

На правах рукописи

МАРЬИНСКИХ ВАСИЛИЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЯЗКОЭЛАСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ  
МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ БЕСПОРОДНЫХ БЕЛЫХ КРЫС С  
РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ В  
ОТВЕТ НА СТРЕССЫ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ И ОЦЕНКА  
ДЕФОРМИРУЕМОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ЛЮДЕЙ С  
ГИПЕРТОНИЕЙ**

03.00.13. – Физиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Тюмень - 2007

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

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ:

кандидат биологических наук, доцент  
Белкин Алексей Васильевич

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор биологических наук, профессор  
Кузнецов Александр Павлович

доктор медицинских наук, профессор  
Сторожок Сергей Анатольевич

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: Южно-Уральский государственный  
университет

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2007 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 «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2007 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор биологических наук, профессор,

Е.А.Чирятьев

### **Актуальность проблемы.**

В последние годы оценка реологических свойств крови и ее компонентов приобретают все большее значение для научно-исследовательской и клинической практики. В норме эритроциты обладают высокой деформируемостью, что определяется вязкоэластическими свойствами мембраны, высоким отношением площади поверхности к объему клетки и низкой вязкостью внутриклеточного содержимого. Это позволяет эритроцитам, имеющим диаметр около 8 мкм., свободно проходить через капилляры диаметром до 3 мкм., обеспечивая транспорт кислорода всем клеткам живого организма.

По мнению ряда авторов /Weed, 1980; Mohandas, 1992/ деформируемость эритроцитов является одним из главных свойств, определяющих продолжительность их жизни *in vivo*, и зависит как от внешних сил (главным образом сдвигового напряжения и скорости сдвига), так и от внутренних факторов: вязкоэластических свойств мембраны, вязкости внутриклеточного гемоглобина и геометрии клетки (отношению площади поверхности к объему).

Существует ряд методов, позволяющих определять деформируемость эритроцитов, но они крайне сложны и требуют дорогостоящего оборудования (ротационные вискозиметры), или проводятся в условиях далеких от *in vitro* (микropипеточные методы и способ центрифугирования) /Corry, Mieselman, 1978; Jones et al., 1984/. Эти методы недостаточно точны и трудоемки по выполнению. На наш взгляд, самый адекватный на сегодняшний день 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/. Способ измерения деформируемости эритроцитов с помощью эктацитометра позволяет получать объективную количественную и качественную информацию о физических свойствах эритроцитов, а использование компьютера значительно повышает точность измерений, снижает трудоемкость проведения эксперимента и ускоряет процесс обработки полученных данных.

В настоящее время отсутствует отечественная серийная модель эктацитометра, что в значительной мере ограничивает возможности проведения исследований по изучению деформируемости эритроцитов.

Поэтому, разработка и создание отечественной модели эктацитометра с компьютерной обработкой полученной информации, отработка технологии эктацитометрических исследований деформируемости эритроцитов, внедрение эктацитометрии в практику научно-исследовательских и клинических лабораторий России, является актуальной проблемой.

**Цель исследования:** С использованием разработанной модели эктацитометра изучить деформируемость эритроцитов крыс с различным уровнем двигательной активности при моделировании стрессов различной этиологии, а также у больных артериальной гипертонией.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Сконструировать эктацитометрическую установку новой модификации.
2. Исследовать влияние физико-химических факторов на деформируемость эритроцитов крыс в опытах *in vitro*.
3. Изучить роль физиологических стрессов на деформируемость эритроцитов крыс с различным уровнем двигательной активности.
4. Исследовать деформируемость эритроцитов больных артериальной гипертонией.

#### **Научная новизна.**

Создана лабораторная установка на основе принципа лазерной дифрактометрии по техническим характеристикам не уступающая зарубежным аналогам. (патент на изобретение №2236009)

Показано, что деформируемость эритроцитов крыс с различным уровнем двигательной активности достоверно отличается: деформируемость эритроцитов активных крыс выше, чем пассивных.

Установлено, что у больных артериальной гипертонией с ишемической болезнью сердца деформируемость эритроцитов снижена.

Впервые показано, что у больных артериальной гипертонией после амбулаторного курса лечения гипотензивным препаратом «Таветен» увеличивается деформируемость эритроцитов.

Полученные результаты по деформируемости эритроцитов в опытах *in vitro*, *in vivo* и в клинических исследованиях свидетельствуют о высокой разрешающей способности установки и возможности ее использования в научно-исследовательской и клинической практике.

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

1. Созданная лабораторная установка (эктацитометр) позволяет объективно оценивать способность к упругой деформации эритроцитов теплокровных (патент на изобретение №2236009).

2. Показано, что деформируемость эритроцитов крыс дифференцированных по уровню двигательной активности, достоверно отличается: способность к упругой деформации эритроцитов активных крыс выше, чем эритроцитов пассивных животных.

3. Характер стресс-нагрузок отражается на степени изменения деформируемости эритроцитов крыс.

4. Деформируемость эритроцитов у больных артериальной гипертонией ниже, чем деформируемость эритроцитов у здоровых людей. Корректирующая терапия с использованием препарата «Таветен» улучшает деформируемость эритроцитов больных артериальной гипертонией после прохождения курса амбулаторного лечения.

**Апробация работы.** Основные положения диссертации доложены на конференциях: «Физика и биология в медицине» (Екатеринбург, 2001), «Актуальные проблемы эволюционной и популяционной физиологии человека» (Тюмень, 2001), «XII Международное совещание и V школа по

эволюционной физиологии» (С.-Петербург, 2001), «XVIII Съезд физиологического общества им. И.П. Павлова» (Казань, 2001), «VI Всероссийская конференция по биомеханике – Биомеханика 2002» (Н. Новгород, 2002), «Югра-Гемо - международный научный симпозиум» (Ханты-Мансийск 2003).

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

**Структура и объем работы:** Диссертация изложена на 121 страницах машинописи и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована таблицами и рисунками. Библиографический указатель включает 108 отечественных и 134 зарубежных источников.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Экспериментальные исследования проводились на половозрелых беспородных крысах самцах массой 160-180 г (162 особи). Все животные содержались в стандартных условиях вивария на полноценной диете и были одного возраста. Опыты проводились в осенне-зимний период. Исследование деформируемости эритроцитов больных артериальной гипертонией с ишемической болезнью сердца проводилось на базе Тюменского кардиологического центра-филиала НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН. Было обследовано 35 человек в возрасте от 30 до 60 лет. 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 инкубационную среду содержащую 3 мл 20% раствора полисахарида Ficoll-400. Все исследования деформируемости эритроцитов проводились методом лазерной дифрактометрии с непосредственным использованием специально сконструированного нами прибора – эктацитометра.

В экспериментах *in vitro* по влиянию температуры среды инкубирования на деформируемость эритроцитов контроль температуры проводили с помощью термостата марки UTU-2 (Poland). Принимая во внимание влияние температурного фактора на изменение кислотности среды инкубирования эритроцитов, в среды специально добавляли один из растворов: 10% раствор HCl или 10% раствор KOH. Контроль над кислотностью сред проводили с использованием рН метра марки Анион – 7010. В экспериментах по изучению влияния различных концентраций глютарового диальдегида на деформируемость эритроцитов в инкубационные среды добавляли разные навески этого реагента (0,01%; 0,02% и 0,03% растворы). Для исследования деформируемости эритроцитов инкубированных в средах с различной осмоляльностью в инкубационные среды добавляли различные навески NaCl. Осмоляльность растворов контролировали при помощи осмометра 1Ц-01.

