

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ФГБОУ ВО «ВГУ»)

Медико-биологический факультет
Кафедра биофизики и биотехнологии

Исследование цитоархитектоники эритроцитов доноров, модифицированных
воздействием лекарственного препарата "Кардикет" и монохроматического
УФ-света (254 нм)

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Направление 06.03.01. Биология

Профиль Биофизика и биотехнология

Допущено к защите в ГЭК __. __. 2019

Зав. кафедрой: д.б.н., проф. В.Г. Артюхов

Обучающийся: Л.О. Соколова

Руководитель: д.б.н., проф. О.В. Путинцева

Воронеж
2019

РЕФЕРАТ

УДК 615.224:615.849.5

Соколова Людмила Олеговна. Исследование цитоархитектоники эритроцитов доноров, модифицированных воздействием лекарственного препарата "Кардикет" и монохроматического УФ-света (254 нм). Выпускная квалификационная работа бакалавра. ВГУ. Воронеж. 2019. 47 с. основного текста, 6 с. приложений, 15 рис., 5 табл., 37 использованных источников литературы.

МЕТОД СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ, ИЗОСОРБИД ДИНИТРАТ, ОКСИД АЗОТА, ПОВЕРХНОСТНАЯ ЦИТОАРХИТЕКТОНИКА ЭРИТРОЦИТОВ, УФ-ОБЛУЧЕНИЕ.

С помощью метода сканирующей электронной микроскопии исследовано одиночное и комплексное влияние лекарственного препарата «Кардикет» (0,4 мг/мл) и УФ-света (254 нм) в дозах 750 и 2270 Дж/м² на цитоархитектонику эритроцитов крови доноров. Было установлено, что воздействие фармакологического препарата приводит к снижению количества дискоцитов в суспензии эритроцитов. Наиболее глубокие изменения показателей цитоархитектоники эритроцитов наблюдались после комплексного воздействия лекарственного средства (24ч) и УФ-света.

Автор работы Л.О. Соколова

Руководитель О.В. Путинцева

ОГЛАВЛЕНИЕ

РЕФЕРАТ.....	2
ОГЛАВЛЕНИЕ.....	3
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ.....	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1. Характеристика эритроцитов крови человека, их строение и функциональные свойства	8
1.2. Оксид азота: биосинтез, физиологическая роль, использование в медицине	13
1.3. Общая характеристика лекарственного препарата «Кардикет»	18
1.4. Влияние УФ-излучения на структуру и функциональные характеристики мембран эритроцитов.....	21
ГЛАВА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	25
2.1. Цель и задачи работы	25
2.2. Объекты и методы исследования.....	25
2.2.1. Объект исследования	25
2.2.2. Получение суспензии эритроцитов	25
2.2.3. Инкубация эритроцитов с модификатором «Кардикет»	26
2.2.4. Облучение нативных и модифицированных лекарственным препаратом «Кардикет» суспензий эритроцитов	26
2.2.5. Метод сканирующей электронной микроскопии	26
2.2.6. Статистическая обработка результатов	28
2.3. Результаты экспериментов и их обсуждение	29
2.3.1. Исследование цитоархитектоники нативных эритроцитов крови доноров	29

2.3.2. Исследование цитоархитектоники эритроцитов крови доноров, модифицированных воздействием лекарственного препарата «Кардикет» в течение разного временного периода	31
2.3.3. Исследование цитоархитектоники эритроцитов доноров, модифицированных воздействием монохроматического УФ-света (254нм).....	33
2.3.4. Исследование цитоархитектоники эритроцитов крови доноров после комплексного воздействия препарата «Кардикет» и УФ-света 254 нм ..	35
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	38
ВЫВОДЫ	41
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	43
ПРИЛОЖЕНИЯ	48

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ,
ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

NO — оксид азота

АТФ — аденозинтрифосфат

АУФОК — аутотрансфузия УФ-облученной крови

АФА — активные формы азота

АФК — активные формы кислорода

ДУФ — длинноволновое УФ-излучение

ИБС — ишемическая болезнь сердца

КУФ — коротковолновое УФ-излучение

СУФ — средневолновое ультрафиолетовое излучение

СЭМ — сканирующая электронная микроскопия

цГМФ — циклический гуанозинмонофосфат

ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших компонентов крови являются эритроциты, которые благодаря своей уникальной двояковогнутой форме могут выполнять свои физиологические функции (транспорт газов по организму, способность обратимо присоединять и отдавать кислород в тканях). Изменение формы эритроцитов и их размеров неизбежно влечет за собой нарушения снабжения организма кислородом и ведет к развитию различных патологий. Трансформация эритроцитов может быть результатом воздействия множества факторов: нарушения внутриклеточного обмена, изменения структуры внутриклеточного гемоглобина, действия внешних физико-химических факторов.

Нитровазодилататоры — группа лекарственных средств, имеющих сосудорасширяющие свойства и отличающиеся по химической структуре. Органические нитраты при поступлении в организм человека подвергаются биотрансформации путем денитрозирования с последующим высвобождением оксида азота. Оксид азота активирует гуанилатциклазу и в итоге образуется цГМФ, обладающий способностью расслаблять гладкомышечные стенки сосудов [23]. К данной группе нитровазодилататоров относится лекарственный препарат «Кардикет».

Среди методов лечения ИБС наряду с лекарственной терапией, все большее значение приобретают физические методы. К их числу относится метод аутотрансфузии УФ-облученной крови (АУФОК). УФ-свет с длиной волны 254 нм обладает наиболее мощным бактерицидным действием и используется в практике АУФОК-терапии. Лечебный эффект метода АУФОК связан с усилением оксигенации крови, ослаблением гипоксичных состояний, нормализацией реологических свойств крови. Следует также отметить, что АУФОК-терапия применяется для реабилитации больных с сердечно-сосудистыми патологиями, которые регулярно и длительное

время используют нитратные лекарственные препараты для профилактики и остановки приступов стенокардии .

В связи с вышеизложенным, актуальным становится изучение структурных изменений эритроцитарных клеток, модифицированных воздействием лекарственного препарата "Кардикет" (Изосорбида динитрат), УФ-света (254 нм) в дозах 750 и 2270 Дж/м² и комплексным влиянием органического нитрата и ультрафиолета.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика эритроцитов крови человека, их строение и функциональные свойства

Кровь является неньютоновской жидкостью, главным образом потому, что она представляет собой не раствор, а суспензию форменных элементов в плазме. К форменным элементам относятся эритроциты (их примерно 5 миллионов в мм^3 и они занимают 40 — 45% общего объема крови), лейкоциты (занимающие примерно 0,3% объема цельной крови) и тромбоциты (0,15%). Выраженное в процентах отношение объема эритроцитов к объему цельной крови называется показателем гематокрита (Hct) [8].

Эритроциты человека представляют собой двояковогнутые диски диаметром 6 — 9 $\mu\text{м}$ и толщиной в центре — 1 $\mu\text{м}$, по краям — 2-2,5 $\mu\text{м}$. Мембрана эритроцитов в толщину составляет около 6 нм и содержит 50% белка, 43% липидов и 7% углеводов. Объем дискоцита составляет 90 $\mu\text{м}^3$, площадь поверхности — 142 $\mu\text{м}^2$ [3]. Эта уникальная форма приводит к уменьшению энергии изгиба мембраны и увеличению площади поверхности по сравнению со сферической формой, что выгодно для их проходимости через капилляры и повышенной газопередающей способности. Описанная выше форма, а также особенности строения их мембраны и цитоскелета дают большую пластичность эритроцитам, благодаря которой они преодолевают мелкие капилляры [6, 37].

Одним из значимых свойств эритроцитов считается деформация: циркулируя с кровью, они взаимодействуют друг с другом, со стенками сосудов (капилляры, вены, артерии). Также они способны без потери нативной формы могут удлиняться, перегибаться, закручиваться. Морфология эритроцитов и их высокая способность к деформации играют важную роль в функциях, которые они выполняют и непосредственно связаны с газообменом. Объем эритроцита, соответствующий диску, может

быть изменен в пределах нормы без растяжения клеточной мембраны, что объясняет его высокую деформируемость. Следовательно, устойчивость эритроцитов к осмотическому гемолизу, аутогемолизу и, в меньшей степени, к механическим травмам частично зависит от их формы. Белки цитоскелета эритроцитов и их плазматической мембраны (спектрин, анкерин, аддуктин, гликофорин) обеспечивают структурные свойства и сохраняют их форму. При дефектах выше перечисленных белков появляются аномальные формы эритроцитов (рис. 1) и укорачивается срок их жизни [15].

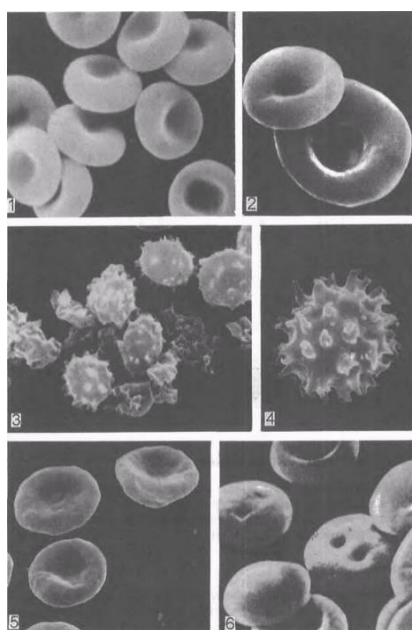


Рис. 1. Эритроциты различной формы на сканирующем электронном микроскопе, увеличение $\times 8000$ (по Г.Н. Никитиной и др., 2012): 1 - нормоциты, 2 - дискоцит-макроцит, 3 и 4 - эхиноциты, 5 - стоматоциты, 6 - сфероциты [9]

В настоящее время мембраны эритроцитов хорошо изучены (рис. 2). Внутриклеточная структура эритроцита представлена преимущественно молекулами гемоглобина (34 %) и другими белками, заключенных в регулярную решетку, которая образована липостроматином в комплексе с молекулами воды. Около 7 % молекул гемоглобина связаны с мембраной [3].

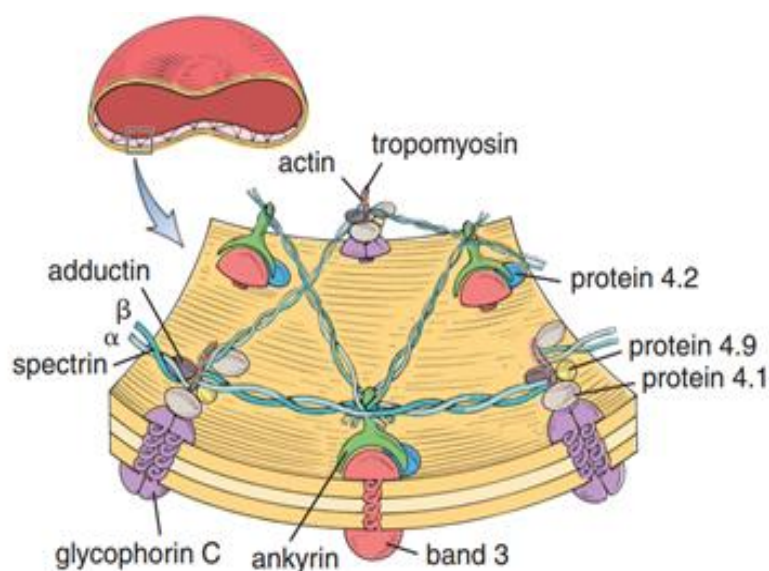


Рис. 2. Мембрана эритроцита

- 1) Периферические белки: спектрин, гликофорин.
- 2) Интегральные белки: анкирин, актин [36]

Структурная организация мембраны позволяет эритроциту претерпевать крупномасштабные, быстрые и обратимые деформации при сохранении его механической целостности в течение всего срока жизни. Уникальные биофизические особенности эритроцитарной мембраны состоят в том, что она сильно эластична и может быстро реагировать на внешние гидравлические сдвиги в кровеносном русле. Эти необычные свойства мембраны являются следствием сложной структуры, в которой оболочка плазматической мембраны, состоящая из молекул липидов, крепится к двумерной эластичной сети белков через сайты привязки (трансмембранные белки), встроенные в липидную матрицу. Прямое взаимодействие белков цитоскелета с анионными фосфолипидами является дополнительным источником связи между мембранным скелетом и липидным бислоем [35].

