

На правах рукописи

САЙФИЕВ РУСЛАН РИНАТОВИЧ

**ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕФОРМИРУЕМОСТИ  
ЭРИТРОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
УСОВЕРШЕНСТВОВАННОГО ЭКТАЦИТОМЕТРА**

03.00.13. – Физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Тюмень - 2002

Диссертация выполнена на кафедре анатомии и физиологии человека и животных Тюменского государственного университета

**НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ:**

доктор биологических наук, профессор

Шалабодов Александр Дмитриевич

кандидат биологических наук, доцент

Белкин Алексей Васильевич

**ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:**

доктор биологических наук, профессор

Кузнецов Александр Павлович

доктор медицинских наук, профессор

Сашенков Сергей Львович

**ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:**

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2003 г. в \_\_\_ часов

на заседании диссертационного совета ДМ 212.274.07 в Тюменском государственном университете по адресу: 625043, г. Тюмень, ул. Пирогова, 3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Тюменского государственного университета

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2002 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор биологических наук, профессор,

Е.А.Чирятьев

**Актуальность проблемы.** Эритроциты являются преобладающим типом клеток крови. Способность эритроцитов к упругой деформации позволяет этим клеткам доставлять необходимые для жизнедеятельности организма вещества по сосудистой системе включающей капилляры, диаметр которых достигает 2 мкм. Деформируемость эритроцитов при прохождении по кровяному руслу обусловлена упругими свойствами самой мембраны этих клеток и наличием особой белковой структуры, выстилающей внутреннюю сторону мембраны и называемой цитоскелетом /Ивенс, Скейлак, 1982; Mohandas, 1992/.

Деформируемость эритроцитов претерпевает существенные изменения при воздействии различных физико-химических факторов /Koutsouris, Delatour-Hanss, Hanss, 1985; Fiocco, Quattrocchi, Neirotti, et al., 1984; Sung, Chien, 1992/ и при ряде заболеваний /Никулин с соавт., 1998; Ганелина с соавт., 2000; Фатенков, Зарубина, Миляков, 2002/.

Важным моментом при проведении исследований деформируемости эритроцитов является объективная оценка этого показателя. Для исследования деформируемости эритроцитов используются такие экспериментальные методы как центрифугирование /Corry, Mieselman, 1978/, фильтрация /Jones e.a., 1984/, реоскопия /Mohandas e.a., 1981/. Однако они либо недостаточно информативны, либо трудоемки по выполнению. Метод, который позволяет провести оперативную и информативную оценку деформируемости эритроцитов основан на компьютерной эктацитометрии и реализован в приборе получившем название эктацитометр /Bessis, et.al., 1981; Mohandas, et.al., 1981/.

Существующие эктацитометры являются крупногабаритными и не транспортабельными. В связи с этим разработка и создание усовершенствованного эктацитометра с компьютерной обработкой полученной информации, внедрение эктацитометрии в практику научно-исследовательских и клинических лабораторий является актуальной проблемой как для практической, так и теоретической медицины. Примером использования эктацитометрической установки в клинической практике является исследование деформируемости эритроцитов у больных артериальной гипертонией, при которой отме-

чается ухудшение реологических показателей крови /Китаева с соавт., 1991; Александрова с соавт., 1991; Кравцов, Дулин, Постнов, 1991; Вершинина с соавт., 1998; Муравьев с соавт., 2000/.

### **Цель и задачи исследования:**

разработать и апробировать усовершенствованный эктацитометр для количественной оценки деформируемости эритроцитов млекопитающих в норме и при различных патологических состояниях.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Разработать и создать усовершенствованный эктацитометр.
2. Изучить влияние физико-химических факторов на деформируемость эритроцитов крыс в опытах *in vitro* с использованием усовершенствованного эктацитометра.
3. Изучить влияние стресс-нагрузок на деформируемость эритроцитов крыс в опытах *in vivo* с использованием усовершенствованного эктацитометра.
4. Провести эктацитометрические исследования деформируемости эритроцитов у больных артериальной гипертонией.

### **Научная новизна.**

Усовершенствованный нами эктацитометр имеет ряд преимуществ по сравнению с существующими аналогами. Благодаря небольшим размерам и массе установка легко транспортируется и может применяться в различных лабораториях по исследованию реологических свойств крови. Использование специальных аппаратных средств позволяет обеспечивать взаимодействие эктацитометра с ЭВМ и передавать четкое изображение дифракционных картин для анализа деформируемости эритроцитов с помощью компьютера. Специальное программное обеспечение позволяет проводить точный экспресс-анализ деформируемости эритроцитов, рассчитывать основные статистические показатели, наглядно отображать с помощью графиков динамику деформируемости эритроцитов в зависимости от приложенного к ним усилия сдвига. Благодаря примененным нами новыми техническими решениями

обеспечивается автоматизация научно-исследовательской работы и значительно ускоряется и упрощается работа с эктацитометром.

С использованием усовершенствованного эктацитометра исследовалась деформируемость эритроцитов крыс под влиянием различных физико-химических факторов в опытах *in vitro*, а также проводилось исследование деформируемости эритроцитов экспериментальных животных под влиянием стресс-нагрузок в опытах *in vivo*.

Было проведено исследование деформируемости эритроцитов у больных артериальной гипертонией с нормальным и повышенным уровнем холестерина в крови, а также исследовалась деформируемость эритроцитов больных артериальной гипертонией с повышенным содержанием холестерина после 4-х месячного амбулаторного курса лечения гипотензивным препаратом моноприл (фозиноприл).

Впервые показано, что гипотензивный препарат моноприл снижает деформируемость эритроцитов у больных артериальной гипертонией после 4-х месячного амбулаторного курса лечения.

Полученные результаты исследований в опытах *in vitro*, *in vivo* и в клинических испытаниях свидетельствуют о высокой чувствительности установки и возможности ее использования в научно-исследовательской и клинической практике.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Усовершенствованный эктацитометр позволяет проводить объективный экспресс-анализ деформируемости эритроцитов млекопитающих с использованием компьютерных технологий, что обеспечивает высокую степень автоматизации исследований.

2. Воздействие физико-химических факторов на эритроциты крыс в опытах *in vitro* изменяет деформируемость клеток.

3. Влияние стресс-нагрузок на эритроциты крыс в опытах *in vivo* вызывает увеличение деформируемости этих клеток.

4. У больных артериальной гипертонией деформируемость эритроцитов снижена.

