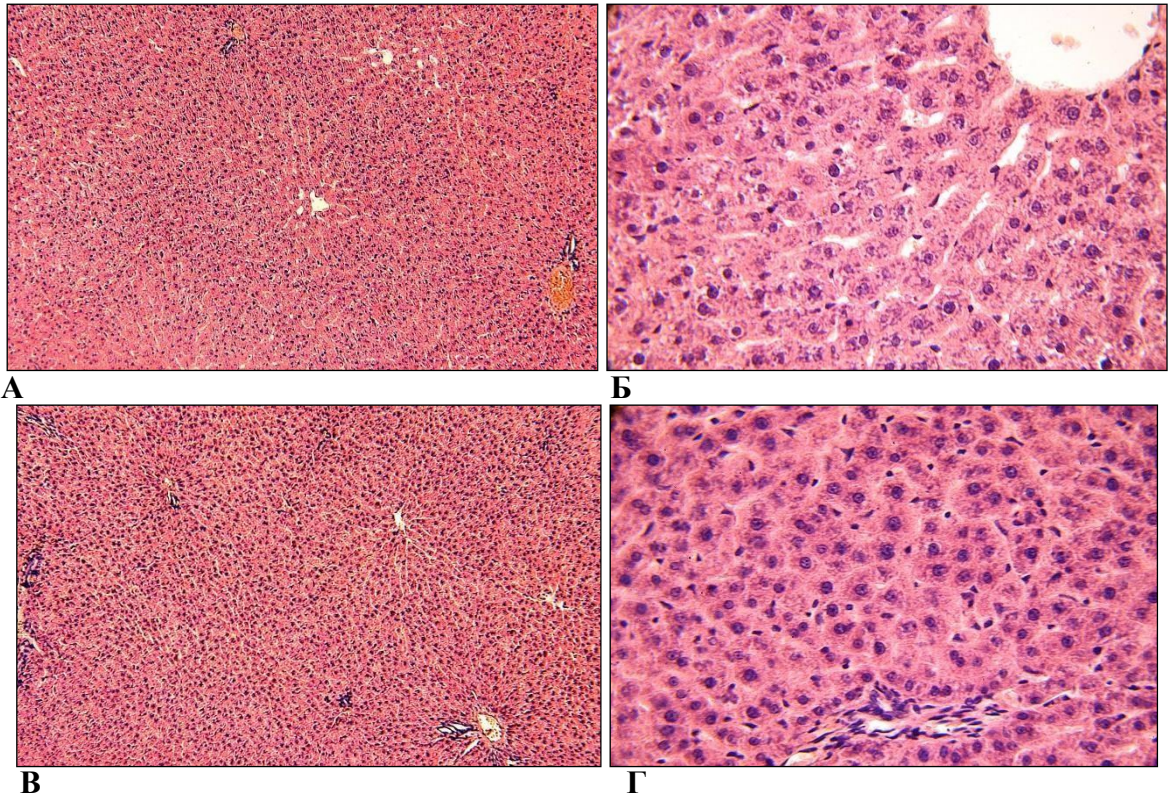


Рисунок 26 – Печень крыс интактной группы (А, Б) и группы сравнения, получавшей масляную основу (В, Г), 11-й день. Окраска гематоксилин-эозином. Ув.: А, В – об. $\times 10$, ок. $\times 10$; Б, Г – об. $\times 63$, ок. $\times 10$

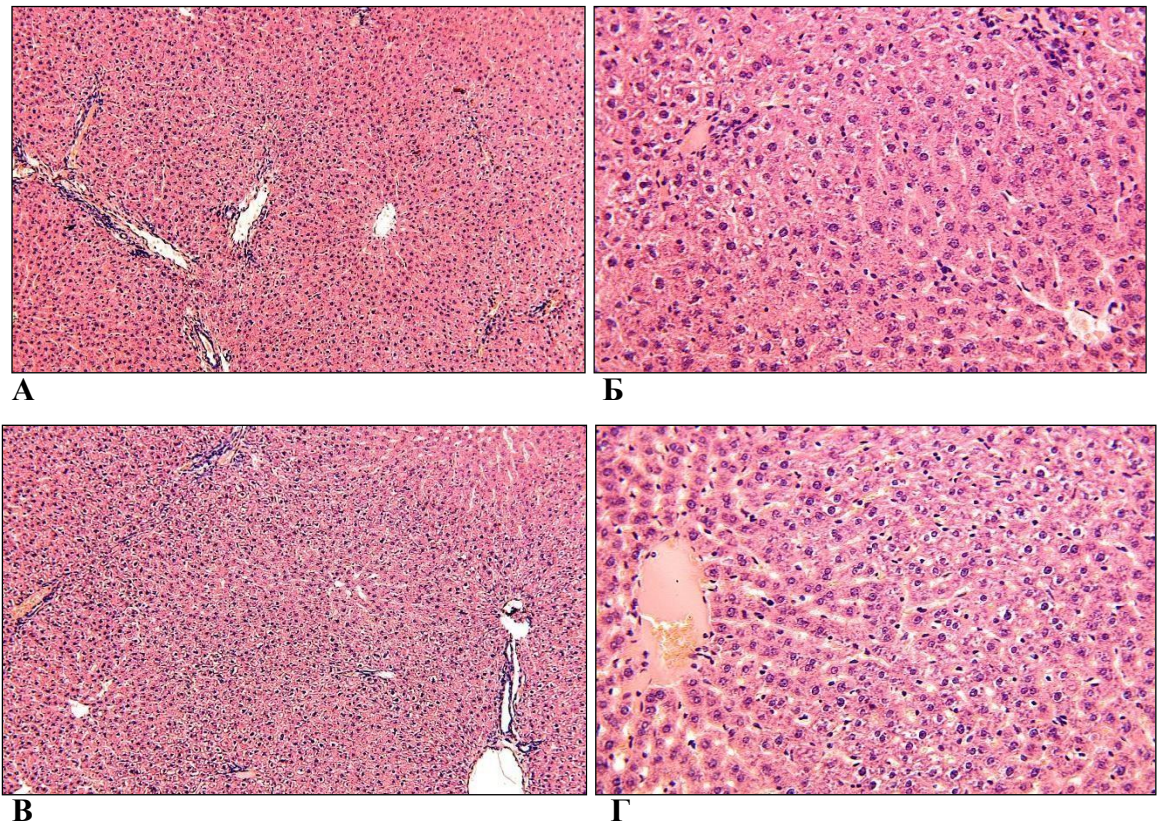


Рисунок 27 – Дистрофические изменения гепатоцитов у крыс, получавших РП в дозах: А, Б – 0,41 мг/г; В, Г – 0,82 мг/г; 11-й день. Окраска гематоксилин-эозином. Ув.: А, В – об. $\times 10$, ок. $\times 10$; Б, Г – об. $\times 40$, ок. $\times 10$

дозах 0,64 мг/г и 0,82 мг/г. В дальнейшем эти животные предпочитали сохранять неподвижность, а при ходьбе волочили одну либо обе задние конечности. К концу эксперимента подобный симптом проявлялся в той или иной мере у большинства (0,64 мг/г) либо у всех (0,82 мг/г) крыс этих групп (Рисунок 25Г). При введении РП в дозе 0,41 мг/г такая клиническая картина возникала к последнему дню опыта лишь у половины животных.

Все крысы, получавшие РП в дозах 0,41 мг/г и 0,64 мг/г, дожили до конца эксперимента. При использовании дозы 0,82 мг/г гибель животных к 11 дню опыта составила 33,3%, в результате чего эксперимент был прекращен.

При гистологическом исследовании образцов печени, полученных на 11 день наблюдения от интактных животных и крыс, получавших МО, различий в структуре органа выявлено не было, что свидетельствует об отсутствии заметного влияния на печень масляной основы (Рисунок 26).

Вместе с тем, в печени крыс экспериментальных групп были обнаружены признаки гидропической дистрофии гепатоцитов, локализованных преимущественно в перипортальных зонах долек (Рисунок 27). При дозе РП 0,41 мг/г подобные изменения были локальными, а у животных, получавших ретинола пальмитат в дозе 0,82 мг/г, имели генерализованный характер.

3.4. Морфология эритроцитов крыс, получавших ретинола пальмитат

Изменения морфологии эритроцитов были проанализированы в группах крыс, получавших РП в минимальной (0,41 мг/г) и максимальной (0,82 мг/г) дозах. Анализ производили на 7-й день опыта, когда признаки гипервитаминоза А только начали появляться у крыс, получавших РП в дозе 0,41 мг/г, а при дозах 0,64 мг/г и 0,82 мг/г эти признаки уже были достаточно выражены. Соответствующие характеристики эритроцитов оценивали также в конце эксперимента на 11-й день.

3.4.1. Распределение эритроцитов по форме

При визуальной оценке мазков крови эритроциты экспериментальных животных характеризовались уменьшением и ассиметричным расположением Pallor либо его отсутствием (Рисунок 28Б).

На 7 день введения РП в дозе 0,41 мг/г доля истинных дискоцитов составляла $33,2 \pm 1,9\%$, дискофероцитов – $42,0 \pm 2,0\%$, эхиноцитов – $2,9 \pm 0,7\%$, стоматоцитов – $4,6 \pm 0,9\%$, сфероцитов $15,5 \pm 1,5\%$, других форм – $1,8 \pm 0,5\%$. При дозе 0,82 мг/г эти показатели равнялись соответственно $28,5 \pm 1,8\%$, $38,5 \pm 2,0\%$, $3,1 \pm 0,7\%$, $6,7 \pm 1,0\%$, $14,5 \pm 1,4\%$ и $8,7 \pm 1,2\%$.

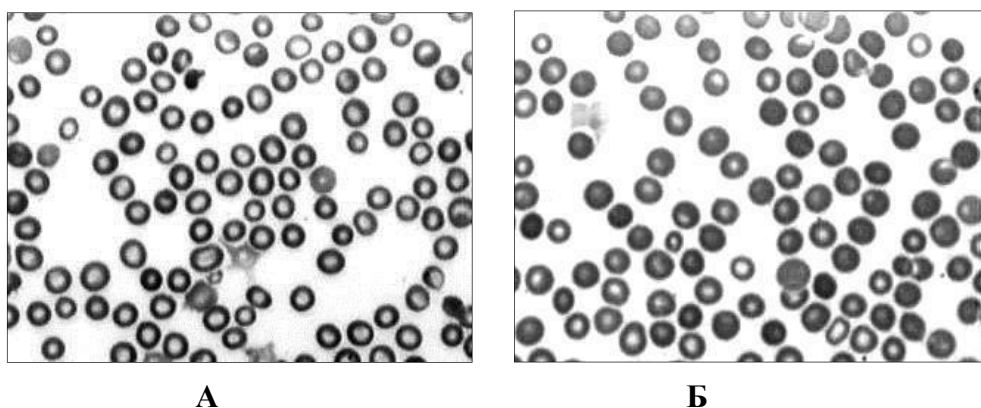


Рисунок 28 – Эритроциты в мазках крови крыс, получавших МО (А) и РП в дозе 0,82 мг/г (Б) на 11 день эксперимента. Окраска по методу Лейшмана. Ув.: об. × 63, ок. × 10

В этот срок наблюдения у крыс экспериментальных групп, в сравнении с животными, получавшими МО, имело место увеличение относительного содержания атипичных форм эритроцитов с одновременным уменьшением долей истинных дискоцитов и дискосфероцитов, как по отдельности, так и в суммарном выражении (Рисунок 29). Так, суммарная доля дискоцитов и дискосфероцитов у крыс контрольной группы равнялась $87,2 \pm 1,9\%$. При введении РП в дозах 0,41 мг/г и 0,82 мг/г этот показатель прогрессивно и статистически значимо снижался и составлял соответственно $75,2 \pm 1,8\%$ ($p < 0,02$) и $68,0 \pm 1,9\%$ ($p < 0,01$). При использовании РП в дозе 0,41 мг/г статистическую значимость ($p < 0,03$) в этот срок наблюдения имели различия в содержании сфероцитов. При дозе 0,82 мг/г значимые различия между экспериментальной группой и группой сравнения были характерны для дискоцитов ($p < 0,01$), сфероцитов ($p < 0,04$) и других форм эритроцитов ($p < 0,03$).

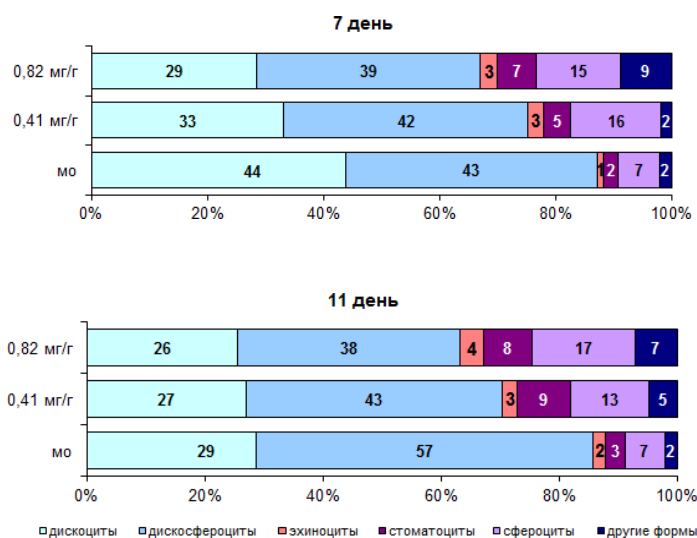


Рисунок 29 – Соотношение эритроцитов разной формы у крыс, получавших РП в дозах 0,41 мг/г и 0,82 мг/г, и в контроле (мо) на 7 и 11 дни опыта. Средние значения долей округлены

На 11 день доля истинных дискоцитов у крыс, получавших РП в дозе 0,41 мг/г, была равной $27,0 \pm 1,8\%$, дискосфероцитов – $43,4 \pm 2,0\%$, эхиноцитов – $2,6 \pm 0,6\%$, стоматоцитов – $9,1 \pm 1,2\%$, сфероцитов $13,2 \pm 1,4\%$, других форм эритроцитов – $4,7 \pm 0,9\%$. Значимые различия с группой сравнения отмечались в количестве дискосфероцитов ($p < 0,02$) и стоматоцитов ($p < 0,01$). При использовании дозы 0,82 мг/г относительное содержание эритроцитов разной формы составило соответственно $25,7 \pm 1,8\%$; $37,6 \pm 2,0\%$; $3,9 \pm 0,8\%$; $8,3 \pm 1,1\%$; $17,4 \pm 1,5\%$ и $7,1 \pm 1,0\%$. В сравнении с контролем, статистическую значимость имели отклонения в содержании дискосфероцитов ($p < 0,01$), стоматоцитов ($p < 0,03$), сфероцитов ($p < 0,03$) и других форм ($p < 0,05$). Наряду с уменьшением относительного содержания истинных дискоцитов и дискосфероцитов имело место снижение их суммарного числа. Так, при использовании дозы 0,41 мг/г общее число истинных дискоцитов и дискосфероцитов равнялось в этот период наблюдения $70,4 \pm 2,0\%$, а при дозе 0,82 мг/г – $63,3 \pm 1,8\%$. Это снижение было значимым ($p < 0,01$) по отношению к аналогичному показателю у крыс группы сравнения – $85,7 \pm 1,9\%$.

3.4.2. Стандартные морфоденситометрические параметры дискоцитов

На 7 день введения РП в дозе 0,41 мг/г и 0,82 мг/г значения Area дискоцитов характеризовалась тенденцией к снижению, однако еще не имели значимых отличий от группы сравнения. К 11 дню это снижение приобрело в обеих группах статистически значимый характер.

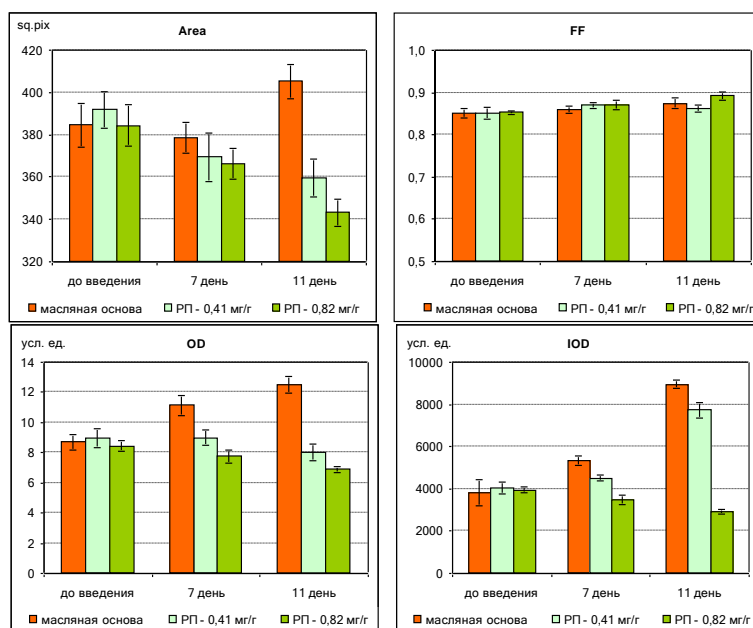


Рисунок 30 – Средние значения СМДМП дискоцитов крыс, получавших РП в дозах 0,41 мг/г и 0,82 мг/г, и в группе сравнения (мо) на 7 и 11 дни эксперимента

Таблица 14 – Значимость различий СМДМП дискоцитов крыс, получавших РП в дозах 0,41 мг/г и 0,82 мг/г, на 7 и 11 дни эксперимента в сравнении с контрольной группой (тест Колмогорова-Смирнова для двух выборок)

Параметры	7 день		11 день	
	Kolmogorov-Smirnov Z	Asymp. Sig. (2-tailed)	Kolmogorov-Smirnov Z	Asymp. Sig. (2-tailed)
РП 0,41 мг/г				
Area	0,94	0,34	1,38	0,05
Pallor	8,18	0,00	6,86	0,00
FF	0,79	0,57	1,28	0,08
Od	2,57	0,00	4,16	0,00
Iod	2,42	0,00	2,70	0,00
РП 0,82 мг/г				
Area	1,20	0,12	1,72	0,01
Pallor	5,11	0,00	4,76	0,00
FF	0,94	0,34	1,45	0,03
Od	3,38	0,00	6,37	0,00
Iod	2,78	0,00	5,20	0,00

Таблица 15 – Значимость различий СМДМП дискоцитов между группами крыс, получавших РП в дозах 0,41 мг/г и 0,82 мг/г, на 7 и 11 дни эксперимента (тест Колмогорова-Смирнова для двух выборок)

Параметры	7 день		11 день	
	Kolmogorov-Smirnov Z	Asymp. Sig. (2-tailed)	Kolmogorov-Smirnov Z	Asymp. Sig. (2-tailed)
Area	0,74	0,64	1,37	0,05
Pallor	1,50	0,02	5,32	0,00
FF	1,10	0,18	1,79	0,00
Od	2,08	0,00	2,85	0,00
Iod	2,43	0,00	3,40	0,00

Таблица 16 – Дисперсия СМДМП дискоцитов крыс ($\lg \sigma^2$), получавших МО и РП в дозах 0,41 мг/г и 0,82 мг/г на 7 и 11 дни эксперимента

Параметры	7 день			11 день		
	МО	0,41 мг/г	0,82 мг/г	МО	0,41 мг/г	0,82 мг/г
Area	3,71	3,59	3,53	3,61	3,37	3,32
Pallor	1,14	1,10	1,06	1,08	1,07	1,04
Od	2,78	1,32	1,20	2,75	1,08	0,30
Iod	4,99	4,48	4,44	4,91	4,23	4,63

В результате постепенного нарастания в крови доли дискоферритов, характеризующихся в сравнении с истинными дискоцитами меньшей площадью пэллора, суммарные средние значения Pаллог были существенно ниже на 7 и 11 день (Рисунок 31, Таблица 14). Через 7 суток введения препарата как в дозе 0,41 мг/г, так и в дозе 0,82 мг/г FF дискоцитов не имел отличий от показателей в группе сравнения. На 11 день данный параметр возрос у крыс, получавших препарат в дозе 0,82 мг/г.

Значения оптических параметров дискоцитов уменьшились в обеих экспериментальных группах уже на 7 день введения РП. На 11 день эти параметры были также значительно ниже показателей у крыс, получавших МО (Рисунок 31, Таблица 14). Выраженность изменений зависела от дозы и длительности введения РП. Так, Od цитоплазмы дискоцитов при дозе 0,41 мг/г составила на 7 и 11 день 81% и 64% от уровня в контрольной группе, а при дозе 0,82 мг/г – 70% и 55% соответственно. Сходным образом менялась и Iod дискоцитов. На 7 и 11 день эксперимента этот показатель равнялся 85% и 66% от уровня контроля при дозе 0,41 мг/г, а при дозе 0,82 мг/г – 86% и 33%. Дозозависимый эффект РП подтверждается наличием статистически значимых отличий средних значений СМДМП дискоцитов у животных двух экспериментальных групп (Таблица 15).

Характерно, что у крыс обеих экспериментальных групп дисперсия СМДМП дискоцитов была ниже, чем в группе сравнения (Таблица 16).

3.4.3. Параметры профиля дискоцитов

В сравнении с группой крыс, получавшей МО, введение РП в дозе 0,41 мг/г в течение 7 дней вызывало уменьшение соотношения Grad1/Grad2, Dy и Volume дискоцитов. Последнее обусловило изменение соотношения Surface/Volume. При использовании дозы 0,82 мг/г снижалась также величина Radius, изменялись значения Grad1, Grad2, Cur2, L_er и Surface дискоцитов. Все перечисленные изменения параметров дискоцитов имели статистически значимый характер (Рисунок 31, Таблица 17).

На 11 день введения РП в дозе 0,41 мг/г число параметров, значимо отличавшихся от показателей в группе сравнения, возросло. Если при введении МО отмечалось некоторое увеличение Surface и Volume дискоцитов, то в условиях избытка РП наблюдалась обратная тенденция. В этом случае значения Surface и Volume клеток характеризовались статистически значимым снижением. При использовании дозы 0,82 мг/г, практически все параметры, характеризующие профиль дискоцитов (исключая Grad1 и Dx), достоверно отличались от соответствующих показателей у животных контрольной группы (Рисунок 31, Таблица 17).

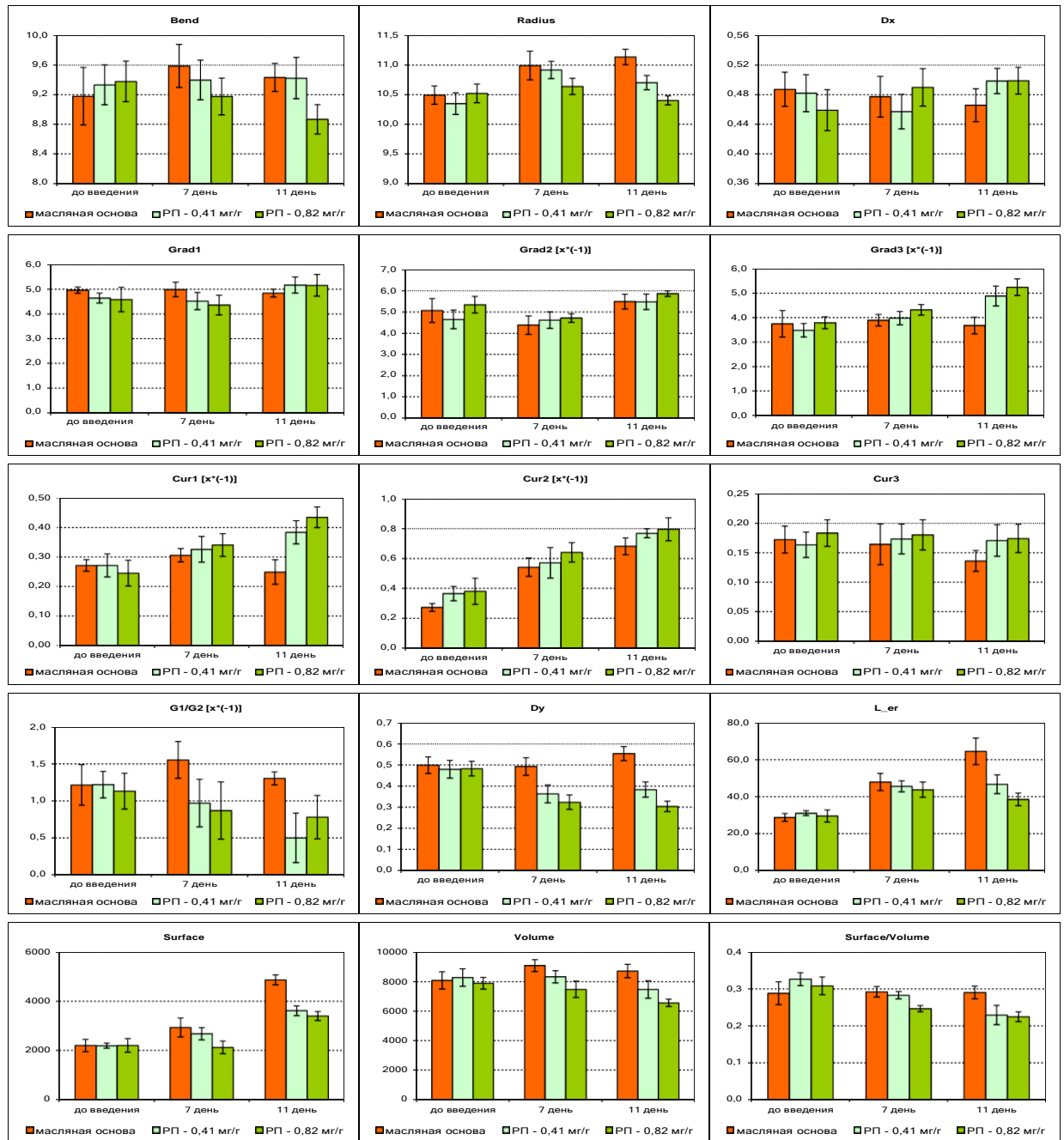


Рисунок 31 – Средние значения ПП дискоцитов крыс, получавших РП в дозах 0,41 мг/г и 0,82 мг/г, и в группе сравнения на 7 и 11 дни эксперимента. Ось ординат – усл. единицы

