

*На правах рукописи*

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте прикладной физики РАН

ЯХНО ТАТЬЯНА АНАТОЛЬЕВНА

**АГРЕГАТНОЕ СОСТОЯНИЕ И КООПЕРАТИВНЫЕ РЕАКЦИИ  
КОМПОНЕНТОВ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ  
В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ**

03.01.02 - Биофизика

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

**Официальные оппоненты:** Доктор медицинских наук, профессор  
**Маевский Евгений Ильич;**

Доктор биологических наук, профессор  
**Кратасюк Валентина Александровна;**

Доктор биологических наук, профессор  
**Воейков Владимир Леонидович.**

**Ведущая организация:** Гематологический научный центр РАМН

Защита диссертации состоится « 15 » июня 2011 г. в 15-00 часов на заседании совета Д 002.093.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Учреждении Российской академии наук Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН по адресу: 142290, г. Пущино Московской области, ул. Институтская, 3, ИТЭБ РАН.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке НЦБИ РАН по адресу: 142290, г. Пущино Московской области, ул. Институтская, 3, ИТЭБ РАН.

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » марта 2011 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат физ.-мат. наук



Н.Ф. Ланина

Пущино - 2011

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Исследованию крови во всем мире ежегодно посвящаются тысячи научных работ. Информация о биохимических и иммунологических механизмах участия крови в выполнении своих функций постоянно обогащается. Однако ощущается явный недостаток внимания к физико-химическим процессам в такой сложной полидисперсной самоорганизующейся системе, какой является кровь. Применимы ли основные закономерности, выявленные для относительно простых дисперсных систем, к механизмам функционирования цельной крови (жидкой ткани) *in vitro* и *in vivo*? Существует ли кооперативность (коллективная согласованность) в изменении ряда физико-химических свойств плазменных белков и эритроцитов? Каким образом изменение агрегатного состояния белков крови влияет на ее реактивность к действию низкоинтенсивных раздражителей? Как различаются эти реакции в норме и патологии? Какая роль в этих изменениях принадлежит биологическим ритмам? Остаются открытыми такие, казалось бы, простые вопросы, как физико-химические аспекты СОЭ (В.Л. Воейков, 1998, В.Л. Воейков и соавт., 1998, R.L. Jugado, 2001), зависимость состояния эритроцитов от их концентрации в плазме (Л.К. Лайзан, 1977, W.-Ch. Wu et al., 2007), механизм агрегации эритроцитов и образования «монетных столбиков» (А.Л. Чижевский, 1980; R. Ben-Ami, et al., 2003; M.W. Rampling, et al., 2004). Показано, что развитие самых разнообразных патологических процессов в организме сопровождается изменением конформации молекул альбумина крови (Ю.М. Лопухин и соавт., 2000; Yu.A.Gryzunov, et al., 2008), изменением распределения коллоидных частиц по размерам в биологических жидкостях (А.Д. Лебедев и соавт., 1987; Ю.И. Бажора и соавт. 1998; М.В. Спиридонов и соавт., 2009, и др.) и изменением физико-химических свойств эритроцитов (В.А. Галенок и соавт., 1987; В.А. Левтов и соавт, 1982; S. Sakuta, S. Takamats, 1982, и др.). Это говорит о том, что при развитии патологии происходят неспецифические изменения агрегатного состояния компонентов крови. Причинно-следственные связи этих изменений на сегодняшний день остаются на уровне гипотез, хотя именно они составляют физико-химическую основу физиологических реакций крови в системе «Болезнь - Здоровье». Поэтому исследование агрегатного состояния и кооперативных эффектов компонентов цельной крови является актуальным и перспективным для восполнения пробелов в современных знаниях о физико-химических механизмах регуляции функций крови в норме и патологии.

Наряду с неспецифическими изменениями крови при различных заболеваниях, существуют также методы неспецифической терапии, способствующие выздоровлению пациентов, независимо от вида патологии. К таким методам принято относить, в частности, фототерапию

низкоинтенсивным красным светом (НИКС), в том числе, светом гелий-неонового лазера (Ю.А. Владимиров, 1994; В.В. Скупченко, Е.С. Милюдин, 1999). Есть мнение, что «запуск» восстановительных реакций организма начинается на уровне изменения физико-химического состояния биологических жидкостей (Б.И. Элькина и соавт., 1989; В.М. Генкин и соавт., 1990; С.Д. Захаров, А.В. Иванов, 2005). Поэтому исследование механизма терапевтического эффекта НИКС как модификатора агрегатного состояния крови представляет большой интерес.

Изменчивость реакции крови на облучение НИКС связывают с влиянием биоритмов (С.Л. Загускин, С.С. Загускина, 2005, И.А. Кокшаров, 1988). Исследованы ритмы золь-гель переходов в клетках и их изменения под действием облучения; предложен хронобиологический подход к проведению фототерапии (С.Л. Загускин, 2006). Тем не менее, по мнению физиков, исследующих механизм действия и опыт применения НИКС (Д.А. Рогаткин, В.В. Черный, 1999), «изучаемая система является неадекватно более сложной, чем предполагают наши современные методические подходы к проблеме» (с. 376).

Принимая во внимание, что кровь представляет собой сбалансированную (в норме) полидисперсную систему, можно предположить, что причиной нарушения агрегатного состояния крови при патологии является изменение соотношения объемных фаз ее компонентов, а также сдвиги таких управляющих параметров, как рН и ионная сила (осмолярность). Представляет интерес проследить за динамикой физико-химических свойств крови при изменении гематокрита, а также за динамикой агрегатного состояния белков плазмы при изменении соотношения концентрации компонентов в системе «белок – соль – вода» на модели высыхающей капли.

Капля жидкости, высыхающая на твердой смачиваемой подложке, представляет собой естественную модель самоорганизующейся системы с бесконечно большим разнообразием вариантов течения процессов в зависимости от внешних условий, а также от состава и структуры жидкости (R.D. Deegan et al., 2000; R.D. Deegan, 2000; Y. Popov, 2005; V. Ragoonanan, A. Aksan, 2008). Форма усеченного шара обеспечивает в капле наличие областей с разными термодинамическими условиями, что приводит к перераспределению компонентов жидкости по горизонтали - в результате развития течений термокапиллярной природы (R.D. Deegan et al., 2000; R.D. Deegan, 2000; W.D. Ristenpart et al., 2007; R. Bhardwaj et al., 2009) и по вертикали – в соответствии с их поверхностной активностью (Т.А. Яхно и соавт, 2004, 2005, 2007). В результате при высыхании капель сыворотки крови в первые минуты происходит вынос значительной части коллоидной фазы на трехфазную границу капли, в то время как неорганические соли остаются в центральной (жидкой) части и кристаллизуются по достижении соответствующего порога концентрации (В.Н. Шабалин, С.В. Шатохина,

2001; Т.А. Яхно и соавт, 2004; Yu.Yu. Tarasevich, 2005). Образование твердотельных отложений в высыхающей капле происходит центростремительно – в направлении от трехфазной границы к центру капли. По мере испарения воды и выноса коллоидной фазы на периферию, в жидкой части капли повышается концентрация соли и изменяется объемная доля белка, что должно отражаться на его агрегатном состоянии. Таким образом, исследование структурообразования альбумина в высыхающих каплях модельных белково-солевых водных растворов и естественных биологических жидкостях может дать информацию о степени агрегативной устойчивости белка в норме и патологии.

Изменение механических характеристик высохших капель биологических жидкостей у больных пациентов по сравнению с практически здоровыми людьми отмечен представителями отечественной медицинской науки (Е.Г. Рапис, 1976, Л.В. Савина, 1987; В.Н. Шабалин, С.В. Шатохина, 2001). Это следует из наблюдаемого визуально нарушения концентрической зональности капель, образования дефектов сплошности высохшей пленки и нарушения регулярного рисунка трещин, свойственного норме. В соответствии с данным методом, микроскопическому анализу подвергаются капли после довольно продолжительной процедуры высушивания (от двух суток и более). В связи с этим несомненный интерес представляет исследование динамики механических свойств капель биологических жидкостей в процессе высыхания, отражающей особенности самосборки их компонентов от нано- до микроуровня. Диагностическая информация, закодированная в этой динамике, может стать важным инструментом в оценке физико-химического статуса исследуемых жидкостей.

Исследование агрегатного состояния компонентов крови в норме и патологии, а также физико-химических механизмов реакции крови на воздействие внешних физических факторов, необходимо, как для углубления фундаментальных знаний о природе, так и для разработки ряда полезных приложений, основанных на этих знаниях.

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящей работы является выявление общих закономерностей изменений физико-химического состояния цельной крови в норме и патологии с позиций рассмотрения ее как открытой неравновесной полидисперсной самоорганизующейся системы.

Задачи исследования:

- 1) исследование зависимости физико-химического статуса цельной крови от концентрации эритроцитов в плазме;
- 2) исследование физико-химических механизмов нарушения агрегативной устойчивости альбумина крови при развитии патологических процессов в организме на модели высыхающих капель биологических жидкостей;

- 3) исследование динамики механических свойств капель биологических жидкостей в процессе высыхания как информативного параметра для оценки физико-химического статуса жидких сред;
- 4) исследование реактивности крови к воздействию низкоинтенсивного света красного и синего диапазона длин волн в норме и патологии;
- 5) выявление механизма терапевтического действия низкоинтенсивного красного света и возможности прогнозирования терапевтического эффекта.

**Методы исследования.** При решении поставленных задач были использованы следующие методы исследования: оптические (Spekord M-40); биохимические (продукты ПОЛ, SH-группы, общие липиды крови, перекисная резистентность эритроцитов); клинические (КЩС, СОЭ, физиологическое обследование, данные лабораторных анализов); морфологические (световая, фазово-контрастная и атомно-силовая микроскопия); биофизические (потенциометрия; полярография, ЭПР, ИК-спектроскопия, пламенная спектрофотометрия, определение механической резистентности, деформируемости и поверхностного заряда эритроцитов, определение вязкости плазмы, определение динамики акустомеханического импеданса высыхающих капель исследуемых жидкостей). Статистический анализ результатов проводился с использованием вероятностно-статистических критериев (Е.В. Гублер, 1978) и пакета программ «Stat graph». Достоверность и обоснованность полученных в работе результатов и выводов обеспечены и подтверждены сопоставлением данных, полученных *in vivo* и *in vitro*, разными методами: измерением оптической плотности, вязкости плазмы и определением СОЭ, изменением заряда мембран эритроцитов и их физико-химическими характеристиками, морфологическими и динамическими особенностями структуризации высыхающих капель биологических жидкостей. При анализе результатов учитывалось также их согласование с современными научными представлениями и экспериментальными фактами, полученными при обзоре отечественных и зарубежных информационных источников.

**Научная новизна.** Все результаты, полученные в рамках данной работы, являются новыми.

1. Выявлен комплекс взаимосвязанных реакций крови, как открытой полидисперсной самоорганизующейся системы (ткани), кооперативно (согласованно) изменяющихся при воздействии внешних или внутренних раздражителей, в норме и патологии.
2. Показано, что, как эритроциты, так и плазма, несут информацию о физико-химическом статусе крови. В ряду индикаторов физико-химического гомеостаза стоят такие взаимозависимые показатели как КЩС, ИСГ, ригидность (деформируемость) эритроцитов, их поверхностный заряд, СОЭ, вязкость крови, оптическая плотность и вязкость плазмы.

3. Выявлен периодический характер кооперативных изменений физико-химических свойств белков плазмы и клеток крови и связанное с этим изменение ее реактивности к действию низкоинтенсивного света.

4. Выявлено немонотонное изменение свойств крови при изменении гематокрита. Отклонение концентрации эритроцитов от нормы, как в сторону уменьшения, так и в сторону увеличения, влечет за собой каскад плазменно-клеточных кооперативных реакций, ведущих к усилению процессов ПОЛ и снижению стабильности эритроцитов. Показано, что емкость буферных систем крови, соответствующая нормальному объемному соотношению эритроцитов и плазмы, необходима для поддержания физико-химического гомеостаза.

5. Показано, что нарушение физико-химического гомеостаза, наблюдающееся при развитии патологического процесса в организме, приводит к снижению агрегативной устойчивости альбумина, сопровождающейся его коацервацией. Исследован механизм коацервации и предложена схема каскада фазовых переходов альбумина от молекул до коагуляционных структур микронных размеров. Коацервация альбумина является причиной повышения вязкости плазмы и снижения онкотического давления крови.

6. Показано, что, как морфологические, так и динамические особенности структуризации высыхающих капель плазмы и сыворотки крови обладают информативностью о физико-химическом состоянии жидких сред организма. Крошчатая структура периферической зоны и наличие коацерватных отложений на поверхности капель является морфологическим индикатором нарушения физико-химического статуса крови и неспецифическим маркером тяжести заболевания. Динамические параметры структуризации высыхающих капель биологических жидкостей содержат диагностическую информацию об их агрегативной устойчивости. Регистрация акустомеханического импеданса высыхающих капель позволяет получать информацию о физико-химическом статусе жидких сред и оценивать его количественно.

7. В основе механизма биологического действия света лежит изменение рН, влекущее за собой каскад неспецифических кооперативных реакций крови: изменение дисперсности белка (альбумина), заряда мембран эритроцитов, интенсивности перекисных процессов в мембранах и СОЭ. Воздействие НИКС на биологические объекты ускоряет или замедляет естественный ход происходящих в них спонтанных процессов, связанных с биологическими ритмами. В каждом случае, независимо от вида заболевания и когерентности источника, выздоровление сопровождается снижением содержания свободного гемоглобина в плазме, а обострение заболевания – повышением его уровня относительно исходного. Прогноз направленности реакции больного на предстоящий сеанс фототерапии может быть осуществлен по реакции его крови на облучение *in vitro*. В

качестве критерия эффекта может быть использована ИСГ. При ее снижении относительно контроля прогнозируется положительный эффект от сеанса облучения.

8. Механизм положительного терапевтического эффекта НИКС может реализоваться через разрушение коагулятов альбумина, присутствующих в крови больных. Эффект не зависит от когерентности источника и имеет пороговый характер в диапазоне терапевтических доз ( $10^2 - 10^4$  Дж/м<sup>2</sup>). Переход альбумина в молекулярную форму вызывает каскад кооперативных реакций, ведущих к восстановлению физико-химического гомеостаза и нормализации функций организма.

**Научно-практическое значение.** Результаты, представленные в диссертационной работе, являются вкладом в биофизику сложных систем, а также имеют прямое отношение к теории и практике нормальной и патологической физиологии крови. В работе наглядно продемонстрировано значение физико-химического гомеостаза крови как важнейшего патогенетического фактора и рассмотрены последствия его нарушения. Описан феномен коацервации альбумина. Разобран механизм образования коацерватов. Представлены схемы нарушения функций организма в связи с явлением коацервации альбумина в сосудистом русле и восстановление этих функций при удалении (разрушении) коацерватов. Выявлены основные факторы, ответственные за реактивность крови к действию НИКС, что радикально меняет тактику проведения фототерапевтических процедур при различных заболеваниях. Разработан способ контроля эффективности фототерапии, способ выбора оптимального диапазона длин волн для проведения фототерапии и способ прогноза эффективности фототерапии. Вклад в биологическую физику заключается также в исследовании механизмов самоорганизации высыхающих капель многокомпонентных жидкостей. Выявлена информативность динамических параметров структуризации высыхающих капель для оценки физико-химического статуса жидких сред. На основе полученных данных разработан новый методологический подход и создан прототип устройства для проведения количественного сопоставительного анализа биологических жидкостей. По материалам работы получено 6 патентов. Проект разработки метода и устройства «Высыхающая капля» стал лауреатом Евразийского инновационного и инвестиционного форума (Eurasia Innovation and Investment Forum 2006, Cleveland, Ohio, USA).