**Апробация работы.** Основные положения диссертации доложены на конференциях: «Физика и биология в медицине» (Екатеринбург, 2001), «Актуальные проблемы эволюционной и популяционной физиологии человека» (Тюмень, 2001), «Актуальные проблемы адаптации человека» (Сургут, 2001), «XII Международное совещание и V школа по эволюционной физиологии» (С.-Петербург, 2001), «Международная конференция по гемореологии» (Ярославль, 2001), «XVIII Съезд физиологического общества им. И.П. Павлова» (Казань, 2001), «Биомеханика – 2002» (Н. Новгород, 2002).

**Публикации:** По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ.

**Структура и объем работы:** Диссертация изложена на 109 страницах машинописи и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследований, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 3 таблицами и 23 рисунками. Библиографический указатель включает 207 работ отечественных и зарубежных авторов.

### **Материал и методы исследований**

Эксперименты проводились на половозрелых беспородных крысах самцах массой 180-200 г (74 особи).

Все животные содержались в стандартных условиях вивария на полноценной диете и были одного возраста. Опыты проводились в зимне-весенний период.

Исследование по влиянию стресс-нагрузок на деформируемость эритроцитов экспериментальных животных проводили по методике “свободное плавание в клетке” /Бондаренко с соавт., 1999/. В эксперименте по кратковременному перегреванию животных использовался термостат SPT - 200 (Poland), позволяющий создавать и сохранять заданный тепловой режим. Для оценки стрессорного состояния организма животных использовали анализ лейкоформулы, который проводили по общепринятым методам и формулам /Стенко, 1975/.

После экспериментального воздействия животных помещали в специально сконструированный «домик» из органического стекла и забирали кровь

из хвостовой вены в гепаринизированные капилляры (фирма Radiometr, Copenhagen, Дания).

Исследование деформируемости эритроцитов больных артериальной гипертонией проводилось на базе Тюменского кардиологического центра – филиала НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН. Было обследовано 67 человек в возрасте от 35 до 65 лет с нормальным и повышенным уровнем холестерина в крови. Контролем служили 20 человек в возрасте от 30 до 55 лет, которые не страдали артериальной гипертонией.

Кровь у больных и здоровых людей забиралась с помощью венопункции из вены правого плеча в одноразовый шприц объемом 2 мл и стабилизировалась 0.3% раствором цитрата натрия.

Проба крови экспериментальных животных и людей в объеме 100 мкл помещалась в 3 мл 20% раствора полисахарида Ficoll-400 растворенного в фосфатном буфере (0.3 М NaCl, 0.02 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.005 М KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7.4, при температуре 37°C). Размешивание эритроцитов в растворе Ficoll-400 проводили в фарфоровой чашке до появления однородно окрашенного раствора без включений и клеточных агрегатов. Деформируемость эритроцитов определяли на разработанном нами эктацитометре.

Для исследования деформируемости эритроцитов инкубированных в средах с различной концентрацией NaCl осмоляльность растворов контролировали при помощи осмометра 1Ц-01. В экспериментах по влиянию температуры среды инкубирования на деформируемость эритроцитов контроль температуры проводили с помощью термостата марки UTU-2 (Poland), при этом, учитывая влияние температурного фактора на изменение кислотности среды инкубирования эритроцитов, в среды добавляли либо 10% раствор HCl либо 10% раствор KOH. В опытах с инкубированием эритроцитов в средах с различным pH контроль над кислотностью сред проводили с использованием pH метра марки Анион – 7010.

Статистическая обработка данных проводилась на персональном компьютере оснащенном процессором марки Celeron 1700 с помощью программы Ecto-1, в программный код которой были записаны основные формулы

для расчета статистических показателей. О достоверности различий судили по  $t$ -критерию Стьюдента

## **Результаты исследований и их обсуждение.**

### **1. Создание экспериментальной модели эктацитометра.**

Для исследования деформируемости эритроцитов в настоящее время используются различные методы, среди которых наибольшее применение получили следующие: центрифугирование /Corry, Mieselman, 1978/, фильтрация /Jones e.a., 1984/, реоскопия /Mohandas e.a., 1981/. Однако, вследствие низкой информативности получаемых этими методами данных и трудоемкости выполнения экспериментальных исследований, мы остановили свой выбор на методе лазерной дифрактометрии или эктацитометрии /Bessis, e.a., 1981/, который позволяет провести оперативную и информативную оценку деформируемости эритроцитов в короткие сроки с использованием незначительных проб крови и компьютерного анализа полученных данных.

Существующие эктацитометры являются крупными и нетранспортабельными установками, в которых основные технические элементы крепятся на горизонтальной основе, что приводит к увеличению размера и массы экспериментального прибора. Для создания усовершенствованного эктацитометра было решено использовать не горизонтальную ориентацию технических элементов, а вертикальную, что позволило значительно уменьшить размер установки. Масса усовершенствованной нами установки составляет 6.5 кг, высота 50 см, длина 30 см и ширина 20 см, при этом все основные рабочие узлы прибора были размещены внутри светонепроницаемого и жесткого чехла, который может легко сниматься при смене опытных образцов.

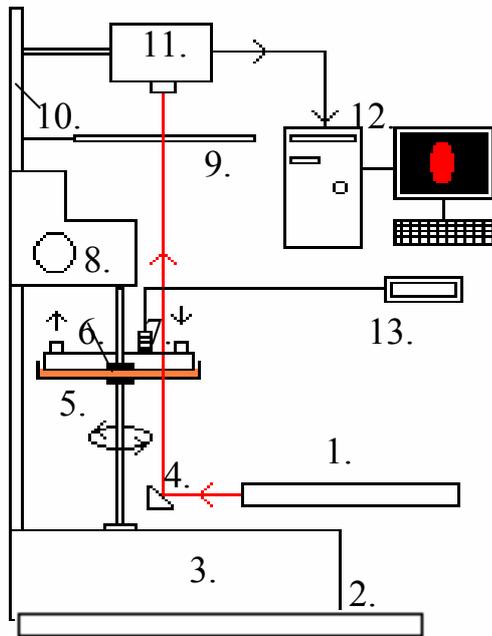
Блок-схема усовершенствованного эктацитометра изображена на рис.1.