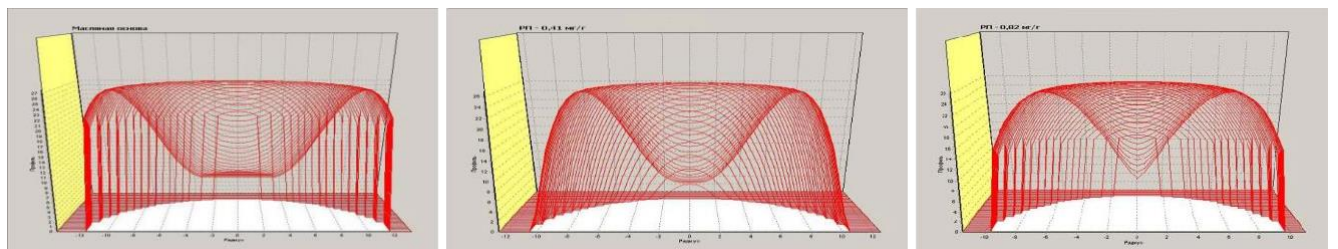


Рисунок 32 – Средний 3D профиль дискоцитов крыс, получавших МО (слева) и РП в дозах 0,41 мг/г (в центре) и 0,82 мг/г (справа), на 11 день эксперимента

Таблица 17 – Значимость различий ПП дискоцитов крыс, получавших РП в дозах 0,41 мг/г и 0,82 мг/г, на 7 и 11 дни эксперимента в сравнении с контрольной группой (тест Колмогорова-Смирнова для двух выборок)

Параметры	7 день				11 день			
	0,41 мг/г		0,82 мг/г		0,41 мг/г		0,82 мг/г	
	Z	Sig.	Z	Sig.	Z	Sig.	Z	Sig.
Bend	1,33	0,06	1,14	0,15	1,23	0,10	2,30	0,00
Radius	0,71	0,69	1,74	0,01	1,01	0,26	1,41	0,04
Grad1	1,27	0,08	2,05	0,00	1,15	0,10	1,26	0,08
Grad2	1,36	0,06	1,11	0,16	1,16	0,10	2,26	0,00
Grad3	1,00	0,27	0,95	0,33	1,38	0,04	2,26	0,00
Cur1	0,81	0,53	0,91	0,38	1,65	0,01	1,47	0,03
Cur2	1,27	0,08	1,64	0,01	1,48	0,03	1,53	0,02
Cur3	0,95	0,33	0,95	0,33	0,93	1,27	1,93	0,00
G1/G2	1,37	0,05	1,98	0,00	1,73	0,01	1,72	0,01
Dy	1,99	0,00	2,50	0,00	2,58	0,00	3,19	0,00
Dx	0,79	0,57	1,10	0,18	1,17	1,31	1,12	0,08
L_er	1,29	0,07	2,19	0,00	2,04	0,00	1,86	0,00
Surface	1,09	0,19	1,96	0,00	1,64	0,01	1,64	0,01
Volume	2,25	0,00	2,68	0,00	2,61	0,00	5,13	0,00
Surf/Vol	1,37	0,04	2,80	0,00	2,65	0,00	5,12	0,00

Таблица 18 – Дисперсия ПП дискоцитов крыс ($\lg \sigma^2$), получавших МО и РП в дозах 0,41 мг/г и 0,82 мг/г на 7 и 11 дни эксперимента

Параметры	7 день			11 день		
	МО	0,41 мг/г	0,82 мг/г	МО	0,41 мг/г	0,82 мг/г
Bend	0,72	0,54	0,53	0,60	0,56	0,52
Radius	0,08	0,00	0,05	0,05	0,15	0,30
Grad1	1,53	1,04	0,90	1,60	1,28	0,78
Grad2	0,86	0,48	0,23	1,14	0,92	-0,10
Grad3	1,41	1,16	0,74	0,95	0,56	0,34
Cur1	0,80	1,00	1,05	0,49	1,15	1,22
Cur2	0,12	0,29	0,68	0,17	0,43	0,55
Cur3	0,64	1,40	1,70	1,40	1,70	1,52
G1/G2	2,15	1,26	1,64	1,23	0,70	1,65
Dy	1,24	1,24	1,06	1,28	1,21	0,87
Dx	1,42	1,59	1,51	1,46	1,54	1,68
L_er	3,14	3,09	2,55	3,37	2,64	2,28
Surface	6,86	6,46	6,47	7,03	6,85	6,20
Volume	5,62	5,37	5,17	5,67	5,47	5,34

Изменение площади и формы пэллора дискоцитов, наблюдаемое при компьютерной реконструкции 3D профиля дискоцитов, подтверждает воздействие РП на эритроциты (Рисунок 32).

Как и в случае СМДМП, дисперсия ПП дискоцитов при введении РП менялась однонаправленно (Таблица 18). Для большинства из них было характерно уменьшение варибельности. Вместе с тем, дисперсия показателей кривизны различных участков профиля дискоцитов и показателя формы на фоне введения РП становилась более выраженной.

3.5. Динамика морфологических изменений эритроцитов крыс, получавших ретинола пальмитат в дозе 0,64 мг/г

В данном эксперименте анализировали динамику изменений эритроцитов на протяжении 11 дней наблюдения и сопоставляли ее с хронологией возникновения и прогрессирования симптомов гипервитаминоза А.

3.5.1. Масса тела и состояние животных, получавших ретинола пальмитат

Симптоматика гипервитаминоза А и сроки возникновения симптомов передозировки РП соответствовали картине, наблюдавшейся в первом эксперименте (Таблицу 19 и Таблицу 11).

Таблица 19 – Динамика развития признаков гипервитаминоза А у крыс, получавших РП в дозе 0,64 мг/г, (указана доля животных с соответствующими признаками)

Признаки гипервитаминоза А	Дни эксперимента						
	5	6	7	8	9	10	11
снижение активности, изменение дыхания	8,3	16,7	33,3	58,3	100	100	100
изменение шерстного покрова, алопеция		16,7	41,7	50	58,3	66,7	83,3
изменение фекалий, диарея			16,7	41,7	66,7	83,3	91,7
геморрагии			16,7	25	58,3	91,7	100
изменение походки				16,7	33,3	75	91,7

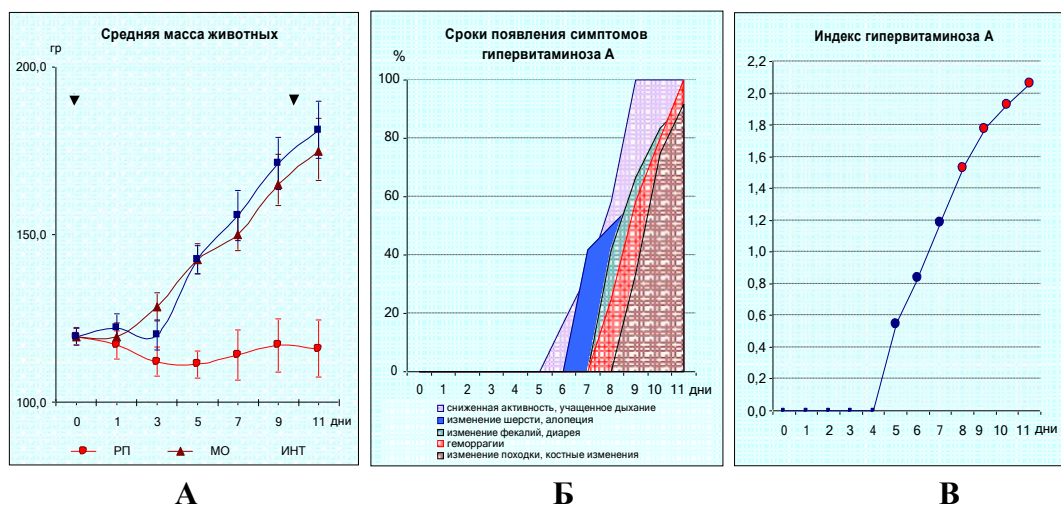


Рисунок 33 – А – динамика изменения массы тела крыс экспериментальной и контрольных групп. Б – сроки появления и динамика нарастания симптомов гипервитаминоза А у крыс, получавших РП в дозе 0,64 мг/г (ось ординат – доля животных). В – индекс гипервитаминоза А: синие маркеры – начальные признаки гипервитаминоза А, красные маркеры – симптоматика подострого токсического действия РП

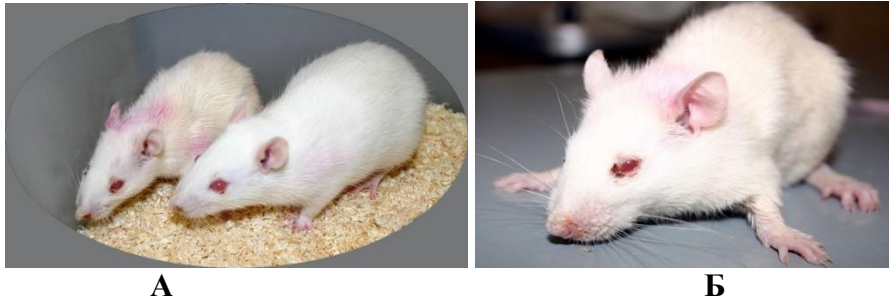


Рисунок 34 – Внешний вид животных на 11 день введения РП в дозе 0,64 мг/г. А – слева крыса экспериментальной группы, справа крыса группы сравнения (МО). Б – кахексия, гемorragии, искривление конечностей у крысы экспериментальной группы

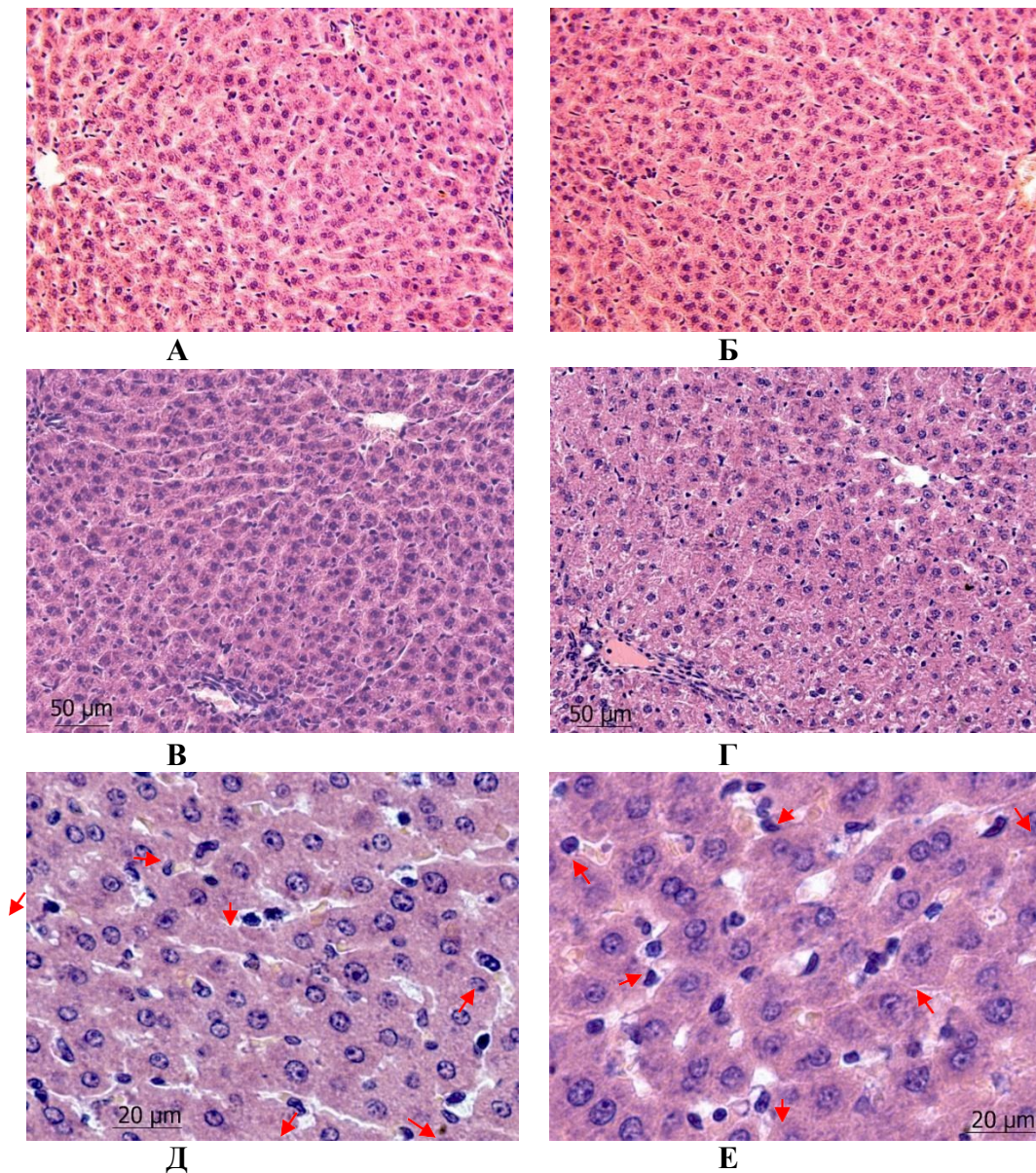


Рисунок 35 – Печень крыс, получавших МО (А, В) и РП в дозе 0,64 мг/г (Б, Г, Д, Е). А, Б – 7-й день; В, Г, Д, Е – 11-й день эксперимента. Окраска гематоксилин-эозин. Ув.: А, Б, В, Г – об. $\times 20$, ок. $\times 10$; Д, Е – об. $\times 63$, ок. $\times 10$. Дистрофические изменения гепатоцитов перипортальных зон печеночных долек (Г), уплотнение и гипертрофия ядер клеток перисинусоидальных пространств и стенок синусоидных капилляров (Д, Е)

Снижение массы тела крыс, получавших РП, было зафиксировано на 5 день наблюдения. В последующем масса тела животных оставалась ниже показателей в контрольных группах (Рисунок 33 А). Между 5 и 7 днем введения РП отмечалось снижение двигательной активности, изменение дыхания и шерстного покрова. После 7 суток у отдельных животных, а к 11 дню – практически у всех, появились симптомы подострого токсического действия РП – ослизнение кала с последующей диареей, геморрагии, алопеция, искривление конечностей и изменение походки (Таблица 19, Рисунок 33Б). Прогрессивную тенденцию развития такой симптоматики отражает индекс динамики гипервитаминоза А (Рисунок 33В). К концу эксперимента внешний вид животных, получавших РП, и животных группы сравнения резко отличался (Рисунок 34).[31]

К 7 дню введения РП структура печени животных экспериментальной группы не имела видимых различий с группой сравнения (Рисунок 35А,Б). На 11 день гепатоциты перипортальных зон печеночных долек характеризовались наличием выраженных признаков дистрофии (Рисунок 35 В, Г). Наблюдалось также уплотнение и гипертрофия клеточных ядер, расположенных в стенках внутридольковых капилляров и/или в перисинусоидальных пространствах (Рисунок 35 Д, Е). Здесь же отмечалось наличие клеток с ячеистой цитоплазмой.

3.5.2. Сопоставление морфологических изменений эритроцитов при введении ретинола пальмитата со степенью выраженности гипервитаминоза А

Изменения морфологии эритроцитов, характеризующие их реакцию на избыток РП, а также варьирование тех же параметров у животных группы сравнения на протяжении эксперимента, представлены ниже на графиках в виде относительных показателей – индексов динамики (ИД). Степень выраженности симптомов, возникающих при избытке ретинола, иллюстрируется относительным показателем – индексом гипервитаминоза А (ИГА). На кривой этого индекса синие маркеры соответствуют времени появления начальных проявлений гипервитаминоза А, а красные – периоду развития подострых токсических эффектов РП. Вертикальной пунктирной линией обозначен день регистрации первых симптомов гипервитаминоза А у отдельных животных.

Динамика численности разных форм эритроцитов. До 4 дня эксперимента включительно статистически значимых различий в соотношении учитываемых форм эритроцитов у крыс, получавших РП, в сравнении с крысами, получавшими МО, выявлено не было (Таблица 20, Рисунки 36 и 37).

Таблица 20 – Значимость различий относительного содержания форм эритроцитов у крыс, получавших РП в дозе 0,64 мг/г и МО (попарное сравнение частот тестом χ^2)

Формы эритроцитов	Дни эксперимента							
	4	5	6	7	8	9	10	11
все дискоциты	0,40	0,03	0,03	0,00	0,02	0,01	0,00	0,00
в т.ч истинные дискоциты	0,23	0,17	0,11	0,01	0,03	0,05	0,03	0,05
в т.ч дискосфероциты	0,32	0,42	0,56	0,44	0,40	0,48	0,05	0,00
сфероциты	0,25	0,02	0,03	0,00	0,01	0,03	0,02	0,00
стоматоциты	0,36	0,51	0,34	0,61	0,26	0,03	0,00	0,01
эхиноциты	0,69	0,50	0,36	0,46	0,19	0,37	0,39	0,01
другие формы	0,50	0,69	0,68	0,32	0,51	0,51	0,18	0,19

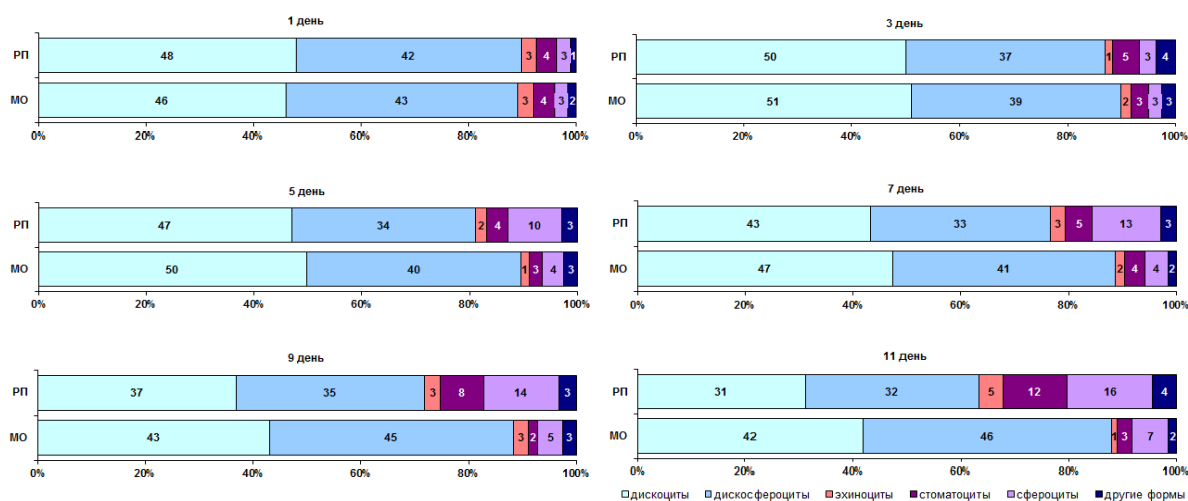


Рисунок 36 – Соотношение эритроцитов разной формы в периферической крови крыс, получавших МО и РП в дозе 0,64 мг/г. Значения долей округлены до целого

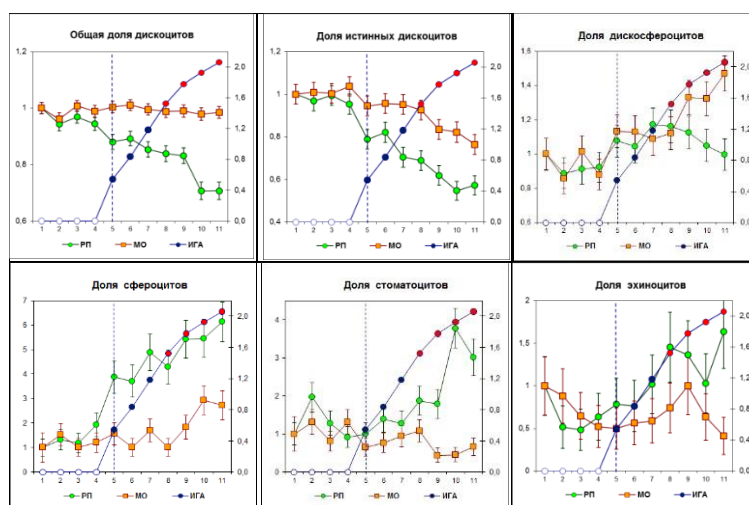


Рисунок 37 – Индекс гипервитаминоза А и динамика изменений относительного содержания разных форм эритроцитов у крыс, получавших РП в дозе 0,64 мг/г. Ось абсцисс – дни эксперимента, оси ординат: левая – ИД, правая – ИГА

Начиная с 5 дня и до окончания опыта, у крыс экспериментальной группы наблюдалось прогрессивное и значимое снижение общей доли дискоцитов и одновременное увеличение относительного содержания сфероцитов. Уменьшение общего числа дискоцитов происходило преимущественно за счет истинных дискоцитов. Доля дискосфероцитов практически не менялась и достоверно снизилась лишь к концу опыта – на 10-11 день. С 9 дня имело место значимое увеличение доли стоматоцитов, а к концу опыта – эхиноцитов.[31]

Снижение общего числа дискоцитов с одновременным уменьшением доли истинных дискоцитов в условиях введения РП совпало по времени с началом развития гипервитаминоза А (5 день) и прогрессировало по мере развития данного состояния (Рисунок 37). Аналогичные временные соотношения с индексом гипервитаминоза А имела динамика изменений относительного содержания сфероцитов. Отклонения числа других атипичных форм эритроцитов от уровня контроля наблюдались лишь в период возникновения и развития токсических эффектов РП. В сравнении с эхиноцитами, значимое увеличение доли стоматоцитов возникало раньше и темпы прироста их числа были выше.

Динамика изменений стандартных морфоденситометрических параметров дискоцитов. В течение первой недели эксперимента динамика изменений Area дискоцитов у крыс, получавших РП, и у животных контрольной группы была однонаправленной и не имела существенных различий. С 6 по 11 день у животных экспериментальной группы наблюдалось прогрессивное статистически значимое уменьшение этого показателя (Таблица 21, Рисунок 38). Средние значения FF дискоцитов и динамика изменений данного параметра на протяжении опыта практически не отличались у контрольных и экспериментальных крыс. Изменения оптических параметров дискоцитов на фоне введения РП были зафиксированы на 5- 6 день наблюдения. С этого момента значения Od и Iod достоверно снижались и до конца эксперимента оставались более низкими, чем у крыс группы сравнения (Таблица 21, Рисунок 38)[31].

Таблица 21 – Значимость различий СМДМП дискоцитов между группой крыс, получавших РП в дозе 0,64 мг/г и МО (тест Колмогорова-Смирнова для двух выборок)

Параметры	Дни эксперимента										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
СМДМП											
Area	0,46	0,41	0,11	0,16	0,25	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
FF	0,57	0,83	0,07	0,78	0,23	0,41	0,19	0,24	0,07	0,11	0,00
Od	0,37	0,17	0,56	0,62	0,17	0,01	0,02	0,04	0,01	0,02	0,00
Iod	0,12	0,16	0,41	0,06	0,00	0,00	0,00	0,02	0,02	0,00	0,00

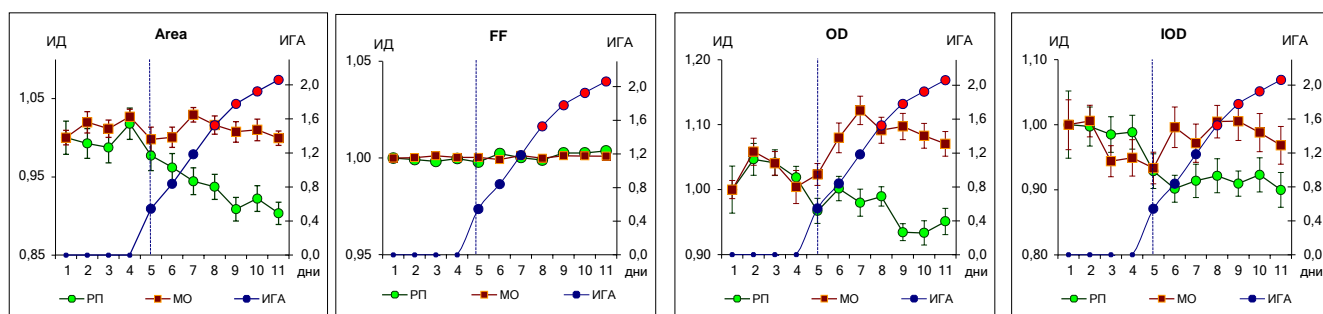


Рисунок 38 – Индекс гипервитаминоза А (ИГА) и индексы динамики (ИД) изменений СМДМП дискоцитов крыс, получавших РП в дозе 0,64 мг/г

При сопоставлении динамики изменений Area, Od и Iod дискоцитов с индексом гипервитаминоза А установлено, что значимые различия средних значений этих параметров от показателей в группе сравнения возникали одновременно с появлением первых признаков гипервитаминоза А (5-6 день). Общий тренд изменений данных параметров на фоне избытка РП существенно отличался от показателей контрольной группы и указывал на прогрессивное снижение их средних значений. В отношении FF какой-либо динамики, отражающей степень тяжести гипервитаминоза А, выявлено не было (Рисунок 38).

Динамика изменений параметров профиля дискоцитов. У крыс, получавших РП, на были выявлены статистически значимые отклонения средних значений ПП дискоцитов от данных, полученных для животных группы сравнения (Таблица 22).

Таблица 22 – Значимость различий ПП дискоцитов между группой крыс, получавших РП в дозе 0,64 мг/г и МО (тест Колмогорова-Смирнова для двух выборок)

Параметры	Дни эксперимента										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Bend	0,10	0,08	0,12	0,27	0,47	0,52	0,09	0,77	0,05	0,00	0,04
Radius	0,96	0,88	0,96	0,48	0,86	0,00	0,99	0,05	0,00	0,03	0,00
Grad1	0,05	0,30	0,02	0,03	0,00	0,00	0,00	0,59	0,89	0,71	0,96
Grad2	0,23	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,77	0,51	0,51	0,73	0,04
Grad3	0,77	0,21	0,00	0,00	0,01	0,00	0,63	0,01	0,00	0,00	0,00
Cur1	0,73	0,23	0,45	0,09	0,07	0,10	0,04	0,00	0,00	0,02	0,00
Cur2	0,29	0,51	0,02	0,00	0,01	0,00	0,78	0,68	0,32	0,99	0,27
Cur3	0,31	0,36	0,06	0,64	0,05	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00
G1/G2	0,48	0,86	0,07	0,88	0,27	0,46	0,13	0,20	0,05	0,23	0,02
Dy	1,00	0,51	0,03	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
Dx	0,44	0,12	0,16	0,40	0,26	0,06	0,09	0,59	0,09	0,92	0,07
L_er	0,96	0,08	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
Surface	0,17	0,23	0,00	0,02	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
Volume	0,43	0,25	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,03	0,01	0,00	0,03
Surface/Volume	0,51	0,96	0,75	0,51	1,00	0,12	0,16	0,10	0,00	0,03	0,00

Направленность и динамика изменений различных параметров были неодинаковы (Рисунок 39).