Для разделения экспериментальных животных на группы активных и пассивных крыс использовался тест «открытое поле» /Бурещ, Бурешова, Хьюстон, 1991/.

Эксперименты по влиянию физической нагрузки, кратковременного охлаждения, перегревания, иммобилизации и вибрации на деформируемость эритроцитов крыс проводили по стандартным методикам /Горизонтов, 1964/. В эксперименте по кратковременному охлаждению крыс помещали в специальную холодильную камеру КХН-2-6СМ, где температуру воздуха поддерживали на уровне 1-2 °С. Время содержания животных в холодильной камере составляло 30 мин. В эксперименте для управляемого нагревания с сохранением заданного теплового режима животных использовался термостат SPT - 200 (Poland). Экспериментальные животные подвергались воздействию температуры 41°С в течение 50 минут. Исследование по влиянию физических нагрузок на деформируемость эритроцитов экспериментальных животных проводили по методике “свободное плавание в клетке” (СПК) /Бондаренко с соавт., 1999/. Иммобилизацию крыс проводили с использованием специального плексигласового бокса, который ограничивал подвижность животных. Время стрессорного воздействия составляло 40 минут.

Лейкоформулу крови экспериментальных животных определяли по стандартным методикам с использованием камеры Горяева, а окраску лейкоцитов проводили по Романовскому-Гимзе /Стенко, 1975/ .

Вся статистическая обработка данных проводилась на персональном компьютере (процессор марки Celeron 1700, программа Ecto-1 со всеми основными формулами для расчета статистических показателей). О достоверности различий судили по *t*-критерию Стьюдента.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **1. Создание эктацитометра собственной разработки.**

Для оценки деформируемости эритроцитов теплокровных животных мы остановились на методе лазерной дифрактометрии с использованием созданной нами лабораторной установки (эктацитометр). Этот выбор основывался на том, что данный метод обладает достаточной информативностью, высокой точностью, а экспериментальный материал наблюдается при условиях максимально приближенным к *in vivo*. Основным отличительным признаком нашей установки в сравнении с существующими зарубежными аналогами является то, что все базовые элементы нашего эктацитометра располагаются в вертикальной плоскости, что значительно уменьшает габариты установки. Также был принципиально изменен механизм деформирующего воздействия на исследуемый материал. Вся установка, кроме периферийных элементов, размещена внутри жесткого светонепроницаемого кожуха, что в значительной степени улучшает контрастность изображения дифракционной картины. При необходимости смены образцов крови кожух легко снимается. Масса установки составляет 6.5 кг, высота 50 см, длина 30 см, ширина 20 см.

Блок-схема эктацитометра изображена на рис.1.

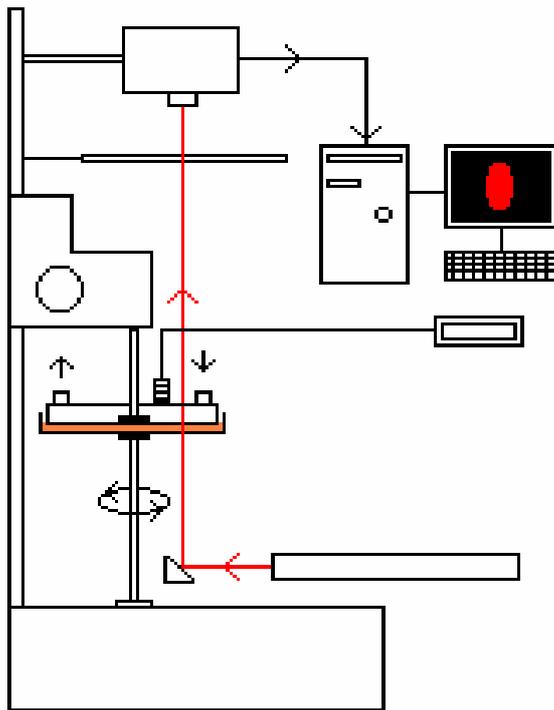


Рис. 1. Блок-схема портативного эктацитометра.

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.

Основанием установки служит металлическая опора с жестко закрепленным стержнем, выполняющим функцию направляющей оси для размещения элементов установки: шагового двигателя, обеспечивающего вращение прозрачной пластины, выполненной из проницаемого для видимого света материала (оргстекло) относительно неподвижной; гелий-неонового лазера (ГИ-3-1 Р =  $1,9 \cdot 10^{-3}$  Вт,  $\lambda = 632,8$  нм); цифровой видеокамеры Canon. Усилие сдвига, вызывающее деформацию эритроцитов, создается за счет вращения нижней пластины относительно верхней - неподвижной. Постоянство температуры пробы крови обеспечивается наличием специальной «рубашки», размещенной на верхней пластине и контролируется при помощи термодатчика. Вращение нижней пластины регулируется при помощи шагового двигателя с переменной, но заданной частотой оборотов от 0 до 28 об/мин. Это позволяет изменять усилие сдвига от 0 до  $49 \text{ Н/м}^2$ . Ширина зазора между пластинами фиксируется при значении 0,5 мм. Изображение дифракционной картины проецируется на полупроницаемый экран и регистрируется при помощи цифровой видеокамеры Canon (рис. 2).

Полученное при помощи видеокамеры изображение передаётся на персональный компьютер, записывается в видеоролик посредством программы

Movie Maker и сохраняется в файл формата avi. Это позволяет анализировать изменение деформируемости эритроцитов в динамике.

В качестве количественной оценки деформируемости эритроцитов используется эктацитометрический индекс или индекс деформируемости Id.

Для его расчета и построения графиков зависимости индекса деформируемости от усилия сдвига, используется программа Ecto-1, написанная в среде программирования Delphi 5.

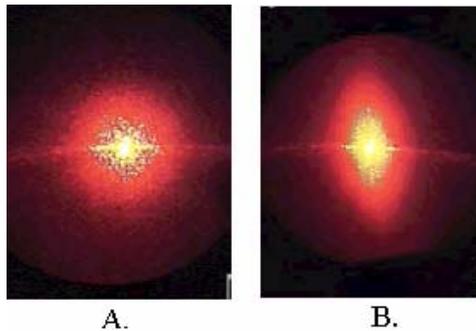


Рис.2. Реальное изображение дифракционной картины, получаемое при прохождении луча лазера через слой эритроцитов, и выводимое на монитор для программного анализа. А-дифракционная картина для покоящихся эритроцитов. В-дифракционная картина для эритроцитов, находящихся в сдвиговом потоке.

С учетом того, что радиус вращающегося сектора в районе прохождения луча лазера составляет 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)), приобретает 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 зависит только от скорости вращения нижней пластины, а при постоянном значении динамической вязкости  $\eta$ , усилия сдвига  $\tau$ , также определяется 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  $Id = (A-B)/(A+B)$ : 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 портативного эктацитометра необходимо было провести серию экспериментов для определения степени достоверности получаемых результатов на основании их повторяемости и соответствия данным, полученным на зарубежных аналогах и представленным в литературе.

## **2. Исследование деформируемости эритроцитов крыс в опытах *in vitro*.**

Исследования по влиянию температурного фактора на деформируемость эритроцитов крыс в опытах *in vitro* проводились в суспензионных средах, термостабилизация которых поддерживалась за счет регулируемого нагревания воды в термостате.