Эквивалентные количества холестерина и фосфолипидов составляют липидный бислой мембраны эритроцитов. Различные фосфолипиды неравномерно распределены в бислое, а асимметрично. Фосфатидилхолин и сфингомиелин преимущественно локализованы во внешнем монослое липидного бислоя. Большинство фосфатидилэтаноламинов и все

фосфатидилсерины локализованы во внутреннем монослое. Функциональная значимость липидно-белковых взаимодействий была подтверждена повышением механической стабильности мембраны за счет прямого связывания фосфатидилсеринов со спектрином.

Основными белковыми компонентами цитоскелетной сети являются α -спектрин и β -спектрин, актин, белок 4.1, аддуктин, дематин, тропомиозин и тропомодулин. Таким образом, на цитоплазматической мембране эритроцитов образуется гибкая сеть из белков, которая способствует сохранению их формы, особенно при продвижении через узкие капилляры сосудов (рис. 3) [35, 5].

Присутствие гемоглобина объясняет красную окраску эритроцитов свежей крови, а совокупность эритроцитов — алый или вишневый цвет крови. При окрашивании мазка крови по методу Романовского-Гимзе, большинство эритроцитов становятся оксифильными. Это обусловлено высоким содержанием в них гемоглобина [6, 9].

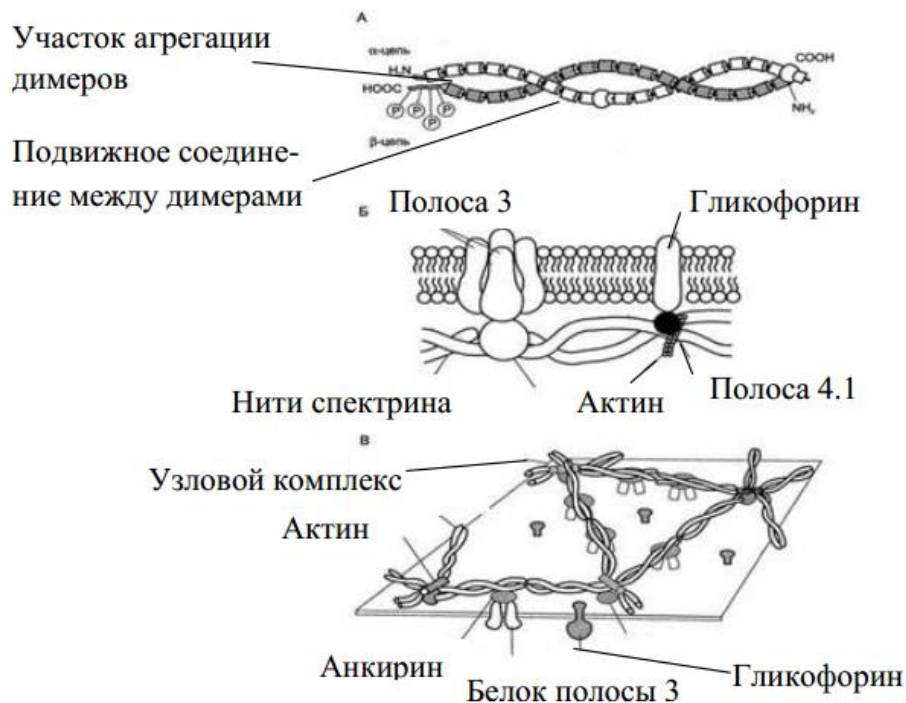


Рис. 3. Строение спектрина (А), околочелювбранного белкового комплекса (Б) и цитоскелета эритроцитов (В) [6]

Эритроцитарные клетки могут подвергаться трансформациям, которые происходят как в норме, так и при патологиях, когда изменяются условия микроокружения. В норме около 3 % эритроцитов могут иметь неправильную форму: в виде эхиноцитов, стоматоцитов, купола, сферически гладкую и т.д. [2]. Изменения типичной двояковогнутой формы эритроцитов может происходить как в зависимости от ее окружения (химическая или физическая обработка), так и в патологических состояниях (болезнь или старение). Химическая обработка включает внедрение амфипатических соединений (например фосфолипидов или лекарств) в бислой, или модификации белкового цитоскелета. Физические методы обработки, такие как инкубация эритроцитов в гипотонических или гипертонических средах и термической обработке могут изменять их форму. Таким образом, морфология эритроцитарных клеток является результатом конкретных физико-химических условий, которые испытала клетка [35].

В самих эритроцитах совершается много ферментативных реакций. В пример можно привести реакции с участием супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы, которые тормозят процесс ПОЛ, разрушают пероксид водорода. Эритроциты могут участвовать в иммунных процессах, так как на мембране имеется Fc-рецептор, распознающий иммуноглобулины класса G (IgG). За счет этого они могут на своей мембране адсорбировать токсины [4].

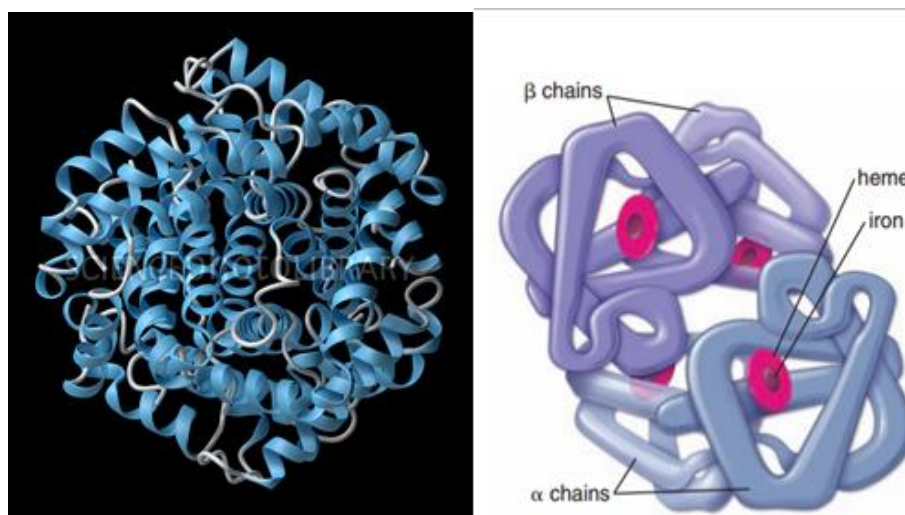


Рис. 4. Молекула гемоглобина 3D [32], [36]

1.2. Оксид азота: биосинтез, физиологическая роль, использование в медицине

Оксид азота — это бесцветный свободнорадикальный газ, малорастворимый в воде, не образующий кислот и солей. Долгое время NO рассматривался как токсичное соединение [10]. Однако, роль оксида азота (II) как сигнальной молекулы в живых организмах была открыта в 1980-х годах, а в 1998 г. Роберт Ферчготт, Луис Игнарро и Ферид Мурад получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине за выяснение его функций в сердечно-сосудистой системе. Монооксид азота является паракринным фактором благодаря своей способности быстро диффундировать через мембраны клеток, однако из-за высокой реакционности, расстояние такой диффузии ограничено 1 мм, а время полужизни молекул NO составляет 5–10 с. [16].

NO-это газообразная молекула, которая может легко диффундировать в окружающую ткань. Монооксид азота состоит из кислорода и азота с двойной ковалентной связью. Атому азота не хватает одного электрона на орбитали sp_2 , превращение NO в высокореактивную молекулу, однако она может оставаться как анион нитрозония (NO^+). Оксид азота является электрически нейтральным, что позволяет ему пересекать биологические мембраны со скоростью диффузии $848 \text{ мкм}^2/\text{с}$ в стенке аорты. Это свойство способствует его функции в качестве вторичного мессенджера. Показано, что NO и O_2 — реагируют с образованием активных форм азота (АФА). АФА способны изменять структуру и функции критических молекул, что дает им возможность участвовать в передаче и регулировать сигналы на разных уровнях организации [26, 10].

В организме человека и животных синтез оксида азота (II) осуществляется путем дезаминирования аминокислоты аргинина и обеспечивается ферментом NO-синтазой (NOS), который у млекопитающих содержит три изоформы: нейрональную (nNOS), индуцибельную (iNOS) и

эндотелиальную (eNOS). nNOS и eNOS экспрессируются и резко увеличивают свою активность в ответ на рост концентрации Ca^{2+} . Зато активация iNOS осуществляется на уровне транскрипции под влиянием эндотоксинов или цитокинов воспаления, в частности в таких клетках как макрофаги и нейтрофилы, и не зависит от цитоплазматического уровня кальция [16].

В теле человека NO генерируется многими клетками: макрофагами и нейтрофилами (иммунная система), тромбоцитами и сосудистым эндотелием (кровеносная система), микроглией и астроцитами (нервная система) [7]. NO производится в основном NOS, но есть и другие альтернативные источники NO, такие как неферментативное окисление L-аргинина и редуктазы, способные превращать нитраты в нитриты, которые в конечном итоге будут производить NO. Генерация нитратов и нитритов также способствует накоплению NO в организме [35]. Было показано, что дискоциты содержат две формы NO-синтаз, которые не будут обладать в нормальных условиях каталитической активностью. Есть предположения, что незрелые эритроциты (эритробласты, ретикулоциты) могли бы выражать свою NO-синтазную активность, теряя ее во время деформации.

Активность отдельных компонентов и цикла азота в целом зависит от многих факторов и, в первую очередь, определяется уровнем содержания кислорода в ближайшем микроокружении и степенью оксигенации крови. В присутствии кислорода более активно проходят NO-синтазные реакции (L-аргинин→NO) (рис. 5). При дефиците кислорода в условиях гипоксии или ишемии начинает преобладать мощная нитритредуктазная компонента, а роль NO-синтазного механизма значительно снижается [7].

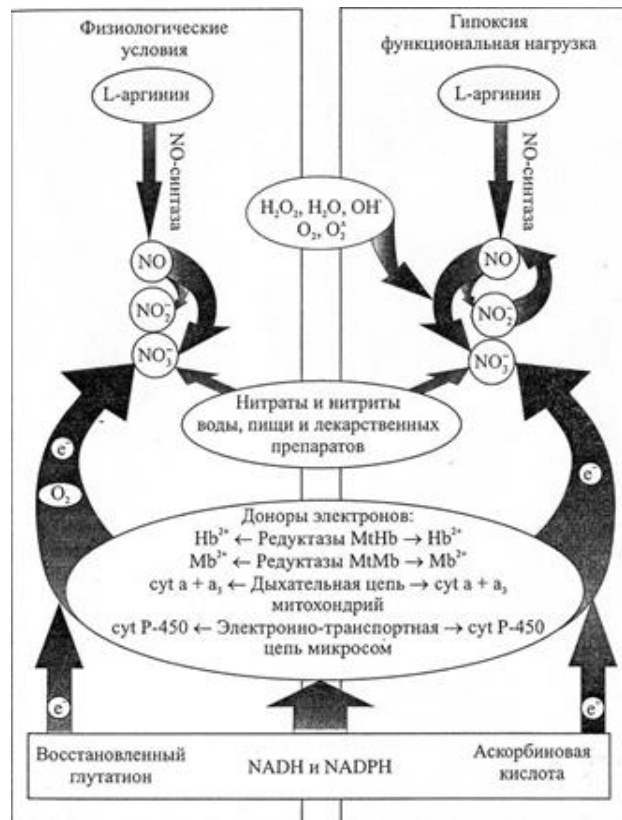
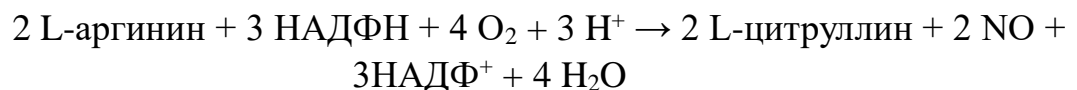


Рис. 5. Цикл NO с NO-синтазными и нитритредуктазными компонентами [19]

В присутствии специфического фермента NO-синтазы идет реакция окисления L-аргинина атомом кислорода, в результате чего образуется монооксид азота:



NO переносится через мембрану эритроцитарных клеток с помощью специального переносчика-протеина АЕ1, или анион-обменника. Внутри клеток NO находится в цитоплазме и не резервируется в гранулах или в синаптических пузырьках. Повышение уровня свободного NO в крови может привести к накоплению его избытка в стенках сосудов.