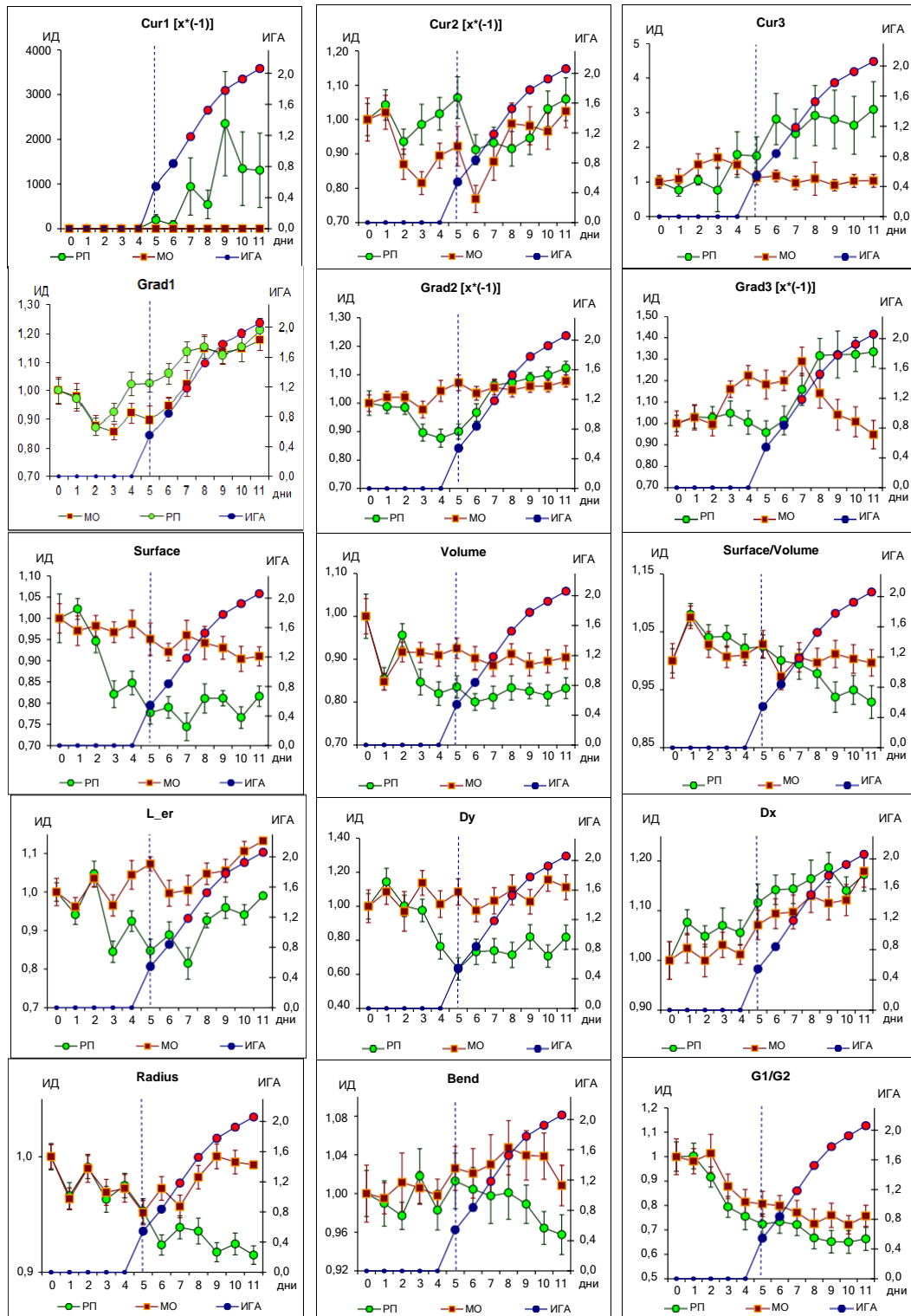


Рисунок 39 – Индекс гипervитаминоза А (ИГА) и индексы динамики (ИД) изменений параметров профиля дискоцитов крыс, получавших РП в дозе 0,64 мг/г

Прежде всего, это касалось кривизны и градиента оптической плотности различных участков профиля дискоцитов. Так, в первые дни эксперимента средние значения Cur1 были близки в контрольной и экспериментальной группе, но с 7 дня опыта этот параметр у крыс, получавших РП, начал существенно увеличиваться. Напротив, значения Cur2 нарастали в интервале с 3 дня по 6 день наблюдения, а в последующем были сопоставимы с показателями контрольной группы. Величина Cur3 значимо нарастала в сравнении с контролем только после 5 дня опыта. Значения Grad1 возрастали, а Grad2 и Grad3 снижались в интервале с 3 дня по 6-7 дни наблюдения. В последующем средние значения Grad1 и Grad2 были сопоставимы с показателями в контрольной группе, а величина Grad3 существенно нарастала. Ряд параметров, описывающих профиль дискоцитов (Surface, Volume, L_er, Dy, Bend, Radius), характеризовались прогрессивным снижением их средних значений по отношению к контролю. Одновременное снижение Surface и Volume дискоцитов происходило достаточно рано – с 3-4 дня опыта. При этом отношение Surface/Volume начинало снижаться лишь на 9-11 дни наблюдения, что свидетельствовало о более существенном уменьшении площади поверхности, нежели объема дискоцитов в период проявления токсических эффектов РП. Изменение Radius совпадало по времени с отклонением Area от соответствующих значений в контрольной группе. Средние значения Dx демонстрировали тенденцию к росту, а значения G1/G2 – к снижению. Однако на протяжении эксперимента эти параметры варьировали в пределах доверительных интервалов и не отличались существенно от аналогичных показателей в группе сравнения.

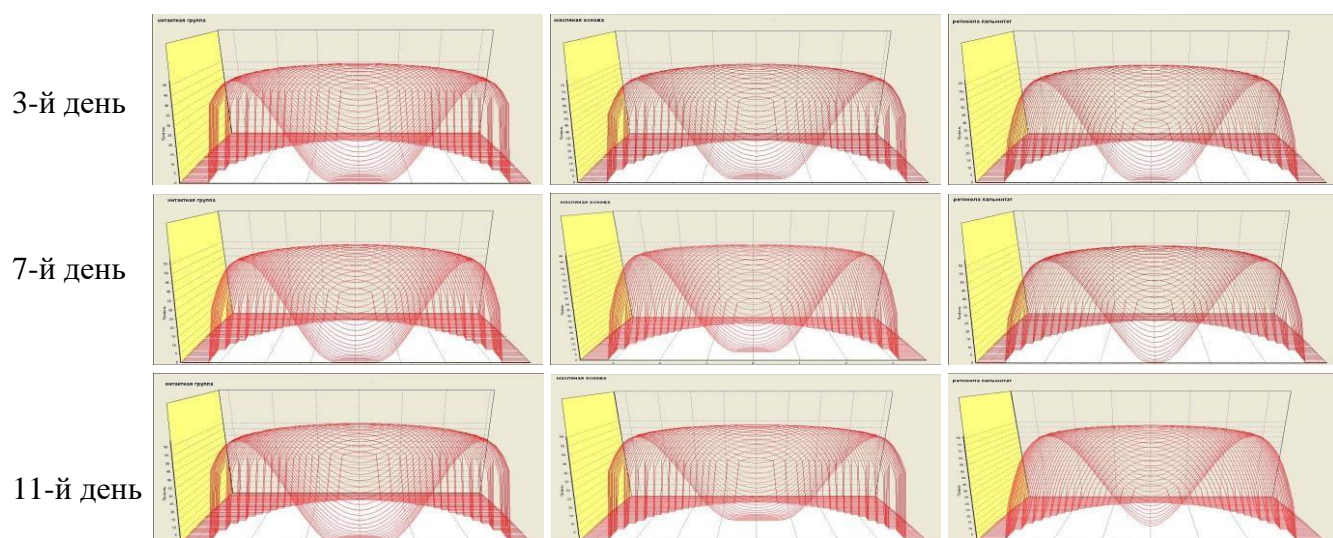


Рисунок 40 – Средний 3D профиль дискоцитов крыс интактной группы (левая колонка), крыс, получавших МО (средняя колонка), и крыс, получавших РП (правая колонка)

Изменения формы дискоцитов под действием РП было подтверждено также методом компьютерной реконструкции их 3D профиля, (Рисунок 40) [25].

При сопоставлении динамики изменений ПП дискоцитов с индексом гипервитаминоза А было установлено, что из пятнадцати измеренных параметров восемь имели статистически значимые различия с показателями в контрольной группе еще до регистрации первых признаков патологии. Так, отклонения от контроля были отмечены для Cur2, Grad1, Grad2, Grad3, Dy, L_er, Surface и Volume на 3-4 день от начала введения РП. Значения других параметров профиля дискоцитов менялись лишь на фоне развития токсических эффектов РП.

3.5.3. Информативность МДМ параметров эритроцитов при гипервитаминозе А

Информативность (диагностическую значимость) изменений параметров дискоцитов при введении РП оценивали по величине коэффициента Кульбака, рассчитанного для признаков, распределения которых статистически значимо различались в экспериментальной и в контрольной группах.

Выше было отмечено, что в условиях введения РП средние значения Cur2, Grad1, Grad2, Grad3, Dy, L_er, Surface и Volume приобрели статистически значимые отличия от показателей в контрольной группе еще до появления видимых признаков гипервитаминоза А. Оценка информативности изменений этих параметров была проведена на 4 день опыта (Таблица 23).[26] В этот день у всех животных экспериментальной группы видимые симптомы гипервитаминоза А еще отсутствовали.

Таблица 23 – Коэффициент информативности Кульбака (I) для признаков, указывающих на изменения морфологии эритроцитов крыс на 4 день введения РП

Признак	I	Уровень значимости различий параметра между группами РП и МО
Снижение Surface	4,6	0,02
Снижение Dy	4,1	0,00
Увеличение Cur2	4,1	0,00
Увеличение Grad1	0,3	0,02
Снижение Grad2	0,0	0,00
Снижение Grad3	0,0	0,00
Снижение L_er	0,0	0,01
Снижение Volume	0,0	0,01

Хотя на 4 день эксперимента все перечисленные в таблице параметры дискоцитов значимо отличались от контроля, коэффициент информативности таких параметров был неодинаков. Высокий коэффициент был установлен для сдвигов значений Surface, Dy и Cur2.

Для остальных изменений ПП дискоцитов коэффициент информативности был ниже допустимого уровня – $I \geq 0,5$ [26].

На фоне развивающегося гипервитаминоза А статистически значимые различия между группами животных были характерны не только для ПП дискоцитов, но и для других показателей, характеризующих морфологические изменения эритроцитов (соотношение их типичных и атипичных форм, СМДМП дискоцитов). Информативность таких параметров была проанализирована на 7 день эксперимента – день, предшествующий возникновению у отдельных крыс выраженных токсических эффектов РП (Таблица 24).

Таблица 24 – Коэффициент информативности Кульбака (I) для признаков, указывающих на изменения морфологии эритроцитов крыс на 7 день введения РП

Признак	I	Уровень значимости различий параметра между группами РП и МО
Снижение Area	5,7	0,00
Снижение Volume	5,6	0,00
Снижение Surface	5,5	0,01
Снижение Iod	5,4	0,00
Снижение Dy	5,1	0,00
Снижение L_er	4,7	0,00
Снижение Od	4,2	0,02
Увеличение Grad1	3,8	0,00
Увеличение доли сфероцитов	0,4	0,00
Снижение доли дискоцитов	0,0	0,00
Увеличение Cur1	0,0	0,04
Увеличение Cur3	0,0	0,05

Кроме изменений Surface и Dy, обладающих информативностью на доклинической стадии развития гипервитаминоза А, высокий коэффициент Кульбака был характерен в этот срок наблюдения для изменений ряда других МДМ параметров. При этом наряду с изменениями ПП дискоцитов (Volume, Surface, Dy, L_er, Grad1) высокие коэффициенты информативности были характерны также и для изменений СМДМП дискоцитов – Area, IOD и OD. При этом, несмотря на статистически значимые различия в относительном содержании дискоцитов и сфероцитов у экспериментальных и контрольных животных на 7 день опыта, равно как значений Cur1 и Cur3, величина коэффициента Кульбака, рассчитанная для этих показателей, была ниже минимально допустимой.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обобщая результаты проведенного исследования, представлялось целесообразным:

- 1) обсудить результаты субпопуляционного анализа дискоцитов у интактных крыс и возможность использования этих данных при оценке состояния эритроцитов в экспериментальных условиях;
- 2) обсудить обнаруженные эффекты воздействия масляной основы, используемой для приготовления раствора ретинола пальмитата, на эритроциты и обосновать выбор контрольной группы при экспериментальном гипервитаминозе А;
- 3) оценить адекватность использованной в работе модели гипервитаминоза А;
- 4) проанализировать характер и возможные причины изменений эритроцитов при введении избыточных доз РП;
- 5) обсудить динамику изменений морфоденситометрических параметров эритроцитов при передозировке РП и оценить их диагностическую значимость для прогноза возникновения гипервитаминоза А.

4.1. Субпопуляции дискоцитов интактных крыс

Преобладающей формой эритроцитов в периферической крови являются дискоциты (нормоциты), доля которых составляет у человека в норме 85-90% [9]. Появление в крови большого числа атипичных форм клеток (эхиноцитов, стоматоцитов, сфероцитов и др.) свидетельствует о значительной перестройке мембраны эритроцитов и/или их цитоскелета, что, как правило, не характерно для начальных проявлений патологических воздействий. Поэтому для прогноза токсических эффектов различных соединений или для их ранней диагностики используется оценка морфофункционального состояния дискоцитов [22, 33, 46].

МДМ анализ мазков крови интактных крыс выявил достаточно высокую вариабельность параметров дискоцитов. Методом атомно-силовой микроскопии показано, что в сравнении с эритроцитами, находящимися в плазме крови, размер и толщина эритроцитов при нанесении на подложку меняются в результате их высыхания и фиксации [35]. Тем же методом установлено, что после фиксации и окрашивания изменяются глубина и ширина пэллора эритроцитов [146]. Эти факторы могли в определенной мере служить причиной разнообразия параметров дискоцитов в мазках крови, использованных для МДМ анализа. Однако роль фиксации и окрашивания вероятно не являлась критичной из-за одинакового характера и силы воздействия на все клетки мазка. Поэтому при сравнении МДМ параметров эритроцитов у интактных животных, а также с параметрами эритроцитов крыс, получавших РП или МО, эти

обстоятельства не принимались во внимание, так как все мазки фиксировались одинаково и окрашивались одновременно.

Установленная в работе вариабельность МДМ параметров дискоцитов, в особенности параметров их профиля, подтверждает имеющиеся в литературе данные о неоднородности эритроцитов человека и животных. В течение жизненного цикла морфофункциональные характеристики эритроцитов изменяются. По этой причине неоднородность популяции эритроцитов периферической крови в норме может проявляться в физиологическом анизоцитозе и пойкилоцитозе, в содержании и характере гемоглобина, во флюктуациях микровязкости и состава белково-липидных комплексов мембраны, в разнообразии мембранных рецепторов и показателей метаболизма [4, 27, 28, 68, 208, 212, 220, 269]. Кроме того, у молодых животных в период от рождения до начала полового созревания имеет место смена фетальной популяции эритроцитов на взрослый тип. Это также проявляется в разнообразии размеров и формы клеток, смене типов гемоглобина, изменении фосфолипидного состава их мембраны и как результат – в изменении ее вязко-эластических и деформабельных свойств [15, 36]. Очевидно, что выявленная в данной работе дисперсия ряда МДМ параметров дискоцитов могла определяться неоднородностью их популяции, связанной как с периодом жизненного цикла эритроцитов, так и с возрастом использованных крыс.

Статистический анализ данных показал, что геометрические параметры дискоцитов (площадь проекции на плоскость, площадь пэллора, ряд параметров профиля) в большей мере характеризуются индивидуальной дисперсией, нежели групповой. Приемлемым объяснением выраженной индивидуальной вариабельности геометрических параметров дискоцитов интактных крыс может служить представление о присущей эритроцитам «памяти формы» [129]. Известно, что при внешних воздействиях дискоциты меняют линейные размеры и форму, но когда воздействие прекращается, они восстанавливают исходную двояковогнутую (торообразную) форму. Подобные события происходят, в частности, при прохождении дискоцитов через капилляры, площадь сечения которых может быть значительно меньше диаметра клетки [116, 120, 220]. Понятно, что, в зависимости от микровязкости и текучести мембраны отдельных эритроцитов, образцы крови, получаемые для изготовления мазков, могут содержать клетки с разной степенью деформации. Другими словами, степень деформации эритроцита в мазке (статическое состояние) может зависеть от характера деформируемости клетки в потоке крови. Это, в свою очередь, может проявляться в разнообразии геометрии дискоцитов в мазках крови – индивидуальной для каждой клетки у конкретного животного.

Для оптических параметров дискоцитов (средняя и интегральная оптическая плотность) характерна преимущественно внутригрупповая дисперсия. Оптическая плотность цитоплазмы эритроцита определяется присутствием в ней гемоглобина и является косвенным показателем

уровня его содержания [47, 220]. Приемлемость оценки содержания гемоглобина в отдельных эритроцитах по оптической плотности убедительно обоснована наличием высокой коррелятивной связи между результатами измерения его концентрации гемоглобинцианидным методом и при фотометрическом измерении IOD в мазках крови [21]. Из собственных результатов МДМ анализа следует, что крысы, принадлежавшие к использованной в работе выборке, различались между собой по содержанию гемоглобина в большей мере, чем дискоциты отдельно взятого животного по тому же параметру. Такой вывод подтверждается наиболее высокой вариабельностью IOD в целом по выборке, по сравнению с другими СМДМП.

Площадь пэллора и ее соотношение с другими геометрическими параметрами предложена в качестве критерия, характеризующего состояние эритроцитов в норме и при анемиях [67]. Используя эти рекомендации, в данной работе было проведено сравнение МДМ параметров в двух группах дискоцитов, распределенных по значениям Pallor/Area выше и ниже медианного. Установлено, что у дискоцитов, относящихся к разным группам (субпопуляциям), параметры отдельных участков профиля существенно различаются. Результаты компьютерной реконструкции 3D профиля дискоцитов явились основанием оценить эти различия как сфероцитарную трансформацию клеток и отнести дискоциты с отношением Pallor/Area > 25% к субпопуляции истинных дискоцитов, а дискоциты с отношением Pallor/Area ≤ 25% к субпопуляции дискосфероцитов. В сравнении с истинными дискоцитами для дискосфероцитов, помимо меньшей площади пэллора, характерны более высокие значения Area, Od, Iod и существенно меньшая величина Surface. Значение Volume в дискосфероцитах несколько выше, поэтому отношение Surface/Volume у них гораздо меньше, чем у истинных дискоцитов. В то же время, увеличение объема клеток определяет возрастание площади их проекции на плоскость. Обоснованием принадлежности дискоцитов к соответствующей субпопуляции, явились результаты дискриминантного анализа, свидетельствующие о бимодальном характере распределения их МДМ параметров. Аналогичный характер распределений ряда МДМ параметров дискоцитов показан ранее в исследованиях, посвященных анализу изменений эритроцитов при холестеринозе [46], при алкоголизме [33], а также после воздействия малых доз радиации [21].

Изменения формы, связанные со старением эритроцитов, сопровождаются утратой мембраны в результате ее везикуляции [68, 86, 165, 208]. Это обусловлено накоплением продуктов перекисного окисления, усилением связывания гемоглобина, модифицирующегося в течение жизненного цикла клеток, с белком полосы 3 и нарушением связей цитоскелета с липидным бислоем плазмолеммы [68, 86, 188, 208, 295]. Известно также, что на протяжении жизненного цикла в эритроцитах человека уменьшается площадь поверхности, а количество

гемоглобина снижается незначительно. В результате оптическая плотность эритроцитов увеличивается. Утрата эритроцитами способности поддерживать собственный гомеостаз катионов по мере старения обуславливает увеличение их объема. Снижающееся при этом отношение площади поверхности к объему ведет к постепенному изменению дисковидной формы на сфероцитарную. Эритроциты теряют способность к обратимой деформации, их осмотическая резистентность падает и в конечном итоге они подвергаются лизису либо элиминируются из кровотока макрофагами селезенки [68, 85, 86, 166, 134, 208, 220, 295].

Сопоставляя эти сведения с результатами собственных исследований, можно полагать, что различия МДМ параметров в субпопуляциях дискоцитов интактных крыс отражают изменения эритроцитов, происходящие на протяжении времени их циркуляции в крови, т.е. – их жизненного цикла. Субпопуляцию дискосфероцитов, имеющих в сравнении с истинными дискоцитами меньшее отношение площади поверхности к объему и более высокую оптическую плотность, предположительно можно рассматривать как начальную стадию физиологической трансформации дискоцитов в сфероциты – терминальную форму возрастных преобразований эритроцитов. В зависимости от условий их возрастная трансформация может реализовываться в последовательности дискоцит-стоматоцит-сфероцит либо дискоцит-эхиноцит-сфероцит [165, 202, 220, 287, 291, 292]. Этим объясняется постоянное присутствие в крови здорового человека и интактных животных атипичных форм эритроцитов (стоматоцитов, эхиноцитов и сфероцитов), что нашло подтверждение в данной работе.

Результаты субпопуляционного анализа дискоцитов явились основанием учитывать не только количество и соотношение их типичных и атипичных форм эритроцитов в условиях эксперимента, но также оценивать соотношение истинных дискоцитов и дискосфероцитов и использовать этот показатель как возможный критерий реакции эритроцитов на внешние воздействия. Целесообразность такого подхода получила подтверждение в экспериментах с передозировкой РП.

4.2. Влияние масляной основы раствора ретинола пальмитата на эритроциты

Витамин А относится к жирорастворимым веществам, поэтому лекарственные препараты ретинола и его эфиров выпускаются в виде масляных растворов. Используемый в данной работе раствор ретинола пальмитата (РП) содержал в качестве основы низкоэруковое рапсовое масло с добавлением бутилгидрокситолуола (БОТ) и бутилгидроксианизола (БОА) – стабилизаторов, препятствующих окислению РП. Очевидно, что ожидаемые изменения морфологии эритроцитов при использовании данного препарата, нельзя было бы с уверенностью объяснить только присутствием в его составе РП без учета возможных эффектов

компонентов масляной основы (МО).

Низкоэруковое рапсовое масло содержит насыщенные жирные кислоты и в большом количестве ненасыщенные жирные кислоты [98, 140, 213, 216, 316]. Фосфолипиды и гликолипиды эритроцитарной мембраны включают более 20 разновидностей насыщенных и ненасыщенных жирных кислот [94, 256, 259]. Установлена зависимость их количества и соотношения в мембране эритроцитов от уровня потребления липидов с пищей [159].

При потреблении продуктов богатых насыщенными жирными кислотами общий уровень последних в мембранах эритроцитов не меняется, но снижается количество мононенасыщенной омега-9 олеиновой кислоты [231]. Омега-9 олеиновая кислота в больших концентрациях образует комплексы с IgG и индуцирует гемолиз эритроцитов [160]. При потреблении пищи, богатой омега-3 жирными кислотами, последние довольно быстро включаются в состав мембраны эритроцитов [284], вследствие чего их содержание в мембране возрастает [96, 102, 153, 194,]. При этом в мембране эритроцитов снижается соотношение омега-6/омега-3 жирных кислот, уменьшается количества олеиновой и арахидоновой кислот [153, 194]. При использовании диет с омега-6 либо с омега-3 жирными кислотами, содержание первых увеличивается в наружном и внутреннем листках липидного бислоя, а вторые включаются только во внутренний слой эритроцитарной мембраны; содержание насыщенных жирных кислот в эритроцитарной мембране при этом не изменяется [255]. Увеличение соотношения омега-6/омега-3 жирных кислот в пище изменяет (увеличивает либо снижает) содержание холестерина, фосфолипидов в мембране эритроцитов, а также активность связанных с мембраной Na^+, K^+ -АТФазы, $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазы и ацетилхолинэстеразы [284, 300]. Незаменимые линолевая и альфа-линоленовая жирные кислоты и продукты их метаболизма (арахидоновая, эйкозапентаеновая и докозагексаеновая кислоты) после присоединения к структурным липидам могут взаимодействовать с мембранными белками, изменяя толщину и текучесть мембран [127]. Следовательно, от жирнокислотного состава эритроцитарной мембраны зависят ее реологические характеристики и как следствие – деформируемость клеток [183, 305].

После перорального введения животным и человеку БОТ и БОА накапливаются в тканях ненадолго, поскольку быстро всасываются и достаточно быстро выводятся из организма. Тем не менее, в зависимости от концентрации, эти антиоксиданты оказывают как положительное, так и негативное действие на эритроциты. В опытах *in vitro* показано, что БОТ и БОА при концентрации в среде 0,75% и выше вызывают гемолиз, причем БОТ является более токсичным соединением [171]. Токсичность в высоких концентрациях и гемолитический эффект БОТ и БОА, а также их влияние на содержание жирных кислот в фосфолипидах эритроцитарных мембран были показаны в более поздних исследованиях [199, 200].

Установлено, что БОТ и БОА могут подавлять активность эритроцитарных карбоангидраз

[281] тем самым снижая транспорт CO_2 . БОТ ингибирует окисление липидов, снижает образование активных форм кислорода, стимулирует активность антиоксидантных ферментов [199, 200, 311] и обеспечивает стабильность количества и состава полиненасыщенных жирных кислот в мембране эритроцитов [210, 217]. По другим данным БОТ снижает содержание полиненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах эритроцитарных мембран [278]. БОА также обладает антиоксидантной активностью, этот эффект прямо коррелирует с содержанием холестерина в мембране и влияет на текучесть эритроцитарной мембраны [276].

Учитывая изложенные выше данные, при планировании настоящего исследования было сделано предположение, что компоненты МО могут сами по себе оказать воздействие на эритроциты. Поскольку сведения об этом в литературе отсутствуют, была проведена проверка такой возможности на крысах, получавших МО в течение 10 дней [24]. В результате было установлено, что при потреблении МО морфология эритроцитов меняется. Раньше всего (конец первой недели перорального введения МО) было зарегистрировано статистически значимое увеличение OD и IOD дискоцитов, значения которых в последующем оставались более высокими, чем у интактных животных. Эти показатели косвенно свидетельствуют о содержании гемоглобина в эритроцитах (см. раздел 4.1). Зрелые эритроциты лишены аппарата биосинтеза, поэтому увеличение оптической плотности их цитоплазмы в условиях потребления МО следует трактовать как появление в крови новых эритроцитов с большим, чем у интактных животных, количеством гемоглобина. Подобную реакцию эритроцитов можно предположительно рассматривать как результат воздействия компонентов МО на процесс синтеза гемоглобина в эритроблестах, что вероятно обусловлено присутствием в рапсовом масле токоферола [216], участвующего в регуляции эритропоэза путем контроля биосинтеза гема [302].