**Апробация работы.** Результаты работы были доложены в СССР и России на семинарах в ИПФ РАН, РФЯЦ-ВНИИЭФ (Саров); Центре Фотохимии РАН (Москва); 4-й Международной конференции по математическому моделированию (Москва, 2000); I Евразийском конгрессе «Медицинская физика-2001» (Москва); на V Всесоюзной конференции по лазерной химии (1992, Лазаревское); на I Международной конференции «Критерии самоорганизации в физических, химических и биологических

системах» (Суздаль, 1995); на III Биофизическом съезде России (Воронеж, 2004); в серии Всесоюзных и Международных конференций по применению лазеров в медицине (Самарканд, 1988, Киев, 1989, Переславль-Залесский, 1990; Новосибирск, 1990; Комсомольск-на Амуре, 1990; Брест, 1991); на I и II Троицких конференциях по медицинской физике (2004, 2006), на X междисциплинарной научной конференции «Нелинейный мир» (2005, Нижний Новгород); на II Съезде Общества клеточной биологии совместно с Юбилейной конференцией, посвященной 50-летию Института цитологии РАН (2007, Санкт-Петербург); на Международной конференции «Кинетика и механизм кристаллизации. Кристаллизация для нанотехнологий техники и медицины» (2008, Иваново); на VII Национальной конференции «Рентгеновское, Синхротронное излучения, Нейтроны и Электроны для исследования наносистем и материалов. Нано-Био-Инфо-Когнитивные технологии» (РСНЭ-НБИК, 2009, Москва); на Всероссийской конференции «Нелинейная динамика в когнитивных исследованиях» (2009, Нижний Новгород), на I Международной конференции «Drops – 2010» (2010, Астрахань); на Пленуме научного Совета РАН по биологической физике «Биофизика и нанотехнологии. Проблемы и перспективы» (Пушино, 2010г.); International Symposium “Topical Problems of nonlinear wave physics”, NWP-1&2 (St.-Petersburg-Nizhny Novgorod, 2005, Nizhny Novgorod-Moscow-Nizhny Novgorod, 2007); SPIE International Conference «Nonlinear Dynamics and Structures in Biology and Medicine: Optical and Laser Technologies» (Saratov, 1996 ). Результаты работы были также доложены за рубежом: IEEE International ultrasonic symposium (2003, Honolulu, Hawaii), INCOME – 2003 (Braunschweig, Germany); SPIE International Conference «Bioengineered and Bioinspired Systems» (2003, Maspolamas, Gran Canaria, Spain); PITTCON-2005 (Orlando, Florida, USA), SPIE International Conference «BIOS-2005» (2005, San Jose, California, USA); I Annual Conference «Chemistry, Physics and Biology of Water» (2006, Brattleboro, Vermont, USA); Eurasia Innovation and Investment Forum (2006, Cleveland, Ohio, USA).

**Личный вклад автора.** Идея диссертационной работы и ее реализация принадлежат автору. Однако выполнение данной работы в полном объеме было бы невозможным без сотрудничества с коллегами.

Материал Глав 2 и 4 был получен при консультативной и технической поддержке И.А. Кокшарова (ЦНИЛ НижГМА), связанной с отладкой методик прямой непрерывной потенциометрии крови и тестирования эритроцитов. Методику экспериментального геморрагического шока на собаках (Глава 2) проводила к.б.н. Е.И. Яковлева (ЦНИЛ НижГМА). Определение величин ЭПР-сигналов меди и железа проведено В.Н. Рухманом под руководством д.ф.-м.н. профессора В.Н. Генкина (ИПФ РАН). Определение содержания ряда элементов в образцах плазмы с помощью пламенной спектрофотометрии проведено к.б.н. Л.Б. Сноповой

(ЦНИЛ НижГМА). Данные атомно-силовой микроскопии получены при содействии к.ф.-м.н. А.В. Кирсанова (ИПФ РАН). Клинический материал, использованный при написании Глав 3 и 4 и 5, был получен при содействии д.м.н. профессора Г.Я. Левина (ННИИТО), д.м.н. профессора О.В. Корочкиной (НижГМА), к.м.н. доцента Н.А. Егоровой (НижГМА), д.м.н. профессора И.Г. Терентьева (НижГМА) и зав. лабораторией областного онкологического диспансера С.В. Сметаниной. Проведение фототерапевтических процедур и клиническое обследование пациентов до и после сеансов фототерапии осуществлялось в клинической больнице № 5 г. Нижнего Новгорода докторами: к.м.н. В.Ф. Новиковым, к.м.н. Н.Д. Гладковой и М.Б. Шибаловой. Техническая реализация метода акустомеханической импедансометрии (АМИ), его физическая интерпретация и алгоритмы обработки данных (вычисление индексов формы кривых АМИ) принадлежат А.Г. Санину (ИПФ РАН). Разработку базового программного обеспечения выполнил к.ф.-м.н. А.С. Пелюшенко (НИРФИ). Неоценимую помощь в организации и проведении экспериментов оказала О.А. Санина (ИПФ РАН). Измерение динамики ряда параметров высыхающих капель было проведено на оригинальных установках, сконструированных д.т.н. В.В. Казаковым. Разработка метода АМИ высыхающих капель и проведение его лабораторных испытаний осуществлялось при поддержке РФФИ: 01-01-0038-а (2001-2003, исполнитель); 02-04-49342-а (2002-2004, руководитель); 09-04-97077-р\_поволжье\_a (2009-2011, руководитель). Всем коллегам автор выражает глубокую признательность за отзывчивость и сотрудничество.

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

1. Существует немонокотное изменение свойств крови при изменении гематокрита. Ведущим параметром этих процессов является изменение рН. Отклонение концентрации эритроцитов от нормы, как в сторону уменьшения, так и в сторону увеличения, влечет за собой каскад плазменно-клеточных кооперативных реакций, ведущих к усилению процессов ПОЛ в гемолизате и снижению перекисной и механической устойчивости эритроцитов. Наличие гистерезиса при разнонаправленном изменении гематокрита указывает на кооперативность плазменно-клеточных реакций, направленных на поддержание гомеостаза и реализуемых в определенных границах клеточных концентраций при совместном участии буферных систем плазмы и эритроцитов.

2. В результате перераспределения компонентов высыхающих капель альбумино-солевых водных растворов, обусловленного физикой процесса, на определенном этапе высыхания происходит уменьшение объема коллоидной фазы (альбумина) в жидкой части капли при повышении ионной силы раствора. Это приводит к потере агрегативной устойчивости альбумина и коацервации. Предложен механизм фазовых переходов альбумина от нано- до микроуровня.

3. В сыворотке и плазме крови людей, больных различными заболеваниями, снижается агрегативная устойчивость альбумина и происходит его коацервация. Это является следствием изменения соотношения объемных фаз ее компонентов, а также сдвиги таких управляющих параметров, как рН и ионная сила (осмолярность). Коацерватная фаза обладает гидрофобными свойствами. Морфологическими маркерами коацервации являются крошковатость периферической зоны высохших капель и появление коацерватной массы в виде наплывов на их поверхности.

4. Динамические параметры структуризации высыхающих капель биологических жидкостей содержат информацию об их составе и структуре. Регистрация акустомеханического импеданса высыхающих капель позволяет проводить количественную оценку нарушения физико-химического гомеостаза больных на основе сравнения их с соответствующими показателями здоровых, что делает возможным проведение медицинской экспресс-диагностики.

5. Реакция крови на облучение низкоинтенсивным светом *in vitro*, оцениваемая по изменению оптической плотности плазмы, сорбции эритроцитами АС+, ИСГ и СОЭ, не зависит от когерентности источника и дозы в широком дозовом интервале. Величина и направленность этой реакции периодически меняется во времени. Исследуемые параметры меняются кооперативно и одновременно: сорбция эритроцитами АС+ и ИСГ изменяются однонаправленно, тогда как оптическая плотность плазмы в области поглощения белка изменяется противофазно им. Реактивность крови больных к воздействию НИКС выше, чем у доноров. Механизм биологического действия низкоинтенсивного света на кровь реализуется через изменение рН, которое сдвигает окислительно-восстановительный баланс крови в ту или иную сторону. Реакция крови на красный и синий свет часто бывает противоположной ( $p = 0,05$ ).

6. Биологический эффект НИКС при облучении *in vivo* не зависит от когерентности источника, вида облучения и дозы в широком дозовом интервале, поскольку имеет пороговый характер. Независимо от вида заболевания, положительный терапевтический эффект сопровождается снижением уровня свободного гемоглобина в крови, а отрицательный – его повышением. Терапевтическая эффективность облучения больного может быть предсказана заранее по результатам предварительного облучения его крови *in vitro*.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 60 работ. Из них 21 - в российских и зарубежных научных журналах и книгах, 13 – в трудах международных конференций, 20 – в виде тезисов международных и всероссийских конференций и съездов, 6 патентов на изобретения.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 317 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы

(глава 1), результатов собственных исследований (главы 2-5), заключения, списка цитированной литературы, включающего 511 источников отечественных и зарубежных авторов, и приложения. Работа иллюстрирована 157 рисунками и содержит 24 таблицы.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Во введении** обосновывается актуальность исследования кооперативных реакций крови в норме и патологии, а также их связи с реактивностью крови к воздействию внешних физических факторов. Описываются объект, предмет и методы исследования. Отмечаются научная новизна, практическая значимость и апробация работы.

**В главе 1** проведен обобщенный анализ литературы по вопросам, касающимся предмета исследования.

**В разделе 1.1.** рассмотрены кооперативные реакции белков и реактивность клеток к действию раздражителей. Дано подробное историческое описание развития представлений о способности живых клеток отвечать на стимулы разной природы одним и тем же стандартным комплексом структурных и функциональных изменений, что легло в основу создания отечественной школы физиологии клетки. Рассматриваются данные о фазности ответа клеток на действие раздражителя при нарастании его силы. Приводится информация о развитии этих представлений в наши дни в России и за рубежом.

**В разделе 1.2.** рассмотрены состав и основные функции крови, а также приводятся данные об основных физико-химических характеристиках плазмы и эритроцитов.

**В разделе 1.3.** рассмотрены классические и современные данные о свойствах дисперсных систем, основе их фазовой и седиментационной устойчивости. Приведены примеры комплексообразования при изменении объема коллоидной фазы, ионной силы раствора, рН, добавления полиэлектролитов и ПАВ. Рассмотрены процессы коагуляции и коацервации коллоидов. Особое внимание уделяется глобулярным белкам: распределению и плотности поверхностных зарядов на их молекулах, современным взглядам на физико-химические механизмы их взаимодействия в водных растворах.

**В разделе 1.4.** цельная кровь рассматривается с позиций открытой неравновесной полидисперсной системы. Приводятся прежние и современные гипотезы механизма агрегации эритроцитов, природы СОЭ, а также физико-химического взаимодействия белков плазмы с клетками крови в норме и патологии. Уделяется внимание феномену полимеризации альбумина и иницирующей роли полимерных комплексов в агрегации эритроцитов и активации функций моноцитов и макрофагов. Рассматривается взаимосвязь деформируемости и величины поверхностного заряда эритроцитов с вязкостью плазмы и крови.

**В разделе 1.5.** приведены отечественные и зарубежные литературные

данные о том, что самые разнообразные патологические процессы сопровождаются нарушением физико-химических показателей эритроцитов. На основании информации, полученной из литературы, и данных собственных исследований проводится объяснение физических механизмов самоорганизации высыхающих капель биожидкостей. Дается физическое обоснование различий их структуропостроения в норме и патологии.

**В разделе 1.6.** приведены данные о периодических колебательных режимах, существующих в системах живой и неживой природы. Рассматриваются хронобиологические схемы различных авторов. В рамках взаимосвязи реактивности организма с его нейро-гуморальным статусом, описываются основные положения общего адаптационного синдрома (Г. Селье, 1936) и неспецифические адаптационные реакции организма (Л.Х. Гаркави, 2006).

**В разделе 1.7.** приводятся данные литературы о физических механизмах взаимодействия НИКС с биологическими объектами. Описываются экспериментальные факты и различные гипотезы. Уделяется внимание понятию о фазотонном гомеостазе (В.В. Скупченко, Е.С. Милюдин, 1994, 1999) и обоснованию необходимости хронобиологического подхода к проведению фототерапии (С.Л. Загускин, С.С. Загускина, 2005).

**В заключении по главе 1** констатируется, что на уровне клетки установлено закономерное изменение физико-химических свойств протоплазмы (изменение мутности, вязкости, размера коллоидных частиц, гидрофильности – гидрофобности белков) при действии раздражителей различной природы. Показано, что эти изменения определяют устойчивость клетки к действию раздражителей. Изменения физико-химических свойств при воздействии раздражителей свойственны также растворам белков и искусственным гидрогелям, что говорит об универсальности механизма фазовых переходов макромолекул в растворе и их более древней (доклеточной) природе. На простых модельных растворах с помощью современных методов исследованы основные закономерности нарушения и поддержания агрегативной устойчивости дисперсных систем и физико-химические факторы, позволяющие управлять этими процессами. Эти закономерности начинают привлекаться в виде гипотез к объяснению некоторых реакций такой сложной неравновесной самоорганизующейся полидисперсной системы, какой является кровь (например, фазовая модель ассоциации эритроцитов, биологический эффект полимера как функция его размера). Однако отсутствие регулярных исследований в этой области не позволяет сказать определенно, насколько применимы основные закономерности, выявленные для относительно простых дисперсных систем, к функции цельной крови *in vitro* и *in vivo*. Исследование кооперативных реакций компонентов крови в норме и патологии прольет свет на механизм физико-химического гомеостаза, что важно для

правильного понимания механизмов функционирования крови.

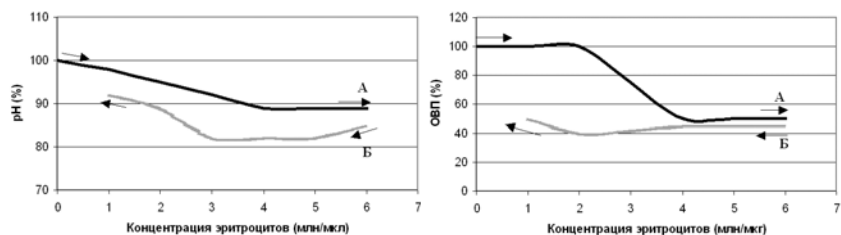
**Глава 2** посвящена исследованию плазменно-клеточных кооперативных эффектов цельной крови при изменении концентрации эритроцитов *in vitro* и *in vivo*.

**В разделе 2.1.** описываются материал и методы исследования. Материалом для исследований *in vitro* служила кровь доноров на консерванте «Глюгидир» (10 образцов), кровь доноров, взятая с гепарином (10 образцов) и гепаринизированная кровь собак (7 образцов). На модели геморрагического шока по Уиггерсу (7 собак) с последующим восполнением объема циркулирующей крови исследовано изменение физико-химических характеристик эритроцитов и плазмы. В число методов исследования входило проведение прямой непрерывной потенциометрии – определения pH и окислительно-восстановительного потенциала крови (ОВП) в процессе изменения гематокрита *in vitro*: а) при постепенном добавлении концентрированной суспензии эритроцитов в плазму; б) при постепенном разбавлении концентрированной суспензии эритроцитов плазмой той же крови. Измерение pH и ОВП проводили при комнатной температуре в потенциометрической ячейке при использовании стеклянного электрода (ЭСП-63-07) и платинового (ЭВП-1) для измерения ОВП. В качестве электрода сравнения использовали хлорсеребряный электрод (ЭВП-1МЗ). Изменение гематокрита производили либо дозированным дробным добавлением к плазме концентрированной суспензии эритроцитов, либо дробным добавлением к концентрированной суспензии эритроцитов определенного объема плазмы. «Впрыскивание» осуществлялось с помощью автоматической пипетки по 0,3 мл с частотой 1-3 раза в минуту. Непрерывную запись результатов измерений проводили на самописце. Сорбционные свойства поверхности эритроцитов оценивали спектрофотометрически (Spekord M-40) по изменению связывания катионного красителя альцианового синего (АС) относительно контроля (той же крови с исходно нормальным гематокритом). Проводилось также определение ряда физико-химических параметров крови при разных значениях гематокрита, воспроизведенных *in vitro*. Полученные данные обрабатывали на IBM-PC по программе “Stat graph”.

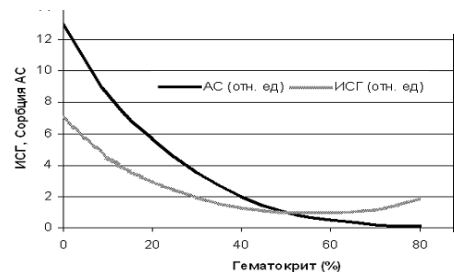
**В разделе 2.2.** приводятся результаты исследований. Исследования *in vitro* выявили различный характер динамики pH и ОВП крови в зависимости от направления изменения гематокрита (Рис. 2.1). При постепенном повышении концентрации эритроцитов происходит закисление суспензии и снижение ОВП. О содержании свободного гемоглобина в пробе судили по разности оптической плотности на длинах волн 412 нм (полоса Соре) и 370 нм (реперная точка). Рассчитывали ИСГ и сорбцию АС на единицу клеточной массы для проб с разным гематокритом (Рис. 2.2). Каскадный характер физико-химических изменений крови при снижении гематокрита *in vitro* иллюстрируют Рис. 2.4-2.7. По достижении

физиологических значений гематокрита оба показателя стабилизируются. При этом рН соответствует уровню физиологической нормы, а ОВП – минимальному значению в каждом опыте.

