



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УДМУРТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

КАФЕДРА БИОМЕДФИЗИКИ

Меньшикова
Светлана Геннадьевна

**Исследование бесконтактной активации крови
физическими методами**

Выпускная квалификационная работа

Научный руководитель
к.ф.-м.н. В. Г. Широносов,
зав. каф. Биомедфизики УдГУ

Ижевск
2002

Автор приносит благодарность заведующему кафедрой Биомедфизики УдГУ Широносову В.Г., аспиранту биолого-химического факультета УдГУ Казанкину Д.С., заведующему кафедрой гистологии ИГМА Соловьеву А.А., сотрудникам кафедры Растревой электронной микроскопии УдГУ, сотрудникам кафедры Иммунологии УдГУ, сотрудникам лаборатории Гематологии 2-й городской больницы за ценные советы в ходе написания данной дипломной работы. Также выражает свою искреннюю признательность доценту кафедры Гистологии ИГМА Соловьеву А.А., заведующему кафедрой Общей физики УдГУ Милютину И.В. за их любезное согласие ознакомиться с сей работой.

В дипломной работе приняты следующие сокращения

АК - активированная кровь

БА - бесконтактная активация

БАК - бесконтактно активированная кровь

БАЖ - бесконтактно активированная жидкость

БЭ - бездиафрагменный электролизер

ДП - диэлектрическая проницаемость

КК - контрольная кровь

ОВ - окислительно-восстановительных

ОВП (E_h) - окислительно-восстановительный потенциал (редокс потенциал)

ПЗ - поверхностный заряд

ТД - термодинамический

ЭКП - электрокинетический потенциал

ЭКС - электрокинетические свойства

ЭП – электродный потенциал

ЭФ - электрофорез

ЭФП - электрофоретическая подвижность

ЭХА - электрохимическая активация

НВЭ - нормальный водородный электрод

ХСЭ - хлорсеребряный электрод

ФР - физиологический раствор

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Электрохимическая активация растворов.....	7
1.2. Окислительно-восстановительный потенциал внутренних сред живых организмов.....	10
1.3. Бесконтактная активация как способ влияния на биохимические процессы живых организмов.....	14
1.4. Гипотезы, объясняющие действие изменений окислительно-восстановительного потенциала на живые организмы.....	16
1.5. Исследование клеток методом электрофореза.....	18
1.6. Исследование жидкостей методом СВЧ - спектроскопии.....	22
1.7. Исследование клеток методом растровой электронной микроскопии.....	24
1.7.1. Форма эритроцитов. Изменение формы эритроцитов при влиянии различных факторов.....	25
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	
2.1. Выбор объекта исследования.....	29
2.2. Метод бесконтактной активации физиологического раствора.....	29
2.3. Метод электрофореза.....	30
2.3.1. Электрофоретическая ячейка и схема установки для микроэлектрофореза.....	32
2.3.2. Методика и схема ячейки для проведения опытов.....	34
2.4. Метод СВЧ-спектроскопии.....	36
2.4.1. Методика и схема установки для проведения опытов.....	36
2.5. Метод растровой электронной микроскопии.....	37
2.5.1. Методика установки для проведения опытов.....	37
2.5.2. Методика подготовки биологических образцов для исследования.....	38
2.6. Применяемые формулы и математическая обработка результатов.....	41
ГЛАВА 3. ПРОВЕДЕНИЕ, РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ ОПЫТОВ	
3.1. Опыты по бесконтактной активации физиологического раствора.....	43
3.2. Опыты по изучению электрохимических свойств эритроцитов бесконтактно активированной крови методом микроэлектрофореза.....	45
3.3. Опыты по изучению спектра поглощения бесконтактно активированной крови методом СВЧ – спектроскопии.....	49
3.4. Опыты по изучению морфологии эритроцитов бесконтактно активированной крови методом растровой электронной микроскопии.....	53
ВЫВОДЫ.....	60
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	61
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 (технические характеристики приборов).....	71
ПРИЛОЖЕНИЕ 2 (руководство к выполнению лабораторной работы).....	73

ВВЕДЕНИЕ

Данная работа относится к широко распространенным в биофизике исследованиям, в которых изучается влияние различных физических факторов и физических явлений на биосистемы. В частности, физическими методами исследуется недавно обнаруженный феномен бесконтактной активации жидкостей (БАЖ) в бездиафрагменном электролизере (БЭ) и влияние БАЖ на состояние и свойства крови и ее форменных элементов.

Большой интерес для изучения представляет исследование свойств жидкостей организма и изменение этих свойств при различных физических воздействиях на жидкость. Известно, что ряд физических воздействий могут бесконтактно существенно изменять свойства и структуру жидкостей (работы Киселева, эффект Кирлиана, к.в.ч. и т.д. [32 - 35]) В соответствие с новым пониманием проблемы (II съезд биофизиков России [11 - 15]) предполагается, что сезонные, суточные, а также изменения физических параметров окружающей среды, таких, например, как интенсивность э.м. полей излучения различных диапазонов (н.ч., в.ч., с.в.ч., к.в.ч., оптика и т.д.) действуют, в первую очередь, на жидкости организма и, в частности, на кровь, а уже затем на форменные элементы биосистем. Особый интерес представляет изучение мощного влияния сверхслабых э.м. полей на биосистемы (резонансные эффекты [11 - 15]).

Прогресс любой науки обусловлен появлением новых методов исследования. В настоящее время существуют разнообразные методы исследования жидкостей и живых клеток: оптические, биофизические, биохимические. В данной работе используется совокупность методов: метод клеточного микроэлектрофореза, метод СВЧ-спектроскопии, метод растровой электронной микроскопии. Метод клеточного микроэлектрофореза является прижизненным и позволяет выяснить степень изменения свойств клеточной популяции и косвенно определить электроинженерные свойства (ЭКС) клеточной поверхности, которые играют очень важную роль в жизнедеятельности клеток организмов любых

типов [24]. Методом СВЧ-спектроскопии измеряются коэффициенты ослабления (Γ) при прохождении электромагнитных волн СВЧ-диапазона в исследуемом материале. Эти измерения являются косвенным определением его диэлектрической проницаемости. Данная величина является одной из важных характеристик внутренней микроструктуры вещества [10, 36]. Метод растровой электронной микроскопии позволяет определить морфологию клеток при различных состояниях организма [19, 20, 31]. Довольно распространенными методами исследования БАЖ являются методы измерения окислительно-восстановительного потенциала (ОВП или Eh), показателя кислотности среды pH [26, 39].

Дипломная работа посвящена изучению бесконтактной активации крови в бездиафрагменном электролизере. Целью работы является исследование различными физическими методами влияния бесконтактной активации на состояние и свойства крови и ее форменных элементов-эритроцитов *in vitro* (т.е. вне организма). В соответствии с этим в работе ставится ряд задач:

1. Исследовать различными физическими методами эффект бесконтактной активации крови в бездиафрагменном электролизере.
2. Разработать учебно-методическое пособие для исследования влияния бесконтактной активации на электроинетические свойства клеток.
3. Провести исследование динамики эритроцитов бесконтактно активированной крови, сравнить с контролем.
4. Исследовать зависимость коэффициента ослабления от частоты волн СВЧ диапазона для бесконтактно активированной крови, сравнить с контролем.

Новизна работы - исследуется возможность управления биохимическими реакциями живого организма посредством изменения Eh внутренней среды клеток безреагентным путем, т.е. без добавления химических веществ на основе нового открытого эффекта - БАЖ в БЭ. Сдвиг химического равновесия биохимических реакций клеток создается посредством отрицательного Eh БАЖ, которая не содержит в себе

чужеродных для организма компонентов и химических веществ. Также предполагается возможным введение в обход диагностики различных заболеваний на ранней стадии развития путем исследования биологических жидкостей организма.

В качестве исследуемого материала используются кровь и ее форменные элементы-эритроциты. Объект исследования выбран не случайно. Кровь – наиболее информативный индикатор состояния организма. Эритроциты являются сравнительно простыми клетками. В них отсутствуют ядро, митохондрии, и некоторые другие внеклеточные образования, что упрощает их исследование по сравнению с другими форменными элементами крови [41].

Полученные данные могут служить основой для разработки новых методов культивирования, повышения жизнеспособности микроорганизмов, создания систем долговременного хранения крови, а также для совершенствования сравнительно новых и эффективных методов диагностики различных заболеваний на ранней стадии развития.

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Электрохимическая активация растворов

В процессе исследования электролиза различных водных систем в диафрагменном электролизёре было обнаружено неизвестное ранее явление сохранения в жидкости потенциальной энергии поляризации электрода. Т.е. у самой поверхности электродов параметры воды (pH , Eh) изменяются в аномальных соотношениях. Сущность явления заключается в возможности заметного изменения скорости и селективности многих химических реакций (с участием преимущественно жидкостей и газов), за счет использования в качестве катализатора химических реакций энергии метастабильного состояния веществ после неравновесного электрохимического воздействия. Это явление было названо авторами электрохимической активацией (ЭХА) жидких сред [4, 5, 59].

В процессе экспериментальных исследований были выявлены следующие особенности состояния электроактивированной жидкой среды:

1. После прекращения электролиза водная система некоторое время пребывает в метастабильном состоянии (аномальные значения pH и Eh).
2. Электроактивированный раствор в некоторых химических реакциях изменяет не только их скорость, но и направление.
3. ЭХА среда, находящаяся в метастабильном состоянии, является неравновесной системой, постепенно проходит ряд псевдоустойчивых состояний по пути к достижению устойчивого термодинамического (ТД) равновесия. Процесс возвращения в состояние устойчивого ТД равновесия, называется электрохимической релаксацией среды [4, 5].

Одной из важных характеристик ЭХА воды является Eh , называемый также редокс-потенциал (от английского RedOx - Reduction/Oxidation), характеризует степень активности электронов в окислительно-

восстановительных (ОВ) реакциях, т.е. реакциях, связанных с присоединением или передачей электронов [96].

Формула для определения Eh раствора:

$$E = E_0 + 0,42 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]} - 2,3 \frac{RT}{F} p\text{H} \quad (1)$$

где Е - стационарный Eh раствора (В, НВЭ), содержащего в избытке компоненты системы [Ox]:[Red]; E_0 - стандартный Eh (В, НВЭ) данной ОВ пары при нормальных условиях; R - молярная газовая постоянная, Дж·моль/К; T - абсолютная температура, К; n - число переносимых электронов; F - постоянная Фарадея, Кл/моль [59, 62].

Измеряют Eh платиновым электродом относительно стандартного хлорсеребряного электрода (ХСЭ) сравнения при помощи высокоомного милливольтметра. Числовые значения Eh по шкале НВЭ приблизительно на 200 мВ ниже значений по шкале ХСЭ [59, 60].

Вода, обработанная только в анодной или только в катодной камере диафрагменного электрохимического реактора, называется соответственно анолитом и католитом [4].

После обработки питьевой воды с минерализацией 0,3 - 1,5 г/л в анодной камере электрохимического реактора РПЭ установки "СТЭЛ" ее pH = 3...4; Eh = +700...+1200 мВ. Катодная обработка воды обеспечивает pH = 10...11; Eh = -500...-800 мВ [59]. Достичь таких же параметров воды простым добавлением химических веществ изменяющих pH и Eh водных растворов невозможно. Это объясняется тем, что вода после обработки переходит в метастабильное состояние с повышенной реакционной способностью. Такое состояние обусловлено наличием высокоактивных соединений, но, в большей степени, длительно существующими структурно-энергетическими возбуждениями [4].

То, что активация водных растворов не зависит от появления в них продуктов электрохимического синтеза, доказывается возможностью бесконтактной ЭХА. Феномен бесконтактной ЭХА теоретически предсказан еще И.Л. Герловиным [16] на основе разработанной им

физической теории фундаментального поля. Экспериментальные данные по бесконтактной ЭХА впервые получены В.М. Бахиром в 1992 г. на основе диафрагменного электролизера [4].

Феномен БАЖ заключается в изменении параметров (pH , Eh) водных растворов в герметичных емкостях, помещенных в электрохимически активированные среды (т.е. в водную среду, где происходит или происходил электролиз). В результате БАЖ изменяется Eh и структура жидкости без изменения ее химического состава.

Как показали результаты экспериментов, при погружении в ЭХА-среды (католит, анолит) герметизированных емкостей, из аморфных материалов (лавсан, стекло, фторопласт), наполненных физиологическим раствором (ФР), показатели Eh в них достоверно менялись во всех случаях. В емкостях из лавсана и стекла знак Eh ФР соответствовал знаку ЭХА-среды, а в капсулах из фторопласта знак Eh менялся на противоположный знаку ЭХА-среды. Показатели pH достоверно изменялись в половине случаев: наиболее существенные изменения pH - в капсулах из лавсана, в стеклянных ампулах изменения выражены в меньшей степени, а в капсулах из фторопласта pH не менялся [4, 59].

Через 2 ч после бесконтактной ЭХА, измененные pH и Eh физиологического раствора, испытывали отчетливую тенденцию к релаксации.

Лавсан, стекло, фторопласт относятся к категории аморфных, диэлектрических, нефильтрующих и недиализирующих материалов. Поэтому изменения pH и ОВП водно - минеральной среды внутри герметизированных емкостей из этих материалов, при погружении их в ЭХА-растворы нельзя объяснить за счет проникновения внутрь продуктов электролиза или за счет прохождения электрического тока через содержимое герметизированных капсул или ампул [59].

Для выяснения природы феномена БАЖ на кафедре Биомедфизики УдГУ были проведены дополнительные опыты [89 - 92]. Эти опыты доказали возможность БАЖ в БЭ, что не объяснимо в рамках теории

фундаментального поля [16], но объяснимо в рамках теории нелинейных динамических систем [91]. Применение электролизной камеры, не разделенной полупроницаемой перегородкой, существенно упрощает схему установки для БАЖ. Поэтому в данной работе используется БЭ.

Существуют и другие способы активации водных сред: механический, термический, акустический, магнитный, электрический и т.д. [4].

1.2. Окислительно-восстановительный потенциал внутренних сред живых организмов

Термин Eh по смыслу соответствует понятию "электрохимический потенциал", обозначающему "*уровень свободной энергии системы относительно числа молей вещества в системе*" [45]. По определению, "электрохимический потенциал" эквивалентен мере свободной энергии биохимических реакций, необходимой для отрыва электронов от донорных соединений с последующим присоединением их к химическому акцептору [59]. Другими словами, Eh является показателем энергетического потенциала жидкости.

В соответствии с этим, в биохимии известно два общепринятых метода количественной оценки ОВ пар. С одной стороны, можно выписать значение ΔG для превращения восстановленной формы в окисленную форму кислородом (O_2). Соединение с большим отрицательным значением $-\Delta G$ будет хорошим восстановителем [46].

Второй способ выражения той же информации связан с использованием электродных потенциалов (ЭП). Связь между энергией Гиббса с ЭП описывается формулой:

$$-\Delta G = nEF = (nE \times 96,487) \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1} = (nE \times 23,061) \text{ ккал}\cdot\text{моль}^{-1} \quad (2)$$

где F – постоянная Фарадея, Кл/моль; E – измеренная разность ЭП двух полуэлементов, В; n - число молей электронов, перенесенных в ходе реакций (для обычных биохимических реакций равно 1 или 2) [46].

ЭП важны еще и потому, что их прямое измерение иногда позволяет подойти к изучению ОВ реакций внутри клеток [46].

По определению Г.В. Сумарукова [76] в живых системах (*in vivo*), в тканевых жидкостях существует стационарный Eh ($\phi_{ст}$), который отражает соотношение суммарных концентраций окисленных и восстановленных форм и "служит мерой тенденции системы становиться окисленной или восстановленной." Иными словами, стационарный Eh отражает донорные или акцепторные свойства тестируемой живой системы относительно НВЭ [59]. Возможно, что смещение стационарного Eh в компартментах клетки является способом регулирования биохимических реакций в необходимом клетке направлении [8].

При внесении в раствор электролита какого-либо вещества в смеси его восстановленной и окисленной форм Eh растворителя будут закономерно изменять отношение [Ox]/[Red], если растворитель "в избытке". Если же химическая добавка присутствует в растворителе в значительной концентрации, то соотношение [Ox]/[Red] добавки будет изменять Eh раствора [59, 60] в соответствии с формулой (1).

Вторая ситуация более характерна для живых систем. В настоящее время показано, что вода живой и мертвый клетки неодинаковы [9]. Несмотря на большое процентное содержание воды (от 60 до 95 % [24]) в организмах, количество свободной воды ограничено. По данным многих авторов, лишь от одной четверти до трети клеточной воды обладает той же подвижностью, что "обычная" вода. Остальная ее часть малоподвижна, как говорят, "структурирована" [81]. Таких данных за последние годы становится все больше, и они заставляют пересмотреть многие устоявшиеся представления об организации клеточной цитоплазмы.

Интегральное значение Eh внутренней среды клетки определяется соотношением всех электроакцепторных и электронодонорных компонент, и в этом случае частные соотношения окисленных и восстановленных форм будут подстраиваться под общее значение Eh. Если биологический объект (например, изолированную клетку) поместить в среду со значением Eh = E, то, в, соответствии с формулой (1), в редокс-системах, характеризующихся $E_0 > E$, будут преобладать процессы

восстановления, а при $E_0 < E$ будут преобладать процессы окисления. Таким образом, ЭХА-растворы создают относительно биологического объекта (или во внутренней среде биологического объекта) заданный электронодонорный или электроноакцепторный фон [59, 60, 76].

Данная закономерность экспериментально доказана. При помещении гомогенатов живых тканей в среды с различными заранее заданными $Eh = E$ достигалось равенство $[Ox] = [Red]$ именно для тех редокс пар, которые имели $E_0 = E$ [59]. Это создает предпосылки для электрохимического управления биохимическими процессами.

В настоящее время в промышленности, с/х и медицине применяются технологические растворы, вода и физиологические растворы с определенными значениями pH и Eh для управления процессами, происходящими в биосистемах.

В процессе окисления, восстановления, диссоциации или комплексобразования регулированием pH и Eh можно изменить потенциал, направление и скорость химических реакций, или при биохимической очистке воды – тормозить или ускорять жизнедеятельность бактерий, изменять каталитическую активность ферментов микробной клетки [22, 94]. При биологической очистке бытовых сточных вод в аэробных условиях белковый азот в результате аммонификации разлагается, образуя азот аммонийных солей. Для окисления иона аммония в нитриты и нитраты Eh воды необходимо повысить до положительных значений. На практике это осуществляют аэрацией сточной воды воздухом, который повышает Eh до значений, наиболее оптимальных для функционирования нитрифицирующих бактерий (0,3…0,5 В) [26], а также является акцептором водорода и других промежуточных восстановительных соединений – продуктов жизнедеятельности микроорганизмов [5,].

Таблица 1

ОВП (мВ)	Время жизни E-Coli, (мин)
450 - 500	167
500 - 550	6
550 - 600	1,7
700 - 750	0,2
750 - 800	0,05

В некоторых применениях (например, в обработке воды для бассейнов) Eh является одним из параметров контроля

качества воды. В частности потому, что позволяет оценить эффективность обеззараживания воды. Для иллюстрации приводится таблица 1 зависимости продолжительности жизни E. Coli от величины редокс-потенциала [96].

Водный раствор гипохлорида натрия, обладающий аномально высокими значениями Eh, приобретает свойства стерилизующей жидкости и применяется в медицине (хирургии, стоматологии и т.д.) для дезинфекции инвентаря [53].

Что касается медицинского применения, то, по крайней мере, для одной области терапевтических воздействий показана достоверная лечебная эффективность направленного снижения Eh внутренней среды обширной группы живых существ от насекомых до млекопитающих. Еще в 1970 г. Г.В. Сумаруков систематизировал литературные данные и показал в эксперименте, что уменьшение Eh тканей и органов, а также жидких биологических сред, сопровождается радиопротекторным действием независимо от того, каким именно методом вызвано снижение ОВП (гипоксия, введение антиоксидантов или выработка эндогенных радиопротекторов). При этом в организме происходит нейтрализация окисленных продуктов за счет создания условий их взаимодействия с избытком восстановленных молекул. В результате снижается риск необратимых перекисных повреждений биосубстрата [76].