В качестве основания разработанной нами установки служит небольшая металлическая опора с вертикальным стержнем, на котором крепятся все технические элементы эктацитометра. Для проведения исследования деформируемости эритроцитов используются две пластины, выполненные из прозрачного для видимого света материала (оргстекло). Усилие сдвига, вы-

зывающее деформацию эритроцитов, создается за счет вращения нижней пластины относительно верхней - неподвижной. Термостабилизация пластин обеспечивается наличием специальной «рубашки», размещенной на верхней пластине. Для контроля температурного режима к верхней пластине крепится термодатчик, цифровое табло которого размещается снаружи установки. Привод нижней пластины обеспечивает серводвигатель, оснащенный переключателем, позволяющим дискретно менять скорость вращения, которая варьирует в пределах от 0 до 28 об/мин. Ширина зазора между пластинами регулируется и в нижней отметке составляет 0.5 мм. Минимально допустимая величина зазора, при которой проводились экспериментальные исследования, достигается при помощи специального «блокатора», который механически препятствует полному опусканию верхней пластины на нижнюю, что препятствует перетиранию исследуемого материала - эритроцитов. В качестве когерентного источника света использовался лазер ГИ-3-1 ( $P = 1,9 \cdot 10^{-3}$  Вт,  $\lambda = 632,8$  нм). Изображение дифракционной картины проецировалось на полупроницаемый экран и регистрировалось при помощи цифровой видеокамеры Canon (рис. 2).

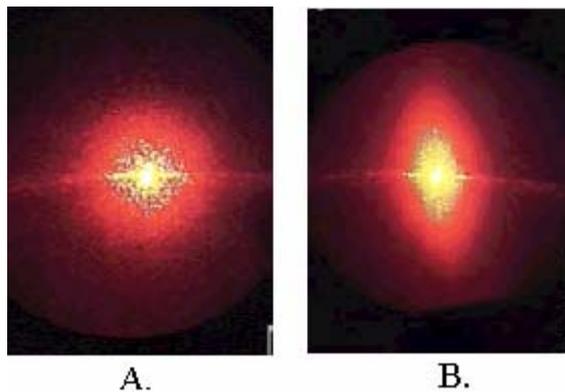
Воспроизведенная при помощи видеокамеры динамика деформируемости эритроцитов при разных усилиях сдвига на персональном компьютере записывалась в видеофайл формата avi посредством программы Movie Maker. Для вычисления индекса деформируемости эритроцитов при разных усилиях сдвига и построения соответствующих графиков использовалась программа, написанная по специальному заказу в среде программирования Delphi 5 и получившая название Ecto – 1.

Эта программа позволяла считывать изображение непосредственно с экрана (по аналогии с принципом сканирования) и рассчитывать геометрию изображения.



**Рис. 1. Блок-схема портативного эктацитометра.**

**1 - лазер; 2 - металлическая опора; 3 - модуль серводвигателя; 4 - поворотное зеркало; 5 - нижняя вращающаяся пластина с пробой крови; 6 - верхняя термостатируемая пластина с «рубашкой» для циркуляции воды; 7 - термодатчик; 8 - механизм регулирования ширины зазора между пластинами; 9 - экран; 10 - вертикальный крепежный стержень; 11 - цифровая видеокамера; 12 - персональный компьютер; 13 - цифровое табло термодатчика.**



**Рис.2. Реальное изображение дифракционной картины, получаемое при прохождении луча лазера через слой эритроцитов и выводимое на монитор для программного анализа. А-дифракционная картина для покоящихся эритроцитов; В-дифракционная картина для эритроцитов находящихся в сдвиговом потоке.**

С учетом того, что радиус вращающегося сектора в районе прохождения луча лазера составлял - 38 мм формула для расчета скорости -

$$\gamma = \frac{R \cdot \Omega}{l} = \left(\frac{R}{l}\right) \cdot \left(2\pi \frac{N}{60}\right)$$

где  $\Omega$  - частота вращения,

$R$  – радиус вращающейся пластины,

$l$  – зазор между пластинами,

$N$  – скорость вращения ( $N/60$  – число оборотов в минуту),

приобретала вид:

$$\gamma = \frac{38 \cdot \Omega}{0.5} = 477.28 \cdot \left(\frac{N}{60}\right)$$

При фиксированных значениях радиусов верхней и нижней пластин скорость сдвига зависела только от скорости вращения нижней пластины, а при постоянном значении динамической вязкости  $\eta$ , усилие сдвига  $\tau$  также определялось только скоростью вращения:

$$\tau = \gamma \cdot \eta$$

Поэтому информация о технических константах нашей установки была записана в память программы Ecto-1, а различные усилия сдвига достигались изменением скорости вращения нижней пластины за счет переключателя, расположенного на серводвигателе.

Для количественной оценки выявляемого средноклеточного удлинения при сдвиге использовался эктацитометрический показатель или индекс деформируемости  $\mathbf{Id} = (\mathbf{A}-\mathbf{B})/(\mathbf{A}+\mathbf{B})$ , где  $A$  и  $B$  – большая и малая полуоси дифракционного эллипса.

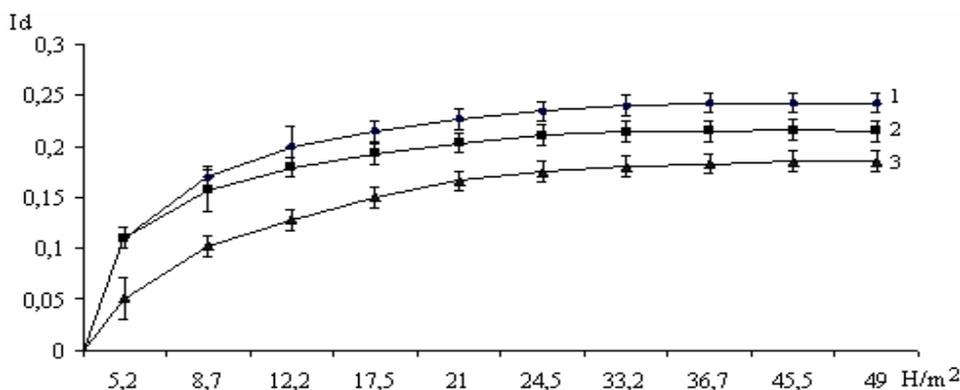
Формулы по вычислению индекса деформируемости и основных статистических показателей также были записаны в память программы Ecto-1.

Для оценки разрешающей способности усовершенствованного эктацитометра необходимо было провести серии экспериментов, которые бы позволили определить степень достоверности получаемых результатов и соответствия их результатам исследований, полученных на зарубежных аналогах и представленных в литературе.

## 2. Экспериментальные исследования деформируемости эритроцитов крыс в опытах *in vitro*.

Исследовалось воздействие на деформируемость эритроцитов крыс таких физико-химических факторов как температура, рН среды инкубирования эритроцитов, осмоляльность инкубационной среды. Кроме того, изучалось влияние различных концентраций глютарового диальдегида на деформируемость эритроцитов крыс.