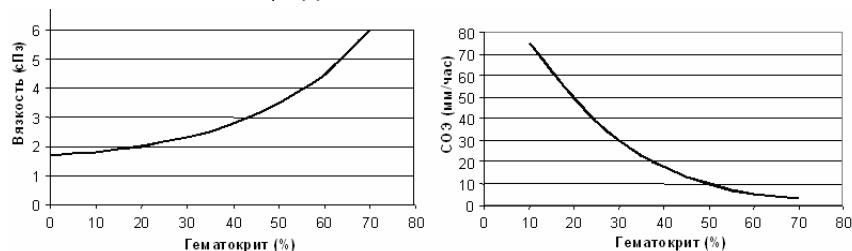
**Рис.2.1.** Динамика рН крови при изменении концентрации эритроцитов, % к рН



плазмы (слева), и динамика ОВП при изменении концентрации эритроцитов, % к ОВП плазмы (справа): А – при добавлении концентрированной суспензии эритроцитов к плазме; Б – при добавлении плазмы к концентрированной суспензии эритроцитов.

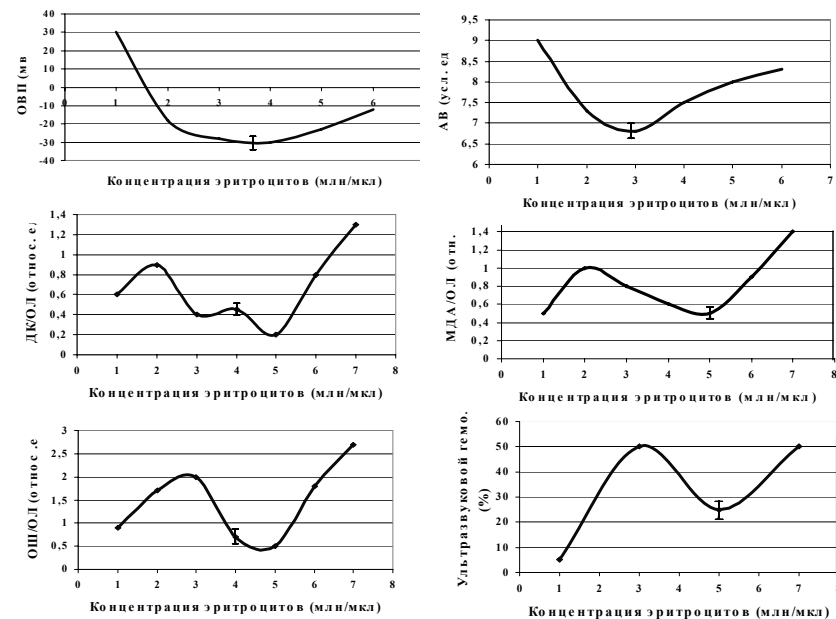


**Рис. 2.2.** Зависимость ИСГ и сорбции АС<sup>+</sup> эритроцитами от величины гематокрита, в расчете на условную единицу массы эритроцитов.



**Рис. 2.3.** Зависимость вязкости плазмы (слева) и СОЭ (справа) от величины гематокрита.

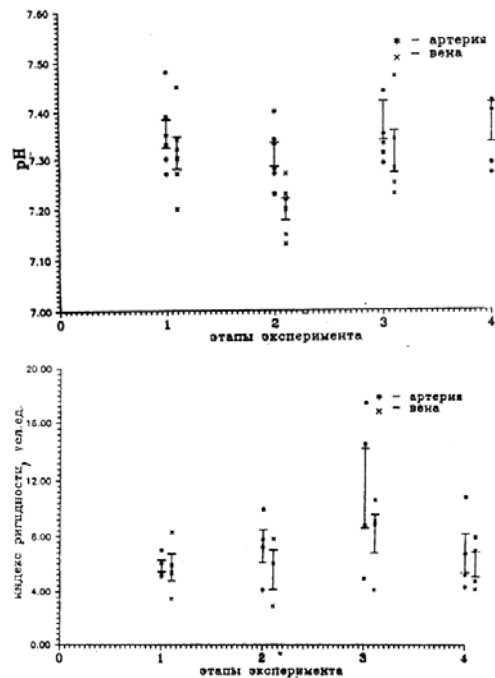
Снижение сорбции АС свидетельствует об уменьшении отрицательного заряда мембран с ростом концентрации клеток. Это сопровождается постепенным нарастанием вязкости плазмы и уменьшением скорости оседания эритроцитов (СОЭ). Интенсивность спонтанного гемолиза эритроцитов (ИСГ) наименьшее значение имела в пределах физиологического диапазона гематокрита (Рис. 2.3).



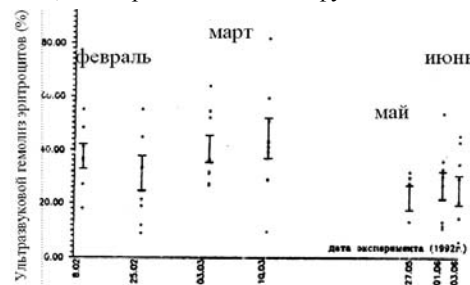
**Рис. 2.4.** Зависимость физико-химических показателей крови от концентрации эритроцитов в плазме: окислительно-восстановительного потенциала (ОВП), дефицита буферных оснований (АВ), концентрации продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов, малонового диальдегида и оснований Шиффа) в гемолизате, нормированных на общее количество липидов крови, и ультразвукового гемолиза.

Величина ультразвукового гемолиза эритроцитов, характеризующего их механическую резистентность, коррелировала с удельным содержанием продуктов ПОЛ, снижаясь в области нормальных концентраций эритроцитов (Рис. 2.4). Низкие значения показателей ПОЛ и ультразвукового гемолиза наблюдались также при крайне низких значениях концентрации эритроцитов (~ 1 млн/мкл). При этом ИСГ и окислительная способность плазмы оставались на максимально высоком уровне. Это противоречие, по-видимому, происходит из-за того, что очень низкая концентрация клеток приводит к некорректным результатам использованных методик. Диапазон изменений гематокрита от 40% до 50% (концентрация эритроцитов в плазме (3,5 – 5,0 млн/мкл) характеризуется оптимальным плазменно-клеточным балансом, обеспечивающим сдвиг окислительно-восстановительных реакций в сторону восстановления, что обеспечивает наилучшие условия для поддержания стабильности

эритроцитов. При этом щелочная среда плазмы в достаточной мере компенсируется кислыми продуктами клеточного метаболизма. Повышение концентрации эритроцитов выше нормы сопровождается небольшим повышением ОВП, снижением заряда мембран эритроцитов (снижением сорбции  $AS^+$  единицей клеточной массы), повышением вязкости плазмы и снижением СОЭ, повышением продуктов ПОЛ в гемолизате в расчете на единицу массы эритроцитов, повышением ультразвукового гемолиза



**Рис. 2.5.** Изменение pH крови (сверху) и IR эритроцитов (снизу) в артерии и вене на разных этапах эксперимента: 1- исходные данные; 2 – геморрагический шок; 3 - через час после инфузии полиглюкина; 4 - через час после реинфузии крови.

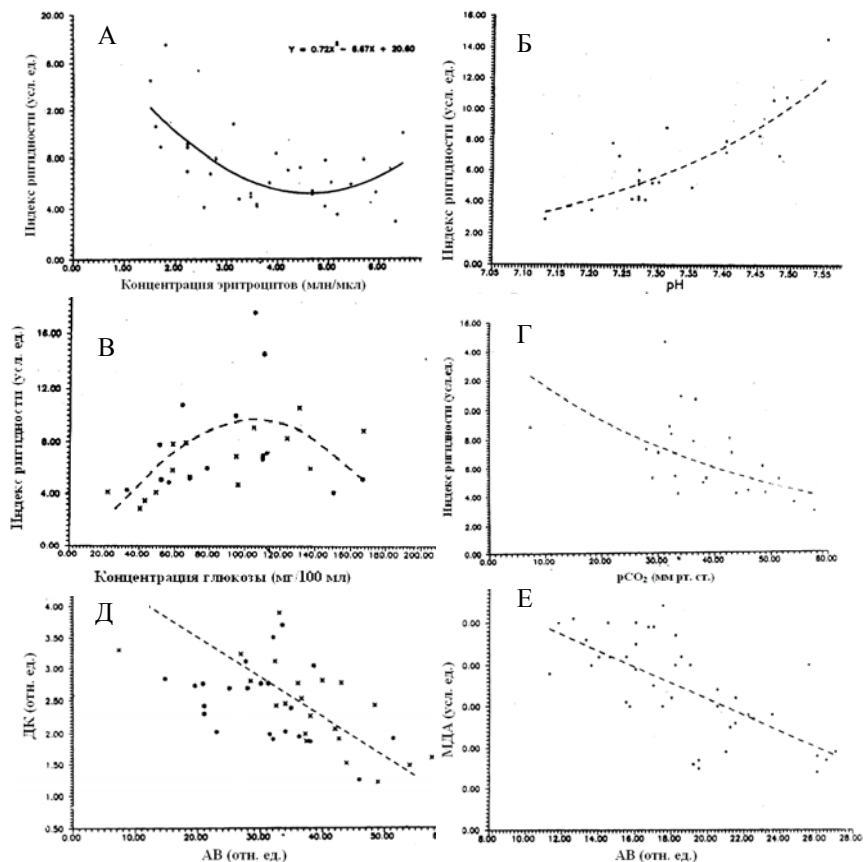


эритроцитов и небольшим повышением ИСГ по сравнению с нормой. При этом отмечается повышение вязкости плазмы и снижение СОЭ.

Результаты изменений pH и IR по 7 экспериментам воспроизведения геморрагического шока с последующим восполнением объема циркулирующей крови представлены на Рис. 2.5. Достоверное снижение pH, как в венозной, так и в артериальной крови, отмечено на стадии геморрагического шока. Через час после введения полиглюкина ригидность эритроцитов достоверно возросла, достигнув нормы только через час после реинфузии крови.

**Рис. 2.6.** Сезонные различия показателей ультразвукового гемолиза эритроцитов в крови собак.

Физические свойства эритроцитов меняются в течение года (Рис. 2.6).



**Рис. 2.7.** Зависимость индекса ригидности эритроцитов от их концентрации в плазме, (А) от величины pH (Б), от концентрации глюкозы (В) и парциального давления углекислого газа (Г); зависимость концентрации продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (Д) и малонового диальдегида (Е)– от дефицита буферных оснований (АВ).

**В заключении по главе 2** говорится, что изменение концентрации эритроцитов в крови, как *in vitro*, так и *in vivo*, является самостоятельным фактором модификации физико-химических параметров крови как единой системы. Причиной этого является более щелочная среда плазмы по сравнению с pH концентрированной эритроцитарной массы. Поскольку pH – это отрицательный десятичный логарифм молярной концентрации ионов  $H^+$ , увеличение pH, например, с 7,4 до 7,6, на самом деле означает удвоение концентрации  $H^+$  с 40 нмоль до 80 нмоль. Помещение в такую среду небольшой порции эритроцитов приводит к гиперполяризации их мембран,

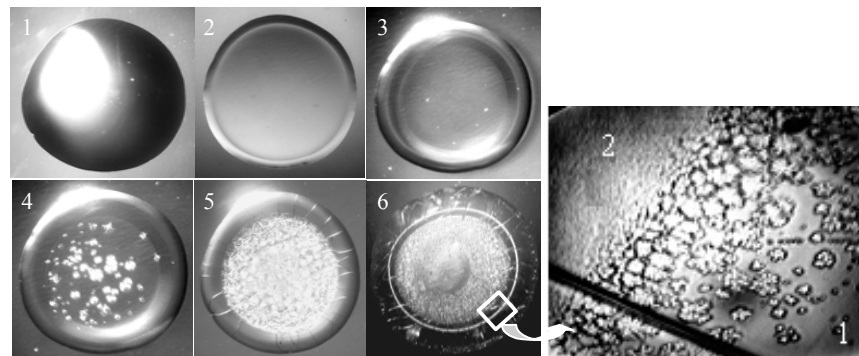
и, как следствие этого, повышению сорбции катионного красителя  $AS^+$ , усилению ПОЛ, повышению интенсивности спонтанного гемолиза и ригидности эритроцитов. Низкая вязкость плазмы и жесткие эритроциты способствуют высокой СОЭ. По мере добавления клеток в плазму происходит плавное снижение рН и ОВП суспензии. Постепенное снижение окислительного потенциала плазмы свидетельствует о смещении баланса в сторону реакций восстановления. В результате, по достижении области физиологических концентраций, мембранный потенциал и ригидность эритроцитов, показатели ПОЛ, ИСГ, рН и ОВП достигают минимальных значений, СОЭ существенно снижается. Отмечается постепенное повышение вязкости плазмы. Дальнейшее повышение концентрации эритроцитов в пределах физиологической нормы не вызывает существенных изменений физико-химических показателей крови, в связи с достижением области динамического фазового равновесия, поддерживаемого буферными системами крови. Повышение гематокрита до 60 – 70% приводит к повторному повышению показателей ОВП, ПОЛ и снижению механической резистентности эритроцитов по сравнению с нормой. Такие мощные факторы воздействия на клетки как изменение рН и ОВП не могут также не отражаться на функции и других клеток крови – лейкоцитов, моноцитов и лимфоцитов, исследование которых в рамках данной работы не проводилось. Функции эритроцитов подвержены сезонным колебаниям.

**В главе 3** приводятся результаты исследования физико-химических механизмов нарушения агрегативной устойчивости альбумина крови при развитии патологических процессов в организме на модели высыхающих капель биожидкостей.

**В разделе 3.1.** описываются материал, объем и методики исследования. Базовый модельный раствор представлял собой 7% (в) раствор бычьего сывороточного альбумина (68 кДа, “Sigma”, США) или сывороточного альбумина человека (67 кДа, рI 4,7, “Sigma”, США, № А-1653) в физиологическом солевом растворе NaCl (0,15 мМ, химически чистый, «Реактив», Россия) без использования буфера. В качестве растворителя использовали дистиллированную воду. Соотношение белка, соли и воды в таком растворе соответствует плазме крови. В клинической части работы общий объем обследованных пациентов составил 217 человек. Суммарно в разных сериях экспериментов исследовали плазму или сыворотку крови здоровых доноров (40 чел.), женщин в разных физиологических состояниях (108 чел.) и больных различными заболеваниями (69 чел.). Из них больных вирусным гепатитом - 17 чел., ожоговой болезнью - 30 чел., гнойными воспалениями - 7 чел., сочетанными травмами - 8 чел., парапротеинемическим гемобластозом – 7 чел., женщин с нормально протекающей беременностью – 33 чел., беременных с внутриутробной патологией развития плода – 15 чел., женщин после нормальных родов - 30,

после преждевременных родов (второй триместр) – 20 чел., с диагнозом «угрожающий выкидыш» - 10 чел.

**В разделе 3.2.** описываются результаты исследований. Характерные этапы высыхания капель БСА в физиологическом солевом растворе на твердой смачиваемой подложке представлены на Рис. 3.1. Через сутки высыхания капли на внутренней поверхности белкового валика можно наблюдать кольцо светорассеивающих структур.

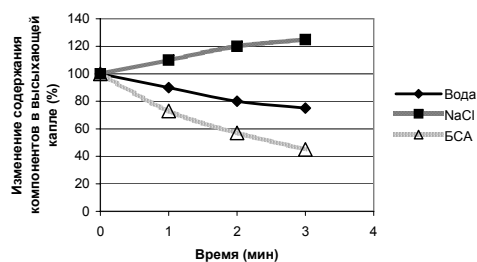


**Рис. 3.1.** Этапы высыхания капли альбумино - солевого раствора на предметном стекле (ув. x 10): 1 – жидкая капля; 2 – 3 – формирование белкового валика по периферии капли; 4 – начало процесса кристаллизации соли в полужидком геле; 5 – завершение кристаллизации соли; 6 – характерный вид капли на следующие сутки. Справа – выделенный фрагмент высохшей капли при большем увеличении (ув. x 280): структуры БСА в высохших каплях альбумин-солевого раствора. 1 – край капли, 2 – зона геля. Ув. x 140.

