

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ НИЖЕГОРОДСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМ.Н.И.ЛОБАЧЕВСКОГО»**

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ И БИОМЕДИЦИНЫ

Кафедра физиологии и анатомии

Профиль_Физиология

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
ЭРИТОЦИТОВ И ТРОМБОЦИТОВ КРОВИ КРЫС БОЛЬНЫХ
ОСТРЫМ ЭНДОМЕТРИТОМ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ КВЧ -
ИЗЛУЧЕНИЯ В ОПЫТАХ IN VITRO

Научный руководитель:
д.б.н., доцент кафедры
физиологии и анатомии
Копылова Светлана Вячеславовна

Выпускная
квалификационная ра-
бота (бакалаврская работа)
студента 4
курса очной формы обучения,
обуча-
ющегося по программе
подготовки ба-
калавра по направлению
Биология,
Крайишник Милицы

Нижний Новгород

2021

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1 Строение и функции эритроцитов.....	7
1.1.1 Состав и морфология.....	7
1.1.2 Строение мембраны эритроцитов.....	7
1.1.3 Функции эритроцитов.....	10
1.2 Исследования физиологии эритроцитов <i>in vitro</i>	11
1.2.1 Потребление глюкозы эритроцитами.....	11
1.2.2 Осмотическая резистентность эритроцитов.....	12
1.2.3 Исследование агрегации эритроцитов.....	14
1.2.4 Электрокинетические свойства эритроцитов.....	15
1.2.5 Влияние КВЧ -излучения на эритроциты <i>in vitro</i>	15
1.3 Строение и функции тромбоцитов.....	17
1.4 Исследования физиологии тромбоцитов <i>in vitro</i>	19
1.4.1 Методы исследования спонтанной агрегации тромбоцитов.....	19
1.4.2 Метод исследования ретракции сгустка крови.....	20
1.4.3 Методы исследования системы гемостаза.....	21
1.4.4 Влияние КВЧ -излучения на тромбоциты <i>in vitro</i>	21
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	23
2.1 Характеристика объекта и материалы исследования....	23

2.2	Определение резистентности эритроцитов методом кислотных эритрограмм (Смирнова, 1995).....	25
2.3	Осмотическая резистентность эритроцитов (Смирнова, 1995).....	26
2.4	Потребление глюкозы эритроцитами (Чиркин, 2002)....	28
2.5	Определение ретенции (адгезивности) тромбоцитов (Баркаган, 1980).....	29
2.6	Определение ретракции кровяного сгустка (Макферлейн, 1970).....	30
2.7	Гемолизат- агрегационный тест (Баркаган, 1980).....	30
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....		32
3.1	Влияние КВЧ-излучения на морфо-функциональное состояние мембран эритроцитов (кислотную резистентность, осмотическую резистентность, на потребление глюкозы) крови крыс больных острым эндометритом в опытах <i>in vitro</i>	32
3.2	Влияние КВЧ-излучения на морфо-функциональное состояние тромбоцитов (адгезивность, ретракцию кровяного сгустка, агрегацию) крови крыс больных острым эндометритом в опытах <i>in vitro</i>	43
ВЫВОДЫ.....		47
ПРИЛОЖЕНИЯ:.....		48
ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА:.....		50

ВВЕДЕНИЕ

Одним из новых направлений клинической медицины является использование низкоинтенсивных электромагнитных волн крайне высокой частоты (КВЧ терапия). Известно, что в основе механизмов индивидуальной резистентности к внешним воздействиям лежат процессы, развивающиеся на клеточном уровне, в этом случае доступными и информативными объектами при исследовании изучений резистентности организма могут служить клетки крови (Choi, 2001).

Электромагнитные колебания крайне высокой частоты (КВЧ-диапазона) уже более 30 лет применяются в медицинской практике. К колебаниям КВЧ-диапазона принято относить электромагнитные волны частотой 30-300 ГГц. Такой диапазон электромагнитных волн обладает рядом уникальных биологических свойств (Бецкий, 2002). В ряде экспериментальных работ было показано, что в процессе жизнедеятельности клетка вырабатывает электромагнитные колебания весьма широкого диапазона. При различных нарушениях функционирования клеток их электрическая симметрия нарушается. Клетки начинают генерировать когерентные электромагнитные волны КВЧ. Целью этих электромагнитных волн является нормализация нарушенных функций клеток. Предполагают, что внешнее КВЧ-облучение по сути имитирует указанные клеточные регулирующие воздействия, способствует нормализации нарушенных

функций клеток. Основной точкой приложения волн КВЧ является мембранно-информационная система они обладают выраженным воздействием на мембраны клеток, стимулируют перемешивание ее липидных слоев и белковых компонентов, изменяя функциональную активность клетки (Киричук, 2003).

Предполагается, что КВЧ-излучение нетепловых интенсивностей способно индуцировать структурные перестройки в мембранах, что сопровождается быстрым закрыванием пробойных каналов ионных утечек. Такая интерпретация полученных данных согласуется с результатами по влиянию ЭМИ сантиметрового диапазона на температурные зависимости проницаемости мембран эритроцитов и подвижности жирных кислот в мембранах липосом (Капустина, 2002).

Исследования в области физиологии и патологии эритроцитов могут решить многие задачи в медицине: например, повышение устойчивости эритроцитов к гемолизу при хранении препаратов консервированной крови, лечение эритроцитозов опухолевого генеза, гемолитических, гипопластических и дефицитных анемий, которые сопровождаются ускоренной гибелью эритроцитов. Согласно данным многочисленных исследований показано что изучение состояния эритроцитов при критических, терминальных и пострестимуляционных состояниях позволяет выявить, как реагируют клетки, ответственные за газообмен

в организме, на сильные изменения обмена веществ, которые происходят при критических состояниях, и как при этом изменяются их функциональные, структурные и биохимические свойства.

Расстройство микроциркуляции играет ключевую роль в патогенезе воспалительных заболеваний. В настоящее время показано, что повышение агрегации тромбоцитов является важным элементом патогенеза как развития, прогрессирования сердечно-сосудистых заболеваний, так и возникновения осложнений.

Целью работы являлось изучение функциональной активности эритроцитов и тромбоцитов крови крыс больных острым эндометритом, при воздействии КВЧ -излучения в опытах *in vitro*.

Задачи:

1. Изучить влияние КВЧ-излучения на морфо-функциональное состояние мембран эритроцитов (кислотную резистентность, осмотическую резистентность, на потребление глюкозы) крови крыс больных острым эндометритом в опытах *in vitro*.

2. Изучить влияние КВЧ-излучения на морфо-функциональное состояние тромбоцитов (адгезивность, ретракцию кровяного сгустка, агрегацию) крови крыс больных острым эндометритом в опытах *in vitro*

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Строение и функции эритроцитов

1.1.1 Состав и морфология

Эритроцит состоит из воды (70%), гемоглобина (25%), а также липидов, сахаров, солей, ферментных белков на долю которых приходится 5%. (Мchedlishvili, 2002). Нормальный зрелый эритроцит (нормоцит) оксифилен, не содержит ядра и клеточных органелл.

При физиологических условиях 85- 97% эритроцитов человека имеют форму двояковогнутого диска с

утолщениями по краям и центральной впадиной, на которую приходится 35-55% его поверхности. Молекула гемоглобина находится близко к поверхности, что обеспечивает максимальную скорость газообмена. Примерно 3% эритроцитов в норме имеют неправильную форму: эхиноцитарную, стоматоцитарную, сфероцитарную (без изменения объема клетки), куполообразную и другие варианты, что обусловлено нарушением внутриклеточного обмена или наличием физико-химических воздействий на эритроцит. (Блохина, Назаров, 2005). Зрелый эритроцит человека имеет диаметр 7 — 8 мкм и толщину 2,2 мкм по краям и в центре 1 мкм, объем эритроцитов составляет 85—90 мкм³, площадь поверхности 145 мкм². Особенности клеточного скелета и структуры мембраны позволяют ему претерпевать значительную деформацию и проходить через капилляры с просветом в 2-3 мкм. (Кленова, Кленов, 2009).

1.1.2 Строение мембраны эритроцитов

Мембрана эритроцитов составляет всего 1% от веса эритроцита, но именно она определяет гомеостаз и функциональное состояние эритроцита (Трошкина, 2007).

Структура клеточной мембраны типичного дискоцита одинакова на всей поверхности эритроцита.

Известно, что мембрана эритроцита выглядит следующим образом: на внешней поверхности расположены липиды, сиаловая кислота, антигенные олигосахариды, адсорбированные белки; внутренняя поверхность

представлена гликолитическими ферментами, натрием, кальцием, АТФ-азой, гликопротеинами и гемоглобином (Погорелов, 2004).

Распределение липидов в эритроцитарной мембране ассиметрично: на ее внешней стороне концентрируются сфингомиелин (26% от всех липидов) и фосфатидилхолин (28%), на внутренней - фосфатидилсерин (13%), фосфатидилэтаноламин (27%) и аминофосфолипиды (Воробьев, 2005).

Белки мембраны условно разделяют на интегральные (встроены в липидный слой) и периферические (цитоплазматические). Интегральные белки в основном представлены белком полосы 3, гликофоринами А, В, С. (рис 1.)

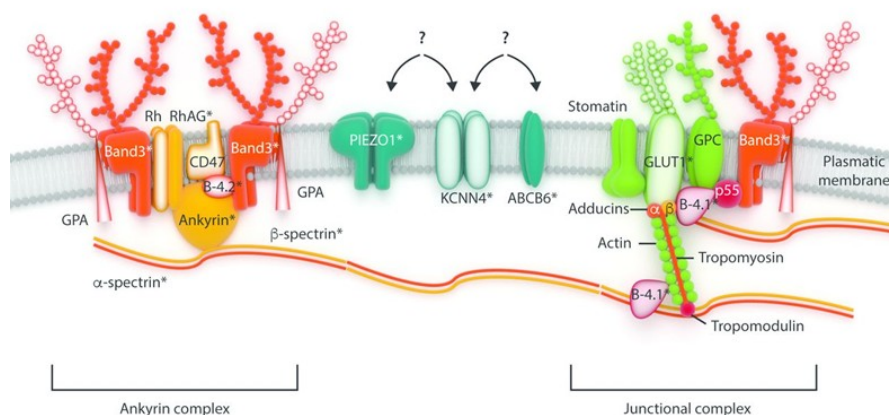


Рис 1. Схема расположения белковых структур и спектринового матрикса в бислое мембраны эритроцита (по Лиему Р., 2005).

По функциональному значению белки эритроцитарной мембраны делят на формирующие мембранный скелет (спектрины, анкирин, белки полосы 4.1, 4.2, 4.9, актин и др.) и на белки, которые обеспечивают метаболизм и ионный гомеостаз клетки, белок полосы 3, или анионный канал, гликофорины, аддуцин, ацетилхолинэстераза, белок полосы 4,5 и фракции 6, Na^+ , K^+ -АТФ-аза, Ca^{2+} -АТФ-аза, карбоангидраза. Белок спектрин состоит из двух фракций (а- и в- спектрины), является основным белком, который составляет структуру цитоскелета, он регулирует подвижность белков и удерживает в равновесии двойной слой липидов (Воробьев, 2005).

Белок анкирин является крупным белком, молекула его состоит из 1881 аминокислоты, участвует в укреплении нескольких интегральных белков на определенном месте (Воробьев, 2005).

Гликофорин А является основным сиалогликопротеидом мембраны эритроцита (75% от всех сиалогликопротеидов), содержит большинство сиаловых кислот, обладает МК-антигенной активностью, несет рецепторы к вирусу гриппа и фигогемагглютиниину (Мушкамбаров, 2003).

Белок полосы 3 (band 3, гликопротеин) функционирует как ионный канал, обменивая в легких HCO_3^- на Cl^- по механизму пассивного транспорта. (Заварзин, 2000). Белок 3 полосы формирует основу (кор) для макромолекулярного

комплекса интегральных и периферических белков мембраны эритроцитов (Perrotta, 2008).

Основу фибриллярной сети субмембранной системы поверхностного аппарата эритроцита составляют связанные между собой тетрамерные комплексы молекул белка спектрина, формирующие гексагональные структуры на внутренней стороне мембраны (Tanner, 2002).

В мембранах эритроцитов обнаружено присутствие аквапорина 1. Он принимает участие в транспорте двуокиси углерода через мембрану эритроцита. Через аквапорин 1 переносится до 60 % углекислого газа, что позволяет рассматривать аквапорин как основной путь поступления CO₂ в эритроцит (Трошкина, 2007).