На первом этапе исследовалась зависимость деформируемости эритроцитов крыс в опытах *in vitro* от температуры среды инкубирования этих клеток. Термостабилизация пластин и суспензии эритроцитов поддерживалась за счет регулируемого нагревания воды в термостате. Результаты исследований представлены на рис. 3.



**Рис. 3. График зависимости индекса деформируемости эритроцитов крыс от температуры среды инкубирования: 1. T- 37°C; 2. T- 30°C; 3. T- 20°C (n=14).**

Видно, что деформируемость эритроцитов крыс изменялась от приложенного усилия сдвига в интервале от 5.2 – 24.5 Н/м<sup>2</sup>. На интервале усилий сдвига 33.2 – 49 Н/м<sup>2</sup> индекс деформируемости эритроцитов не возрастал, что по-видимому обусловлено достижением максимальной величины этого показателя.

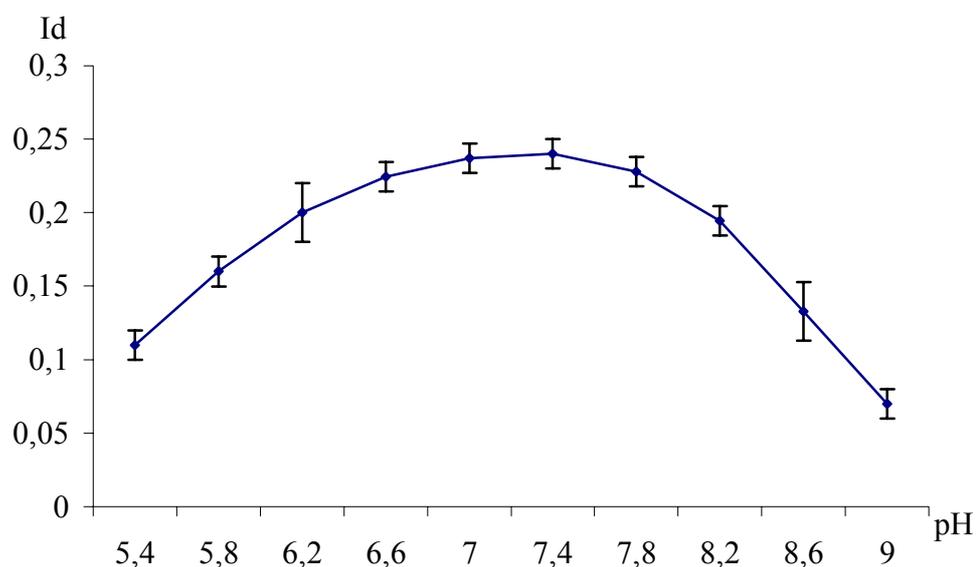
Отмечены достоверные различия в деформируемости эритроцитов на больших усилиях сдвига после инкубирования этих клеток в средах с температурами 37°C и 20°C. Значение индекса деформируемости эритроцитов на

усилии сдвига  $49 \text{ Н/м}^2$  и при температуре среды инкубирования  $37^\circ\text{C}$  достигали  $0.24 \pm 0.012$ , тогда как при температуре  $20^\circ\text{C}$  и на том же усилии сдвига этот показатель составлял  $0.15 \pm 0.015$  ( $P < 0.05$ ).

Таким образом, показано, что снижение температуры среды инкубирования клеток до  $20^\circ\text{C}$  сопровождалось снижением деформируемости эритроцитов. Полученные нами результаты исследований хорошо согласуются с данными других авторов, проводивших исследования деформируемости эритроцитов при разных температурах с использованием метода фильтрации /Fiocco, Quattrocchi, Neirotti, et al., 1984; Sung, Chien, 1992/.

Известно, что деформируемость эритроцитов зависит от кислотности среды инкубирования клеток и достигает максимальных значений при  $\text{pH} = 7.4$ , в то время как при сдвиге этого показателя в кислую или щелочную сторону было отмечено снижение способности эритроцитов к упругой деформации /Crandal, Critz, Osher, 1972; Koutsouris, Delatour-Hanss, Hanss, 1985/.

Эксперимент проводился при постоянном усилии сдвига  $\tau = 49 \text{ Н/м}^2$  и температуре  $37^\circ\text{C}$ . Результаты исследований представлены на рис. 4.



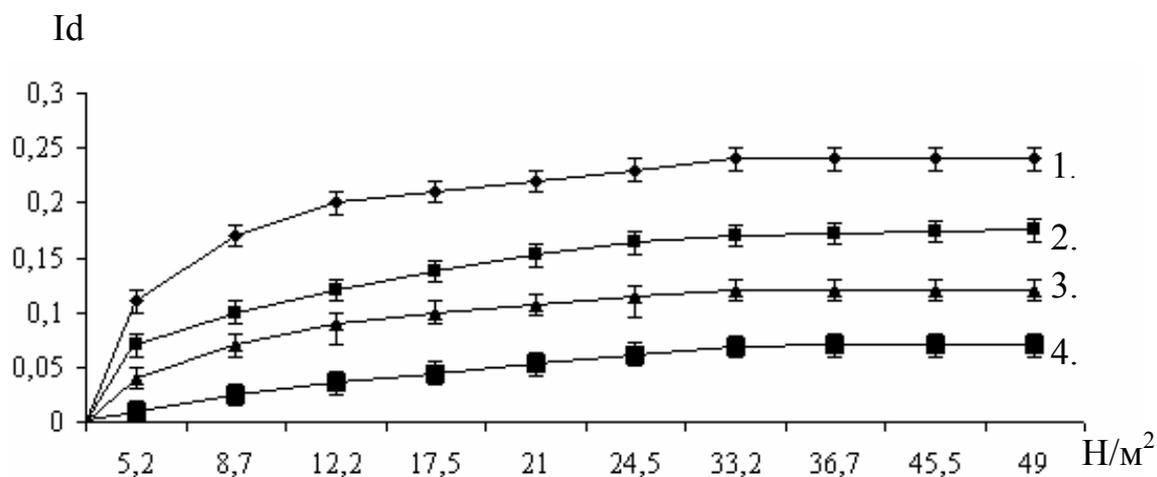
**Рис.4. График зависимости индекса деформируемости эритроцитов крыс от pH среды инкубирования (n=7).**

Видно, что индекс деформируемости эритроцитов в интервале рН от 7.0 до 7.4 достигал максимального значения ( $0.24 \pm 0.012$ ), в то время как при отклонении рН инкубационной среды в кислую и щелочную сторону наблюдалось достоверное снижение этого показателя. Так, например, при рН=8.2 среды инкубирования эритроцитов крыс индекс деформируемости клеток составлял  $0.20 \pm 0.012$ , а при рН =5.8 –  $0.16 \pm 0.013$ . Результаты исследований хорошо согласуются с данными, полученными в работах других авторов, изучавших деформируемость эритроцитов методами фильтрации /Crandal, Critz, Osher, 1972; Kucera, et.al., 1984/ и эктацитометрии /Koutsouris, Delatour-Hanss, Hanss, 1985/.