Длительное образование NO инициирует процесс апоптоза, который может быть вызван токсическим действием избытка оксида азота на клетки. Избыточная генерация NO является основополагающим звеном патогенеза многих патологий, которые сопровождаются острой гипотензией и сниже-

нием реактивности кровеносных сосудов на констрикторные стимулы. Таким образом, роль высокого образования оксида азота доказана в развитии септического, анафилактического, кардиогенного, термического и иных видов шока. В случае острой гипоксии увеличение скорости образования оксида азота реализуется как механизм повреждения некоторых структур головного мозга.

Оксид азота обладает широким спектром биологических эффектов. В настоящее время показано и доказано, что NO :

- выступает как эндогенный вазодилататор, сосудорасширяющие свойства которого обусловлены прямой активацией гуанилатциклазы и накоплением 3'- и 5'-цГМФ, также участвует в регуляции тонуса кровеносных сосудов;
- благодаря 3'- и 5'-цГМФ, который оказывает непосредственное расслабляющее воздействие на клетки гладкой мускулатуры, является универсальным миорелаксатором: NO любого происхождения действует на чрезвычайно широкий спектр мышц;
- тормозит агрегацию тромбоцитов и их адгезию на стенках сосудов;
- регулирует пролиферацию лимфоцитов;
- NO участвует в неспецифической защите организма против бактерий, вирусов, также против раковых клеток, способствуя быстрому протеканию реакций фагоцитоза самостоятельно или совместно с другими свободными радикалами (O_2 , $ONOO^-$, OH^-);
- участвует в антистрессовом эффекте адаптации к повторным стрессовым воздействиям;
- NO участвует в формировании кислородтранспортной функции крови при окислительном стрессе и гипоксии. Оксид азота может определить сродство гемоглобина к кислороду и соответственно процессы оксигенации и деоксигенации в капиллярном сети малого и большого кругов кровообращения, а также других функций крови.

Сыграв большую роль в патогенезе многих заболеваний, NO способствовал разработке фармацевтических препаратов, направленных на нейтрализацию возникающих нарушений. Фундаментом фармакологической регуляции NO в организме служат некоторые его функции, которые были рассмотрены выше. В настоящее время используются 4 группы лекарственных веществ, механизм действия которых связан с NO :

- 1) Нитропрепараты, которые действуют как вазодилататоры через освобождение NO в клетках;
- 2) М-холиноблокаторы, активирующие NO-синтазы, что повышает уровень оксида азота в клетках;
- 3) Препараты, стимулирующие транскрипцию индуцибельной NO-синтазы, усиливающей синтез NO;
- 4) Антагонисты ангиотензивных рецепторов 1-го типа : их активация приводит к угнетению экспрессии индуцибельной NO-синтазы [7].

Вопрос о взаимоотношениях эритроцитов и NO остается открытым и актуальным. Эти аспекты весьма перспективны с точки зрения диагностики и лечения ряда патологий и заболеваний, а также с точки зрения вмешательства в метаболизм оксида азота.

Роль эритроцитов как участников вазорегуляции в исследованиях рассматривается с двух точек зрения. Во-первых, как прямого "освободителя" NO. Во-вторых, как стимулятора высвобождения NO посредством синтеза АТФ эритроцитами. До сих пор продолжаются споры и дискуссии о том, каково физиологическое происхождение вазоактивного NO в условиях гипоксии [15].

1.3. Общая характеристика лекарственного препарата «Кардикет»

Лекарственный препарат «Кардикет»[®] (SCHWARZ PHARMA, Германия) является антиангинальным препаратом, относится к группе органических нитратов. Структурная формула «Кардикета» (изосорбид динитрат) представлена на рис. 6.

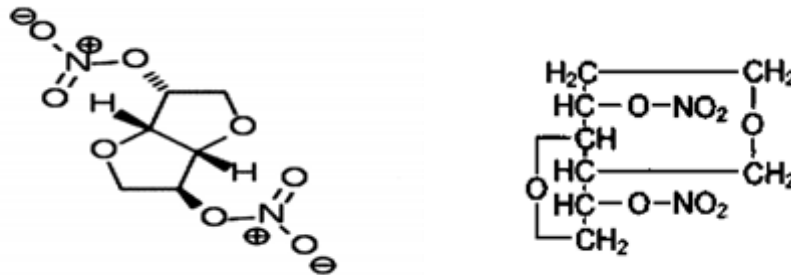


Рис. 6. Структурная формула изосорбид динитрата

Синонимы. Динитросорбилонг (Россия), Изо Мак ретард (Германия), Изодинит (Болгария), Изокет (Германия), Изолонг (Израиль), Изосорбид динитрат (Франция), Кардикет (Германия), Кардонит (Польша), Нитросорбид (Россия).

Форма выпуска. Аэрозоль подъязычный дозированный содержит активного вещества 1,25 мг/доза. Капсулы (20 мг; 40 мг; 120 мг). Таблетки содержат 5 мг; 10 мг; 20 мг; 60 мг или 80 мг активного вещества.

«Кардикет» является периферическим вазодилататором, мощным венодилататором и расширителем артерий. Это снижает системное артериальное давление в зависимости от дозы и уменьшает венозный возврат и, следовательно, давление наполнения желудочков и сердечной нагрузки. Как и все другие нитраты, Кардикет расширяет коронарные артерии и устраняет их спазм. При длительной терапии может наблюдаться ослабление гипотензивного и сосудорасширяющего эффектов. Механизм действия «Кардикета» как органического нитрата представлен на рис. 7.

Кардикет[®] пролонгированного действия характеризуется сочетанием быстрого наступления эффекта с продолжительным действием. Преимущества препарата определяются тем, что активное вещество,

содержащееся в таблетке Кардикета пролонгированного действия, быстро поступает в кровоток. В результате этого препарат обеспечивает быстрое начало эффекта при лечении стенокардии и надолго сохраняет свое защитное действие. Начало действия препарата — через 15-30 мин после приема [1].



Рис. 7. Механизм действия нитратов [20]

Фармакокинетика. Абсорбция всех лекарственных форм высокая. Биодоступность при приеме внутрь составляет 20 % (эффект «первого прохождения» через печень), при сублингвальном применении — 60 %. C_{\max} при пероральном приеме достигается через 1 ч. Связь с белками плазмы — 30 %. $T_{1/2}$ при внутривенном введении составляет 20 мин, при сублингвальном применении — 60 мин, при пероральном приеме — 4 ч. Метаболизируется в печени с образованием нескольких метаболитов, два из которых фармакологически активны: изосорбида-5-мононитрат (75—85 %) с $T_{1/2} \approx 5$ ч и изосорбида-2-мононитрат (15—25 %) с $T_{1/2} \approx 2,5$ ч. Выводится почками почти полностью в виде метаболитов.

Показания к применению:

- 1) стенокардия (купирование и профилактика, в т.ч. нестабильная стенокардия);
- 2) острый инфаркт миокарда (в т.ч. осложненный острой левожелудочковой недостаточностью), состояние после инфаркта миокарда;

- 3) спазм коронарных артерий (профилактика и лечение при использовании сердечного катетера);
- 4) сердечная недостаточность;
- 5) отек легких (кардиогенный);
- 6) легочная гипертензия, легочное сердце (в составе комбинированной терапии);
- 7) спазм периферических артерий (облитерирующий эндартериит, ангиоспастический ретинит) [23].

Режим дозирования. Таблетки пролонгированного действия 40 мг в начале лечения назначают по 1 таб. 1 раз/сут или по 1/2 таб. 2 раза/сут. При недостаточном терапевтическом эффекте дозу можно увеличить до 1 таб. 2 раза/сут. Для поддержания терапевтического эффекта при дозе 1 таб. 2 раза/сут, вторую таблетку следует принимать не позднее чем через 8 ч после первой. Длительность лечения определяет врач. Пациент должен быть предупрежден о том, что препарат предназначен для длительного применения и самостоятельно резко прекращать его прием нельзя. Таблетки принимают внутрь независимо от приема пищи, не разжевывая и запивая небольшим количеством жидкости.

Побочное действие. При применении Кардикета могут наблюдаться нежелательные эффекты. Расстройства нервной системы: головная боль, головокружение, сонливость. Со стороны сердца: тахикардия, обострение стенокардии. Сосудистые нарушения: ортостатическая гипотензия, коллапс (иногда сопровождается брадиаритмией и обмороком). Желудочно-кишечные расстройства: тошнота, рвота, изжога. Заболевания кожи и подкожной клетчатки: аллергические кожные реакции (например, сыпь), покраснение, ангионевротический отек, синдром Стивенса-Джонсона, в единичных случаях: эксфолиативный дерматит.

Сообщалось о тяжелых гипотензивных реакциях на органические нитраты, включая тошноту, рвоту, беспокойство, бледность и чрезмерное потоотделение.

Во время лечения Кардикетом может возникнуть временная гипоксемия вследствие относительного перераспределения кровотока в гиповентилярованных альвеолярных областях. Особенно у пациентов с ИБС это может привести к гипоксии миокарда. Кардикет следует применять с осторожностью пациентам с тяжелыми нарушениями функций почек или печени [1, 23].

1.4. Влияние УФ-излучения на структуру и функциональные характеристики мембран эритроцитов

Электромагнитное излучение, занимающее спектральную область между фиолетовой границей видимого света (400 нм) и длинноволновой частью рентгеновского излучения (10 нм), называют ультрафиолетовым (УФ) [24].

Это известный факт, что почти все живые организмы подвергаются некоторому количеству облучения. УФ-облучение может быть не только полезным, но и иметь вредные последствия. Опираясь на определение УФ-излучения, его делят на 4 участка:

- 1) 315÷400 нм — длинноволновое УФ-излучение (ДУФ)
- 2) 280÷315 нм — средневолновое УФ-излучение (СУФ)
- 3) 200÷280 нм — коротковолновое УФ-излучение (КУФ)
- 4) ≤ 200 нм — вакуумный ультрафиолет [30,5].

ДУФ-излучение приводит к светло-коричневому загару за короткое время, последующее затемнение происходит за счет меланина, который накапливается в коже. СУФ-излучение приводит к серьезным солнечным ожогам, связанным с усиленной эритемой и отеком, болью и образованием волдырей менее, чем за один день. Из-за использования КУФ-излучения в устранении микроорганизмов, оно известно как бактерицидное или стерилизационное [30].

Все тела, а также и слои воздуха, сильно поглощают УФ-излучение в области длин волн меньше 200 нм. Белками и нуклеиновыми кислотами ДУФ-излучение почти не поглощается. Это связано с тем, что инициация деструктивных реакций в вышеупомянутых биополимерах, при действии такого вида оптического излучения происходит с участием другой молекулы. Эти молекулы выступают первичными фоторецепторами и называются фотосенсибилизаторами, а процессы — фотосенсибилизированными. При облучении КУФ-излучением в белках и нуклеиновых кислотах протекают реакции фотоионизации, фотодиссоциации и фотоприсоединения [24, 25].

Клетки всех живых организмов содержат вещества, чьи молекулы способны поглощать кванты излучения и, таким образом, участвовать в фотохимических реакциях, которые в итоге меняют их строение и функции. УФ-облучение крови является достаточно сложным и многообразным процессом. Поэтому в настоящее время нет единой теории о влиянии УФИ на организм человека [13].