При рассмотрении области кольца с большим увеличением в проходящем свете в направлении от периферии к центру можно наблюдать сначала пленку белка гомогенной структуры, затем – расположенные на ней отдельные округлые агрегаты белка размером около микрона, далее – фрактальные кластеры, состоящие из подобных агрегатов, которые ближе к центру объединяются, образуя гель (Рис. 3.1, справа). Принципиально такая же картина наблюдается и в высохших каплях сывороточного альбумина человека. Рассмотрим причины образования структур альбумина на определенной стадии высыхания капель. В экспериментах, проведенных ранее [22], с помощью физического моделирования было показано, что доля альбумина, выносимого на периферию капли в первые минуты высыхания и быстро отвердевающего в виде белкового валика, составляет ~ 70 %. Соль остается в центральной зоне капли вплоть до кристаллизации. Формирование белкового валика в высыхающей капле 7% раствора БСА объемом 3 мкл занимает 4-6 минут. Прямыми измерениями показано [27], что в первые 3 минуты высыхания капля испаряется наиболее интенсивно,

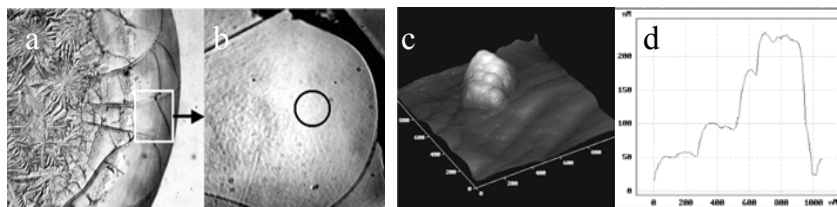
теряя 25% своей исходной массы. Средняя скорость испарения воды в начальный момент высыхания капли составляла 0,35 мг/мин. Затем, по мере формирования области насыщенного пара над поверхностью капли, скорость испарения снижалась и становилась линейной, составляя, приблизительно, 0,14 мг/мин. Исходя из этих данных, рассмотрим изменение соотношения основных компонентов в жидкой части испаряющейся капли в момент формирования белкового валика, приняв исходное содержание каждого компонента за 100% (Рис. 3.2).

Очевидно, что в результате испарения воды концентрация соли в жидкой (центральной) зоне капли растет, а концентрация альбумина при этом снижается вследствие опережающего выноса коллоидной фазы на периферию капли. В результате роста ионной силы раствора при одновременном снижении объема коллоидной фазы начинается фазовое расслоение (коацервация) альбумина. Для проверки этого предположения было проведено исследование нижнего адсорбционного слоя альбумина с помощью атомно-силовой микроскопии. Препараты готовили следующим образом (Рис. 3.3).



**Рис. 3.2.** Принципиальное изменение соотношения воды, соли и альбумина в жидкой части высыхающей капли в процессе формирования белкового валика.

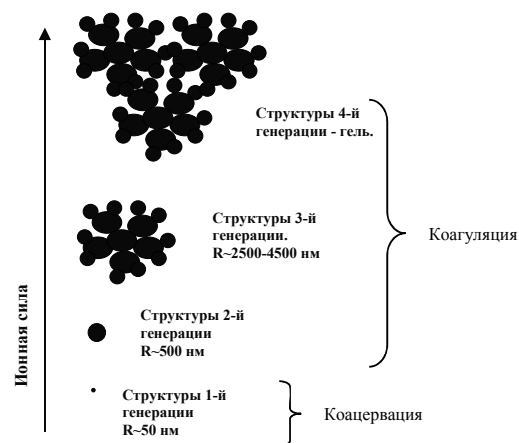
Верхнюю часть высохшего белкового валика подцепляли кончиком скальпеля и легко



**Рис. 3.3.** Фрагмент высохшей капли альбумино – солевого раствора (а, ув. х 20) и нижний адсорбционный слой на выделенном участке после удаления верхнего слоя (б, ув. х 40). Кругом обозначено поле исследования. С - коагуляционная структура альбумина ранней генерации, лежащая на нижнем адсорбционном слое; d – профиль ее продольного сечения.

отделяли от нижнего адсорбционного слоя альбумина. Область исследования располагалась с внешней стороны видимого в световой микроскоп кольца альбуминовых структур, где предполагалось найти

наиболее ранние генерации агрегатов белка. Результат представлен на Рис. 3.3. На основании экспериментальных данных схема эволюции структур альбумина может быть представлена следующим образом (Рис. 3.4).



**Рис. 3.4.** Принципиальная схема эволюции структур альбумина в высыхающей капле альбумино - солевого раствора.

По достижении порога фазового расслоения «жидкость - жидкость» (коацервации) образуются жидкие ассоциаты молекул альбумина с общей гидратной оболочкой. Капли вновь образованной фазы белка обладают большей концентрацией и

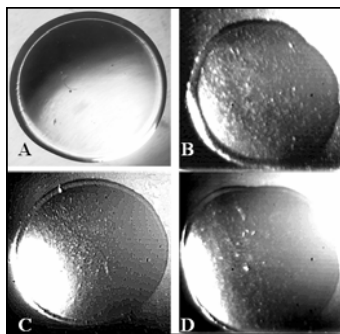
плотностью по сравнению с окружающим белковым раствором. По мере дальнейшего испарения воды и роста ионной силы раствора капли коацервата становятся более плотными, теряют способность к слиянию и начинают слипаться (коагулировать), образуя полутвердые агрегаты (структуры 2-й генерации, Рис. 3.3,с,d). При дальнейшем росте ионной силы начинается агрегация структур 2-й генерации с образованием фрактальных кластеров, формирующих, в конечном итоге, гель. При отсутствии соли в 7% растворе БСА структурообразования не происходит, и капля выглядит оптически однородной.

Таким образом, на модели высыхающей капли продемонстрирован феномен и предложен механизм коагуляции белка в альбумино-солевых растворах при снижении объема коллоидной фазы с одновременным повышением ионной силы раствора.

В сыворотке крови здоровых доноров образование альбуминовых структур происходило, как и в модельных жидкостях, лишь на определенном этапе высыхания капель. У лиц с тяжелыми заболеваниями, независимо от вида патологии, коагуляционные структуры уже существовали в пробирке. Эти структуры можно было наблюдать в жидких каплях при боковом освещении (Рис. 3.5).

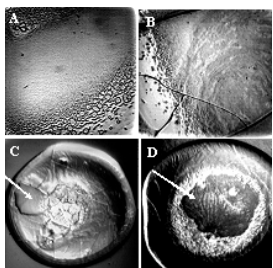
В сыворотке крови больного болезнью Вальденстрема, при которой единственным вырабатываемым иммуноглобулином является функционально неполноценный IgM, сыворотка в пробирке разделялась на две прозрачные фазы: менее плотную верхнюю и более плотную нижнюю. Образованные структуры оседали под действием силы тяжести. При

высушивании капль таких жидкостей часть структур расплавлялась, образуя гель, и отделилась от образующейся твердой фазы в виде единой коацерватной массы, располагающейся на поверхности капли (Рис. 3.6, 3.8).

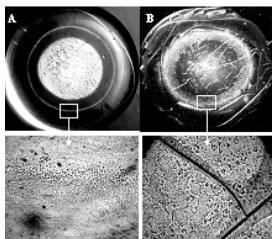


**Рис. 3.5.** Жидкие капли биологических жидкостей в начале высыхания (ув. х 20). А – сыворотка крови практически здорового донора; В – сыворотка пациента с хроническим гепатитом В и хроническим гепатитом С; С – плазма пациента с ожоговой болезнью; D – сыворотка пациента с коксартрозом.

Очевидное изменение характера структуризации альбумина можно наблюдать у женщин после преждевременных родов в ранний послеродовой период (Рис. 3.7) и у женщин с патологией беременности (Рис. 3.8). Нарушение нормального протекания беременности, вызвавшее преждевременные роды, сопровождается снижением агрегативной устойчивости альбумина, что проявляется в появлении в высохших каплях сыворотки большого количества агрегатов, в том числе, аномально крупных размеров. Это нарушает однородность (сплошность) твердой фазы и приводит к повышению хрупкости капль – множественному трещинообразованию. На капле отсутствует кольцо альбуминовых структур. Причина этого – коацервация альбумина уже в жидкой фазе, о чем свидетельствует микроскопическое строение краевой зоны капль.



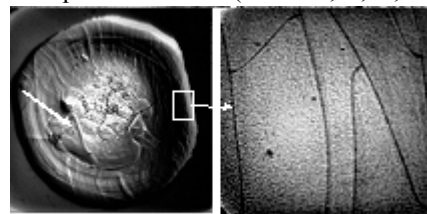
**Рис. 3.6.** Высохшие капли сыворотки крови больных пациентов. Верхний ряд - пептизация коацерватных структур: А - ожоговая болезнь (ув. х 140); В - вирусный гепатит В, острая желтушная форма (ув. х 140). Нижний ряд – коацерватная фаза на поверхности капль (показана стрелками): С – преждевременные роды – 26 недель беременности (ув. х 20); D – ожоговая болезнь (ув. х 20).



**Рис. 3.7.** Высохшие капли плазмы крови женщин в ранний послеродовой период: А – роды в срок (40 недель); В – преждевременные роды (34 недели); снизу – выделенные области при большем увеличении (ув. х 600).

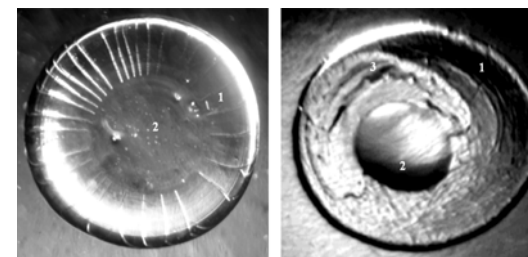
В процессе высыхания таких капль, при возрастании ионной силы раствора коацерватные

структуры подвергаются пептизации (Рис. 3.6, А, В) и образуют единую коацерватную массу, которая, в силу гидрофобности, выносятся на поверхность капли (Рис. 3.6, С, D; Рис. 3.9).



**Рис. 3.8.** Капля сыворотки женщины с диагнозом «внутриутробное нарушение развития плода» после преждевременных родов в 26 недель беременности. Стрелкой показан коацерват, лежащий на поверхности капли в виде отдельной массы.

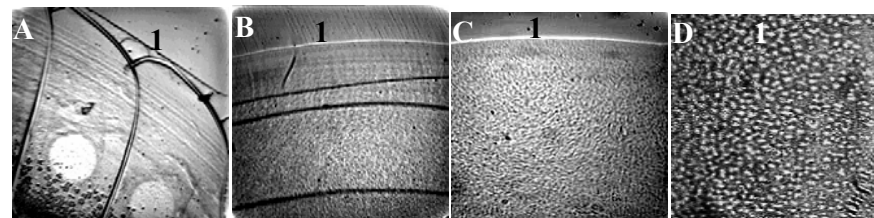
Справа – фрагмент краевой зоны капли, состоящий из микроструктур коагулировавшего альбумина (ув. х 70).



**Рис. 3.9.** Высыхающие капли сыворотки крови здорового донора (слева) и больного хроническим гепатитом В + хроническим гепатитом С, на одной и той же стадии высыхания. 1 – отвердевшая часть периферии капли. Остатки жидкой фазы в центре (2) в норме имеют плоскую форму, а при патологии – стремятся к сферической, в силу гидрофобности поверхности коагулята (3).

фазы в центре (2) в норме имеют плоскую форму, а при патологии – стремятся к сферической, в силу гидрофобности поверхности коагулята (3).

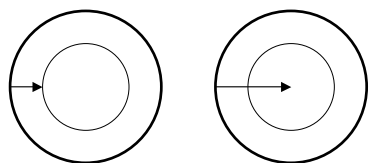
Рис. 3.10 демонстрирует микроскопическое строение краевых зон высохших капль здорового донора и больных пациентов. Видно, что периферический слой однородного белка на периферии капль, за которым следует слой альбуминовых структур, переходящий в гель, присутствует только в норме. У больных ожоговой болезнью и парапротеинемией периферический слой капль состоит из микроскопических коагуляционных структур альбумина, придающих ему зернистую фактуру.



**Рис. 3.10.** Периферические зоны высохших капль сыворотки. А – здорового донора; В и С – больных ожоговой болезнью; D – больного парапротеинемией (гиперпродукция генетически неполноценного IgG). 1 – край капль.

Таким образом, несмотря на очевидные различия в патогенезе таких заболеваний как ожоговая болезнь, вирусный гепатит, макроглобулинемия, коксартроз и патология беременности, отмечено сходство в характере структуризации альбумина при высыхании сыворотки крови. Коацервация альбумина и образование коагуляционных структур представляется общим неспецифическим проявлением нарушения физико-химического гомеостаза. Коагулировавший белок приобретает гидрофобную поверхность, благодаря чему коацерватная масса всегда располагается на границе с воздухом.

Рассмотрим динамические параметры структуризации высыхающих капель. Образование твердофазных отложений начинается с трехфазной границы. Будем называть его фронтом структуризации. По мере высыхания линия фронта продвигается от периферии к центру капли. Окончанием высыхания капли будем считать момент окончания кристаллизации соли в центральной части, доступный визуальному наблюдению. У здоровых людей, как правило, путь фронта структуризации равен радиусу капли. У больных, чаще всего, путь фронта заканчивается раньше, поскольку ближе к центру начинается граница рыхлых гелеобразных отложений. Кристаллизация соли в таких каплях начинается диффузно в геле после определенного латентного периода, связанного с испарением воды из геля (Рис. 3.11).



**Рис. 3.11.** Схематическая иллюстрация продвижения фронта структуризации в высыхающих каплях сыворотки крови больных (слева) и здоровых (справа) пациентов. Внутренний круг обозначает зону кристаллизации соли.

Результаты измерений динамических параметров высыхающих капель сыворотки крови в норме и патологии представлены в Табл. 3.1.

**Таблица 3.1.**

Динамические параметры структуризации высыхающих капель сыворотки крови в норме и патологии (\* $p = 0,05$ )

Группа	Колич. (чел)	Время высыхания (мин.)	Вср. (мм/сек.)
Здоровые доноры	10	20,8	0,22
Больные (суммарно)	40	25,0*	0,15*
Ожоговая болезнь	15	25,5*	0,16*
Гнойная хирургия	7	25,7*	0,16*
Сочетанная травма	8	22,6	0,16*
Вирусный гепатит В, С	10	23,0	0,13*

Таким образом, капли больных людей сохли дольше, чем здоровых. Средняя скорость продвижения фронта структуризации в каплях у больных людей была достоверно ниже, чем у здоровых. Это согласуется с данными о коагуляции альбумина в крови больных. При лечении ожоговой болезни в клинике широко применяются методы экстракорпоральной гемокоррекции, в частности, плазмаферез, плазмасорбция, криоаферез и криопреципитация. Производится также фотомодификация крови с помощью фототерапии НИКС. В диссертации приводится шесть конкретных примеров изменения ряда биохимических показателей и динамики структуризации высыхающих капель плазмы крови у больных до и после процедур экстракорпоральной гемокоррекции, а также фотомодификации крови *in vitro* низкоинтенсивным красным или синим светом. Приведем два из них.

**Пример 1.** Больная Г., 5 лет, с диагнозом «ожоговая болезнь в стадии токсемии», до и после двухнедельного лечения в стационаре. Биохимические показатели крови данной больной представлены в Табл. 3.2. Как видно из таблицы, в начале заболевания практически все исследованные показатели находятся в границах нормы.

**Таблица 3.2.**

Лабораторные показатели больной Г. до и после лечения

Показатели	11.09.00	25.09.00	Норма
К/Na	3,33/144	3,71/147	4-5/135-155 (мэкв/л)
Глюкоза	4,63	4,0	3,6 - 6,1 (ммоль/л)
Мочевина	4,62	4,36	2,5 - 6,43 (ммоль/л)
Креатинин	56,9	Данных нет	61,9 - 132,0 (мкмоль/л)
Билирубин: общий / прямой	11,04/2,51	7,63/2,65	3,42 - 17,20 / 0,00 - 3,42 (мкмоль/л)
Общий белок	66,1	69,9	60-83 (г/л)
Альбумин	36,1	43,9	35-53 (г/л)
AST	18,2	17,1	9,0 - 48,0 (МЕ/л)
ALT	10,7	27,8	5,0 - 49,0 (МЕ/л)
Холестерин	2,47	3,93	< 5,2 (ммоль/л)
IgA	2,5	Данных нет	2,28±0,04 (МЕ/мл)
IgM	2,5	Данных нет	1,67±0,06 (МЕ/мл)
IgG	11,8	Данных нет	11,99 (МЕ/мл)

**Таблица 3.3.**

Динамические параметры высыхающих капель плазмы крови больной Г.

Дата	В ср. (мм/мин)	В макс. (мм/мин)	Путь фронта (мм)
11.09.00	0,04	0,08	0,40
25.09.00	0,05	0,24	1,28
Криопреципитация <i>in vitro</i>	0,12	1,28	2,23

Содержание альбумина соответствует нижней границе нормы, содержание IgA и IgM несколько повышено. Через две недели лечения в условиях стационара содержание альбумина повышается до средненормальных значений. Исходно в высохших каплях плазмы больной присутствует коагулят. Как процедура лечения, так и процедура криопреципитации, воспроизведенная *in vitro*, привели к исчезновению коагулята с поверхности капель. Это отразилось в динамике их структуризации (Табл. 3.3).