В следующей серии экспериментов проводилось исследование деформируемости эритроцитов, инкубированных в средах с различной концентрацией глютарового диальдегида. Взаимодействие глютарового диальдегида с мембраной эритроцита приводит к возникновению поперечных сшивок между мембранными белками, в результате чего снижаются вязкоэластические свойства мембран этих клеток /Heusinkveld e.a., 1977; Белкин, 1996/. Исследование деформируемости эритроцитов крыс проводили после 5 минут инкубации клеток в средах содержащих 21% раствор Ficoll-400 в буферном растворе (0.30 M NaCl, 0.020 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.005 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, рН = 7.4, при 37°C) с добавлением глютарового диальдегида в конечных концентрациях равных 0.01%, 0.02%, 0.03%. Результаты исследований представлены на рис.5.

Видно, что после инкубирования эритроцитов в средах с различными концентрациями глютарового диальдегида наблюдалось достоверное снижение деформируемости клеток относительно контроля. Так, после инкубирования эритроцитов в среде содержащей глютаровый диальдегид в концентрации 0.01% индекс деформируемости этих клеток на максимальном усилии сдвига ( $49 \text{ Н/м}^2$ ) составлял  $0.18 \pm 0.014$ , тогда как в отсутствие глютарового диальдегида в среде инкубирования -  $0.24 \pm 0.014$  ( $P < 0.05$ ). При увеличении концентрации глютарового диальдегида в среде инкубирования до 0.02% и 0.03% - индекс деформируемости составил  $0.12 \pm 0.012$  и  $0.06 \pm 0.012$  соответственно, т.е. наблюдалось снижение деформируемости эритроцитов при уве-

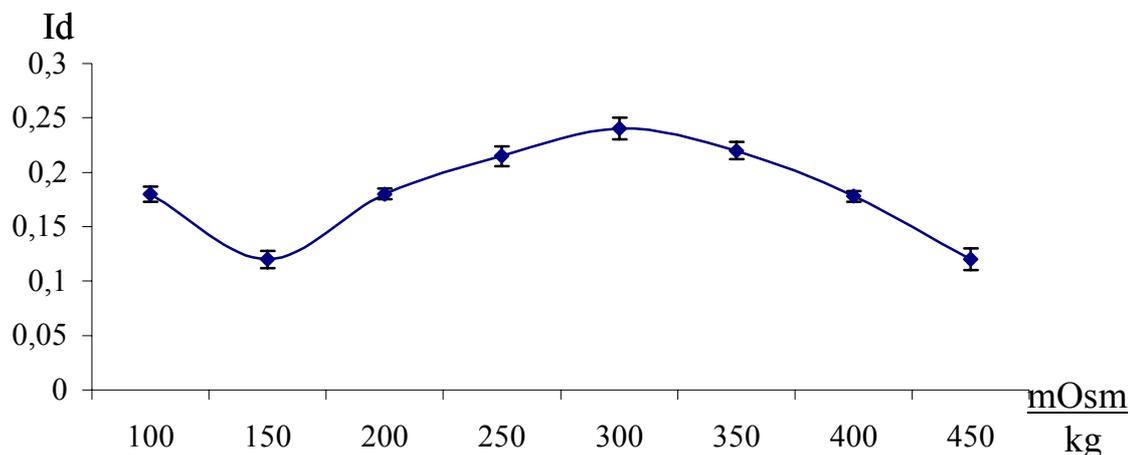
личении концентрации глутарового диальдегида в среде инкубирования клеток.



**Рис. 5.** График зависимости индекса деформируемости эритроцитов крыс от концентрации глутарового диальдегида в среде инкубирования: 1 - в отсутствие глутарового диальдегида (контроль); 2 - 0.01% концентрация глутарового диальдегида; 3 – 0.02% концентрация глутарового диальдегида; 4 – 0.03% концентрация глутарового диальдегида (n=14).

Известно, что способность эритроцитов к упругой деформации зависит от осмоляльности среды инкубирования /Schmid-Schonbein, 1982/. Деформируемость эритроцитов достигает максимальных значений в изоосмоляльных средах, тогда как увеличение или уменьшение осмоляльности среды инкубирования приводит к снижению деформируемости этих клеток. На следующем этапе нашего исследования изучалась деформируемость эритроцитов после инкубирования клеток в растворах с различной осмоляльностью.

Результаты проведенных исследований представлены на рис. 6.



**Рис. 6. График зависимости индекса деформируемости эритроцитов крыс от осмоляльности среды инкубирования клеток (n=7).**

Видно, что максимальное значение индекса деформируемости эритроцитов крыс ( $0.24 \pm 0.013$ ) зарегистрировано после инкубации этих клеток в изоосмоляльной среде (300 mOsm/kg). При увеличении осмоляльности инкубационной среды от 300 до 450 mOsm/kg наблюдалось постепенное снижение индекса деформируемости эритроцитов. Так, после инкубации эритроцитов в гиперосмоляльном растворе (450 mOsm/kg) индекс деформируемости эритроцитов достоверно снизился до  $0.12 \pm 0.021$  и это снижение по сравнению со значением индекса деформируемости эритроцитов, инкубированных в изоосмоляльной среде составило 50% ( $P < 0.05$ ). После инкубирования эритроцитов в гипоосмоляльной среде (200 mOsm/kg) индекс деформируемости эритроцитов составил  $0.18 \pm 0.013$ , т.е. был на 20% ниже значения индекса деформируемости эритроцитов, инкубированных в изоосмоляльной среде ( $P < 0.05$ ).

Таким образом, результаты исследований показывают, что различные физико-химические факторы по-разному влияют на деформируемость эритроцитов, а использование сконструированного нами эктацитометра позволяет выявлять эти различия.

### 3. Исследование деформируемости эритроцитов крыс в опытах *in vivo*.

Известно, что деформируемость эритроцитов изменяется под влиянием стресс-нагрузок на организм /Fiocco, Quattrocchi, Neirotti, et al., 1984; Sung, Chien, 1992; Викулов, Мельников, Осетров 1999; Муравьев с соавт., 2000/.