Кабат И. А. (1976) доказал, что УФ-облучение может влиять на осмотические свойства эритроцитов, субмикроскопическую структуру и метаболизм адениновых нуклеотидов. Во время облучения АТФ уменьшался, а количество АДФ и адениновых соединений увеличивалось. УФ также увеличивал гипотонический ионный обмен Na^+ и K^+ и увеличивал значение гематокрита. С помощью двухфазной полимерной системы, содержащей поли-декстран, было показано, что клеточная поверхность циркулирующих эритроцитов уменьшается после УФ-облучения. Это способствовало продлению выживаемости перелитых эритроцитов и предложено для объяснения более эффективной терапевтической активности аутотрансфузированной крови. Снопов С.А. и др. (1989) предположили, что некоторые структурные изменения в эритроцитах, в частности в гликокаликсе, связаны с улучшением эффекта аутотрансплантации крови

после УФ-облучения. Ichiki H. et al. (1994) показали, что объем клеток и мембранный потенциал эритроцитов могут изменяться при УФ-облучении.

Ультрафиолетовое излучение (УФИ) всегда вызывало много путаницы, как у широкой общественности, так и у некоторых медицинских специалистов и биологов, потому что бактерицидный УФ-свет (КУФ-излучение) используется для стерилизации воды, дезинфекции поверхностей и в качестве помощи в борьбе с инфекциями в операционных. Поэтому многие люди предполагают, что УФ-свет должен действовать, убивая патогены (бактерии, вирусы или другие микроорганизмы), циркулирующие в кровотоке организма. Однако нет никаких доказательств того, что это действительно так. Поэтому механизмы действия должны заключаться в каком-то другом действии ультрафиолета на различные компоненты крови. Хотя вся совокупность доказательств о механизмах действия УФИ весьма сложна, как видно из приведенного выше материала, можно попытаться сделать некоторые общие выводы. Во-первых, УФИ яркий пример известного явления “гормесис” или “двухфазной реакцией дозы”. Это явление было хорошо рассмотрено Эдвардом Калабресе из Массачусетского университета в Амхерсте. Основная концепция гласит, что любое токсичное химическое вещество, лекарственное средство или любое физическое воздействие (такое как ионизирующее излучение, гипертермия или окислительный стресс) может быть полезным, защитным или даже терапевтическим, при условии, что доза достаточно низка. Если доза увеличена, то полезные или защитные влияния исчезают, и если доза более добавочно увеличена, то вредные влияния обработки будут очень очевидными. Это наглядно показали оригинальные эксперименты Нотта на собаках, которые привели к установлению только 5-7% от общего объема крови в качестве оптимального количества облучаемой крови [28].

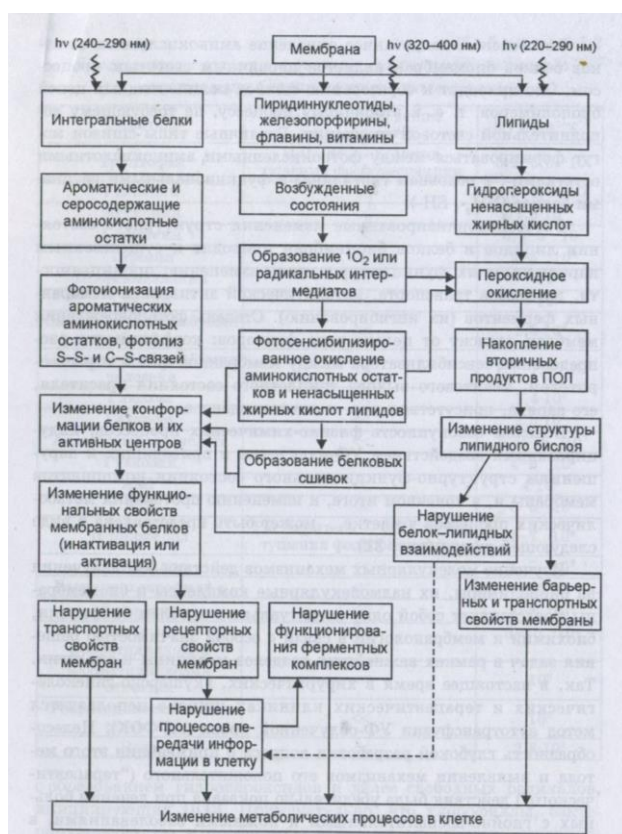


Рис. 8. Схема физико-химических процессов, индуцированных воздействием УФ-излучения и приводящих к нарушениям структурно-функционального состояния компонентов мембран [2]

Необходимо отметить, что фоточувствительность мембраносвязанных белков может существенно отличаться от таковой для этого же биополимера в растворе. Это обусловлено особенностями микроокружения белковых молекул в мембране, их взаимодействием с другими компонентами надмолекулярного комплекса.

Таким образом, уровень фоточувствительности мембранных белков-ферментов эффективно контролируется структурным состоянием их микроокружения [2].

ГЛАВА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Цель и задачи работы

Целью данной работы являлось исследование цитоархитектоники эритроцитов крови доноров, модифицированных лекарственным препаратом «Кардикет» в течение разного временного периода и облученных УФ-светом (254 нм) в дозах 750 и 2270 Дж/м².

Для достижения поставленной цели предполагалось решить следующие задачи:

Для достижения поставленной цели предполагалось решить следующие задачи:

- 1) Подобрать и изучить литературу по теме исследования.
- 2) Освоить метод сканирующей электронной микроскопии.
- 3) Освоить методики подготовки биологических образцов к электронному микроскопированию.
- 4) Исследовать цитоархитектонику нативных эритроцитов до и после инкубации при 37 °С в течение 1 и 24 ч
- 5) Исследовать поверхностную цитоархитектонику суспензий эритроцитов доноров, модифицированных воздействием лекарственного препарата «Кардикет» (0,4 мг/мл) в течение 1 и 24 ч.
- 6) Исследовать поверхностную цитоархитектонику эритроцитов человека, модифицированных воздействием монохроматического УФ-света (254 нм) в дозах 750 Дж/м² и 2270 Дж/м².
- 7) Изучить комплексное воздействие на цитоархитектонику эритроцитов доноров лекарственного препарата «Кардикет» и УФ-света (254 нм) в дозах 750 и 2270 Дж/м².

2.2 Объекты и методы исследования

2.2.1. Объект исследования

В качестве объекта исследования использовали суспензии эритроцитов в 0,01 моль/л Na-фосфатном буфере (pH 7,4), полученные из крови доноров в день взятия пробы.

2.2.2. Получение суспензии эритроцитов

Для получения суспензий эритроцитов венозную кровь доноров (1 мл) разводили 9 мл 0,9 % раствором NaCl, центрифугировали 10 минут при 2000 об/мин на центрифуге MPW-340. Желтоватый супернатант (т.е. богатая тромбоцитами плазма) и белое кольцо лейкоцитов удаляли пипеткой Пастера, а эритроциты повторно суспензировали и промывали три раза. Полученные суспензии эритроцитарных клеток доводили до величины оптической плотности (D), равной 0,8 при $\lambda = 495$ нм с помощью раствора 0,01 моль/л Na-фосфатного буфера (pH 7,4), и затем использовали в дальнейших экспериментах [3]. Концентрация клеток в суспензиях составляла $1 \cdot 10^6$ кл/мл.

2.2.3. Инкубация эритроцитов с модификатором «Кардикет»

Суспензию эритроцитов человека предварительно инкубировали в течение 1 и 24 ч с раствором лекарственного препарата «Кардикет»[®] (SCHWARZ PHARMA, Германия) (0,4 мг/мл), в соотношении 1:1, в стерильных условиях при температуре 37 °С в суховоздушном термостате ТС-1/80 СПУ (Россия).

2.2.4. Облучение нативных и модифицированных лекарственным препаратом «Кардикет» суспензий эритроцитов

Суспензии нативных и модифицированных эритроцитов в объеме 2 мл облучали УФ-светом при помощи облучателя BIO-link-BLX 254 нм (Vilber Lourmaet, Франция) в дозах 750 и 2270 Дж/м².

2.2.5. Метод сканирующей электронной микроскопии

Методом сканирующей электронной микроскопии была исследована поверхностная цитоархитектоника нативных и модифицированных лекарственным препаратом «Кардикет» эритроцитов донорской крови. Контрольные и опытные образцы, содержавшие 10⁶ кл/мл эритроцитарных клеток, фиксировали в объеме 1 мл 2,5 % раствором глутарового альдегида (Sigma, США), в течение 1 ч. После образцы промывали 0,01 моль/л Na-фосфатным буфером (pH 7,4) не менее трех раз после фиксации, в течение 1 мин. Обезвоживание образцов проводили батареей спиртов на центрифуге Mini Spin, при 800 об/мин, следующим образом : 50 % этанол — 5 мин., 70 % этанол — 5 мин., 90 % этанол — 5 мин., 95 % этанол — 5 мин. Приготовленные суспензии эритроцитов наносили на керамические подложки и высушивали в термостате при 37 °С. Препараты напыляли золотом и просматривали на сканирующем электронном микроскопе JEOL (Japan Electron Optics Laboratory) JSM – 6380 LV (Япония) при ускоряющем напряжении 20 кВ в лаборатории ЦКПНО ВГУ.

Структурные характеристики мембран эритроцитов оценивали в соответствии с классификацией Г.И. Козинец и др. [14]. Подсчет производили согласно этой классификации, выделяя при этом следующие формы клеток (рис. 9): дискоцит, дискоцит с одним выростом, с гребнем, с множественными выростами, эритроциты в виде «тутовой ягоды»,

куполообразные (стоматоциты), сферические, сфероциты с шипиками на поверхности (эхиноциты), в виде «спущенного мяча», а также дегенеративно измененные формы эритроцитов. Первые пять классов эритроцитов считаются обратимо деформированными, поскольку они способны восстанавливать форму. Другие пять классов относятся к группе необратимо деформированных или предгемолитических.

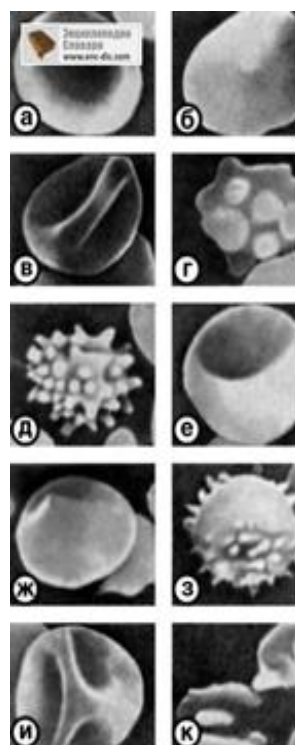


Рис. 9. Различные формы эритроцитов, выявляемые при сканирующей электронной микроскопии [14]: а - дискоцит, б - дискоцит с одним выростом; в - дискоцит с гребнем; г - дискоцит с множественными выростами; д - эритроцит в виде тутовой ягоды; е - куполообразный эритроцит; ж - сферический эритроцит (гладкий); з - сферический эритроцит с выростами; и - эритроцит в виде спущенного мяча; к - дистрофически измененные эритроциты

Для детального анализа характера изменения поверхностной архитектоники эритроцитов рассчитывали ряд показателей:

- 1) Д – количество дискоцитов в процентах;
- 2) ОД – количество обратимо деформированных эритроцитов, в процентах;

3) НД – количество необратимо деформированных эритроцитов, в процентах;

4) ИТ – индекс трансформации, представляющий собой количественную оценку соотношения патологических и нормальных форм эритроцитов: $ИТ = (ОД + НД) / Д$;

5) ИОТ – индекс обратимой трансформации: $ОД / Д$;

6) ИНОТ – индекс необратимой трансформации: $ИНОТ = НД / Д$.