Необходимо отметить, что введение в организм восстановителей само по себе не гарантирует значительных отрицательных сдвигов Eh в тканях. Попытки изменения и регулирования Eh внутренних сред организма химическими способами трудно предсказуемы, хотя существует ряд веществ, вызывающих локальные уменьшения Eh мышечной ткани на 140-170 мВ (цистеин, цистамин, тиомочевина, нитрит натрия, фруктоза, метионин и др.). Этиловый спирт уменьшает Eh мышцы на 13 мВ, что подтверждает хорошо известное в быту слабое противолучевое действие этого вещества [76].

Как показывают расчеты, колебания Eh во внутренних средах организма всего лишь на десятки мВ физиологически существенны. Следовательно, параметр Eh должен занять свое место в ряду актуальных гомеостатических характеристик [59].

Но в целом проблема управления Eh внутренней среды организма разработана слабо в связи с рядом методических трудностей. Прежде всего, технические возможности измерения Eh в живом организме крайне ограничены [28]. Кроме того, общий набор медико - биологических методов воздействия на электронное равновесие организма в подавляющем большинстве случаев обходится без учета Eh, что создает в данной области информационный вакuum [59].

1.3. Бесконтактно активированные растворы как способ влияния на биохимические процессы живых организмов

Помимо простоты получения, универсальности применения и значительного сокращения или полного исключения специальных химических реагентов, бесконтактно активированные растворы обладают самым существенным преимуществом перед традиционными – они экологически чисты. В процессе их приготовления в раствор не вносятся какие-либо химические или чужеродные организму вещества. После некоторого, достаточно продолжительного времени, бесконтактно активированный раствор теряют свою активность, и приближаются по свойствам к исходному состоянию [3].

Отрицательные значения Eh бесконтактно активированной воды создают электронодонорный фон. Равновесие биохимических реакций в такой среде может быть сдвинуто в соответствии с формулой (1). Созданный в бесконтактно активированной среде электронодонорный фон, может использоваться клетками как энергетический резерв антиоксидантной защиты организма при неблагоприятном влиянии внешней среды. К примеру, было установлено, что при поении мышей,

облученных смертельной дозой рентгеновского излучения, водой с Eh= -450 мВ смертность уменьшилась с 96 % до 10 % по сравнению с контрольной, которой давали обычную (неактивированную) водопроводную воду с положительным Eh [59 - 61].

Работы в направлении изучения БАЖ ведутся и уже получены многообещающие результаты. Помимо БАЖ в ЭХА-средах, известен способ Киселева Б.И. бесконтактной активации (БА) растворов магнитным полем, УФО, лазером с дополнительным воздействием, генератором акустических колебаний, меняющим структуру и размеры микрокластеров воды от ~ 20 диполей до ~2-3 [32 - 35]. Этот способ нашел широкое применение для лечения многих заболеваний [32 - 35] и укрепления иммунитета.

Прилуцким В.И. были проведены опыты на клеточных тест-объектах, показывающие изменение свойств этих объектов при инкубировании в средах с различным Eh. Опыты проводились на клетках, обладающих собственной подвижностью (сперматозоиды быка, эвгlena зеленая (*Euglena viridis*)). Было показано, что оптимальный диапазон Eh среды инкубирования по показателю подвижности сперматозоидов смешен в отрицательную сторону и составляет Eh = -130 ... 0 мВ, ХСЭ. Для *Euglena viridis* хорошая подвижность наблюдалась в диапазоне Eh = -200 ... +500 мВ, ХСЭ. [59 - 61]. Объясняется это тем, что в электронодонорной среде происходит сдвиг равновесия биохимических реакций, который, в результате, способствует накоплению восстановленных форм без угнетения тканевого дыхания, что эквивалентно анаболическому эффекту [59].

На основе опытов по электрофоретическому поведению клеток показано, что вода с пониженным Eh обладает адаптивным действием на клетки микроводорослей [72] и клетки человека (букальный эпителий [75], эритроциты, нервные волокна [52]).

Применение бесконтактно активированных сред является новым и перспективным методом управления биохимическими реакциями клеток.

Воздействие активированных веществ на живой организм состоит в изменении активностей ионов и молекул, участвующих в элементарных актах физико-химического воздействия и определяет скорость, энерговыделение, а в ряде случаев и направление реакций. Таким образом, применение активированных веществ для регулирования жизнедеятельности организмов обеспечивает чрезвычайно мягкое и эффективное воздействие на биологические процессы благодаря влиянию на первичные физико-химические реакции (передачу электрона, перенос протона), определяющие (через скорость, интенсивность энерговыделения) все последующие процессы [4, 59]. Воздействие на первичные процессы химических веществ (лекарственные средства) практически невозможно без изменения химического состава внутренней среды, а это всегда приводит к побочным эффектам [6].

Поэтому возникает необходимость дальнейшего исследования свойств бесконтактно активированных растворов и изучения их влияния на биохимические реакции клеток.

1.4. Гипотезы, объясняющие действие изменений окислительно-восстановительного потенциала на живые организмы

Eh эквивалентен мере свободной энергии биохимических реакций, необходимой для отрыва электронов от донорных соединений с последующим присоединением их к химическому акцептору. Поэтому большинство авторов склоняется к точке зрения о том, что изменение Eh внутренних сред влияет, прежде всего, на перенос заряда. Причем независимо от того, что считать базовым носителем этого заряда: электроны, как то считает классическая клеточная термодинамика [8], или протоны в представлении новых концепций биоэнергетики клетки [54].

Изменение Eh внутренней среды организма, в основном, можно достичь введением различных лекарственных веществ. О механизме действия лекарственных средств, к которым относятся также различные

модификации воды и ее растворов, а также источники целебных минеральных вод, водолечение (гидротерапия), ионизированная вода, вода, содержащая радиоактивные элементы, и др., в настоящее время практически мало известно с биологической и медицинской точки зрения. А. Сент-Дьерди отмечает [68, 69], что существует связь между переносом заряда и действием лекарственных средств, поскольку некоторые из них могут служить донорами или акцепторами электронов.

Трудно предсказать биологический эффект такого переноса заряда, т.к. действие этих лекарственных веществ зависит не только от того, отдают ли они электроны или захватывают их, но и от места их воздействия. Например, клеточные мембранные, управляющие многочисленными функциями клетки, большей частью несут отрицательный заряд на внутренней своей стороне, а положительный - на внешней. Поэтому электроны, отдаваемые на внутренней поверхности мембранны, увеличивают заряд, что ведет к гиперполяризации и вместе с тем к торможению, тогда как электроны, отдаваемые на внешней стороне, уменьшают потенциал и, вероятно, вызывают возбуждение [6, 52].

Если вещество осуществляет свои биологические функции в результате присоединения или отдачи электронов, то оно должно обладать исключительными донорными или акцепторными свойствами [6].

О роли процесса переноса заряда в фармакологической активности свидетельствует тот факт, что различные алкалоиды (например, хинин, никотин и др.) являются хорошими проводниками по отношению к йоду [6].

В работах Прилуцкого В.И. [59 - 62] приводится гипотеза, объясняющая действие электродонорных факторов активированной воды на митохондрии.

Известно, что за счет различия знаков зарядов (поляризации) на поверхностях мембранных митохондрий возникает разность потенциалов, провоцирующая транспорт протонов из межмембранныго пространства (H^+ - резервуар) на внутреннюю поверхность внутреннего контура мембранны,

обращенного к матриксу. Мембрана митохондрии оказывает сопротивление переносу протонов. Для преодоления этого сопротивления на внутреннем контуре митохондриальной мембранны необходим трансмембранный градиент Eh не менее 200 мВ [59 - 61].

По предположению, усиление электронодонорного фона вокруг митохондрии при диффузии воды с отрицательным значением Eh или при накоплении восстановленных химических соединений, создает эффект электронного давления на внешнюю оболочку митохондрии и стимулирует транспорт электронов в направлении матрикса. Это создает предпосылки для увеличения ΔE и "проталкивания" протонов на внутреннюю сторону мембранны с последующим усилением ресинтеза АТФ.

Возможно, при этом молекулы электроактивированной воды имеют преимущество перед обычными молекулами воды при их проникновении внутрь митохондрии. Механизм и конечные эффекты подобного воздействия являются многофазными и неоднозначными.

Таким образом, смещение электронного равновесия в биологических жидкостях, окружающих митохондрии, способно усиливать процессы энергогенеза. Сдвиг Eh в сторону восстановительных (отрицательных) значений создает условия для активации тканевого дыхания и расхода энергии, который компенсируется накоплением восстановленных химических форм и, в конечном счете, преобладает анаболический эффект [59 - 61].

1.5. Исследование клеток методом электрофореза

Первая и особенно вторая половина XX века характеризовалась широким использованием новейших достижений физики, химии, техники для решения медико-биологических проблем. Это позволило учёным "добраться" до глубины клетки и получить принципиально новый, богатейший материал о процессах, развертывающихся в ней в условиях нормы и при патологии [65].

С 1889 года, главным образом благодаря работам Фишера и Харди, показавшим, что путём воздействия фиксаторов на коллоидные модели можно воспроизвести разнообразные структуры, наблюдаемые в фиксированных клетках, но не отражающие их прижизненного состояния, интерес переместился в сторону изучения живых клеток [65]. Непосредственное наблюдение живых клеток в организме названо прижизненным или витальным, в свежеприготовленной из организма ткани или какой-либо биологической жидкости (сыворотка крови, водянистая влага глаза, физиологические растворы) – суправитальным. Суправитальное или витальное наблюдения можно проводить на клетках, свободно взвешенных в жидкой среде или выделенных из фрагментов ткани, на прозрачных мембранах, прозрачных частях организма животного и даже на непрозрачных органах. В исследованиях этого типа весьма полезно применение красителей, почти или совершенно безвредных для живых клеток, например, нейтрального красного, трипанового или метиленового синего, януса зеленого.

Наряду с другими методами прижизненного исследования достаточно широко используют клеточный электрофорез (ЭФ). Традиционно ЭФ применяют для разделения (аналитического и препаративного) высокомолекулярных соединений, таких, например, как, белки и нуклеиновые кислоты. Фактически, этим методом можно выявлять любые молекулы, имеющие электрический заряд и поэтому обладающие способностью двигаться в электрическом поле [24]. Заряд клеточной поверхности является неотъемлемым свойством любой клетки. Как известно, именно поверхность есть место, где совершаются многочисленные биологически важные явления [24]. Электрический заряд клеток играет важную роль в газообмене [83], адсорбции веществ из внешней среды [17, 82], образовании структуры клеточных скоплений [24, 43, 64, 83] и во всех остальных физиологических проявлениях жизни. В средах, неблагоприятных для жизнедеятельности, поверхностный электрический заряд клеток может существенно изменяться [43, 83]. Это

одно из проявлений приспособительной реакции клетки на изменившиеся условия среды. Например, при экстремальных значениях pH среды дрожжевые клетки снижают суммарный поверхностный заряд, тем самым ослабляется взаимное отталкивание клеток. В результате наблюдаются скопления клеток на поверхности среды и пенообразование в ферментере [83]. Клеточный ЭФ достигается путём наложения постоянного электрического поля на взвесь клеток, находящихся в жидкой среде. Величина электрического заряда и его знак зависят от природы ионогенных групп, степени их диссоциации и pH среды. Эритроциты несут на своей поверхности отрицательный электрический заряд. Величина заряда играет важную роль в поддержании гомеостаза внутренней среды организма человека, его адаптации [88]. Различные ферменты и белки могут прочно фиксироваться на поверхности эритроцитов, снижая их заряд до определённой величины. Заряд целой клетки обуславливается не одним каким-либо её компонентом, а суммой всех зарядов, образующихся на поверхности клетки [83]. Заряды на поверхности эритроцита распределяются неравномерно. Более высокая плотность зарядов на выпуклых поверхностях клетки.

Приложение к крови внешнего электрического поля вызывает направленную ориентацию, вращение, деформацию, а так же поступательное движение (клеточный ЭФ) клеток. Свойства клеток, которые определяют ее способность взаимодействовать с электрическим полем, названы электроинетическими свойствами (ЭКС). ЭКС проявляются, прежде всего, в движении клетки или ее отдельных частей (мембрана, ядро, митохондрии и т.д.), под действием внешнего электрического поля, т.е. при ЭФ. По определению, электрофорез - это движение частиц, находящихся во взвешенном состоянии в жидкой среде, под действием внешнего электрического поля [45]. В этом отношении следует различать понятие "методы электрофореза", которое означает "способы определения ЭКС клеток или частиц".

Линейная скорость электрофореза является основным ЭКС клетки и зависит, прежде всего, от её заряда. Но возникают затруднения при интерпретации результатов, полученных при непосредственных наблюдениях подвижности клеток в электрическом поле [70]. Эти затруднения в значительной мере устраняются с применением аналитических методов для определения ЭКС. Для этих целей наиболее широко используют метод микроэлектрофореза, основанный на измерении скорости движения *отдельных* клеток в постоянном электрическом поле [24, 83]. Микроэлектрофорез позволяет количественно оценить ЭКС отдельных клеток или частиц:

1. Электрофоретическую подвижность (ЭФП) [24], под которой понимают отношение линейной скорости клетки к напряженности поля [24]. Или, другими словами, движение клеток в среде под действием электрического поля напряженностью в 1 В/м [24].
2. Электрокинетический потенциал (ЭКП или ζ -потенциал). Это падение потенциала в так называемой плоскости скольжения, разделяющей неподвижную часть ионов двойного электрического слоя (ДЭС), сцепленных с поверхностью клетки, от подвижной, окружающей клетку [24].
3. Плотность поверхностного заряда (ПЗ) [24].

В формулах, применяемых для вычисления ЭФП, ЭКП, ПЗ частиц учитывается: напряженность электрического поля, скорость движения клетки, вязкость и диэлектрическая постоянная (ДП) среды, ионная сила раствора и некоторые другие параметры, которые зависят от используемых методов. Таким образом, при пересчете линейной скорости с учетом влияния условий, в которых она наблюдается, можно получить количественную оценку ЭКС, не зависящую от применяемой методики.

Особенно широкое распространение в последние годы получил МЭФ форменных элементов-клеток крови и использование этой техники в разнообразных областях: иммуногематологии, устойчивости крови, патофизиологии, реологических свойств. Клетки крови как объект

изучения и их поведение в электрическом поле описаны ещё в 1892 году. ЭКС форменных элементов крови в норме и при патологии, несмотря на неопределённость выводов некоторых исследований, представляются важным направлением современной биофизики [83].

1.6. Исследование жидкостей методом СВЧ-спектроскопии

К сверхвысокочастотным электромагнитным колебаниям в настоящее время относятся такие колебания, частота которых лежит в диапазоне от $300 \cdot 10^6$ Гц (300 МГц) до $300 \cdot 10^9$ Гц (300 ГГц). Со времени изобретения радио А. С. Поповым началось быстрое освоение различных диапазонов радиоволн. Он же предложил использовать радиоволны не только для связи, но и для обнаружения предметов по их "радиотени". В настоящее время существует много областей использования электромагнитных колебаний, особенно СВЧ диапазона [10]. С помощью СВЧ энергии можно сушить древесину, фрукты, размораживать и нагревать различные продукты, нагревать пластмассу перед ее формовкой и т. д. СВЧ энергию можно применять в медицине для местного прогрева различных частей тела. СВЧ колебания в последние годы успешно применяют в различных областях техники для нагрева материалов. Это связано с тем, что СВЧ колебания хорошо поглощаются многими диэлектрическими материалами. При применении волн и колебаний СВЧ диапазона важно знать законы их распространения и поглощения и иметь разнообразные генераторы СВЧ колебаний [10].

СВЧ энергия, прежде чем попасть к потребителю (например, излучающей антенне радиолокационной станции), очень часто проходит ряд СВЧ устройств (усилители, преобразователи и т. д.) Такие устройства соединяются друг с другом линиями передач СВЧ колебаний-коаксиальными или волноводными. Поэтому нагрузкой линии передачи можно назвать любое СВЧ устройство, к которому эта линия подводит энергию СВЧ, независимо от того, что произойдет с энергией в этом устройстве (будет ли она поглощена, усиlena и передана дальше или будет

излучена). Режим работы линии количественно можно охарактеризовать коэффициентом стоячей волны напряжения (КСВН).

Диапазон СВЧ волн в данной работе используется для исследования свойств жидкости (крови). В настоящее время существует много способов по определению химических и физических свойств жидкостей: рН-метрия, определение редокс-потенциала (Eh) и т. п. [26, 39]. Но эти данные не позволяют проводить анализ внутренней структуры жидкостей. Основным недостатком подобных методов является то, что элементы измерительных приборов вступают в непосредственный контакт с исследуемыми веществами и могут внести качественные изменения в их структуру. Исключить подобные недостатки позволяют бесконтактные методы исследований, основанные на использовании электромагнитных волн СВЧ диапазона. Измерение характеристик материалов СВЧ методами дают возможность определять свойства вещества и их молекулярную структуру. Одними из основных характеристик материалов являются магнитная и диэлектрическая проницаемости (МП и ДП). Зная их, возможно качественное сравнение различных типов жидкостей по их физическим свойствам. В силу высокой чувствительности данных методов, возможно также фиксировать изменения в веществе, подвергнутого какому-либо внешнему воздействию.

СВЧ диэлектрометрия необходима для исследования механизмов биологического воздействия электромагнитного излучения СВЧ диапазона на вещество. Однако, поскольку основным веществом, поглощающим волны мм диапазона, является вода, излучение диэлектрических свойств в этой области представляет интерес для выяснения роли растворителя как в поддержании нативной структуры биообъектов при различных температурах, так и во влиянии состояния водного окружения на параметры термических конформационных переходов в нуклеиновых кислотах и белках [29].

Один из бесконтактных методов определения ДП основан на измерении коэффициента стоячей волны по напряжению (КСВН) и коэффициента

поглощения (Γ) [37]. В работе измеряется коэффициент для волноводной линии, где в качестве нагрузки используются различные образцы крови.

1.7. Исследование клеток методом растровой электронной микроскопии

На сегодняшний день одним из наиболее информативных методов исследования микроструктуры (микрообъема) материала является электронная микроскопия: просвечивающая и растровая. В отличие от просвечивающего микроскопа, в котором объект изучают на просвет, растровый электронный микроскоп (РЭМ) позволяет изучать поверхность массивного образца. РЭМ-это прибор с большими возможностями, позволяющий наблюдать и изучать неоднородные органические и неорганические материалы и поверхности. В этом приборе исследуемая область или анализируемый микрообъем облучается тонко сфокусированным электронным пучком либо неподвижным, либо разворачиваемым в растр по поверхности образца. Объемность изображения возникает за счет большой глубины фокуса растрового электронного микроскопа, а также эффекта оттенения рельефа контраста во вторичных электронах. Большая глубина фокуса этого микроскопа дает возможность получить богатую информацию об образце. Именно эта особенность является самой ценной для исследователей, использующих РЭМ. РЭМ также позволяет исследовать объекты при очень малых увеличениях, что особенно важно в некоторых областях науки [19, 20, 31].

Растровая электронная микроскопия внесла существенный вклад в решение некоторых проблем иммунологии. Установлены значительные различия в строении поверхностной мембранны Т - и В - лимфоцитов, что позволяет морфологически дифференцировать эти типы клеток, выполняющие различные функции при формировании иммунного ответа [20].

Применение РЭМ оказалось перспективным в изучении тонкого строения почки [38]. В частности, при помощи этого метода оказалось

возможным изучить трехмерное строение капиллярной сети почки и описать наличие междольковых капилляров, обеспечивающих взаимосвязь между сосудами различных долей почки.