Одним из основных биофизических показателей крови являются ее реологические свойства. Реология крови — текучесть, которая определяется совокупностью функционального состояния форменных элементов (подвижность, деформируемость, агрегационная активность эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов), вязкости (концентрация белков и липидов) и осмолярности крови. Ключевая роль в формировании реологических параметров крови принадлежит форменным элементам, прежде всего эритроцитам, которые составляют 98% от общего объема клеточной популяции (Фирсов, Климанова и др. , 2010).

1.1.3 Функции эритроцитов

1) Эритроциты осуществляют газотранспортную функцию. Перенос кислорода от альвеол легких к тканям и углекислого газа от тканей к легким реализуется с участием гемоглобина и карбоангидразы.

2) Эритроциты участвуют в гомеостазировании pH, т.е. выполняют буферную функцию (Оловникова, Николаева, 2001).

3) Эритроциты осуществляют питательную функцию - переносят на своей поверхности аминокислоты, холестерин, глюкозу, витамины (B1, B2, B6, C) от органов пищеварения к клеткам организма .

4) Эритроциты выполняют защитную функцию. Она реализуется за счет адсорбции на поверхности эритроцитов токсических веществ, ряда вирусов и микробов ,разрушения медиаторов типа ацетилхолина холинэстеразой эритроцитов (Оловникова, Николаева, 2001).

6) Эритроциты несут в себе групповые признаки крови и детерминанты Rh (Горев, Смагулова и др., 2005).

7) Эритроциты являются регуляторами сосудистого тонуса.

Многие из указанных функций реализуются за счет того, что на мембране эритроцита содержатся рецепторы инсулина, соматотропного гормона, ацетилхолина, катехоламинов, простагландинов, иммуноглобулинов (Martin, Bernard, 2001).

1.2 Исследования физиологии эритроцитов in vitro

1.2.1 Потребление глюкозы эритроцитами

Значительное увеличение концентрации глюкозы внутри клетки приводит к гликозилированию белков цитоскелета, гемоглобина, что может сопровождаться изменением липид-белковых взаимодействий, может нарушаться взаимодействие белков цитоскелета и целостность мембран эритроцитов (Чеснокова, Понукалина и др., 2015).

Шпаков Н.М., проводил исследование о влиянии глюкозы на устойчивость эритроцитов млекопитающих к механическому стрессу, и показал как содержание глюкозы влияет на механические свойства эритроцитов (Шпаков, 2015).

Шпаков наблюдал что повышенное содержание глюкозы в крови приводит к изменению механических свойств эритроцитов, в результате чего снижается их способность проходить по капиллярам, уменьшается площадь контакта клетки с поверхностью сосудов и снижается кислород-транспортная функция. Снижение потребления глюкозы свидетельствует о снижении скорости гликолитических процессов (Шпаков, 2015).

1.2.2 Осмотическая резистентность эритроцитов

Эритроциты человека в плазме крови или свежевыделенные эритроциты в изотоническом солевом растворе представляют собой двояковогнутые диски – дискоциты. Объем дискоцита можно увеличить до

сферической формы без изменения площади поверхности мембраны. При увеличении объема эритроцита увеличивается площадь поверхности мембраны (Козак, 2010).

Осмотическая резистентность эритроцитов (ОРЭ) отражает функциональное состояние клеточных мембран. В настоящее время ОРЭ принято определять по степени гипотонической среды, выраженной в процентном содержании NaCl, при которой происходит частичный или полный гемолиз эритроцитов. Наиболее вероятно, что этот метод преимущественно отражает способность эритроцитов к деформируемости: чем она выше, тем выше ОРЭ, т.е. тем требуется больший объем воды, входящей в эритроцит, для его разрушения.

Обычно осмотическую резистентность определяют помещая эритроциты в раствор поваренной соли. Изотоническим является 0,9% раствор NaCl, в нем эритроциты не набухают и остаются дискоцитами. Минимальное значение концентрации NaCl, которое не приводит к осмотическому гемолизу, является мерой осмотической хрупкости. Эритроциты в крови по критерию осмотической хрупкости распределены по нормальному закону (закону Гаусса) (Камилов, Шакиров и др., 2007).

Осмотическая резистентность эритроцитов может зависеть от многих факторов: отношения объема клетки к площади поверхности цитоплазматической мембраны (V/S);

эластичности мембраны; концентрации осмотически активного материала в клетке и от изменения количества этого материала; изменения свойств мембраны под действием физических факторов и экзогенных химических соединений. (рис. 4)

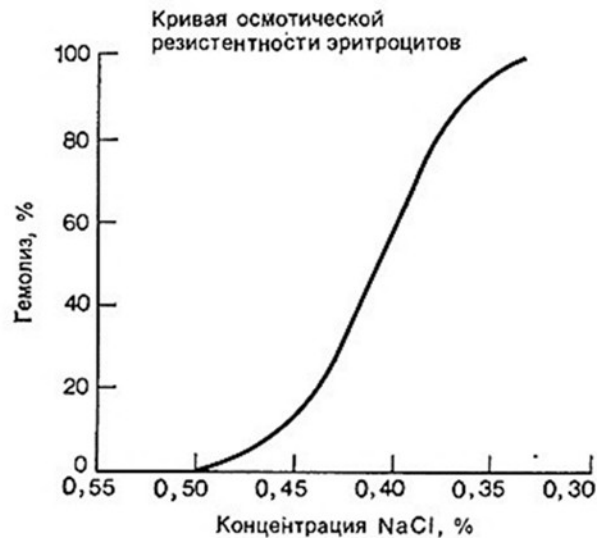


Рис 4. Кривая осмотической резистентности эритроцитов
(по Камилову Р.Ф., 2007)

В возникновении гемодинамических нарушений периферического звена кровотока важным являются изменения механических свойств эритроцитов, их деформационной и агрегационной способности.

Если эритроциты поместить в солевой физиологический раствор, то осмотическое давление внутри эритроцита создается ионами которые находятся в клетке так и гемоглобином, а снаружи только ионами, поэтому

концентрация ионов внутри эритроцита оказывается ниже, чем в окружающем растворе. За счет увеличения ионной проницаемости мембран концентрации ионов внутри и снаружи начинают выравниваться. Внутриклеточный гемоглобин при этом создает избыточное осмотическое давление, поэтому вместе с ионами в клетку входит вода и вызывает увеличение объема эритроцитов. Этот процесс называется коллоидно-осмотическим набуханием (рис. 5).

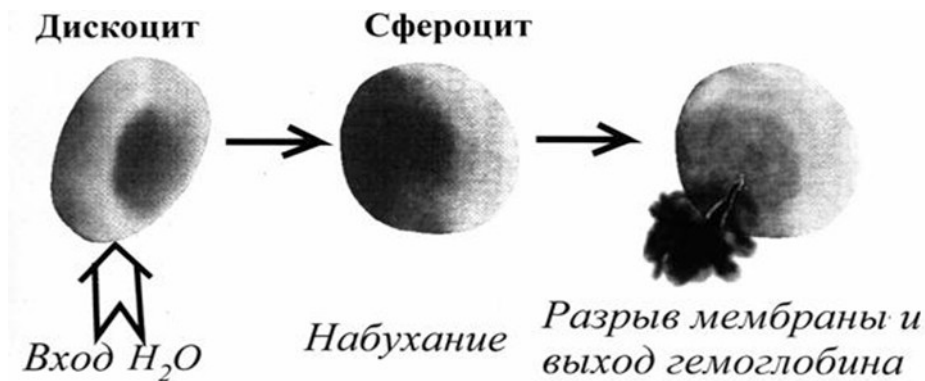


Рис5. Набухание и лизис эритроцитов в гипотоническом солевом растворе (по Потаненко А.Я., 2006)

Он приводит к осмотическому гемолизу даже в изотоническом солевом растворе (Потапенко, Кягова и др., 2006).

Изучение осмотической резистентности дает возможность, помимо определения деформируемости эритроцитов, косвенно оценивать содержание в них аквапоринов и влияние различных биологически активных веществ на экспрессию и транслокацию аквапоринов (Крысова, Куншин и др., 2011).

1.2.3 Исследование агрегации эритроцитов

Агрегация различается по видам : в регулярном сдвиговом потоке, при остаточном движении в микроскопической кювете, при оседании эритроцитов, при ультразвуковых колебаниях(Шрамм, Куличихин, 2003). Исследование кинетики образования эритроцитарных агрегатов у человека в норме и патологии происходит при помощи вискозиметрических приборов. Различают несколько видов вискозиметров:

- 1) ротационные.
- 2) капиллярные (Ройтман, 2001).

Агрегация эритроцитов в эксперименте зависит от условий кровотока, геометрии камеры, содержащей кровь, времени которое пошло с начала процедуры, и от исходного состояния крови. (Камышников, 2002).

Так же используют абсорбционные фотометрические методы, которые основаны на интенсивности поглощения света (Домушина, Дворянский и др., 2008)

1.2.4 Электрокинетические свойства эритроцитов

Биологическое состояние мембраны клетки связано с поверхностным зарядом, о наличии заряда можно судить по электрофоретической подвижности клеток. Регистрация перемещения клеток крови в электрическом поле позволяет оценить не только их электрокинетический потенциал и, следовательно, морфофункциональное состояние мембран, но

и состояние гомеостаза организма в целом (Матюшичев, Шамратова, 2008).

1.2.5 Влияние КВЧ -излучения на эритроциты in vitro

Многочисленными исследованиями показано, что электромагнитные излучения крайне высоких частот (ЭМИ КВЧ) (30300 ГГц) или миллиметрового (мм) диапазона ($\lambda=110$ мм) низкой интенсивности (меньше 10 мВт/см) обладают выраженной биологической эффективностью.

КВЧ-излучение обладает неспецифическим действием, механизмы которого к настоящему моменту до конца не изучены. Тем не менее на основе КВЧ-излучения созданы и создаются устройства для коррекции состояния организма при развитии патологических состояний. Известно, что большинство заболеваний, на лечение которых направлено действие КВЧтерапии, сопровождается нарушениями в микроциркуляторном русле.

На микроциркуляторном уровне кровь проявляет себя как сложная гетерогенная система корпускулярной природы, имеющая реологические свойства, существенно отличающие ее от других жидкостей. Следовательно, на условия гемодинамики в системе микроциркуляции оказывает влияние агрегатное состояние крови. Вязкость крови в значительной степени определяется способностью эритроцитов к агрегации. Вместе с тем, результаты исследований свидетельствуют и о высокой чувствительности эритроцитов к ЭМИ мм диапазона (Киричук, 2003).

Так, ЭМИ КВЧ достоверно увеличивает скорость оседания эритроцитов *in vitro*, что может быть связано с увеличением агрегации красных клеток крови.

Получены убедительные доказательства влияния ЭМИ КВЧ на кислород-транспортную функцию и антиоксидантный потенциал эритроцитов.

Выявлено, что облучение эритроцитов сопровождается интенсификацией процессов регенерации, что связано с характерными количественными и качественными изменениями липидов и эритроцитарных мембранах. После экспериментального КВЧвоздействия на образцы цельной крови животных *in vitro* параллельно со снижением количества эритроцитов выявлено увеличение их среднего диаметра, периметра, объема и снижение жесткости мембран (Авдеенко, 2003).

Показано что ЭМИ КВЧ корригирует стресс индуцированные морфологические изменения эритроцитов *in vitro*. КВЧ воздействие препятствует деформации эритроцитов, вызываемой стрессом, способствует сохранению нормальной формы и объема клеток. Этот факт, по всей видимости, объясняется тем, что под воздействием ЭМИ КВЧ эритроциты приобретают повышенную прочность. Таким образом, ЭМИ КВЧ препятствует нарушению функциональной целостности эритроцитов, т.е. развитию деформационного стресса (Чуян, 2006).

1.3 Строение и функции тромбоцитов

Тромбоциты представляют собой маленькие, 2-4 микрометра диаметром, безъядерные клеточные фрагменты, циркулирующие в кровотоке в концентрации 200-400 тыс. на микролитр и отвечающие за ключевые этапы процесса остановки кровотечения - гемостаза (Пантелеев, 2014).

В исходном, неактивированном виде тромбоциты напоминают двояковыпуклые «тарелочки». Благодаря своему маленькому размеру (2-4 микрона в диаметре) они свободно проходят через капилляры. Его внутренняя среда на самом деле представляет собой сплошную «губку», сеть мембранных каналов, которая служит дополнительным источником мембранной поверхности при активации и способствует секреции гранул.