Получены достоверные различия деформируемости эритроцитов при инкубировании этих клеток в средах с температурами 37°C и 20°C на различных усилиях сдвига. Индекс деформируемости эритроцитов на усилие сдвига 49 Н/м<sup>2</sup> и при температуре среды инкубирования клеток 37°C составлял  $0,24 \pm 0,01$ , тогда как при температуре инкубационной среды 20°C и на том же усилии сдвига этот показатель составлял  $0,15 \pm 0,01$  ( $P < 0,05$ ).

На усилие сдвига 24,5 Н/м<sup>2</sup> индекс деформируемости эритроцитов инкубированных в среде с температурой 37°C составлял  $0,23 \pm 0,01$ , а при инкубировании этих клеток в среде при 20°C -  $0,15 \pm 0,01$  ( $P < 0,05$ ). Индекс деформируемости эритроцитов на усилие сдвига 5,2 Н/м<sup>2</sup> и при температуре среды инкубирования клеток 37°C был равен  $0,11 \pm 0,01$ , в то время как при температуре инкубационной среды 20°C индекс деформируемости составлял  $0,05 \pm 0,01$  ( $P < 0,05$ ).

Результаты, которые мы получили в ходе исследований, согласуются с результатами других авторов, проводивших исследования деформируемости эритроцитов при разных температурах методом фильтрации /Fiosso, Quattrocchi, Neirotti, et al., 1984; Sung, Chien, 1992/.

В следующем эксперименте для оценки разрешающей способности эктацитометра был проведен эксперимент на эритроцитах крыс, инкубированных в средах с различными значениями рН (от 5,4 до 9). Эксперимент проводился при постоянном усилии сдвига  $\tau = 49$  Н/м<sup>2</sup> и температуре 37°C. Индекс деформируемости эритроцитов в интервале рН от 7,0 до 7,4 достигал максимального значения ( $0,24 \pm 0,01$ ), в то время как при отклонении рН в кислую и щелочную сторону наблюдалось достоверное снижение этого показателя. Так, например, при инкубировании эритроцитов крыс в слабо-щелочной среде (рН=8,2) индекс деформируемости клеток составлял  $0,19 \pm 0,01$ , а при рН=5,8 -  $0,16 \pm 0,01$ .

Результаты наших исследований хорошо согласуются с данными зарубежных авторов, изучавшими деформируемость эритроцитов методами

фильтрации /Crandal, Critz, Osher, 1972; Kucera, et.al., 1984/ и эктацитометрии /Koutsouris, Delatour-Hanss, Hanss, 1985/.

Для исследования деформируемости эритроцитов крыс, инкубированных в средах с различной концентрацией глютарового диальдегида проводилась следующая серия экспериментов.

После 5 минут инкубации эритроцитов крыс в средах содержащих 20% раствор Ficoll-400 в буферном растворе (0,30 М NaCl, 0,020 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,005 М KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7,4, при 37°C) с добавлением глютарового диальдегида в конечных концентрациях равных 0,01%, 0,02%, 0,03% были получены следующие результаты.

Было показано, что после инкубирования эритроцитов в средах с более высокими концентрациями глютарового диальдегида наблюдалось явное 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 Н/м<sup>2</sup>) составлял 0,18±0,01, тогда как в отсутствие глютарового диальдегида в среде инкубирования - 0,24±0,01 (P<0,05). При увеличении концентрации глютарового диальдегида в среде инкубирования до 0,02% и 0,03% - индекс деформируемости составлял 0,12±0,01 и 0,07 ± 0,01 соответственно.

На следующем этапе нашей работы исследовалась деформируемость эритроцитов крыс после инкубирования клеток в растворах с различной осмоляльностью. Эксперимент проводился при постоянном значении усилия сдвига ( $\tau = 49 \text{ Н/м}^2$ ). Диапазон осмоляльности растворов находился в пределах от 100 – 450 mOsm/kg. Максимальное значение индекса деформируемости эритроцитов крыс (0,24 ± 0,01) было 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 деформируемости эритроцитов. Так, после инкубации эритроцитов в гиперосмоляльном растворе (450 mOsm/kg) индекс деформируемости эритроцитов достоверно снижался до 0,12±0,02 и это снижение по сравнению со значением индекса деформируемости эритроцитов, инкубированных в изоосмоляльной среде, составило 50%. После инкубирования эритроцитов в гипоосмоляльной среде (200 mOsm/kg) индекс деформируемости эритроцитов составлял 0,18±0,01, т.е. был на 25% ниже значения индекса деформируемости эритроцитов, инкубированных в изоосмоляльной среде.

Результаты проведенных нами исследований хорошо согласуются с результатами, полученными Н. Schmid-Schonbein (1982) исследовавшим деформируемость эритроцитов методом фильтрации.

Исследования деформируемости эритроцитов в опытах *in vitro* показывают, что различные физико-химические факторы по-разному влияют на деформируемость эритроцитов, а использование сконструированного нами эктацитометра позволяет выявлять эти различия.

Полученные результаты исследований показали хорошую разрешающую способность используемого эктацитометра, что позволило нам применять его для изучения деформируемости эритроцитов крыс не только в опытах *in vitro*, но и *in vivo*.

### **3. Исследование деформируемости эритроцитов у крыс с различным уровнем двигательной активности в опытах *in vivo*.**

Результаты разделения экспериментальных животных методом «открытое поле» на группы активных и пассивных крыс представлены в таблице 1. Как видно из данных таблицы 1 активные животные характеризуются большим количеством пересечений квадратов, вертикальных стоек и числом актов грумминга по сравнению с пассивной группой.

В качестве факторов влияющих на деформируемость эритроцитов активных и пассивных крыс использовались такие воздействия как холодовой стресс, механическая вибрация, кратковременное перегревание, иммобилизационный стресс и физическая нагрузка в виде принудительного плавания.

Таблица 1.

Поведенческие характеристики крыс с различной двигательной активностью при тестировании в открытом поле.

Тип поведения	Число животных	Характеристики				
		Число пересечений квадратов	Число стоек	Число выходов в центр	Число дефекаций	Число актов грумминга
Активное	60	135,0±10,3	46,5±7,4	3,5±1,0	5,8±0,2	9,3±3,2
Пассивное	60	41,5±4,2*	8,4±1,3**	0,4±0,1	3,7±0,7	4,2±1,3*

Примечание: достоверность различий \*-при  $P < 0,05$ ; \*\* - при  $P < 0,01$

Известно, что стрессорные воздействия 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/.

#### **3.1. Влияние кратковременного охлаждения на деформируемость эритроцитов крыс.**

Результаты исследований по воздействию холодового стресса на лейкограмму и деформируемость эритроцитов крыс представлены в таблице 2 и на рисунке 3.

Как видно из таблицы 2 после кратковременного охлаждения в крови опытных животных было зарегистрировано достоверное возрастание количества лейкоцитов, палочкоядерных нейтрофилов, сегментоядерных нейтрофилов, а также отмечалось достоверное снижение относительного

содержания эозинофилов и лимфоцитов, что свидетельствовало о возникшей стресс реакции организма.

Таблица 2.