С помощью РЭМ были изучены изменения эритроцитов под влиянием искусственного кровообращения с различными перфузионными средами [42], состояние эритроцитов периферической крови при прямом массаже сердца [51], морфологические изменения эритроцитов под влиянием нативного яда красной кобры [55]. Были проведены исследования формы эритроцитов после экстракорпорального ультрафиолетового и красного когерентного облучения крови [30] и структурные изменения форменных элементов УФ облученной крови, описанные в работе [77].

1.7.1.Форма эритроцитов. Изменение формы эритроцитов при влиянии различных факторов

Изучение взаимосвязи между структурой и функцией клеток крови, взаимодействие этих клеток друг с другом невозможно без правильных представлений об эритроцитах как о трехмерных образованиях.

В 1967 году было впервые получено объемное изображение эритроцитов с помощью РЭМ. Именно тогда было доказано, что красные кровяные тельца имеют форму двояковогнутого диска. Однако, как оказалось, это не совсем так. Правильную форму двояковогнутого диска имеют не все эритроциты, а лишь нормоциты, что было выяснено благодаря дальнейшему применению РЭМ для исследований морфологии клеток. По наблюдению в РЭМ [78], правильная двояковогнутая форма клеток в изученных образцах крови здоровых людей составляет 60 - 70%. Характерно, что нормальные эритроциты имеют гладкую поверхность. Границы нормоцитов могут иметь неровные очертания. Такие клетки имеют объем $V=163 \text{ мкм}^3$. Благодаря тому, что содержимое эритроцитов обладает определенной вязкостью, в токе крови возможно перемещение мембранны, которая строго фиксирована, и к числу уникальных свойств эритроцитов относится их способность к изменению своей формы.

Изменение обусловлено вязкоэластичными свойствами мембраны, которая почти не способна к растяжению, но обладает очень небольшим сопротивлением к изгибу, то есть значительной гибкостью. В процессе систематического изучения изменений формы эритроцитов под влиянием различных факторов появилась необходимость использования эталона, который можно было бы считать так называемой нормой. В литературе [78] представлена одна из классификаций форм клеток для исследования их в РЭМ. Клетки способны принимать различные равновесные формы (рис. 1).

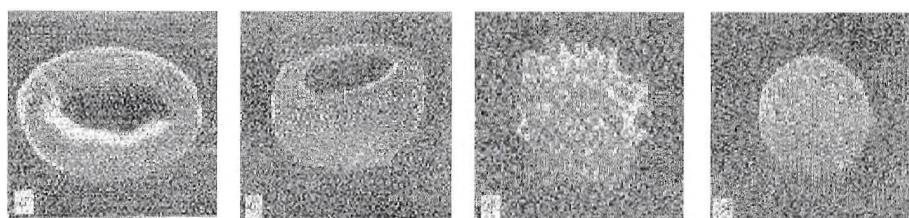


Рис. 1. [78]. Равновесные формы эритроцитов по данным РЭМ
а - дискоцит, б - стоматоцит, в - эхиноцит, г - сфеноцит

При исследовании морфологии эритроцитов следует различать деформированные и деструктивные формы эритроцитов (рис. 2).

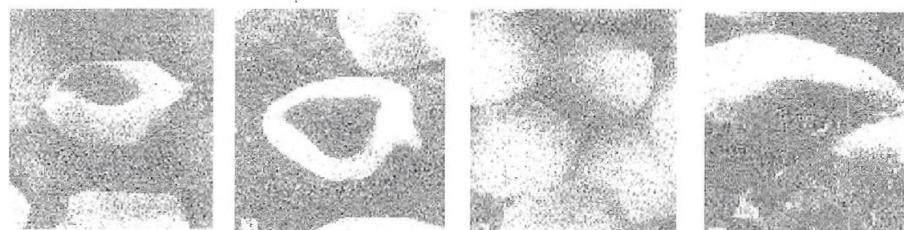


Рис. 2. [38]. Деформированные и деструктивные эритроциты.
а - деформированный эритроцит, $\times 10000$, б – группа деформированных эритроцитов, $\times 10000$, в – деструктивные эритроциты, имеющие вид сферы, г – деструктивный эритроцит в момент разрушения, $\times 10000$

Деструктивные формы эритроцитов появляются в результате воздействия на кровь ряда физических факторов: сжимающих пассажей насосов, осмотического стресса, газодинамического разрушения. Деформированными называют эритроциты с несколько измененной поверхностью, которые можно обнаружить в крови здоровых людей, не страдавших болезнями крови. Форма и очертания деформированных

эритроцитов искажены или искривлены. Не исключена возможность, что деформированные эритроциты развиваются из нестойких, молодых форм эритроцитов, являющихся переходной формой между одной из не совсем зрелых эритроцитов к нормоцитам. Изменение формы эритроцитов может быть вызвано рядом причин. Наиболее важным [38] можно считать две из них: нарушение осмотического равновесия по обе стороны от мембраны эритроцита и естественное старение его. После нескольких недель хранения при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ или при добавлении ингибиторов метаболизма в плазме крови эритроциты принимают форму, представляющую предгемолитическое состояние клеток (рис. 3). Такие же изменения происходят через несколько часов инкубации клеток при 37°C .

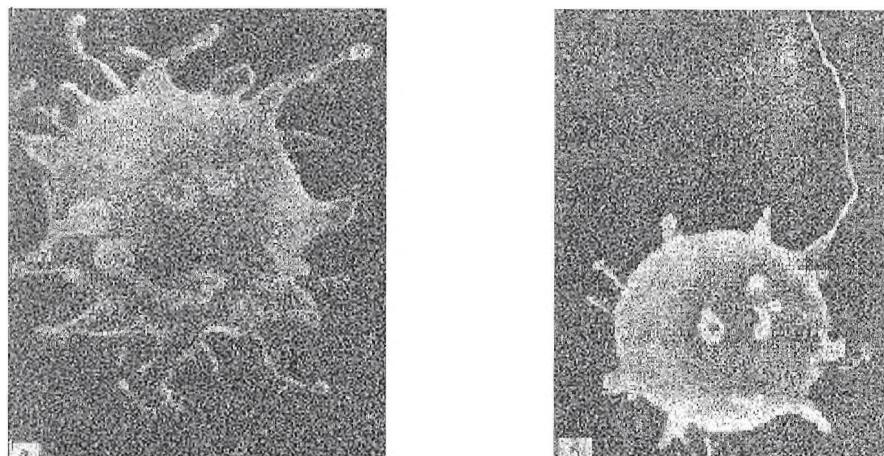


Рис. 3. [38]. Эритроциты в длительно хранимой донорской крови (по Bessis, Mandon, 1972)
а – сфераэхиноцит, $\times 14300$, б – миелиновая форма, $\times 14300$

Изменение формы эритроцитов снижается при ишемии и диабете, так же при малярии. Эти изменения могут быть обусловлены нарушениями метаболических процессов в клетках, изменениями в гемоглобине или дефектами в мембранных липидах.

При некоторых заболеваниях эритроциты принимают патологические формы, которые не встречаются *in vitro* [86] (рис. 4).

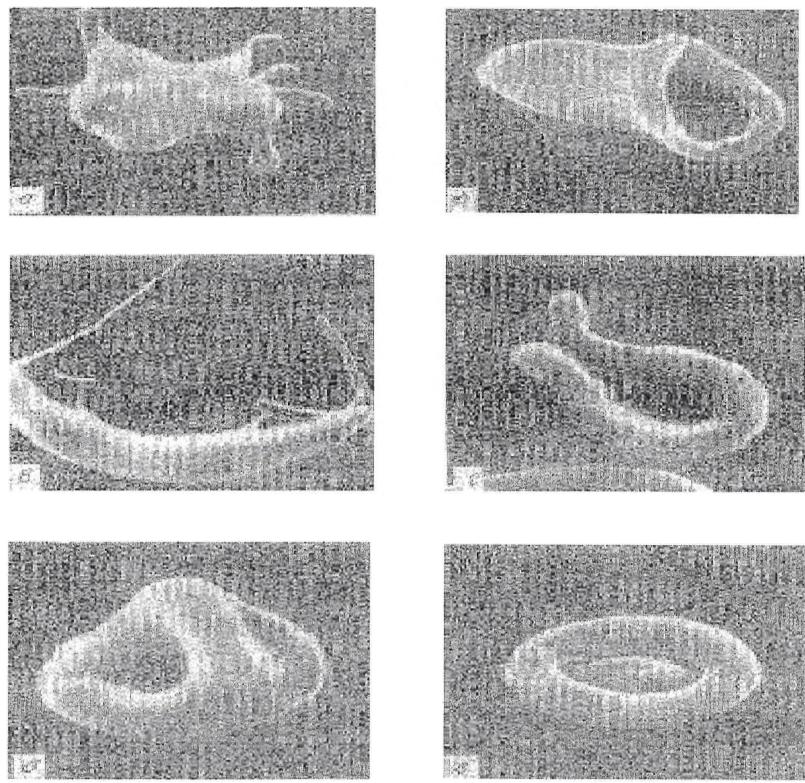


Рис. 4. [86]. Патологические формы эритроцитов по данным РЭМ

а – акантоцит, б – кадоцит, в – дрепаноцит, г – кератоцит, д – книсоцит, е - тороцит

В данной дипломной работе исследуется возможность влияния БА на форму эритроцитов.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Выбор объекта исследования

Объект исследования выбран не случайно. Кровь - наиболее информационный индикатор состояния организма. Подание в организм чужеродных веществ вызывает изменения, в первую очередь, в крови, влекущие за собой невыполнение основных функций ее форменных элементов: эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов. Поэтому в качестве объекта исследования в работе использовалась кровь и ее форменные элементы - эритроциты. Эритроциты являются сравнительно простыми клетками. В них отсутствуют ядро, митохондрии, и некоторые другие внеклеточные образования. Для эритроцитов нет необходимости в применении красителей, они хорошо видны в световой микроскоп. В данных биологических объектах содержится около 70% воды, 25% гемоглобина, 5% составляют липиды, сахара, соли, ферментные белки. Содержимое эритроцитов – жидкость [41].

2.2. Метод бесконтактной активации ФР

В данной работе проводилась бесконтактная активация ФР в БЭ. Схема опыта представлена на рис. 5.

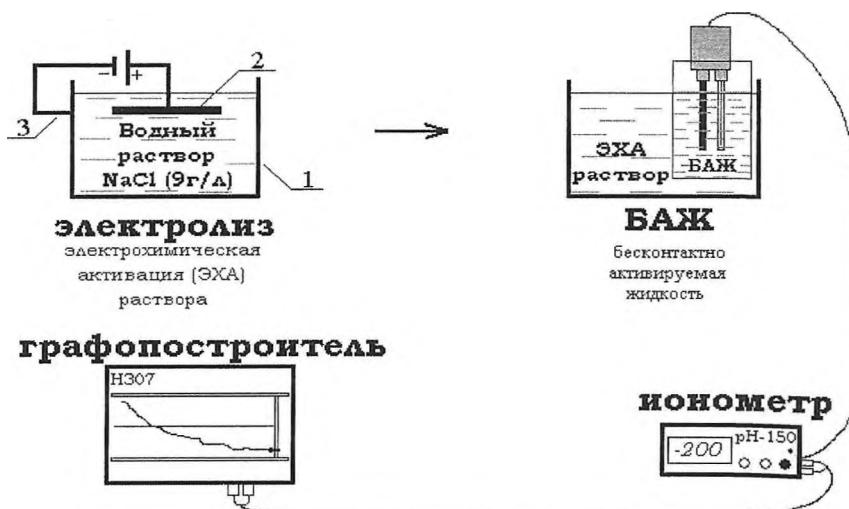


Рис. 5. Блок-схема опыта по бесконтактной активации физиологического раствора

Электролизная камера (1) представляет собой цилиндрическую ёмкость диаметром 15 см и высотой 7 см из нержавеющей стали медицинского применения (марка 12H18X9T), которая одновременно служит катодом. В качестве анода (2) используется диск диаметром 10 см и толщиной 2 мм из титана с покрытием ОРТ (электрохимически стойкий сплав сложного состава, содержащий оксид рутения, платину, серебро и др.). Напряжение на электродах обеспечивается источником питания постоянного тока Б5-49 (3). Анод в форме диска размещается в камере горизонтально, на глубине 1 см от поверхности жидкости.

2.3. Метод электрофореза

В данной работе используется разновидность электрофореза, именуемая для краткости как "знакопеременный электрофорез".

Сущность метода очень кратко можно охарактеризовать с помощью его полного названия: "метод прижизненного знакопеременного клеточного микроэлектрофореза".

В данном случае "прижизненный" и "клеточный" означает, что для исследования используются живые клетки (микроводоросли, дрожжи, бактерии, форменные элементы крови и т.д.), в отличие от методов, в которых изучаются биологические частицы неклеточного строения, а также вирусы и инертные частицы, покрытые исследуемым веществом (белки, антитела и т.д.). Возможность прижизнского исследования является преимуществом метода, поскольку позволяет вести наблюдения клеток непосредственно в процессе их жизнедеятельности.

Слово "знакопеременный" отражает специфику данного метода, которая отличает его от остальных. В обычных методах электрофореза, клетки, под действием постоянного поля, проходят определенное расстояние ($s = \text{const}$) и фиксируется время их движения. Чем больше заряд клетки, тем меньше время движения.

Иной принцип лежит в основе знакопеременного метода. Время действия тока *одной направленности* является постоянной величиной ($t = \text{const}$), а фиксируется расстояние, которое проходит клетка. Чем больше поверхностный заряд клетки, тем большее расстояние она проходит. После этого заряд на электродах меняется и между ними возникает электрический ток *противоположной направленности*. Клетка в любом случае движется к электроду, заряд которого противоположен собственному заряду клетки, но при смене знаков на электродах *направление движения* меняется на противоположное. В результате можно наблюдать возвратно-поступательные колебания клеток в такт колебаниям направленности внешнего поля. Таким образом, частота колебаний клеток равна частоте смены знаков на электродах, но амплитуда колебания может быть различной в зависимости от заряда клетки. Под амплитудой колебания клеток в данном методе понимается расстояние, которое проходит клетка в поле зрения микроскопа под действием $1/2$ периода смены направленности поля. За один период смены знаков на электродах клетка движется в прямом и обратном направлении. В случае отсутствия течений в электрофоретической камере она возвращается в то же место, откуда начинала свое движение.

Поскольку для наблюдения клеток применяется микроскоп, то данный метод следует называть "микроэлектрофорезом", в отличие от метода подвижной границы, когда можно невооруженным глазом определить смещение суспензии клеток, например эритроцитов, в капилляре, под действием поля. Можно кратко перечислить преимущества микроэлектрофореза, которые наиболее важны для данной работы: 1) при использовании высокого увеличения, обеспечивается большая чувствительность измерений; 2) форма, размер и ориентация частиц могут быть определены одновременно с электрофоретической подвижностью; 3) наблюдения проводятся при низкой концентрации частиц, так что взаимодействие между ними исключено; 4) возможно измерение различий в электрофоретической подвижности **отдельных** клеток.

Для создания знакопеременного поля используется устройство аналогичное "устройству для оценки электроинетических свойств клеток букального эпителия", запатентованного М.С. Гончаренко, Е.А. Ерешенко, Д.Л. Хавжу в 1994 году. В данной работе использовался прецизионный прибор (генератор сигналов специальной формы программируемый Г6 - 31) работающий по тому же принципу [83].

Преимуществами метода являются простота, невысокая стоимость, возможность определения электроповерхностных свойств при различных физиологических состояниях исследуемых клеток.

Вместе с тем метод еще недостаточно разработан и нуждается в дальнейшем совершенствовании как самого прибора, так и методических подходов к работе. Но уже сейчас с помощью него получено много экспериментальных данных [52, 59, 71, 75, 83, 93].

2.3.1. Электрофоретическая ячейка и схема установки для микроэлектрофореза

Для определения ЭКС клеток использовалась упрощенная горизонтальная прямоугольная одноразовая электрофоретическая ячейка. Конструкция ячейки представлена на рис.6.

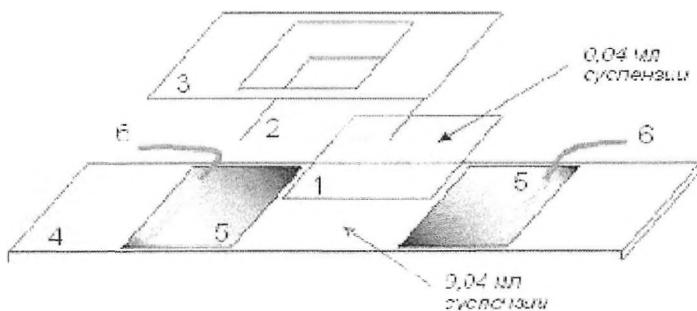


Рис. 6. Конструкция ячейки для исследования электроинетических свойств микрочастиц, взвешенных в жидкостях. Вид камеры в разобранном виде

Основанием ячейки является стандартное предметное стекло (4), на котором фиксированы серебряные электроды (5). Расстояние между электродами $l = 2,5$ см. На предметном стекле, между электродами располагается электрофоретическая камера одноразового использования.

Она образована двумя покровными стёклами (1 и 2), одинаковыми по размеру. Первое стекло (1) образует дно ячейки, второе (2) - верхнюю стенку. Сверху вся система накрывается бумажным фильтром (3). В ячейке поддерживается постоянная температура, благодаря соответствующему термостатирующему устройству (см. рис. 8).

Установленная на предметном столике микроскопа данная камера, с помощью проводов (6) подключается к электрической цепи. Схема подключения знакопеременного генератора и измерительных приборов представлена на рис. 7.

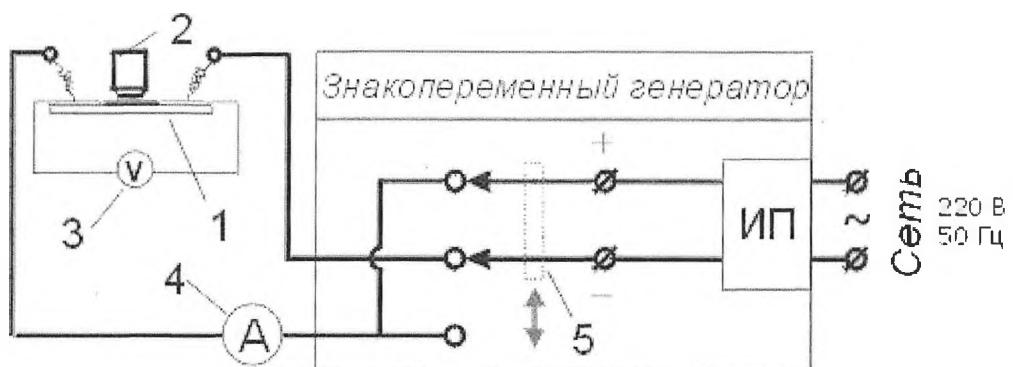


Рис. 7. Блок - схема установки для электроинергетических исследований. 1 - электрофоретическая ячейка с подведенным к ней термостатирующим устройством; 2 - объектив микроскопа; 3 - вольтметр; 4 - микроамперметр; 5 - автоматический переключатель полюсов на электродах камеры; ИП - источник питания

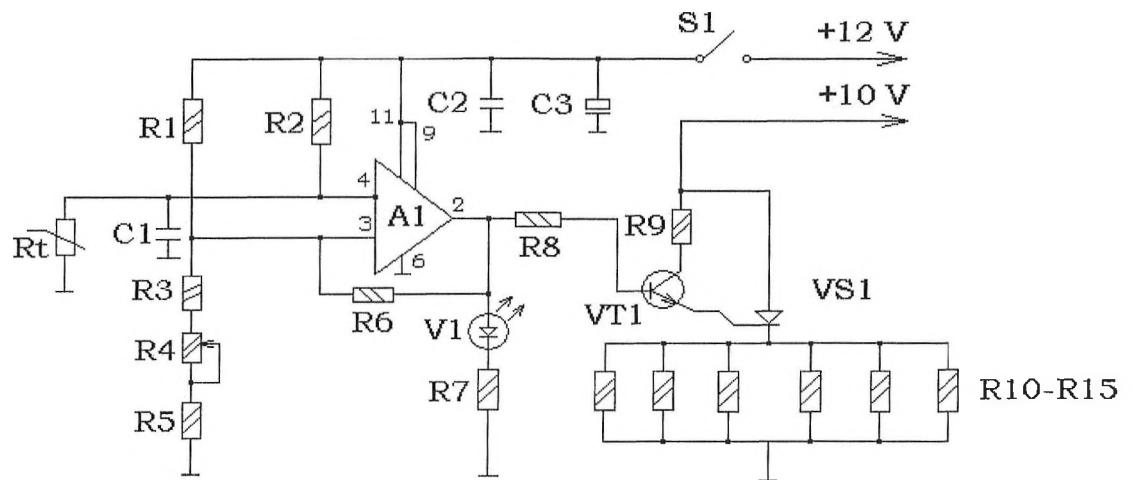


Рис. 8. Принципиальная схема терморегулятора.
 A_1 -К554CA3; VT_1 -KT817; VS_1 -КУ202Л; V_1 -АЛ307Б; $R_1=20$ кОм; $R_2=20$ кОм; $R_3=1$ кОм; $R_4=10$ кОм; $R_5=1$ кОм; $R_6=1$ МОМ; $R_7=510$ Ом; $R_8=10$ кОм; $R_9=100$ Ом; $R_{10}-R_{15}=33$ Ом; $C_1=0,15$ мкФ; $C_2=0,047$ мкФ; $C_3=20,0$ мкФ

При подаче на электроды напряжения ($U=10$ В, частота 10^1 Гц, амплитуда - меандр), клетки, находящиеся в камере, совершают вынужденные колебания. Амплитуда колебаний прямо пропорциональна скорости движения клеток, которая, в свою очередь, прямо пропорционально зависит от поверхностного заряда клетки. В результате клетки, с различными электрохимическими свойствами, при одинаковой частоте смены направления поля, отличаются по величине амплитуды колебаний.