Способность к активации - быстрому и в большинстве случаев необратимому переходу в некое новое состояние - является главным качеством тромбоцита. Стимулом активации может служить практически любое значительное возмущение окружающей среды, вплоть до простого механического напряжения. Однако основными физиологическими активаторами тромбоцитов считаются: 1) коллаген - главный белок внеклеточного матрикса; 2) тромбин - сериновая протеиназа, центральный фермент плазменной системы свертывания; 3) АДФ - адениновый нуклеотид, который выделяется из разрушенных клеток сосуда или секретруется плотными гранулами самих

тромбоцитов; 4) тромбоксан А₂ – липид из класса эйкозаноидов, синтезируемый и выделяемый тромбоцитами.

Действие каждого из тромбоцитарных активаторов опосредуется через специализированные рецепторы в мембране тромбоцита. Активация тромбоцитов внешне проявляется многочисленными внутренними перестройками и изменениями свойств, основными среди которых считаются: 1) изменение формы на амёбовидную, для части тромбоцитов – сферическую ; 2) усиление способности к адгезии – прикреплению к месту повреждения; 3) появление способности к агрегации – прикреплению к другим тромбоцитам с целью формирования полноценной пробки(Мазуров, 2011).

Часть этих свойств служит для реализации главной функции тромбоцитов – формирования гемостатической пробки, другая – для ускорения реакций свертывания крови. Так, экспонирование прокоагулянтной мембраны и секреция альфа-гранул необходимы для осуществления именно второй функции тромбоцитов.

Свертывание крови представляет собой каскад реакций в плазме крови, который заканчивается формированием сети волокон фибрина и переводом крови из жидкого состояния в желеобразное.

В нормальном состоянии мембрана тромбоцитов не поддерживает реакций свертывания. Отрицательно заряженные фосфолипиды, в первую очередь

фосфатидилсерин, сосредоточены на внутреннем слое мембраны, а фосфатидилхолин внешнего слоя связывает факторы свертывания гораздо хуже.

Активация тромбоцита, предположительно, приводит к активации фермента скрамблазы, который начинает быстро, специфично, двусторонне и АДФ независимо перебрасывать отрицательно заряженные фосфолипиды из одного слоя в другой. В результате происходит ускоренное установление равновесия, при котором концентрация фосфатидилсерина в обоих слоях становится одинаковой (Пантелеев, 2014).

1.4 Исследования физиологии тромбоцитов in vitro

Существующие на сегодняшний день методы исследования позволяют изучить практически каждый этап участия тромбоцитов в процессе образования тромба. В диагностике нарушений тромбоцитарного звена гемостаза существенную помощь может оказать анализ состояния тромбоцитарных рецепторов, осуществляемый с помощью проточной цитометрии и электронной микроскопии (Филиппова, 2012).

1.4.1 Методы исследования спонтанной агрегации тромбоцитов

Большинство методов исследования САТ можно разделить по принципу из выполнения на две основные группы: 1) оптические (измерение оптической плотности

суспензии тромбоцитов), 2) визуальные (непосредственная морфологическая оценка агрегированных тромбоцитов или изменение их количества). Оценивают как наличие агрегатов тромбоцитов в исследуемой плазме или цельной крови, так и агрегационную активность тромбоцитов в ответ на неспецифические стимулы (длительное вращение в центрифуге, встряхивание). Иногда наличие САГ оценивают по степени их дезагрегации.

Методы оценки агрегационной активности тромбоцитов в образце цельной крови позволяют учитывать клеточное и плазменное окружение тромбоцитов, т.е. в условиях, приближенных к физиологическим; нет необходимости центрифугировать кровь и, следовательно, подвергать дополнительному механическому воздействию тромбоциты; выраженная гиперлипидемия не влияет на точность результатов исследования в отличие от оптических методов (Козловский, 2013).

Среди многочисленных методов определения адгезивности тромбоцитов наибольшее распространение получил метод определения ретенции на стеклянных шариках. Метод основан на подсчете числа тромбоцитов в венозной крови до и после ее пропускания с определенной скоростью через стандартную колонку со стеклянными шариками. Разница отражает степень адгезивности клеток. Для анализа берут свежую цитратную кровь. Исследование проводится в закрытой системе, так как соприкосновение

крови с воздухом, особенно в условиях перемешивания, существенно искажает результаты (Филиппова, 2012).

1.4.2 Метод исследования ретракции сгустка крови

Контракция (ретракция) кровяного сгустка – это его самопроизвольное сжатие под действием сократительных белков тромбоцитов. Несмотря на важность этого процесса для гемостаза и тромбоза, его систематическое изучение затрудняется отсутствием количественных методов. Контракция сгустка осуществляется за счет активного сокращения активированных тромбоцитов, которые прилипают к нитям фибрина, образуя трехмерный вязкоэластический каркас, и натягивают их. Основным сократительным белком тромбоцитов является мышечный миозин IIА. Прикрепление тромбоцитов к фибрину осуществляется через интегриновый рецептор $\alpha IIb\beta 3$ (прежнее название GPIIb/IIIa), который, в свою очередь, прочно связан с подвижными белками цитоскелета (Ложкин, 2014).

Контракцию можно визуально наблюдать *in vitro* по уменьшению объема сгустка свежесвернувшейся крови. Поскольку движущей силой контракции сгустка являются тромбоциты, этот процесс можно использовать как тест для характеристики их количества и функционального состояния. Снижение или отсутствие контракции сгустка описано при болезни Верльгофа, тромбоцитопении, эритремии, тромбастении Гланцмана и других тромбоцитопатиях.

Несмотря на научную важность и потенциальную диагностическую ценность этого явления, систематическое изучение контракции кровяного сгустка не получило широкого распространения, прежде всего из-за несовершенства существующих методов регистрации и оценки этого процесса. Степень контракции в подавляющем большинстве исследований, сравнительно не многочисленных, рассчитывается очень примерно по отношению объема выделившейся сыворотки к объему взятой крови (Ложкин, 2014).

1.4.3 Методы исследования системы гемостаза

Точность методов исследования системы гемостаза зависят в первую очередь от малотравматического набора крови и использования в качестве стабилизатора цитрата. В настоящей монографии дается систематизированный анализ параметров гемостаза на основе системы микротестов, большинство из этих тестов выполняется на образцах цельной крови. Вместе с тем гемолизат-агрегационный тест, количественное определение фактора Виллебранда проводятся на микроколичествах плазмы. Гемолизат - агрегационный тест отражает способность тромбоцитов к агрегации. Коагуляционный гемостаз представляет собой серию последовательных реакций, идущих при участии двенадцати белков, ионов кальция и фосфолипидов (Баркаган, 2008).

1.4.4 Влияние КВЧ -излучения на тромбоциты *in vitro*

Рассмотрение литературных данных о действии ЭМИ КВЧ на клеточном и субклеточном уровне может помочь конкретизировать представления о возможных путях восприятия организмами этого вида излучения. Имеются данные о способности КВЧ волн вызывать изменения гидратации белковых структур мембранных рецепторов. В работах показано умеренное ингибирующее влияние КВЧ облучения на функциональную активность (активацию и агрегацию) тромбоцитов в условиях *in vitro*. Наблюдаемый эффект ингибирования функциональной активности тромбоцитов опосредован рецепторо и мембранотропным действием КВЧ излучения на частотах молекулярного спектра поглощения и излучения (МСПИ) оксида азота. Основываясь на известных в настоящее время эффектах ЭМИ КВЧ на клетку, предполагается наличие мембранотропного действия излучения, а также влияния на активность биополимеров за счет изменения их конформации и гидратного окружения (Подоляко, 2000).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Характеристика объекта и материалы исследования

Исследования проводились *in vitro*, для чего использовалась кровь 30 белых лабораторных крыс, самок массой 250-300 г.

Животных содержали в виварии, оборудованном согласно требованиям Санитарных правил по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) №1045-73. Исследования осуществляли в соответствии с правилами проведения работ и использования экспериментальных животных (Приложение к Приказу МЗ СССР №775 от 12.08.77), Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях от 18 марта 1986 г. и ФЗ РФ "О защите животных от жестокого обращения" от 01.01.1997. Животные находились в

одинаковых пластиковых клетках с поилками, имели свободный доступ к достаточному количеству воды в поилках и полноценному экструдированному комбикорму. Световой режим вивария 12:12 (Каркищенко, Грачёв, 2010).

Работа выполнялась согласно инструкциям:

1. Инструкция по охране труда при использовании вытяжных шкафов. Рег. №2.

2. Инструкция по охране труда при работе на персональном компьютере для сотрудников и студентов. Рег. №21.

3. Инструкция по охране труда для студентов при выполнении работ с использованием электроприборов Рег. №123.

4. Инструкция по охране труда для сотрудников и студентов при работе с едкими веществами (кислоты, щелочи). Рег. №120.

5. Инструкция по охране труда при работе с легковоспламеняющимися (ЛВЖ) и горючими жидкостями (ГЖ) Рег. №30.

6. Инструкция по охране труда при работе с лабораторной химической посудой и ампулами. Рег. №4.

7. Инструкция о мерах пожарной безопасности от 26.10.2017.

8. Инструкция по охране труда при работе с лабораторными животными Рег. №190.

9. По охране труда для работников и аспирантов при выполнении работ с использованием электроприборов Рег. №121 (Каркищенко, Грачёв, 2010).

Первая группа исследований проводилась на пробах крови интактных крыс, которые не подвергались какому-либо воздействию на протяжении эксперимента.

Вторая группа исследований проводилась на пробах крови больных животных, которым воспроизводился острый эндометрит, путем введения аутокаловых масс.

Третья группа исследований проводилась на пробах крови крыс опытной группы:

Опыт 1 заключался в том, что кровь подвергалась КВЧ – излучению *in vitro* на 5 сутки после начала эксперимента.

Опыт 2 заключался в том, что кровь подвергалась КВЧ – излучению *in vitro* на 10 сутки после начала эксперимента.

Опыт 3 заключался в том, что кровь подвергалась КВЧ – излучению *in vitro* на 15 сутки после начала эксперимента.

Для исследования тромбоцитов кровь забиралась и подвергалась КВЧ-излучению *in vitro* на 5, 10, 15-е сутки после начала эксперимента.

Кровь забиралась из подъязычной вены на 5-е, 10-е и 15-е сутки эксперимента.

Для моделирования воспалительного процесса эндометрия крыс использовали раствор аутокаловых масс (Хейфец, 1999).

Аутокаловую взвесь готовили непосредственно перед экспериментом. Собирали кал половозрелых самок крыс. Кал смешивали с физиологическим раствором в пропорции 1:10 (Никонов, 1988), раствор дважды фильтровали сквозь марлевый стерильный материал.

Полученную свежеприготовленную эмульсию вводили крысам ректально на глубину 25 мм в объеме 1 мл с помощью устройства для ректальных вливаний (дозатора), обеспечивающего отсутствие травматичности процедуры (Никонов В. М., 1988).

2.2 Определение резистентности эритроцитов методом кислотных эритрограмм (Смирнова, 1995)

Определение кислотных эритрограмм проводится на фотоэлектроколориметре ФЭК-М.

Принцип метода:

Фотометрическая регистрация кинетики гемолиза эритроцитов в 0,002 Н соляной кислоты.

Ход определения:

Одну каплю крови помещают в пробирку с 4 мл физиологического раствора. Содержимое перемешивают, 2 мл взвеси отмеряют в кювету. Заметив время, смешивают взвесь эритроцитов в кювете с 2 мл 0,002 Н раствора соляной кислоты и точно через 30 с. делают первое определение экстинкции $E_{0,30}$. Затем каждые 30 с делают новое определение экстинкции $E_1, 30, E_2, 30$ и т.д., пока величина экстинкции не перестанет уменьшаться (E_H). Постепенное

уменьшение экстинкции, наблюдаемое через интервалы 30 с, следствие постепенного разрушения эритроцитов, причем сначала разрушаются те формы, резистентность которых к соляной кислоте слабее.