2.2.6. Статистическая обработка результатов

Опыты проводили в 5-7-кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в четырех повторностях. Результаты опытов сравнивали с контролем. Статистическую обработку результатов экспериментов реализовывали с помощью пакета прикладных статистических программ «Stadia 6.0 (Professional)». Достоверность различий контрольных и опытных значений сравниваемых показателей, подчиняющихся нормальному распределению, определяли по t-критерию Стьюдента при 5% уровне значимости [12].

2.3. Результаты экспериментов и их обсуждение

2.3.1. Исследование цитоархитектоники нативных эритроцитов крови доноров

Нами была исследована цитоархитектоника нативных эритроцитов крови доноров. Результаты проведенных экспериментов представлены в таблице 1 и на рис. 10. В нативном образце содержалось $93,6 \pm 4,7$ % дискоцитов; $4,4 \pm 0,22$ % обратимо деформированных клеток (дискоциты с одним выростом, с гребнем, с множественными выростами, эритроциты в виде тутовой ягоды) и $2,0 \pm 0,01$ % необратимо деформированных эритроцитов (куполообразные эритроциты, сфероциты с гладкой поверхностью, с шипиками на поверхности, эритроциты в виде «спущенного» мяча, дегенеративные формы эритроцитов). Индексы трансформации имели следующие показатели: ИТ равен $0,07 \pm 0,04$; ИОТ — $0,05 \pm 0,0025$; ИНОТ — $0,02 \pm 0,001$. Данные показатели соответствуют морфологической картине красных клеток крови здорового человека [14].

Таблица 1

Показатели цитоархитектоники нативных эритроцитов крови доноров

Показатели	Количество эритроцитов	Инкубация 1ч	Инкубация 24ч
Д, %	$93,6 \pm 4,7$	$89,8 \pm 0,91$	$70,4 \pm 0,98^*$
ОД, %	$4,4 \pm 0,22$	$6,8 \pm 0,34$	$18,5 \pm 0,9^*$
НД, %	$2,0 \pm 0,01$	$3,1 \pm 0,15$	$10,2 \pm 0,51^*$
ИТ	$0,07 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,0048$	$0,40 \pm 0,017^*$
ИОТ	$0,05 \pm 0,0025$	$0,076 \pm 0,0038$	$0,26 \pm 0,013^*$
ИНОТ	$0,02 \pm 0,001$	$0,035 \pm 0,0017$	$0,14 \pm 0,006^*$

* Отличия от нативных эритроцитов статистически достоверны ($P < 0,05$).

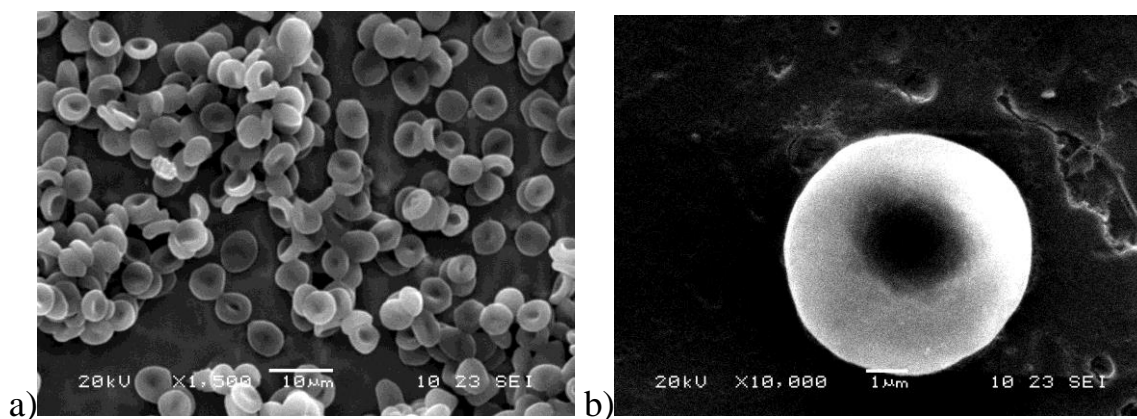


Рис. 10. Электронные микрофотографии эритроцитов контрольного образца: а) при увеличении $\times 1500$; б) при увеличении $\times 10000$

Анализ результатов, представленных в табл. 1 и на рис.11 показывают, что уровень дискоцитов понизился после 1 ч инкубации при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $89,8\pm 0,91\%$, но при этом возросло количество обратимо деформированных клеток ($6,8\pm 0,34\%$) и необратимо деформированных клеток ($3,1\pm 0,15\%$). Соответственно количествам ОД и НД форм, повысились ИТ— до $0,11\pm 0,0048$, ИОТ— до $0,075\pm 0,0038$, ИНОТ— до $0,034\pm 0,0015$. После хранения эритроцитов при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 24ч количество дискоцитов сократилось до $70,4\%$, число обратимо деформированных форм увеличилось до $18,5\%$, а число необратимо деформированных форм составило $10,2\%$. ИТ был равен $0,40\pm 0,017$, ИОТ составил $0,26\pm 0,013$, ИНОТ повысился до $0,14\pm 0,006$.

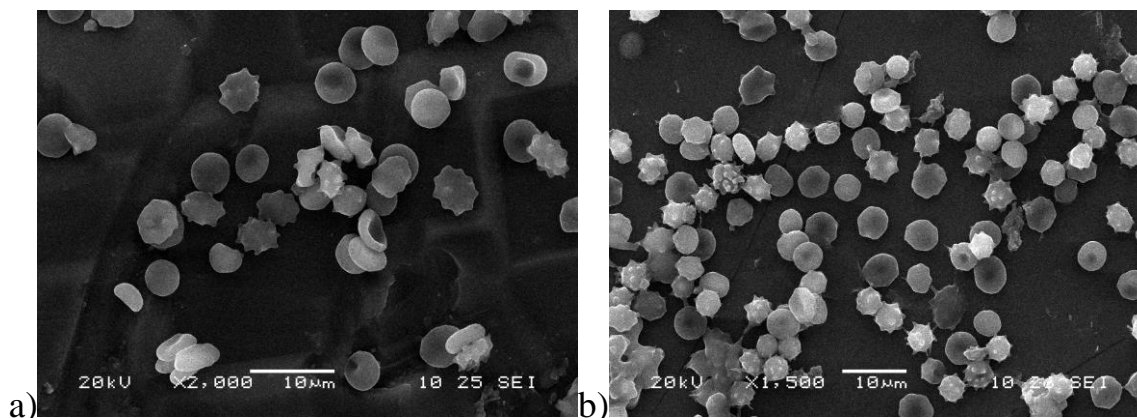


Рис. 11. Электронные микрофотографии эритроцитов контрольного образца после инкубации при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 ч (а) при увеличении $\times 2000$ и 24 ч (б) при увеличении $\times 1500$

Проведенные ранее исследования на кафедре биофизики и биотехнологии ВГУ показали, что после 24-часового хранения эритроцитарных клеток наблюдается окисление гемового железа оксигемоглобина эритроцитов. Процесс перехода основной части белка в метформу сопровождается нарушением целостности мембран эритроцитов и выходом гембелка во внеклеточное пространство [11].

2.3.2. Исследование цитоархитектоники эритроцитов доноров, модифицированных воздействием лекарственного препарата «Кардикет» в течение разного временного периода

Нами была исследована цитоархитектоника эритроцитов человека после модификации изосорбид динитратом (0,4 мг/мл) в течение 1 и 24 ч (табл. 2, рис. 12). После модификации суспензии эритроцитов человека лекарственным препаратом «Кардикет» в течение 1 ч наблюдалось снижение количества двояковогнутых дискоцитов до $86,2 \pm 0,98$ %, повышение количества обратимо деформированных до $12,0 \pm 0,30$ % и необратимо деформированных эритроцитов до $2,8 \pm 0,66$ %, значений ИТ – до 0,17, ИОТ – до 0,13 и ИНОТ – до 0,03.

24х-часовое воздействие изосорбид динитрата на суспензию эритроцитов человека привело к снижению количества двояковогнутых дискоцитов до $38,2 \pm 0,68$ %, повышению количества обратимо деформированных до $44,2 \pm 0,8$ % и необратимо деформированных эритроцитов до $17,6 \pm 0,4$ %; значений ИТ – до 0,66 ИОТ – до 0,47 и ИНОТ – до 0,18.

Цитоархитектоника эритроцитов крови доноров,
модифицированных лекарственным препаратом «Кардикет» в течение
разного временного периода

Показатели	Контрольные образцы эритроцитов	Эритроциты + Кардикет (1 ч инкубации)	Эритроциты + Кардикет (24 ч инкубации)
Д, %	$93,6 \pm 4,7$	$86,2 \pm 0,98$	$38,2 \pm 0,68^*$
ОД, %	$4,4 \pm 0,22$	$12,0 \pm 0,30^*$	$44,2 \pm 0,8^*$
НД, %	$2,0 \pm 0,01$	$2,8 \pm 0,14^*$	$17,6 \pm 0,4^*$
ИТ	$0,07 \pm 0,04$	$0,17 \pm 0,003^*$	$0,66 \pm 0,002^*$
ИОТ	$0,05 \pm 0,0025$	$0,13 \pm 0,01^*$	$0,47 \pm 0,003^*$
ИНОТ	$0,02 \pm 0,001$	$0,03 \pm 0,001^*$	$0,18 \pm 0,02^*$

* Отличия от нативных эритроцитов статистически достоверны ($P < 0,05$).

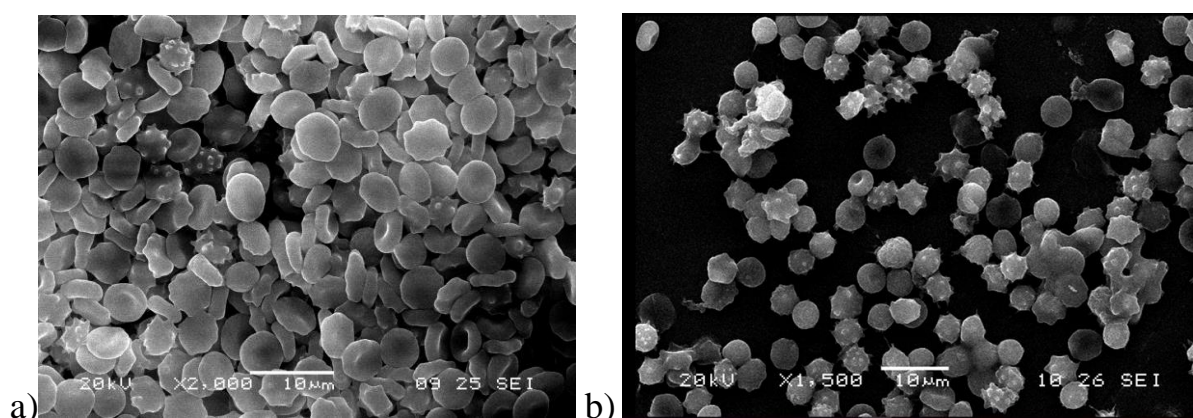


Рис. 12. Электронные микрофотографии эритроцитов после модификации суспензии эритроцитов человека препаратом «Кардикет» в течение 1 часа (а) при увеличении $\times 2000$ и 24 часов (б) при увеличении $\times 1500$

Проведенные исследования показали, что более длительный контакт эритроцитов с лекарственным препаратом «Кардикет» способствует наиболее выраженным изменениям анализируемых показателей.

2.3.3. Исследование цитоархитектоники эритроцитов доноров, модифицированных воздействием монохроматического УФ-света (254нм)

Нами была исследована цитоархитектоника эритроцитов крови доноров после воздействия на их суспензии УФ-света (254 нм) в дозах 750 и 2270 Дж/м² (табл. 3, рис. 13).

Анализ морфологических показателей эритроцитов после воздействия УФ-света в дозе 750 Дж/м² выявил снижение количества двояковогнутых дискоцитов до $70,0 \pm 3,2$ % , увеличение числа обратимо деформированных эритроцитов до $12,86 \pm 0,64$ % и повышение содержания необратимо деформированных эритроцитов до $17,1 \pm 0,8$ % относительно контроля. Величины ИТ, ИОТ и ИНОТ повысились до 0,42; 0,18 и 0,24 соответственно.