2.3.2. Методика установки ячейки для проведения опытов

Поскольку данная глава может послужить технико-методическим обоснованием для последующих разработок и опытов, считаю необходимым обратить особое внимание на приемы и отдельные детали работы, которые могут оказать влияние на результаты подобных исследований.

Электрофоретическая камера в данном методе является одноразовой и готовится к каждому опыту по единой схеме. На предметное стекло, между электродами, наносили 0,04 мл исследуемой суспензии клеток, накрывали каплю первым покровным стеклом. На первое покровное стекло также наносилось 0,04 мл исследуемой жидкости с клеточным тест - объектом и накрывалось вторым покровным стеклом. Раствор не выходит за пределы камеры за счет поверхностного натяжения жидкости. Система из двух покровных стекол удерживается между собой, и образует электрофоретическую камеру, в которой обеспечивается равенство объема жидкости от опыта к опыту.

Сверху, на стекла, помещается стандартный фильтр, для предотвращения испарения, создания контакта жидкости с электродами, а также разделения суспензии и веществ, выделяющихся на электродах. Стандартный фильтр - это рамка из фильтровальной бумаги, смоченная в исследуемом растворе. Ширина рамки соответствует ширине предметного

стекла, длина подбирается таким образом, чтобы оба электрода приблизительно на 1/3 были покрыты краями бумаги. Вырезанный прямоугольник в центре, немного меньший по размеру, чем покровное стекло, позволяет рассматривать клетки в микроскоп.

Фильтровальная бумага применялась в качестве фильтра для устранения перехода материала электродов в раствор. При проведении экспериментов в данной работе, стандартные бумажные фильтры менялись через каждую пробу.

Чтобы клетки не прилипали к поверхности стекла, предметные и покровные стекла очищались 70% этианолом и высушивались на фильтровальной бумаге.

После установки электрофоретической ячейки включается электрическая цепь, и производятся измерения амплитуды колебаний клеток в поле зрения микроскопа по окулярной линейке. Отсчет амплитуды производится обязательно по одному и тому же краю клетки.

Иногда во время измерения амплитуды колебаний наблюдаются течения жидкости, вызванные неравномерным испарением воды с поверхности фильтра. Вообще, течения жидкости в электрофоретических ячейках является серьезной методической проблемой в исследованиях подобного рода. Способам их устранения уделяется много внимания в монографиях по ЭФ [24, 50].

Т.к. при смене знаков движение клетки меняется на противоположное, то можно легко учитывать влияние течений, которые изменяют истинную картину движения клеток, т.к. в результате возвратно - поступательных движений клетки каждый раз возвращаются не в то же самое место, откуда они начинали свое движение. Для устранения подобных ошибок в наблюдениях фиксировалось 3 показания: L_1 - первое зафиксированное положение клетки, L_2 - положение клетки в результате одного смещения под действием 1/2 периода смены знаков на электродах, L_3 - положение клетки через 1 период смены знаков. В случае отсутствия течений

значения L_1 и L_3 - совпадают. Смещение клетки под воздействием $1/2$ периода смены знаков на электродах вычисляется по формуле:

$$L_0 = \frac{|L_2 - L_1| + |L_2 - L_3|}{2} \quad (4)$$

Таким образом, течения жидкости в камере учитываются, что является преимуществом данного метода.

2.4. Метод СВЧ-спектроскопии

2.4.1. Методика и схема установки для проведения опытов

Исследовалась зависимость коэффициента ослабления от частоты электромагнитной волны СВЧ-диапазона при прохождении через различные пробы крови. Измерения $\Gamma(f)$ проводились на базе стандартного панорамного измерителя КСВН Р2-60 с записью измерений на двухкоординатном самопишущем потенциометре Н 307 на основе метода, разработанного на кафедре Биомедфизики [36]. Блок-схема измерительной установки для опыта представлена на рисунке 9.

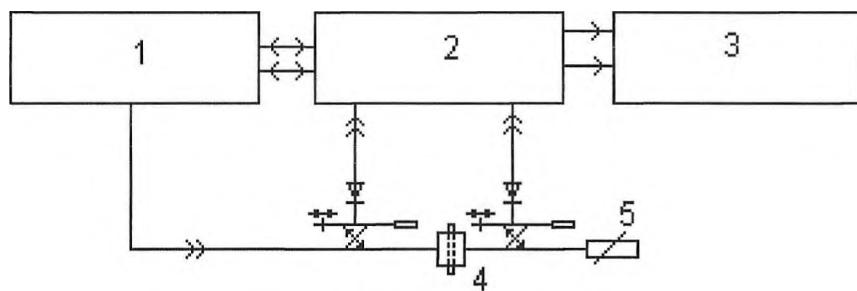


Рис. 9. Блок – схема измерительной установки для исследования спектра поглощения в крови волн СВЧ диапазона

1 - генератор СВЧ колебаний, 2 - индикатор КСВН и ослабления , 3 - двухкоординатный самопищий прибор, 4 - образец исследуемой жидкости, 5 - согласованная нагрузка

В данной работе для определения КСВН используется измеритель КСВН панорамный Р2-60, в состав которого входят следующие блоки и узлы: индикатор КСВН и ослабления Я2Р-67; генератор качающейся частоты ГКЧ-60; коаксиально-волноводный переход; направленные

детекторы падающей и отраженной волн; согласованная нагрузка и короткозамыкатель.

Работа измерителя основана на принципе рефлектометра - раздельного выделения сигналов, пропорциональных мощности падающей от генератора и отраженной от измеряемого объекта (при определении КСВН) или прошедшей через измеряемый объект (при измерении ослабления) волн. Сигналы, пропорциональные падающей и отраженной мощностям снимаются с детекторных головок, встроенных во вторичных трактах направленных детекторов.

Измеритель КСВН и ослабления называется панорамный, так как на индикаторе прибора отражается зависимость КСВН и Г в широком диапазоне частот, т. е. видна как бы панорамная картина поведения измеряемого узла.

2.4. Метод растровой электронной микроскопии

Основы методических приемов подготовки биологических объектов для РЭМ были разработаны в 70-х годах. В начале в РЭМ пользовались, главным образом, нативными препаратами. Были получены данные о клеточной поверхности. Однако при изучении нативных препаратов было много атерфактов. Поэтому возникла необходимость специальной подготовки образцов.

Разработка специальных методик позволила получать богатейшую, новую информацию о микрорельефе клеточной поверхности и его измерениях, что очень важно для понимания функционального состояния биологических поверхностей как в нормальных, так и в патологических условиях.

2.5.1. Методика установки для проведения опытов

Сравнивалась морфология эритроцитов при БА с контрольными эритроцитами, не испытавшими влияние БА. Для исследований использовали приборы РЭМ-100 У, фотоаппарат марки Киев-60.

Принципиальная схема РЭМ-100 У представлена на рис. 9. Устройство и принцип работы описаны в техническом описании и инструкции к эксплуатации [80].

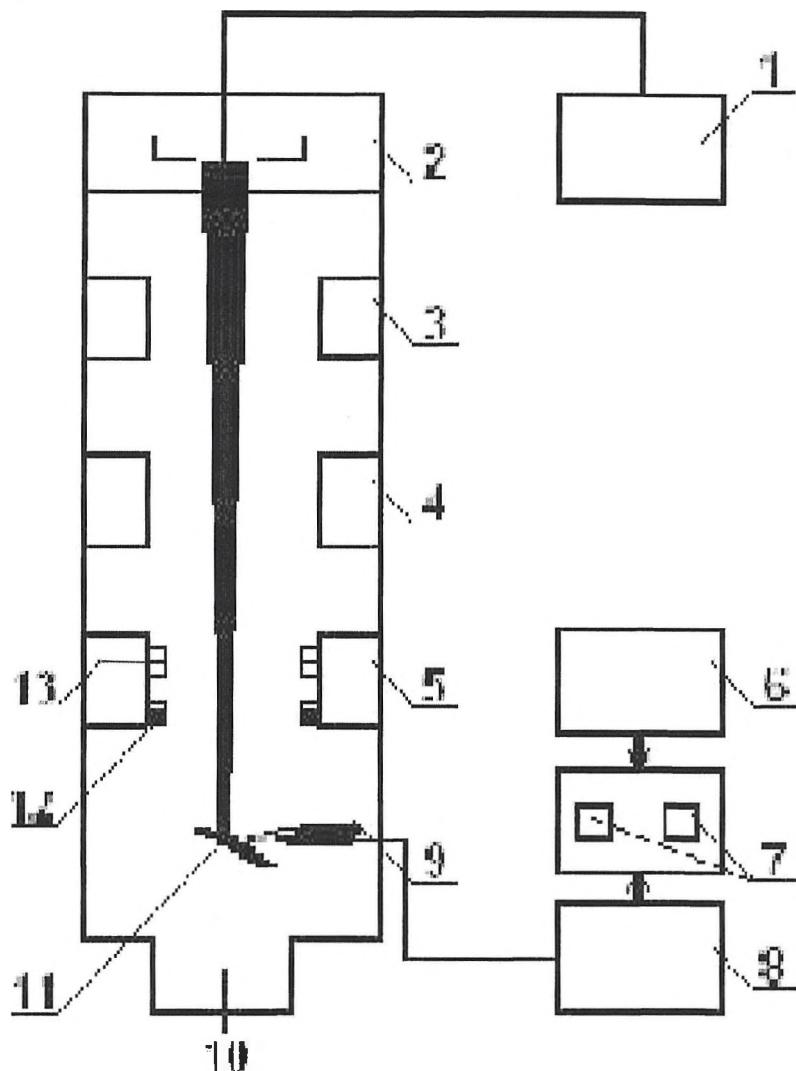


Рис. 10. Принципиальная схема РЭМ

1 – блок высокого напряжения, 2 – электронная пушка, 3 – 5 – конденсорные линзы, 6 – генератор сканирования, 7 – экраны наблюдения и фоторегистрации, 8 – блок регулирования увеличения, 9 – коллекторная система, 10 – вакуумная система, 11 – объект исследования, 12 – стигматор, 13 – сканирующие катушки

2.5.2. Методика подготовки биологических образцов

Подготовку биологических объектов для РЭМ можно разделить на следующие основные этапы:

1. Обработка объекта до фиксации.
2. Фиксация.
3. Обезвоживание.

4. Высушивание.
5. Придание объекту равномерной электропроводности.

РЭМ широко применяют для изучения клеток крови. С целью быстрого проведения анализа состояния мембран и формы эритроцитов крови больных разработана (и используется в данной работе) модификация метода фиксации материала для исследования в РЭМ [38]:

1. Помещение клеток крови в 1% раствор глутарового альдегида на фосфатном буфере pH 7,4 и фиксация в течение 20-30 минут.
2. Отделение полученного осадка клеток дистиллированной водой (3-4 раза) для удаления следов фиксатора.
3. Дегидратация клеток крови в сериях ацетона (60, 70, 90, 100%) в течение 10-30 минут с повторением этой процедуры несколько раз.
4. Приготовление суспензии клеток в 100% растворе ацетона, нанесение их на металлическую подложку.
5. Высушивание мазка на воздухе.

Большое значение в подготовке образцов для РЭМ имеет приданье объекту равномерной электропроводности. Биологический материал обладает высоким электрическим сопротивлением, являясь диэлектриком. Когда электронный зонд микроскопа попадает на диэлектрик, на его поверхности из-за отсутствия стекания заряда на землю накапливаются поглощенные электроны. Накопление электронов приводит к появлению на поверхности образца заряженных областей, которые при последующем сканировании могут нерегулярным образом отклонять первичный пучок, приводя к серьезным искажениям изображения. Так же, наличие поверхностного заряда сильно изменяет вторичную электронную эмиссию. Существуют следующие методики [38], которые позволяют изучать диэлектрики в РЭМ, избегая эффекта зарядки:

1. Нанесение проводящего покрытия.
2. Работа при низком ускоряющем напряжении.
3. Использование методики однокадровой экспозиции.

В данной дипломной работе используется методика нанесения проводящего покрытия. Проводящий слой получается в напылительной установке ВУП – 5. Общий вид прибора изображен на рис. 11. Устройство и принцип работы подробно описаны в техническом описании и инструкции по эксплуатации [79].

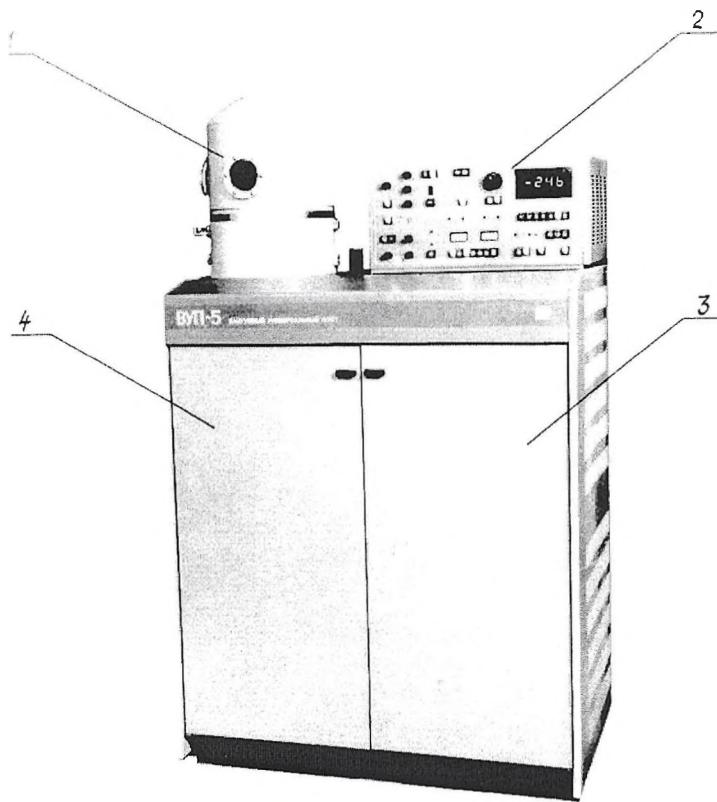


Рис. 11. Внешний вид установки и ВУП – 5

1 – рабочий объем, 2 – пульт управления и индикации режимов работы прибора, 3, 4 – две части стойки

Для получения нужной толщины подбирается соответствующая величина тока, который определяет интенсивность и длительность напыления.

После того, как образцы подготовлены, их можно поместить в РЭМ и исследовать. Полученное изображение на экране РЭМ фиксируется с помощью фотографирования. Показатель и итог работы, в данном случае, - это фотографирование.

2.6. Применяемые формулы и статистическая обработка результатов

Цель статистической обработки - извлечение из полученных данных заключенной в них информации, получение на основании проведенного исследования объективных и убедительных выводов [39].

Определение понятий, которые применяются для описания данных:

Измерение - одно значение амплитуды колебаний для одной клетки.

Проба - несколько измерений, сделанных в одной электрофоретической камере.

Опыт - несколько исследованных проб одной и той же суспензии клеток.

В 1 пробе, как правило, 10 измерений. Для каждой пробы определяли:

среднее арифметическое $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$ (5); стандартное отклонение

$S = \sqrt{\frac{1}{n} \sum (x_i - \bar{x})^2}$ (6); ошибку среднего $S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n-1}}$ (7); и коэффициент

вариации.

Коэффициент вариации.

При наложении на клеточную суспензию электрического знакопеременного поля заряженные объекты, совершают колебательные движения, с одинаковой частотой 10^{-1} Гц, но с различной амплитудой колебания (A), которая прямо пропорциональна скорости движения (V) клетки. Скорость движения, при прочих равных условиях, зависит от заряда поверхности клетки. Разброс значений внутри одной пробы объясняется различием электроповерхностных свойств клеток и в некоторой степени различием их внутренних свойств. Чем более разнородные клетки составляют популяцию, тем больше будет размах вариации амплитуды колебаний при одинаковых внешних условиях. Существует несколько способов учета степени варьирования признака. В данной работе применяется коэффициент вариации:

$$CV = 100 \frac{S}{\bar{x}} \% \quad (8)$$

где S - стандартное отклонение, \bar{x} - среднее арифметическое [39].

Преимущества данного коэффициента: Величина коэффициента вариации не именованная, выражается в процентах и не зависит от величины амплитуды. Т.е. данный коэффициент отражает только внутригрупповые причины варьирования свойств клеток и практически не зависит от особенностей применяемой электрофоретической камеры. Это очень важно, т.к. в соответствии с методикой данной работы необходимо сравнивать результаты, полученные в различных одноразовых ячейках.

ГЛАВА 3.

ПРОВЕДЕНИЕ, РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ ОПЫТОВ

3.1. Опыты по бесконтактной активации физиологического раствора

Исследовалась зависимость Eh (t) для ФР. Схема опыта приведена в разделе 2.2.

В электролизную камеру заливался слабый раствор соли NaCl ($V = const = 1 \text{ л}$, $C = const = 9 \text{ г/л}$) который подвергается электролизу при параметрах тока $I = 1 \text{ А}$, $U = 4,5 \text{ В}$. Электролиз с указанными выше параметрами и раствором проводится в течение 15 мин, после чего анод вынимался из камеры. В результате электролиза в растворе создавалась электрохимически активированная неравновесная среда с $Eh \approx + 600\text{-}700 \text{ мВ}$. При помещении в такую среду непроницаемой ёмкости с водным раствором в последнем возможно протекание БАЖ. В ёмкость помещался ФР объемом $V=40 \text{ мл}$. Ёмкость с ФР погружалась в ЭХА-среду электролизной камеры через 3 мин после прекращения в ней электролиза. При этом исключалась возможность непосредственного контакта этих двух сред. В ёмкостях с ФР измерялся с интервалом пять минут Eh с помощью ионометра pH-150. Результаты фиксировались на двухкоординатном самопищущем потенциометре Н 307.

На рисунке 12 представлен характерный график зависимости Eh (t) для ФР.

В данном случае график отражает усредненные данные по результатам 10 опытов. Если извлечь ёмкость из ЭХА-раствора, то наблюдается релаксация, характеризующаяся возвращением значений Eh ФР к первоначальным.

Следует обратить внимание на шкалу времени. Процесс активации происходит достаточно быстро 0,5...10 мин., в то время как релаксация может продолжаться несколько часов.