В наших исследованиях в качестве факторов, влияющих на деформируемость эритроцитов, использовались такие стресс-нагрузки как принудительное плавание и кратковременное перегревание. Известно, что стресс-нагрузки изменяют иммуногематологическую реакцию, которая развивается достаточно быстро и может быть зарегистрирована по изменению количественного состава лейкоцитов и лимфоцитов в периферической крови /Гольдберг, 1992/. Поэтому в качестве гематологического критерия стрессорного состояния организма экспериментальных животных использовался анализ лейкоформулы /Стенко, 1975/, результаты которого отображены в таблицах 1 и 2.

Таблица № 1  
Лейкоформула крыс, подвергнутых принудительному плаванию ( $M \pm m$ )

Показатель	Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	Палочкояд. нейтр, %	Сегмент. нейтр., %	Эозинофи- лы, %	Моноци- ты, %	Лимфоци- ты, %
Контроль (n=8)	$4.40 \pm 0.11$	$0.75 \pm 0.25$	$16.75 \pm 2.03$	$1.38 \pm 0.42$	$1.82 \pm 0.23$	$79.30 \pm 2.23$
Принудитель- ное плавание (n=8)	$6.03 \pm 0.19$ ***	$1.55 \pm 0.21$ *	$25.73 \pm 1.74$ **	$0.18 \pm 0.12$ *	$2.00 \pm 0.38$	$70.73 \pm 1.99$ **

Примечание: достоверность различий по сравнению с контролем: \* -  $P < 0.05$ ; \*\* -  $P < 0.01$ ; \*\*\* -  $P < 0.001$

Таблица № 2  
Лейкоформула крыс, подвергнутых перегреванию ( $M \pm m$ )

Показатель	Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	Палочкояд. нейтр, %	Сегмент. нейтр., %	Эозинофи- лы, %	Моноци- ты, %	Лимфоци- ты, %
Контроль (n=8)	$4.20 \pm 0.12$	$0.71 \pm 0.22$	$16.61 \pm 2.1$	$1.42 \pm 0.41$	$1.9 \pm 0.25$	$80.31 \pm 2.25$
Перегревание (n=8)	$6.10 \pm 0.21$ ***	$1.68 \pm 0.20$ *	$26.84 \pm 1.65$ **	$2.57 \pm 0.38$ *	$1.34 \pm 0.32$	$68.29 \pm 1.82$ ***

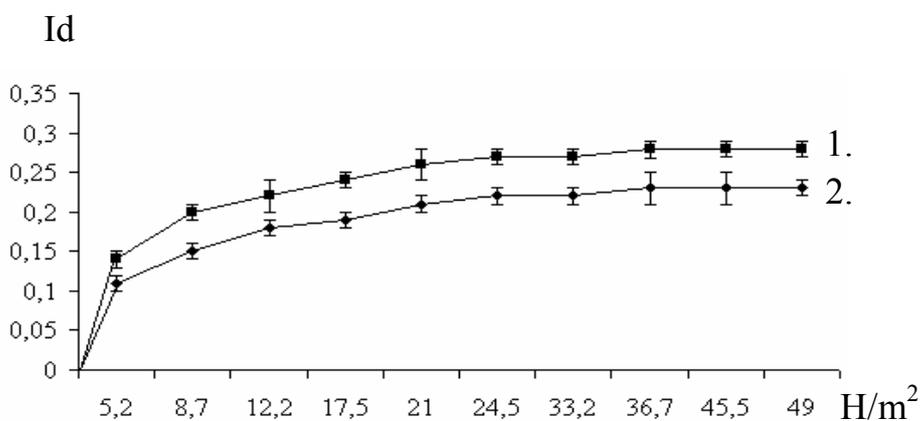
Примечание: достоверность различий по сравнению с контролем: \* -  $P < 0.05$ ; \*\* -  $P < 0.01$ ; \*\*\* -  $P < 0.001$

Как видно из таблиц 1 и 2 после принудительного плавания и перегревания в крови опытных животных было зарегистрировано достоверное уве-

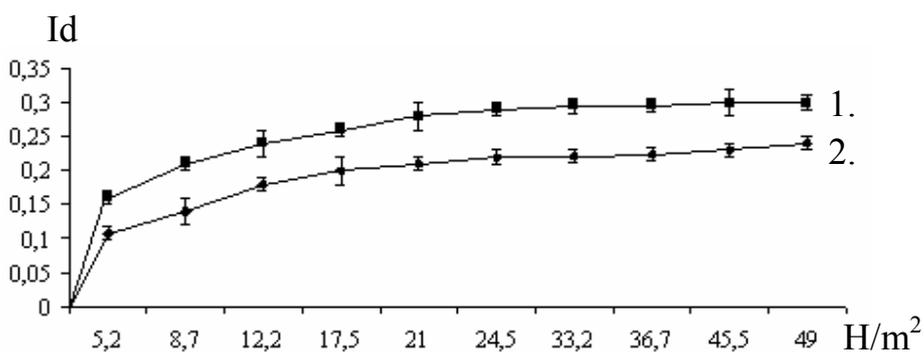
личение количества лейкоцитов, палочкоядерных нейтрофилов, сегментоядерных нейтрофилов и эозинофилов, и достоверное снижение количества лимфоцитов.

Анализ полученных экспериментальных данных свидетельствует о стресс-реакции животных, возникшей на стадии напряжения стресса под воздействием стресс-нагрузок, что несомненно должно было отразиться на изменении деформируемости эритроцитов.

Результаты исследования по деформируемости эритроцитов крыс под влиянием стресс-нагрузок представлены на рис. 7 и 8.



**Рис.7. График зависимости индекса деформируемости эритроцитов крыс от усилия сдвига после принудительного плавания животных. 1 – принудительное плавание животных; 2 - контроль (n=16).**



**Рис.8. График зависимости индекса деформируемости эритроцитов крыс от усилия сдвига после перегревания животных. 1 – перегревание животных; 2- контроль (n=16).**

Как показали результаты исследования, после принудительного плавания крыс деформируемость эритроцитов достоверно увеличивалась при ма-

лых, средних и больших усилиях сдвига по сравнению с контролем. Так при усилии сдвига  $5.2 \text{ Н/м}^2$  индекс деформируемости клеток контрольных крыс составил  $0.11 \pm 0.013$ , а после принудительного плавания - увеличился на 27% и составил  $0.14 \pm 0.012$  ( $P < 0.05$ ). На максимальном значении усилия сдвига ( $49 \text{ Н/м}^2$ ) индекс деформируемости эритроцитов крыс в контроле составил  $0.23 \pm 0.012$ , а в опыте -  $0.26 \pm 0.014$ , т.е. увеличился на 13% ( $P < 0.05$ ).