После воздействия УФ-света в дозе 2270 Дж/м² было отмечено снижение дискоцитов до $58 \pm 1,29$ %, увеличение числа ОД до $13,57 \pm 0,55$ % и повышение НД до $27,86 \pm 1,34$ % относительно контроля. Значения ИТ, ИОТ, ИНОТ повышаются до 0,71, 0,23 и 0,48 соответственно.

Таблица 3

Цитоархитектоника эритроцитов крови доноров, облученных УФ-светом (254 нм) в дозах 750 и 2270 Дж/м²

Показатели	Контрольные образцы эритроцитов	Эритроциты + 750 Дж/м ²	Эритроциты + 2270 Дж/м ²
Д, %	$93,6 \pm 4,7$	$70,0 \pm 3,2^*$	$58,0 \pm 1,29^*$
ОД, %	$4,4 \pm 0,22$	$12,86 \pm 0,64^*$	$13,57 \pm 0,55^*$
НД, %	$2,0 \pm 0,01$	$17,1 \pm 0,8^*$	$27,86 \pm 1,34^*$
ИТ	$0,07 \pm 0,04$	$0,42 \pm 0,012^*$	$0,71 \pm 0,016^*$
ИОТ	$0,05 \pm 0,0025$	$0,18 \pm 0,007^*$	$0,23 \pm 0,007^*$
ИНОТ	$0,02 \pm 0,001$	$0,24 \pm 0,009^*$	$0,48 \pm 0,011^*$

* Отличия от нативных эритроцитов статистически достоверны (P < 0,05)

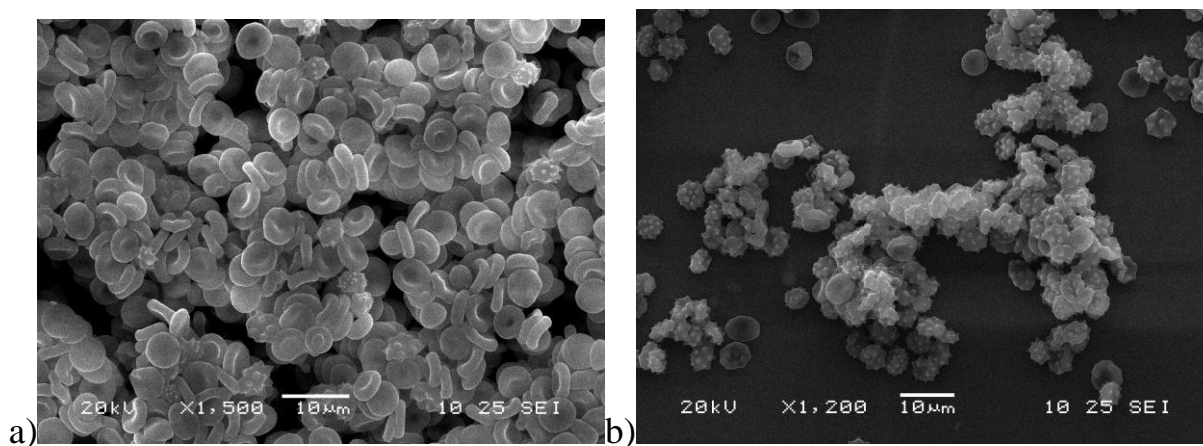


Рис. 13. Электронные микрофотографии эритроцитов после воздействия УФ-света 254 нм при дозах 750 Дж/м² при увеличении x1500 (a) и 2270 Дж/м² при увеличении x1200(b)

Повышение ОД и НД форм свидетельствует о фотодеструкции мембран эритроцитов, которая особенно выражена при большой дозе УФ-света.

Биофизическое обоснование деформации мембран эритроцитов заключается в том, что УФ-излучение, также как и ионизирующая радиация [31], вызывает образование АФК и усиление окислительных процессов как в самих мембранах эритроцитов, так и в молекуле гемоглобина [32].

2.3.4. Исследование цитоархитектоники эритроцитов крови доноров после комплексного воздействия препаратом «Кардикет» и УФ-света (254 нм)

Нами была изучена цитоархитектоника эритроцитов крови доноров после сочетанного воздействия препарата «Кардикет» (в течение 1 и 24 ч) и УФ-света (254 нм) в дозах 750 и 2270 Дж/м². Результаты проведенных экспериментов представлены в таблицах 4 и 5, а также на рис. 14, 15.

Таблица 4

Цитоархитектоника эритроцитов крови доноров после комплексного воздействия препарата «Кардикет» и УФ-света (254 нм) в дозе 750 Дж/м²

Показатели	Контрольные образцы эритроцитов	Эритроциты + Кардикет (1ч) + 750 Дж/м ²	Эритроциты + Кардикет (24ч) + 750 Дж/м ²
Д, %	93,6 ± 4,7	65,1 ± 2,7*	50,0 ± 2,43*
ОД, %	4,4 ± 0,22	18,2 ± 0,88*	24,5 ± 1,12*
НД, %	2,0 ± 0,01	16,7 ± 0,75*	21,5 ± 1,08*
ИТ	0,07 ± 0,04	0,53 ± 0,023*	0,92 ± 0,04*
ИОТ	0,05±0,0025	0,27 ± 0,012*	0,49 ± 0,02*
ИНОТ	0,02 ± 0,001	0,25 ± 0,009*	0,43 ± 0,01*

* Отличия от нативных эритроцитов статистически достоверны (P < 0,05).

Облучение УФ-светом с длиной волны 254 нм в дозе 750 Дж/м² суспензии эритроцитов, предварительно модифицированных изосорбид динитратом (0,4 мг/мл) в течение 1 ч (рис. 15 а), способствовало снижению количества нормоцитов до 65,1±2,7 %, увеличению количества обратимо деформированных форм до 18,2±0,88 % и повышению необратимо деформированных клеток до 16,7± 0,75%. Значения ИТ повысились до 0,53; ИОТ – до 0,27; ИНОТ – до 0,25.

Анализ морфологических показателей после облучения суспензии эритроцитов, предварительно модифицированных лекарственным

препаратом «Кардикет» (0,4 мг/мл) в течение 24 ч, УФ-светом с $\lambda=254$ нм в дозе 750 Дж/м^2 (рис. 15 б), показал снижение количества дискоцитов до $50,0 \pm 2,43$ %, при одновременном увеличении обратимо и необратимо деформированных клеток до $24,5 \pm 1,12$ % и до $21,5 \pm 1,08$ % относительно интактных образцов. ИТ повысился до 0,92; ИОТ – до 0,49; ИНОТ – до 0,43.

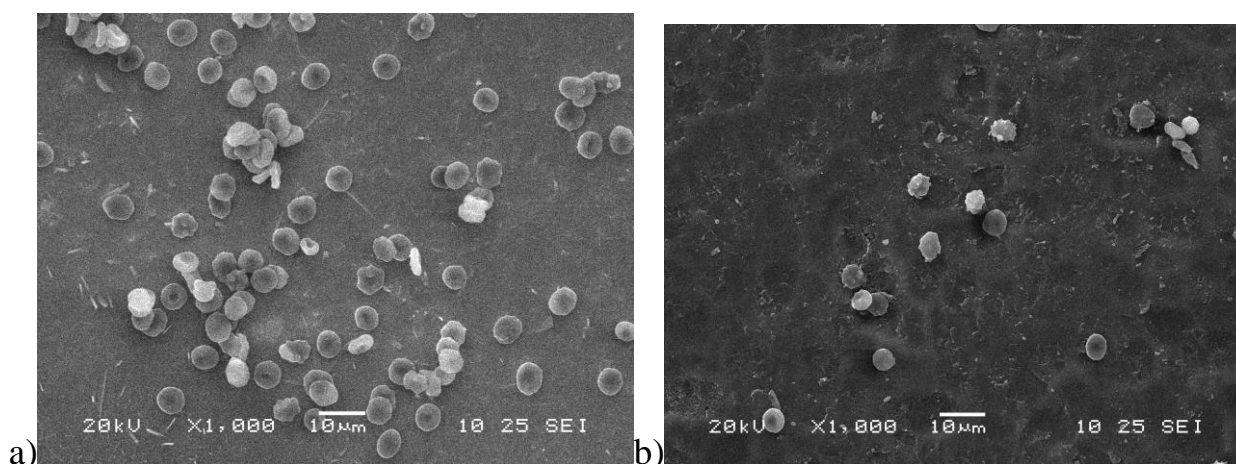


Рис. 14. Электронные микрофотографии эритроцитов после комплексной модификации препаратом «Кардикет» в течение 1 ч (а) и 24ч (б), и УФ-светом (254 нм) в дозе 750 Дж/м^2 при увеличении $\times 1000$

Таблица 5

Цитоархитектоника эритроцитов крови доноров после комплексного воздействия препарата «Кардикет» и УФ-света (254 нм) в дозе 2270 Дж/м^2

Показатели	Контрольные образцы эритроцитов	Эритроциты + Кардикет (1ч) + 2270 Дж/м^2	Эритроциты + Кардикет (24ч) + 2270 Дж/м^2
Д, %	$93,6 \pm 4,7$	$42,7 \pm 0,75^*$	$39,2 \pm 1,6^*$
ОД, %	$4,4 \pm 0,22$	$29,7 \pm 0,95^*$	$35,1 \pm 1,2^*$
НД, %	$2,0 \pm 0,01$	$27,6 \pm 0,78^*$	$24,1 \pm 1,06^*$
ИТ	$0,07 \pm 0,04$	$1,34 \pm 0,06^*$	$1,5 \pm 0,07^*$
ИОТ	$0,05 \pm 0,0025$	$0,69 \pm 0,03^*$	$0,89 \pm 0,04^*$
ИНОТ	$0,02 \pm 0,001$	$0,64 \pm 0,02^*$	$0,61 \pm 0,02^*$

* Отличия от нативных эритроцитов статистически достоверны ($P < 0,05$).

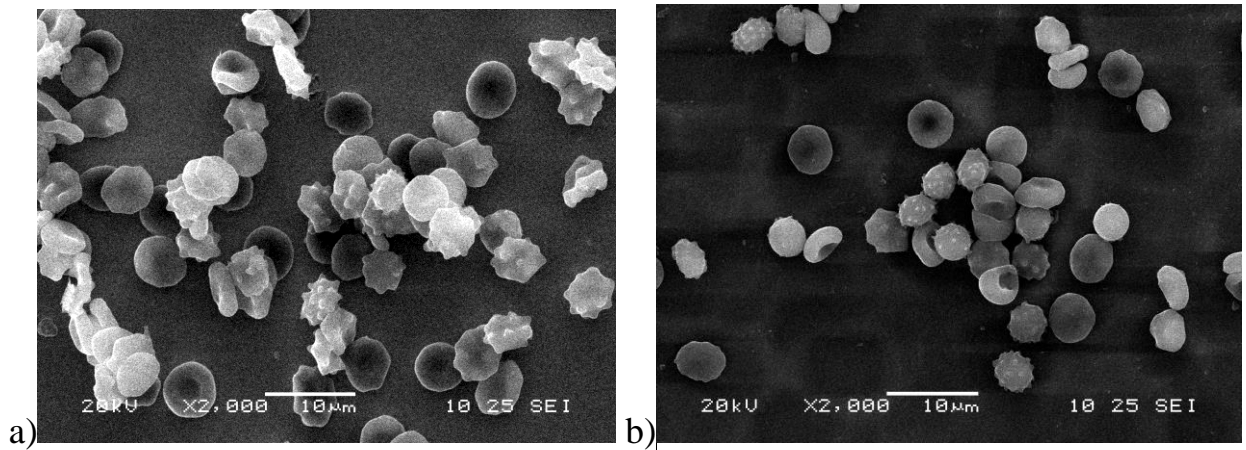


Рис. 15. Электронные микрофотографии эритроцитов после комплексной модификации препаратом «Кардикет» в течение 1 ч (а) и 24ч (б), и УФ-светом (254 нм) в дозе 2270 Дж/м² при увеличении x2000

После модификации изосорбид динитратом в течение 1 ч и облучения УФ-светом в дозе 2270 Дж/м² отмечается более значительное снижение количества дискоцитов до $42,7 \pm 0,75$ % и возрастание показателей ОД и НД до $29,7 \pm 0,95$ % и $27,6 \pm 0,78$ %. Величины ИТ, ИОТ и ИНОТ составляют 1,34; 0,69; 0,64. После 24-часовой инкубации в присутствии «Кардикета» и последующего УФ-облучения (2270 Дж/м²) наблюдается уменьшение количества нормоцитов до $39,2 \pm 1,6$ %, возрастание ОД и НД до $35,1 \pm 1,2$ % и до $24,1 \pm 1,06$ %. Показатели ИТ, ИОТ, ИНОТ повысились до величин $1,5 \pm 0,07$, $0,89 \pm 0,04$, $0,61 \pm 0,02$.