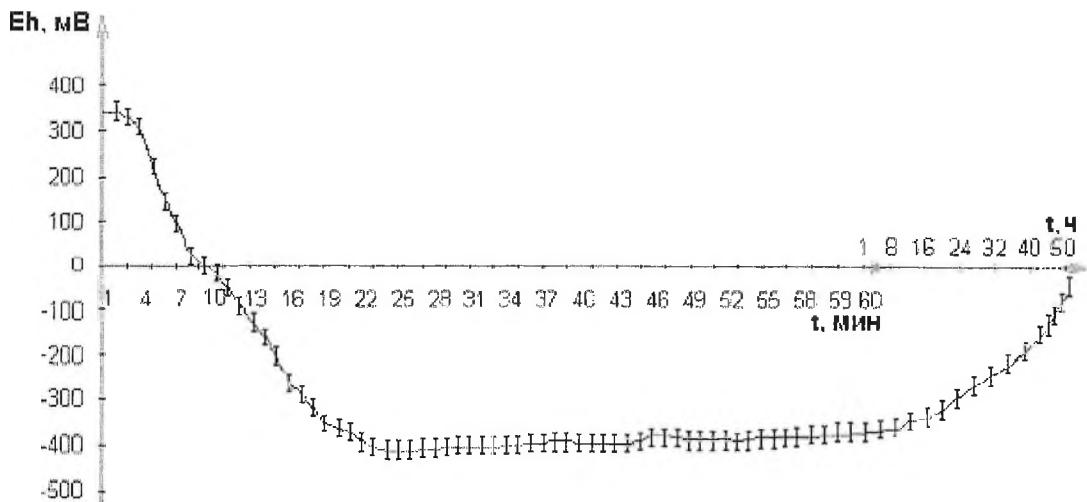


Рис. 12. Характерный график зависимости окислительно – восстановительного потенциала от времени для физиологического раствора

Обсуждение и выводы по результатам опытов по бесконтактной активации физиологического раствора:

Процесс бесконтактной активации зависит от многих внешних факторов, которые не поддаются учету. При сохранении общих закономерностей, характер протекания и результаты БА варьируют от опыта к опыту. Например, выход отрицательного значения Eh на плато не имеет четких временных границ (может находиться в пределах 0,5...20 минут). Отрицательное максимальное значение Eh, для ФР, которое может быть достигнуто при одинаковых условиях, так же может значительно колебаться в пределах -250...-350 мВ. Время релаксации зависит от условий хранения жидкости.

Существует множество различных гипотез, объясняющих механизмы активации и релаксации жидкостей. В задачи данной работы не входило исследование глубоких физических основ данного явления, поэтому данные гипотезы здесь не приводятся. В данной работе феномен БАЖ используется для получения микробиологических сред с измененными значениями Eh. В соответствии с задачами эксперимента эмпирически найдены условия, необходимые для получения требуемых сред:

1. Для достижения стабильного уровня $Eh \approx +700$ мВ в БЭ необходимо затратить время не более 15 минут. В результате электролиза при указанных параметрах нагрев среды составляет $\Delta t = 0,5$ °C за 20 минут электролиза. Поэтому время электролиза ограничено 15 минутами. За этот период величина нагрева среды не превышает погрешности применяемого термометра и в силу незначительности ей можно пренебречь.
2. Для достижения стабильного уровня $Eh \approx -370$ мВ при БА ФР в герметичной емкости необходимо затратить время не менее 10 минут. Максимальное время выхода Eh на плато составляет в среднем 10 минут, поэтому время БА, в большинстве опытов, составляла 15 мин.
3. Более или менее повторяемые результаты достигаются перемешиванием ФР при БАЖ.

3.2. Опыты по изучению электрокинетических свойств эритроцитов бесконтактно активированной крови методом микроэлектрофореза

Исследовалось влияние БА на электрокинетические свойства эритроцитов капиллярной крови. Использовалась кровь здорового человека, взятая из верхней фаланги безымянного пальца руки. Для получения БАК использовалась установка, аналогичная описанной в п. 2.2.

В электролизную камеру заливался слабый раствор соли $NaCl$ ($V = const = 1$ л, $C = const = 9$ г/л), который подвергается электролизу при параметрах тока $I = 1$ А, $U = 4,5$ В. Электролиз с указанными выше параметрами и раствором проводился в течение 15 минут, после чего анод вынимался из камеры. В результате электролиза в растворе создавалась электрохимически активированная неравновесная среда с $Eh \approx +600-700$ мВ. При помещении в такую среду непроницаемых емкостей с исследуемым материалом в последнем возможно протекание БАЖ. В одну из емкостей помещался ФР объемом $V=40$ мл, в другую-кровь с ФР в пропорции 1:200. Емкости с содержимым погружались в ЭХА-среду электролизной камеры через 3 мин после прекращения в ней электролиза.

При этом исключалась возможность непосредственного контакта двух сред: электролизной камеры и содержимого емкостей. По истечении 15 минут емкости изымались из раствора. По мере необходимости из одной брался ФР, в него помещалась капиллярная кровь, культивировалась в течение 15 минут и исследовалась амплитуда колебаний эритроцитов. Параллельно этому, из емкости, содержащей кровь с ФР в пропорции 1:200 также бралось ее содержимое и исследовалась амплитуда колебаний эритроцитов. В контроле исследовалась амплитуда колебаний эритроцитов в неактивированном ФР. Полученные данные обрабатывались с использованием критериев Стьюдента. Высчитывалось среднее значение амплитуды колебаний $X_{ср}$, мкм; стандартное отклонение S , мкм, коэффициент вариации $C_v, \%$; процент клеток с биоэлектрической подвижностью. В таблицах 2-5 приведены усредненные данные для 7 проб в каждом опыте.

В первом столбце каждой таблицы цифры указывают следующее:

1. Кровь добавлялась перед замерами в бесконтактно активируемый физиологический раствор.
2. Кровь активировалась в физиологическом растворе.
3. Кровь добавлялась перед замерами в контрольный физиологический раствор.

$X_{ср}$ - среднее значение амплитуды колебаний;

S - стандартное отклонение;

Cv - коэффициент вариации;

A - коэффициент активности.

Опыт №1

Таблица 2

№ опыта	X_{cp} , мкм	S, мкм	Cv, %	A, %
1	9,3	1,9	20,6	90,0
2	3,2	1,2	36,2	50,0
3	5,2	1,8	35,1	60,0

Опыт №2

Таблица 3

№ опыта	X_{cp} , мкм	S, мкм	Cv, %	A, %
1	6,3	0,9	15,4	90,0
2	2,3	0,1	1,4	40,0
3	5,4	0,6	10,7	50,0

Опыт №3

Таблица 4

№ опыта	X_{cp} , мкм	S, мкм	Cv, %	A, %
1	8,1	2,3	28,5	90,0
2	3,2	1,1	32,8	50,0
3	5,2	1,8	35,1	60,0

Опыт №4

Таблица 5

№ опыта	X_{cp} , мкм	S, мкм	Cv, %	A, %
1	6,3	0,9	15,5	90,0
2	3,1	0,9	9,5	40,0
3	5,3	0,8	14,4	50,0

Обсуждение и выводы по результатам исследования электрокинетических свойств эритроцитов:

1. Показатели, фиксируемые в таблицах, для эритроцитов БАК в ФР, для эритроцитов крови, помещенной в бесконтактно активируемый ФР, существенно отличается от показателей контроля.
2. Исследование свойств эритроцитов показало, что непосредственная БАК действует подавляюще на клетки, по сравнению с постактивацией (уже контактной) крови в БА ФР контролем: амплитуда колебаний и процент активности эритроцитов БАК значительно ниже показателей эритроцитов крови, помещенной в БА ФР и контрольной крови. В нашем случае БА ФР - наиболее благоприятная среда для культивирования эритроцитов.

Повышение адаптивности клеток в неблагоприятных условиях при воздействии активированной воды на клетку можно объяснить в рамках единой гипотезы. Подходы к объяснению могут быть различными, но сущность воздействия сводится к одному: искусственному предоставлению клетке дополнительного источника энергии, которая используется для повышения адаптивности в неблагоприятных условиях.

С точки зрения биофизики основа основ жизни – устойчивое неравновесие, то есть живой организм или отдельная клетка должны обладать запасом свободной энергии, который создается постоянным обменом веществ с окружающей средой. В этом отношении активированная вода отличается от обычной только "уровнем свободной энергии" [45]. При воздействии ее на живой организм происходит передача этой энергии на нужды клетки.

В рамках биологического подхода существует известная гипотеза Прилуцкого, объясняющая механизм действия активированной воды на митохондрии клетки. В соответствии с этой гипотезой можно достаточно просто объяснить экспериментальные факты.

Усиление электрондонорного фона вокруг митохондрии при диффузии активированной жидкости создает эффект внешнего электронного давления. Это увеличивает трансмембранный потенциал и усиливает

транспорт электронов внутрь митохондрии. Поскольку этот транспорт совмещен с синтезом АТФ, то энергетические ресурсы клетки увеличиваются. Следовательно, адаптивность клетки возрастает.

При этом в окислительно-восстановительных реакциях гликолиза и дыхания преобладают реакции с образованием восстановленных форм веществ, следовательно, за время действия активированной воды происходит накопление восстановленных промежуточных продуктов биохимических реакций. После релаксации активированной жидкости эти вещества вступают в реакции окисления гликолиза. В результате вырабатывается энергия АТФ, которая так же используется клеткой для поддержания гомеостаза. Благодаря этому действие активированной жидкости на культуру клеток не ограничивается временем релаксации жидкости.

Следует признать, что данные выводы являются только попыткой объяснить истинные причины влияния активированных сред на живые клетки. По результатам проведенных экспериментов сделать окончательные и правильные выводы сложно. Поэтому возникает необходимость продолжения работ по данной теме.

По данной тематике оформлено и отредактировано методическое руководство к выполнению лабораторной работы на тему: "Исследование качества воды методом биотеста" (см. приложение 2).

3.3. Опыты по сравнению спектров поглощения бесконтактно активированной и контрольной крови методом СВЧ-спектроскопии

Исследовались коэффициенты поглощения от частоты $\Gamma(f)$ различных проб венозной крови людей на основе метода, разработанного на кафедре Биомедфизики [36]. Изучалась венозная активированная и неактивированная кровь людей независимо друг от друга (в разные дни). Т.к. опыты производились независимо друг от друга, в разное время и с использованием различных проб, сравнивать результаты измерений довольно сложно. В связи с этим особый интерес представляет общая

тенденция изменения спектра поглощения СВЧ-волны в крови при БА и в контроле. Сравнение спектра поглощения, путем выявления зависимости коэффициента ослабления от частоты, в активированной и контрольной крови велось относительно каждой пробы.

Для получения БА крови использовалась установка, аналогичная описанной в п.2.2. В электролизную камеру заливался слабый раствор соли NaCl ($V = \text{const} = 1 \text{ л}$, $C = \text{const} = 9 \text{ г/л}$), который подвергается электролизу при параметрах тока $I = 1 \text{ A}$, $U = 4,5 \text{ В}$. Электролиз с указанными выше параметрами и раствором проводился в течение 15 минут, после чего электроды вынимались из камеры. В результате электролиза в растворе создавалась электрохимически активированная неравновесная среда с $Eh \approx + 600\text{-}700 \text{ мВ}$. При помещении в такую среду непроницаемых емкостей с исследуемым материалом в последнем возможно протекание БАЖ. В одной из двух емкостей, куда помещалась кровь объемами 20 мл в каждой, БА велась при включенном токе в течение 15 минут, в другой емкости-при выключенном токе в течение 15 минут. Емкости с содержимым погружались в ЭХА-среду электролизной камеры через 3 мин после прекращения в ней электролиза. При этом исключалась возможность непосредственного контакта двух сред: электролизной камеры и содержимого емкостей. По истечении указанного времени емкости изымались из раствора. Далее кровь исследуемой пробы помещали в кварцевые пробирки и устанавливали их в соответствии с рабочей схемой тракта панорамного измерителя. Установка для опытов описана в п. 2.4.1. Исследовалось 15 проб крови. На рис.13, 14, представлены графики, отражающие зависимость коэффициента ослабления от частоты $\Gamma(f)$ для различных образцов крови. В силу общей одинаковой тенденции изменений коэффициента ослабления с уменьшением значений Eh , представлены данные только для двух проб крови. В таблицах представлены результаты измерений окислительно-восстановительного потенциала и температуры для каждого из трех случаев: случая, когда БА

велаась при включенном токе, случая, когда БА велаась при выключенном токе, случая, когда кровь БА не подвергалась.

Проба№1

Таблица 6

Жидкость	Eh, мВ	T, °C
БАК(1)	-168±1	22±1
БАК(2)	-149±1	22±1
КК(3)	190±1	21±1
ЭХА среда	650±1	22±1

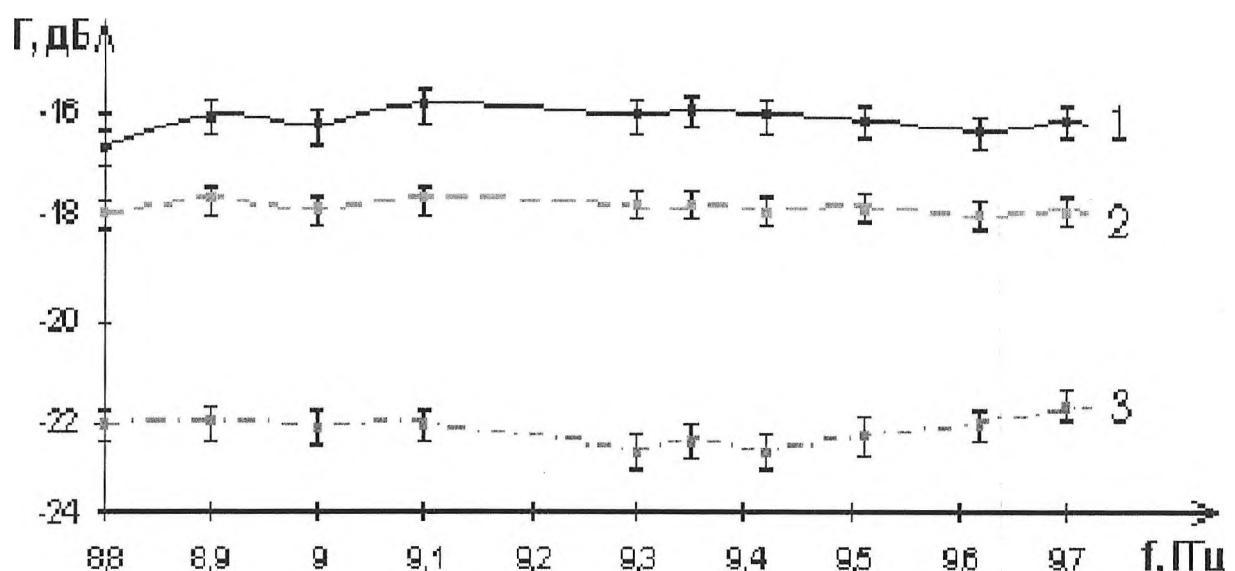


Рис. 13. Зависимость коэффициента ослабления от частоты $\Gamma(f)$ 18.03.2002 г.

- 1 - БАК велаась при выключенном токе ($Eh = -168$ мВ),
- 2 - БАК велаась при выключенном токе ($Eh = -149$ мВ),
- 3 – кровь БА не подвергалась ($Eh = 190$ мВ).

Проба №2

Таблица 7

Жидкость	Eh, мВ	T, °C
БАК1	-280±1	22±1
БАК	-145±1	22±1
КК	160±1	21±1
ЭХА среда	698±1	22±1

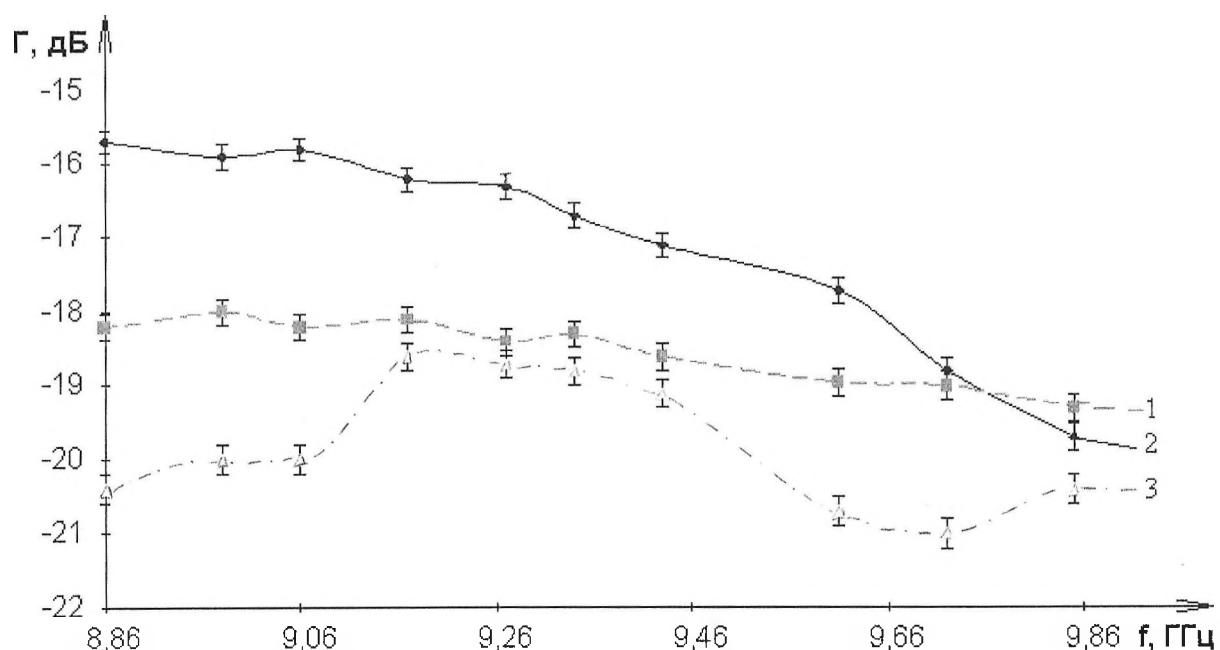


Рис. 14. Зависимость коэффициента ослабления от частоты (18.03.2002 г.)

- 1 - БАК велась при выключенном токе ($Eh = -168$ мВ),
- 2 - БАК велась при выключенном токе ($Eh = -149$ мВ),
- 3 – кровь БА не подвергалась ($Eh = 190$ мВ).

Обсуждения, выводы по результатам сравнения спектров поглощения бесконтактно активированной и контрольной крови методом СВЧ-спектроскопии:

1. На графиках представлены зависимости коэффициента ослабления от частоты $\Gamma(f)$. Стоит отметить, что в большинстве наблюдались нелинейные зависимости коэффициента ослабления от Eh исследуемой пробы крови, но общая тенденция изменений коэффициента все же сохранялась: при уменьшении Eh исследуемой среды наблюдалось повышение радиопрозрачности среды, характеризующееся увеличением численных значений коэффициента ослабления.

Возможность регистрации изменений в жидкости, подвергнутой БА, методами СВЧ – спектроскопии позволяют в дальнейшем выявить структурные особенности и объяснить причину столь необычного поведения активированной жидкости, ее микрокластерную структуру. Использование этого метода найдет свое применение для анализа (тестирования) биологических жидкостей человеческого организма и выявления различных заболеваний на ранней стадии развития.

Результаты выполненных опытов опубликованы в сборнике тезисов восьмой всероссийской научно-практической конференции студентов физиков (8 ВНКСФ) за 2002г [37].

3.4. Опыты по изучению морфологии эритроцитов бесконтактно активированной крови методом растровой электронной микроскопии

Сравнивалась морфология эритроцитов при БА с контрольными эритроцитами, не испытавшими влияние БА. В исследовании использовалась человеческая венозная кровь.