**Пример 2.** Больной К., 25 лет. Цирроз печени алкогольного генеза, сформированный, субкомпенсированный, умеренной активности. Облучение *in vitro* производили (после темновой адаптации проб в течение 1 часа) низкоинтенсивным светом красного ( $\lambda = 600-800$  нм) или синего ( $\lambda = 400-500$  нм) диапазона длин волн в дозе 100 Дж.

В капле исходной сыворотки коагулят имел округлые очертания и занимал большую часть поверхности капли. После облучения сыворотки отложения коагулята имели неровные края, площадь их сократилась примерно вдвое. Изменение динамики структуризации капель отражено в Табл. 3.4.

**Таблица 3.4.**

Динамические параметры структуризации высыхающих капель сыворотки крови больного К. до и после облучения

Проба	V ср. (мм/мин)	V макс. (мм/мин)	Время высыхания (мин)
Исходная	0,07	0,20	34
Красный свет	0,14	0,65	25
Синий свет	0,15	0,60	23

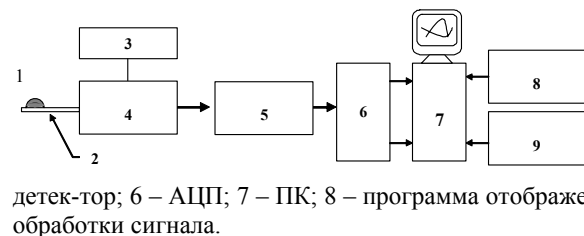
**В заключении по главе 3** сказано, что использование модели «высыхающей капли» позволило выявить каскад фазовых переходов альбумина при высыхании модельных альбумино – солевых растворов и рассмотреть механизм этих превращений. Показано, что причиной фазового расслоения модельной жидкости (образования коацерватов) на определенном этапе высыхания является уменьшение содержания альбумина при повышении ионной силы раствора в жидкой части капли. При дальнейшем испарении воды и повышении ионной силы раствора коацерватные капли становятся плотнее и жестче, образуют первичные агрегаты, из которых в дальнейшем формируются коагуляционные структуры фрактального строения.

Процедуры детоксикации, проведенные как *in vivo*, так и *in vitro*, приводят к исчезновению коацерватной массы на поверхности капель. Удаление коацервата отражается и на динамических параметрах

структуризации высыхающих капель в виде повышения скорости распространения фронта (средней и максимальной) и увеличения пути его распространения. Облучение сыворотки крови больных светом красного и синего диапазона длин волн оказывает влияние на формирование коацерватной фазы при высыхании капель. Это проявляется как в изменении объема коацервата, так и в динамических параметрах структуризации высыхающих капель. Таким образом, изменение физико-химических свойств биожидкостей в результате лечения или обработки *in vitro* могут быть выявлены и оценены количественно с помощью динамических параметров структуризации высыхающих капель. Определение биохимических показателей крови с этой целью менее информативно.

**В главе 4** проводится исследование динамики механических свойств капель биологических жидкостей как информативного параметра для оценки физико-химического статуса жидких сред. Для этого был разработан новый методологический подход и создан прототип прибора для его реализации в автоматическом режиме.

**В разделе 4.1.** описываются физические основы метода. Его идея заключается в следующем. Капля жидкости, высыхающая на твердой смачиваемой подложке, представляет собой естественную модель самоорганизующейся системы с бесконечно большим разнообразием вариантов динамики процессов молекулярной самосборки, в зависимости от состава и структуры жидкости. Исходные физико-химические параметры раствора (поверхностное натяжение, смачивание, вязкость, внутренняя структура, дисперсность, теплопроводность, ионная сила, рН) влияют на динамику таких процессов как коацервация, преципитация, седиментация, гелеобразование и кристаллизация, сопровождающие процесс высыхания многокомпонентной жидкости. В результате меняются физические свойства капли, динамика которых может быть зарегистрирована. При одинаковых внешних условиях (включая подложку) эта динамика определяется только составом и структурой жидкости. Был разработан способ автоматической регистрации динамических параметров высыхающих капель [7,11-19,26,3П-6П]. Блок-схема устройства для реализации способа представлена на Рис. 4.1.



**Рис. 4.1.** Блок – схема устройства: 1 – капля жидкости; 2 – кварцевый резонатор; 3 – генератор; 4 – мостовая схема; 5 – амплитудный детектор; 6 – АЦП; 7 – ПК; 8 – программа отображения сигнала; 9 – программа обработки сигнала.

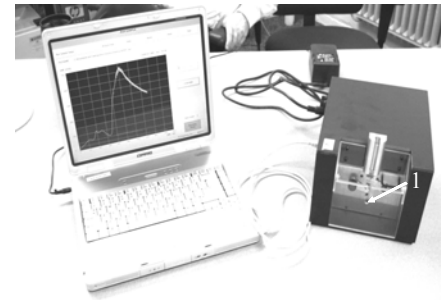
Капля жидкости высыхает на поверхности кварцевого резонатора, совершающего колебания сжатия – расширения по длине. В процессе измерений рабочая частота колебаний кварцевой пластины принудительно поддерживается постоянной и равной резонансной частоте ненагруженного резонатора – 60 кГц. Амплитуда колебаний ненагруженного резонатора синусоидально распределена по длине пластины и составляет не более 10 нм. При выбранных условиях колебаний высыхающая капля образует такие же радиальные зоны, что и капля, высохшая на стекле. Это свидетельствует о сохранении процессов самоорганизации, описанных в главах 1 и 3. Измеряемой величиной является комплексная электрическая проводимость резонатора, нагруженного каплей, при этом собственная емкость резонатора и емкость соединительного кабеля вычитаются мостовой схемой устройства (Рис. 4.1). Значения акустомеханического импеданса (АМИ) капли вычисляются из измеряемой величины электрической проводимости и выводятся на экран в режиме реального времени (Рис. 4.2). На настоящем этапе развития технологии измеряется, отображается и записывается величина модуля АМИ. АМИ является величиной акустического или механического импеданса объекта, нагружающего кварц в режиме сдвиговых колебаний. АМИ интегрально включает в себя такие физические характеристики объекта, как вязкость, эластичность, трение и массу с разной степенью адгезии к подложке:

$$\text{АМИ} = N1 \cdot (1 + j) \cdot S \cdot \sqrt{2\pi f \eta} + N2 \cdot j \cdot 2\pi f \cdot m + N3 \cdot \frac{k}{j \cdot 2\pi f} + N4 \cdot k_{\text{frc}} \quad (4.1)$$

где  $j$  – мнимая единица;  $S$  – площадь контакта капли с кварцем;  $f$  – частота колебаний кварца;  $\eta$  – начальная вязкость жидкости;  $\rho$  – начальная плотность жидкости;  $m$  – масса;  $k$  – эластичность;  $k_{\text{frc}}$  – коэффициент трения.

Первое слагаемое в выражении (4.1) описывает величину акустического импеданса вязкой жидкости, соприкасающейся с подложкой на площади  $S$ , второе – величину механического импеданса массы  $m$ , колеблющейся вместе с подложкой, третье – величину акустического или механического импеданса нагрузки в виде упругого (эластичного) элемента, четвертое – величину акустического или механического импеданса диссипативных потерь (трения). Каждое слагаемое имеет свой весовой коэффициент:  $N1$ ,  $N2$ ,  $N3$ ,  $N4$ . Эти коэффициенты имеют исходно разные значения у разных жидкостей и изменяются по-разному в процессе высыхания капли, в зависимости от свойств жидкости (состава, структуры). Это вносит индивидуальность в динамику АМИ, что отражается на форме кривой, выводимой на экран. Решающим фактором при использовании измерения АМИ в режиме сдвиговых колебаний является чрезвычайная чувствительность его величины к возникновению и росту новой фазы на границе жидкость – кварц, а также к акустическим и механическим

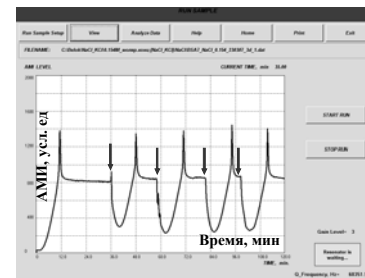
свойствам образующихся структур. Динамика фазовых переходов в высыхающей капле получает отображение в виде кривой в координатах АМИ / время. Наши исследования показали, что форма кривой АМИ является паспортной характеристикой жидкости [11-19,24,26]. Общий вид прототипа прибора представлен на Рис. 4.2. Процессы самоорганизации в высыхающих каплях многокомпонентных жидкостей, отображаемые сигналом АМИ, полностью обратимы и хорошо воспроизводимы (Рис. 4.3). Кооперативность процессов структурообразования в высыхающих каплях находит отражение в динамических параметрах АМИ (Рис.4.4, 4.5).



**Рис. 4.2.** Внешний вид прототипа устройства. 1 – кварцевый резонатор с высыхающей каплей.

Для выявления количественной разницы между разными жидкостями форма кривых АМИ может быть параметризована и представлена в виде чисел на плоскости признаков. В рамках данной

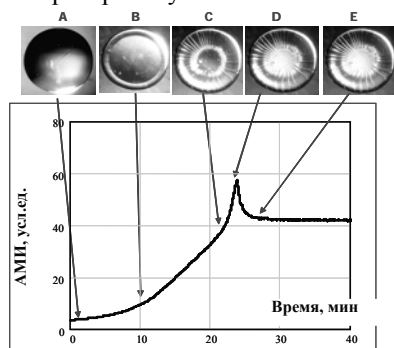
работы были использованы специально разработанные алгоритмы (индексы формы, ИФ), отражающие те или иные особенности формы кривых АМИ [11,18,24].



**Рис. 4.3.** Кривые АМИ высыхающих капель 7% раствора БСА в 0,9% растворе NaCl до и после повторного добавления дистиллированной воды к остаткам высохшей на сенсоре капли. Исходный объем капли раствора БСА – 3 мкл. Объем добавляемой воды к остаткам высохшей капли – 3 мкл. Момент добавления воды показан стрелками.

**В разделе 4.2.** Приводятся результаты исследований модельных белково-солевых растворов и естественных биологических жидкостей человека. Исследования показали, что при высыхании капль биологических жидкостей фазовый переход солей происходит в недрах предварительно сформированной органической матрицы, физические свойства которой лимитируют испарение воды, а, следовательно, и динамику структуризации капль. Поэтому геометрия «солевого пика» (Рис. 4.4) является важным диагностическим параметром. В качестве исследуемых жидкостей были использованы растворы

лиофилизированных белков сыворотки крови людей в физиологическом (0,9%) растворе хлорида натрия для инфузий (Табл. 4.1). Растворы готовили не менее чем за сутки до исследования без использования буфера. Содержание общего белка в пробах составляло 70-86,4 г/л, что находится в пределах физиологической нормы. При исследовании смеси белков разного типа использовали соответствующий «контроль концентрации» с равным массе общего белка содержанием сывороточного альбумина человека (Табл. 4.1). Все сравниваемые пробы исследовали при одинаковых лабораторных условиях.



**Рис. 4.4.** А-Е - этапы высыхания капли сыворотки крови донора (5  $\mu$ л), и соответствующие им участки кривой АМИ (снизу): А – В – Формирование белкового валика по периферии и уплощение купола капли; В - С - гелеобразование; С - D - процесс кристаллизации соли в гелевой матрице; D - Е - испарение остатков свободной воды и достижение постоянного уровня сигнала. Этот уровень отражает массу капли с рыхлосвязанной водой и силу адгезии

осадка к поверхности кварца.

**Таблица 4.1.**

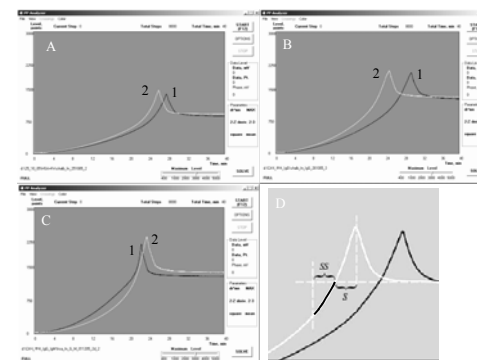
Состав исследованных белково-солевых растворов

№	Состав пробы	Общий белок, г/л	HSA, г/л	Fn, г/л	IgG, г/л	IgM, г/л
1	HSA	70	70	-	-	-
2	HSA + Fn	70,4	70	0,4	-	-
3	HSA + Fn + IgG	86,4	70	0,4	16	-
4	HSA (контроль 1)	86,4	86,4	-	-	-
5	HSA + IgG	82,0	70	-	12	-
6	HSA + IgG + IgM	84,6	70	-	12	2,16
7	HSA + Fn + IgG + IgM	84,46	70	0,3	12	2,16
8	HSA (контроль 2)	84,46	84,46	-	-	-

Поскольку процесс кристаллизации соли наиболее хорошо воспроизводим и четко коррелирует с составом исследуемой жидкости [10,14,17,19], мы использовали кинетику кристаллизации соли как информативный параметр для сравнительной оценки динамических процессов в высыхающих жидкостях разного состава. Кривые АМИ высыхающих капель данных растворов приведены на Рис. 4.5. Численные значения ИФ-1 для модельных растворов, состав которых отображен в

Табл. 4.1, представлены в Табл. 4.2. Приведенные данные свидетельствуют о статистически значимых различиях в динамике АМИ, как между модельными смесями и соответствующими контрольными пробами, так и между пробами разного состава.

В следующей серии экспериментов были приготовлены растворы 7% БСА в 0,9% водных растворах разных солей: KCl, NaCl, CaCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O и MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O. Результаты исследований представлены на Рис. 4.6: один из индексов формы АМИ «выстроил» данные в соответствии с рядом Гофмейстера [24,26].



**Рис. 4.5.** Интерфейс программного обеспечения. Необработанные экспериментальные кривые АМИ высыхающих капель белково-солевых растворов (X – время, мин, Y – АМИ, усл. ед.). А – HSA (1) и HSA+Fn (2); В – Контроль-1 (1) и HSA+Fn+IgG (2); С – Контроль-2 (1) и HSA+Fn+IgG+IgM (2). D – иллюстрация расчета ИФ-1. Отрезок S соответствует времени кристаллизации соли. Длина этого отрезка

отложена влево (SS). ИФ-1 численно равен усредненной производной выделенного участка кривой АМИ.

**Таблица 4.2.**

Численные значения ИФ-1 для модельных растворов (Табл. 4.1)

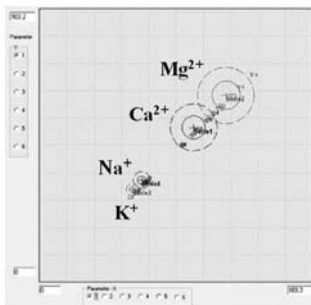
Состав растворов	Индекс Формы-1 (M $\pm$ $\sigma$ )
HSA	12.0 $\pm$ 0.1
HSA+Fn	10.9 $\pm$ 0.4
HSA+Fn+IgG	16.6 $\pm$ 0.8
HSA (Контроль 1)	13.3 $\pm$ 0.3
HSA+Fn+IgG+IgM	23.7 $\pm$ 1.2
HSA (Контроль 2)	13.4 $\pm$ 0.5

Принимая во внимание эмпирическое уравнение (4.2), можно с достаточной уверенностью утверждать, что такая последовательность расположения данных связана с особенностью взаимодействия каждого катиона с водой. Это взаимодействие проявляется в изменении вязкости раствора, к которой чувствителен наш прибор (данное утверждение применимо и для

разных концентраций одного и того же катиона).

$$\eta / \eta_0 = 1 + Ac1/2 + Bc \quad (4.2)$$

где  $\eta$  – вязкость водного раствора соли;  $\eta_0$  – вязкость воды при той же температуре; C - концентрация; A – электростатический коэффициент; B – мера взаимодействия катиона с водой.



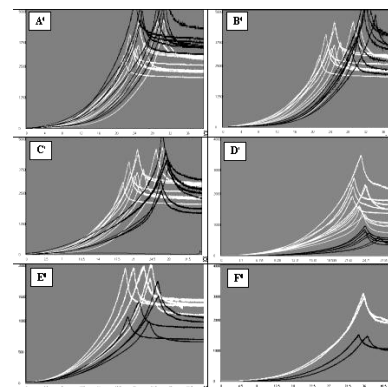
**Рис. 4.6.** Расположение на плоскости признаков в координатах одного из индексов формы ( $M \pm 2\sigma$ ) результатов расчета динамики АМИ высыхающих капель растворов 7% БСА в 0.9% водных растворах солей: KCl, NaCl,  $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  [24].

Таким образом, использование исследуемой жидкости в виде капли, высыхающей на поверхности колеблющегося кварцевого резонатора, благодаря множеству физико-химических параметров, интегрально влияющих на форму кривой АМИ, дает информацию о жидкости, достаточную для ее идентификации на основе сравнения с референтным эталоном.