Таким образом, наиболее выраженные изменения формы эритроцитов наблюдаются после длительного контакта с нитратным препаратом (24 ч) и последующего воздействия УФ-света (254 нм) в большой дозе (2270 Дж/м²). Увеличение количества ОД и НД форм клеток указывает на протекание фотохимических реакций, изменяющих строение и функции эритроцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изменения формы эритроцитов и их размеров влечет за собой дефицит поставки кислорода к органам и тканям, а также накоплением в эритроцитарных клетках метгемоглобина. Поэтому становятся актуальными исследования цитоархитектоники эритроцитов для своевременного корректирующего вмешательства. Актуальной становится задача изучения и оценки влияния нитратных лекарственных препаратов на клетки крови. Одним из них является периферический вазодилататор «Кардикет». Среди методов лечения ИБС наряду с фармакологическими препаратами, все большее значение приобретает АУФОК-терапия. Она позволяет купировать гипоксические состояния, нормализовать реологические свойства крови, усиливать ее оксигенацию.

Для получения информации о фотопродуктах, образующихся в результате действия на эритроциты доноров лекарственного препарата «Кардикет» и УФ-излучения (254 нм) был использован метод сканирующей электронной микроскопии. Была изучена цитоархитектоника эритроцитов и изменения их форм, которые появлялись при использовании, выше указанных, модификаторов.

Лекарственный препарат «Кардикет» (0,4 мг/мл) имеет идентичный всем нитратам механизм действия: в результате ряда биохимических реакций он превращается в NO. Оксид азота активирует гуанилатциклазу и в итоге образуется цГМФ, обладающий способностью расслаблять гладкомышечные стенки сосудов [23].

Нами было исследовано влияние различных сроков хранения на изменения цитоархитектоники нативных и модифицированных «Кардикетом» эритроцитов. Было установлено, что архитектоника интактных клеток не изменялась через 1 ч при 37 °С, в то время как в присутствии изосорбид динитрата число дискоцитов снижалось до 86,2 %. Однако через сутки количество поврежденных (деформированных) эритроцитов в

интактной суспензии составило 70,4 %, а в присутствии «Кардикета» этот показатель достиг 38,2 % от общего числа клеток, при этом наблюдался процесс гемолиза ряда эритроцитарных клеток.

В настоящее время накоплен большой экспериментальный материал, посвященный воздействию УФ-света различного диапазона на форменные элементы крови и, в частности на эритроциты. Выявлены различные механизмы влияния УФ-света на состояние эритроцитов и их мембран, среди которых можно выделить следующие:

- шеддинг надмембранных комплексов, уменьшение слоя гликокаликса (поверхностного углеводного покрова клеток);
- прямое взаимодействие с мембранными белками, что сопровождается изменением их функциональных свойств (экспрессия эритроцитарных антигенов, активности ферментов, транспорта ионов через каналы и локальной концентрации ионов и, как следствие, поверхностного заряда и поверхностных свойств эритроцитов – везикуляция);
- взаимодействие между мембраной и подлежащим цитоскелетом.

Нами было показано, что облучение эритроцитов УФ-светом (254 нм) в дозах 750 и 2270 Дж/м² в результате действия этих многочисленных механизмов приводит к образованию внутри популяции эритроцитов патологических форм клеток. При этом с ростом дозы УФ-света четко прослеживается уменьшение числа двояковогнутых дискоцитов (до 70,0 % и 58,0 %) и возрастание числа обратимо- и необратимо деформированных клеток.

Воздействие УФ-света на суспензии эритроцитов, предварительно модифицированных лекарственным препаратом «Кардикет» приводило к статистически достоверному снижению числа дискоцитов до 65,1 %, 42,7%, 50,0 % и 39,2 %. Также наблюдалось повышение количества ОД и НД форм по сравнению с интактными образцами.

Облучение УФ-светом (750 Дж/м^2) эритроцитов, предварительно модифицированных в течение 1 ч, приводило к значительному снижению числа дискоцитов (65,1 %) и нарастанию их ОД и НД форм.

После облучения суспензии эритроцитов, находившихся в контакте с изосорбид динитратом в течение 24 ч, УФ-светом в дозе 750 Дж/м^2 было зарегистрировано снижение количества двояковогнутых дискоцитов до 50,0% и повышение числа деформированных клеток. Уровень дискоцитов после воздействия большой дозы УФ-света (2270 Дж/м^2) на суспензии эритроцитов, модифицированных в течение 1 и 24 ч, упал до 42,7 % и 39,2%, соответственно.

Полученные нами данные свидетельствуют о необходимости более осторожного использования метода АУФОК для лечения пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, длительное время принимающих нитратные вазодилататоры, и введения мониторинга за структурным состоянием их эритроцитов для исключения их негативного воздействия.

ВЫВОДЫ

1. С помощью метода сканирующей электронной микроскопии было установлено, что нативная суспензия эритроцитов человека содержала $93,6 \pm 4,7$ % дискоцитов; $4,4 \pm 0,22$ % обратимо деформированных клеток и $2,0 \pm 0,01$ % необратимо деформированных эритроцитов. Индексы трансформации имели следующие показатели: ИТ равен $0,07 \pm 0,04$; ИОТ $0,05 \pm 0,0025$; ИНОТ $0,02 \pm 0,001$.

2. После инкубации нативных эритроцитов при 37°C в течение 1 ч и 24 ч отмечалось понижение числа дискоцитов до $89,8 \pm 0,91$ % и до $70,4 \pm 0,98$ %.

3. Воздействие лекарственного препарата «Кардикет» на суспензии эритроцитов доноров в течение 1 ч приводило к снижению количества нормоцитов до $86,2 \pm 0,98$ %, увеличению ОД и НД клеток до $12,0 \pm 0,30$ % и $2,8 \pm 0,14$ %, а также показателей ИТ, ИОТ, ИНОТ.

4. Суточная инкубация суспензии эритроцитов с лекарственным препаратом «Кардикет» сопровождалась резким уменьшением числа дискоцитов до $38,2 \pm 0,68$ %, увеличением показателей ОД и НД до $44,2 \pm 0,8$ % и $17,6 \pm 0,4$ %, ИТ — до 0,66, ИОТ — до 0,47, ИНОТ — до 0,18.

5. Воздействие монохроматического УФ-света в дозах 750 и 2270 Дж/м² на суспензию эритроцитов индуцировало уменьшение количества дискоцитов до 70,0 % и 58,0 % при одновременном увеличении количества ОД — до 12,86 % и 13,57 % и НД — до 17,1 % и 27,86 % относительно контрольного образца.

6. Выявлено, что комплексное воздействие лекарственного препарата «Кардикет» (1ч) и УФ-света (254 нм) в дозах 750 и 2270 Дж/м² приводило к снижению двояковогнутых дискоцитов до $65,1 \pm 2,7$ % и до $42,7 \pm 0,75$ %, возрастанию уровней ОД и НД клеток. Индексы трансформации возрастали.

7. Установлено, что 24-часовой контакт эритроцитов с лекарственным препаратом «Кардикет» и последующее УФ-облучение (254 нм) в дозах 750 и 2270 Дж/м² приводило к более значительному снижению двояковогнутых

дискоцитов до 50,0 % и до 39,2 % , возрастанию уровней ОД и НД клеток относительно контроля. Индексы трансформации также возрастали.

8. Выявленные особенности взаимодействия лекарственного препарата «Кардикет» и УФ-света (254 нм) с эритроцитарными клетками указывают на необходимость контроля морфологической картины эритронов состояния пациентов, которые длительное время принимают нитровазодилататоры для получения максимально благоприятного эффекта при их применении.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Аляутдин Р.Н. Фармакология / Под ред. Р.Н. Аляутдина. — 2-е изд. — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. — 592 с.
2. Артюхов В.Г. Биологические мембраны. Структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами / В.Г. Артюхов, М.А. Наквасина — Воронеж: Изд-во ВГУ, 2000. — 296 с.
3. Артюхов В.Г. Практикум по биофизике / В.Г. Артюхов [и др.] — Воронеж: Изд-во ВГУ, 2001. — 294 с.
4. Бабейков И.М. Эритроциты в норме, патологии и при лазерных воздействиях / И.М. Бабейков — Тверь: Изд-во Триада, 2008. — 256 с.
5. Биофизика: Учебник для вузов / под ред. В.Г. Артюхова. — М.: Академический проект Екатеринбург: Деловая книга. 2016. — 294с.
6. Биохимия: Учебник / Под ред. Е.С. Северина — 2-е изд., испр. — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004 — 784 с..
7. Гемоглобин человека в условиях воздействия различных физико-химических агентов: монография / В.Г. Артюхов [и др.]; ВГУ — Воронеж: Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2013. — 363 с.
8. Герман И. Физика организма человека / И. Герман. — Долгопрудный: Изд.дом "Интеллект", 2011. — 992 с.
9. Гистология, эмбриология, цитология: Афанасьев Ю.И. [и др.] — 6-е издание, перераб. и доп. — М.: ГЭОТАР-Медиа — 2012. — 800 с.
10. Зинчук В.В. NO-зависимые механизмы внутриэритроцитарной регуляции сродства гемоглобина к кислороду: монография / В.В. Зинчук, Т.Л. Степуро — Гродно: ГрГМУ, 2016. — 176 с.
11. Калаева Е.А. Нитроглицерин повышает устойчивость эритроцитов к спонтанному гемолизу / Е.А. Калаева, В.Г. Артюхов, О.В.Путинцева // Материалы 23 съезда физиологического общества им. И.П. Павлова с

- международным участием, Воронеж 18-22 сентября 2017 г.: тез.докл. — Воронеж, 2017. — С. 440-441.
12. Калаева Е.А. Теоретические основы статистики и практическое применение математической статистики в биологических исследованиях / Е.А. Калаева, В.Г. Артюхов, В.Н. Калаев — Воронеж : Изд-во ВГУ, 2016. — 284 с.
13. Карандашов В.И. Ультрафиолетовое облучение крови / В.И. Карандашов, Е.Б. Петухов. — М.: Медицина — 1997. — 224 с.
14. Козинец Г.И. Интерпретация анализов крови и мочи и их клиническое значение / Г. И. Козинец — М.: "Триада-Х". — 1998. — 104 с.
15. Кручинина М.В. Эритроциты и NO: факты, гипотезы взаимодействия, перспективы для диагностики и терапии сердечно-сосудистых заболеваний / М.В. Кручинина [и др.] // Научно-практический журнал. — 2014. — Т.10 — № 3. — С. 80-85.
16. Кузнецова В.Л. Оксид азота: свойства, биологическая роль, механизмы действия / В.Л. Кузнецова // Современные проблемы науки и образования. — 2015. — № 4. — С. 13-18.
17. Леонова, Е. В. Патопфизиология системы крови : учеб. пособие / Е. В. Леонова, А. В. Чантурия, Ф. И. Висмонт. — Минск : БГМУ, 2009. — 128 с.
18. Небольсина А.А. Влияние различных доз УФ-излучения (254 нм) на размеры молекул оксигемоглобина человека / А.А. Небольсина, О.В. Путинцева, В.Г. Артюхов // Материалы Международной научной конференции и Двенадцатого съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, Минск, 28-30 июня 2016 г.: тез.докл. — Минск, 2016. — С.144-146.
19. Оксид азота (NO) и цикл NO в миокарде: молекулярные, биохимические и физиологические аспекты / В.П. Реутов [и др.] // Успехи физиологических наук. — 2007. — Т. 38 — № 4. — С. 39-58.