Для получения БА крови и ФР использовалась установка, аналогичная описанной в п.2.2. В электролизную камеру заливался слабый раствор соли $NaCl$ ($V = const = 1 \text{ л}$, $C = const = 9 \text{ г/л}$), который подвергается электролизу

при параметрах тока $I = 1 \text{ A}$, $U = 4,5 \text{ В}$. Электролиз с указанными выше параметрами и раствором проводился в течение 15 минут, после чего электроды вынимались из камеры. В результате электролиза в растворе создавалась электрохимически активированная неравновесная среда с $Eh \approx + 600\text{-}700 \text{ мВ}$. При помещении в такую среду непроницаемых емкостей с исследуемым материалом в последнем возможно протекание БАЖ. В одной из двух емкостей, куда помещалась кровь объемами 20 мл в каждой, БА велась при включенном токе в течение 15 минут, в другой емкости-при выключенном токе в течение 15 минут. Емкости с содержимым погружались в ЭХА-среду электролизной камеры через 3 мин после прекращения в ней электролиза. При этом исключалась возможность непосредственного контакта двух сред: электролизной камеры и содержащего емкостей. По истечении указанного времени емкости изымались из раствора. Далее шел процесс подготовки эритроцитов для исследования в РЭМ. Методика подготовки эритроцитов для исследования в РЭМ описана в п. 2.5.2. Были получены 3 мазка эритроцитов одной пробы крови:

1. Эритроциты крови той емкости, в которой осуществлялась БА при включенном токе.
2. Эритроциты крови той емкости, в которой осуществлялась БА при выключенном токе.
3. Эритроциты контрольной крови, т.е. той, которая активации не подвергалась.

Далее подготовленные образцы помещались в РЭМ. Полученные изображения на экране РЭМ фиксировались с помощью фотографирования. На рисунках 15, 16, 17 представлены данные 4-х полей зрения для каждого из трех образцов. Количество различных морфологических форм эритроцитов по классификации [38, 78] подсчитывали при различных увеличениях. В таблице 9 представлены значения измерений окислительно – восстановительного потенциала и

температуры. По данным опытов проведено сравнение красных кровяных клеток венозной крови взрослого человека.

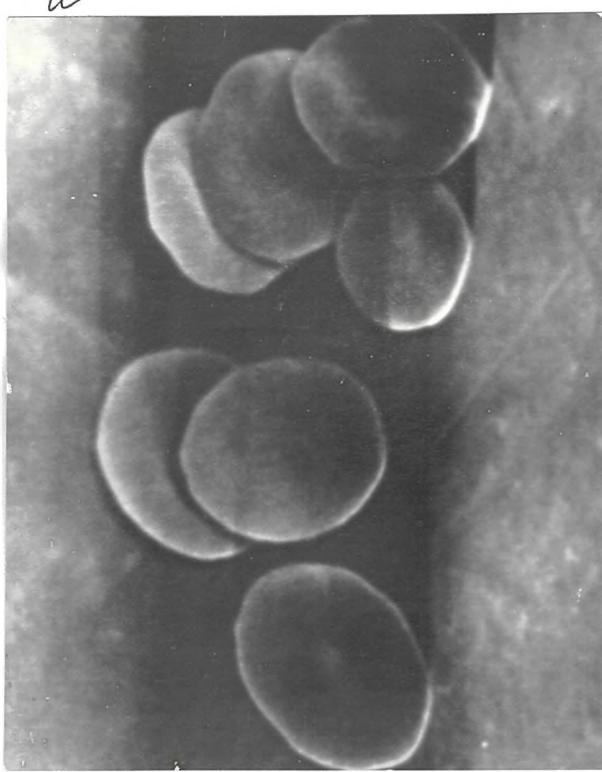
Таблица 9

Жидкость	Eh, мВ	T, °C
БАК1(№1)	-150±1	22±1
БАК(№2)	-30±1	22±1
КК(№3)	80±1	21±1
ЭХА среда	699±1	22±1

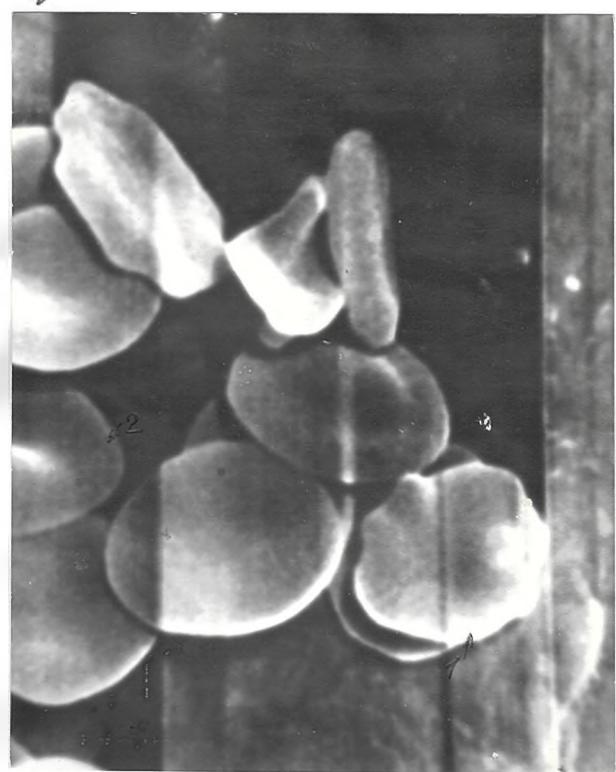
Обсуждение и выводы по результатам изучения морфологии эритроцитов бесконтактно активированной крови методом растровой электронной микроскопии:

1. Метод растровой электронной микроскопии, по сравнению с методом световой микроскопии, позволяет наиболее детально и глубоко изучить морффункциональные состояния эритроцитов при влиянии различных воздействий (в нашем случае при БА).
2. Изменение морфологии клеток при БА указывает на структурные перестройки мембранны.
3. Изменение структуры мембранны и морфологии обусловлены изменением Eh среды , а также изменением энергетического потенциала клетки.

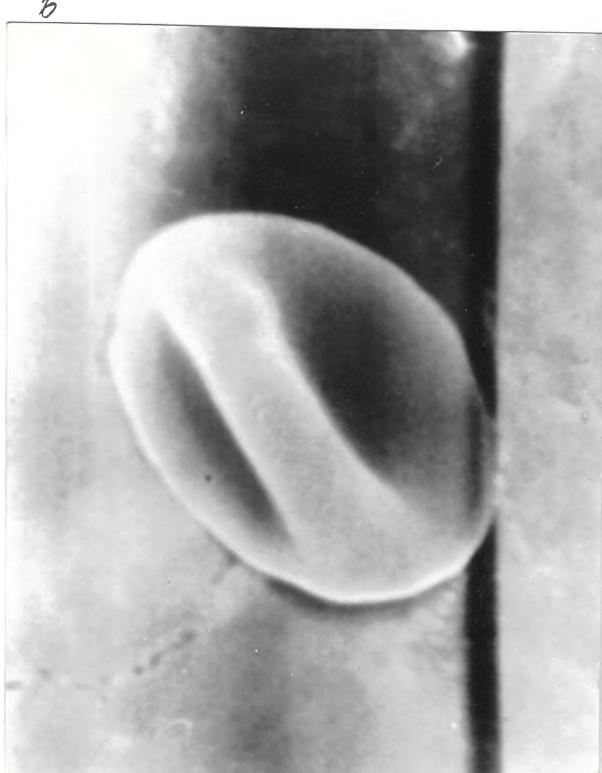
На фотографиях (см. рис. 15, 16, 17) представлены обнаруженные нами клетки крови различных форм. На фотографиях 15а - плоские эритроциты, 15б - шиповидный эритроцит, куполообразный эритроцит, 15в - кнозоцит, 15г - эритроцит с пальцеобразными выростами. На рис. 16а - плоские эритроциты, шиповидные эритроциты, 16б - фестончатый эритроцит, куполообразный нормоцит, 16в - "вздутые" диски, 16г - "вздутые" диски и эхиноцит. На рис. 17а - игольчатый сфероцит, 17б - особая клетка, эритроцит с пальцеобразными выростами, 17в - плоский эритроцит, 17г - особая клетка, игольчатый сфероцит, плоские эритроциты.



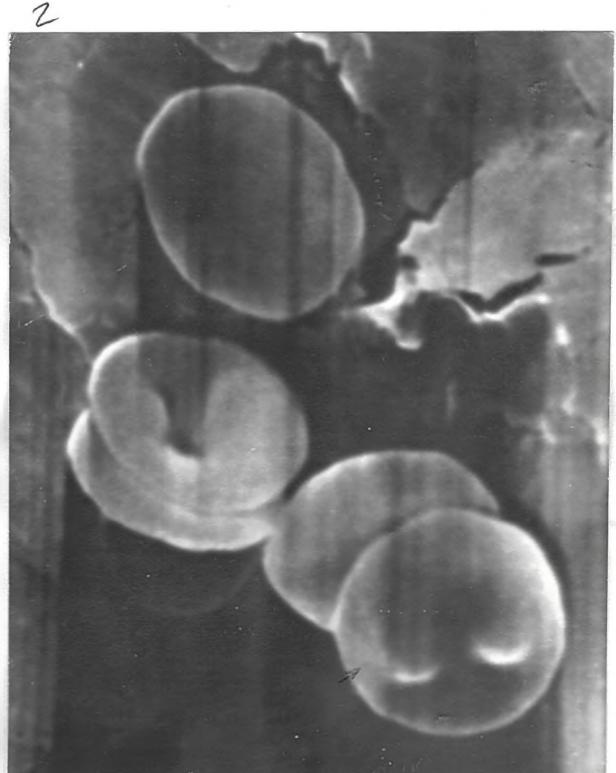
$\times 5000$



$\times 5000$



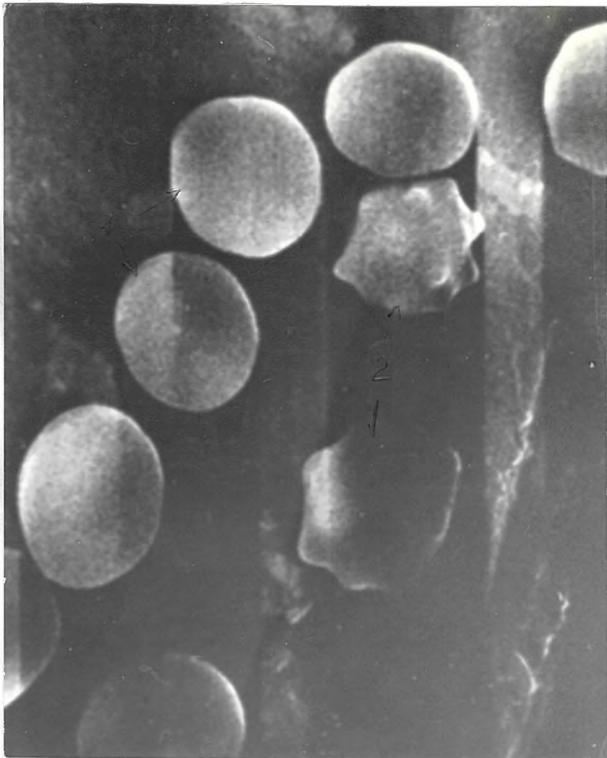
$\times 10000$



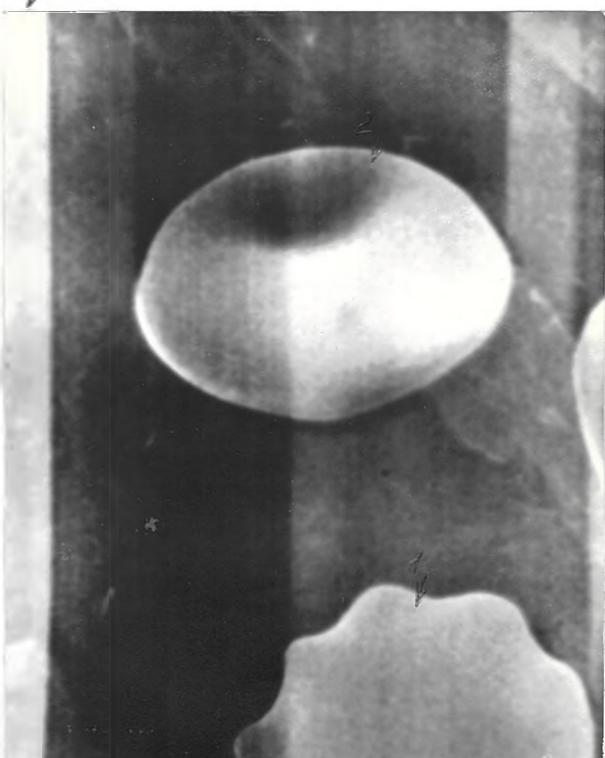
$\times 5000$

Рис. 15. Формы эритроцитов контрольной крови ($Eh = 80$ мВ)

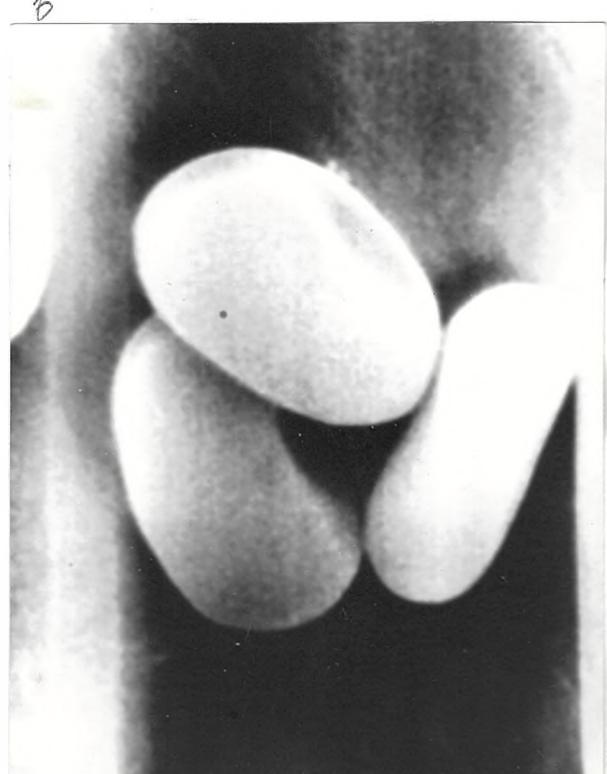
а - плоские эритроциты, б - шиповидный эритроцит (1), куполообразный эритроцит (2), 15в - книзоцит, 15г - эритроцит с пальцеобразными выростами



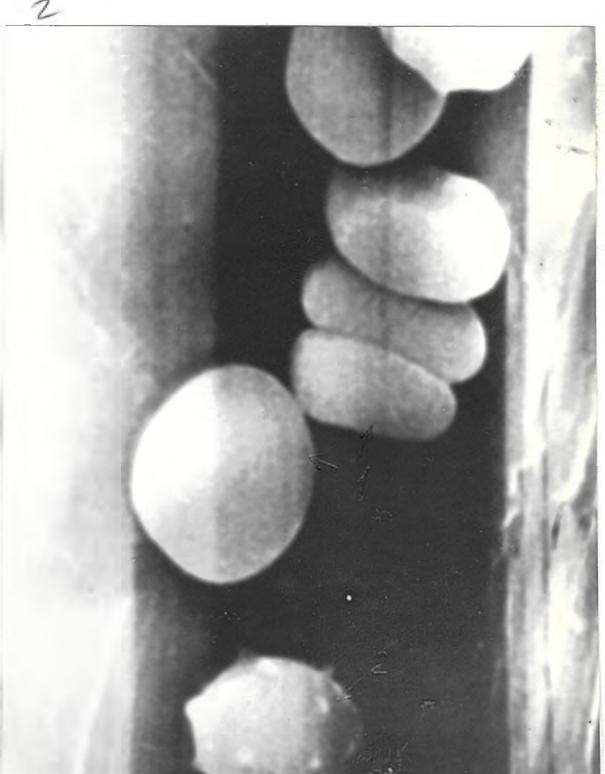
$\times 5000$



$\times 10000$



$\times 10000$



$\times 6000$

Рис. 16. Формы эритроцитов БА крови ($Eh = -30$ мВ)

а - плоские эритроциты (1), шиповидные эритроциты (2), б - фестончатый эритроцит (1), куполообразный нормоцит (2), в - "вздутие" диски, г - "вздутие" диски (1) и эхиноцит (2)

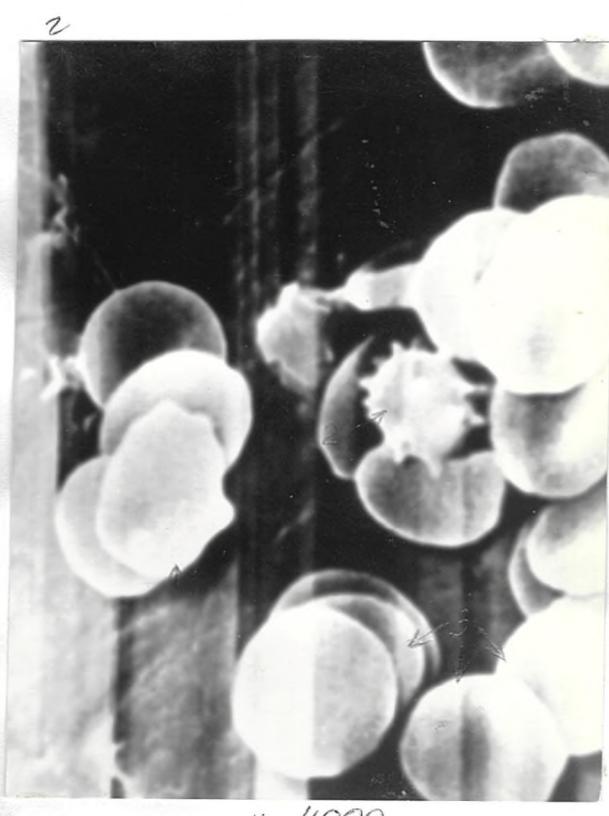
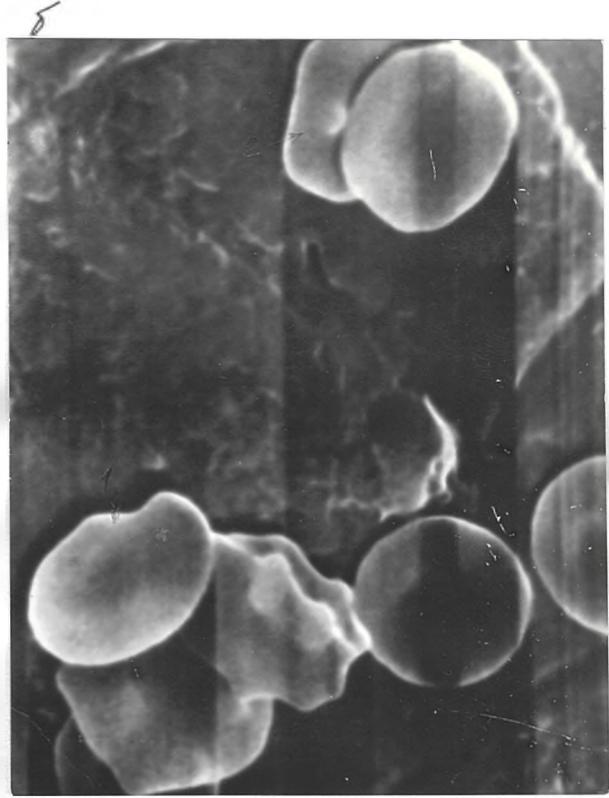
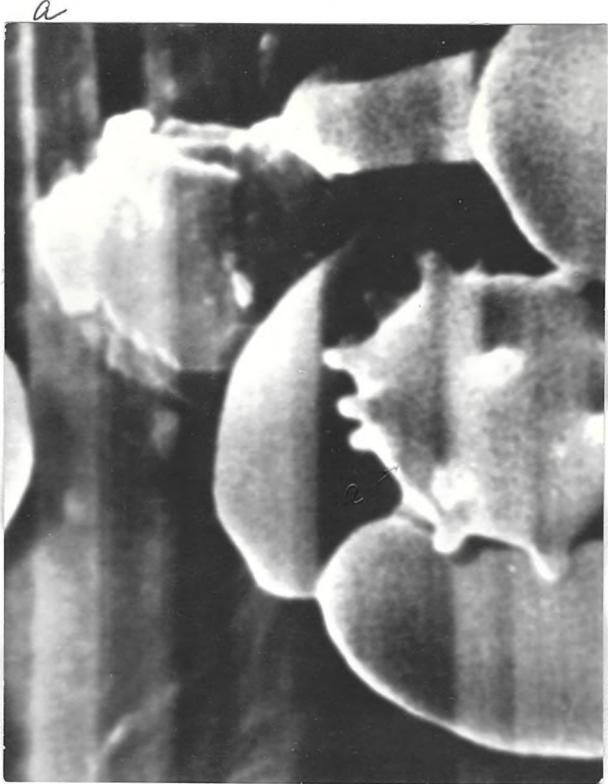


Рис. 17. Формы эритроцитов БА крови ($Eh = -150$ мВ)

а - игольчатый сфероцит, б - особая клетка (1), эритроцит с пальцеобразными выростами (2), в - плоский эритроцит, г - особая клетка (1), игольчатый сфероцит (2), плоские эритроциты (3).