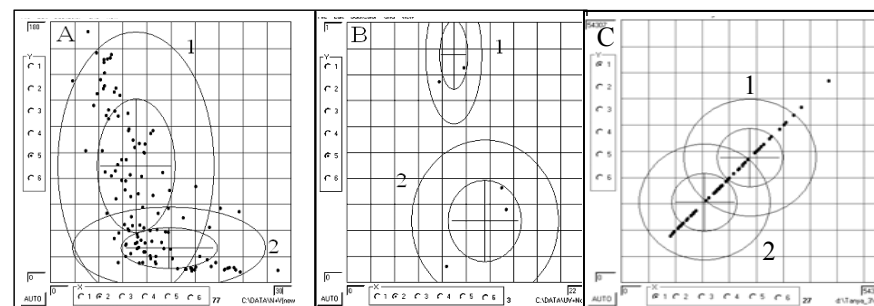
Далее приводятся результаты исследования биологических жидкостей человека. Объем исследования составил 174 пробы, из которых 50 проб взяты у женщин после родов в срок в ранний послеродовый период (не более 2-х часов), 36 – у женщин после преждевременных родов (2-й триместр беременности), 10 – у беременных с диагнозом угроза преждевременных родов, 33 – у женщин с нормально протекающей беременностью, 10 – у женщин с диагнозом первичный рак груди 3-й степени (до начала лечения), 6 – у больных раком легких (до начала лечения), 1 – у больного раком 12-перстной кишки, 7 – у пациентов с парапротеинемиями, 7 – у больных гепатитами различной природы. Исследовали также слюну и мочу практически здоровых людей (20 проб), мочу женщин с первичным раком груди 3-ей стадии до начала лечения (7 проб), слюну, собранную у больных вирусным гепатитом В (16 проб). Слюну собирали натошак, центрифугировали перед тестированием (10 мин, 1500 об./мин). Все сравниваемые пробы тестировали при одинаковых лабораторных условиях.

На Рис. 4.7 показаны кривые АМИ высыхающих капель сыворотки крови здоровых и больных людей.

Для каждого заболевания были найдены специфические ИФ, позволявшие наилучшим образом отделять их на плоскости признаков от остального массива данных, не разделявшие при этом другие заболевания. Разработанное программное обеспечение производит запись, хранение и воспроизведение результатов исследованных жидкостей. Программа «Сплиттер» позволяет представлять базы данных сравниваемых жидкостей на плоскости признаков в координатах выбранных ИФ в автоматическом режиме (Рис. 4.8).



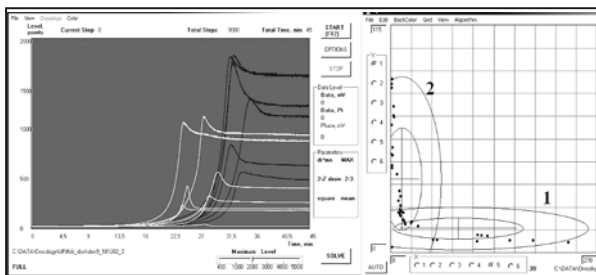
**Рис. 4.7.** Экспериментальные кривые отображения динамики АМИ в процессе высыхания капль сыворотки крови. Ось Y – АМИ (усл. ед.), ось X – время (мин). Черные кривые – заболевание, белые – контроль. А – рак груди; В – рак легких; С – парапротеинемии; D – преждевременные роды (черные кривые) по сравнению с родами в срок (белые кривые); E – гепатит В; F – беременность 34 недели с диагнозом «угроза преждевременных родов» по сравнению с нормальной беременностью 34 недели, по две капли из каждой сыворотки.



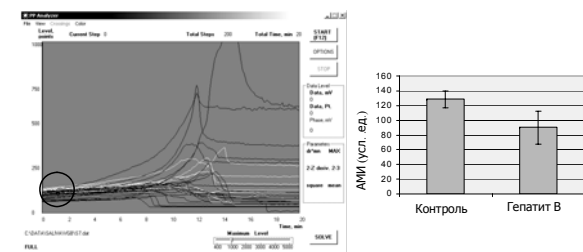
**Рис. 4.8.** Интерфейс программы «Сплиттер». А – распределение данных АМИ-тестов плазмы крови у женщин после прежде-временных родов (1) и нормальных родов (2) в координатах ИФ-2 и ИФ-5; В – распределение данных АМИ-тестов сыворотки крови у беременной женщины с диагнозом «угрожающий выкидыш», 7 недель (1) и женщины с нормально протекающей беременностью, 7 недель (2) в тех же координатах ( $M \pm 2\sigma$ ); С – распределение данных АМИ-тестов плазмы крови у женщин с диагнозом рак груди (1) и практически здоровых женщин (2) в координатах ИФ-1 ( $M \pm 2\sigma$ ).

Данные, представленные в таблице 4.3, свидетельствуют о перспективности развития данного подхода для использования его в медицинской экспресс-диагностике (скрининге и мониторинге).

Особую ценность представляет возможность неинвазивной диагностики с использованием в качестве объекта исследования мочи и слюны. Несмотря на то, что вариабельность этих жидкостей по составу и структуре велика даже у практически здоровых людей, проведение анализа с помощью программы «Сплиттер» в автоматическом режиме позволило выявить различия в форме кривых АМИ в «норме» и «патологии» (Рис. 4.9,4.10).



**Рис. 4.9.** Интерфейс программного обеспечения. Слева – кривые АМИ капле мочи практически здоровых женщин (белые) и женщин с первичным раком груди (черные); справа – распределение полученных данных на плоскости признаков в координатах ИФ-1/ИФ-5. (1) – здоровые, (2) – больные ( $M \pm 2\sigma$ ).



**Рис. 4.10.** Интерфейс программного обеспечения. Слева – кривые АМИ капле слюны доноров (белые) и больных гепатитом В (черные); справа – различия в значениях АМИ ( $M \pm \sigma$ ) в начале

высыхания капле (отмечено кружком)

**Таблица 4.3.**

Диагностические показатели АМИ-тестов плазмы крови

Группы сравнения		Чувствительность	Специфичность	Прогноз болезни (PPV)	Прогноз здоровья (NPV)
Группа 1 (к-во чел.)	Группа 2 (к-во чел.)				
Роды в срок (50)	Преждевр. роды (36)	83	92	88	89
Нормальная беременность (33)	Угроза преждевр. родов (10)	98	57	67	97
Доноры (15)	Парапротеинемия (7)	100	100	100	100
Доноры (15)	Онкология (17)	76	100	100	74
Доноры (15)	Рак груди (10)	92	86	86	92
Доноры (15)	Рак легких (5)	96	73	87	92
Рак груди (10)	Рак легких (5)	93	73	67	95
Доноры (15)	Гепатиты (7)	96	88	90	96

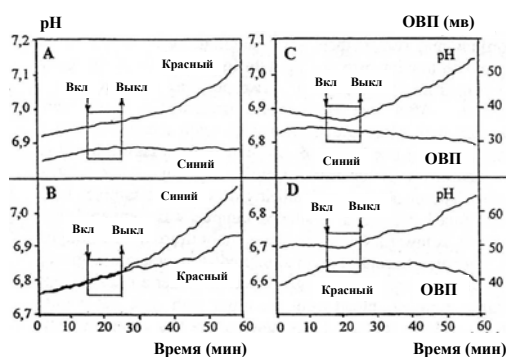
**В заключении по главе 4** говорится, что динамика молекулярной самосборки компонентов жидкостей, высыхающих в виде капле на твердой смачиваемой подложке, содержит информацию об их составе и структуре. Этот феномен получил физическую интерпретацию и прошел экспериментальную проверку. Разработан способ, позволяющий извлекать эту информацию в виде “динамических портретов”, представляющих собой паспортную характеристику жидкости. Способ основан на проведении сопоставительного анализа жидкости с эталонной базой данных, собранной при тех же условиях (объем капли, подложка, параметры колебаний сенсора,  $T$ ,  $P$ ,  $H$ ). Приведены примеры возможного использования данного феномена в медицинской диагностике. Особенностью данного подхода является то, что каждый компонент исследуемой жидкости вносит свой специфический вклад в динамику самосборки. Это относится и к специфическим маркерам заболеваний, что позволяет отличать не только больных от здоровых, но и находить признаки, свойственные тем или иным заболеваниям. При этом сам динамический процесс играет роль “усилителя”, позволяющего визуализировать наличие компонентов, присутствующих в жидкости в ничтожных концентрациях.

**В главе 5** приводятся результаты исследования реактивности крови к воздействию низкоинтенсивного света красного и синего диапазона длин волн в норме и патологии.

**В разделе 5.1.** описываются материал и методы исследования. Материалом для исследований *in vitro* служила кровь доноров на консерванте «Глюглицир» (40 образцов) и кровь доноров и больных различными заболеваниями, взятая с гепарином (62 образца). В качестве источника НИКС использовали свет гелий-неонового лазера (ГНЛ) или некогерентный источник и световод с фильтрами КС-10 и СЗС-25, обеспечивающими максимум пропускания в области 600-800 нм (красный свет) или с фильтрами СЗС-21 и СЗС-25, с максимумом пропускания 400-500 нм (синий свет). При проведении прямой потенциометрии кровь в объеме 20 мл помещали в термостатируемую ячейку (+38° С). Слой крови, отделяющий источник света от измерительной части электродов составлял не менее 1 см, что полностью исключало возможность прямой засветки измерительной части электродов, подтвержденное измерением мощности оптического излучения (ИМО-2) на этом уровне. Перед началом экспериментов кровь выдерживали при комнатной температуре 2 часа, после чего определяли ее исходные параметры. Регистрацию динамики рН и ОВП начинали с момента достижения кровью температуры +38° С. Тестовые световые воздействия подавали через 15 минут после начала записи, продолжавшейся в течение часа.

**В разделе 5.2.** приводятся результаты экспериментов с облучением крови *in vitro*. Данные прямой непрерывной потенциометрии показали, что облучение крови может приводить к сдвигу рН от сотых до десятых долей

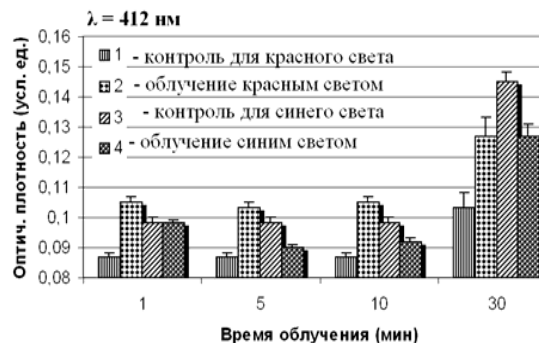
(ошибка измерения не превышала 0,01 ед. рН). Это проявлялось на фоне спонтанного защелачивания консервированной крови на открытом воздухе (Рис. 5.1). Скорость этого защелачивания (тангенс угла наклона прямой) определяется индивидуальными свойствами крови. Под действием света может происходить либо ускорение этого процесса, либо его замедление. Отсутствие реакции также возможно. В большинстве образцов крови направленность реакции при облучении красным и синим диапазоном длин волн была противоположной ( $p = 0,05$ ). Измерение величины поглощения красного и синего света одними и теми же участками мазков крови показало, что для красного света оно составляет  $17,3 \pm 0,23\%$ , а для синего –  $25,2 \pm 0,30\%$ . Лежит ли в основе этих различий дозовая зависимость? Для проверки этого предположения проведен эксперимент с облучением крови донора с разной реакцией на красный и синий свет (Рис. 5.2). Плотность мощности источника света составляла  $300 \text{ Дж/м}^2$ , а время облучения изменяли от 1 до 30 минут. Разница в показателях контроля для красного и синего света объясняется тем, что работа начиналась с облучения крови красным светом. За это время успевало повыситься содержание свободного гемоглобина в интактной крови. Измерения ИСГ по величине оптической плотности плазмы на пике поглощения гемоглобина ( $\lambda = 412 \text{ нм}$ ) показали, что изменение дозы облучения в 30 раз не изменяет направленности реакции крови на облучение.



**Рис. 5.1.** Результат воздействия низкоинтенсивного света красного и синего диапазона длин волн на изменение скорости спонтанного защелачивания консервированной крови, по данным прямой непрерывной потенциометрии. А – изменение рН при облучении крови донора 1; В – изменение рН при облучении крови донора 2; С – изменение рН и ОВП при облучении синим светом крови донора 3; D – при облучении красным светом крови донора 4. Некогерентный свет,  $300 \text{ Дж/м}^2$ .

При облучении консервированной крови 40 доноров расфокусированным лучом ГНЛ одной и той же дозой ( $0,75 \text{ мВт/см}^2$ , 10 мин) были получены следующие результаты (Табл. 5.1). Таким образом, предварительные эксперименты по выяснению характера распределения направленности реакции крови разных доноров на облучение НИКС, оцениваемой по величине ИСГ, показали, что она равновероятно может отсутствовать,

быть больше, чем в контроле или меньше, чем в контроле. Реакция крови на красный и синий свет так же индивидуальна и не зависит от дозы воздействия в широком дозовом интервале. Рассмотрим реакцию крови на облучение, оцениваемую по величине СОЭ (Табл.5.2).



**Рис. 5.2.** Изменение оптической плотности плазмы через час после облучения цельной крови одного и того же донора красным или синим светом ( $300 \text{ Дж/м}^2$ ) при разном времени облучения.

**Таблица 5.1.** Распределение направленности реакции крови на облучение ГНЛ ( $0,75 \text{ мВт/см}^2$ , 10 мин) в 40 образцах консервированной донорской крови.

Количество проб крови	Интенсивность спонтанного гемолиза эритроцитов в облученной пробе по сравнению с контролем		
	Не изменилась	Увеличилась	Уменьшилась
40	12	13	15

$p \leq 0,05$ .

**Табл. 5.2.** Изменение СОЭ после облучения крови разными источниками НИКС, в процентах к контролю.

Донор	Источник НИКС, доза воздействия		
	Некогерентный, $300 \text{ Дж/м}^2$	Когерентный (ГНЛ), $2,7 \cdot 10^4 \text{ Дж/м}^2$	Некогерентный, $4,8 \cdot 10^5 \text{ Дж/м}^2$
	Скорость оседания эритроцитов в процентах к контролю		
1	144; 171	147; 150	150; 150
2	75; 75		80; 80
3	67; 63	74; 80	
4	100; 100		100; 100
5	54; 50		55; 55
6	100; 100	100; 117	

$p < 0,01$

Облучение одного и того же образца крови дозами НИКС, различающимися на 3 порядка, дают сопоставимые результаты. Когерентность источника не существенна. Распределение по направленности реакции на облучение так же равновероятно, как и при определении ИСГ.

В следующей серии экспериментов стояла задача определения взаимозависимости изменений ИСГ и сорбции  $AC^+$  поверхностью эритроцитов при облучении *in vitro* гепаринизированной крови 62-х больных различными заболеваниями. Кровь облучали в чашках Петри в затемненном помещении расфокусированным лучом ГНЛ 10 минут при плотности мощности 0,75-4,5 мВт/см<sup>2</sup>. Толщина слоя крови не превышала 2 мм. Из 62-х больных у 16-ти реакции ИСГ и сорбции  $AC^+$  были разнонаправленными, у 42-х – однонаправленными (из них у 23-х оба показателя были меньше контроля, у 18-ти – превышали контроль), и кровь 6-ти больных не реагировала на облучение. Таким образом, процент не реагирующей на облучение крови среди больных был существенно меньше, чем у доноров: 10% и 30%, соответственно. Распределение направленности реакции крови на облучение по данным показателям было также равновероятно. Однонаправленное изменение двух показателей (ИСГ и сорбции  $AC^+$ ) статистически значимо ( $p < 0,01$ ). В процессе хранения консервированной крови меняется ее реакция к действию света, слабо зависящая от дозы облучения. То есть, эффективность воздействия достигается малой дозой облучения и реакция имеет пороговый характер. Изменение параметров СОЭ также не зависит от когерентности источника и дозы облучения крови (Табл. 5.2). В Табл. 5.3. представлены показатели крови разных доноров, подвергнутой одинаковым световым воздействиям. Улучшение морфо-функциональных показателей происходило при облучении крови донора 1 синим, а крови донора 2 – красным светом, ухудшение – при облучении красным светом в первом и синим – во втором случае. Снижению интенсивности перекисных процессов, улучшению качественных показателей эритроцитов и восстановительного потенциала крови соответствовало повышение ЭПР-сигнала  $Cu^{2+}$  (спин/мл  $\times 10^6$ ), а ухудшению – его снижение.