Лейкограмма активных и пассивных крыс после кратковременного охлаждения ( $M \pm m$ )

Показатель	Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	Палочкояд. нейтр.,%	сегмент. нейтр.,%	эозинофил ы, %	Моноцит ы, %	лимфоциты, %
контроль (n=10)	$4,40 \pm 0,11$	$0,75 \pm 0,25$	$16,75 \pm 2,03$	$1,38 \pm 0,42$	$1,82 \pm 0,23$	$79,30 \pm 2,23$
Холодовой стресс (пассивные) (n=10)	$6,10 \pm 0,17$ **	$1,54 \pm 0,20$ *	$24,70 \pm 2,01$ ***	$0,19 \pm 0,12$ *	$1,98 \pm 0,16$	$71,75 \pm 1,75$ **
Холодовой стресс (активные) (n=10)	$6,30 \pm 0,18$ ***	$1,69 \pm 0,22$ **	$27,04 \pm 1,75$ ***	$0,60 \pm 0,15$ **	$1,36 \pm 0,12$	$69,18 \pm 1,78$ **

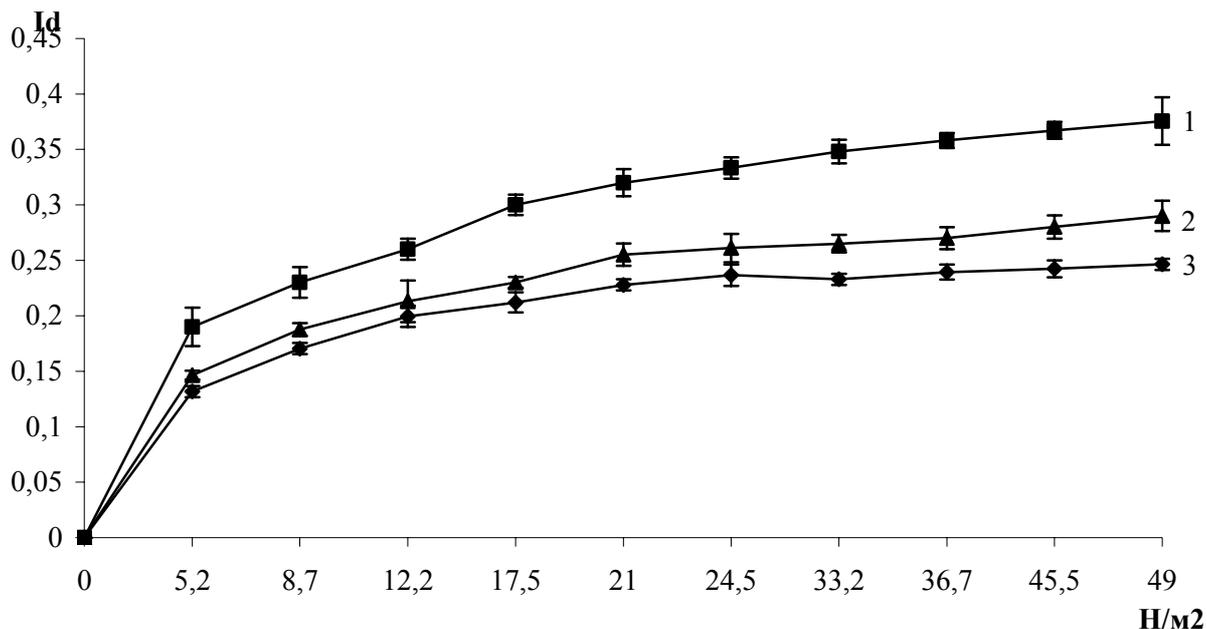
Примечание: достоверность различий по сравнению с контролем: \* -  $P < 0,05$ ; \*\* -  $P < 0,01$ ; \*\*\* -  $P < 0,001$

Деформируемость эритроцитов активных и пассивных крыс также достоверно изменялась по сравнению с контролем (рис. 3).

Так, на максимальном усилии сдвига ( $49 \text{ Н/м}^2$ ) индекс деформируемости клеток контрольных крыс составлял  $0,24 \pm 0,01$ , а после кратковременного охлаждения активных крыс данный показатель увеличивался до  $0,37 \pm 0,02$  (увеличение на 54%). У пассивных крыс индекс деформируемости эритроцитов на максимальном усилии сдвига увеличивался на 20% и составлял  $0,29 \pm 0,01$  ( $P < 0,05$ ).

На среднем усилии сдвига ( $21 \text{ Н/м}^2$ ) индекс деформируемости эритроцитов экспериментальных животных в контроле составлял  $0,22 \pm 0,01$ , у активных крыс данный показатель увеличивался до  $0,32 \pm 0,01$  (на 45%). Индекс деформируемости эритроцитов у пассивных крыс на усилии сдвига  $21 \text{ Н/м}^2$  достоверно увеличивался на 13% и составлял  $0,25 \pm 0,01$  ( $P < 0,05$ ).

На минимальном усилии сдвига ( $5,2 \text{ Н/м}^2$ ) индекс деформируемости эритроцитов контрольных крыс составлял  $0,13 \pm 0,01$ , тогда как у активных крыс данный показатель увеличивался на 46% и составлял  $0,19 \pm 0,02$ . У пассивных крыс достоверных различий по сравнению с контрольной группой на данном усилии сдвига не обнаружено.



**Рис. 3** График зависимости индекса деформируемости эритроцитов активных и пассивных крыс от усилия сдвига после кратковременного охлаждения. 1 – активные крысы; 2 – пассивные крысы; 3 – контроль.

### 3.2. Влияние иммобилизационного стресса на деформируемость эритроцитов крыс.

Результаты исследований по воздействию иммобилизационного стресса на лейкограмму и деформируемость эритроцитов крыс представлены в таблице 3 и на рисунке 4.

Как видно из таблицы 3 после иммобилизационного стресса в крови крыс увеличивалось содержание лейкоцитов, палочкоядерных нейтрофилов и сегментоядерных нейтрофилов, при этом отмечалось достоверное снижение относительного содержания эозинофилов и лимфоцитов.

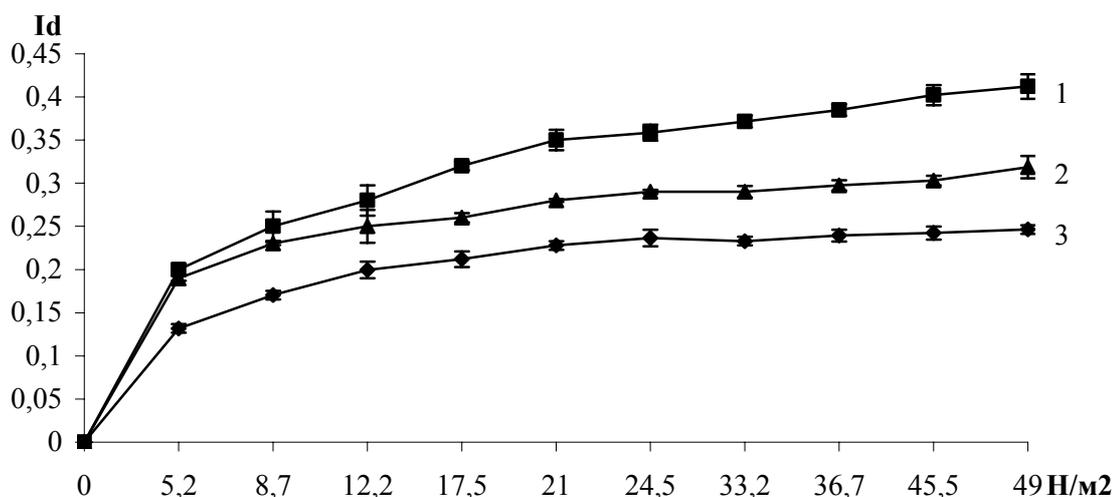
У крыс, подвергнутых иммобилизационному стрессу, индекс деформируемости эритроцитов достоверно увеличивался на малых, средних и больших усилия сдвига по сравнению с показателями контрольной группы (рис. 4). Так, например, при усилии сдвига  $49 \text{ Н/м}^2$  индекс деформируемости эритроцитов контрольных крыс составлял  $0,24 \pm 0,01$ , тогда как у активных крыс увеличивался на 70% ( $0,41 \pm 0,01$ ), у пассивных животных данный показатель возрастал на 29% и составлял  $0,31 \pm 0,02$ .