У крыс, подвергнутых кратковременному перегреванию, индекс деформируемости эритроцитов достоверно увеличивался при малых и больших значениях усилия сдвига по сравнению с показателями контрольной группы крыс. Так, например, при усилии сдвига  $5.2 \text{ Н/м}^2$  индекс деформируемости эритроцитов опытных крыс увеличивался на 45 % и составлял  $0.16 \pm 0.012$ , в отличие от показателей контрольной группы крыс -  $0.11 \pm 0.013$  ( $P < 0.05$ ), а при максимальном усилии сдвига ( $49 \text{ Н/м}^2$ ) индекс деформируемости эритроцитов опытных крыс увеличивался на 20% и составлял  $0.29 \pm 0.012$  в отличие от показателей контрольной группы крыс -  $0.24 \pm 0.014$  ( $P < 0.05$ ).

Результаты проведенных исследований деформируемости эритроцитов крыс демонстрируют хорошую разрешающую способность нашего эктацитометра и согласуются с результатами исследований по влиянию стресс-нагрузок на деформируемость эритроцитов полученных другими авторами /Fiocco, Quattrocchi, Neirotti, et al., 1984; Sung, Chien, 1992; Викулов, Мельников, Осетров 1999; Муравьев с соавт., 2000/.

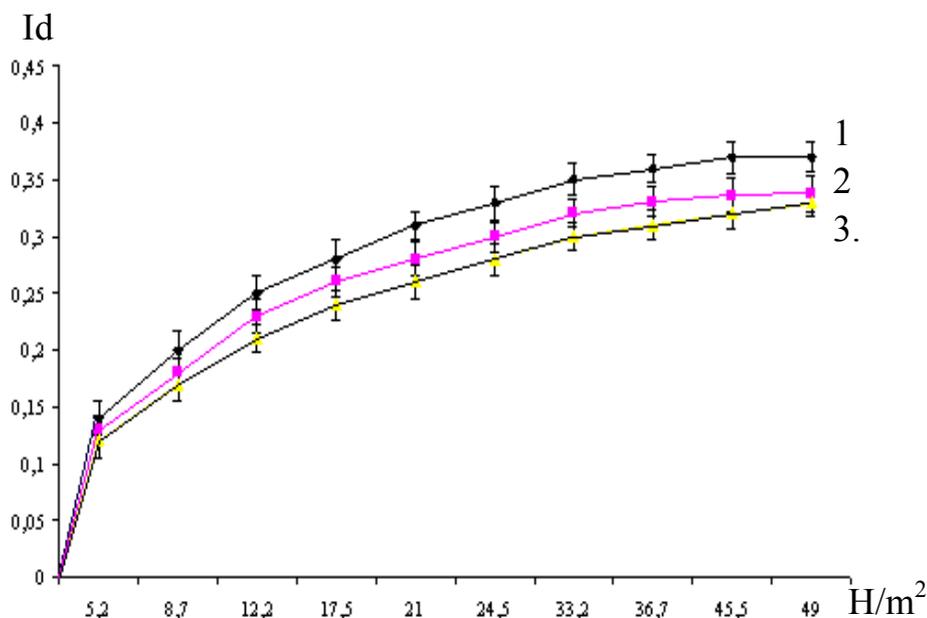
В связи с этим, было целесообразно апробировать наш эктацитометр в клинической практике для исследования деформируемости эритроцитов больных артериальной гипертонией, а также для оценки влияния лекарственной терапии на исследуемый показатель крови.

#### **4. Исследование деформируемости эритроцитов у больных артериальной гипертонией.**

Было проведено клиническое испытание эктацитометрической установки при исследовании деформируемости эритроцитов у больных артериальной гипертонией с нормальным и повышенным содержанием холестерина

в крови. Кроме того, исследовалась деформируемость эритроцитов больных артериальной гипертонией после 4-х месячного амбулаторного курса лечения гипотензивным препаратом моноприл (фозиноприл).

Результаты исследований деформируемости эритроцитов больных артериальной гипертонией с различным уровнем холестерина в крови представлены на рис. 9.



**Рис. 9. График зависимости индекса деформируемости эритроцитов здоровых людей и больных артериальной гипертонией с различным содержанием холестерина в крови: 1 – здоровые люди (n=20); 2 – больные артериальной гипертонией и с нормальным содержанием холестерина в крови (n=35); 3 – больные с артериальной гипертонией и с повышенным содержанием холестерина в крови (n=32).**

Отмечено достоверное снижение деформируемости эритроцитов у больных артериальной гипертонией с повышенным и нормальным уровнем холестерина в крови по сравнению со здоровыми людьми. Так, у больных артериальной гипертонией с повышенным содержанием холестерина в крови индекс деформируемости эритроцитов на максимальном усилии сдвига (49 Н/м²) составил  $0.33 \pm 0.014$ , а у здоровых людей -  $0.37 \pm 0.013$  (снижение на 11%,  $P < 0.05$ ). У больных артериальной гипертонией с нормальным содержанием холестерина в крови на усилии сдвига 49 Н/м² индекс деформируемо-

сти эритроцитов составил  $0.33 \pm 0.012$  по сравнению со здоровыми людьми -  $0.37 \pm 0.013$  (снижение на 11%,  $P < 0.05$ ). Достоверных различий в деформируемости эритроцитов при всех усилиях сдвига между больными артериальной гипертонией с повышенным и нормальным уровнем холестерина в крови обнаружено не было.

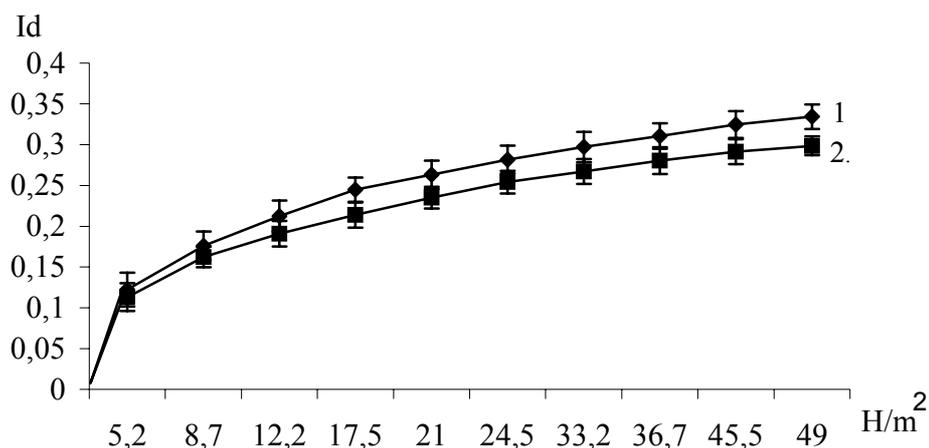
Результаты проведенных исследований хорошо согласуются с данными других авторов, которые также отмечали снижение деформируемости эритроцитов у больных артериальной гипертонией /Китаева с соавт., 1991; Александрова с соавт., 1991; Кравцов, Дулин, Постнов, 1991; Муравьев с соавт., 2000/.