Для выяснения возможного влияния биологических ритмов на реактивность крови здоровых доноров к облучению НИКС, был поставлен эксперимент на 4-х добровольцах – лицах мужского пола 20-21 года. Кровь для исследований брали из локтевой вены через каждые 4 часа, 5 раз в течение суток: в 7, 11, 15, 19 и 23 часа. Собранную кровь сразу же облучали в чашках Петри расфокусированным лучом ГНЛ 10 мин при плотности мощности 0,75 мВт/см<sup>2</sup>. Облученные и контрольные пробы инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение часа. После этого пробы центрифугировали и отделяли плазму от клеток. Плазму разводили 1:20 физраствором и фотометрировали. Результаты изменения ИСГ,

относительно контроля, и плотности плазмы по белку для 4-х доноров представлены на Рис. 5.3. Выявлены индивидуальные квазипериодические колебания реактивности крови к облучению ее *in vitro* в течение дня. У двух доноров максимум реакции по ИСГ отмечался в первой половине дня (11 часов), у двух других – в вечернее время (19 и 23 часа). Минимальный отклик на облучение у всех добровольцев отмечен в 15 часов. Максимальное повышение ИСГ относительно контроля у всех доноров сочеталось с наименьшей оптической плотностью плазмы по белку, минимальное – с наибольшей.

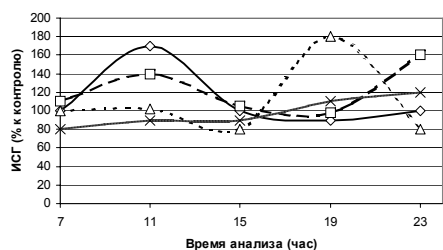
**Таблица 5.3.**

Изменение показателей крови двух доноров после облучении одинаковыми дозами красного или синего света (в % к исходным параметрам).

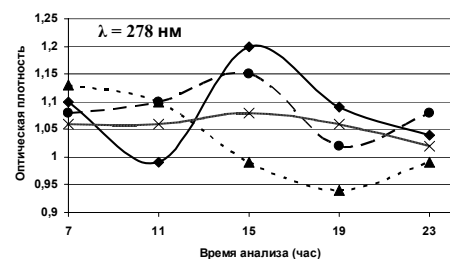
Исходные параметры:	Донор 1		Донор 2	
	ЭПР $Cu^{2+}$ = 1,52; ЭПР $Fe^{3+}$ = 6,95 SH-гр. = 115,7; ТБК-прод. = 0,240		ЭПР $Cu^{2+}$ = 1,30; ЭПР $Fe^{3+}$ = 7,39 SH-гр. = 13,7; ТБК-прод. = 0,280	
Параметры	Красный свет	Синий свет	Красный свет	Синий свет
ЭПР $Cu^{2+}$	77,3	108,7	380,0	82,6
ЭПР $Fe^{3+}$	118,2	93,3	144,9	68,7
Ультр. гемолиз	261,9	81,8	78,0	582,4
IR	194,2	190,6	173,0	64,7
SH - группы	70,2	219,7	130,1	40,8
ТБК – прод.	100,0	67,6	78,9	126,9
Zn	84,6	120,0	104,0	100,0
Cu	100,0	117,1	103,0	100,0
K	171,8	155,4	173,5	195,5
Нормоциты	87,2	122,7	109,6	79,8
Стоматоциты 1	117,6	57,1	0,0	0,0
Стоматоциты 2	150,0	16,7	0,0	0,0
Эхиноциты	300	0,0	0,0	233,3
Пойкилоциты	250,0	60,0	66,7	200,0
Сфероциты	200,0	62,5	0,0	0,0

В ходе выполнения данной работы было замечено, что плазма крови, сильно разведенная физиологическим раствором, также испытывает слабые колебания оптической плотности при инкубации при комнатной температуре. Этот феномен был использован в серии экспериментов для выяснения характера влияния облучения на параметры этих колебаний, а также на зависимость направленности ответа на облучение от хода естественных процессов в пробирке. Согласно полученным данным, облучение крови НИКС в каждый момент времени дает реакцию,

зависящую от направления естественных спонтанных процессов изменения оптической плотности надосадков, ускоряя их ( $p < 0,01$ ).



**Рис. 5.3.** Величина и направленность изменений интенсивности спонтанного гемолиза эритроцитов (сверху) и плотности плазмы по белку (снизу) у 4-х добровольцев после облучения их крови *in vitro* в разное время суток.



Клинические исследования проводились на крови 62-х больных, проходивших плановый курс фототерапии в городской клинической больнице № 5. Из них 34 больных заболеваниями суставов воспалительного и дегенеративного характера получали ежедневно наружное

облучение суставов НИКС - расфокусированным лучом ГНЛ или лампой накаливания через фильтр КС-10 дозой  $2,7 \times 10^4$  Дж/м<sup>2</sup>. У 12 больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки поверхность язвы облучали некогерентным НИКС через фиброгастроскоп дозой  $10^5$ - $10^6$  Дж/м<sup>2</sup> или внутривенно ГНЛ. 16 больных с нарушением сердечной деятельности - синдромом слабости синусового узла - облучались внутрисердечно ГНЛ дозой  $10^4$  Дж/м<sup>2</sup>. Независимо от вида облучения, диапазон терапевтических доз за 1 сеанс составлял  $10^4 - 10^6$  Дж/м<sup>2</sup>, при продолжительности облучения - 30 мин. Целью работы было исследование роли когерентности источника облучения в качестве терапевтического эффекта и существуют ли дозовые зависимости при облучении больных *in vivo*. Для этого в процессе сеанса фототерапии у больных, облучавшихся ГНЛ или некогерентным светом, брали кровь через 10 минут после начала облучения и через 30 мин - в конце сеанса.

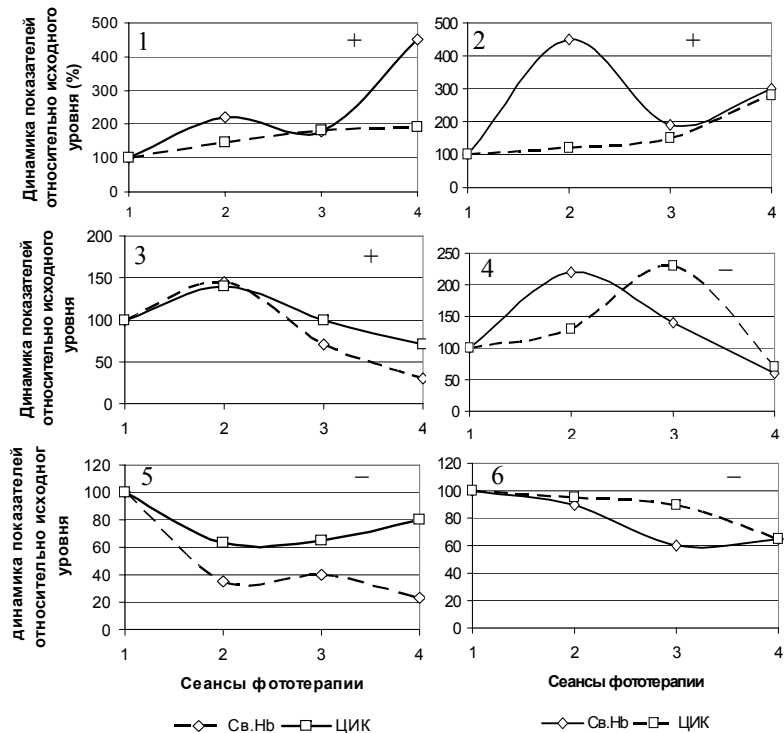
В качестве критерия ответа на облучение было использовано изменение содержания свободного гемоглобина в плазме, как показателя, характеризующего стабильность мембран эритроцитов. О содержании гемоглобина в плазме в динамике судили по изменению высоты «гемоглобинового пика». Для этого из значения оптической плотности на максимуме поглощения гемоглобина (412 нм) вычитали значение оптической плотности на длине волны, где нет специфической полосы поглощения гемоглобина (370 нм). Это позволяло исключить влияние

светорассеяния.

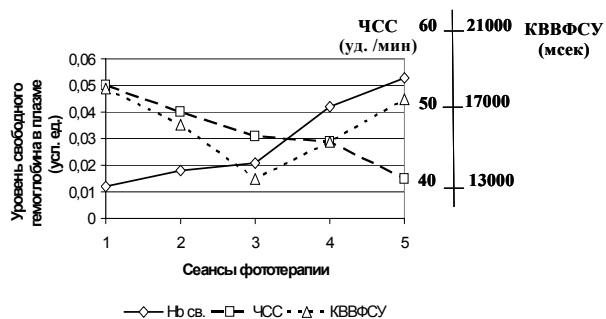
Динамику содержания свободного гемоглобина в плазме сравнивали с выраженностью терапевтического эффекта и с динамикой морфо-функциональных показателей, специфических для каждого вида заболевания: циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) - для больных заболеваниями суставов, площади язвенных дефектов - для больных язвенной болезнью (ЯБ), частоты сердечных сокращений и времени (или скорректированного времени) восстановления функции синусового узла после введения атропина - для больных с синдромом слабости синусового узла (СССУ).

Лечение больных с СССУ заключалось в ежедневном внутрисердечном или внутривенном облучении пациентов светом ГНЛ через световод с мощностью излучения на выходе 1,5 мВт. В процессе лечения больные подвергались электрофизиологическому обследованию. В работе показана типичная динамика функциональных показателей сердца и содержания свободного гемоглобина в плазме четырех больных в процессе фототерапии при положительном терапевтическом эффекте, заключавшемся в повышении частоты сердечных сокращений (ЧСС), снижении времени восстановления функции синусового узла (ВВФСУ) и скорректированного времени восстановления функции синусового узла (КВВФСУ). Улучшению функциональных показателей соответствовало снижение уровня свободного гемоглобина в плазме, свидетельствующее о стабилизации эритроцитарных мембран. На рис. 5.5 показано ухудшение функциональных показателей сердечной деятельности у больного в процессе внутривенной лазеротерапии и соответствующее этому снижение резистентности эритроцитарных мембран (повышение уровня свободного гемоглобина в плазме). У больных с ЯБ желудка и 12-перстной кишки заживление язвенного дефекта в конце фототерапевтических процедур также сопровождалось снижением уровня свободного гемоглобина в плазме. На Рис. 5.4 Показана динамика свободного гемоглобина в плазме шести больных заболеваниями суставов в процессе фототерапии когерентным или некогерентным светом и динамика содержания ЦИК, по данным клинической лаборатории больницы. Данные примеры демонстрируют разнообразие направленности реакции больных в ходе фототерапии, подтвержденное клинически: обострение заболевания (Рис. 5.4, 1,2), обострение после первого облучения с последующим улучшением клинической картины (Рис. 5.4, 3,4), постепенного улучшения клинических показателей в ходе лечения (Рис. 5.4, 5,6).

Таким образом, в каждом случае, независимо от вида заболевания и когерентности источника, выздоровление сопровождалось снижением содержания свободного гемоглобина в плазме, а обострение заболевания - повышением его уровня.



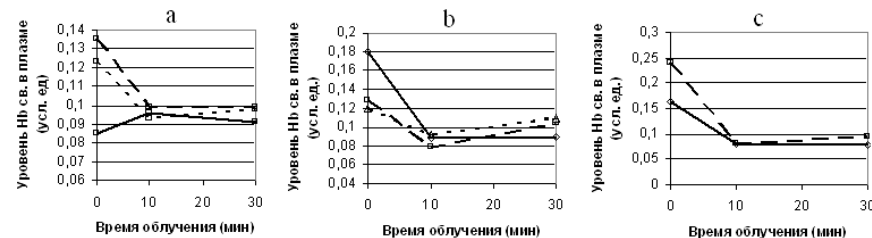
**Рис. 5.4.** Сравнительная динамика уровня свободного гемоглобина в плазме и ЦИК, относительно исходного уровня, в процессе фототерапии больных с заболеваниями суставов: ревматоидным артритом (1,5,6) и первичным деформирующим остеоартрозом (2,3,4); + и - - облучение когерентным или некогерентным светом, соответственно.



**Рис. 5.5.** Изменение уровня свободного гемоглобина и некоторых функциональных показателей у больного с СССУ при неблагоприятном действии НИКС.

Рассмотрим динамику содержания свободного гемоглобина в процессе облучения ряда

пациентов. (Рис. 5.6). Больная С. облучалась в течение 30 минут. Больная К. облучалась лишь первые 10 минут, однако не знала об этом. Сеанс продолжался и после выключения источника света до истечения 30 минут. Через 30 минут с начала облучения уровень свободного гемоглобина в крови менялся несущественно по сравнению с 10 минутами облучения. Эксперимент с соблюдением полного антуража внутривенного облучения, но без включения источника света (плацебо), был поставлен с больным М. Оказалось, что вера больного в проведение процедуры привела к такому же эффекту, что и реальное облучение (Рис. 5.6).



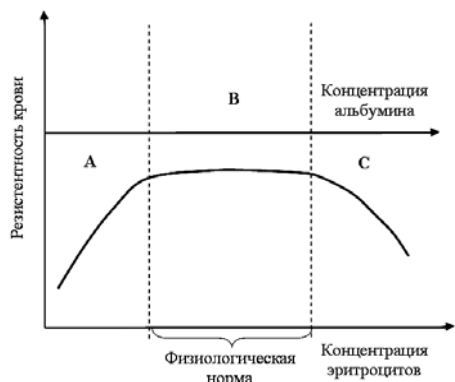
**Рис. 5.6.** Изменение уровня свободного гемоглобина в плазме пациентов: а) больной С., облучавшейся внутривенно 30 минут, через 10 минут и в конце облучения, по данным 3-х сеансов; б) больной К., облучавшейся внутривенно 10 минут, в конце облучения и через 30 минут после начала облучения, по данным 3-х сеансов; в) больного М. с имитацией внутривенного облучения крови (плацебо), через 10 и 30 минут с начала процедуры, по данным 2-х сеансов.

Этот пример демонстрирует те же характерные времена срабатывания неспецифических ответных реакций организма на раздражитель (в данном случае – стресс). Не исключено, что механизм повышения резистентности эритроцитарных мембран под действием стресса также реализуется через изменение рН – универсального регулятора заряда компонентов крови, обеспечивающего возникновение и развитие каскада морфо-функциональных адапционно-приспособительных реакций.

**В заключении по главе 5** говорится, что биологический эффект НИКС не зависит от когерентности источника и дозы в широком дозовом интервале, поскольку имеет пороговый характер. Воздействие НИКС на биологические объекты ускоряет или замедляет естественный ход происходящих в них спонтанных процессов, связанных с биологическими ритмами. То есть, реактивность к действию одного и того же раздражителя меняется во времени. В основе биологического механизма действия света лежит изменение рН, влекущее за собой каскад неспецифических кооперативных реакций крови: изменение дисперсности белка (альбумина), заряда мембран эритроцитов, интенсивности перекисных процессов в

мембранах и СОЭ. Направленность реакции крови больного на предстоящее облучение может быть предсказана по предварительному облучению его крови *in vitro* [3,1П,2П]. Стабилизация клеточных мембран (снижение ИСГ) является маркером благоприятного воздействия НИКС, дестабилизация (повышение ИСГ) прогнозирует обострение процесса.

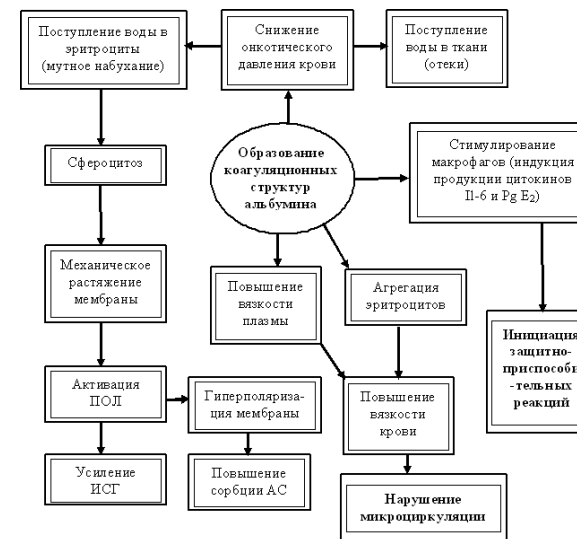
**В заключении по диссертации** проводится общий анализ полученных результатов и подводятся итоги работы. Проведенное исследование позволило выявить ряд взаимосвязанных реакций крови, кооперативно (согласованно) изменяющихся при воздействии внешних или внутренних раздражителей. В основе этой согласованности лежат известные законы физической химии дисперсных систем. Цельная кровь, как ткань, обладает большими компенсаторными возможностями, обеспечиваемыми оптимальным сочетанием буферных систем плазмы и эритроцитов (Рис. 1з). Нарушение нормальных соотношений между дисперсными фазами снижает резистентность крови к действию внешних факторов (повышает реактивность). Поэтому определение дозовых зависимостей НИКС, проводимое на клеточных суспензиях (например, эритроцитах в физрастворе) недопустимо аппроксимировать на цельную кровь.