В основе флюктуаций геометрических характеристик эритроцитов, возникающих на фоне перорального введения МО, скорее всего, лежат изменения липидного профиля их плазмолеммы. Входящее в состав МО рапсовое масло богато ненасыщенными жирными кислотами. Как указывалось, выше, при употреблении этих жирных кислот возрастает их содержание в плазме крови и в эритроцитарной мембране, а ее микровязкость и текучесть меняются. Это отражается не только на морфологии, но и на возможности эритроцитов обеспечивать газообмен, который зависит от величины таких геометрических параметров клеток как Surface, Volume и Surface/Volume [244, 264]. Помимо жирных кислот определенный вклад в изменение морфологии и функционального состояния эритроцитов при потреблении МО могут вносить также присутствующие в ее составе БОТ и БОА. В течение жизненного цикла эритроцита в нем постоянно образуются свободные радикалы и продукты перекисного окисления липидов, накопление которых при снижении активности внутриклеточной системы антиоксидантной защиты вызывает критические изменения цитоскелета и биомеханических

свойств мембраны клетки [285]. БОТ и БОА ингибируют окисление липидов, снижают образование активных форм кислорода, стимулируют активность антиоксидантных ферментов, что в целом улучшает реологические свойства и проницаемость эритроцитарной мембраны [199, 200, 276, 311]. Задача изучить воздействие на эритроциты каждого из компонентов МО в работе не ставилась. Однако, поскольку размеры и форма эритроцитов зависят от состояния их плазмолеммы, можно сделать вывод о том, что компоненты использованной МО в совокупности обладают мембранотропным действием.

Обобщая полученные в работе факты, можно полагать, что, в отличие от эффектов ретинола пальмитата (см. раздел 4.4), потребление МО не оказывает выраженного токсического действия на эритроциты. Несмотря на некоторый сдвиг соотношения истинных дискоцитов и дискосфероцитов, их суммарное количество остается неизменным, а число атипичных форм эритроцитов практически не отличается от аналогичных показателей у интактных крыс. Ограниченные по объему изменения формы эритроцитов, происходящие на фоне введения МО, скорее способствуют повышению их газотранспортной и газообменной функций. На это указывают возникающие в данных условиях увеличение IOD цитоплазмы (содержания в ней гемоглобина), а также увеличение Surface и ее соотношения с Volume дискоцитов.

Полученные в этой части работы данные явились основанием заключить, что при оценке состояния эритроцитов в условиях экспериментального гипервитаминоза А группой сравнения (контролем) должны служить животные, получающие МО, используемую для растворения ретинола, а не интактные животные. Как выяснилось в последующем, при потреблении крысами РП флюктуации МДМ параметров, характеризующих состояние эритроцитов в этих условиях, являются более выраженными и для большинства параметров отличаются по вектору изменений.

4.3. Адекватность модели гипервитаминоза А

Сведения о токсических эффектах витамина А разнятся как по поводу источников ретинола, использованных доз, способов введения, так и в отношении видов и возраста животных [обзоры: 53, 157, 250]. Поэтому одной из задач настоящего исследования стал выбор дозы ретинола пальмитата, позволяющей за относительно короткий промежуток времени смоделировать у крыс состояние гипервитаминоза А. С целью объективной оценки эффектов различных доз РП, в работе был использован интегральный показатель состояния животных – индекс динамики гипервитаминоза А. При его расчете сравнивались сроки возникновения конкретных симптомов, доля крыс с соответствующими симптомами в сопоставимые сроки наблюдения, а также смертность животных.

Ежедневное пероральное введение крысам Вистар с массой тела 120-130 г масляного раствора РП в дозах 0,41 мг/г, 0,64 мг/г и 0,82 мг/г привело к появлению во всех группах животных признаков передозировки препарата. [1] РП является одной из биологически активных форм витамина А и по сравнению со многими другими ретиноидами обладает меньшей токсичностью [37, 123, 125, 157]. Тем не менее, указанных выше концентраций оказалось достаточно для того, чтобы в течение 11 дней вызвать у крыс выраженное состояние гипервитаминоза А. Известно, что симптомы гипервитаминоза А у детей, а также у молодых животных возникают при приеме меньших доз ретинола и раньше, чем у взрослых [18, 53, 205, 190, 250, 251]. Поэтому выбор и использование в работе молодых, растущих животных с массой тела 120-130 г был преднамеренным и оказался оправданным.

Симптоматика гипервитаминоза А была одинаковой во всех экспериментальных группах, но время появления соответствующих признаков передозировки РП варьировало в пределах от 1 до 3 дней, что ожидаемо свидетельствовало о зависимости эффекта от дозы препарата. Начальные признаки гипервитаминоза А (снижение двигательной активности, анорексия, прекращение прироста массы тела) появились у крыс, получавших РП в дозах 0,64 мг/г и 0,82 мг/г, с 5-6 дня опыта, а в дозе 0,41 мг/г – с 7-8 дня наблюдения. По имеющимся данным, подобные симптомы возникают достаточно рано и служат неспецифическими критериями развивающегося гипервитаминоза А [157, 178, 225, 270].

Алопеция, эритемы и геморрагии, изменения костей скелета считаются признаками хронической токсичности витамина А, для развития которой требуются недели и месяцы [157, 225, 270]. В случае употребления высоких доз ретинола за короткий период времени те же симптомы рассматриваются отдельными авторами [181] как признак острой токсичности. С этим вряд ли можно согласиться, так как острая токсичность исследуется на нескольких группах животных и оценивается по их смертности после однократного введения лекарственного вещества в разных дозах [40]. Более корректно в этом случае говорить о проявлениях подострой токсичности витамина А [250].

В нашем исследовании симптомы подострой токсичности возникли у отдельных животных и далее прогрессировали в зависимости от дозы на второй неделе введения РП. Причиной алопеции при гипервитаминозе А являются кровоизлияния в области волосяных фолликулов [270]. Геморрагии при избыточном потреблении ретинола описаны не только в коже, но и во многих других органах [53, 157, 225, 250, 270]. В настоящей работе геморрагии наблюдались на веках и в слизистой оболочке носа.

Гипервитаминоз А у людей, преимущественно взрослых, может сопровождаться диареей [157]. Ссылок в литературе на сходную симптоматику у животных не найдено. В данной работе были выявлены изменения характера экскрементов, свидетельствующие о возможных

нарушениях кишечного гидролиза и всасывания, что могло служить дополнительным фактором развития кахексии при избытке РП в организме. Предположение о нарушении процессов пищеварения у животных экспериментальных групп подтверждается данными о торможении пролиферации и дифференцировки энтероцитов тонкой кишки при введении РП растущим крысам в течение 8 дней [10, 11]. Установлено также, что при избыточном потреблении ретинола число бокаловидных клеток, их секреторная активность и, следовательно, образование слизи в кишечнике усиливается [18, 37]. По этой причине характер экскрементов также может меняться.

На тяжесть смоделированного в эксперименте гипервитаминоза А указывало появление у крыс хромающей походки, а затем искривление и ограничение подвижности задних и передних конечностей. Данное состояние, описанное преимущественно у грызунов, служит индикатором выраженного токсического действия витамина А [173, 270]. Можно предположить, что причиной ограничения подвижности экспериментальных животных могли быть вызывающие боль внутримышечные и периостальные кровоизлияния. С другой стороны, выявленные симптомы, возможно, являлись следствием дегенерации метафизарных хрящей [272] либо переломов костей конечностей. Переломы трубчатых костей при гипервитаминозе А возникают в результате подавления остеобластогенеза [158, 313] увеличения числа остеокластов [158, 161], деминерализации и резорбции костной ткани и, как следствие, остеопороза [79, 169, 158]. Время появления такой патологии зависит от возраста – у молодых животных она возникает достаточно быстро и чаще. Так, при потреблении крысами массой 69-79 г ретинола ацетата в дозе 50 000 МЕ в течение 4 дней, а затем в дозе 25 000 МЕ хромота возникла на 8 день, а переломы определялись рентгенологически на 10 день эксперимента [225].

Описанная выше симптоматика гипервитаминоза А может косвенно свидетельствовать о повышении концентрации ретинола в крови в условиях проведенного эксперимента, что подтверждается результатами измерений его содержания после употребления РП [1].

Транспорт ретиноидов к клеткам-мишеням обеспечивает синтезируемый гепатоцитами ретинол-связывающий белок. При избыточном поступлении в организм витамина А концентрация ретинол-связывающего белка в крови и в печени падает из-за снижения его синтеза и секреции гепатоцитами [111, 205, 222]. В результате мобилизуемые печенью эфиры ретинола образуют комплексы с липопротеинами плазмы крови и в таком виде транспортируются к мембранам клеток. Именно эти комплексы считаются токсическими метаболитами, ответственными за развитие признаков гипервитаминоза А [178, 251]. Одновременно со снижением биосинтетической активности наблюдаются снижение детоксикационных возможностей гепатоцитов и их жировая дистрофия [99], активация клеток Купфера, гипертрофия и гиперплазия липоцитов печени [131, 237, 279].

В данной работе на 7 день введения РП в дозах 0,41 мг/г, 0,64 мг/г и 0,82 мг/г микроскопических изменений в структуре печени выявлено не было. Вместе с тем, к этому моменту у животных уже наблюдались внешние признаки токсического действия препарата, выраженные в разной степени в зависимости от дозы. Учитывая данные об относительно быстром насыщении печени крыс ретинолом и его эфирами в условиях гипервитаминоза А [211], можно предположить, что, несмотря на отсутствие морфологических изменений в органе на 7 день эксперимента, функциональная активность гепатоцитов, в частности, эффективность гидролиза эфиров ретинола, уровень биосинтеза ретинол-связывающего белка, постепенно снижалась на протяжении первой недели введения РП во всех трех дозах. Понятно, что такое предположение требует обоснования в виде результатов отдельного биохимического исследования.

Признаки дистрофии гепатоцитов в перипортальных зонах печеночных долек были обнаружены на 11 день опыта. Одновременно по ходу кровеносных капилляров были выявлены клетки с ячеистой цитоплазмой и гипертрофированными клеточными ядрами, которые являются, скорее всего, перисинусоидальными липоцитами и/или клетками Купфера. Подобный характер морфологических изменений печени согласуется с наблюдениями других исследователей [131, 237, 280] и может свидетельствовать о нарастающих токсических эффектах РП в интервале от 7 до 11 суток.

Динамика развития гипервитаминоза А при введении РП в дозах 0,64 мг/г и 0,82 мг/г была достаточно сходной, а симптомы гипервитаминоза А возникали раньше, чем при дозе РП 0,41 мг/г. При использовании дозы 0,82 мг/г отдельные животные погибли до окончания эксперимента. С учетом этих фактов представляется, что оптимальной моделью, позволяющей в течение 1,5 недель вызвать состояние гипервитаминоза А, является ежедневное введение *per os* масляного раствора РП крысам Вистар с массой тела 120-130 г в дозе 0,64 мг/г.

4.4. Характер и возможные причины изменений эритроцитов при введении избыточных доз ретинола пальмитата

Наряду с внешними проявлениями токсического действия, ежедневное введение *per os* масляного раствора РП в различных дозах вызвало у экспериментальных животных изменение ряда МДМ параметров эритроцитов [25]. Время возникновения и степень выраженности этих изменений зависели от дозы, но были сходны по направленности.

В сравнении с контролем в этих условиях изменились (возросли либо снизились) значения градиентов оптической плотности (Grad) и кривизны (Cur) различных участков профиля дискоцитов. При изменении этих параметров в одном направлении и с одинаковой

выраженностью форма эритроцита не должна существенно меняться. Однако на фоне гипервитаминоза А в зависимости от периода развития и тяжести данного состояния флюктуации значений Grad и Cur в восходящих и нисходящих участках тора дискоцитов, а также в области пэллора не были идентичными. Несмотря на сохранение дискоцитами двояковогнутой формы, эти изменения профиля вместе с уменьшающимися значениями показателя контрастности (Du) могут свидетельствовать о том, что геометрия клеток, тем не менее, нарушается. Установлено также, что при передозировке РП уменьшаются протяженность профиля дискоцитов (L_{er}), площадь их поверхности (Surface) и объем (Volume). Более выраженное снижение Surface обуславливает уменьшение Surface/ Volume. В свою очередь, снижение Volume коррелирует с уменьшением площади проекции дискоцитов на плоскость (Area). Коррелятивные связи между различными МДМ параметрами дискоцитов, изменяющимися в результате передозировки РП, имели принципиально тот же характер, что и у интактных животных. Дисперсия большинства МДМ параметров дискоцитов у крыс экспериментальной группы снижалась, причем более заметно при максимально высокой дозе РП. Это свидетельствует о достаточно стереотипном характере морфологических изменений дискоцитов при избыточном содержании в организме РП и об их зависимости от дозы ретинола. В совокупности эти факты вместе с результатами компьютерной реконструкции 3D профиля дискоцитов указывали на изменение, как формы, так и размеров дискоцитов при гипервитаминозе А.

Как уже отмечалось, способность эритроцитов к изменению размера и формы определяется состоянием их плазмолеммы. Следовательно, выявленные в работе морфологические перестройки дискоцитов связаны с модифицирующим действием РП на их мембрану. Это соответствует представлениям о мембранотропных свойствах биологически активных форм витамина А [18, 37, 157].

Об изменении геометрии эритроцитов в условиях передозировки РП можно было также судить по соотношению истинные дискоциты - дискосфероциты, а также по соотношению типичных и атипичных форм эритроцитов. На фоне развивающегося гипервитаминоза А отмечалось постепенное снижение доли истинных дискоцитов и нарастание доли сфероцитов. Количество дискосфероцитов изменялось незначительно и лишь к концу эксперимента с возникновением выраженных токсических эффектов РП существенно уменьшилось. Это подтверждает представление о дискосфероцитах как о транзитной субпопуляции при трансформации истинных дискоцитов в сфероциты. Подобная трансформация может быть результатом кренирования с образованием эхиносфероцитов либо инвагинации с образованием стоматосфероцитов [68, 291].

В период начальных проявлений гипервитаминоза А количество эхиноцитов и

стоматоцитов было сопоставимо с показателями в контроле. Возникновение подострых токсических эффектов РП сопровождалось существенным увеличением доли стоматоцитов и динамики ее нарастания, которые превышали аналогичные показатели для эхиноцитов. Это является основанием полагать, что увеличение количества сфероцитов в периферической крови крыс, происходящее при передозировке РП и особенно выраженное на фоне подострых токсических эффектов препарата, происходит преимущественно за счет механизма инвагинации дискоцитов. Аналогичный вариант трансформации дискоцитов описан при электронномикроскопическом исследовании суспензии эритроцитов после добавления к ней ретинола [119, 215]. Выраженная стоматосфероцитарная трансформация дискоцитов была обнаружена также через сутки после внутрибрюшинного введения крысам ретиноевой кислоты в высоких дозах [49]. Показано также, что при кренировании увеличиваются диаметр и площадь поверхности эхиноцитов, а при инвагинации уменьшаются диаметр и объем стоматоцитов [39, 291]. В данной работе установлено, что у крыс экспериментальной группы по мере нарастания доли стоматоцитов значения объема, площади поверхности и радиуса дискоцитов постепенно уменьшаются, что свидетельствует в пользу инвагинационного механизма их деформации в условиях передозировки РП.

Введение РП в избыточных дозах в течение полутора недель привело к изменению не только геометрических, но и оптических параметров дискоцитов. В сравнении с контрольной группой дискоциты экспериментальных животных характеризовались более низкими значениями как средней (OD), так и интегральной (IOD) оптической плотности. По мере развития гипервитаминоза А эти различия прогрессивно нарастали. Это является основанием полагать, что передозировка РП вызвала у животных гемоглобинемию. Подобное состояние при гипервитаминозе А ранее неоднократно отмечалось рядом авторов [178, 251]. Оптическая плотность эритроцитов как показатель их насыщенности гемоглобином оценивалась при изменении осмолярности инкубационной среды в суспензии эритроцитов [135]. Установлено, что при увеличении осмолярности объем эритроцитов уменьшается, внутриклеточная концентрации гемоглобина повышается, что сопровождается увеличением их оптической плотности. Полученные в настоящем исследовании данные не во всем согласуются с результатами цитируемой работы. При передозировке РП снижение OD и IOD дискоцитов, трактуемое как показатель уменьшения концентрации в них гемоглобина, происходило при одновременном уменьшении Volume. Кажущееся противоречие устраняется при анализе возможных причин возникновения гемоглобинемии при гипервитаминозе А, изложенном ниже.

Обобщая результаты, можно заключить, что при передозировке РП геометрические и оптические характеристики эритроцитов меняются, причем степень этих изменений зависит от дозы РП и продолжительности его введения. В работе не ставилась задача изучить механизм

воздействия РП на эритроциты. Тем не менее, сопоставление имеющихся в литературе данных о метаболических нарушениях и состоянии клеточных мембран при введении в организм повышенных доз ретинола или его производных с фактами, полученными в настоящем исследовании, позволяет высказать некоторые предположения относительно причин возникновения морфологических изменений эритроцитов в условиях проведенного эксперимента (Рисунок 41).

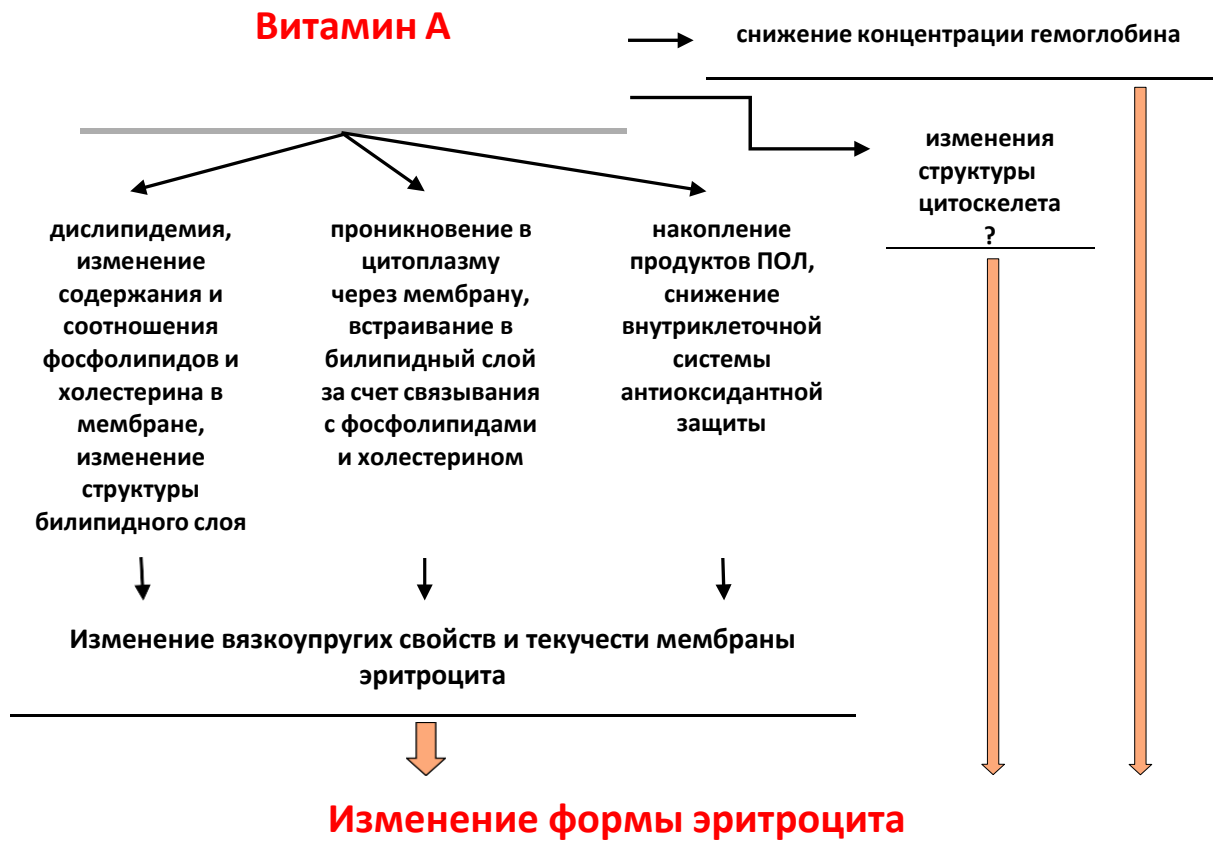


Рисунок 41 – Гипотетическая схема механизмов возникновения морфологических изменений эритроцитов при гипервитаминозе А (пояснения в тексте)

Витамин А играет важную роль в липидном обмене [84, 184], поэтому побочным эффектом его применения является дислипидемия [174, 201, 286, 300]. При продолжительном приеме ретинола в умеренных дозах либо при кратковременном его приеме в высоких дозах в плазме крови значительно увеличивается содержание свободных жирных кислот, триглицеридов, общего и связанного с ЛПНП холестерина, а уровень холестерин-ЛПВП падает [124, 184, 258, 286]. Состояние эритроцитарной мембраны зависит от липидного состава плазмы крови, что подтверждено *in vitro* путем изменения концентрации липидов в суспензии эритроцитов. Так, высокое содержание холестерина в плазме крови сопровождается

увеличением индекса деформированности эритроцитов и снижением их осмотической резистентности [177]. Высокий уровень свободных жирных кислот, являющихся эндогенными ингибиторами Na^+ , K^+ -АТФазы, также снижает осмотическую резистентность эритроцитов *in vitro* [219]. Изменение содержания фосфолипидов в суспензии эритроцитов способствует их эхиноцитарной или стоматоцитарной трансформации [104, 136].

Помимо изменения липидного профиля плазмы крови, повышенный уровень витамина А в организме отражается и на липидном составе самой мембраны эритроцитов, которая характеризуется в этих условиях высоким уровнем свободного и связанного с липопротеинами холестерина [124] и изменением содержания различных фракций фосфолипидов [206]. Подобные изменения липидного состава эритроцитарной мембраны могут возникать в результате обмена фосфолипидов и холестерина между плазмой крови и эритроцитами или наоборот [46, 236, 273, 290]. Ретиноиды меняют не только состав, но и структуру билипидного слоя. Так, инкубирование эритроцитов с 9-цис ретиноевой кислотой ведет к транслокации фосфатидилсерина из внутреннего в наружный слой мембраны и к набуханию клеток [51]

Очевидно, что наблюдавшиеся в настоящей работе изменения геометрических параметров эритроцитов при передозировке РП могут быть следствием изменения состава и структуры билипидного слоя их мембраны. Такое предположение подтверждается данными об уменьшении способности эритроцитов к обратимой деформации и снижении их осмотической резистентности при увеличении содержания в их мембране холестерина [177], ненасыщенных жирных кислот [186], а также при включении экзогенных фосфолипидов в наружный либо внутренний листки ее липидного бислоя [104, 136]. Показано также, что при изменении концентрации холестерина в мембране дискоцитов профиль их поверхности меняется, а в случае роста соотношения холестерин/фосфолипиды площадь их поверхности уменьшается [46].

Исследования *in vitro* свидетельствуют о возможности прямого действия витамина А на эритроцитарную мембрану. При инкубировании эритроцитов с ретинолом вязкоупругие свойства и текучесть их мембраны изменяются [151]. Ограничение текучести мембраны отражается на способности эритроцитов к обратимой деформации [152, 261], происходит инвагинация и/или везикуляция плазмолеммы дискоцитов, трансформация дискоцитов в сфероциты и последующий их гемолиз [119, 215]. В данной работе о снижении способности дискоцитов к обратимой деформации в условиях передозировки РП можно было судить по уменьшению значений Surface/Volume – показателю, характеризующему деформабельную способность эритроцитов [252]. Так как ретинол и его производные являются липофильными веществами, их мембранотропность объясняется возможностью встраиваться в липидный бислой клеточной мембраны и проникать через неё в цитоплазму [95, 295]. Встраивание

витамина А в мембрану происходит в результате связывания с фосфолипидами и в меньшей степени с холестерином билипидного слоя [71].

Выше было отмечено, что симптомами гипервитаминоза А являются анемия и гемоглобинемия, возникающие в результате гемолиза эритроцитов при их трансформации из дискоцитов в сфероциты. Вместе с тем установлено, что повышенные дозы витамина А вызывают снижение концентрации гемоглобина в самих эритроцитах [119, 178], что возможно происходит из-за его утраты вследствие изменения осмотического равновесия между цитоплазмой клеток и плазмой крови. Это изменение возникает в присутствии ретиноидов в результате выхода из цитоплазмы эритроцитов ионов калия [119] в обмен на увеличение содержания в ней ионов натрия [19, 263]. Транспорт катионов через эритроцитарную мембрану зависит от уровня активности Na^+ , K^+ -АТФазы [261], а также от ее фосфолипидного состава [51]. Последнее обстоятельство позволяет допустить, что возникающее под действием РП снижение концентрации гемоглобина в эритроцитах, сопровождающееся снижением их оптической плотности, также может быть результатом рассмотренного выше изменения состава и структуры билипидного слоя мембраны. Возможно уменьшение концентрации гемоглобина в эритроцитах при гипервитаминозе А связано также с нарушением его синтеза. Клинические наблюдения указывают на значительное снижение активности эритропоеза при приеме РП в высоких дозах [251]. Имеются данные о влиянии витамина А на биодоступность [107] и метаболизм [266] железа в организме, а также о снижении интенсивности его включения в эритроциты у детей при приеме РП в дозе 3300 МЕ [112].

Вязкоупругие свойства и проницаемость биомембран могут изменяться при накоплении в клетках свободных радикалов и снижении активности внутриклеточных факторов антиоксидантной защиты. Итогом дисбаланса между образованием свободных радикалов и их инактивацией является окислительный стресс, одним из основных событий которого является перекисное окисление липидов (ПОЛ) [20, 235]. Высокие концентрации кислорода, а также присутствие полиненасыщенных жирных кислот в мембране эритроцитов служат причиной постоянного образования в них свободных радикалов и продуктов ПОЛ. В норме устойчивость эритроцитов к окислительному стрессу эффективно обеспечивается наличием антиоксидантов – каталазы, супероксиддисмутазы, глутатиона, глутатионпероксидазы, глутатионтрансферазы, глутатионредуктазы [246, 285]. При воздействии на организм некоторых экзотоксинов эта устойчивость заметно снижается [44]. Учитывая липофильные свойства витамина А, нельзя исключить возможность возникновения окислительного стресса при передозировке РП как фактора вызывающего морфологические изменения эритроцитов. На это указывают приведенные ниже данные.