Таблица 3.

Лейкограмма активных и пассивных крыс после  
иммобилизационного стресса ( $M \pm m$ )

Показатель	Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	Палочкояд. нейтр, %	сегмент. нейтр., %	эозинофил ы, %	Моноцит ы, %	Лимфоциты, %
контроль (n=10)	$4,28 \pm 0,13$	$0,75 \pm 0,25$	$16,75 \pm 2,03$	$1,38 \pm 0,42$	$1,82 \pm 0,23$	$79,30 \pm 2,23$
Иммобилиза ция (пассивные) (n=10)	$5,91 \pm 0,20$ **	$1,21 \pm 0,15$ **	$24,52 \pm 1,51$ **	$0,20 \pm 0,11$ **	$2,00 \pm 0,29$	$73,75 \pm 1,82$ **
Иммобилиза ция (активные) (n=10)	$6,00 \pm 0,18$ ***	$1,58 \pm 0,19$ *	$26,86 \pm 1,63$ **	$0,42 \pm 0,24$ *	$1,29 \pm 1,01$	$70,19 \pm 2,00$ ***

Примечание: достоверность различий по сравнению с контролем: \* -  $P < 0,05$ ;  
\*\* -  $P < 0,01$ ; \*\*\* -  $P < 0,001$



**Рис. 4** График зависимости индекса деформируемости эритроцитов активных и пассивных крыс от усилия сдвига после иммобилизационного стресса. 1 – активные крысы; 2 – пассивные крысы; 3 – контроль.

На усилии сдвига  $21 \text{ Н/м}^2$  индекс деформируемости эритроцитов экспериментальных животных в контроле составлял  $0,22 \pm 0,01$ , у активных и пассивных крыс данный показатель достоверно увеличивался до  $0,35 \pm 0,01$  (увеличение на 59%) и  $0,28 \pm 0,01$  (увеличение на 27%) соответственно. На усилии сдвига  $5,2 \text{ Н/м}^2$  индекс деформируемости эритроцитов опытной группы крыс достоверно увеличивался по сравнению с контрольными показателями. Так, у контрольной группы крыс на данном усилии сдвига индекс

деформируемости составлял  $0,13 \pm 0,01$ , у активных -  $0,20 \pm 0,01$  (увеличение на 53%), у пассивных –  $0,19 \pm 0,01$  (увеличение на 46%).

### 3.3 Влияние кратковременного перегревания на деформируемость эритроцитов крыс.

Результаты исследований по воздействию кратковременного перегревания на количественный состав лейкоцитов и деформируемость эритроцитов крыс представлены в таблицах 4 и на рисунке 5.

Как видно из таблицы 4, в результате стресс-реакция произошли существенные изменения в показателях лейкоформулы, что свидетельствует о включение адаптационных механизмов организма.

Таблица 4.

Лейкограмма активных и пассивных крыс подвергнутых кратковременному перегреванию ( $M \pm m$ )

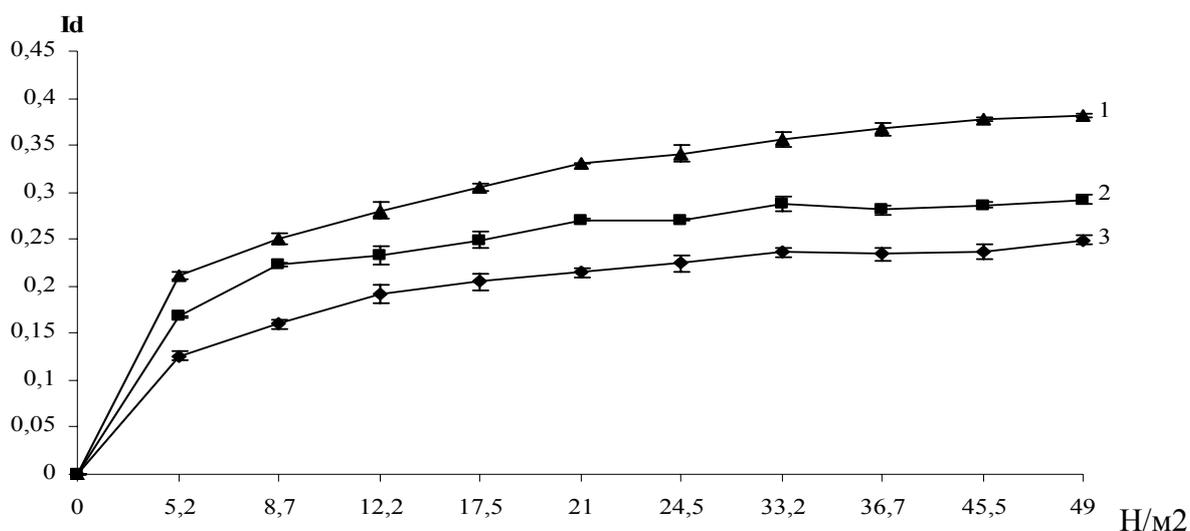
Показатель	Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	Палочкояд. нейтр, %	сегмент. нейтр., %	эозинофил ы, %	Моноцит ы, %	Лимфоциты, %
Контроль (n=10)	$4,20 \pm 0,12$	$0,71 \pm 0,22$	$16,61 \pm 2,10$	$1,42 \pm 0,41$	$1,90 \pm 0,25$	$80,31 \pm 2,25$
Перегревание (пассивные) (n=10)	$5,90 \pm 0,11$ **	$1,44 \pm 0,10$ *	$25,60 \pm 1,01$ ***	$0,20 \pm 0,16$ *	$1,80 \pm 0,24$	$70,48 \pm 0,12$ **
Перегревание (активные) (n=10)	$6,10 \pm 0,16$ ***	$1,70 \pm 0,12$ **	$28,14 \pm 1,34$ ***	$0,55 \pm 0,42$ **	$1,00 \pm 0,17$	$59,14 \pm 0,16$ **

Примечание: достоверность различий по сравнению с контролем: \* -  $P < 0,05$ ; \*\* -  $P < 0,01$ ; \*\*\* -  $P < 0,001$

Результаты исследования, представленные на рисунке 5, показывают, что деформируемость эритроцитов у активных и пассивных крыс достоверно увеличивалась после кратковременного перегревания по сравнению с контрольной группой.