Процент уменьшения экстинкции вычисляют по простому тройному правилу, принимая разность $E_H - E_{0,30}$ за 100%. Процент распределения эритроцитов по стойкости изображают графически кривой зависимости процента эритроцитов от времени гемолиза – эритрограммой. Нормальная эритрограмма с 0,002 N раствором соляной кислоты у взрослых характеризуется слабым понижением ко второй минуте, быстрым повышением и максимумом к 3,5 мин с последующим медленным снижением и достижением нулевой линии к 7 минуте. Кривую можно разделить на 3 основных участка : участок от 7,5 до 5 минут соответствует среднеустойчивым эритроцитам и участок от 3,5 до 1,5 минут соответствует эритроцитам с пониженной устойчивостью старых форм в возрасте свыше 90 дней. Расширение эритрограммы вправо указывает на увеличение числа молодых эритроцитов, т. е. на наличие регенеративного процесса. Сдвиг эритрограммы и ее имаксимума влево указывает на появление в периферической крови эритроцитов с повышенной резистентностью и встречается при инфекционных заболеваниях и интоксикациях гемолитическими ядами (например пчелиным).

2.3 Осмотическая резистентность эритроцитов (Смирнова, 1995)

Под резистентностью эритроцитов понимают их свойство противостоять разрушительным воздействиям : осмотическим , химическим , механическим и пр. При этом пониженная резистентность соответствует повышенной хрупкости, а повышенная резистентность - пониженной хрупкости . Резистентность эритроцитов можно исследовать по отношению к различным воздействиям.

Принцип метода: определение осмотической резистентности эритроцитов основано на фотоэлектрическом измерении степени гемолиза в ряду растворов хлорида натрия.

Реактивы:

0,9 раствор NaCl

Ход определения:

Перед исследованием приготавливают в пробирках растворы хлорида натрия различной концентрации от 0,9 до 0,2 с интервалом 0,1. В каждую пробирку с 0,5 мл раствора добавляют по две капли свежей крови. Кровь лучше набирать пипеткой от гемометра Сали и вводить по 20 мкл.

Осторожным встряхиванием пробирки достигают равномерности взвеси и затем пробирки оставляют в штативе на 30 мин при комнатной температуре. После этого все растворы ряда промеряют на ФЕКе, определяя экстинцию для каждой концентрации при красном светофильтре. При красном светофильтре экстинция зависит только от

концентрации взвешанных в растворе частиц и практически не зависит от цвета гемоглобина.

Процент парциального гемолиза вычисляют, принимая за 100% разность между максимальной экстинцией и 0,1 % NaCl. Результаты опыта выражают графиком, на котором по оси абсцисс откладывают концентрации гемолизирующих растворов, а по оси ординат – соответствующие им величины процентов парциального гемолиза. Полученный график – эритрограмма выражает количественное распределение эритроцитов по группам стойкости. Он имеет вид одновершинной кривой с острым пиком и пологими краями. От 0,85% до 0,65% имеется небольшой максимум, затем идет крутой подъем к вершине основного максимума, который располагается в пределах от 0,50% до 0,44% раствора NaCl. Подъем в области 0,85% раствора соли связан с массовым подъемом эритроцитов в сфероциты, что предшествует гемолизу эритроцитов.

2.4 Потребление глюкозы эритроцитами (Чиркин, 2002)

Принцип метода:

Основным источником энергии для эритроцитов является глюкоза. В мембране эритроцита находятся переносчики глюкозы (гликофорин, GLUT- 1 сKm= 1-2 ммоль/л. Для оценки трансмембранного переноса определяют убыль глюкозы из среды инкубации, содержащей эритроциты.

Реактивы, исследуемый материал:

- 1) изотонический раствор NaCl 0,85 %;
- 2) фосфатный буфер - 0,1 М, рН 7,4 (7,16 г Na₂HPO₄ • 12 H₂O растворить в 100 мл H₂O ; 2,72 г KH₂PO₄ растворить в 100 мл H₂O; к 81 мл раствора Na₂HPO₄ добавить примерно 19 мл раствора KH₂PO₄ (рН 7,4) и довести объем дистиллированной водой до 200 мл);
- 3) инкубационная смесь , состоящая из 1 объема изотонического раствора NaCl и 1 объема 0,1 М фосфатного буфера , рН 7,4 . В инкубационную смесь добавляют глюкозу из расчета 12 мг на 10 мл смеси;
- 4) свежие эритроциты, отмытые 3 раза холодным изотоническим раствором NaCl и упакованные центрифугированием в течение 10 мин при 1500 об/мин.

Ход работы: смешивают 2 объема инкубационной смеси и 1 объем упакованных эритроцитов. Инкубируют 2 ч при 37°С , периодически встряхивая пробирку. До и после инкубации отбирают по 0,1 мл инкубационной смеси и определяют содержание глюкозы. Делают заключение об убыли глюкозы в процессе инкубации.

Концентрацию глюкозы рассчитали по формуле:

$$C = E_0 / E_k \times 10$$

C - концентрация глюкозы в опытной пробе, моль/л

E₀ - оптическая плотность опытной пробы, ед.опт.плотн.

E_к - оптическая плотность калибровочной пробы, ед.опт.плотн.

10- концентрация глюкозы в калибровочном растворе, моль/л

Статистическая обработка проводилась с использованием программы Excel и Т-критерия Стьюдента для парных сравнений. Результаты оценивались как статистически значимые при $p \leq 0,05$.

2.5 Определение ретенции (адгезивности) тромбоцитов (Баркаган, 1980)

Принцип метода: Среди многочисленных методов определения адгезивности тромбоцитов наибольшее распространение получил метод определения ретенции. Метод основан на подсчете числа тромбоцитов в венозной крови до и после ее пропускания с определенной скоростью через стандартную колонку. Для исследования берут свежевзятую цитратную кровь.

В полиэтиленовый или силиконированный стеклянный шприц набирают 2 мл крови, присоединяют к нему полихлорвиниловую трубку (колонку). Качают трубку 60 сек. Количество тромбоцитов определяют дважды: до и после пропускания крови через колонку. Индекс ретенции (адгезивности) тромбоцитов рассчитывают по следующей формуле:

$$ИР = (A-B/A) \cdot 100 (\%),$$

где ИР — индекс ретенции (адгезивности);

А — количество тромбоцитов в крови до пропускания;

В — количество тромбоцитов в крови после пропускания через колонку.

2.6 Определение ретракции кровяного сгустка (Макферлейн, 1970)

В градуированную центрифужную пробирку помещают 5 мл венозной крови. В нее погружают стеклянную палочку с шероховатой поверхностью, укрепленную вертикально при помощи пробки, закрывающей пробирку. Пробирку устанавливают на водяную баню при 37 градусах Цельсия. Через час после свертывания стеклянную палочку удаляют вместе со сгустком. Определяют объем оставшейся сыворотки и выражают его в процентах. Ретракция кровяного сгустка недостаточна или отсутствует при тромбоцитопениях и тромбоцитопатиях.

2.7 Гемолizat- агрегационный тест (Баркаган, 1980)

Принцип метода : Гемолizat эритроцитов является специфическим естественным индуктором агрегации тромбоцитов. В тесте определяют время появления видимых глазом агрегатов тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме после добавления к ней гемолизата в различных концентрациях.

Ход определения: кровь набирают в силиконированную пробирку, стабилизируют цитратом и отделяют богатую тромбоцитами плазму, а осадок эритроцитов отмывают дважды изотоническим раствором хлорида натрия в соотношении 1:1, центрифугируя каждый раз по 10 мин при 1500 об/ мин. После удаления изотонического раствора

хлорида натрия 0.1 мл отмытых эритроцитов гемолизируют в 1 мл дистиллированной воды. Это разведение является маточным и обозначается как 10^{-1} . Затем из него последовательными разведениями готовят разведения гемолизата от 10^{-2} до 10^{-6} , для чего 0.1 мл каждого предыдущего раствора вносят в заранее приготовленные пробирки с 1.0 мл дистиллированной воды. Рабочими являются растворы 10^{-2} (максимальная доза гемолизата) и 10^{-6} (минимальная доза). Исследуемую богатую тромбоцитами плазму разливают по 0.2 мл в две пробирки. После прогревания образцов в течение 1 мин при температуре 37 градусов в микротермостате в плазму добавляют 0.05 мл каждого из растворов гемолизата. Немедленно включают секундомер и при постоянном покачивании определяют появление видимых глазом в проходящем свете первых агрегатов тромбоцитов. Определяют время появления этих агрегатов.

Чтение результатов: Показания визуального теста выражают в секундах. Показатель агрегационной активности одного

тромбоцита (ААТ) определяют по формуле: $ААТ, \% = \frac{К}{Б} * 100$,

где К- нормальное количество тромбоцитов, соответствующее полученному времени агрегации ; Б- истинное количество тромбоцитов в исследуемой плазме. Степень активности тромбоцитов в ГАТ оценивают по индексу активации (ИАТ) по

формуле: $ИАТ = \frac{Кс}{Км}$, где Кс- нормальное количество

тромбоцитов, соответствующее времени агрегации при использовании минимальной дозы гемолизата, Км-аналогичный показатель для теста с максимальной дозой гемолизата.

Причины ошибок: 1) проведение теста при тромбоцитопении (менее $150 \cdot 10^9/\text{л}$) ; 2) проведение исследования через 20 мин и более после извлечения крови ; 3) проведение теста с плазмой, в которой уже образовались спонтанные агрегаты тромбоцитов или микросгустки фибрина

Нормативные показатели : время агрегации при исследовании максимальной дозы гемолизата - $13,8 \pm 0,5$ с (пределы нормальных показателей 11-17 с); для субпороговой дозы гемолизата - $46,8 \pm 3,4$ с (пределы нормы 40-54 с). Норма ААТм и ААТс - $100,0 \pm 2,4\%$ (пределы нормы 80-120%); ИАТ- $0,99 \pm 0,03$ (пределы нормы $0,82 \pm 1,17$).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Влияние КВЧ-излучения на морфо-функциональное состояние мембран эритроцитов (кислотную резистентность, осмотическую резистентность, на потребление глюкозы) крови крыс больных острым эндометритом в опытах *in vitro*.

В данной серии экспериментов было изучено влияние КВЧ-излучения *in vitro* на кислотную резистентность

эритроцитов здоровых крыс и крыс больных острым эндометритом.

Цифровые данные оптической плотности крови крыс вынесены в приложение, при математической обработке которых представляется возможным учесть стойкость эритроцитов и вывести эритрограмму.

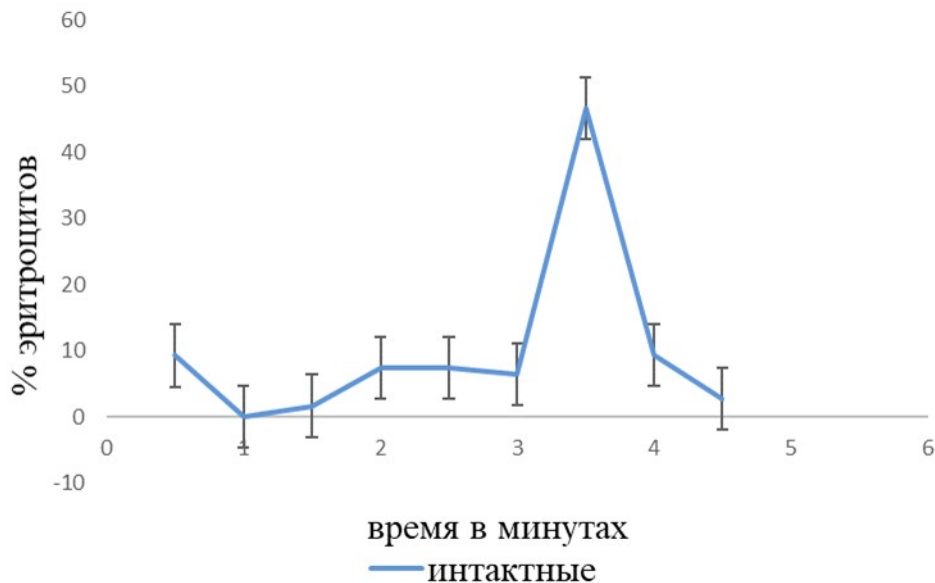


Рис. 7. Эритрограмма крови интактных крыс

Из анализа эритрограммы (рис. 7) видно, что начало гемолиза находится в первом 30-секундном интервале. Продолжительность гемолиза составляет 4,5 минуты с резким максимумом на 3,5 минуте. По форме эритрограмма асимметрична. Ее левое плечо характеризует наличие в крови исследуемого животного клеток, которые обладают пониженной стойкостью. Правое плечо указывает на то что клетки обладают повышенной стойкостью.