Передозировка РП при его пероральном введении крысам в течение 4 недель вызывает

накопление в тканях легкого O_2^- и H_2O_2 , рост уровня ПОЛ и одновременное снижение активности каталазы и супероксиддисмутазы [246]. Искусственная диета с высоким содержанием РП, потребляемая в течение 4 недель, вызывает накопление продуктов ПОЛ и снижение активности глутатиона в гепатоцитах печени [99]. В эритроцитах крыс при пероральном введении витамина А в повышенных дозах в течение 8 недель снижается содержание супероксиддисмутазы [155]. По другим данным избыток витамина А повышает активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах крыс [178], а высокое содержание β -каротена в пище ингибирует процесс ПОЛ в эритроцитарной мембране [274]. Через два месяца лечения изотретиноином в эритроцитах пациентов усиливается накопление продуктов ПОЛ и одновременно возрастает содержание восстановленного глутатиона и глутатионпероксидазы [124].

Следовательно, витамин А и его аналоги обладают как антиоксидантным, так и прооксидантным действием. При избытке ретинола происходит накопление продуктов ПОЛ. Однако в зависимости от дозы и продолжительности его употребления это может сопровождаться увеличением либо снижением активности внутриклеточных систем антиоксидантной защиты, что определяет уровень компенсаторной реакции эритроцитов на окислительный стресс. Известно, что старение эритроцитов связано с окислительными повреждениями, возникающими в результате снижения уровня антиоксидантной защиты, и завершается их сфероцитарной трансформацией [68, 208, 285]. В настоящей работе показано постепенное увеличение содержания сфероцитов в крови, происходящее на фоне введения РП и обратно коррелирующее со снижением доли дискоцитов. Это может быть основанием допустить, что в условиях проведенного эксперимента причиной морфологических изменений эритроцитов являлся, как и при их старении, дисбаланс между уровнем накопления ПОЛ и уровнем антиоксидантной защиты. Обоснование и конкретизация роли использованного в работе масляного раствора РП и его различных доз в индуцировании оксидативного стресса эритроцитов требует отдельного исследования. При этом следует учесть способность БОТ и БОА, присутствующих в масляной основе, ингибировать ПОЛ в мембране эритроцитов [199, 200, 276, 311].

Обратимая либо стойкая деформация эритроцитов зависит также от состава и взаимодействия интегральных белков мембраны с липидами и с белками цитоскелета [50, 83, 262, 291, 310], от рН цитоплазмы [82, 145], от концентрации в ней электролитов и трансмембранного потенциала [226]. Сведений об изменении этих факторов деформабельности эритроцитарной мембраны под действием витамина А в базах данных научной медицинской литературы не найдено.

4.5. Динамика и диагностическая значимость морфологических изменений эритроцитов при передозировке ретинола пальмитата

С целью поиска морфологических критериев прогноза последствий передозировки РП был сопоставлен характер морфологических изменений эритроцитов со сроками появления и прогрессирования симптомов гипервитаминоза А [25]. Первым проявлением действия РП на эритроциты при его ежедневном введении per os в дозе 0,64 мг/г стало изменение параметров профиля (ПП) дискоцитов. Из пятнадцати измеренных ПП дискоцитов восемь (Grad1, Grad2, Grad3, Cur2, Dy, L_er, Surface, Volume) имели статистически значимые отклонения от показателей в контрольной группе за 1-2 дня до возникновения у отдельных животных первых признаков гипервитаминоза А. Значения остальных параметров, описывающие профиль дискоцитов, начинали отклоняться от показателей контрольной группы, когда симптомы гиповитаминоза А разной степени тяжести уже определялись визуально.

Изменение стандартных геометрических (Area, Pallor) и оптических (OD, IOD) параметров дискоцитов было зарегистрировано после появления симптомов развивающегося гипервитаминоза А, причем оптические параметры менялись несколько раньше. Начало снижения доли дискоцитов у крыс экспериментальной группы совпало с появлением первых признаков гипервитаминоза А. По мере развития этого состояния прогрессивное уменьшение доли дискоцитов в крови сопровождалось одновременным нарастанием доли сфероцитов. Значимые отклонения доли стоматоцитов и эхиноцитов от показателей в контрольной группе обнаружались после восьмого введения РП, когда у животных уже возникли признаки подострого токсического действия ретинола.

Таким образом, изменения большинства параметров дискоцитов, характеризующие их морфологические изменения при передозировке РП, а также изменение состояния эритрона в сторону увеличения доли атипичных форм эритроцитов возникали одновременно с появлением первых симптомов гипервитаминоза А и прогрессировали по мере развития данного состояния. Исключение составили МДМ параметры профиля дискоцитов, флуктуации значений которых имели место до момента регистрации первых признаков переизбытка РП. Очевидно, что при экспериментальном гипервитаминозе А, смоделированном передозировкой РП, изменения Grad1, Grad2, Grad3, Cur2, Dy, L_er, Surface и Volume являются более чувствительными критериями, позволяющими отличить норму от патологии. Изменения других ПП, а также СМДМП дискоцитов при передозировке РП могут рассматриваться лишь как критерии степени тяжести патологического процесса, так как их отклонения от показателей в контроле возникали только на фоне развивающегося гипервитаминоза А.

При анализе морфологических изменений эритроцитов, возникающих у крыс на фоне

введения РП, следовало не только установить их направленность и статистически значимый характер по отношению к животным группы сравнения, но также выделить признаки, являющиеся наиболее информативными для оценки состояния эритроцитов при гипервитаминозе А [26].

В качестве одного из критериев информативности используется мера Кульбака, при вычислении которой оцениваются различия распределений признака в двух сравниваемых выборках. Мера Кульбака (иначе - информационный критерий, коэффициент информативности) основана на частотной характеристике признака и позволяет оценивать не достоверность различий между распределениями, а степень этих различий. Поэтому информативность рассчитывается для признаков, имеющих статистически значимые различия распределений в сравниваемых группах [13].

В работе за признак принималось достоверное изменение (увеличение или уменьшение) среднего значения конкретного МДМ параметра дискоцитов при передозировке РП в сравнении с контрольной группой в сопоставимые сроки наблюдения. Частотной характеристикой признака служила доля дискоцитов со значениями параметров, распределенными выше или ниже доверительных интервалов среднего арифметического, рассчитанного до начала эксперимента для выборок контроль и опыт.

При сравнении информативности признаков, предположительно рассматриваемых в качестве прогностических критериев передозировки РП, более высокие коэффициенты Кульбака имели такие признаки, как снижение средних значений Surface, Dy и увеличение Cur2. Изменения остальных ПП, несмотря на их статистическую значимость, имели коэффициент информативности ниже допустимого уровня $\geq 0,5$. На этом основании можно полагать, что параметры Surface, Dy и Cur2 являются более чувствительными показателями состояния эритроцитов при передозировке РП. Поэтому использование данных параметров для прогноза возникновения гипервитаминоза А в эксперименте и, возможно, при приеме препаратов, содержащих РП, представляется более целесообразным, чем других МДМ параметров дискоцитов. Высокие коэффициенты информативности, характеризующие изменения МДМ параметров дискоцитов на фоне возникновения симптомов подострого токсического действия РП, показывают, что для оценки степени тяжести состояния, являющегося следствием передозировки РП, можно использовать не только параметры профиля (в порядке убывания информативности – Volume, Surface, Dy, L_{er}), но и стандартные МДМ параметры дискоцитов (в порядке убывания информативности – Area, Iod, Od).

Заключение

Использованный в работе метод компьютерной морфоденситометрии позволил получить новые данные о составе эритрона периферической крови интактных крыс Вистар и объективно оценить морфофункциональные изменения эритроцитов, возникающие под воздействием ксенобиотиков (ретинола пальмитата и масляной основы его растворов).

На основе анализа МДМ параметров выявлены различия дискоцитов интактных крыс и охарактеризованы субпопуляции истинных дискоцитов и дискосфероцитов. Выбран критерий принадлежности дискоцитов к соответствующей субпопуляции – значение $Pallor/Area$ больше или меньше 25%. Обоснована целесообразность оценивать соотношение истинных дискоцитов и дискосфероцитов в крови и, наряду с другими морфологическими характеристиками эритроцитов, использовать этот показатель как возможный критерий их реакции на внешние воздействия.

При потреблении крысами масляной основы ретинола пальмитата суммарное количество дискоцитов и число атипичных форм эритроцитов соответствуют аналогичным показателям у интактных животных. Средние значения некоторых МДМ параметров дискоцитов при этом меняются – возрастает оптическая плотность цитоплазмы, увеличивается площадь поверхности и ее соотношение с объемом клеток, что указывает на возможное повышение в данных условиях газотранспортной и газообменной функции эритроцитов.

При избыточном поступлении в организм ретинола пальмитата изменяется состав эритрона периферической крови – снижается суммарное число дискоцитов, возрастает доля дискосфероцитов и одновременно увеличивается число атипичных форм эритроцитов. Передозировка ретинола пальмитата ведет также к существенным изменениям большинства МДМ параметров дискоцитов. Реакция дискоцитов на разные дозы ретинола пальмитата стереотипна, объем изменений их МДМ параметров зависит от дозы и длительности введения препарата. Совокупность фактов, полученных при анализе морфологии эритроцитов, является основанием полагать, что функциональные возможности эритроцитов при передозировке ретинола пальмитата существенно снижаются.

При сопоставлении характера морфологических изменений эритроцитов со сроками появления и прогрессирования симптомов гипервитаминоза А выявлены статистически значимые изменения ряда МДМ параметров дискоцитов ($Cur2$, $Grad1$, $Grad2$, $Grad3$, Dy , L_er , $Surface$ и $Volume$), возникающие до появления видимых признаков передозировки ретинола пальмитата. Наиболее информативными признаками, регистрируемыми на доклинической стадии гипервитаминоза А, являются увеличение $Cur2$, снижение $Surface$ и Dy дискоцитов, что позволяет их использовать в качестве прогностических критериев передозировки препарата.

Флюктуации остальных МДМ параметров дискоцитов при избытке ретинола пальмитата в организме, равно как и рост числа атипичных форм эритроцитов, могут рассматриваться лишь как критерии степени тяжести патологического процесса, так как их отклонения от показателей в контроле возникали только на фоне развивающегося гипервитаминоза А.

Результаты анализа морфологически изменений эритроцитов в условиях передозировки ретинола пальмитата обосновывают эффективность использования компьютерной морфоденситометрии для прогноза возникновения и оценки степени тяжести гипервитаминоза А. Следует отметить, что выявленные в работе изменения МДМ параметров эритроцитов являются неспецифическими, так как они могут возникать под воздействием разнообразных факторов, имея при этом иную направленность и степень выраженности. Приведенные данные об информативности изменений соответствующих МДМ параметров дискоцитов получены в условиях передозировки ретинола пальмитата. Утверждать, что эти же признаки будут информативными в иных экспериментальных условиях, например, при применении других производных ретинола не следует. Поэтому при использовании эритроцитов в качестве объектов оценки действия каких-либо факторов целесообразно в каждом случае определение информативности их неспецифических морфологических изменений с учетом характера и продолжительности воздействия. Это позволит выделить из признаков, имеющих в сравнении с контролем статистически значимые различия, наиболее информативные. Использование последних, помимо более надежной диагностической оценки, даст возможность сократить количество МДМ параметров, анализируемых в повторяющихся условиях эксперимента.

Выводы

1. При экспериментальном гипервитаминозе А, вызванном ежедневным введением per os масляного раствора ретинола пальмитата в дозах 0,41 мг/г, 0,64 мг/г и 0,82 мг/г, изменения морфологии эритроцитов одинаковы по направленности. Время возникновения и степень выраженности изменений зависят от дозы и продолжительности введения препарата.

2. При передозировке ретинола пальмитата наиболее рано, до появления видимых признаков гипервитаминоза А, возникают изменения параметров профиля дискоцитов – Grad1, Grad2, Grad3, Cur2, Dy, L_er, Surface, Volume. Изменения стандартных морфоденситометрических параметров дискоцитов, соотношения истинных дискоцитов и дискосфероцитов, а также типичных и атипичных форм эритроцитов в крови происходят одновременно с развивающимся гипервитаминозом А.

3. Наиболее информативными признаками, регистрируемыми до появления симптомов передозировки ретинола пальмитата, являются увеличение Cur2, снижение Surface и Dy дискоцитов. На фоне возникающих подострых токсических эффектов ретинола пальмитата высокие коэффициенты информативности имеют не только параметры профиля (в порядке убывания – Volume, Surface, Dy, L_er), но и стандартные морфоденситометрические параметры дискоцитов (в порядке убывания – Area, Iod, Od).

4. Масляная основа раствора ретинола пальмитата (низкоэруковое рапсовое масло с антиоксидантами бутилгидрокситолуолом и бутилгидроксианизолом) вызывает изменения морфоденситометрических параметров дискоцитов (оптической плотности цитоплазмы, площади поверхности и ее соотношения с объемом клеток) через неделю после начала ее введения per os в объемах, сопоставимых с объемом раствора ретинола пальмитата, используемого для достижения дозы 0,64 мг/г или 0,82 мг/г. Вектор изменений и степень их выраженности отличаются от эффектов, возникающих при пероральном введении раствора ретинола пальмитата.

5. Адекватной моделью, позволяющей в течение 1,5 недель вызвать состояние гипервитаминоза А, является ежедневное введение per os масляного раствора ретинола пальмитата крысам Вистар с массой тела 120-130 г в дозе 0,64 мг/г.

6. Вариабельность и бимодальный характер распределения морфоденситометрических параметров дискоцитов интактных крыс Вистар свидетельствуют о неоднородности их популяции. Принадлежность дискоцитов к разным субпопуляциям определяется отношением Pallor/Area, которое в истинных дискоцитах $> 25\%$, а в дискосфероцитах $\leq 25\%$.

7. В выборке интактных крыс Вистар с массой тела 120-130 г суммарная доля дискоцитов в крови составляет $87,6 \pm 1,3\%$ (дискоцитов – $44,4 \pm 2,0\%$, дискосфероцитов – $43,2 \pm 2,0\%$). Из атипичных форм эритроцитов преобладают сфероциты – $7,8 \pm 1,1\%$. Доля эхиноцитов – $2,2 \pm 0,6\%$, стоматоцитов – $1,6 \pm 0,5\%$, других атипичных форм – $0,8 \pm 0,4\%$.

Список сокращений и условных обозначений

БОА	бутилгидроксианизол
БОТ	бутилгидрокситолуол
МДМ	морфоденситометрия, морфоденситометрические
МО	масляная основа
ПП	параметры профиля
РП	ретинола пальмитат
СМДМП	стандартные морфоденситометрические параметры

Перечень МДМ параметров дискоцитов:

Area	площадь проекции на плоскость
Bend	точка перегиба тор-пэллор *
Cur1	кривизна восходящей части тора
Cur2	кривизна нисходящей части тора
Cur3	кривизна пэллора
Dx	показатель асимметрии
Dy	показатель контрастности
FF	форм-фактор
Grad1	градиент оптической плотности восходящей части тора
Grad2	градиент оптической плотности нисходящей части тора
Grad3	градиент оптической плотности пэллора
G1/G2	отношение Grad1 к Grad2
IOD	интегральная оптическая плотность
L_er	длина профиля по линии сканирования
OD	средняя оптическая плотность
Pallor	площадь пэллора
Pallor/Area	отношение площади пэллора к площади проекции
Radius	радиус
Surface	площадь поверхности
Surface/Volume	отношение площади поверхности к объему
Volume	объем

* тор – периферический выпуклый участок дискоцита, пэллор – центральный вогнутый участок дискоцита

Список литературы

1. Аванесова Н.И. Изменения эритроцитов при экспериментальном гипервитаминозе А / Н.И.Аванесова, В.В. Бородин, К.С. Гузев, М.Е. Иванова, Н.С. Крючкова, Т.А. Ломановская, Е.Н. Скребнева, О.Е. Хорошаев, Е.Е. Цуканов, В.И. Ноздрин // Альманах "Ретиноиды" – 2021. Вып. 36. – С. 83-85.
2. Автандилов Г.Г Медицинская морфометрия / Г.Г Автандилов // М.: Медицина. – 1990. – 383с.
3. Афанасьев Ю. И. Изменения эритроцитов при введении избыточных доз ретиноидов. / Ю. И. Афанасьев, В. И Ноздрин., К. Ф. Фофанова, Ю. Т. Волков, О. И. Михайлов, С. М. Субботин, В. М. Падалко // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. – 1982 – Т. ХСIV. – № 12. – С. 20-22.
4. Белугин Д.А. Полиморфизм генов цитокинов и его вклад в вариабельность количественного содержания мембранных белков эритроцитов человека. / Д.А. Белугин // Дисс. канд. биол. наук. – 2006. – 227с.
5. Блюменфельд Л.А. Гемоглобин / Л.А. Блюменфельд // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – №4. – С.33-38.
6. Боровская М.К. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменения при патологии разного генеза. / М.К. Боровская Э.Э. Кузнецова, В.Г. Горохова, Л.Б. Корякина, Т.Е. Курильская, Ю.И. Пивоваров // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – № 3(73). – С. 334-354
7. Боронихина Т. В. Плазмолемма эритроцитов и ее изменения в течение жизни клеток./ Т. В. Боронихина, Т. А. Ломановская, А. Н. Яцковский // Журнал анатомии и гистопатологии, 2021, Том 10, № 2 стр. 62-72
8. Ващенко В. И. Везикуляция эритроцитов человека и ее роль в донорских эритросодержащих комплнентах / В. И. Ващенко, В.Н. Вильянинов, Л.А. Скрипай, Е.Ф. Сороколетова // Вестник российской военно-медицинской академии. – 2020. – № 1(69). – С.173-179.
9. Воробьев А.И. Руководство по гематологии. / А.И. Воробьев // - 2007. М. – Ньюдиамед. – 1275 с.
10. Гаджиева З.М. Действие гипревитаминоза А на эпителий тонкой кишки крыс. / З.М. Гаджиева // Бюл. эксп. биол. мед. – 1984а. – Т. 97. – № 1. – С. 108-110.
11. Гаджиева З.М. Изменения слизистой оболочки тонкой кишки крыс при гипервитаминозе А. / З.М. Гаджиева // Вопр. питан. – 1984б. – № 3. – С. 47-50.
12. Гомзикова М.О. Мембранные микровезикулы: биологические свойства и участие в

- патогенезе заболеваний. / М.О. Гомзикова, Р.Ф. Гайфуллина, И.Г. Мустафин, В.М. Чернов, З.Р. Мифтахова, А.С. Галявич, А.А. Ризванов // *Гены & Клетки* – 2013. – Т. VIII. – № 1. – С. 6-11
13. Гублер Е. В. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях Е. В. Гублер, А. А. Генкин / Л.: Медицина. – 1973. – 144 с.
14. Жукоцкий А.В. Телевизионная компьютерная морфоденситометрия нормальных и патологических структур клеток и тканей. / А.В. Жукоцкий // Автореф. дисс. докт. мед. наук – М.: – 1992. – 40 с.
15. Иванова И.Л. Возрастные и половые особенности фосфолипидного состава эритроцитов крыс линии Вистар в процессе постнатального онтогенеза. И.Л. Иванова, Э.А. Эндакова, Т.П. Новгородцева / *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* // - 2002. – Т. 88. – № 1. – С. 53-62.
16. Карташова Н.М., Изменения конфигурации и ультраструктуры эритроцитов в экстремальных для клеток условиях. / Н.М. Карташова, В.Н. Кидалов, Э.М. Наумова, А.А. Хадарцев. // *Вестник новых медицинских технологий* – 2005а – Т. XI. – № 1. – С. 5-8.
17. Карташова Н.М. К вопросу о физиологической значимости изменения формы, ультраструктуры и флуоресценции эритроцитов периферической крови при их трансформации в стоматоциты. / Н.М. Карташова, В.Н. Кидалов, Э.М. Наумова, А.А. Хадарцев, А.С. Цогоев // *Вестник новых медицинских технологий* – 2005б – Т. XI – № 1 – С. 8-11.
18. Коколина В.Ф., Технологии системной ретинолотерапии в педиатрической практике. / В.Ф. Коколина, А.В. Картелищев, В.И. Альбанова, Г.М. Родионова, К.В. Ноздрин. // (методические рекомендации № 10) – под ред. А.Г. Румянцева. М., изд. ЗАО «Ретиноиды». – 2007. – 44 с.
19. Крюкова Л.В. Интенсивность гликолиза и энергетический обмен в эритроцитах при экспериментальном гипервитаминозе А. / Л.В. Крюкова, А.А. Грозина, С.И. Камаева // *Вопросы медицинской химии.* – 1976. – Т. 22. – № 5. – С. 640-642
20. Ланкин В.З. Итоги изучения патофизиологических последствий нарушения регуляции свободнорадикальных процессов: тупик или новый импульс? / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе // *Acta Biomedica Scientifica.* – 2016. – Т.1. – №3(2) – С.160-167 doi.: 10.12737/article_590823a5489433.14864804
21. Ломакина Е.Б. Компьютерный морфоденситометрический анализ эритроцитов в норме и у детей, проживающих в зонах радионуклидного загрязнения. / Е.Б. Ломакина // Автореф. дисс. канд. мед. наук – М. – 1995. – 23 с.
22. Ломакина Е.Б. Компьютерный морфоденситометрический анализ эритроцитов в норме и при низких дозах радиации. / Е.Б. Ломакина Т.К. Дубовая, Э.М. Коган // *Бюл. эксп. биол. мед.* – 1997. – Т. 124. – № 11. – С. 591-592.

23. Ломако В.В., Трансформация эритроцитов у крыс разных возрастов. / В.В. Ломако, О.В. Шило // Успехи герантологии. – 2019. – Т. 32(1-2). – С. 55-59
24. Ломановская Т. А. Влияние масляной основы раствора ретинола пальмитата на морфологию эритроцитов / Т. А., Ломановская, Т. В. Боронихина, Г.А., Пьявченко А. Н. Яцковский // Морфологические ведомости, 2021, том 29 № 3 стр. 48-54
25. Ломановская Т. А. Изменения морфологии эритроцитов при передозировке ретинола пальмитата./ Т. А. Ломановская., Т. В. Боронихина, А. Н. Яцковский // Оперативная хирургия и клиническая анатомия, 2020, №1, стр. 46-51
26. Ломановская Т. А. Оценка информативности морфологических изменений эритроцитов при гипервитаминозе А и выбор прогностических признаков его возникновения / Т. А. Ломановская., Т. В. Боронихина, А. Н. Яцковский // Клиническая и экспериментальная морфология, 2022, Том 11 № 1, стр. 73-78. DOI: 10.31088/СЕМ2022.11.1.82-87.
27. Луценко М.Т. Компьютерный анализ строения мембран эритроцитов различных форм. / М.Т. Луценко // Морфология. – 2009. – № 6. – С. 82-84.
28. Лысов Н.А., Связь способности эритроцитов к деформации со структурными перестройками мембран красных клеток крови у лиц различных возрастных групп. / Н.А. Лысов, А.П. Горис, Е.Г. Зарубина, С.В. Москвин // Морфологические ведомости. – 2011. – № 4. – С.69-72.
29. Любарев А.Е. Влияние ретиноидов на осмотическую стойкость эритроцитов. / А.Е. Любарев, Б.И. Курганов // Хим.-фарм. журн. – 1987. – Т. 21. – № 8. – С.919-923.
30. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. / Г.А. Меркулов //Л.: Медицина. – 1969. – 423 с.
31. Минашкина Т.А. Морфологическая характеристика эритроцитов при экспериментальном гипервитаминозе А. / Т.А. Минашкина // Морфология, 2011, Том 139, № 2, стр. 41 – 44
32. Михайлов О.И. Изменение эритроцитов под действием ретиноевой кислоты. / О.И. Михайлов // В сб.: Ретиноиды. – М.: ЗАО «Ретиноиды». – 1997. – Вып. 5. – С.70-74.
33. Мордовцев В.Н. Ретинола пальмитат в лечении больных с нарушениями кератинизации. / В.Н. Мордовцев, В.И. Альбанова, И.А. Иванова, А.Ю. Прохоров, Д.Б. Сонин, В.Г. Васильчиков, Т.Н. Гришко, Ю.И. Орешкина // В сб.: Ретиноиды. – М.: ЗАО «Ретиноиды». – 2014. – Вып. 33. – С.19–26.
34. Муравьев А. В. Деформация эритроцитов: роль в микроциркуляции. / А. В. Муравьев, В. Л. Комлев, П. В. Михайлов, А. А. Ахапкина, А. А. Муравьев // Ярославский педагогический вестник – 2013. – Том III – № 2 (Естественные науки) – С. 93–102
35. Нагорнов Ю. С. Оптимизация формы эритроцита в соответствии с данными атомно-

- силовой микроскопии. Математическая морфология. / Ю. С. Нагорнов, И. В. Жилиев // Электронный математический и медико-биологический журнал. – 2013. – Т. 12. – Вып. 1. – С. 1-12.
36. Новожилов А.В. Динамика гематологических показателей и индекса деформируемости эритроцитов в ювенальном периоде крыс и морских свинок. / А.В. Новожилов, Л.Н. Катюхин, Б.А. Фейзуллаев // Журнал эволюц. биохимии и физиол. – 2012. – Т. 48. – № 1. С. 32-42. doi: 10.1134/S0022093012010057
37. Ноздрин В. И. Фармакологические свойства биологически активных форм витамина А/ В.И. Ноздрин, Ю.Т. Волков // В сб.: Ретиноиды. – М.: ЗАО «Ретиноиды». – 1995. – Вып. 2. – С.12–28.
38. Первушин Ю. В., Гематологические исследования в клинической лабораторной диагностике. / Ю. В. Первушин, С. А. Луговская, Л. А. Марченко, Н. И. Ковалевич // Учебное пособие. Ставрополь. – 2006.
39. Плескова С.Н. Изменения строения и фрактальной размерности эритроцитов под влиянием наночастиц магнетита (исследование с использованием атомно-силовой микроскопии). / С.Н. Плескова, Р.Н. Крюков, С.Ю. Зубков //Морфология. – 2018. – Т. 153. – № 2. – С. 42-46
40. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. // М.: Гриф и К. – 2012. – 944 с.
41. Рыбалкина Т. С. Возможности использования мази Рецедил в дерматологии. / Т. С. Рыбалкина, В. И. Альбанова // В сб.: Ретиноиды. – М.: ЗАО «Ретиноиды». – 2011. – Вып. 32. – С. 150 - 156.
42. Саницкий В. Б. Препарат Рецедил в практике хирурга / В. Б. Саницкий, В. И. Альбанова // В сб.: Ретиноиды. – М.: ЗАО «Ретиноиды». – 2011. – Вып. 32. – С. 156 - 169.
43. Сидоров А.К. Факторы стабильности цитоскелета эритроцитов. / А.К. Сидоров // Интернет-конференция: "Наука – вместе" <http://science.mirvmeste.com> – 2009.
44. Теплый Д. Д. Особенности морфофизиологических показателей эритроцитов белых крыс на этапах онтогенеза в норме и при оксидативном стрессе. / Д.Д.Теплый // Автореф. дисс. канд. биол. Наук. – 2011. – 20 с.
45. 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
46. Умудов Х. М. Автоматизированная морфометрия эритроцитов в норме и при холестеринозе. / Х. М. Умудов // Автореф. дисс. канд. мед. наук – М. – 1987. – 21 с.
47. Цибулевский А.Ю. Состояние эритроцитов интактных и ваготомированных крыс различного возраста после массивной кровопотери. / А.Ю.Цибулевский, Т.К. Дубовая, Б.З.