На усилии сдвига  $49 \text{ Н/м}^2$  индекс деформируемости эритроцитов контрольной группы крыс был равен  $0,24 \pm 0,01$ , у опытных животных достоверно увеличивался и составлял для активных -  $0,38 \pm 0,02$  (увеличение на 58%) и пассивных животных -  $0,29 \pm 0,01$  ( $P < 0,05$ ) (увеличение на 20%).

На среднем усилии сдвига ( $21 \text{ Н/м}^2$ ) индекс деформируемости эритроцитов контрольной группы крыс составлял  $0,22 \pm 0,02$ , у активных крыс данный показатель был равен  $0,33 \pm 0,01$  (увеличение на 50%), у пассивных крыс индекс деформируемости эритроцитов составлял  $0,27 \pm 0,01$  ( $P < 0,05$ ) (увеличение на 22%).



**Рис. 5** График зависимости индекса деформируемости эритроцитов активных и пассивных крыс от усилия сдвига после кратковременного перегревания. 1 – активные крысы; 2 – пассивные крысы; 3 – контроль.

На усилении сдвига  $5,2 \text{ Н/м}^2$  индекс деформируемости эритроцитов контрольных крыс составлял  $0,13 \pm 0,01$ , тогда как у опытных животных данный показатель был достоверно выше: у активных крыс увеличивался на 61% и составлял  $0,21 \pm 0,01$ , а у пассивных крыс на 23% и составлял  $0,16 \pm 0,01$ .

### **3.4 Влияние принудительного плавания на деформируемость эритроцитов крыс.**

Результаты исследований по воздействию принудительного плавания на лейкограмму и деформируемость эритроцитов крыс представлены в таблице 5 и на рисунке 6.

Как видно из таблицы 5, после перенесенного стресса, вызванного принудительным плаванием, в крови опытных животных было зарегистрировано достоверное возрастание количества лейкоцитов, палочкоядерных нейтрофилов, сегментоядерных нейтрофилов, а также отмечалось достоверное снижение относительного содержания эозинофилов и лимфоцитов. Данные представленные на рисунке 6 показывают, что у крыс, подвергнутых принудительному плаванию индекс деформируемости эритроцитов достоверно увеличивался по сравнению с показателями контрольной группы.

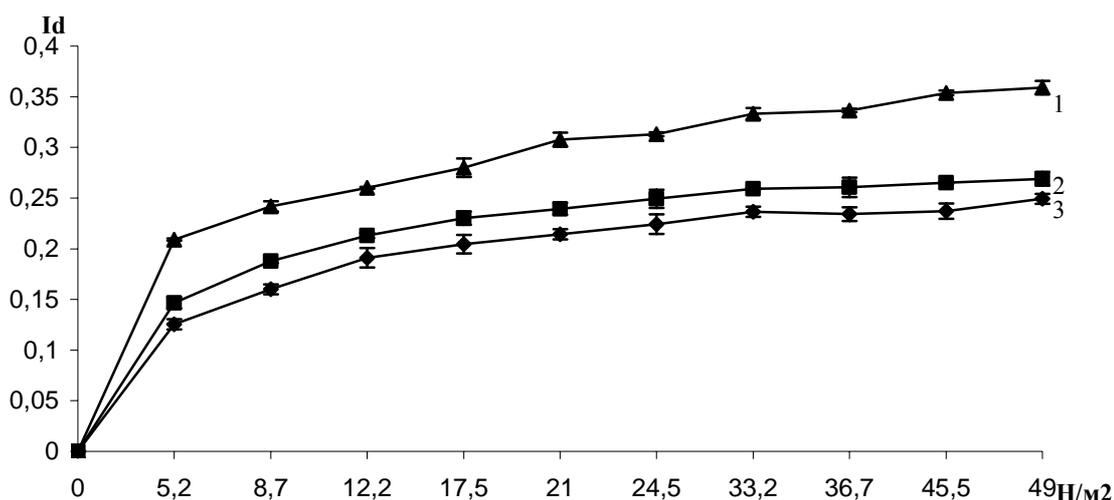
Таблица 5.

Лейкограмма активных и пассивных крыс подвергнутых  
принудительному плаванию ( $M \pm m$ )

Показатель	Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	Палочкояд. нейтр, %	сегмент. нейтр., %	эозинофил ы, %	Моноцит ы, %	лимфоциты, %
Контроль (n=10)	$4,20 \pm 0,12$	$0,71 \pm 0,22$	$16,61 \pm 2,10$	$1,42 \pm 0,41$	$1,90 \pm 0,25$	$80,31 \pm 2,25$
Плавание (пассивные) (n=10)	$4,80 \pm 0,12$ **	$1,45 \pm 0,79$ **	$23,53 \pm 0,51$ **	$0,32 \pm 0,71$ **	$2,11 \pm 0,17$	$74,47 \pm 2,92$ **
Плавание (активные) (n=10)	$5,90 \pm 0,14$ ***	$1,78 \pm 0,14$ *	$25,29 \pm 0,48$ **	$0,53 \pm 0,58$ *	$2,12 \pm 2,05$	$67,19 \pm 1,21$ ***

Примечание: достоверность различий по сравнению с контролем: \* -  $P < 0,05$ ; \*\* -  $P < 0,01$ ; \*\*\* -  $P < 0,001$

Так, например при усилии сдвига  $49 \text{ Н/м}^2$  индекс деформируемости эритроцитов контрольных крыс был равен  $0,24 \pm 0,01$ , тогда как у активных крыс увеличивался на 50% ( $0,36 \pm 0,01$ ), у пассивных животных данный показатель увеличивался на 16% и составлял  $0,28 \pm 0,01$  ( $P < 0,05$ ). На среднем усилии сдвига ( $21 \text{ Н/м}^2$ ) индекс деформируемости эритроцитов экспериментальных животных в контроле был равен  $0,22 \pm 0,02$ , у активных крыс данный показатель достоверно увеличивался до  $0,30 \pm 0,01$  (увеличение на 36%).



**Рис. 6** График зависимости индекса деформируемости эритроцитов активных и пассивных крыс от усилия сдвига после принудительного плавания. 1 – активные крысы; 2 – пассивные крысы; 3 – контроль.

На усилии сдвига  $5,2 \text{ Н/м}^2$  индекс деформируемости эритроцитов опытной группы крыс достоверно увеличивался по сравнению с контрольными показателями. Так, у контрольной группы крыс на данном усилии сдвига индекс деформируемости составлял  $0,13 \pm 0,02$ , у активных -  $0,20 \pm 0,01$  (увеличение на 53%).

### 3.5. Влияние вибрационного стресса на деформируемость эритроцитов крыс.

Результаты исследований по воздействию вибрационного стресса на лейкограмму и деформируемость эритроцитов крыс представлены в таблице 6 и на рисунке 7.

Результаты исследований лейкограммы представленные в таблице 6 демонстрируют, что после вибрационного стресса в крови опытных животных наблюдалось достоверное возрастание количества лейкоцитов, палочкоядерных нейтрофилов, сегментоядерных нейтрофилов, а также отмечалось достоверное снижение относительного содержания эозинофилов и лимфоцитов.

Таблица 6.