Если весь период гемолиза разделить на три части по времени (от 30 секунд до 2 минут, от 2 минут до 3,5 минуты и от 3,5 минуты до 5 минут), то это позволит выделить в исследуемой крови эритроциты трех различных групп стойкости: первая группа (продолжительность гемолиза от 30 секунд до 2 минут) — пониженностойкие эритроциты, вторая группа (продолжительность гемолиза от 2 до 3,5 минуты) — среднестойкие и третья группа (гемолиз продолжался от 3,5 до 5 минут) — повышенностойкие.

Нормальная эритрограмма с 0,002 Н раствором соляной кислоты характеризуется слабым понижением ко второй минуте, быстрым повышением и максимумом к 3,5 мин с последующим медленным снижением и достижением нулевой линии к 5 минуте.

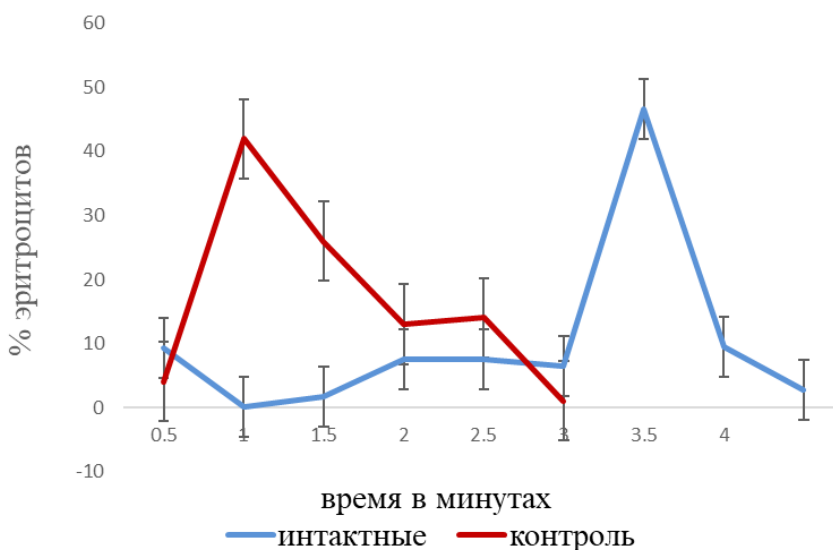


Рис. 8. Влияние острого эндометрита на изменение эритрограммы крови крыс

Из анализа эритрограммы (рис. 8) видно, что у крыс контрольной группы продолжительность гемолиза составляет 3 минут с резким максимумом на 1 минуте. Она характеризуется максимумом к 1 мин и с последующим медленным снижением и достижением нулевой линии к 3 минуте, чем она отличится от эритрограммы интактной группы крыс, которая характеризуется максимумом к 3,5 минуте. Это говорит о наличии клеток которые обладают пониженной стойкостью.

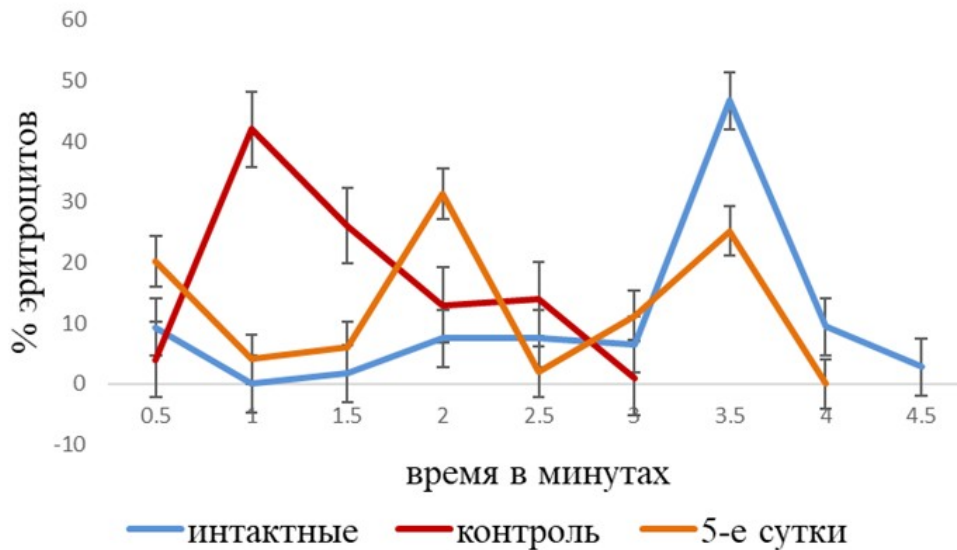


Рис. 9. Влияние КВЧ-излучения на кислотную резистентность эритроцитов крыс больных острым эндометритом в опытах *in vitro* на 5-е сутки эксперимента

Из анализа эритрограммы (рис. 9) видно, что продолжительность гемолиза у крыс больных острым эндометритом на 5-е сутки эксперимента составляет 4 минуты с резким максимумом на 2 и 3,5 мин. Из эритрограммы видно, что в крови преобладают

среднестойкие и повышеннотойкие эритроциты, чем она отличается от эритрограммы интактной группы крыс.

При КВЧ-излучении на 5-е сутки эксперимента число неустойчивых клеток уменьшилось.

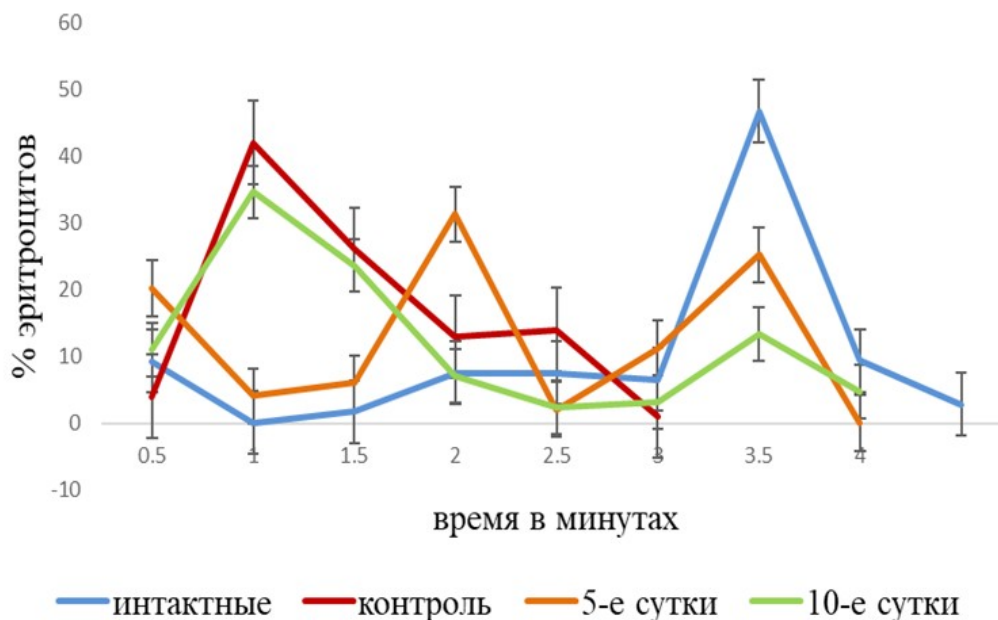


Рис. 10. Влияние КВЧ-излучения на кислотную резистентность эритроцитов крыс больных острым эндометритом в опытах *in vitro* на 10-е сутки эксперимента

Из анализа эритрограммы (рис. 10) видно, что продолжительность гемолиза у крыс больных острым эндометритом в опытах *in vitro* на 10-е сутки эксперимента составляет 4 минуты с резким повышением на 1 мин и последующим снижением до 2,5 мин и медленным повышением на 3,5 мин. Видно, что на 10-е сутки эксперимента в крови преобладают пониженнотойкие эритроциты по сравнению с экспериментом, который проводился на 5-е сутки, где в крови преобладают

среднестойкие и повышеннотойкие эритроциты, возможно, это связано с тем, что на 5-е сутки в пробирках остались клетки, которые благодаря собственной энергии способны поддерживать повышенную стойкость. На 10-е сутки в пробах остались только неустойчивые клетки.

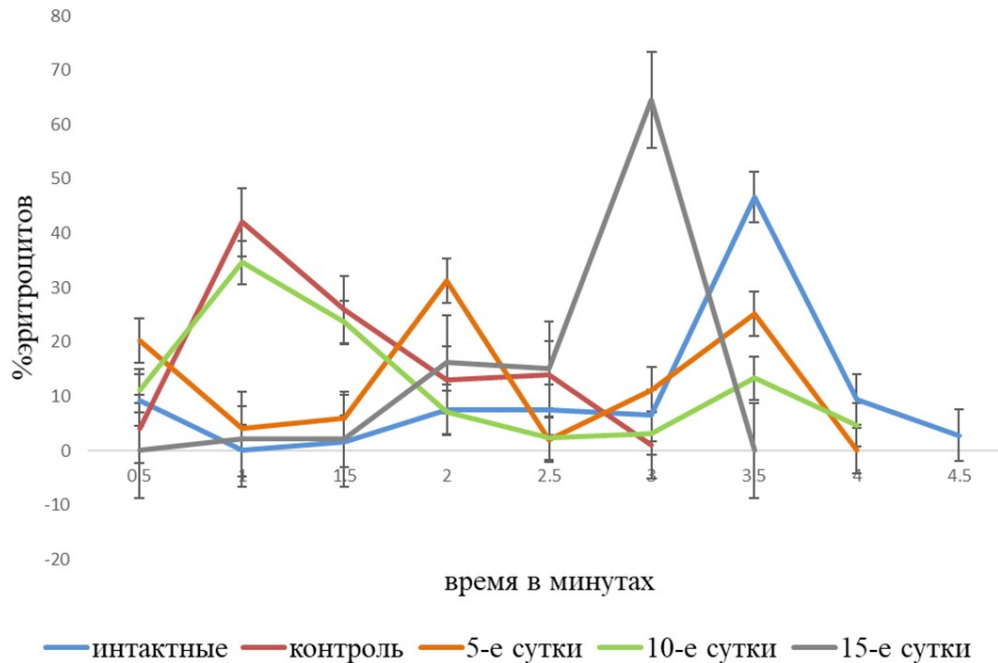


Рис. 11 Влияние КВЧ-излучения на кислотную резистентность эритроцитов крыс больных острым эндометритом в опытах *in vitro* на 15-е сутки эксперимента

Из анализа эритрограммы (рис. 11) видно, что продолжительность гемолиза у крыс больных острым эндометритом на 15-е сутки эксперимента составляет 3,5 минут с резким повышением на 3 мин и последующим снижением до 3,5 мин. Из эритрограммы видно, что в крови крыс интактной группы и крови крыс в опытах на 15-е сутки

эксперимента преобладают повышенностойкие эритроциты мембранах .

На следующем этапе эксперимента была исследована кровь лабораторных животных *in vitro* до и после их курсового лечения КВЧ-излучением. Цифровые данные вынесены в приложение, при математической обработке которых представляется возможным учесть стойкость эритроцитов и вывести эритрограмму.

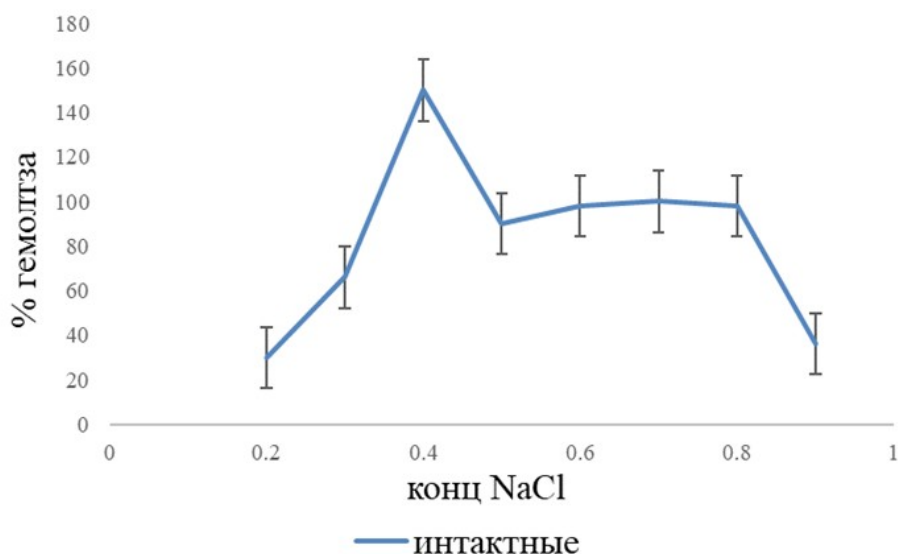


Рис 12. Эритрограмма крови интактных крыс

Полученный график - эритрограмма - выражает количественное распределение эритроцитов по группам стойкости. От 0,85 до 0,6% имеется небольшой максимум, затем идет подъем к вершине основного максимума, который располагается в пределах от 0,5% до 0,4% раствора NaCl. Подъем в области 0,8% раствора соли связан с массовым

подъемом эритроцитов в сфероциты, что предшествует гемолизу эритроцитов.