- Соколинский, В.С. Медовый, А.М. Пятницкий // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2009. – №2. – С.129-136
48. 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 doi:10.25837/НАТ.2019.51.80.003
49. Яцковский А.Н. Морфоденситометрический анализ эритроцитов мышей, получавших различные дозы ретиноевой кислоты. / А. Н. Яцковский, Е. А. Анашкина // Морфология. – 2002. – Т. 121. – № 2–3. – 189 с.
50. Abbas Y. M. Band 3 function and dysfunction in a structural context. / Y. M. Abbas, A. M. Toye, J. L. Rubinstein, R. A. F. Reithmeier // Current Opin Hematol. – 2018. - Vol. 25. – №3 – P. 1-8. doi:10.1097/moh.0000000000000418 .
51. Abed M. Stimulation of Phospholipid Scrambling of the Erythrocyte Membrane by 9-Cis-Retinoic Acid. / M. Abed, K. Alzoubi, F. Lang, A. Al Mamun Bhuayn // Cell Physiol Biochem. – 2017. – Vol. 41. – № 2. – P. 543–554. doi:10.1159/000457014 .
52. Agrawal R. Assessment of red blood cell deformability in type 2 diabetes mellitus and diabetic retinopathy by dual optical tweezers stretching technique. / R. Agrawal, T. Smart, J. Nobre-Cardoso, C. Richards, R. Bhatnagar, A. Tufal, D. Shima, P.H Jones, C. Pavesio // Sci Rep. – 2016. – Vol. 6. – 15873p. doi: 10.1038/srep15873.
53. Alarcyn-Corredor O. M. La hipervitaminosis A: una enfermedad multisistémica. / O. M. Alarcyn-Corredor // Revista de la Facultad de farmacia. – 2006. – Vol. 48. – № 2. – P. 13-20
54. Allen L.H. Estimating the Potential for Vitamin A Toxicity in Women and Young Children. / L.H. Allen, M. J Haskell // Nutr. – 2002. – Vol. 132. – №.9. – P. 2907-2919. doi:10.1093/jn/132.9.2907s
55. Alper, S. L. Genetic diseases of PIEZO1 and PIEZO2 dysfunction. / S. L. Alper // Curr. Top. Membr. – 2017. Vol.79. – P. 97–134. doi: 10.1016/bs.ctm.2017.01.001
56. Amaidena M. R. Involvement of membrane tubulin in erythrocyte deformability and blood pressure. / M. R. Amaidena, N. E. Monesteroloa, V. S. Santander, A. N. Campetellia, C. A. Arceb, J. Picc, S. I. Hoped, M. S. Vattad, C. H. Casalea // Journal of Hypertensio – 2012. – Vol. 30. – № 1. – P. 1414–1422. doi:10.1097/HJH.0b013e328353b19a
57. An X. Phosphatidylserine binding sites in erythrocyte spectrin: location and implications for membrane stability. / X. An, X. Guo, H. Sum, J. Morrow, W. Glatzer, N. Mohandas // Biochemistry. – 2004. – Vol. 43. – P. 310–315
58. An X. Tropomyosin modulates erythrocyte membrane stability. / X. An, M. Salomao, X. Guo, W. Gratzer, N. Mohandas // Blood. – 2007. – Vol. 109. – № 3. – P. 1284–1288
59. An X. Disorders of red cell membrane. / X. An, N. Mohandas // Br. J. Haematol. – 2008. – Vol.

141. №3. – P. 367–375

60. Andolfo I. New insights on hereditary erythrocyte membrane defects. / I. Andolfo, R. Russo, A. Gambale, A. Iolascon // *Haematologica*. – 2016. – Vol. 101. – №11. – P.1284-1294. doi:10.3324/haematol.2016.142463

61. Antonelou M. H. Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice. / M. H. Antonelou, A. G. Kriebardis, I. S. Papassideri // *Blood Transf.* – 2010. – Vol. 8. – Suppl. 3. – P. s39–s47. doi: 10.2450/2010.007S

62. Aoki T. A comprehensive review of our current understanding of red blood cell (RBC) glycoproteins. / T. Aoki // *Membranes (Basel)*. – 2017. – Vol. 7. – № 4. – 56p. doi:10.3390/membranes7040056

63. Arese P. Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. / P. Arese, F. Turrini, E. Schwarzer // *Cell Physiol. Biochem.* – 2005. – Vol. 16. – P. 133–146. doi: 10.1159/000089839

64. Asaro R.J. Erythrocyte aging, protection via vesiculation: an analysis methodology via oscillatory flow. / Asaro R.J., Zhu Q., Cabrales P. // *Front. Physiol.* – 2018. – Vol. 9. – 1607p. doi:10.3389/fphys.2018.01607

65. Asaro R.J. Vital erythrocyte phenomena: what can theory, modeling, and simulation offer? / R.J. Asaro, Q. Zhu // *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*. – 2020. – Vol.19. – № 5. – P. 1361-1388. doi:10.1007/s10237-020-01302-x

66. Babu N. Influence of hypercholesterolemia on deformability and shape parameters of erythrocytes in hyperglycemic subjects. / N. Babu // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2009. – Vol. 41. – № 3. – P. 169–177

67. Bacus J. W. Quantification of Red Blood Cell Morphology. / J. W. Bacus, N.Y. Press // *Cell Analysis*. – 1982. – P. 1–31. doi:10.1007/978-1-4684-4097-3_1.

68. Badior K.E. Molecular Mechanism for the Red Blood Cell senescence clock. / K.E. Badior J.R. Casey // *IUBMB Life*. – 2018. – Vol. 70. – №1. – P. 32–40. doi:10.1002/iub.1703.

69. Baines A. J. Protein 4.1 and the control of ion channels. / A. J. Baines, P. M. Bennett, E. W. Carter, C. Terracciano // *Blood cell Mol. Dis.* – 2009. – Vol. 42. – № 3. – P. 211–215 doi: 10.1016/j.bcmed.2009.01.016.

70. Baines A. J. Evolution of the spectrin-based membrane skeleton // A.J. Baines // *Transfus. Clin. Biol.* – 2010. – Vol. 17. – № 3. – P. 95–103. doi: 10.1016/j.tracli.2010.06.008.

71. Bangham A.D. Studies on the mode of action of excess of vitamin A. 9. Penetration of lipid monolayers by compounds in the vitamin A series. / A.D. Bangham, J.T. Dingle, J.A. Lucy // *Biochem J.* – 1964. – Vol. 90. – №1. – P. 133-140. doi: 10.1042/bj0900133.

72. Benga G. Water channels proteins (later called aquaporins) and relatives: past, present, and

- future. / G. Benga // *IUBMB Life* – 2009. – Vol. 61. – № 2. – P. 112–133
73. Berbis P. Rétinoïdes / P. Berbis // *EMC – Dermatologie*. – 2009. – Vol. 4. № 2. – P. 1–16. doi:10.1016/s0246-0319(09)48113-5 a. –645 b. -783.
74. Berg C. P. Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis Engels. / C. P. Berg, I. H. Engels, A. Rothbart, K. Lauber, A. Renz, S. F. Schlosser, K. Schulze-Osthoff, S. Wesselborg // *Cell Death Differ.* – 2001. Vol. 8. – №. 12. – P. 1197–1206. doi.org/10.1038/sj.cdd.4400905
75. Bernhardt I. Intracellular Ca²⁺ Concentration and Phosphatidylserine Exposure in Healthy Human Erythrocytes in Dependence on in vivo Cell Age. / I. Bernhardt, D.B. Nguyen, M.C. Wesseling, L. Kaestner // *Frontiers in Physiology*. – 2020. – Vol. 10. – 1629p. doi: 10.3389/fphys.2019.01629
76. Betz T. ATP-dependent mechanics of red blood cells. / T. Betz, M. Lenz, J. F. Joanny, C. Sykes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – Vol. 106. – № 36. P. 15320–15325 doi:10.1073/pnas.0904614106
77. Bevers E.M. Getting to the outer leaflet: physiology of phosphatidylserine exposure at the plasma membrane. / E.M. Bevers, P.I. Williamson // *Physiol Rev.* – 2016. – Vol. 96. – 605p.
78. Bissinger R. Oxidative stress, eryptosis and anemia: a pivotal mechanistic nexus in systemic diseases. / R. Bissinger, A. Al M. Bhuyan, S.M. Oadri, F. Lang // *FEBS J.* – 2019. – Vol. 286. – №5. – P. 826-854 doi:10.1111/febs.14606
79. Binkley N. Hypervitaminosis A and bone. // N. Binkley, D. Krueger *Nutr Rev.* – 2000. – Vol. 58. – № 5. – P. 138-144.
80. Blanc L. The water channel aquaporin-1 partitions into exosomes during reticulocyte maturation: implication for the regulation of cell volume. / L. Blanc, J. Liu, M. Vidal, J. A. Chasis, X. An, N. Mohandas // *Blood*. – 2009. – Vol. – 114. – № 18. – P. 3928–3934.
81. Blanc L., Reticulocyte membrane remodeling: contribution of the exosome pathway. / L. Blanc, M. Vidal // *Curr. Opin. Hematol.* – 2010. – Vol. 17. – № 3. – P. 177–183 doi:10.1097/MOH.0b013e328337b4e3
82. Bobrowska-Hägerstrand M. Membrane skeleton and red blood cell vesiculation at low pH / M. Bobrowska-Hägerstrand, H. Hägerstrand, A. Iglič // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. – 1998. – Vol. 1371. – No 1. – P. 123–128. doi:10.1016/s0005-2736(98)00011-x
83. Boguśławska D. Spectrin and phospholipids - the current picture of their fascinating interplay. / D. Boguśławska, B. Machnicka, A. Hryniewicz-Jankowska, A. Czogalla. // *Cellular and Molecular Biology Letters*. – 2014. – Vol. 19. – № 1. – P. 158-79. doi:10.2478/s11658-014-0185-5
84. Bonet M.L. Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. /M.L. Bonet, J. Ribot, F. Palou // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2012. – Vol. 1821. – № 1. – P. 177–

189 doi:10.1016/j.bbali.2011.06.001

85. Bookchin R.M. Identification and characterization of a newly recognized population of high-Na⁺, low-K⁺, low-density sickle and normal red cells / R.M. Bookchin, Z. Etzion, M. Sorette, N. Mohandas, J.N. Skepper, V.L. Lew // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2000. – Vol. 97. – P. 8045–8050.
86. Bosman G.J. Erythrocyte Aging: A More than Superficial Resemblance to Apoptosis? / G.J. Bosman, F. L. Willekens, J.M. Were // *Cell Physiol Biochem.* – 2005. – Vol. 16. – P.01-08
doi:10.1159/000087725
87. Bosman G.J. Comparative proteomics of erythrocyte aging in vivo and in vitro / G.J. Bosman, E. Lasonder, Y.A. Groenen-Döpp, F.L. Willekens, J.M. Werre, V.M. Novotný // *J Proteomics.* – 2010. – Vol. 73. – No 3. – P. 396-402. doi: 10.1016/j.jprot.2009.07.010. Epub 2009 Aug 4.
88. Bransky A. Correlation between erythrocytes deformability and size: A study using a microchannel based cell analyzer. / A. Bransky, N. Korin, Y. Nemirovski, U. Dinnar. // *Microvascular Research.* – 2007. – Vol. 73. – №1. – P. 7–13. doi:10.1016/j.mvr.2006.09.001
89. Briglia M. Eryptosis: Ally or Enemy. / M. Briglia, M.A. Rossi, C. Faggio // *Curr Med Chem.* – 2017. – Vol. 24. № 9. – P. 937-942. doi: 10.2174/0929867324666161118142425.
90. Browning J. A., Pathophysiology of red cell volume. / J. A. Browning, J. C. Ellory, J. S. Gibson // *Contrib. Nephrol.* – 2006. – Vol. 152. – P. 241–268
91. Bruce L. J. Mutations in band 3 and cation leaky red cells. / L. J. Bruce // *Blood Cell Mol. Dis.* 2006. – Vol 36. – № 3. – P. 331–336
92. Bruce L. J. Red cell membrane transport abnormalities. / L. J. Bruce // *Curr. Opin. Hematol.* – 2008. – vol. 15. – № 3. – P. 184–190
93. Bruce L. J. Hereditary stomatocytosis and cation-leaky red cells—recent developments. / L. J. Bruce // *Blood Cell Mol. Dis.* – 2009. – Vol. 42. – № 3 – P. 216–222
94. Bystrická Z, Gas chromatography determination of fatty acids in the human erythrocyte membranes - A review. / Z. Bystrická, Z. Ďuračková // *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* – 2016. – Vol. 115. – P. 35-40. doi: 10.1016/j.plefa.2016.09.007.
95. Cällari D. Biochemical and ultrastructural research on the antagonism between vitamins A and D at the level of the erythrocyte membrane / D. Cällari, R. Cicero, G. Ciancio, A. Billitteri // *Boll Soc Ital Biol Sper.* – 1982. – Vol. 58. No 16. – P.1068-1074
96. Cao J. Incorporation and clearance of omega-3 fatty acids in erythrocyte membranes and plasma phospholipids. / J. Cao, K.A. Schwichtenberg, N.Q. Hanson, M.Y. Tsai. // *Clin Chem.* – 2006. – Vol. 52. – № 12. – P.2265-2272.
97. Castano G. Vitamin A toxicity in a physical culturist patient: a case report and review of the literature. // G. Castano, C. Etchart, S. Sookoian // *Ann Hepatol.* – 2006. – Vol. 5. – № 4. – P. 293 - 295.

98. Catalá A. Five Decades with Polyunsaturated Fatty Acids: Chemical Synthesis, Enzymatic Formation, Lipid Peroxidation and Its Biological Effects. / A. Catalá // *Journal of Lipids*. – 2013. – P. 1 – 19. doi:10.1155/2013/710290
99. Cha J.H. Vitamin A supplementation modifies the antioxidant system in rats. / J.H. Cha, Q.M. Yu, J.S. Seo // *Nutrition Research and Practice*. – 2016. – Vol. 10. – № 1. – P.26-32. doi:10.4162/nrp.2016.10.1.26
100. Chen K. Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. / K. Chen, J.Liu, S.Heck, J. A. Chasis, X.An, N. Mohandas // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – Vol. 106. – № 41. – P. 17413–17418.
101. Chen M., An Enhanced Spring-Particle Model for Red Blood Cell Structural Mechanics: Application to the Stomatocyte–Discocyte–Echinocyte Transformation. / M. Chen, F.J. Boyle // *J Biomech Engin*. – 2017. – Vol.139. – №12. – P. 1-43. doi:10.1115/1.4037590
102. Chen C. Effects of plant oils with different fatty acid composition on cardiovascular risk factors in moderately hypercholesteremic Chinese adults: a randomized, double-blinded, parallel-designed trial. / C. Chen, P. Wang, Z. Zhang, Y. Ye, S. Zhuo, Q. Zhou, B. Zhang // *Food & Function*. – 2020. – Vol. 11. – No. 8. – P. 7164-7174. DOI:10.1039/d0fo00875c
103. Cheruvattath R. Vitamin A toxicity: when one a day doesn't keep the doctor away. / R. Cheruvattath, M. Orrego, M. Gautam, T. Byrnel, S. Alam, M. Voltchenok, M. Edwin, J. Wilkens, W. Williams, H.E.Vargas // *Liver Transplantation*. – 2006. – Vol. 12. – №12. – P. 1888–1891.
104. Chi L. M. Effective bilayer expansion and erythrocyte shape change induced by monopalmitoyl phosphatidylcholine. Quantitative light microscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy measurements / L.M. Chi, W.G. Wu // *Biophysical Journal*. – 1990. – Vol. 57. No 6. – P. 1225–1232. doi:10.1016/s0006-3495(90)82641-2
105. Chroni E. Neuromuscular adverse effect associated with systemic retinoid dermatotherapy: monitoring and treatment algorithm for clinicians. / E. Chroni, A. Monastirli, D.Tsambaos // *Drug Saf*. – 2010. – Vol. 33. – №1. – P. 25-34
106. Ciana A. Spectrin and other membraneskeletal components in human red blood cells of different age. /A. Ciana, C. Achilli, G. Minetti // *Cell Physiol Biochem*. – 2017.– Vol.42.–P.1139-1152 doi.org/10.1159/000478769
107. Citelli M. Vitamin a modulates the expression of genes involved in iron bioavailability. / M. Citelli, L.L. Bittencourt, S.V. Da Silva, A.P.T. Pierucci, C. Pedrosa // *Biol Trace Elem Res*. – 2012. – Vol. 149. – P. 64–70. doi: 10.1007/s12011-012-9397-6.
108. Coghlan D. Complementary medicine and vitamin A toxicity in children. / D. Coghlan, N.E. Cranswick // *Med J Aust*. – 2001. – Vol. 175. – № 4. – P. 223 -224.
109. Conrard L. Spatial relationship and functional relevance of three lipid domain populations at the

- erythrocyte surface. / L. Conrard, A. Stommen, A.S. Cloos, J. Steinkuhler, R. Dimova, H. Pollet, D. Tyteca // *Cell Physiol Biochem.* – 2018. – Vol. 51. № 4. – P. 1544-1565. doi:10.1159/000495645
110. Czogalla A. Do we already know how spectrin attracts ankyrin? / A. Czogalla, A. F. Sikorski // *Cell Mol. Life Sci.* – 2010. – Vol. 67. – № 16. – P. 2679–2683
111. D’Ambrosio D.N. Vitamin A Metabolism: An Update. / D.N. D’Ambrosio, R.D. Clugston, W.S. Blaner // *Nutrients.* – 2011. – Vol 3. – P. 63-103; doi:10.3390/nu3010063
112. Davidsson L. The effect of retinyl palmitate added to iron-fortified maize porridge on erythrocyte incorporation of iron in African children with vitamin A deficiency. / L. Davidsson, P.Adou, C.Zeder, T.Walczyk, R. Hurrell // *British J Nutr.* – 2003. – Vol. 90. – P. 337–343. doi: 10.1079/BJN2003914
113. De Oliveira S. An overview about erythrocyte membrane. / S. De Oliveira, C. Saldanha // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2010. – Vol. 44. – №1. – P. 63–74
114. De Oliveira, M.R. Vitamin A and Retinoids as Mitochondrial Toxicants. / M.R. De Oliveira // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – 2015. – Vol. 140267. – P.1–13. doi:10.1155/2015/140267
115. De Rosa M. C. Allosteric properties of hemoglobin and the plasma membrane of the erythrocyte: new insights in gas transport and metabolic modulation. / M. C. De Rosa, C.Carelli Alinovi, A.Galtieri, A.Russo, B. Giardina // *IUBMB Life.* – 2008. – Vol. 60. – № 2. – P. 87–93
116. Delaunay J. The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders. / J.Delaunay // *Blood Rev.* – 2007. – Vol. 21. – P. 1–20.
117. Devaux P. F. How lipid flippases can modulate membrane structure. / P. F. Devaux, A. Herrmann, N. Ohlwein, M. M. Kozlov // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1778. – №7-8. – P.1591–1600
118. Diaz-Silva M., Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease / M. Diaz-Silva, M. Dao, J. Han, C.T. Lim, S. Suresh // *MRS Bull.* – 2010. Vol. 35. No 2. – P. 382-388.
119. Dingle J.T. Studies on the mode of action of excess of vitamin A. 5. The effect of vitamin A on the stability of the erythrocyte membrane / J.T. Dingle, J.A. Lusy // *Biochem J.* – 1962. – Vol. 84. – No 3. – P. 611-21. doi: 10.1042/bj0840611.
120. Discher D.E. New insights into erythrocyte membrane organization and microelasticity / D.E. Discher // *Curr Opin Hematol.* – 2000. – Vol. 7. – 117–122.
121. Dupire J. Full dynamics of a red blood cell in shear flow / J. Dupire, Socol M., Viallat A. // *PNAS.* – 2012. – Vol.109. – № 51. – P. 20808–20813. doi/10.1073/pnas.1210236109
122. Eber S. Hereditary spherocytosis—defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer. / S. Eber, S. E. Lux // *Semin. Hematol.* – 2004. – Vol. 41. – № 2 – P. 118–141

123. Edem D. O. Vitamin A: a review. / D. O. Edem // *Asian J. Clin. Nutr.* – 2009. – Vol. 1. – №1. – P. 65–82
124. Erturan I. Isotretinoin treatment induces oxidative toxicity in blood of patients with acne vulgaris: a clinical pilot study. / I. Erturan, M. Nazıroğlu, V.B. Akkaya // *Cell Biochem Funct.* – 2012. – Vol. 30. – c № 7. – P. 552-557. doi: 10.1002/cbf.2830.
125. Escaron A. L. Orally ingested 13C2-retinol is incorporated into hepatic retinyl esters in a nonhuman primate (*Macaca mulatta*) model of hypervitaminosis A. / A. L. Escaron, S. A. Tanumihardjo // *Comp Med.* – 2010. – Vol. 60. – №1. – P. 71–76.
126. Farag M. R. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity / M.R. Farag, M. Alagawany // *Chemico-Biological Interactions.* – 2018. – Vol. 279. – P.73-83. doi:10.1016/j.cbi.2017.11.007
127. Fats and fatty acids in human nutrition: Report of an expert consultation. // *FAO Food Nutr Pap.* – 2010. – Vol. 91. – P.1-166.
128. Ferru E. Regulation of membrane–cytoskeletal interactions by tyrosine phosphorylation of erythrocyte band 3. / E. Ferru, K. Giger A. Pantaleo E. Campanella, J.Grey, K. Ritchie, R. Vono, F. Turrini, P. S. Low// *Blood.* – 2011. – Vol. 117. – № 22. – P. 5998-6006. doi: 10.1182/blood-2010-11-317024.
129. Fischer T. M. Shape memory of human red blood cells. / T. M. Fischer // *Biophys. J.* – 2004. – Vol. 86. – № 5. – P. 3304–3313
130. Föllner M. Erythrocyte programmed cell death. / M. Föllner, S. M. Huber, F. Lang // *IUBMB Life.* – 2008. – Vol. 60. – № 10. – P. 661–668
131. Fonseca Y. O. On the presence of hepatic stellate cells in portal spaces. / Y. O. Fonseca, C. B. Lima, E. T. Santos, Z. A. Andrade // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* – 2005. – Vol. 100. – № 3. – P. 289–291
132. Ford J.C., Red Blood Cell Morphology Reporting: How Much is a Waste of Time? / J.C. Ford, R. Milner, D.D. Dix // *J. Ped. Hematol./Oncol.* – 2011. – Vol. 33. – No 1. – P. 10-14.
133. Forsyth A.M. The effects of membrane cholesterol and simvastatin on red blood cell deformability. /A.M. Forsyth, S. Braunmüller, J. Wan, T. Franke, H.A. Stone // *Microvasc Res.* – 2012. – Vol. 83. – № 3. – P. 347–351 doi:10.1016/j.mvr.2012.02.004
134. Franco R. S. Changes in the properties of normal human red blood cells during in vivo aging. / R. S. Franco, M. E. Puchulu-Campanella, L. A. Barber, M. B. Palascak, C. H. Joiner, P. S. Low, R. M. Cohen. // *American Journal of Hematology.* – 2013. – Vol. 88. – №1. – P. 44–51. doi:10.1002/ajh.23344
135. Friebe M. Influence of osmolarity on the optical properties of human erythrocytes. / M. Friebe // *J Biomed Optics.* – 2010. – Vol. 15. – № 5. 055005 p. doi:10.1117/1.3486542