Лейкограмма активных и пассивных крыс подвергнутых вибрационному стрессу ( $M \pm m$ )

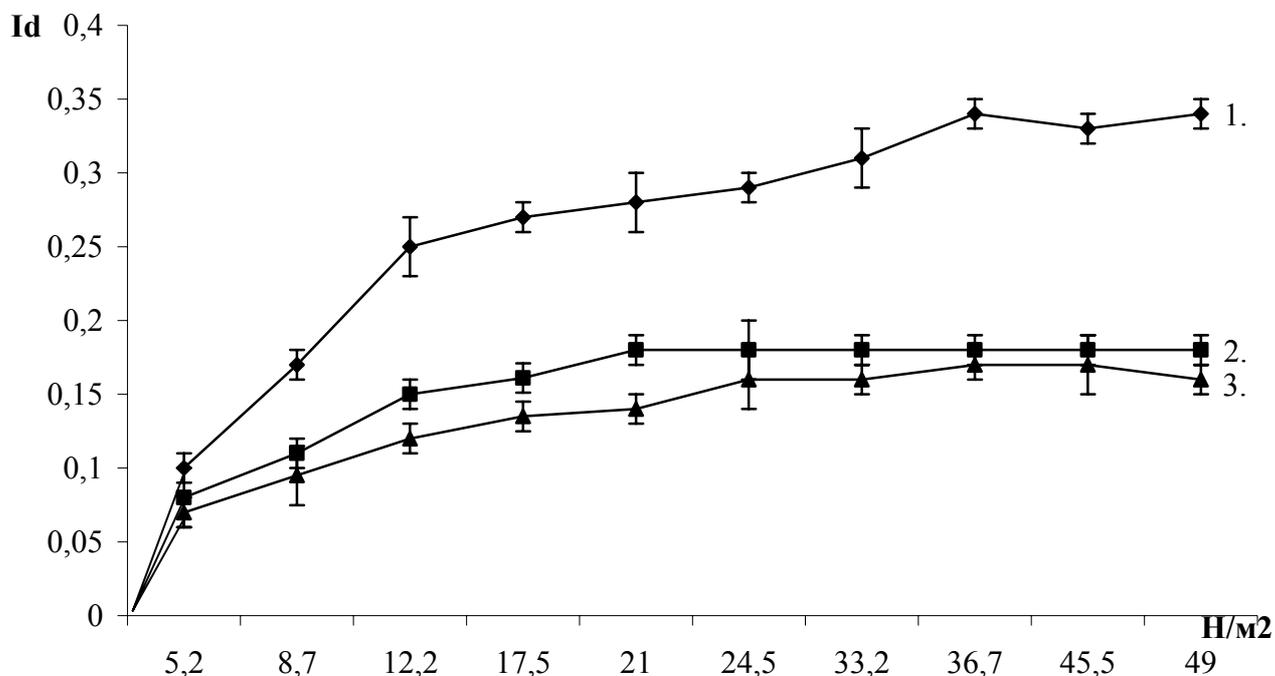
Показатель	Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	Палочкояд. нейтр.,%	сегмент. нейтр.,%	эозинофилы, %	моноциты, %	Лимфоциты, %
контроль (n=10)	$4,40 \pm 0,11$	$0,94 \pm 0,21$	$17,60 \pm 1,06$	$1,37 \pm 0,18$	$2,31 \pm 0,20$	$77,80 \pm 1,03$
механическая вибрация (активные) (n=10)	$6,06 \pm 0,13$ ***	$1,36 \pm 0,19$ *	$27,73 \pm 1,04$ **	$0,16 \pm 0,11$ *	$2,11 \pm 0,26$	$68,92 \pm 1,87$ **
механическая вибрация (пассивные) (n=10)	$5,09 \pm 0,11$ ***	$1,47 \pm 0,20$ *	$28,75 \pm 1,08$ **	$0,18 \pm 0,13$ *	$2,13 \pm 0,28$	$65,81 \pm 1,22$ **

Примечание: достоверность различий по сравнению с контролем: \* -  $P < 0,05$ ; \*\* -  $P < 0,01$ ; \*\*\* -  $P < 0,001$ .

У крыс, подвергнутых вибрационному стрессу, индекс деформируемости эритроцитов достоверно снижался на различных усилиях сдвига по сравнению с показателями контрольной группы (рис. 7).

На усилии сдвига  $49 \text{ Н/м}^2$  индекс деформируемости контрольной группы крыс был равен  $0,24 \pm 0,01$ , у опытных активных животных достоверно снижался на 25% и составлял  $0,18 \pm 0,02$ , а у пассивных животных на 34% и составлял  $0,16 \pm 0,01$ . На среднем усилии сдвига ( $21 \text{ Н/м}^2$ ) индекс деформируемости эритроцитов контрольной группы крыс составлял  $0,22 \pm 0,02$ , у активных крыс данный показатель был равен  $0,18 \pm 0,01$  (снижение на 19%), у пассивных крыс

индекс деформируемости эритроцитов составлял  $0,16 \pm 0,01$  (снижение на 28%). На минимальном усилии сдвига ( $5,2 \text{ Н/м}^2$ ) индекс деформируемости эритроцитов контрольных крыс составлял  $0,13 \pm 0,01$ , тогда как у опытных животных данный показатель был достоверно ниже: у активных крыс -  $0,08 \pm 0,01$  (на 39%), а у пассивных крыс -  $0,07 \pm 0,01$  (на 47%).



**Рис. 7** График зависимости индекса деформируемости эритроцитов активных и пассивных крыс от усилия сдвига после вибрационного стресса. 1 – контроль; 2 – активные крысы; 3 – пассивные крысы.

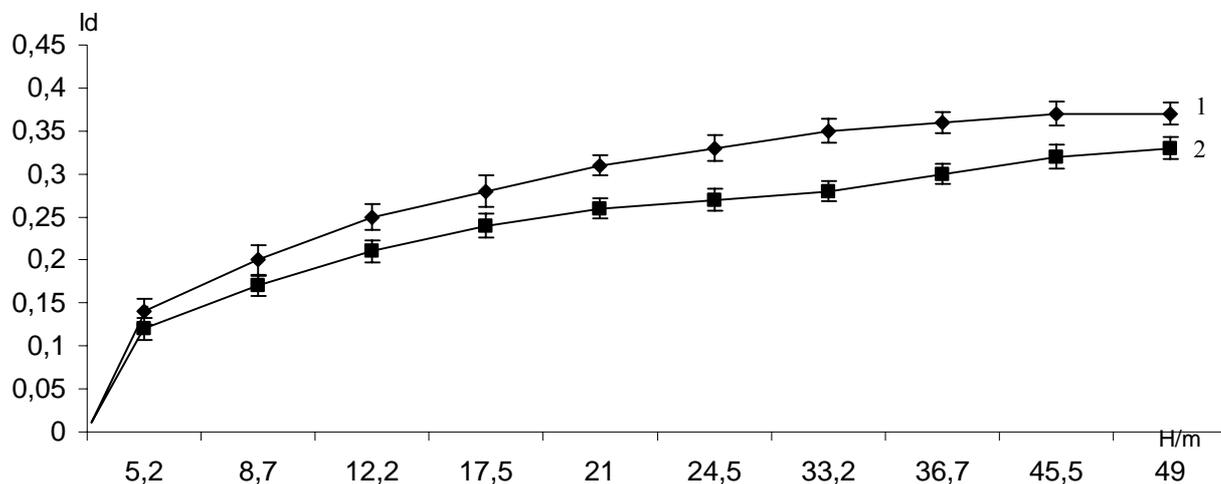
#### **4. Влияние гипотензивного препарата «Таветен» на деформируемость эритроцитов больных артериальной гипертонией с ишемической болезнью сердца.**

В нашей работе проводилось исследование деформируемости эритроцитов у больных артериальной гипертонией с ишемической болезнью сердца до лечения и после 8-ми недельного курса лечения препаратом «Таветен».