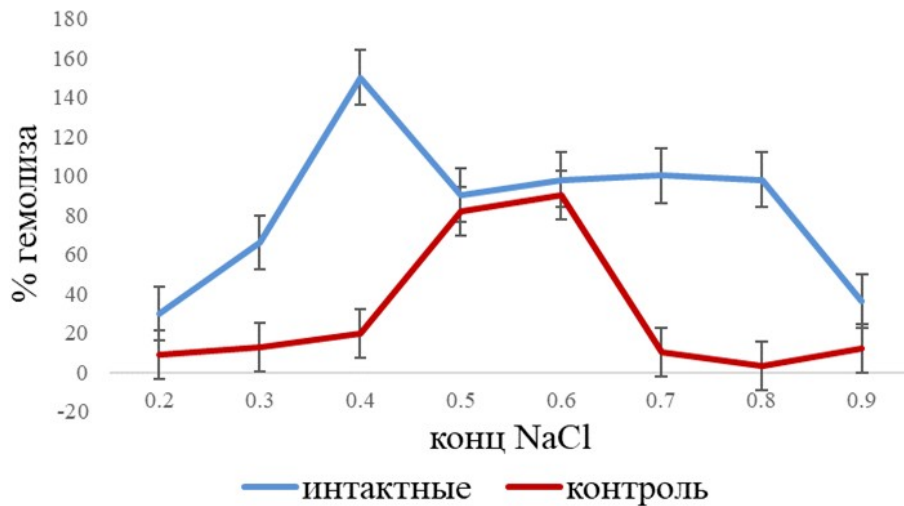


Рис 13. Влияние острого эндометрита на изменение эритрограммы крови крыс

Полученный график – эритрограмма выражает количественное распределение эритроцитов по группам стойкости. Количество разрушенных эритроцитов у крыс контрольной группы при действии 0,5 и 0,6 конц NaCl составляет 82-90% , а у крыс интактной группы при 0,4 конц NaCl идет подъем к вершине основного максимума.

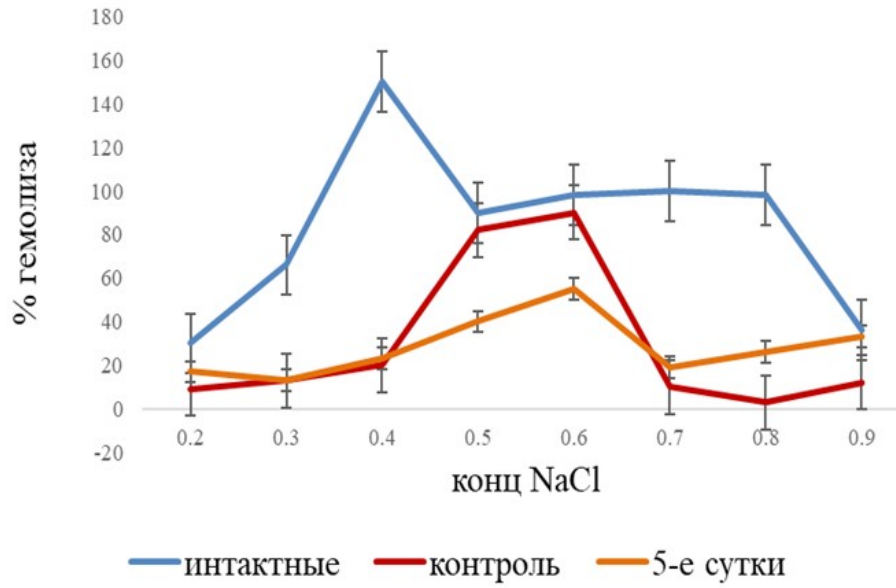


Рис 14. Влияние КВЧ-излучения на осмотическую резистентность эритроцитов крыс больных острым эндометритом в опытах *in vitro* на 5-е сутки эксперимента

Из графика видно что на 5-е сутки эксперимента в крови крыс в пределах от 0,5% до 0,6% растворов NaCl имеется максимум разрушения эритроцитов как и в крови контрольной группы крыс при такой концентрации растворов.

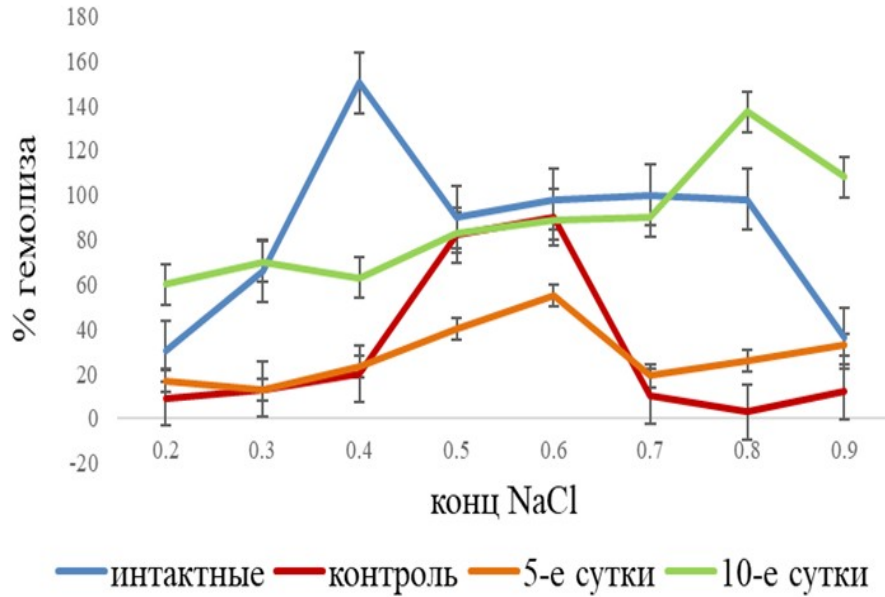


Рис 15. Влияние КВЧ-излучения на осмотическую резистентность эритроцитов крыс больных острым эндометритом в опытах *in vitro* на 10-е сутки эксперимента

Из эритрограммы видно что количество разрушенных эритроцитов в опытах на 10-е сутки эксперимента при действии 0,8 раствора NaCl составляет >100% по сравнению с крови крыс на 5-е сутки эксперимента где при такой же концентрации процент гемолиза менее 20% и именно такой результат говорит о наличии в эритроцитах наиболее существенных колебания количества АТФ (Камилов, 2007).

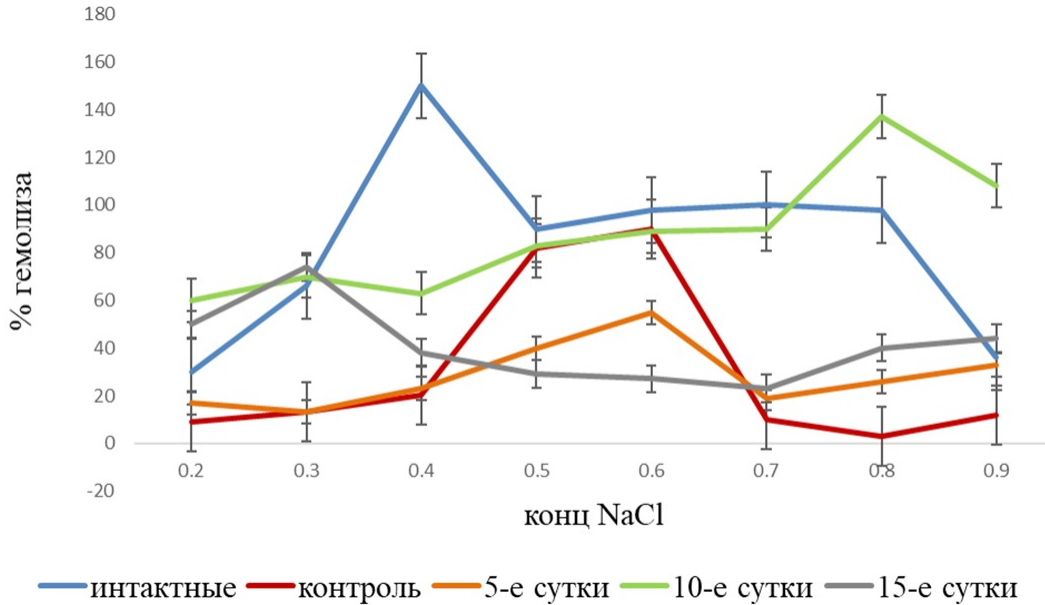


Рис 15. Влияние КВЧ-излучения на осмотическую резистентность эритроцитов крыс больных острым эндометритом в опытах *in vitro* на 15-е сутки эксперимента

На 15 день облучения процент разрушения эритроцитов возрастает при действии 0,2% и 0,3 % растворов NaCl.

Из выше изложенного видно, что гемолиз в контроле начинался в растворе NaCl 0,5% и 0,6% концентрации. У интактной группы животных разрушение эритроцитов происходило при 0,3 % NaCl.

В опыте гемолиз наступал при 0,5% NaCl на 5-е сутки КВЧ-лечения, при 0,8% NaCl на 10-е сутки КВЧ-лечения и 0,3% NaCl на 15-е сутки КВЧ-лечения что говорит о разной устойчивости опытных, контрольных и интактных эритроцитов к гемолизу.

У крыс больных острым эндометритом содержание глюкозы в крови в процессе инкубации повышается.

После КВЧ-излучения у опытной группы крыс на 5-е сутки содержание глюкозы в крови примерно как и у интактной группы. На 10-е и 15-е сутки эксперимента содержание глюкозы в крови ещё больше снижается.

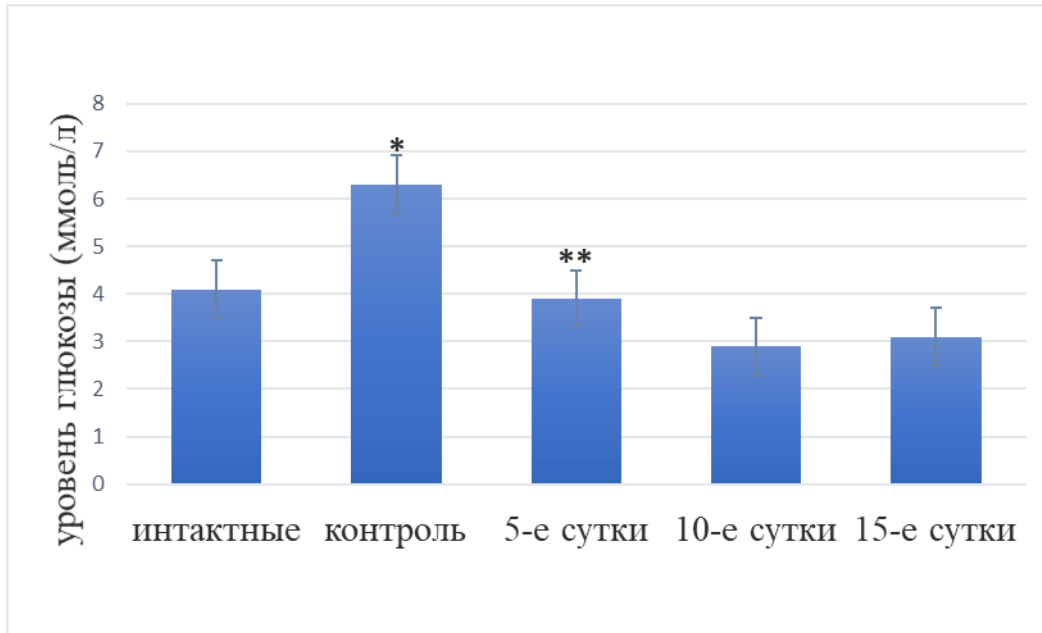


Рис 19. Концентрация глюкозы в крови крыс интактной, контрольной группах и на 5-е, 10-е и 15-е сутки после воздействия КВЧ-излучении опытах *in vitro*

Примечание * - $p \leq 0,05$ достоверно по отношению к интактной группе

** - $p \leq 0,05$ достоверно по отношению к контрольной группе

Результаты экспериментов показывают, что КВЧ-излучение оказывает действие как на кислотную и осмотическую резистентность эритроцитов так и на потребление глюкозы эритроцитами таким образом, что действует на структурные перестройки в организации

мембран эритроцитов, действует на процесс регенерации, что связано с характерными количественными и качественными изменениями липидов в эритроцитарных мембранах.