136. Fujii T. Phospholipid dynamics and function in cell membrane of blood cells. With reference to mode of action of certain amphiphilic drugs / T. Fujii // *Yakugaku Zasshi*. – 1994. – Vol. 114. No 6. – P. 374-87. doi: 10.1248/yakushi1947.114.6_374
137. Gabreanu G.R. Erythrocyte membrane in type 2 diabetes mellitus / G.R. Gabreanu, S. Angelescu // *Discoveries (Craiova)*. – 2016. – Vol. 4. – No 2. – 60 p. doi: 10.15190/d.2016.7
138. Gallagher P.G. Abnormalities of the Erythrocyte Membrane. / P.G. Gallagher // *Pediatr Clin N Am*. – 2013. – Vol. 60. – № 6. – P. 1349–1362. doi. 10.1016/j.pcl.2013.09.001
139. Gallagher P.G. Disorders of erythrocyte hydration / P.G. Gallagher// *Blood*. – 2017. – Vol. 130 No 25. – P. 2699-2708. doi: 10.1182/blood-2017-04-590810.
140. Garcia-Aloy M. Biomarkers of food intake for nuts and vegetable oils: an extensive literature search. / M. Garcia-Aloy, P.J.M. Hulshof, S. Estruel-Amades, M.C.J. Osté, M. Lankinen, J.M. Geleijnse, C. Andres-Lacueva // *Genes & Nutrition*. – 2019 – Vol. 14. – P. 7. doi: 10.1186/s12263-019-0628-8
141. Gautier E.F. Absolute proteome quantification of highly purified populations of circulating reticulocytes and mature erythrocytes. / E.F. Gautier, M. Leduc, S. Cochet, K. Bailly, C. Lacombe, N. Mohandas, F. Guillonneau, W. El Nemer, P. Mayeux // *Blood Adv* – 2018. – Vol. 2. – № 20. – P. 2646–2657. doi:10.1182/bloodadvances.2018023515
142. Ghashghaeinia M. Proliferating tumor cells mimick glucose metabolism of mature human erythrocytes / M. Ghashghaeinia, M. Köberle, U. Mrowietz, I. Bernhardt // *Cell Cycle*. – 2019. – Vol. 18. – No 12. – P. 1316-1334. doi: 10.1080/15384101.2019.1618125.
143. Ghebremeskel K. Arachidonic and docosahexaenoic acids are strongly associated in maternal and neonatal blood. / K. Ghebremeskel, M.A. Crawford, C. Lowy, Y. Min, B. Thomas, I. Golfetto, D. Bitsanis, K. Costeloe // *Eur. J. Clin. Nutr.* – 2000. – Vol. 54. №1. – P. 50-56.
144. Ghosh S. Evaluating the morphology of erythrocyte population: An approach based on atomic force microscopy and flow cytometry / S. Ghosh, I. Chakraborty, M. Chakraborty, A. Mukhopadhyay, R. Mishra, D. Sarkar // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. – 2016. – Vol. 1858. № 4. – 671–681. doi: 10.1016 / j.bbamem.2016.01.021
145. Gimsa J. A Possible Molecular Mechanism Governing Human Erythrocyte Shape / J.A. Gimsa // *Biophysical Journal*. – 1998. – Vol. 75. No 1. – 568p. doi:10.1016/s0006-3495(98)77546-0
146. Girasole M. Artificially induced unusual shape of erythrocytes: an atomic force microscopy study. / M. Girasole, A. Cricenti, R. Generosi, A. Congiu-Castellano, G. Boumis, G. Amiconi. // *Journal of Microscopy*. – 2001. – Vol. 204. № 1. – P. 46–52. doi:10.1046/j.1365-2818.2001.00937.x
147. Girasole M. Structure and function in native and pathological erythrocytes: A quantitative view from the nanoscale. / M. Girasole, S. Dinarelli, G.Boumis // *Micron*. – 2012. – Vol. 43. – P. 1273–1286. doi:10.1016/j.micron.2012.03.019

148. Glauert A. M. Studies on the mode of action of excess of vitamin A. VII. Changes in the fine structure of erythrocytes during haemolysis by vitamin A / A. M. Glauert, M. R. Daniel, J. A. Lucy, Dingle // *TJ. Cell Biology*. – 1963. – Vol. 17. – P. 111–121
149. Goi G. Erythrocyte membrane alterations during ageing affect beta-D-glucuronidase and neutral sialidase in elderly healthy subjects. / G. Goi, R. Cazzola, C. Tringali, L. Massaccesi, S.R. Volpe, M. Rondanelli, E. Ferrari, C. J. Baguero Herrera, B. Cestaro, A. Lombardo, B. Venerando // *Exp Gerontol*. – 2005. Vol. 40. – № 3. – P. 219-25. doi: 10.1016 / j.exger.2004.08.013.
150. Gokhin D.S. Dynamic actin filaments control the mechanical behavior of the human red blood cell membrane. / D.S. Gokhin, R.B. Nowak, J.A. Khoory, A. de la Piedra, I.C. Ghiran, V.M. Fowler // *Mol Biol Cell*. – 2015. – Vol. 26. № 9. – P. 1699–1710. doi:10.1091/mbc.E14-12-1583
151. Gornicki A., Gutsze A. In vivo and in vitro influence of etretinate on erythrocyte membrane fluidity. / A. Gornicki // *European J. Pharm.* – 2001. – Vol. 423. – P. 127–134
152. Gornicki A. Influence of the retinoid acitretin on erythrocyte microrheology in vitro. / A. Gornicki // *Int J Clin Pharmacol Ther.* – 2006. – Vol. 44. – №12. – P. 648-654
153. Hals P.A. The time course of erythrocyte membrane fatty acid concentrations during and after treatment of non-human primates with increasing doses of an omega-3 rich phospholipid preparation derived from krill-oil. / P.A. Hals, X. Wang, F. Piscitelli, V. Di Marzo, Y.F. Xiao. // *Lipids Health Dis.* – 2017. – Vol. 16. № 1. – 16 p. doi: 10.1186/s12944-017-0414-9.
154. Hamidi M. Carrier erythrocytes: an overview. / M. Hamidi, H. Tajerzadeh. // *Drug Deliv.* – 2003. – Vol. 10. – №1. – P. 9–20
155. Han L. Effect of different dosage of vitamin A supplement on anti-oxidative activity and the fluidity of erythrocyte membrane in rats. / L. Han, A. Ma, Y. Zhang // *Wei Sheng Yan Jiu.* – 2004. – Vol. 33. – №4. – P.450-2. PMID: 15461273.
156. Harrison E. H. Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. / E. H. Harrison // *Annu. Rev. Nutr.* – 2005. – Vol. 25. – P. 87–103
157. Hathcock J. N. Evaluation of vitamin A toxicity / J. N. Hathcock, D. G. Hattan, M. Y. Jenkins, J. T. McDonald, P. R. Sundaresan, V. L. Wilkening // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1990. – 52. – P. 183–202.
158. Henning P. Retinoid receptors in bone and their role in bone remodeling. / P. Henning, H.H. Conaway, U.H. Lerner // *Frontiers in Endocrinology.* – 2015. – Vol. 6. – P. 1-13. doi:10.3389/fendo.2015.00031
159. Hodson L. Plasma and erythrocyte fatty acids reflect intakes of saturated and n-6 PUFA within a similar time frame. / L. Hodson, H.C. Eyles, K.J. McLachlan, M.L. Bell, T.J. Green, C.M. Skeaff // *J Nutr.* 2014. – Vol. 144. – №1. – P. 33-41. doi: 10.3945/jn.113.183749.
160. Hoque M. Augmenting the cytotoxicity of oleic acid-protein complexes: Potential of target-specific antibodies. / M. Hoque, J. Gupta, M. Saleemuddin // *Biochimie.* – 2017. – Vol. 137. – P. 139-

146. doi: 10.1016/j.biochi.2017.03.013
161. Hu L. Retinoic acid increases proliferation of human osteoclast progenitors and inhibits RANKL-stimulated osteoclast differentiation by suppressing RANK. / L. Hu, T. Lind, A. Sundqvist, A. Jacobson, H. Melhus // *PLoS ONE*. – 2010. – Vol. 5. – № 10. – P. 1-10. doi:10.1371/journal.pone.0013305.
162. Huisjes R. Squeezing for life—properties of red blood cell deformability. / R. Huisjes, A. Bogdanova, W.W. van Solinge, R.M. Schiffelers, L. Kaestner, R. van Wijk // *Front Phys*. – 2018. – Vol. 9. – P. 656. doi:10.3389/fphys.2018.00656.
163. Huisjes R. Density, Heterogeneity And Deformability Of Red Cells As Markers Of Clinical Severity In Hereditary Spherocytosis. / R. Huisjes, A. Makhro, E. Llaudet-Planas, L. Hertz, P. Petkova-Kirova, L.P. Verhagen, S. Pignatelli, A.E. Rab M., R. M. Schiffelers, E. Seiler, W. W. van Solinge, J-L.V. Corrons, L. Kaestner, M. Mañú-Pereira, A. Bogdanova, R. van Wijk // *Haematologica*. – 2020. – Vol. 105. – № 2. – P. 338-347347 doi:10.3324/haematol.2018.188151.
164. Iglesias-Fernandez J. Membrane phase-dependent occlusion of intramolecular GLUT1 cavities demonstrated by simulations. / J. Iglesias-Fernandez, P.J. Quinn, R.J. Naftalin, C. Domene // *Biophys J*. – 2017. – Vol. 112. – № 6. – P. 1176–1184. doi:10.1016/j.bpj.2017.01.030
165. Iglič A., Spherocyte shape transformation and release of tubular nanovesicles in human erythrocytes. / A. Iglič, P. Veranic, K. Jezernic, M. Fosnaric, B. Kamin, H. Hagerstrand, V. Kralj-Iglič // *Bioelec-trochemistry*. – 2004. – Vol. 62. № 2. – P.159-161.
166. Iolascon A. Red blood cell membrane defects / A. Iolascon, S. Perrotta, G.W. Stewart // *Rev Clin Exp Hematol*. – 2003. – Vol 7. – No 1. – P. 22–56.
167. Iolascon A. Advances in understanding the pathogenesis of red cell membrane disorders. / A. Iolascon, I. Andolfo, R. Russo // *British Journal of Haematology*. – 2019. – Vol. 187. No 1. P. 13-24. doi:10.1111/bjh.16126
168. Ipsaro J.J. Structural basis for spectrin recognition by ankyrin. / J.J. Ipsaro, A. Mondragyn // *Blood*. – 2010. – Vol.115. – № 20. – P. 4093–4101. doi.org/10.1182/blood-2009-255604.
169. Jackson H.A. Effect of vitamin A on fracture risk. / H.A. Jackson, A.H. Sheehan // *Ann Pharmacother*. – 2005. – Vol. 39. – № 12. – P. 2086-2090.
170. Jacob H.S. Membrane lipid depletion in hyperpermeable red blood cells: its role in the genesis of spherocytes in hereditary spherocytosis / H.S. Jacob // *Clin Invest*. – 1967. – Vol. 46. No12. – P. 2083-94. doi: 10.1172/JCI105695.
171. Jayalakshmi C. P. Effect of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) on rat erythrocytes / C. P. Jayalkshmi, J.D. Sharma // *Environ Res*. – 1986. – Vol. 41. No1. – P. 235-8.
172. Jeican I.I. Changes observed in erythrocyte cells exposed to an alternating current. / I.I. Jeican,

- H. Matei, A. Istrate, E.Mironescu, S. Balici // *Clujul Medical*. – 2017. – Vol.90. – № .2. – P.154-160. doi: 10.15386/cjmed-696.
173. Jenkins M.Y. Influence of excess vitamin E on vitamin A toxicity in rats / M.Y. Jenkins, G. V. Mitchell // *J. Nutr.* – 1975. – Vol. 105. – P. 1600–1608
174. Jeyakumar S.M. Chronic vitamin A-enriched diet feeding regulates hypercholesterolaemia through transcriptional regulation of reverse cholesterol transport pathway genes in obese rat model of WNIN/GR-Ob strain. / S.M. Jeyakumar, A. Sheril, A.Vajreswari // *Indian J Med Res.* – 2016. – Vol. 144. – № 2. – P. 238-244. doi: 10.4103/0971-5916.195038.
175. Jha R. Age-dependent decline in erythrocyte acetylcholinesterase activity: correlation with oxidative stress. / R. Jha, S. I. Rizvi // *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Polacky. Olomous. Czech. Repub.* – 2009. – Vol. 153. – Vol. 3. – P. 195–198. doi: 10.5507 / bp.2009.032
176. Johansson S. Subclinical hypervitaminosis A causes fragile bones in rats. / S. Johansson, P. Lind, H. Kansson, H. Oxlund, J. Orberg, H. Melhus // *Bone.* – 2002. – Vol. 31. – № 6. – P. 685–689. doi:10.1016/s8756-3282(02)00910-9
177. Kanakaraj P. Influence of hypercholesterolemia on morphological and rheological characteristics of erythrocytes / P. Kanakaraj, M. Singh // *Atherosclerosis.* – 1989. – Vol. 76. No 2-3. – P. 209–218. doi:10.1016/0021-9150(89)90105-6
178. Karar P.K. Effect of dietary protein on vitamin A levels in plasma and liver of hypervitaminotic-A rats. / P.K. Karar, R. Manavalan, G. Rajagopal // *Indian J Exp Biol.* – 2002. – Vol. 40. – № 3. – P. 355-358.
179. Kawahara T. N. Short-term vitamin A supplementation does not affect bone turnover in men. T. N. Kawahara, D. C. Krueger, J. A. Engelke, J. M. Harke, N. C. Binkley // *J. Nutr.* – 2002. – Vol. 132. № 6. – P. 1169–1172.
180. Khan A.A. Dematin and adducin provide a novel link between the spectrin cytoskeleton and human erythrocyte membrane by directly interacting with glucose transporter-1 / A.A Khan, T. Hanada, M. Mohseni, J.J. Jeong, L. Zeng, M. Gaetani, D. Li, B.C. Reed, D.W. Speicher, A.H. Chishti // *J Biol Chem.* – 2008. – Vol. 283. – P. 14600–14609.
181. Khasru M. R. Acute hypervitaminosis A in a young lady. / M. R. Khasru, R. Yasmin, A. K. Salek, K. H. Khan, S. D. Nath, S. Selim // *Mymensingh Med. J.* – 2010. – Vol. 19. – № 2. – P. 294–298.
182. Kim J. Advances in the measurement of red blood cell deformability: A brief review / J. Kim, H.Y. Lee, S. Shin // *J Cell Biotech.* – 2015. – Vol. 1. – P. 63–79. doi:10.3233/JCB-15007
183. Kim O.Y. Impact of Blood or Erythrocyte Membrane Fatty Acids for Disease Risk Prediction: Focusing on Cardiovascular Disease and Chronic Kidney Disease / O.Y. Kim, S.M. Lee, W.S. An // *Nutrients.* – 2018. – Vol. 10. – No 10. – 1454 p. doi: 10.3390/nu10101454

184. Klör H.U. The impact of oral vitamin A derivatives on lipid metabolism. / H.U. Klör, A. Weizel, M. Augustin, T.L. Diepgen, P. Elsner, B. Homey, A. Kapp, T. Ruzicka, T. Luger // *J Dtsch Dermatol Ges.* – 2011. – Vol. 8. – B. 9. – P. 600-606. doi: 10.1111/j.1610-0387.2011.07637.x.
185. 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. – № 24. – P. 6237–6245.
186. Kogawa H. Studies on in vitro effect of free fatty acids on water content and osmotic fragility of rabbit (*lepus cuniculus*) erythrocytes. / H. Kogawa, N. Yabushita, T. Nakajima, K. Kageyama // *Life Sciences.* – 1998. – Vol. 62. – № 9. – 823–828. doi:10.1016/s0024-3205(97)01184-3.
187. Kopylov V.F. Computerized morphodensitometric analysis of blood cells from individuals exposed to low-dose radiation / V.F. Kopylov, A.V. Zhukotsky, E.M. Kogan, T.G. Putina, O.V. Marchenko, E.B. Lomakina, S.A. Chernysh // *Proc. SPIE 2136, Biochemical Diagnostic Instrumentation.* – 1994. doi.:10.1117/12.180785
188. Koshkaryev A., Non-oxidative band-3 clustering agents cause the externalization of phosphatidylserine on erythrocyte surfaces by a calcium-independent mechanism / A. Koshkaryev, L. Livshits, I. Pajic-Lijakovic, A. Gural, G. Barshtein, S. Yedgar // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomem-branes.* – c 2020. – Vol. 1862. – No 6. 183231 p. doi:10.1016/j.bbamem.2020.183231
189. Kosmachevskaya O. V. Alternate and Additional Functions of Erythrocyte Hemoglobin. O.V. Kosmachevskaya, A. F. Topunov. *Biochemistry.* 2018. – Vol. 83. – № 12-13. – P. 1575–1593. doi:10.1134/s0006297918120155.
190. Lam H.S. Risk of vitamin A toxicity from candy-like chewable vitamin supplements for children. / H.S. Lam, C.M. Chow, W.T. Poon, C.K. Lai, W.L. Yeung, J. Hui, A.Y. Chan, P.C. Ng // *Pediatrics.* – 2006. – Vol. 118. № 2, p. 820-824.
191. Lang F. Mechanisms and significance of eryptosis. / F. Lang, K. S. Lang, P. A. Lang, S. M. Huber, T. // *Weider Antioxid. Redox. Signal.* – 2006. – Vol. – 8. – № 7-8. – P. 1183–1192.
192. Lang F. Physiology and pathophysiology of eryptosis. / F. Lang, E. Lang, M. Föller // *Transfus Med Hemother* – 2012. – Vol. 39. – № 5. – P. 308-314. doi: 10.1159/000342534.
193. Larson M.C. Phosphatidylethanolamine is progressively exposed on RBCs during storage. / M.C. Larson, M.S. Karafin, C.A. Hillery, N. Hogg // *Trans Med.* – 2017. – Vol. 27. № 2. – P. 136–141 doi:10.1111/tme.12382
194. Lee S.M. Effect of Omega-3 Fatty Acid on the Fatty Acid Content of the Erythrocyte Membrane and Proteinuria in Patients with Diabetic Nephropathy. / S.M. Lee, S.H. Chung, Y. Park, M.K. Park, Y.K. Son, S.E. Kim, W.S. An. // *International Journal of Endocrinology.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 208121. doi: 10.1155/2015/208121.
195. Leonard C. Contribution of plasma membrane lipid domains to red blood cell (re)shaping. / C.

- Leonard, L. Conrad, M. Guthmann, H. Pollet, M. Carquin, C. Vermeylen, P. Gailly, P. Van Der Smissen, M.P. Minggeot-Leclercq, D. Tyteca // *Sci Rep* – 2017. – Vol. 7. №1. – 4264p. doi:10.1038/s41598-017-04388-z
196. Lew, V. L. Effects of age-dependent membrane transport changes on the homeostasis of senescent human red blood cells / V. L. Lew, N. Daw, Z. Etzion, T. Tiffert, A. Muoma, L. Vanagas, R.M. Bookchin // *Blood*. – 2007. – Vol. – 110. – № 4. – P. 1334–1342. doi.org/10.1182/blood-2006-11-057232
197. Lew V. L. On the Mechanism of Human Red Blood Cell Longevity: Roles of Calcium, the Sodium Pump, PIEZO1, and Gardos Channels. / V. L. Lew, T. Tiffert. // *Frontiers in Physiology*. – 2017. – Vol. 8. doi:10.3389/fphys.2017.00977
198. Li H, Lykotrafitis G Erythrocyte membrane model with explicit description of the lipid bilayer and spectrin network. // H. Li, G. Lykotrafitis // *Biophys J*. – 2014. – Vol. 107. – P. 642–653 doi:10.1016/j.bpj.2014.06.031
199. Li H, Inhibition of lipid oxidation in foods and feeds and hydroxyl radical-treated fish erythrocytes: A comparative study of Ginkgo biloba leaves extracts and synthetic antioxidants. / H. Li, X. Zhou, P. Gao, Q. Li, H. Li, R. Huang, M. Wu. // *Anim Nutr*. – 2016a. – Vol. 2. – № 3. – P. 234–241. doi: 10.1016/j.aninu.2016.04.007.
200. Li H. The cytotoxicity and protective effects of Astragalus membranaceus extracts and butylatedhydroxyanisole on hydroxyl radical-induced apoptosis in fish erythrocytes. / H. Li, X. Zhou, M. Wu, M. Deng, C. Wang, J. Hou, P. Mou // *Anim Nutr*. – 2016b. – Vol. 2. No. 4. – P. 376–382. doi: 10.1016/j.aninu.2016.08.004.
201. Lilley J.S. Oral retinoids and plasma lipids. / J.S. Lilley, M.F. Linton, S. Fazio // *Dermatol Ther*. – 2013. – Vol. 26. – № 5. – P. 404–10. doi: 10.1111/dth.12085.
202. Lim H. W. G. Stomatocyte-discocyte-echinocyte sequence of the human red blood cell: Evidence for the bilayer-couple hypothesis from membrane mechanics. / H. W. G. Lim, M. Wortis // *Mukhopadhyay Proceed Nat Ac Sci*. – 2002. – Vol. 99. – № 26. – P.16766 – 16769. doi:10.1073/pnas.202617299.
203. Lind P.M., Subclinical hypervitaminosis A in rat: Measurements of bone mineral density (BMD) do not reveal adverse skeletal changes. / P.M. Lind, S. Johansson, M. Rönn, H. Melhus // *Chemico-Biological Interactions*. – 2006. – Vol. 159. – № 1. – P. 73–80. doi:10.1016/j.cbi.2005.10.104.
204. Lind T. Studies of indirect and direct effects of hypervitaminosis A on rat bone by comparing free access to food and pair-feeding. / T. Lind, P. M. Lind, L. H. Hu, // *Melhus Upsala Journal of Medical Sciences*. – 2018. – Vol.123. – № 2. – P. 82–85. doi:10.1080/03009734.2018.1448020
205. Lipkin A. C. Hypervitaminosis A in pediatric hematopoietic stem cell patients requiring renal replacement therapy. / A. C. Lipkin, P. Lenssen // *Nutrition in Clinical Practice*. – 2008. – Vol. 23. –

№ 6. – P. 621–629

206. Lutsiuk N.B. Effect of vitamin A on lipid metabolism in the erythrocyte membrane / N.B. Lutsiuk, M.N. Cherviak // *Vopr Med Khim.* – 1985. – Vol. 31. No 6. – P. 89-91. PMID: 4090394
207. Lutz H. U. Naturally occurring anti-band 3 antibodies in clearance of senescent and oxidatively stressed human red blood cells. / H. U. Lutz // *Transfus. Med.Hemother.* – 2012. – Vol. 39. – P. 321–327. doi: 10.1159/000342171.
208. Lutz H.U., Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans. / Lutz H.U., A. Bogdanova // *Frontiers in physiology.* – 2013. – Vol. 4. – P. 1-15 doi: 10.3389/fphys.2013.00387
209. Maciaszek J.L. Sickle cell trait human erythrocytes are significantly stiffer than normal. / J.L. Maciaszek, G. Lykotrafitis // *J Biomech.* – 2011. – Vol. 44. – №. 4. – P. 657-61 doi: 10.1016/j.jbiomech.2010.11.008.
210. Magnusardottir A. R. Effects of storage time and added antioxidant on fatty acid composition of red blood cells at -20 degrees C. /A. R. Magnusardottir, G.V. Skuladottir // *Lipids.* – 2006. – Vol. 41. – № 4. – P. 401-404.
211. Mallia A. K. Metabolism of retinal-binding protein and vitamin A during hypervitaminosis A in the rat / A. K. Mallia, J. E. Smith, D. W. Goodman // *J. Lipid Research.* – 1975. – Vol. 16 – P. 180–188
212. Manno S. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation / S. Manno, Y. Takakuwa, N. Mohandas // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280. – № 9. – P. 7581–7587
213. Marchioli R. Omega-3 fatty acids and heart failure. / R. Marchioli, M.G. Silletta, G. Levantesi, R. Pioggiarella // *Curr Atheroscler Rep.* – 2009. – Vol.11. – № 6. – P. 440-447. doi:10.1007/s11883-009-0066-y
214. Marwarha G. The retinol esterifying enzyme LRAT supports cell signaling by retinol-binding protein and its receptor STRA6. / G. Marwarha, D.C. Berry, C.M. Croniger, N. Noy // *FASEB J.* – 2014. – Vol. 28. – №1. – P. 26-34. doi: 10.1096/fj.13-234310.
215. Martin J., Murphy Jr. Effects of Vitamin A on the Erythrocyte Membrane Surface. *Blood*, 1973, Vol. 41, No. 6, p. 893-899.
216. Matthaus B., Some rape/canola seed oils: fatty acid composition and tocopherols. / B. Matthaus, M.M. Özcan, F. Al Juhaimi // *Zeitschrift Für Naturforschung C.* – 2016. Vol. 71. No 3-4. – P. 73–77. doi:10.1515/znc-2016-0003
217. Metherel A. H. Butylated hydroxytoluene can protect polyunsaturated fatty acids in dried blood spots from degradation for up to 8 weeks at room temperature. / A.H. Metherel, R.C. Hogg, L.M. Buzikievich, K.D. Stark // *Lipids Health Dis.* – 2013. – Vol. 12. – 22p. doi. 10.1186/1476-511X-12-22

218. Millán C. G. Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers / C. G. Millán, M. L. Marinero, A. Z. Castañeda, J. M. Lanao // *J. Control. Release.* – 2004. – Vol. 95. – No 1. – P. 27–49
219. Mineo H. Chemical specificity in short-chain fatty acids and their analogues in increasing osmotic fragility in rat erythrocytes in vitro. / H. Mineo, H. Hara // *Biochim et Biophys Acta - Biomembranes.* – 2007. – Vol. 1768. – No 6. – P. 1448–1453. doi:10.1016/j.bbamem.2007.02.008
220. Mohandas N. Red cell membrane: past, present, and future. / N. Mohandas, P.G. Gallagher // *Blood.* – 2008. – Vol. 112. – No 10. – P. 3939–3948.
221. Mohanty J.G. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging / J.G. Mohanty, E. Nagababu, J.M. Rifkind // *Front Physiol.* – 2014. – Vol. 5. – 84p. Doi:10.3389/fphys.2014.00084
222. Moise A.R., Delivery of retinoid-based therapies to target tissues /A.R. Moise, N. Noy, K. Palczewski, W.S. Blander // *Biochemistry.* – 2007. – Vol. 46. № 15. – P. 4449-4458.
223. Monesterolo N. PMCA activity and membrane tubulin affect deformability of erythrocytes from normal and hypertensive human subjects / N. Monesterolo, A. Nigra, A. Campetelli, V. Santander, J. Rivelli, C. Arce, C. Casale // *Biochim Biophys Acta.* – 2015. – Vol. 1848. – P. 2813–2820 DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.08.011
224. Montel-Hagen A. Erythroid glucose transporters / A. Montel-Hagen, M. Sitbon, N. Taylor // *Curr. Opin. Hematol.* – 2009. – Vol. 16. – No 3. – P. 165–172.
225. Moor T. Hypervitaminosis A / T. Moor, Y.L. Wang // *Biochem J.* – 1945. – Vol. 39. – No 3. – P. 222-228.
226. Muñoz S. Transmembrane voltage induced on altered erythrocyte shapes exposed to RF fields / S. Muñoz, J.L. Sebastián, M. Sancho, J.M. Miranda // *Bioelectromagnetics.* – 2004. – Vol. 25. No 8. – P. 631-3. doi: 10.1002/bem.20065
227. Murphy M. J. Effect of vitamin A on the erythrocyte membrane surface / M. J. Murphy// *Blood.* – 1973. – Vol. 41. No 6. – P.893-9
228. Myhre A. M. Water-miscible, emulsified, and solid forms of retinal supplements are more toxic than oil-based preparations / A. M. Myhre, M. H. Carlsen, S. K. Bøhn, H. L. Wold, P. Laake, R. Blomhoff // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2003. – Vol. 78. – No 6. – P.1152–1159.
229. Nagababu E. Role of the membrane in the formation of heme degradation products in red blood cells / E. Nagababu, J. G. Mohanty, S. Bhamidipaty, G. R. Ostera, J. M. Rifkind // *Life Sci.* – 2010. – Vol. 86. – P.133–138. doi: 10.1016/j.lfs.2009.11.015
230. Nagababu E. Role of peroxiredoxin-2 in protecting RBCs from hydrogen peroxide-induced oxidative stress / E. Nagababu, J. G. Mohanty, J. S. Friedman, J. M. Rifkind // *Free Radic. Res.* – 2013. – Vol. 47. – P. 164–171. doi: 10.3109/10715762.2012.756138.