В работах последних лет обнаружены такие клетки, как "фестончатые" эритроциты [30], и особые клетки [71]. Появление "фестончатых" эритроцитов, по предположению авторов, вызвано нарушением энергетического потенциала мембранны эритроцита. А исходя из того, что эритроциты устойчивы к действию неблагоприятных факторов, способны к деформации и эффективному газообмену, что определяется высоким отношением площади поверхности к объему (S/V), авторы предположили, что приобретение эритроцитом уплощенной формы с извилистыми краями приводит к улучшению его функциональных свойств. Нашиими исследованиями эти клетки также были отмечены. В ходе опытов, рассмотрев несколько полей зрения, "фестончатые" и особые клетки были выявлены по большей части в крови, у которой Eh = - 150 мВ, одна клетка присутствовала в крови, у которой Eh = - 30 мВ и в контрольной крови, у которой Eh= 80 мВ не было зафиксировано ни одной подобной клетки.

По мнению некоторых авторов, подавляющее число эритроцитов крови здоровых людей в физиологических условиях изменяют форму двояковогнутого диска, являются диско - или нормоцитами [38]. При действии некоторых неблагоприятных факторов на кровь нормоциты способны принимать различные формы, которые могут иметь как обратимый, так и необратимый характер, в зависимости от вида фактора и длительности его воздействия. К таким формам относят овалоциты, эхиноциты, микроциты, деформированные и куполообразные клетки. В своем развитии последние находятся на предстадии образования сфеноцитов, которые представляют собой предгемолитическую форму эритроцитов [78]. Исследование литературы подтвердило [38], что эритроциты из двояковогнутого диска превращаются в сферовидные через стадию образования шиповидных эритроцитов.

ВЫВОДЫ

В дипломной работе впервые экспериментально исследовано *различными физическими методами* влияние бесконтактной активации на состояние и свойства крови и ее форменных элементов - эритроцитов. По результатам проделанной работы можно сделать следующие выводы:

1. Процесс бесконтактной активации жидкости в емкостях из используемого материала (полиэтилен) с толщиной стенки 0,16 мм происходит, как правило, за 10 – 15 минут, процесс релаксации может продолжаться часами.
2. Время выхода Eh бесконтактно активируемой жидкости в полиэтиленовых емкостях на стабильный уровень составляет в среднем 15 минут.
3. Изменение амплитуды колебаний и процентного числа эритроцитов с биоэлектрической активностью при бесконтактной активации обусловлено изменением поверхностного заряда клеток.
4. Бесконтактная активация крови, сопровождающаяся смещением Eh в область отрицательных значений, характеризуется повышением радиопрозрачности крови: коэффициент ослабления волн СВЧ диапазона увеличивается.
5. Изменение морфологии эритроцитов при бесконтактной активации указывает на структурные перестройки мембранны.
6. Изменение электрокинетических свойств, структуры мембранны эритроцитов, коэффициента ослабления в крови волн СВЧ диапазона при бесконтактной активации обусловлено изменением энергетического потенциала и появлением структурно – энергетических возбуждений в крови.
7. Разработана методика и создан учебно – методический стенд к выполнению лабораторной работы на тему: "Исследование качества воды методом биотеста".
8. Полученные результаты опытов могут служить основой для разработки новых методов культивирования клеток, создания систем долговременного хранения крови (биотехнология, медицина, водоочистка и т.д.). Также предполагается возможным введение в обиход диагностики различных заболеваний на ранней стадии их развития.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексин С.А., Байбеков И.М. "Живая" вода - миф или реальность. // Эл. вариант: Журнал МИС-РТ. сб. № 6. ч. 1. 1999. <http://www.ikar.udm.ru/>
2. Антонов В.Ф., Черныш А.М., Пасечник В.И., и др. Биофизика: - 1 – ое изд., 1999
3. Бахир В.М. Медико-технические системы и технологии для синтеза ЭХА растворов. -М.: ВНИИИМТ НПО "ЭКРАН", 1998. - 65 с.
4. Бахир В.М. Электрохимическая активация. Ч.1. ВНИИИМТ. - М., 1992. - 401 с.
5. Бочкарев Г.Р. Попов И.В. Ростовцев В.И. и др. Опытно-промышленные испытания установки для умягчения воды электрохимическим способом // водоснабжение и санитарная техника, - 1982. - №4. -с.7-8
6. Бут А.И. Электронно-ионные процессы водных структур живых организмов и продуктов их переработки. - М., 1992.
7. Вахрушев Я.М., Бажутина Р.В. Лабораторные методы диагностики (учебно-методическое пособие для студентов), - И., 1992
8. Вестерхоф Х., ван Дам К. Термодинамика и регуляция превращений свободной энергии в биосистемах: Пер.с англ.- М.: Мир, 1992. - 686 с.
9. Воейков В.Л., Решетов П.Д., Набиев И.Р. и др. "Физико-химические методы изучения биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов" /Под ред. и с предисловием акад. Иванова В.Т.- М.: Наука, 1992
10. Воскобойник М.Ф., Черников А.И. Техника и приборы СВЧ: Учебник для техникумов. - М.: Радио и связь, 1982.- 208с., ил.
11. Второй съезд биофизиков России. Электронный вариант: Биофизика мембран.http://www.biophys.msu.ru/scripts/trans.pl/WIN/cyrillic/rwpdb99/10_BP99/10_OBZOR/10_OTCHET.HTM#ag
12. Второй съезд биофизиков России. Электронный вариант: Биофизика сложных систем. Нелинейные процессы. Самоорганизация в биологических системах.http://www.biophys.msu.ru/scripts/trans.pl/WIN/cyrillic/rwpdb99/10_BP99/10_OBZOR/10_OTCHET.HTM#af

- 13.Второй съезд биофизиков России. Электронный вариант: Введение. Анализ современного состояния биофизики.
http://www.biophys.msu.ru/scripts/trans.pl/WIN/cyrillic/rpdb99/10_BP99/1_0_OBZOR/10_OTCHET.HTM#a1
- 14.Второй съезд биофизиков России. Электронный вариант: Действие физико-химических факторов на биологические системы.
http://www.biophys.msu.ru/scripts/trans.pl/WIN/cyrillic/rpdb99/10_BP99/1_0_OBZOR/10_OTCHET.HTM#aj
- 15.Второй съезд биофизиков России. Электронный вариант. Новые методы в биофизике
http://www.biophys.msu.ru/scripts/trans.pl/WIN/cyrillic/rpdb99/10_BP99/1_0_OBZOR/10_OTCHET.HTM#ah
- 16.Герловин И.Л. Основы единой теории всех взаимодействий в веществе.
– Ленинград: Энергоатомиздат., 1990
- 17.Гершанович В.Н. Транспорт веществ в бактериальные клетки. // Природа. -1981. -№7. -с. 85-91
- 18.Гонян С.А. Поверхностный заряд клеток при их различных функциональных состояниях // Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук, - Ереван., 1992
- 19.Гоулдстейн Джозеф. Практическая растровая электронная микроскопия.
- М: Мир, 1978 г. - 656 с.
- 20.Гоулдстейн Джозеф. Растровая электронная микроскопия и рентгеновский микроанализ: В 2т.- М: Мир, 1984. -Т. 1.
- 21.Кайракбаев Г.М., Токтамысова З.С. / Лабораторное дело. – 1990 г. - а2 – с. 31 – 33
- 22.Доливо-Добровольский Л.Б., Кульский Л.А., Накорчевская В.Ф. Химия и микробиология воды. - К., 1971
- 23.Донцов В. И. Крутько В. Н. Подколзин А. А. Старение; механизмы и пути преодоления. - М., 1997
- 24.Духин С.С., Дерягин Б.В. //Электрофорез. – М.: Изд-во Наука, 1976.

- 25.Зайцев И.Д., Креч Э.И. Применение и познание временно активированной воды. // Химическая промышленность. - 1989. - №4. - С.44-47.
- 26.Захарьевский М.С. Оксредметрия. - Л., 1967
- 27.Зенин С.В. О механизме активации воды // 2-й Международный симпозиум "Электрохимическая активация в медицине, сельском хозяйстве, промышленности", сб. докл. - М; ВНИИМТ АО НПО "Экран". 1999. ч.1.
- 28.Исайкин В.А. Методика и техника измерений поверхностных биопотенциалов внутри организма человека. // Измерительная техника. - 1987, №12, -с. 43 – 45
- 29.Исследование взаимодействия электромагнитных волн миллиметрового и субмиллиметрового диапазонов с биологическими объектами: Сб. научн. тр. /АН УССР. Институт радиофизики и электрон.; Редкол.: Шестопалов В.П.(отв. ред.) и др. - Киев: Наук. думка, 1989. – 152 с.
- 30.Карандашев В.И., Квитко Н.Н., Слинченко О.А., Александрова Н.П. Электронно – микроскопическое исследование формы эритроцитов после экстракорпорального ультрафиолетового и красного когерентного облучения крови. // Бюл. экспер. биол. и мед. – 1993 г. - а5 – с. 530 – 532
- 31.Карупу В.Я. Электронная микроскопия. – К: Вища школа. Головное издательство, 1984 г. – 208 с.
- 32.Киселев Б.И. Аквацит. - К: Первая проба сил против ВИЧ // Медицинская газета. – 1993. - №19
- 33.Киселев Б.И. Метод адаптивного лечения (искусственный источник биополя в медицине). - Санкт-Петербург, 1997
- 34.Киселев Б.И. Метод адаптивного лечения (искусственный источник биополя в медицине). - С. - Петербург; "Комплекс", вып. 1. 1997.- с. 9. // Электронный вариант <http://www.ikar.udm.ru/akdmed.htm>
- 35.Киселев Б.И. Способ обработки физиологического раствора Киселева Б.И. а.с. № 1827274, кл. A61 № 5/06 от 13.10.1992

- 36.Коновалова Н. А. СВЧ – методы исследования жидкостей // Дипломная работа, 2002
- 37.Коновалова Н.А., Широносов В.Г., Меньшикова С.Г. Регистрация феномена бесконтактной активации жидкостей методом СВЧ-спектроскопии. Сб. тезисов ВНКСФ-8. - Екатеринбург: 2002. с. 590-592.
- 38.Крымский Л.Д., Нестайко Г.В., Рыбалов А.Г. Растворная электронная микроскопия сосудов и крови. - М., 1976 г. – 166 с.
- 39.Лакин Г.Ф. Биометрия. - М.: "Высш. школа", 1973. - 343 с.
- 40.Ларский Э.Г. Лабораторное дело. - М.: Изд-во "Медицина", 1990, №9.
- 41.Левтов В.А., Регирер С.А., Шадрина Н.Х. Реология крови. - М.: Изд-во "Медицина", 1982
- 42.Лепова В.Г. Анализ эритроцитарных популяций в онтогенезе человека. - М., 1987
- 43.Лирова С.А., Шкоп Я.Я., Цвид Е.Е. Измерение электрокинетических свойств поверхности дрожжевых клеток в переходных режимах. // Микробиология. – 1982. Т.51, №1, - с. 12-16
- 44.Лоцкилов В.И. Информационно-волновая медицина и биология. - М.: Аллегро-пресс, 1998. - 256 с., илл.
- 45.Международный энциклопедический словарь (МЭС 891)
- 46.Мецлер Д.К. Биохимия: В 3т. - М.: "Мир", 1980. Т.1 -229 с.
- 47.Микроанализ и растворная электронная микроскопия /Под ред. Морис Ф.Л., Мени Л.К, Тиксье Р.К. – М.: Металлургия, 1985 г. – 445 с.
- 48.Микроскопическая техника /Под ред. Саркисова Д. С. и Петрова Ю. Л. - М: Медицина, 1996. – с. 253 – 271
- 49.Минаков В.В., Широносов В.В., Широносова Г.И. "Изумруд-СИ" - универсальная бытовая установка для получения: активированных растворов и питьевой воды с заданным составом и свойствами. Сб. тез. и докл. 2-го Международного симпозиума. Электрохимическая активация в медицине, с/х, промышленности -М.; 28-29. 11.1999. Ч 2. с.

333. // Электронный вариант: Журнал МИС-РТ. сб. №15-12. 1999.
<http://web.uni.udm.ru/common/biomed/2msexa2.htm>
50. Мирошников А.И., Фомиченков В.М., Иванов А.Ю. Электрофизический анализ и разделение клеток. - М.: Наука, 1986
51. Овсянников Ю.А., Шевцов Н.М., Медведев М.А. Состояние эритроцитов периферической крови при прямом массаже сердца / Бюл. экспер. биол. и мед. – 1997 – с. 354 – 356
52. Паксютов О.А., Чучков В.М., Голендухин А.Н., Людков Г.Г. Прижизненные реакции нервных волокон на активированную воду // Электрохимическая активация - 97. Первый международный симпозиум "Электрохимическая активация в медицине, сельском хозяйстве, промышленности", Доклады и тезисы. В 2-х частях. Часть II, М.: ВНИИИМТ. 1997. С. 64-65
53. Паничева С.А. Новые технологии дезинфекции и стерилизации сложных изделий медицинского назначения. - М.: 1998
54. Петракович Г.Н. Ядерные реакции в живой клетке // Русская Мысль. - 1993.- № 3-12.- с. 66-73
55. Петухов Е.Б., Александрова Н.П., Савушкин А.В., Квитко Н.Н., Васильев Д.Б. Морфологические изменения эритроцитов при влиянии нативного яда красной кобры / Бюл. экспер. биол. и мед. – 1995 г. -е10 – с. 425 – 427
56. Петухова Л.Е. Векторная биомеханика клеток // Труды молодых ученых России сб. мат. III Медицинского конгресса. - Ижевск, Россия, 2000. - с. 4-7
57. Позмогова И.Н., Шкоп Я.Я., Цвид Е.Е. и др. Хемостатное культивирование дрожжей *Candida utilis* при нестационарных температурных условиях/Микробиология, 1982, -Т.51, с. 236-239
58. Пирузян Л.А. Проблемы медицинской биофизики. - М.: Знание, 1991.- 64 с. - (Новое в жизни, науке, технике. Сер. "Биология"; №3).

333. // Электронный вариант: Журнал МИС-РТ. сб. №15-12. 1999.
<http://web.uni.udm.ru/common/biomed/2msex2.htm>
50. Мирошников А.И., Фомиченков В.М., Иванов А.Ю. Электрофизический анализ и разделение клеток. - М.: Наука, 1986
51. Овсянников Ю.А., Шевцов Н.М., Медведев М.А. Состояние эритроцитов периферической крови при прямом массаже сердца / Бюл. экспер. биол. и мед. – 1997 – с. 354 – 356
52. Паксютов О.А., Чучков В.М., Голендухин А.Н., Людков Г.Г. Прижизненные реакции нервных волокон на активированную воду // Электрохимическая активация - 97. Первый международный симпозиум "Электрохимическая активация в медицине, сельском хозяйстве, промышленности", Доклады и тезисы. В 2-х частях. Часть II, М.: ВНИИИМТ. 1997. С. 64-65
53. Паничева С.А. Новые технологии дезинфекции и стерилизации сложных изделий медицинского назначения. - М.: 1998
54. Петракович Г.Н. Ядерные реакции в живой клетке // Русская Мысль. - 1993.- № 3-12.- с. 66-73
55. Петухов Е.Б., Александрова Н.П., Савушкин А.В., Квитко Н.Н., Васильев Д.Б. Морфологические изменения эритроцитов при влиянии нативного яда красной кобры / Бюл. экспер. биол. и мед. – 1995 г. -е10 – с. 425 – 427
56. Петухова Л.Е. Векторная биомеханика клеток // Труды молодых ученых России сб. мат. III Медицинского конгресса. - Ижевск, Россия, 2000. - с. 4-7
57. Позмогова И.Н., Шкоп Я.Я., Цвид Е.Е. и др. Хемостатное культивирование дрожжей *Candida utilis* при нестационарных температурных условиях/Микробиология, 1982, -Т.51, с. 236-239
58. Пирузян Л.А. Проблемы медицинской биофизики. - М.: Знание, 1991.- 64 с. - (Новое в жизни, науке, технике. Сер. "Биология"; №3).

59. Прилуцкий В.И., Бахир В.М. Электрохимически активированная вода: аномальные свойства, механизм биологического действия. - М.: ВНИИИМТ АО НПО "Экран". 1997
60. Прилуцкий В.И. Пределы выживания изолированных клеток в электрохимически активированных (ЭХА) средах // Электрохимическая активация - 99. Второй международный симпозиум "Электрохимическая активация в медицине, сельском хозяйстве, промышленности", Москва 28-29 октября 1999 г. Доклады и тезисы: В 2-х частях - М.: Всероссийский научно-исследовательский и испытательный институт медицинской техники, 1999. Часть II, -122с.
61. Прилуцкий В.И. Механизм действия электроактивированной воды на функцию митохондрий // Электрохимическая активация - 99. Второй международный симпозиум "Электрохимическая активация в медицине, сельском хозяйстве, промышленности", Москва 28-29 октября 1999 г. Доклады и тезисы. В 2-х частях. - М.: Всероссийский научно-исследовательский и испытательный институт медицинской техники. 1999. Часть II, 122с.
62. Прилуцкий В.И. Электрохимически активированная вода: аномальные свойства, механизм биологического действия // Активированная вода. - 1996. №3
63. Прозоровский В.Б., Скопичев В.Г. Морфологические изменения эритроцитов мышей и крыс при воздействии фосфороганическими ингибиторами холинестераз / Бюл. экспер. биол. и мед. – 1993 г. - а4 – с.443 – 445.
64. Работнова И.Л., Лирова С.А., Ризенберг Д.Л. Прикл. биохим. и микробиол., 1977, т.13, с. 377
65. Робертис Э. Де, Новинский В., Саэс Ф. Биология клетки. - М.: "Мир", 1973. - 488 с.
66. Руководство к практическим занятиям по микробиологии /Под ред. Егорова Н.С - 3-е изд., перераб. и доп. - М.: Изд-во МГУ, 1995. -224с., ил.