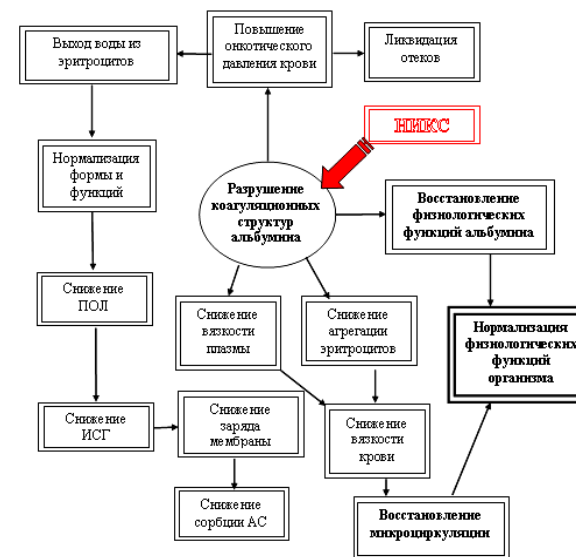
**Рис. 1з.** Схема, иллюстрирующая зависимость резистентности крови от соотношения объемов дисперсных фаз – эритроцитов и альбумина. А и С – области фазового дисбаланса, появляющиеся при отклонении от нормы концентрации одного из компонентов.

Развитие патологического процесса в организме, независимо от вида патологии, пола и возраста пациентов, может

сопровождаться образованием коагуляционных структур альбумина в плазме крови. Главным следствием коацервации альбумина является снижение его физиологических функций, а также снижение онкотического давления крови. Схема каскада кооперативных реакций крови, связанных с явлением коацервации, представлена на Рис.2з. Эти реакции лежат в основе таких известных клиницистам неспецифических проявлений различных заболеваний, как «синдром повышенной вязкости плазмы» и «синдром эндогенной интоксикации».



**Рис. 2з.** Схема каскада кооперативных реакций, развивающихся в ответ на коацервацию альбумина в плазме крови.



**Рис. 3з.** Схема каскада кооперативных реакций, развивающихся в ответ на облучение НИКС крови больных пациентов.

## Выводы

1. Выявлен комплекс взаимосвязанных реакций крови, как открытой полидисперсной самоорганизующейся системы (ткани), кооперативно (согласованно) изменяющихся при воздействии внешних или внутренних раздражителей, в норме и патологии.
2. Как эритроциты, так и плазма, несут информацию о физико-химическом статусе крови. В ряду индикаторов нарушения физико-химического гомеостаза стоят такие взаимозависимые показатели как КЩС, ИСГ, ригидность (деформируемость) эритроцитов, их поверхностный заряд, агрегация, СОЭ, вязкость крови, вязкость плазмы.
3. Выявлен периодический характер кооперативных изменений физико-химических свойств белков плазмы и клеток крови и связанное с этим изменение ее реактивности к действию низкоинтенсивного света.
4. Выявлено немонотонное изменение свойств крови при изменении гематокрита *in vitro*. Отклонение концентрации эритроцитов от нормы, как в сторону уменьшения, так и в сторону увеличения, влечет за собой каскад плазменно-клеточных кооперативных реакций, ведущих к усилению процессов ПОЛ и снижению стабильности эритроцитов. Показано, что емкость буферных систем крови, соответствующая нормальному объемному соотношению эритроцитов и плазмы, необходима для поддержания физико-химического гомеостаза.
5. Показано, что нарушение физико-химического гомеостаза, наблюдающееся при развитии патологического процесса в организме, приводит к снижению агрегативной устойчивости альбумина, сопровождающейся его коацервацией. Исследован механизм коацервации и предложена схема каскада фазовых переходов альбумина от молекул до коагуляционных структур микронных размеров. Коацервация альбумина является причиной повышения вязкости плазмы и снижения онкотического давления крови в капиллярах.
6. Показано, что, как морфологические, так и динамические особенности структуризации высыхающих капель плазмы и сыворотки крови обладают информативностью о физико-химическом состоянии жидких сред организма. Наличие коацерватных отложений на поверхности капель является индикатором нарушения физико-химического статуса крови и неспецифическим маркером тяжести заболевания. Динамические параметры структуризации высыхающих капель биологических жидкостей содержат диагностическую информацию об их агрегативной устойчивости. Регистрация акустомеханического импеданса высыхающих капель позволяет получать информацию о физико-химическом статусе жидких сред и оценивать его количественно.
7. В основе биологического механизма действия низкоинтенсивного света лежит изменение рН, влекущее за собой каскад неспецифических кооперативных реакций крови: изменение дисперсности белка (альбумина),

заряда мембран эритроцитов, интенсивности перекисных процессов в мембранах и СОЭ. Воздействие НИКС на биологические объекты ускоряет или замедляет естественный ход происходящих в них спонтанных процессов, связанных с биологическими ритмами. Прогноз направленности реакции больного на предстоящий сеанс фототерапии может быть осуществлен по реакции его крови на облучение *in vitro*. В качестве критерия эффекта может быть использована ИСГ. При ее снижении относительно контроля прогнозируется положительный эффект от сеанса облучения.

8. Механизм положительного терапевтического эффекта НИКС реализуется через разрушение коагулятов альбумина, присутствующих в крови больных. Эффект не зависит от когерентности источника и имеет пороговый характер в диапазоне терапевтических доз ( $10^4 - 10^6$  Дж/м<sup>2</sup>). Переход альбумина в молекулярную форму вызывает каскад кооперативных реакций, ведущих к восстановлению физико-химического гомеостаза и нормализации функций организма.

## Список основных публикаций по теме диссертации

1. Яхно В.Г., Яхно Т.А. Экспериментальное исследование плазменно-клеточных кооперативных эффектов цельной крови при изменении концентрации эритроцитов. // Критерии самоорганизации в физических, химических и биологических системах. Труды международной конференции, Москва-Суздаль, 12-18 июня 1995 г. Суздаль, 1995. С.185-195.
2. Яхно В.Г., Яхно Т.А. Экспериментальное исследование плазменно-клеточных кооперативных эффектов цельной крови при изменении концентрации эритроцитов. // Вестник Удмуртского Университета. 1995. №7. С.81-91.
3. Yakhno T. A. Experimental and clinical studies of blood reaction to light irradiation. // Nonlinear Dynamics and Structures in Biology and Medicine: Optical and Laser Technologies. Proc. SPIE, 8-14 July 1996. Saratov, Russia. 1996. V.3053. С.172-182.
4. Потехина Ю.П., Зубеев П.С., Страхов А.В., Бузоверя М.Э., Яхно Т.А., Щербак Ю.П. Кристаллографический анализ биологических жидкостей при желчнокаменной болезни. // Международный медицинский журнал. 2000. №5. С.469-473.
5. Яхно Т.А., Яхно В.Г., Левин Г.Я., Корочкина О.В., Бузоверя М.Э. Динамика процессов самоорганизации биожидкостей в норме и при некоторых заболеваниях. // IV Междунар. конф. по математическому моделированию, 27 июня – 1 июля 2000 г. М: МГТУ «Станкин». 2001. V.2. P.265-275.
6. Потехина Ю.П., Зубеев П.С., Страхов А.В., Бузоверя М.Э., Яхно Т.А., Щербак Ю.П. Кристаллография и вискозиметрия желчи при желчнокаменной болезни. // Клиническая и лабораторная диагностика. 2001. №3. С.33-35.
7. Яхно Т.А., Яхно В.Г., Санин А.Г., Шмелев И.И. Исследование динамики фазовых переходов жидкостей разного типа методом регистрации акустомеханического импеданса высыхающей капли. // Биофизика. 2002. Т.47, №6. С.1101-1105.
8. Соустов Л.В., Челноков Е.В., Битюрин Н.М., Немов В.В., Яхно Т.А., Сергеев Ю.В., Островский М.А. Исследование фотоагрегации белков при воздействии

излучения ХеС1-лазера. Препринт ИПФ РАН №599. 2003. 19 с.

9. Яхно Т.А., Седова О.А., Санин А.Г., Пелюшенко А.С. О существовании регулярных структур в жидкой сыворотке (плазме) крови человека и фазовых переходах в процессе ее высыхания. // ЖТФ. 2003. Т.73, №4. С.23-27.
10. Яхно Т.А., Яхно В.Г., Санин А.Г., Санина О.А., Пелюшенко А.С. Белок и соль: пространственно-временные события в высыхающей капле. // ЖТФ. 2004. Т.49, №8. С.1055-1063.
11. Yakhno T.A., Yakhno V.G., Sanin A.G., Sanina O.A., and Pelyushenko A.S. A Method for Liquid Analysis by means of Phase Transitions during drop drying. // Bioengineered and Bioinspired Systems, 19-21 May 2003, Maspolamas, Gran Canaria, Spain. Proc. SPIE. 2003. V.5119. P.87-99.
12. Яхно Т.А., Яхно В.Г., Санин А.Г., Санина О.А., Кутяйкин В.Г., Усватов В.А. «Высыхающая капля» - новая технология интегральной оценки качества жидких продуктов. // Партнеры и конкуренты. РИА «Стандарты и качество». 2003. №4. С.29-33.
13. Yakhno T., Sanin A., Yakhno V., Pelyushenko A., Dowell M., Vacca C., and Goutarova V. Drying drops of biological liquids: dynamics of optical and mechanical properties. Application in rapid medical diagnostics. // BIOS-2005. Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic Systems III, 20-26 January 2005, San Jose, California, USA, 2005. Proc. SPIE. 2005. V.5692. P.188-198.
14. Yakhno T.A., Yakhno V.G., Sanin A.G., Sanina O.A., Pelyushenko A.S. Dynamics of phase transitions in drying drops as an information parameter of liquid structure. // Nonlinear Dynamics. 2005. №39. P.369-374.
15. Yakhno T.A., Sanin A.G., Yakhno V.G., Pelyushenko A.S., Egorova N.A., Terentiev I.G., Smetanina S.V., Korochkina O.V., and Yashukova E.V. The informative-capacity phenomenon of drying drops. Aptitude test in medical diagnostics. // IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine. 2005. V.24, N2, P.96-104.
16. Т.А. Яхно, В.Г. Яхно, А.В. Соколов. Процессы формообразования в высыхающих каплях сыворотки крови в норме и патологии. // Биофизика. 2005. Т.50, № 4. С.726-734.
17. Яхно Т.А., Яхно В.Г., Санин А.Г., Пелюшенко А.С., Шапошникова О.Б., Чернов А.С. Феномен высыхающей капли и возможности его практического использования. // Нелинейный мир. 2007. №1-2. С.47-54.
18. Yakhno T., Sanin A., Pelyushenko A., Kazakov V., Shaposhnikova O., Chernov A., Yakhno V., Vacca C., Falcone F., Johnson B. Uncoated quartz resonator as a universal biosensor. // Biosensors & Bioelectronics. 2007. V.22, №9-10. P.2127-2131.
19. Яхно Т.А., Санин А.Г., Яхно В.Г. Динамика фазовых переходов в высыхающих каплях биологических жидкостей: физико-химические основы, способ регистрации и извлечения диагностической информации. // В кн.: Медицина в зеркале информатики (ред. акад. РАН О.М. Белоцерковский и чл.-корр. РАН А.С. Холодов). М: Наука. 2008. С.63-78.
20. Яхно Т.А., Казаков В.В., Санин А.Г., Шапошникова О.Б., Чернов А.С. Сравнительная оценка механических свойств адсорбционных слоев в растворах белков сыворотки крови человека. // ЖТФ. 2007. Т.77, №4. С.119-122.
21. Яхно Т.А., Казаков В.В., Санин А.Г., Шапошникова О.Б., Чернов А.С. Динамика фазовых переходов в высыхающих каплях растворов белков сыворотки крови человека. // ЖТФ. 2007. Т.77, №4. С.123-127.

22. Yakhno T. Salt-induced Protein Phase Transitions in Drying Drops. // Journal of Colloid and Interface Science. 2008. V.318. P.225-230.
23. Яхно Т.А., Яхно В.Г. Основы структурной эволюции высыхающих капель биологических жидкостей.// ЖТФ. 2009. Т.79, №8. С.133-141.
24. Яхно Т.А., Санин А.Г., Vacca C.V., Falcione F., Санина О.А., Казаков В.В., Яхно В.Г. Новая технология исследования многокомпонентных жидкостей с использованием кварцевого резонатора. Теоретическое обоснование и приложения. // ЖТФ. 2009. Т.79, №10. С.22-29.
25. Yakhno T. Protein phase instability developed in plasma of sick patients: clinical observations and model experiments. // Natural Science, 2010, № 3, P. 220-227. DOI: 10.4236/ns.2010.23034; also available: <http://www.scirp.org/journal/NS>
26. Yakhno T., Sanin A., Kazakov V., Sanina O., Vacca C., Falcione F., Yakhno V. Uncoated quartz resonator as a universal biosensor. // in a book: Intelligent and Biosensors (ed. S.Somerset Vernon). INTECH. 2010. ISBN 978-953-7619-58-9. P.386-404. Also available: <http://www.sciyo.com/articles/show/title/uncoated-quartz-resonator-as-a-universal-biosensor>
27. Яхно Т.А., Казаков В.В., Санина О.А., Санин А.Г., Яхно В.Г. Капли биологических жидкостей, высыхающие на твердой подложке: динамика морфологии, массы, температуры и механических свойств. // ЖТФ. 2010. № 7. С.17-23.

#### Патенты

- 1П. Яхно Т.А., Новиков В.Ф., Гладкова Н.Д., Шибалова М.Б. Способ определения эффективности фототерапии. Патент RU 2018830 от 30.08.95.
- 2П. Яхно Т.А. Способ выбора оптимального диапазона длин волн для эффективной фототерапии. Патент RU 2077731 от 23.02.96.
- 3П. Яхно Т.А., Яхно В.Г., Санин А.Г., Шмелев И.И., Кротов Е.В. Способ исследования многокомпонентной жидкости. Патент РФ RU 2232384 от 23.01.2001.
- 4П. Yakhno T.A., Yakhno V.G., Shmeljov I.I., Sanin A.G., Krotov E.V., Brodsky Yu. Ya. Method for studing liquid and device for carrying out said method. Unated State Patent No: US 6,847,357 B2. Date of Patent: Apr. 5, 2005.
- 5П. Yakhno T.A., Yakhno V.G., Shmeljov I.I., Sanin A.G., Krotov E.V., Brodsky Yu. Ya. Method and Apparatus for Determination of Medical Diagnostics Using Biological Fluids. U.S. Appl. 2005-0262926, December 1, 2005, CIP of U.S. 6,874,357.
- 6П. Yakhno T.A., Yakhno V.G., Shmeljov I.I., Sanin A.G., Krotov E.V., Brodsky Yu. Ya. Method and Apparatus for Determination of Food Quality and Authenticity. U.S. Appl. 2005-0241373, November 3, 2005, CIP of U.S. 6,874,357.

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АД – артериальное давление  
АМИ – акустомеханический импеданс  
АС<sup>+</sup> - альциановый синий (катионный краситель)  
БСА – бычий сывороточный альбумин  
ВВФСУ – время восстановления функции синусового узла  
ГНЛ – гелий-неоновый лазер  
ДК – диеновые конъюгаты  
ИСГ – интенсивность спонтанного гемолиза  
КВВФСУ – скорректированное время восстановления функции синусового узла  
ИК - инфракрасный  
КЩС – кислотно – щелочное состояние  
МДА – малоновый диальдегид  
НИКС – низкоинтенсивный красный свет  
ОВП – окислительно-восстановительный потенциал  
ПАВ – поверхностно-активные вещества  
ПОЛ – перекисное окисление липидов  
САЧ – сывороточный альбумин человека  
СОЭ – скорость оседания эритроцитов  
СССУ – синдром слабости синусового узла  
ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы  
ЭПР – электронный парамагнитный резонанс  
ЯБ – язвенная болезнь  
IR – индекс ригидности

Яхно Татьяна Анатольевна

## **АГРЕГАТНОЕ СОСТОЯНИЕ И КООПЕРАТИВНЫЕ РЕАКЦИИ КОМПОНЕНТОВ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ**

А в т о р е ф е р а т

Подписано к печати XX.XX.2011 г.  
Формат 60 x 90 1/16. Бумага писчая №1. Усл. печ. л. 2,5.  
Тираж 120 экз. Заказ № XXX (2011). Бесплатно.

Отпечатано в типографии Института прикладной физики РАН,  
603950 г.Н.Новгород, ул. Ульянова, 46