Ряд проведенных исследований показали, что облучение крови миллиметровыми волнами оказывает существенное влияние на осмотическую резистентность эритроцитов. После экспериментального КВЧ-воздействия на кровь *in vitro* параллельно со снижением количества эритроцитов выявлено увеличение их среднего диаметра, периметра, объема и снижение жесткости мембран (Капустина, 2002).

Можно предположить, что острое воспаление приводит к повышению уровня холестерина в мембране эритроцита и изменению фосфолипидного состава. Установлено, что основным фактором изменения фосфолипидного спектра клеточных мембран является перекисное окисление липидов мембран клеток. При изучении мембран эритроцитов было обнаружено и нарушение белок-липидных взаимодействий, изменение активности Ca^{2+} -АТФазы и снижение активности антиоксидантной системы эритроцитов. (Рязанцева, 2004).

Значительное увеличение концентрации глюкозы приводит к гликозилированию белков цитоскелета, гемоглобина и аминофосфолипидов внутреннего монослоя мембраны, что может сопровождаться нарушением целостности мембран эритроцитов.

3.2 Влияние КВЧ-излучения на морфо-функциональное состояние тромбоцитов (адгезивность, ретракцию кровяного сгустка, агрегацию) крови крыс больных острым эндометритом в опытах *in vitro*

Из результатов эксперимента видно что в крови крыс интактной группы индекс адгезивности составлял 42%, что соответствует норме. В крови крыс больных острым эндометритом наблюдали значительное увеличение количества тромбоцитов по сравнению с интактной группой. В опытах которые проводились на 15-е сутки после начала эксперимента доказали что КВЧ-излучение оказывает существенного влияния на процесс адгезии тромбоцитов, при этом индекс адгезивности достоверно снизился на 22%.

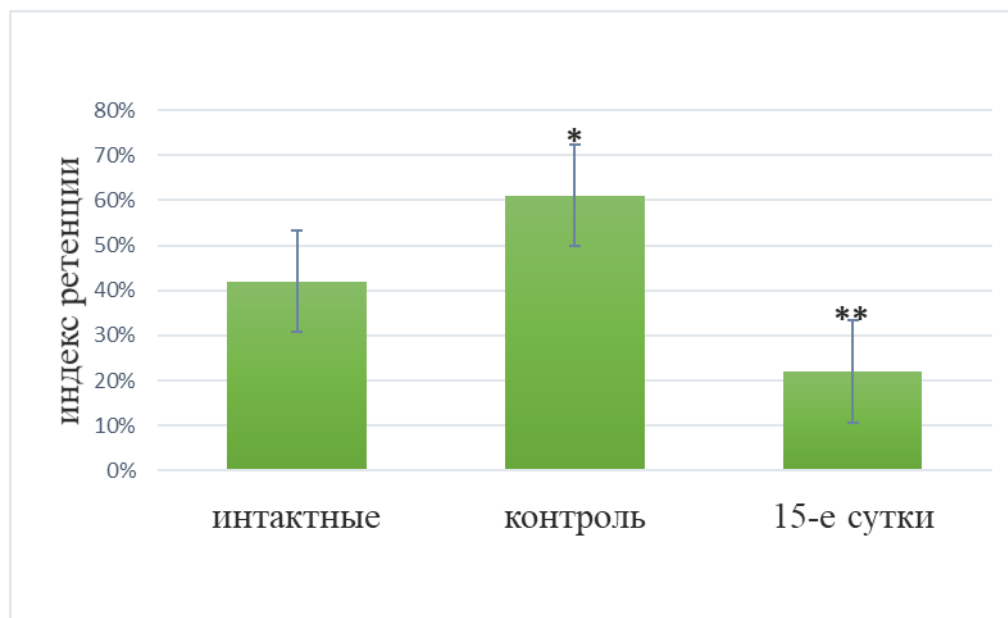


Рис 16. Индекс адгезивности в крови крыс интактной, контрольной группах и на 15-е сутки после воздействия КВЧ-излучении в опытах *in vitro*

Примечание * - $p \leq 0,05$ достоверно по отношению к интактной группе

** - $p \leq 0,05$ достоверно по отношению к контрольной группе

Увеличение объёма кровяного сгустка у крыс больных острым эндометритом было сопряжено со снижением его ретракции до 25%, по сравнению с интактной группой (45%). Под влиянием КВЧ-излучения наблюдали повышение ретракции до 35%, что говорит о эффективности воздействия КВЧ-волн на тромбоциты.

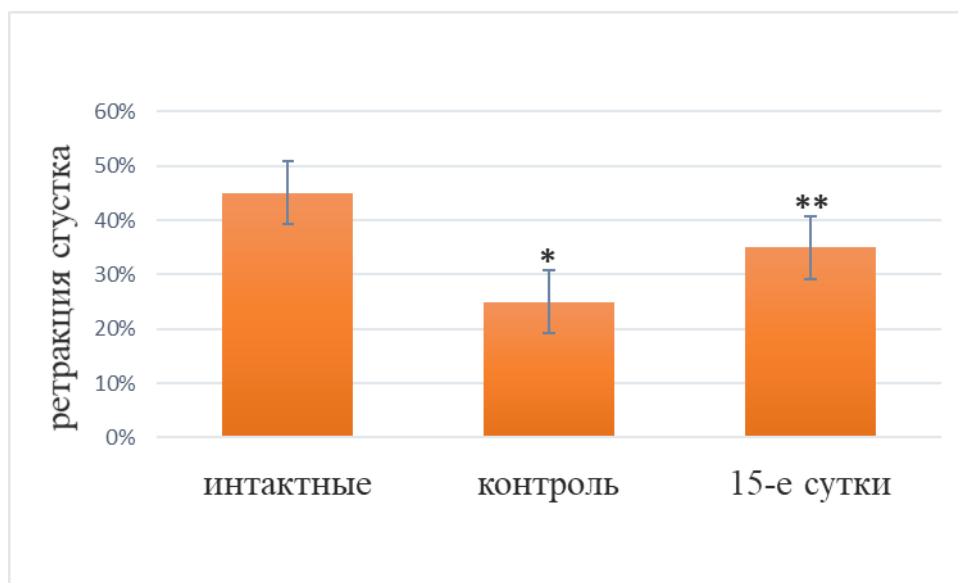


Рис 17. Ретракция кровяного сгустка в крови крыс интактной, контрольной группах и на 15-е сутки после воздействия КВЧ-излучения в опытах *in vitro*

Примечание *- $p \leq 0,05$ достоверно по отношению к интактной группе

** - $p \leq 0,05$ достоверно по отношению к контрольной группе

В крови крыс больных острым эндометритом в пробирках за короткое время появились видимые глазом агрегаты тромбоцитов. Время агрегации при исследовании максимальной и минимальной дозах гемолизата в крови крыс контрольной группы (16с и 66с) уменьшилось по сравнению с интактной группой (40с и 80с) что говорит о повышении агрегационной способности тромбоцитов.

Действием КВЧ-излучения на тромбоциты крови крыс в опытах *in vitro* наблюдали замедление скорости агрегации. Время агрегации при исследовании максимальной и минимальной дозах гемолизата составляло 35с и 70с.

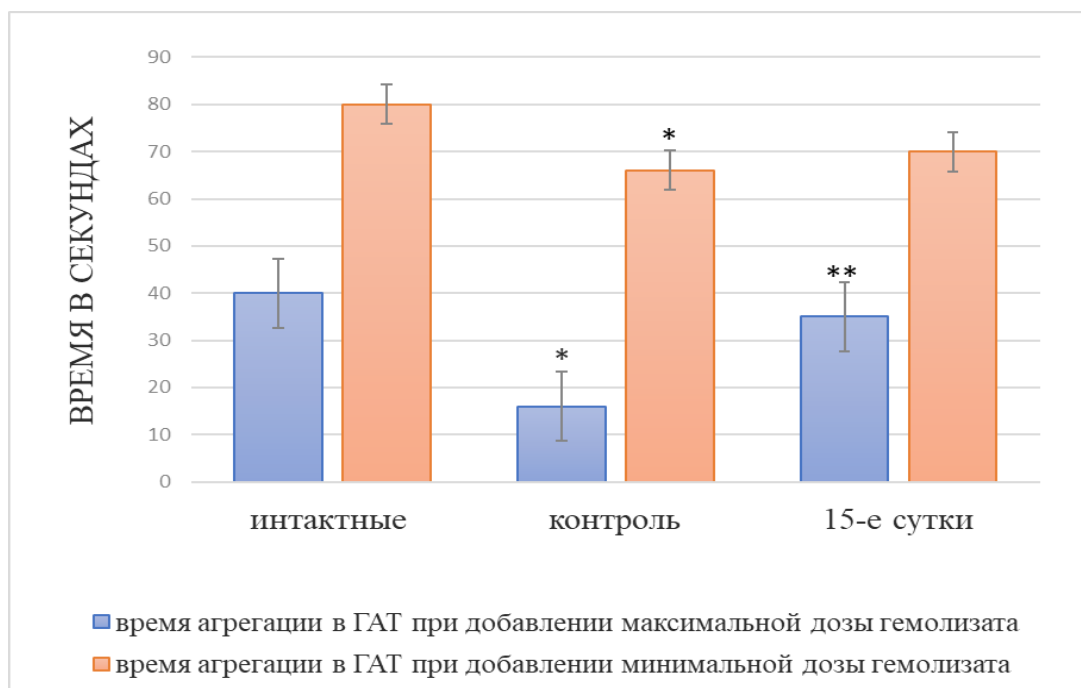


Рис 18. Время агрегации в ГАТ при добавлении максимальной и минимальной дозах гемолизата в крови крыс интактной, контрольной и опытной группах.

Примечание *- $p \leq 0,05$ достоверно по отношению к интактной группе

** - $p \leq 0,05$ достоверно по отношению к контрольной группе

Представленные данные свидетельствуют о возможности коррекции агрегационной способности тромбоцитов животных с помощью КВЧ-излучения. Показано что КВЧ-излучение изменяет функциональную активность тромбоцитов и тем самым снижает адгезию тромбоцитов.

Конформационные изменения кальциевых каналов может привести к уменьшению поступающих в клетку ионов Ca^{2+} , что также привело бы к уменьшению ответной реакции тромбоцитов. Данный механизм наиболее вероятен при рассмотрении ингибирующего влияния классических режимов КВЧ-воздействия на процесс активации тромбоцитов (Киричук, 2006).

ВЫВОДЫ

1. При создании альтерации «острый эндометрит» эритроциты крыс становились менее резистентны к солевым и кислотным растворам, а также увеличилось потребление глюкозы этими клетками. Адгезия и

агрегация тромбоцитов увеличились, а также увеличился и объем кровяного сгустка.

2. При действии КВЧ-излучении на 5-е и на 15-е сутки после моделирования альтерации выявили преобладание в крови повышеннотойких эритроцитов. На 10-е сутки - в крови преобладали пониженнотйкие эритроциты. На 5-е, 10-е и 15-е сутки, при воздействии КВЧ-излучения *in vitro* потребление глюкозы снижалось.
3. При действии КВЧ-излучении на 15-е сутки после моделирования альтерации выявили замедление скорости агрегации, повышение ретракции кровяного сгустка, а также снижение адгезивности тромбоцитов.

ПРИЛОЖЕНИЯ:

Приложение 1.