На первом этапе исследовалась деформируемость эритроцитов здоровых людей и больных артериальной гипертонией с ишемической болезнью сердца до лечения препаратом «Таветен». (рис. 8).

Отмечено достоверное различие деформируемости эритроцитов у больных артериальной гипертонией по сравнению со здоровыми людьми. Так, у больных артериальной гипертонией с ишемической болезнью сердца индекс деформируемости эритроцитов на максимальном усилии сдвига ( $49 \text{ Н/м}^2$ )

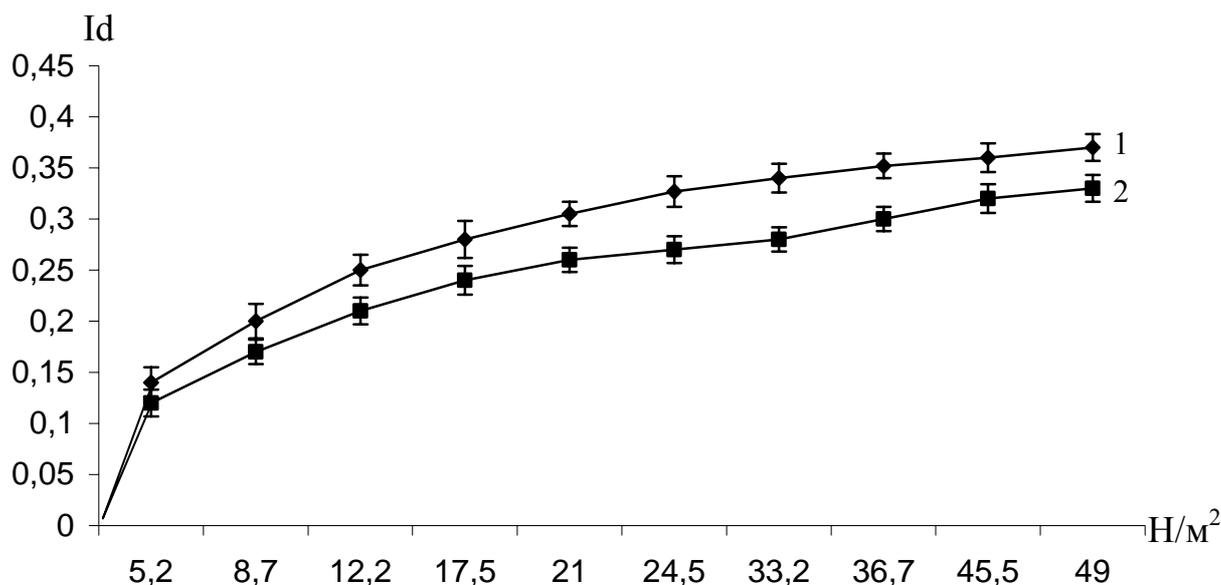
составлял  $0,33 \pm 0,01$ , у здоровых этот показатель был выше на 12% ( $0,37 \pm 0,01$ ). На усилии сдвига  $21 \text{ Н/м}^2$  индекс деформируемости эритроцитов здоровых людей составлял  $0,31 \pm 0,01$ , в то время как у больных артериальной гипертонией с ишемической болезнью сердца –  $0,27 \pm 0,01$  ( $P < 0,05$ ).



**Рис. 8** График зависимости индекса деформируемости эритроцитов здоровых людей и больных артериальной гипертонией с ишемической болезнью сердца: 1 – здоровые люди; 2 – больные артериальной гипертонией с ишемической болезнью сердца.

На следующем этапе исследовалось влияние гипотензивного препарата «Таветен» на деформируемость эритроцитов больных артериальной гипертонией с ишемической болезнью сердца после 8-ми недельного курса лечения (рис. 9).

Отмечалось, что после лечения препаратом «Таветен» индекс деформируемости эритроцитов больных артериальной гипертонией на усилии сдвига  $49 \text{ Н/м}^2$  достоверно увеличивался и составлял  $0,37 \pm 0,01$  по сравнению с исходным значением полученным до лечения –  $0,33 \pm 0,01$  (увеличение на 12% при  $P < 0,05$ ). На среднем усилии сдвига  $21 \text{ Н/м}^2$  индекс деформируемости эритроцитов больных артериальной гипертонией после лечения препаратом «Таветен» достоверно увеличивался на 11% и составлял  $0,30 \pm 0,01$ , тогда как до лечения этот показатель был равен  $0,27 \pm 0,01$  ( $P < 0,05$ ).



**Рис. 9** График зависимости индекса деформируемости больных артериальной гипертензией с ишемической болезнью сердца до и после после 8-ми недельного курса лечения гипотензивным препаратом «Таветен»: 1 – больные после лечения; 2 – больные до лечения препаратом «Таветен».

## ВЫВОДЫ

1. Создана новая модель устройства, отличающаяся от ранних прототипов, меньшими габаритами, точностью измерений и возможностью оперативной обработки изображения дифракционных картин с использованием персонального компьютера и специального программного обеспечения.
2. В опытах по оценке деформируемости эритроцитов крыс помещенных в среды с различными нефизиологическими значениями температуры, рН и осмоляльности было отмечено достоверное снижение деформируемости. Наиболее физиологические показатели деформируемости эритроцитов крыс в опытах *in vitro* отмечались после инкубирования клеток в средах с температурой 37 °С, рН 7-7,4, осмоляльностью 300 mOsm/kg .
3. У животных с различным уровнем двигательной активности выявлены отличия в деформируемости эритроцитов. Деформируемость эритроцитов активных крыс была достоверно выше по сравнению с данным показателем пассивных животных.
4. Деформируемость эритроцитов экспериментальных животных как в группе пассивных, так и в группе активных крыс увеличивалась после воздействия стрессорных нагрузок таких как, физическая нагрузка, кратковременное охлаждение, перегревание, иммобилизация. После воздействия вибрационного стресса в обеих группах экспериментальных животных отмечалось снижение деформируемости эритроцитов относительно контрольной группы.

5. Деформируемость эритроцитов у больных артериальной гипертонией снижена по сравнению со здоровыми людьми. Применение препарата «Тавеген» в течение 8 –ми недельного курса лечения, приводит к увеличению деформируемости эритроцитов больных артериальной гипертонией.

### **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. 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.
4. 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.
5. Исследование деформационных свойств эритроцитов с использованием усовершенствованного эктацитометра / Белкин А.В., Марьинских В.В., Шалабодов А.Д. // Тезисы докладов: «VI Всероссийская конференция по биомеханике – Биомеханика – 2002» - Н. Новгород, 2002. - С. 33.
6. Оценка влияния механических вибраций на реологию эритроцитов крыс/ А.В. Белкин, А.В. Колычева, В.В. Марьинских и др. //Югра-Гемо: материалы международного научного симпозиума. – Ханты-Мансийск., – 2003. – С. 31-34.
7. Исследование вязкоэластических свойств мембран эритроцитов крыс с различным уровнем двигательной активности и их реакция на стрессы различной этиологии / Белкин А.В., Марьинских В.В., Турбасова Н.В., Шалабодов А.Д. // Вестник Тюменского Государственного Университета. – 2007. - № 3. – С.234-239.