20. Применение нитратов в лечении больных ишемической болезнью сердца // А.Г. Евдокимова [и др.] // Consilium medicum (Кардиология). — 2014. — № 8. — С. 12-16.
21. Путинцева О.В. Исследование цитоархитектоники эритроцитов доноров в условиях воздействия препарата «Кардикет» / О.В. Путинцева, В.Г. Артюхов, Л.О. Соколова // Материалы 7-й Международно-методической конференции «Фармобразование-2018», Воронеж 28-30 марта 2018 г. : тез. докл. — Воронеж, 2018. — С.576-579.
22. Путинцева О.В. Цитоархитектоника эритроцитов доноров в условиях воздействия лекарственного препарата нитроглицерина / О.В. Путинцева, В.Г. Артюхов, М.А. Федакова // Вестник ВГУ серия: химия, биология, фармация. — 2018. — № 3. — С. 193-198.
23. Рациональная фармакотерапия сердечно-сосудистых заболеваний: Рук-во для практикующих врачей / Е.И. Чазов [и др.] ; под ред. Е.И. Чазова, Ю.Н. Беленкова. — М.: Литтера — 2005. — 972 с.
24. Ремизов А.Н. Медицинская и биологическая физика: Учеб. Для вузов / М.: Дрофа . — 2003. — 560 с.
25. Рубин А.Б. Биофизика. — М.: Изд-во МГУ им. М.В. Ломоносова — 1987. — Т.1. — 190 с., Т.2 — 277 с.
26. Daiber A. Taking up the cudgels for the traditional reactive oxygen and nitrogen species detection assays and their use in the cardiovascular system / A/ Daiber [et al.] // Redox Biology. — Vol. 12. — 2017. — P. 35-49.
27. Francis Mount Blood cells / Francis Mount // Anatomy Of Blood Cells — Sinai Regional Cancer Center Hartford Ct. — URL: <http://www.anatomylibrary.us/=blood+cells> (дата обращения 27.10.2018)
28. Hamblin M.R. Ultraviolet irradiation of blood : “The Cure That Time Forgot?” / M.R. Hamblin // Adv Exp Med Biol — 2017. — Vol. 996. — P. 295-309.

29. Hinterdorfer, P Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy/ P. Hinterdorfer, Y.F. Dufrêne// *Nat Methods* . —2006. — Vol. 3(5). — P.347-355.
30. Huseyin T. Histological and ultrastructural analyses of mole rats lung cells exposed to ultraviolet radiation / T. Huseyn // *Jornal of Radiation on Research and Applied Sciences*. — 2014. — Vol. 7. — P.560-567.
31. Kenneth Eward Hemoglobin / Kenneth Eward // *Science photo library* — URL: <http://www.sciencephoto.com/=hemoglobin> (дата обращения 27.10.2018).
- 32.Kozlova E.K. Local defects in the nanostructure of the membrane of erythrocytes upon ionizing radiation of blood / E.K. Kozlova [et al.] // *Physics particles and nuclei letters*. — 2016. — Vol. 13. — № 1. — P. 140-148
- 33.Misra R.B. Effect of UVB radiation on human erythrocytes in vitro / R.B. Masira, R.S. Ray, R.K. Hans // *Toxicology in vitro*. — 2005. — Vol. 19. — №3. — P. 433-438.
34. Narla J. Red cell membrane disorders / J. Narla, N. Mohandas // *International Journal of Laboratory Hematology*. — 2017. — Vol. 39. — P. 47-52.
35. Picon-Pages P. Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain / P. Pacon-Pages, J. Garcia-Buendia, F.J. Munoz // *BBA-Molecular Basis of Disease*. — 2018. — Vol. 30. — P.1-19.
36. Ross Michel H. Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology / Michel H. Ross, Wojciech Pawlina. — 6th ed.; 2011 — p. 611.
37. Yeow N. Atomic force microscopy: from red blood cells to immunohaematology / N. Yeow, R.F. Tabor, G. Garnier // *Advances in Colloid and Interface Science*. — 2017. — Vol.1. — P. 2-41.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Таблица 1

Показатели цитоархитектоники нативных эритроцитов крови доноров

Контрольные образцы эритроцитов				Инкубация 1ч				Инкубация 24ч			
Повторность	Д,%	ОД, %	НД,%	Повторность	Д,%	ОД, %	НД,%	Повторность	Д,%	ОД, %	НД,%
1	93	4	2	1	89	6	3	1	70	19	10
2	96	5	2	2	89	6	4	2	71	19	12
3	94	5	1	3	89	6	3	3	71	17	10
4	96	4	2	4	88	7	3	4	71	18	9
5	93	4	2	5	89	8	4	5	72	20	10
6	93	5	3	6	89	8	4	6	70	18	11
7	96	4	2	7	89	7	3	7	69	19	10
8	94	4	3	8	92	7	4	8	71	20	9
9	93	5	1	9	92	6	2	9	70	17	11
10	95	4	2	10	90	7	3	10	70	19	9
11	92	5	2	11	91	8	2	11	71	17	12
12	92	4	3	12	91	6	4	12	70	20	11
13	90	5	2	13	90	7	2	13	70	18	9
СРЕДНЕЕ	93,6±4,7	4,4±0,22	2,0±0,01	СРЕДНЕЕ	89,8±0,91	6,8±0,34	3,1±0,15	СРЕДНЕЕ	70,4±0,98	18,5±0,9	10,2±0,51
ИТ	0,07 ± 0,04			ИТ	0,11 ± 0,0048			ИТ	0,40 ± 0,017		
ИОТ	0,05 ± 0,0025			ИОТ	0,076 ± 0,0038			ИОТ	0,26 ± 0,013		
ИНОТ	0,02 ± 0,001			ИНОТ	0,035 ± 0,0017			ИНОТ	0,14 ± 0,006		

Обозначения: Д – количество дискоцитов (%); ОД – количество обратимо деформируемых клеток (%); НД – количество необратимо деформированных клеток (%); ИТ – индекс трансформации; ИОТ– индекс обратной трансформации; ИНОТ – индекс необратимой трансформации.

Таблица 2

Цитоархитектоника эритроцитов крови доноров, модифицированных лекарственным препаратом «Кардикет» в течение разного временного периода

Эритроциты+Кардикет (1 ч инкубации)				Эритроциты+Кардикет (24 ч инкубации)			
Повторность	Д,%	ОД,%	НД,%	Повторность	Д,%	ОД, %	НД,%
1	86	12	3	1	38	46	18
2	88	11	3	2	38	44	19
3	87	13	2	3	37	43	16
4	88	12	3	4	39	43	17
5	86	12	4	5	37	45	20
6	86	11	2	6	39	43	17
7	85	12	2	7	40	44	19
8	87	13	3	8	38	43	16
9	86	11	3	9	37	46	17
10	85	13	2	10	38	44	20
11	86	12	4	11	37	43	16
12	86	12	2	12	40	46	17
13	85	12	4	13	39	45	17
СРЕДНЕЕ	86,2 ± 0,98	12,0 ± 0,30	2,8 ± 0,14	СРЕДНЕЕ	38,2 ± 0,68	44,2 ± 0,8	17,6 ± 0,4
ИТ	0,17 ± 0,003			ИТ	0,66 ± 0,002		
ИОТ	0,13 ± 0,01			ИОТ	0,47 ± 0,003		
ИНОТ	0,03 ± 0,001			ИНОТ	0,18 ± 0,02		

*Примечание: обозначения такие же, как и в таблице 1.

Таблица 3

Цитоархитектоника эритроцитов крови доноров, облученных УФ-светом (254 нм) в дозах 750 и 2270 Дж/м²

Эритроциты+750 Дж/м ²				Эритроциты+2270 Дж/м ²			
Повторность	Д,%	ОД,%	НД,%	Повторность	Д,%	ОД, %	НД,%
1	69	13	16	1	57	13	30
2	71	12	17	2	58	15	26
3	70	14	16	3	59	13	27
4	71	12	18	4	61	14	26
5	70	14	18	5	57	13	29
6	69	12	17	6	57	12	27
7	70	14	16	7	58	14	31
8	70	13	18	8	57	15	26
9	69	14	17	9	58	14	27
10	69	12	16	10	58	12	29
11	71	14	19	11	58	14	26
12	71	12	18	12	56	15	27
13	70	11	17	13	60	12	31
СРЕДНЕЕ	70,0 ± 3,2	12,86±0,64	17,1± 0,8	СРЕДНЕЕ	58,0 ± 1,29	13,57 ± 0,55	27,86 ± 1,34
ИТ	0,42 ± 0,012			ИТ	0,71 ± 0,016		
ИОТ	0,18 ± 0,007			ИОТ	0,23 ± 0,007		
ИНОТ	0,24 ± 0,009			ИНОТ	0,48 ± 0,011		

*Примечание: обозначения такие же, как и в таблице 1.

Таблица 4

Цитоархитектоника эритроцитов крови доноров после комплексного воздействия препарата «Кардикет» и УФ-света (254 нм) в дозе 750 Дж/м²

Эритроциты+Кардикет (1ч)+750 Дж/м ²				Эритроциты+Кардикет (24ч)+750 Дж/м ²			
Повторность	Д,%	ОД,%	НД,%	Повторность	Д,%	ОД,%	НД,%
1	65	18	18	1	50	25	22
2	64	19	16	2	49	26	21
3	64	17	17	3	48	24	23
4	66	18	16	4	50	25	23
5	65	20	18	5	52	24	18
6	64	16	16	6	53	22	24
7	67	18	18	7	50	24	23
8	65	18	16	8	50	25	21
9	64	17	17	9	48	25	24
10	65	19	16	10	50	24	21
11	67	18	15	11	53	24	19
12	66	20	16	12	48	26	21
13	65	19	19	13	49	25	20
СРЕДНЕЕ	65,1 ± 2,7	18,2 ± 0,88	16,7 ± 0,75	СРЕДНЕЕ	50,0 ± 2,43	24,5 ± 1,12	21,5 ± 1,08
ИТ	0,53 ± 0,023			ИТ	0,92 ± 0,04		
ИОТ	0,27 ± 0,012			ИОТ	0,49 ± 0,02		
ИНОТ	0,25 ± 0,009			ИНОТ	0,43 ± 0,01		

*Примечание: обозначения такие же, как и в таблице 1.

Таблица 5

Цитоархитектоника эритроцитов крови доноров после комплексного воздействия препарата «Кардикет» и УФ-света (254 нм) в дозе 2270 Дж/м²

Эритроциты+Кардикет (1ч)+2270 Дж/м ²				Эритроциты+Кардикет (24ч)+2270 Дж/м ²			
Повторность	Д,%	ОД,%	НД,%	Повторность	Д,%	ОД,%	НД,%
1	42	31	26	1	40	38	26
2	43	28	27	2	40	36	22
3	44	30	29	3	37	37	24
4	45	29	30	4	39	35	25
5	42	28	26	5	38	32	24
6	41	32	27	6	40	33	23
7	42	30	29	7	41	35	25
СРЕДНЕЕ	42,7 ± 0,75	29,7 ± 0,95	27,6 ± 0,78	СРЕДНЕЕ	39,2 ± 1,6	35,1 ± 1,2	24,1 ± 1,06
ИТ	1,34 ± 0,06			ИТ	1,5 ± 0,07		
ИОТ	0,69 ± 0,03			ИОТ	0,89 ± 0,04		
ИНОТ	0,64 ± 0,02			ИНОТ	0,61 ± 0,02		

*Примечание: обозначения такие же, как и в таблице 1.

Нормконтролер

М.Г. Холявка