Влияние КВЧ-излучения на кислотную резистентность
эритроцитов крови крыс больных острым эндометритом в
опытах in vitro

Время экспозиц ии ,мин	Оптическая плотность, ед.опт. плотности				
	Интактн ые животн ые	Контрол . Группа	КВЧ-(5- е сутки)	КВЧ- (10-е сутки)	КВЧ-(15-е сутки)
0,5	0,11±0,0 1	0,12±0, 01	1,2±0.0 5	1,44±0. 04	0,12±0.00 6
1	0,10±0,0 2	0,11±0, 03	1±0.013	1,3±0.0 7	0,12±0.01 9
1,5	0,09±0,0 2	0,01±0, 112	0,96±0. 014	0,86±0. 014	0,11±0.03
2	0,09±0,0 4	0,04±0, 02	0,9±0.0 15	0,56±0. 06	0,11±0.02
2,5	0,08±0,0 15	0,03±0, 021	0,59±0. 015	0,47±0. 19	0,01±0.02 3
3	0,07±0,0 2	0,02±0, 01	0,57±0. 01	0,44±0. 03	0,06±0.01 1
3,5	0,07±0,0 6	0,02±0, 03	0,46±0. 02	0,4±0.0 4	0,02±0.01
4	0,02±0,0 12	0,02±0, 03	0,21±0. 01	0,23±0. 02	0,02±0.01
4,5	0,01±0,0 3		0,21±0. 01	0,17±0. 03	
5	0,01±0,0 3			0,17±0. 03	
5,5	0,01±0,0				

	3				
--	---	--	--	--	--

Приложение 2.

Влияние КВЧ-излучения на осмотическую резистентность в эритроцитах крови крыс больных острым эндометритом в опытах *in vitro*

Концентрация NaCl, %	Интактные животные	Контроль. Группа	КВЧ(5-е сутки)	КВЧ(10-е сутки)	КВЧ(15-е сутки)
0,2	0,02±0,0 1	0,01±0, 12	0,02±0,03	0,06±0.0 4	0.05±0.0 1
0,3	0,01±0,0 15	0,01±0, 2	0,01±0,02	0,07±0.0 2	0.07±0.0 03
0,4	0,03±0,0 2	0,02±0, 11	0,02±0,01	0,063±0. 047	0.04±0.0 23
0,5	0,07±0,0 4	0,08±0, 3	0,04±0,01 15	0,083±0. 056	0.03±0.0 03
0,6	0,04±0,0 14	0,09±0, 1	0,06±0,01 45	0,089±0. 071	0.03±0.0 17
0,7	0,05±0,0 3	0,01±0, 17	0,02±0,00 9	0,09±0.0 8	0.02±0.0 0
0,8	0,05±0,0 1	0,01±0, 1	0,03±0,01 15	0,137±0. 113	0.04±0.0 2

0,9	0,02±0,0	0,01±0,	0,03±0,01	0,108±0.	0.04±0.0
	2	13	7	097	27

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА:

1. Авдеенко В.С., Калюжный И.И., Креницкий А.П., Майбородин А.В., Тупикин В.Д. Изменение метаболических процессов в крови животных (in vitro) под воздействием ЭМИ КВЧ МСПИ О2 //Миллиметровые волны в биологии и медицине. № 3 . 2003. С. 2128.
2. Бецкий ОВ., Яременко Ю.Г. Миллиметровые волны и перспективные области их применения // Зарубежная радиоэлектроника. № 5, 2002. С. 19-28.
3. Блохина Т.А, Назаров С.Б. Воздействие некоторых плазменных факторов на реологические характеристики эритроцитов человека // Вестник Ивановской медицинской академии. Т. 13. №3-4. 2008. С.18-20.

4. Васильева Е.М. Биохимические особенности эритроцитов. Влияние патологии // Биомедицинская химия. Т. 51. №1. 2005. С.12-13.
5. Вдовин В.А., Муравьев А.В., Певзнер А.А. Способ определения агрегации клеток крови // Ярославский педагогический вестник. Т. 3 . №3. 2012. С.151-153.
6. Волкова С.А., Боровков Н.Н. Основы клинической гематологии. Н. Новгород: изд-во НижГМА , 2013. 400 с.
7. Воробьев А.И. Руководство по гематологии. М.: изд-во Ньюдиамед, Т. 3. 2005. 361 с.
8. Гапеев А.Б., Чемерис Н.К. Действие непрерывного и модулированного ЭМИ КВЧ на клетки животных. Обзор. Часть I. Особенности и основные гипотезы о механизмах биологического действия ЭМИ КВЧ // Вестник новых медицинских технологий.Т.1.2000. С.15-22.
9. Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В. Механизмы развития окислительного стресса при моделировании состояния дефицита ионов цинка в эритроцитах человека *in vitro* // Актуальные вопросы биологической физики и химии. С.: изд-во Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Севастопольский государственный университет", Т. 3. №1. 2018. С.115-122.
10. Горев Р.А., Смагулова З.Ш., Макарушко С.Г. Адсорбция белка, глюкозы и холестерина на эритроцитах при действиях гормонов // Вятский медицинский вестник. Т. 2. №2-3. 2005. С. 32-37.

11. Домушина Н.А., Дворянский С.А., Циркин В.И. Методы изучения агрегационной способности эритроцитов // Вятский медицинский вестник. №3-4. 2008. С.59-67.
12. Елемесов Р. Е., Акоев В. Р., Ким Ю. А. Влияние электромагнитного излучения на гемолиз эритроцитов , истощенных по АТФ // II съезд биофизиков России. Тезисы. М., 1999.
13. Заварзин А.А. Сравнительная гистология. СПб.: изд-во С.-Петербур. ун-та, 2000. 520 с .
14. Мазуров А.В. Физиология и патология тромбоцитов. М.: изд-во Литтерра, 2011. 480 с.
15. Мороз В.В., Голубев А.М., Афанасьев А.В., Кузовлев А.Н., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Черныш А.М. Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях // Общая реаниматология . Т. 8. №6. 2012. С.5.
16. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. Эритроцит при патологии: размышления у электронного микроскопа // Архив патологии. № 3.2004. С. 53-61.
17. Капустина Н.Б. Влияние низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ-диапазона с шумовым спектром на некоторые показатели гомеостаза человека и животных// диссертация канд.биол.наук. 2002.С.22.

18. Камилов Р.Ф., Шакиров Д.Ф., Кудрявцев В.П. Кислотная и осмотическая резистентность эритроцитов // Вятский медицинский весник. №4. 2007. С.106-108.
19. Каркищенко Н.Н., Грачева С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях // Альтернативы биомедицины. М.: изд-во Профиль-2С. 2010. 358 с.
20. Киричук В.Ф., Малинова Л.И., Креницкий А.П. Гемореология и электромагнитное излучение КВЧ-диапазона, С: изд-во Саратов. мед. ун-та, 2003.
21. Киричук В.Ф., Креницкий А.П., Майбородин А.В., Тупикин В.Д. Микроциркуляция и электромагнитное излучение ТГЧ-диапазона / Саратов: Изд-во СарГМУ. 2006. 391 с.
22. Козак М.В.-Возрастные изменения осмотической резистентности эритроцитов // Физиология Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. №2. 2010. С.648-652.
23. Кольман Я., Рем К.Г. Наглядная биохимия, М.: изд-во Мир, 2009. 473с.
24. Конощенко С. В., Мартоян М. М., Елкина Н. М., Мирмуминова З. М. Окислительная модификация протеинов и метгемоглобинообразование в эритроцитах в условиях моделирования окислительного стресса *in vitro* // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского Биология. Химия. Т. 4. №1. 2018. С.35-42.

25. Крылов, И. А., Клеменова, Н. Г. Медко // Белорусский мед 2002 : тез. докл 1-ой Междунар. конф. Минск, 2002.С. 47-48.
26. Кленова Н.А., Кленов Р.О.Строение, метаболизм и функциональная активность эритроцитов человека в норме и патологии // Гос. образовательное учреждение высш. проф. образования "Самарский гос. ун-т". 2009. 112 с.
27. Кривенцев Ю. А., Бисалиева Р. А., Носков И. А. Гемоглобины человека // Вестник АГТУ. №11-6. 2016. С.1081-1085.
28. Лилунова Е.А. Система красной крови . Белгор.: изд-во Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Белгородский государственный национальный исследовательский университет", 2004. 216 с.
29. Лысов В.Ф., Максимов В.И. Основы физиологии и этологии животных . М.: изд-во КолосС, 2004. 248 с.
30. Машковский М.Д. Лекарственные средства . М.: изд-во ООО «Издательство Новая волна», 2002. 540 с.
31. Мороз В.В.,Голубев А.М.,Афанасьев А.В., Кузовлев А.Н., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Черныш А.М., Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях // Общая реаниматология. Т. 8. №1. 2012. С.52-58.
32. Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л. Молекулярная биология . М.: изд-во Медицинское информационное агенство, 2003. 534 с.

33. Оловникова Н.И., Николаева Т.Л. Антигены эритроцитов человека, Гематология и трансфузиология. М.: изд-во Библиограф, 2001. С.95-100.
34. Орёл, Н. М. Функциональная биохимия крови, печени, почек, мышц. МНС.: изд-во БГУ, Т. 2. 2015. 150 с.
35. Погорелов В.М, Козинец Г.И. Лабораторно-клиническая диагностика анемий. М.: изд-во Медицинское информационное агентство, 2004. 152 с.
36. Подоляко В.Л., Макарич А.В., Янкелевич Ю.Д. КВЧ-модуляция *in vitro* реологических свойств крови больных в остром периоде ишемического инсульта // Миллиметровые волны в биологии и медицине. № 4 (20). 2000. С. 53-55.
37. Потапенко А.Я., Кягова А.А., Тихомиров А.М. Осмотическая устойчивость эритроцитов // Медицинские науки. №3. 2010. С.9-14.
38. Ройтман Е.В. Биореология. Клиническая гемореология. Основные понятия, показатели, оборудование // Клиническая лабораторная диагностика. №5. 2001. С.25-32.
39. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. Типовые нарушения молекулярной организации мембраны эритроцита при соматической и психической патологии // Успехи физиологических наук. Т. 3. №1. 2001. С.53-65.
40. Соколова И.А., Рыкова С.Ю. Агрегация эритроцитов: некоторые вопросы и гипотезы // Российский журнал биомеханики. Т. 15. №1. 2011. С.7-22.

41. Фирсов Н.Н., Климанова Н.В. , Коротаева Т.В. Степень зависимости периферического кровотока от изменения микрореологических свойств крови. Региональное кровообращение и микроциркуляция. Т. 9. №4. 2010. С.4-62.
42. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Метаболические особенности эритроцитов // Успехи современного естествознания. №1-2. 2015. С.192-194.
43. Чуюн Е.Н. , Джелдубаева Э.Р. Механизмы антиноцицептивного действия низкоинтенсивного миллиметрового излучения. Симферополь: изд-во Диайпи, 2006. 326 с.
44. Шифман Фред Дж. Патология физиология крови . М.: изд-во Бином, 2009. 446 с.
45. Шпакова Н.М., Нипот Е.Е., Шапкина О.А., Семионова Е.А., Орлова Н.В.- Влияние глюкозы на устойчивость эритроцитов млекопитающих к механическому стрессу // Доповіді Національної академії наук України. №3. 2015. С.142-147.
46. Шрамм Г. , Куличихин В.Г. Основы практической реологии и реометрии. М.: изд-во КолосС, 2003. 311 с.
47. Albert A. and Vera G. List Professor of Medicine, Tisch Cancer Institute, Hematology-Oncology Section, Department of Medicine, Icahn School of Medicine at Mount Sinai // Haematologica, 2014. P.345-349.
48. Choi B., Welch A.J. // Lasers Surg. Med. – 2001. – V. 29. – P. 351-359.

49. Saladin KS. Anatomy and physiology – the unity of form and function. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, 2004. P.52-62.
50. Sherwood L. Human physiology – from cells to systems. 5th ed. Belmont, Calif: Brooks/Cole, 2004. P.225-229.
51. Martin H. Steinberg, Bernard G. Forget, Douglas R. Higgs, Ronald L. Nagel, Disorders of Hemoglobin, 2001. P.63-66.
52. Perrotta S., Gallagher PG., Mohandas N.: Hereditary spherocytosis. Lancet , 2008. P.23-30.
53. Tanner M.J. Band 3 anion exchanger and its involment in erythrocyte and kidney disorses, 2002. 252 p.
54. <https://cyberleninka.ru/article/n/osobennosti-molekulyarnoy-struktury-membran-eritrotsitov/viewer?fbclid=IwAR2XTwEwYpDcGGsKAUQ8IfQgion3f57PKhYwPExpURtb52MNGQ7MWIXRvPw>.
55. <https://cyberleninka.ru/article/n/osobennosti-obmena-glyukozy-po-pentozofosfatnomu-puti-v-eritrotsitah-materey-i-novorozhdennyh-s-gerpesnoy-patologiey>
56. <https://jeb.biologists.org/content/jexbio/193/1/183.full.pdf>
57. <https://www.nature.com/articles/ncomms14750#abstract>