231. Nagashree R.S. Effect of a Diet Enriched with Fresh Coconut Saturated Fats on Plasma Lipids and Erythrocyte Fatty Acid Composition in Normal Adults / R. S. Nagashree, N. K. Manjunath, M. Indu, M. Ramesh, V. Venugopal, P. Sreedhar, N. Pavithra, H. R. Nagendra // *J Am Coll Nutr.* – 2017. – Vol. 36. – No 5. – P. 330-334. doi: 10.1080/07315724.2017.1280713.
232. Narla J. Red cell membrane disorders / J. Narla, N. Mohandas // *Int J Hematol.* – 2017. – Vol. 39. – P. 47–52.
233. Nigra A. Tubulin is retained throughout the human hematopoietic/erythroid cell differentiation process and plays a structural role in sedimentable fraction of mature erythrocytes / A. Nigra, V. Santander, R. Dircio-Maldonado, M.R. Amaiden, N. Monesterolo, P. Flores-Guzman, T. Muhlberger, J. Rivelli, A. Campetelli, H. Mayani, C. Casale // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2017. – Vol. 91. – P. 29–36. doi: 10.1016/j.biocel.2017.08.012
234. Nigra, A. D. Human erythrocytes: cytoskeleton and its origin / A. D. Nigra, C. H. Casale, V. S. Santander // *Cellular and Molecular Life Sciences.* – 2019. – Vol. 77. – No 9. – P. 1681-1694. doi:10.1007/s00018-019-03346-4
235. Niki E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects / E. Niki // *Free Radical Biology and Medicine.* – 2009. – Vol. 47. – No 5. – P. 469–484. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.032
236. Nikolić M. Efflux of cholesterol and phospholipids derived from the haemoglobin-lipid adduct in human red blood cells into plasma / M. Nikolić, D. Stanić, I. Baricević, D.R. Jones, O. Nedić, V. Niketić // *Clin Biochem.* – 2007. – Vol. 40. No 5-6. – P.305-309. Epub 2006 Dec 5. PMID: 17291471
237. Nollevaux M.C. Hypervitaminosis A – induced liver fibrosis: stellate cell activation and daily dose consumption / M.C. Nollevaux, Y. Guiot, Y. Horsmans, I. Leclerq, J. Rahier, A.P. Geubel, C. Sempoux // *Liver Int.* – 2006. – Vol. 26. № 2. – P. 182-186.
238. Novozhilov A.V. Dynamics of Hematologic Parameters and of the Erythrocyte Deformability Index at the Juvenal Period of Rats and Guinea Pigs / A.V. Novozhilov, L. N. Katyukhin, B. A. Feizullaev // *Zh Evol Biokhim Fiziol.* – 2012. – Vol. 48. – No. 1. – P. 29-37. doi: 10.1134/S0022093012010057
239. Nunomura W. Regulation of protein 4.1R interactions with membrane proteins by Ca²⁺ and calmodulin / W. Nunomura, Y. Takakuwa // *Front. Biosci.* – 2006. – Vol. 1. – No 11. – P. 1522–1539.
240. Ørnsrud R. Retinoic acid cross-talk with calcitriol activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*) / R. Ørnsrud, E. J. Lock, C. N. Glover, G. J. Filk // *Endocrinol.* – 2009. – Vol. 202. No 3. – P. 473–482.
241. Pagano M. The use of erythrocyte fragility to assess xenobiotic cytotoxicity / M. Pagano, C. Faggio // *Cell Biochemistry and Function.* – 2015. – Vol. 33. – No 6. – P. 351–355. doi:10.1002/cbf.3135

242. Pantaleo A. Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions / A. Pantaleo, G. Giribaldi, F. Mannu, P. Arese, F. Turrini // *Autoimmun. Rev.* – 2008 – Vol. 7. – P. 457–462 doi: 10.1016/j.autrev.2008.03.017.
243. Park Y. K. Measurement of red blood cell mechanics during morphological changes / Y. K. Park, C. A. Best, K. Badizadegan, R. R. Dasari, M.S. Feld, T. Kuriabova, M. L. Henle, A. J. Levine, G. R. Popescu // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – Vol. 107. – No 15. – P. 6731–6736. doi: 10.1073/pnas.0909533107
244. Park H. Measuring cell surface area and deformability of individual human red blood cells over blood storage using quantitative phase imaging / H. Park, S. Lee, M. Ji, K. Kim, Y. Son, S. Jang, Y. Park // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6:34257. doi: 10.1038/srep34257.
245. Parrow N.L. Measuring Deformability and Red Cell Heterogeneity in Blood by Ekta-cytometry / N.L. Parrow, P.C. Violet, H. Tu, J. Nichols, C.A. Pittman, C. Fitzhugh, R.E. Fleming, N. Mohandas, J.F. Tisdale, M. J. Levine // *Vis Exp.* – 2018 – Vol. 12. – No 131. – 56910 p. doi: 10.3791/56910.
246. Pasquali M.A. Vitamin A supplementation for different periods alters oxidative parameters in lungs of rats. / M.A. Pasquali, D.P. Gelain, M.R. de Oliveira, G.A. Behr, L.L. da Motta, R.F. da Rocha, F. Klamt, J.C. Moreira // *J Med Food.* – 2009. – Vol. 12. – 6. – P. 1375-80. doi: 10.1089/jmf.2008.0298.
247. Paulick M. G. The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins / M. G. Paulick, C. R. Bertozzi // *Biochemistry.* – 2008. – Vol. 47. – No 27. – P. 6991–7000.
248. Peng Z. Multiscale simulation of erythrocyte membranes / Z. Peng, R. J. Asaro, Q. // *Zho Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* – 2010. – Vol. 81. – No3. Pt1. – P. 031904
249. Peng Z. Deformation of the erythrocyte cytoskeleton in tank treading motions / Z. Peng, Q. Zhu // *Soft Matter.* – 2013. – Vol. 9. – No 31. – P.7617–7627 doi.org/10.1039/C3SM50895A
250. Penniston K.L. The acute and chronic toxic effects of vitamin A / K. L. Penniston, Sh. A Tanumihardjo // *Am J Clin Nutr.* – 2006. – Vol. 83. – No. 2. – P.191-201. doi:10.1093/ajcn/83.2.191
251. Perrotta S. Hematopoiesis. Infant hypervitaminosis A causes severe anemia and thrombocytopenia: evidence of a retinal-dependent bone marrow cell growth inhibition / S. Perrotta, B. Nobili, F. Rossi, M. Criscuolo, A. Iolascon, D. Di Pinto, I. Passaro, L. Cennamo, A. Oliva, F. D. Ragione // *Blood.* – 2002. – Vol. 99 – No 6. – P. 2017–2022.
252. Pivkin I. V. Biomechanics of red blood cells in human spleen and consequences for physiology and disease / I. V. Pivkin, Z. Peng, G. E. Karniadakis, P. A. Buffet, M. Dao, S. // *Suresh Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2016. – Vol. 113. – No 28. – P. 7804–7809. doi: 10.1073/pnas.1606751113
253. Polliack A. A light and electron microscopic study of the lymphomyeloid complex in hypervitaminosis A. / A. Polliack, R. Drexler // *Blood.* – 1972. – Vol. 40. – № 4. – P. 528–541

254. Poole J. Red cell antigens on band 3 and glycophorin A / J. Poole // *Blood rev.* – 2000. – Vol. 14. – No 1. – P. 31–43
255. Pöschl J.M. Effects of dietary supplementation of saturated fatty acids and of n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids on plasma and red blood cell membrane phospholipids and deformability in weanling guinea pigs / J.M. Pöschl, K. Paul, M. Leichsenring, S. R. Han, M. Pfisterer, H. J. Bremer, O. Linderkamp // *Lipids.* – 1999. – Vol. 34. – No 5. – P. 467-73. PMID:10380118
256. Pottala J. V. Structural Equation Modeling for Analyzing Erythrocyte Fatty Acids in Framingham / J.V. Pottala, G. D. Djira, M. A. Espeland, J. Ye, M. G. Larson, W.S. Harris // *Comput Math Methods Med.* – 2014. – Vol. 2014. – 160520 p. doi: 10.1155/2014/160520.
257. Puchulu-Campanella E. Identification of the components of a glycolytic enzyme metabolon on the human red blood cell membrane / E. Puchulu-Campanella, H. Chu, D. J. Anstee, J. A. Galan, W. A. Tao, P. S. Low // *J Biol Chem.* – 2013. – Vol. 288. – No 2. – P. 848-58. doi: 10.1074/jbc.M112.428573.
258. Prashanth A. Vitamin A-enriched diet modulates reverse cholesterol transport in hypercholesterolemic obese rats of the WNIN/Ob strain / A. Prashanth, S.M. Jeyakumar, N.V. Giridharan, A. Vajreswari // *J Atheroscler Thromb.* – 2014. – Vol. 21. – No 11. – P. 1197-207. doi: 10.5551/jat.22186
259. Prasinou P. The Erythrocyte Membrane Lipidome of Healthy Dogs: Creating a Benchmark of Fatty Acid Distribution and Interval Values / P. Prasinou, P.E. Crisi, C. Chatgililoglu, M. Di Tommaso, A. Sansone, A. Gramenzi, B. Belà, F. De Santis, A. Boari, C. Ferreri // *Front. Vet. Sci.* – 2020. – Vol. 7. – 502 p. doi: 10.3389/fvets.2020.00502
260. Pretorius E. Erythrocyte deformability and eryptosis during inflammation, and impaired blood rheology / Pretorius E // *Clinical Hemorheology and Microcirculation.* – 2018. – Vol. 69. – No 4. – P. 545–550. doi:10.3233/ch-189205.
261. Radosinska J. Effect of yeast biomass with high content of carotenoids on erythrocyte deformability, NO production and Na,K-ATPase activity in healthy and LPS treated rats / J. Radosinska, L. Mezesova, L. Okruhlicova, K. Frimmel, E. Breierova, M. Bartekova, N. Vrbjar // *Clin Hemorheol and Microcircul.* – 2016. – Vol. 64. – No 2. – P. 125–134. doi:10.3233/ch-162051
262. Reithmeier R. A. F. Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context / R. A. F. Reithmeier, J. R. Casey, A. C. Kalli, M. S. P. Sansom, Y. Alguel, S. Iwata // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* – 2016. – Vol. 1858. – No 7. – P. 1507–1532. doi:10.1016/j.bbamem.2016.03.030
263. Remigante A. Natural Antioxidants Beneficial Effects on Anion Exchange through Band 3 Protein in Human Erythrocytes / A. Remigante, R. Morabito, A. Marino // *Antioxidants.* – 2019. – Vol. 9 – No 1. – 25 p. doi:10.3390/antiox9010025

264. Renoux C. Impact of surface-area-to-volume ratio, internal viscosity and membrane viscoelasticity on red blood cell de-formability measured in isotonic condition / C. Renoux, M. Faivre, A. Bessaa, L. Da Costa, P. Joly, A. Gauthier, P. Connes // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9. No 1. – P. 6771. doi: 10.1038/s41598-019-43200-y.
265. Repsold L. Eryptosis: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death / L. Repsold, A. M. Joubert // *Biomed Res Int.* – 2018. – Vol. 2018 9405617p. doi: 10.1155/2018/9405617.
266. Restrepo-Gallego M. Influence of Dietary Vitamin A and Iron Deficiency on Hemato-logic Parameters and Body Weight of Young Male Wistar Rats. / M. Restrepo-Gallego, L.E. Díaz // *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2020. – Vol. 59. – No 1. – P. 17-23. doi: 10.30802/AALAS-JAALAS-19-000020.
267. Rivera-Santiago R. Full-length anion exchanger 1 structure and interactions with ankyrin-1 determined by zero length crosslinking of erythrocyte membranes / R. Rivera-Santiago, S. L. Harper, S. Sriswasdi, P. Hembach, D. W. Speicher // *Structure.* – 2017. – Vol. 25. – P. 132–145. Doi:10.1016/j.str.2016.11.017
268. Rizvi S.I. Markers of oxidative stress in erythrocytes during aging in humans / S.I. Rizvi, P.K. Maurya // *Ann N Y Acad Sci.* – 2007. – Vol. 1100. – P. 373-82. doi: 10.1196/annals.1395.041
269. Rochowiak A. The structure and role of CR1 complement receptor in physiology / A. Rochowiak, Z. I. Niemir // *Pol. Merkur. Lekarski.* – 2010. – Vol. 28. – No 163. – P. 79–83
270. Rodahl K. Hypervitaminosis A in the rat / K.Rodahl // *J Nutr.* – 1950. – Vol. 41. – No 4. – P. 399-421.
271. Rossi L. Erythrocyte-based drug delivery / L. Rossi, S. Serafini, F. Pierigé, A. Antonelli, A. Cerasi, A. Fraternali, L. Chiarantini, M. Magnani // *Expert. Opin. Drug Deliv.* – 2005. – Vol. 2. – No 2. – P. 311–322
272. Rothenberg A. B. Hypervitaminosis A-induced premature closure of epiphyses (physeal obliteration) in humans and calves (hyena disease): a historical review of human and veterinary literature / A. B. Rothenberg, W. E. Berdon, J. C. Woodard, R. A. Cowles // *Pediatr. Radiol.* – 2007. – Vol. 37. – No 12. – P. 1264–1267
273. Sakagami T., Behavior of plasma lipoproteins during exchange of phospho-lipids between plasma and erythrocytes / T. Sakagami, O. Minari, T. Orii // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1965. – Vol. 98. № 1. – P. 111-116 doi:10.1016/0005-2760(65)90015-9
274. Salimath, B. P. Dietary components inhibit lipid peroxidation in erythrocyte membrane /B.P. Salimath, C.S. Sundaresh, L.Srinivas // *Nutrition Research.* – 1986. – Vol. 6. No 10. – P. 1171–1178. doi:10.1016/s0271-5317(86)80087-2
275. Samuel E. Lux IV Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions / E. Lux IV. Samuel // *Blood.* – 2016. – Vol. 127. – No 2. – P.187-199 doi:10.1182/blood-2014-12-512772

originally published

276. Sánchez-Gallego J.I. Comparative antioxidant capacities of quercetin and butylated hydroxyanisole in cholesterol-modified erythrocytes damaged by tert-butylhydroperoxide. / J. I. Sánchez-Gallego, A. López-Revuelta, A. Hernández-Hernández, J.L. Sardina, G. López-Ruano, J. Sánchez-Yagüe, M. Llanillo // *Food Chem Toxicol.* – 2011. – Vol. 49. – No 9. – P. 2212-21. doi: 10.1016/j.fct.2011.06.014
277. Satchwell T. J. Protein 4.2: a complex linker / T. J. Satchwell, D. K. Shoemark, R. B. Sessions, A. M. Toye // *Blood cells Mol. Dis.* – 2009. – Vol. 42. – No 3. – P. 201–210
278. Schnurr K. 3,5-Di-*t*-butyl-4-hydroxytoluene (BHT) and probucol stimulate selectively the reaction of mammalian 15-lipoxygenase with biomembranes / K. Schnurr, H. Kühn, S.M. Rapoport, T. Schewe // *Biochim Biophys Acta.* – 1995. – Vol. 1254 No1. – P. 66-72.
279. Senoo H. Vitamin A-storing cells (stellate cells) / H. Senoo, N. Kojima, M. Sato // *Vitam. Horm.* – c 2007. – Vol. 75. – P. 131–159
280. Senoo H. Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative – past, present and future / H. Senoo, K. Yoshikawa, M. Morii, M. Miura, K. Imai, Y. Mezaki // *Cell Biology International.* – 2010. – Vol. 34. – No 12. – P. 1247–1272. doi:10.1042/cbi20100321.
281. Sentürk M. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of antioxidant phenols / M. Sentürk, I. Gülçin, A. Daştan, O.I. Küfrelioğlu, C.T. Supuran // *Bioorg Med Chem.* – 2009. – Vol. 17. – No 8. – P. 3207-11. doi: 10.1016/j.bmc.2009.01.067.
282. Sheetz M.P. Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions / Sheetz M.P., Singer S.J // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1974. – Vol. 71. – No 11. – P. 4457-61. doi: 10.1073/pnas.71.11.4457.
283. Shin S. Erythrocyte deformability and its variation in diabetes mellitus. / S. Shin, Y. Ku, N. Babu, M. Singh // *Indian Journal of Experimental Biology.* – 2007. – Vol. 45. – No 1. – P. 121–128.
284. Simopoulos A.P. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity / A.P. Simopoulos // *Nutrients.* – 2016. – Vol. 8. – No 3. – 128 p. doi: 10.3390/nu8030128.
285. Sinha A. Single-cell evaluation of red blood cell bio-mechanical and nano-structural alterations upon chemically induced oxidative stress / A. Sinha, T.T. Trang, T.T.T. Chu, M. Dao, R. Chandramohanadas, // *Scientific Reports.* - 2015. – Vol. 5. – No 1. doi:10.1038/srep09768
286. Staels B. Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by retinoids / B. Staels // *J Am Acad Dermatol.* – 2001. – Vol. 45. – No 5. – P. S158-67. doi: 10.1067/mjd.2001.113718
287. Stasiuk M. Transformations of erythrocytes shape and its regulation / M. Stasiuk, G. Kijanka, A. Kozubek // *Postepy Biochem.* – 2009. – Vol. 55. No 4. – P. 425-433.
288. Stefanovic M. Oxygen regulates the band 3–ankyrin bridge in the human erythrocyte membrane / M. Stefanovic, E. Puchulu_Campanella, G. Kodippili, P.S. Low // *Biochem J.* – 2013. – Vol. 449. –

No 1. – P. 143-50. doi: 10.1042/BJ20120869.

289. Stoeckel K, Response of plasma fatty acid profiles to changes in dietary n-3 fatty acids and its correlation with erythrocyte fatty acid profiles in dogs / K. Stoeckel, L. Bachmann, G. Dobeleit, H. Fuhrmann // *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. – 2012. – Vol. 97. No 6. – P.1142–1151. DOI:10.1111/jpn.12023

290. Sutherland W.H. Transfer of excess cholesterol from human red blood cells to plasma in vitro / W.H. Sutherland E.R. Nye // *Biochem Int*. – 1984 – Vol. 9. – No 4. – P. 531-8. PMID: 6517956

291. Svetina S. Red blood cell shape and deformability in the context of the functional evolution of its membrane structure / S. Svetina // *Cell Mol Biol Lett*. – 2012. – Vol. 17. – No 2. – P. 171-181. doi:10.2478/s11658-012-0001-z

292. Tachev K. On the mechanism of stomatocyte–echinocyte transformations of red blood cells: experiment and theoretical model / K. Tachev, K. Danov, P. Kralchevsky // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* – 2004. Vol. 34. No 2. – P. 123–140. doi:10.1016/j.colsurfb.2003.12.011

293. Tan L. Vitamin A kinetics in neonatal rats vs. adult rats: comparisons from model-based compartmental analysis / L. Tan, M.H. Green, A.C. Ross // *J Nutr*. – 2015. – Vol. 145. – No 3. – P. 403-10. doi: 10.3945/jn.114.204065.

294. Terasawa K. Human erythrocytes possess a cytoplasmic endoskeleton containing beta-actin and neurofilament protein / K. Terasawa, T. Taguchi, R. Momota, I. Naito, T. Murakami, A. Ohtsuka // *Arch Histol Cytol*. – 2006. Vol. 69. – P. 329–340 doi: 10.1679/aohc.69.329

295. Thiagarajan P. How Do Red Blood Cells Die? / P. Thiagarajan, C.J. Parker, J.T. Prchal // *Front. Physiol*. 2021. – Vol. 12. – 655393 p. doi: 10.3389/fphys.2021.655393

296. Tokumasu F. Altered membrane structure and surface potential in homozygous hemoglobin C erythrocytes / F. Tokumasu, G.A. Nardone, G.R. Oстера, R.M. Fairhurst, S.D. Beaudry, E. Hayakawa, J.A. Dvorak // *PloS One*. – 2009. – Vol. 4. – No 6. – P. e5828

297. Trybus M. MPP1-based mechanism of resting state raft organization in the plasma membrane. Is it a general or specialized mechanism in erythroid cells? / M. Trybus, L. Niemiec, A. Biernatowska, A. Hryniewicz-Jankowska, A.F. Sikorski // *Folia Histochem Cytobiol*. – 2019. – Vol. 57. – No 2. – 43-55. doi: 10.5603/FHC.a2019.0007.

298. Tsuchida T. Mechanisms of hepatic stellate cell activation / T. Tsuchida, S.L. Friedman // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. – 2017. – Vol. 14. – No 7. – P. 397-411. doi: 10.1038/nrgastro.2017.38.

299. Urano S. Vitamin E: Inhibition of Retinol-induced Hemolysis and Membrane-stabilizing Behavior / S. Urano, Y. Inomori, T. Sugawara, Y. Kato, M. Kitahara, Y. Hasegawa, M. Matsuo, K. Mukai // *J Biol Chem*. – c 1992. – Vol. 267. No. 26. – P. 18365-18370

300. Vajreswari A. Effect of altered dietary n-6-to-n-3 fatty acid ratio on erythrocyte lipid composition and membrane-bound enzymes / A. Vajreswari, M. Rupalatha, P.S. Rao // *J Nutr Sci*

Vitaminol. – 2002. – Vol. 48. – No 5. – P. 365-370.

301. Van den Akker E. Band 3 multiprotein complexes in the red cell membrane of mice and men / E. Van den Akker, T.J. Satchwell, R.C. Williamson, A.M. Toye // *Blood Cell Mol. Dis.* – 2010. – Vol. 45. – No 1. – P. 1–8

302. Van Doormaal J.J. Effects of short-term high dose intake of evening primrose oil on plasma and cellular fatty acid compositions, α -tocopherol levels, and erythropoiesis in normal and Type 1 (insulin-dependent) diabetic men / J.J.Van Doormaal, I.G. Ideda, F.A.J. Muskiet, I.A. Martini, H. Doorenbos // *Diabetologia.* 1988. – Vol. 31. No 8. – P. 576–584. doi:10.1007/bf00264763

303. Van Kim C. L. Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane / C.L. Van Kim, Y. Colin, J.P. Cartron // *Blood Rev.* – 2006. – Vol. 20. – No 2. – P. 93–110

304. Wang S. AMPK α 1 deletion shortens erythrocyte life span in mice: role of oxidative stress / S. Wang, G.L. Dale, P. Song, B. Viollet, M. H. Zou // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – P. 19976–19985. doi: 10.1074/jbc.M110.102467

305. Weijers R.N.M. Membrane flexibility, free fatty acids, and the onset of vascular and neuro-logical lesions in type 2 diabetes / R.N.M. Weijers // *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders.* – 2015. – Vol. 15. – P. 1-13. DOI:10.1186/s40200-016-0235-9

306. Wesseling M. C. Phosphatidylserine exposure in human red blood cells depending on cell age / M.C. Wesseling, L. Wagner-Britz, H. Huppert, B. Hanf, L. Hertz, D.B. Nguyen // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2016. – Vol. 38. – P. 1376–1390. doi: 10.1159/000443081

307. Westerman M. Red blood cell-derived microparticles: An overview / M. Westerman, J.B. Porter // *Blood Cells, Molecules and Diseases.* – 2016. – 59. – P. 134–139. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmed.2016.04.003>

308. Williamson R. C. Toye A. M. Glycophorin A: Band 3 aid / R.C. Williamson, A.M. Toye // *Blood Cells Mol. Dis.* – 2008. – Vol. 41. – No 1, P. 35–43

309. Yazdani A. Tank-treading and tumbling frequencies of capsules and red blood cells / A. Yazdani, R. Kalluri, P. Bagchi // *Phys Rev E.* – 2011. – Vol. 83 – P.046305 doi.org/10.1103/PhysRevE.83.046305

310. Yeagle, P. L. Non-covalent binding of membrane lipids to membrane proteins / P.L. Yeagle // *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes.* – 2014. – Vol. 1838. – No 6. – P. 1548–1559. doi:10.1016/j.bbamem.2013.11.009

311. Yehye W.A. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): a review / W.A. Yehye, N.A. Rahman, A. Ariffin, S.B. Abd Hamid, A.A. Alhadi, F.A. Kadir, M. Yaeghoobi // *Eur J Med Chem.* – 2015. – Vol. 101. – P. 295-312. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.06.026.

312. Yokoyama H. Three-dimensional structure of membrane protein stomatin and function of

- stomatin-specific protease / H. Yokoyama // *Yakugaku Zasshi*. – 2010. – Vol. 130. – No 10. – P. 1289-93.
313. Yorgan T.A. Immediate effects of retinoic acid on gene expression in primary murine osteoblasts / T.A. Yorgan, T. Heckt, C. Rendenbach, C. Helms, S. Seitz, T. Streichert, M. Amling, T. Schinke // *J Bone Miner Metab.* – 2016. – Vol 34. – No 2. – P. 161-170
314. Yusipovich A. I. Evaluation of Erythrocyte Shape and Status by Laser Interference Microscopy / A.I. Yusipovich, N. Bryzgalova, R. Yu., E. Parshina R. Yu., A.G. Lomakin, O.V. Rodnenkov, G.G. Levin, G.V. Maksimov, A.B. Rubin // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2008. – Vol. 145. – No. 3. – P. 382–385
315. Zara M. Biology and role of extracellular vesicles (EVs) in the pathogenesis of thrombosis / M. Zara, G.F. Guidetti, M. Camera, I. Canobbio, P. Amadio, M. Torti, E. Tremoli, S.S. Barbieri // *Int J Mol Sci.* – 2019 – Vol. 20. – Vol. 11. – P. 2840–2872
316. Zarate R. Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. R. Zarate, Nabil el Jaber-Vazdekis, N. Tejera, J.A. Perez, C. Rodriguez // *Clin Trans Med.* – 2017. – Vol. 6. – 25p. doi 10.1186/s40169-017-0153-6
317. Zhu Q. Prospects of human erythrocyte skeleton-bilayer dissociation during splenic flow. / Q. Zhu, S. Salehyar, P. Cabrales, R. Asaro // *Biophys J.* 2017. – Vol. 113. – № 4. – P. 900–912 doi:10.1016/j.bpj.2017.05.052