На следующем этапе исследования изучалось влияние 4-х месячного амбулаторного курса лечения гипотензивным препаратом моноприл на деформируемость эритроцитов больных артериальной гипертонией с повышенным содержанием холестерина в крови. При этом регистрировалось артериальное давление и содержание холестерина в крови. Было отмечено достоверное снижение систолического и диастолического артериального давлений у больных гипертонией на протяжении курса лечения препаратом моноприл. Так, например, средний показатель систолического артериального давления у больных до лечения моноприлом составлял  $158 \pm 1.2$  мм. рт. ст., а после лечения наблюдалось достоверное снижение этого показателя до  $135 \pm 1.1$  мм. рт. ст. ( $P < 0.05$ ). Уровень диастолического артериального давления до лечения составлял  $100 \pm 0.3$  мм. рт. ст., а после лечения -  $85 \pm 0.4$  ( $P < 0.05$ ). Уровень холестерина в крови больных артериальной гипертонией не изменялся на протяжении курса лечения ( $6.13 \pm 0.51$  ммоль/л, и  $5.85 \pm 0.52$  ммоль/л до и после лечения соответственно).

Результаты исследования деформируемости эритроцитов больных артериальной гипертонией с повышенным содержанием холестерина в крови до и после 4-х месячного курса лечения препаратом моноприл представлены на рис.10.

Видно, что после 4-х месячного амбулаторного лечения препаратом моноприл у больных артериальной гипертонией наблюдалось достоверное сни-

жение деформируемости эритроцитов на усилии сдвига  $49 \text{ Н/м}^2$ . Так, индекс деформируемости эритроцитов у больных артериальной гипертонией до лечения препаратом моноприл составлял  $0.33 \pm 0.011$ , а после 4-х месячного курса лечения снизился на 12% и составил  $0.29 \pm 0.012$  ( $P < 0.05$ ). На средних и малых усилиях сдвига достоверные различия в деформируемости эритроцитов отсутствовали



**Рис.10.** График зависимости индекса деформируемости эритроцитов у больных артериальной гипертонией с повышенным содержанием холестерина в крови: 1 – до лечения; 2 – после 4 –х месячного курса лечения моноприлом ( $n = 32$ ).

### Выводы

1. Создан усовершенствованный эктацитометр с хорошей разрешающей способностью, позволяющий проводить эффективный экспресс-анализ деформируемости эритроцитов с использованием персонального компьютера и специального программного обеспечения в опытах *in vivo*, *in vitro* и в клинических исследованиях.
2. В опытах *in vitro* отмечалось снижение деформируемости эритроцитов после инкубирования клеток в средах с разными значениями pH, температуры, осмоляльности и в средах инкубирования с различными концентрациями глютарового диальдегида. Максимальная деформируемость эритроцитов отмечалась после инкубирования клеток в средах с температурой  $37^\circ\text{C}$ , pH 7-

7.4, осмоляльностью = 300 mOsm/kg и в среде инкубирования, не содержащей глютаровый диальдегид.

3. Принудительное плавание и кратковременное перегревание крыс приводило к снижению количества лимфоцитов и увеличению числа эозинофилов, нейтрофилов и лейкоцитов в периферической крови. Деформируемость эритроцитов опытных животных после стресс-нагрузок увеличивалась.

4. Деформируемость эритроцитов больных артериальной гипертонией с повышенным и нормальным уровнем холестерина в плазме крови достоверно ниже деформируемости эритроцитов здоровых людей. Деформируемость эритроцитов больных артериальной гипертонией с повышенным содержанием холестерина в крови не отличалась от деформируемости эритроцитов больных артериальной гипертонией с нормальным уровнем холестерина в крови.

5. У больных артериальной гипертонией с повышенным содержанием холестерина в крови после 4-х месячного амбулаторного курса лечения препаратом моноприл отмечалось снижение артериального давления и деформируемости эритроцитов на максимальном усилии сдвига ( $49 \text{ Н/м}^2$ ). При этом содержание холестерина в крови не изменялось.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Эктацитометрия. Новые технические решения. Новые перспективы / Белкин А.В., Марьинских В.В., Сайфиев Р.Р., Шалабодов А.Д. // Сборник тезисов научных работ: «Физика в биологии и медицине»- Екатеринбург, 2001. – С. 10-11.

2. Оценка деформируемости эритроцитов различной степени зрелости /Белкин А.В., Марьинских В.В., Сайфиев Р.Р., Шалабодов А.Д. // Тезисы докладов: «XVIII Съезд физиологического общества им. И.П. Павлова» - Казань, 2001. С. – 309.

3. Исследование адаптационных механизмов системы кроветворения в ответ на острую кровопотерю / Белкин А.В., Доценко А.А., Сайфиев Р.Р., Шалабодов А.Д. // Межвузовский сборник научных трудов: «Актуальные проблемы адаптации человека» - Сургут, 2001. С. – 35-36.
4. Влияние физиологических стрессов на реологические показатели эритроцитов крыс /Белкин А.В., Марьинских В.В., Сайфиев Р.Р., Шалабодов А.Д. // В сборнике научных работ: «Актуальные проблемы эволюционной и популяционной физиологии человека» - Тюмень, 2001. С. – 39 - 40.
5. Новые конструктивные решения в эктацитометрии / Белкин А.В., Марьинских В.В., Сайфиев Р.Р., Шалабодов А.Д. // Тезисы докладов: «XII Международное совещание и V школа по эволюционной физиологии» - С.-Петербург, 2001. - С. 20.
6. Исследование деформационных свойств эритроцитов с использованием усовершенствованного эктацитометра / Белкин А.В., Марьинских В.В., Сайфиев Р.Р., Шалабодов А.Д. // Тезисы докладов: «VI Всероссийская конференция по биомеханике – Биомеханика – 2002» - Н. Новгород, 2002. - С. 33.
7. Исследование эффективности ингибитора АПФ моноприла в терапии осложненной артериальной гипертензии /Попова С.Н., Вершинина А.М., Вебер Э.Е., Гапон Л.И., Сайфиев Р.Р. // Сборник тезисов научных докладов: «Актуальные проблемы кардиологии» - Тюмень, 2002.- С.-141-142.