- 76.Сумаруков Г.В. Окислительное равновесие и радиочувствительность организмов. - Москва: Атомиздат, 1970. - с.4
- 77.Суходуб Л. Ф., Дружий И. Д., Пертышный Н. Г., Плескачев В. И. //Реферативный журнал физиол. чел. и жив. – 25Н, а5, 1991
- 78.Черницкий Е. А., Воробей А. И. Структура и функции эритроцитарных мембран. -Минск, 1981
- 79.Техническое описание и инструкция по эксплуатации 2.950.122ТО, книга 3// Пост вакуумный универсальный ВУП-5, заводской номер №95, 1989
- 80.Техническое описание и инструкция по эксплуатации ЦФI.720.041 ТО, книга 3// Микроскоп электронный растровый РЭМ-100 У, заводской номер №3684, 1984
- 81.Уоттерсон Д.Г. Роль воды в функции клетки // Биофизика: 1991. -Т.36, вып.1, с. 5-30
- 82.Физикохимия мембранных процессов / Тимашев С.Ф. - М.: Химия, 1988, - 240 с.
- 83.Харамоненко С.С., Ракитянская А.А. Электрофорез клеток крови в норме и патологии. - Минск: Беларусь, 1974. - 143 с.
- 84.Цвид Е.Е., Шкоп Я.Я., Позмогова И.Н., Шульговская Е.М. Электрокинетические свойства микроорганизмов в зависимости от условий культивирования. Микробиология, 1981. - Т.50, с. 659-664
- 85.Черников Ф.Р., Бахир В.М., Дмитриев Н.Н. и др. Динамическая структура воды при электрохимической активации. Журнал "Korrect News", № 9, от 10.04.2000, <http://www.private.peterlink.ru/korrect/news.htm>.
- 86.Черницкий Е.А., Воробей А.И. Структура и функции эритроцитарных мембран. - Минск, 1981
- 87.Чижевский А.Л. Структурный анализ движущейся крови. - М: Изд – во АН СССР, 1959. - 474 с.
- 88.Чижевский А.Л. Электрические и магнитные свойства эритроцитов. - Киев: Наук. Думка, 1975. - 93 с.

- 89.Широносов В.Г., Широносов Е.В. Вода, излучение, жизнь. Сб. тез. докл. 7-го Международного симпозиума. Информационно-технологическое и медицинское обеспечение защиты населения и окружающей среды в чрезвычайной ситуации. Кипр- Проторас, 29.04-6.05 2000. -М.; 2000. с. 42-44
- 90.Широносов В.Г., Широносов Е.В. Опыты по бесконтактной электрохимической активации воды, с. 66-68, 2-й Международный симпозиум "Электрохимическая активация в медицине, сельском хозяйстве, промышленности", сб. докл. - М; ВНИИИМТ АО НПО "Экран". 1999. I ч. - с. 300. Электронный вариант: <http://www.ikar.udm.ru/2msexal.htm>
- 91.Широносов В.Г. Резонанс в физике, химии и биологии. – Ижевск: Изд. Дом Удм. ун-т, 2001.- с.92
- 92.Широносов В.Г., Широносов Е.В. Устройство для бесконтактной активации жидкости, а. с. № 2000108654/12(009166) приоритет от 10.04.2000.
- 93.Шкляев А.Е., Шишгин А.В. Электрофоретическая подвижность эритроцитов в растворах рибоксина у больных хроническим дуоденитом и язвенной болезнью двенадцатiperстной кишки // Труды молодых ученых России сб. мат. III Медицинского конгресса, Ижевск, Россия, окт.4-7, 2000
- 94.Электрохимическая технология изменения свойств воды / Рогов В.М., Филипчук В.Л. - Львов: Выща шк. Изд-во при Львов. Ун-те, 1989. - 128 с.
- 95.Ярыгин В. Н., Крыжановский Г. Н., Романов Ю. А. и др. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. №1. Изд-во РАМН, 2001.
- 96.<http://www.water.ru/>
- 97.Korrect – news Информационный научно-популярный журнал/электронное издание – <http://www.nsk.su/~emed/kn-12.html>
- 98.Proceedings 39-th General Meeting Society of Electrophoresis: Abstract // Phys. Chem. Biol. – 1989. – Vol. 33, №1. – P. 2-180.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Приборы, используемые в опытах и погрешности измерений:

1. Источник питания постоянного тока Б5-49 : $\Delta I = \pm 0,1$ А, $\Delta U = \pm 0,1$ В;
2. Весы механические $\Delta m = \pm 0,05$ г;
3. Линейка $\Delta l = \pm 1$ мм;
4. Мензурка: $\Delta V = \pm 15$ мл.
5. Прибор для измерения pH, ОВП, Т (pH=150) $\Delta \text{ОВП} = \pm 1$ мВ;
6. Термостат $\Delta T = \pm 1^{\circ}\text{C}$;
7. Частота с.в.ч. $\Delta f/f = \pm 2\%$.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
УДМУРТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

УТВЕРЖДАЮ

Зав кафедрой биомедфизики,


к. ф.-м. н.

В.Г. Широносов
“17” 05 2001 г.

ИССЛЕДОВАНИЕ КАЧЕСТВА ВОДЫ МЕТОДОМ БИОТЕСТА

Методические указания

Ижевск – 2001

Указания рассмотрены и утверждены методической комиссией кафедры «Биомедфизика» физического факультета.

Протокол №0517 от “17” 05 2001 г.

Председатель методической комиссии кафедры биомедфизики, к.ф.-м. н. В.Г. Широносов

В методических указаниях содержится описание лабораторной работы по потоковому курсу «Вода и водные растворы» для студентов 4-го курса физического факультета. Даны краткие теоретические сведения и подробно изложена методика выполнения экспериментальной части работы.

Работа может быть использована студентами, аспирантами, и специалистами других специальностей, занимающихся изучением воды и водных растворов.

Работу подготовили:

—МСУ—

Казанкин Д.С.

Меньшикова С.Г.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: Используя метод биотеста, выяснить влияние концентрации и класса опасности загрязняющего вещества на общую токсичность образца воды для живых клеток. На основе полученных данных сделать сравнительную характеристику качества предоставленных образцов воды.

ПРИБОРЫ И МАТЕРИАЛЫ: генератор сигналов специальной формы программируемый Г6-31, световой микроскоп (Биолам), образцы воды, клеточный тест-объект, предметные и покровные стёкла, пробирки, пипетки (0,2 мл и 2 мл), шприц, стандартные фильтры, фильтровальная бумага.

1. ВВЕДЕНИЕ

В зависимости от качества воды, ее классифицируют по целевому назначению на:

1. Питьевую.
2. Техническую.
3. Поливочную.
4. Охлаждающую и т.д.

Качество воды зависит от её параметров: физических, химических и бактериологических, которые должны соответствовать установленным гигиеническим требованиям и нормативам качества.

1.1. Гигиенические требования и нормативы качества питьевой воды

Питьевая вода должна быть безопасна в эпидемическом и радиационном отношении, безвредна по химическому составу и иметь благоприятные органолептические свойства. Качество питьевой воды должно соответствовать гигиеническим нормативам перед ее поступлением в распределительную сеть, а также в точках водозабора наружной и внутренней водопроводной сети.

Параметры качества питьевой воды определены в СанПиН 2.1.4.559.-96. В этот список включены гигиенические нормативы вредных веществ в питьевой воде. В него входят индивидуальные химические вещества, которые могут присутствовать в питьевой воде в указанном виде и могут быть идентифицированы современными аналитическими методами.

Химические соединения, загрязняющие воду, характеризуются различной степенью опасности для человека. Поэтому в зависимости от токсичности, кумулятивности, способности вызывать отдаленные эффекты, вещества классифицируют на 4 класса опасности:

- 1 класс - чрезвычайно опасные
- 2 класс - высокоопасные
- 3 класс - опасные
- 4 класс - умеренно опасные

Классы опасности веществ необходимо учитывать при выборе соединений, подлежащих первоочередному контролю.

Биотест применяется в качестве экспресс-метода для определения общей токсичности воды. Результаты биотеста могут служить рекомендацией для дальнейшего анализа с помощью чувствительных методов аналитического определения веществ в воде, а также устанавливают очередность в проведении физико-химических анализов среди нескольких предоставленных образцов.

1.2. Живые организмы как индикатор качества среды

Живые организмы находят широкое применение в качестве индикаторов вредных веществ находящихся в окружающей их среде. Что касается определения качества воды, то до сих пор, одним из критериев физиологичности воды открытых водоемов для питьевого водоснабжения является выживаемость в ней водных организмов.

Наряду с многоклеточными организмами в качестве тест-объектов используются их отдельные живые клетки и одноклеточные организмы. Наблюдение живых клеток организма называется прижизненным или витальным.

Для получения информации о процессах и явлениях происходящих на клеточном уровне существуют разнообразные методы исследования живых клеток - оптические, биофизические, биохимические. В настоящее время широко распространен клеточный электрофорез. Электрофоретическая техника позволяет получить информацию о биологическом объекте из измерений, в определенном смысле не нарушающих его как живой или действующий механизм. Такая информация может быть получена из данных о физико-химических свойствах их поверхности. Как известно, именно поверхность есть место, где совершаются многочисленные биологически важные явления.

Клетка любого организма представляет собой целостную живую систему. Оболочка клетки осуществляет непосредственное взаимодействие с внешней средой. На поверхности клетки существует электрический заряд, который играет важную роль во всех жизненных проявлениях клетки. Электрический заряд клетки формируется за счёт:

- 1) диссоциации ионогенных групп молекул, входящих в состав цитолеммы;
- 2) заряда клеточных белков;
- 3) работы Na/K насоса, играющего важную роль в формировании мембранныго потенциала.

Следует отметить, что постоянство структуры клеточной поверхности возможно только при сохранении жизнеспособности клетки, которая поддерживается непрерывно протекающими обменными процессами между клеткой и окружающей средой. Для нормального выполнения своих функций клетки должны иметь стабильный электрический заряд, который зависит от физико-химической структуры их поверхности, физиологического состояния клетки и состава окружающей среды. В средах, неблагоприятных для жизнедеятельности, электрический заряд клеток может существенно изменяться. Это одно из проявлений приспособительной реакции клетки на изменившиеся условия среды. Такое свойство можно использовать, в частности, для биологического тестирования загрязнённости воды.

Непосредственное измерение электроповерхностных свойств биологических объектов невозможно. Поэтому используют косвенный метод - микроэлектрофорез.

2. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

2.1. Теоретические основы микроэлектрофореза

Электрофорез представляет собой движение отдельных частиц в поле зрения микроскопа, находящихся во взвешенном состоянии в жидкой среде, под действием внешнего электрического поля. Микроэлектрофорез является разновидностью электрофореза.

Метод микроэлектрофореза позволяет количественно оценить электроинетические свойства отдельных клеток или частиц:

1. Электрофоретическую подвижность (ЭФП).
2. Электрокинетический потенциал (ЭКП или ζ -потенциал).
3. Плотность поверхностного заряда (ПЗ).

Эти параметры дают ценную информацию о физико-химическом состоянии поверхности клетки.

Микроэлектрофорез основан на электрокинетических явлениях, которые наблюдаются в жидкостных дисперсных системах и в жидкостях, заполняющих капилляры. Они заключаются в движении одной фазы относительно другой при действии электрического поля или в возникновении разности потенциалов в направлении относительного движения фаз при действии механических сил. Данные явления обусловлены существованием на границе фаз диффузного двойного электрического слоя.

При физиологическом значении рН, отрицательно заряженная поверхность клетки притягивает из окружающей среды, противоположно заряженные ионы - противоионы, стремящиеся приблизиться к ионизированным группам клеточной поверхности. В результате клетка оказывается окруженной двойным электрическим слоем. Он состоит из ионов одного знака, прочно связанных с клеткой - потенциалопределяющие ионы и эквивалентного количества противоположно заряженных ионов, находящихся в дисперсионной среде - противоионы. В целом весь комплекс остается электронейтральным. При действии электрического поля на гетерогенную систему происходит явление, напоминающее электролиз и клетка с двойным электрическим слоем перемещается к аноду или катоду в зависимости от знака заряда.

Если поместить клетку в однородное электрическое поле, то оно приведет к деформации двойного электрического слоя. При перемещении в электрическом поле коллоидных частиц или клеток с двойным электрическим слоем их поверхность смещения не совпадает с разделом твердой и жидкой фаз, а сдвигается в глубину последней. Поэтому на границе отрыва частицы с прочно фиксированным слоем ионов от остальной массы жидкости образуется скачок потенциала. Этот потенциал был назван электрокинетическим или ζ -потенциалом.

Величину ЭКП вычисляют, пользуясь формулой Эйнштейна-Смолуховского:

$$\zeta = \frac{4\pi\eta\omega}{DE} \quad (1)$$

где η - вязкость среды, равная для воды; при температуре +20 °C 0,01 пуз (10-2 Г·см⁻¹·сек⁻¹); D - диэлектрическая постоянная для воды 81; E - градиент потенциала, т.е. падение напряжения на единицу длины проводника (В·см⁻¹); ω - скорость движения клетки (см·сек⁻¹).

Величина модуля вектора напряжённости внешнего электрического поля определяется формулами:

$$E = \frac{I}{K_0 A} \quad (2)$$

или

$$E = \frac{U}{RK_0 A} \quad (3)$$

где I – значение силы тока (А), A – поперечное сечение слоя рассматриваемой жидкости (см²); K₀ – удельная электропроводность среды (Ω^{-1}); U - приложенная разность потенциалов (В).

Согласно формуле Смолуховского (1) величина ζ -потенциала частицы, не зависит от размеров и формы частиц, так как с увеличением поверхности клетки ее общий заряд возрастает в той же мере, как и встречаемое ею сопротивление жидкости. Так как при низких концентрациях солей η и D постоянные величины, то ЭКП зависит только от скорости движения и градиента напряжения. Следует отметить, что при использовании метода микроэлектрофореза измеряется не сама величина поверхностного потенциала, а его

значение в плоскости скольжения частицы, поэтому ζ -потенциал всегда меньше φ - полного термодинамического потенциала.

В соответствии с теорией Штерна о строении ДЭС, он может менять свою толщину сжимаясь и, наоборот, в зависимости от ионной силы среды, которая определяется по уравнению Льюса и Рэндалла:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2 \quad (4)$$

где μ - ионная сила раствора; Z_i - валентность иона; C_i - концентрация ионов в г/л.

Чем больше ионная сила среды, тем большее число противоионов попадет в адсорбционный слой и толщина ДЭС будет сжиматься. В результате величина ЭКП уменьшится. При разбавлении системы, наоборот, диффузный слой расширится и ζ -потенциал возрастет.

Следует отметить, что ДЭС может образоваться вокруг клетки лишь при достаточно высокой плотности зарядов. При низкой плотности заряда вокруг каждого иона образуется ионная атмосфера, а не двойной электрический слой. По мнению некоторых исследователей, поверхностная плотность заряда лучше характеризует электрохимические свойства клеток, чем другие параметры. Она определяется уравнением:

$$\sigma = \frac{\omega \eta}{\frac{1}{k} + r} \quad (5)$$

где σ - плотность заряда; ω - электрофоретическая скорость движения; η - вязкость среды; r - радиус противоиона; $1/k$ - обратная величина толщины ДЭС.

К сожалению, в подавляющем большинстве случаев расчеты по представленным формулам (даже при умеренных величинах ζ -потенциала, что позволяет использовать линейные модели) в настоящее время невозможны. Это связано, во-первых, с отсутствием аналитического описания строения диффузного двойного слоя несферических частиц. Сложная конфигурация биологических частиц, в ряде случаев динамические изменения формы дают серьезные основания сомневаться в приложимости существующей теории к таким объектам. Во-вторых, как правило, ионогенные группы и особенно адсорбируемые ионы распределены неравномерно по отношению к "поверхности" организма. Кроме того, биологические объекты, как известно, обычно проницаемы для низкомолекулярных ионов, причем в литературе не имеется данных об ошибках, которые при этом появляются. Для устранения подобных сложностей применяются другие количественные характеристики электрохимических свойств клеток.

Одной из таких величин является электрофоретическая подвижность (ЭФП), под которой понимают отношение линейной скорости клетки к градиенту потенциала электрического поля, определяемая по уравнению:

$$\varpi = \frac{S}{tE} \quad (6)$$

где ϖ - электрофоретическая подвижность, $\text{см}^2 \cdot \text{сек}^{-1} \cdot \text{В}^{-1}$; E - напряженность поля, $\text{В} \cdot \text{см}^{-1}$; S - путь, пройденный частицей, см; t - время, сек.

Погрешность единичного замера скорости при измерениях электрофоретически однородных дисперсий, аккуратном экспериментировании, с поправкой на некоторые трудноустранимые потоки, дает среднюю ошибку порядка 5-7 %. Для серии из 20 замеров ошибка (для прецизионных измерений) составляет около 1,5-2 %.

3. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Специфика данной работы определяет требования для получения репрезентативной выборки:

1. Среди всех клеток в поле зрения микроскопа, для снятия показаний, следует выбирать одиночные клетки среднего размера, с ровными четкими краями, не встречающие препятствий при движении.
2. Необходимо точно соблюдать время экспозиции клеток в растворе и проводить измерения через одинаковые промежутки времени. В противном случае качество измерений будет низким. На выполнение одного опыта отводится 12 минут из них: 5 мин. для экспозиции клеток в исследуемом растворе, 2 мин. или меньше для установки препарата, остальное время - для снятия 10 измерений.
3. Исследуются 4 пробы воды, для каждой необходимо сделать 3 опыта по 10 измерений в каждом.

Образцы воды приводятся в работе в виде таблицы 1:

Таблица 1.

№ образца	Вещество	Класс опасности	Концентрация	
			ПДК	Абс., мг/л
1				
2				
3				
4				

Все данные, полученные в результате измерений, и последующие расчеты заносятся в отчет по данному опыту. Отчет оформляется в виде таблицы 2:

Таблица 2.

Проба N.p (номер образца . номер пробы)								
t (нач)	(время начала измерений)							
№ изм.	L ₁	L ₂	L ₃	L ₀	Среднее	Дисперсия	Стандартное отклонение	Ошибка среднего
1								
2								
3								
...								
10				формула (7)	формула (9)	формула (11)	формула (12)	формула (13)
11								
12								
t (кон)	(время окончания измерений)							
t (абс)	общее время = t (кон) - t (нач)							

3.1. Порядок выполнения работ

1. Развести клеточную суспензию (0,04 мл) в пробирке с исследуемой водой (10 мл). Клетки имеют плотность выше, чем окружающая их жидкость, поэтому со временем оседают на дно. Перед забором исследуемых клеток всегда необходимо взбалтывать суспензию и набрать требуемый объем пипеткой из середины пробирки.
 2. Отметить время начала экспозиции клеток в исследуемой жидкости.
 3. Подготовиться к работе.
- Установить параметры генератора (частота 10^{-1} Гц, амплитуда - 2 (мейндр), напряжение - 10 В). Замочить стандартные фильтры в исследуемой воде. Весьма существенным

моментом является подготовка поверхности предметных стекол. Поверхность должна быть тщательно очищена и обезжирена, чтобы клетки не прилипали к поверхности стекла. Капля жидкости должна равномерно расплываться по стеклу, а не собираться в выпуклые, медленно высыхающие капельки. Хорошее обезжиривание достигается протиранием вымытых и высушенных стекол ватой, смоченной эфиром или спиртом (после этого промывание водой не требуется).

4. По истечении 5 минут экспозиции приготовить временный препарат клеток "раздавленная капля": на предметное стекло между электродами поместить 0,04 мл исследуемого раствора, накрыть каплю первым покровным стеклом. На него нанести 0,04 мл исследуемой жидкости с клеточным тест-объектом и накрыть эту каплю вторым покровным стеклом. Система из двух покровных стекол образует электрофоретическую камеру, в которой обеспечивается равенство объема жидкости от опыта к опыту. Для предотвращения испарения, а так же для создания контакта жидкости с электродами, сверху, на стекла, помещается стандартный фильтр. Это рамка из фильтровальной бумаги смоченная в исследуемом растворе. Ширина рамки соответствует ширине предметного стекла, длина подбирается таким образом, чтобы оба электрода приблизительно на 1/3 были покрыты краями бумаги. Окошко в центре, немного меньшее по размеру, чем покровное стекло, позволяет рассматривать клетки в микроскоп.
5. Настроить микроскоп, установить объектив с увеличением 60^{\times} , найти в поле зрения клетки. Поворачивая револьвер, устанавливают объектив с наименьшим увеличением (8^{\times} или 20^{\times}). С помощью макрометрического винта опускают тубус микроскопа, оставляя расстояние до препарата около 1 мм. Настраивают освещение. Наблюдая в окуляр, медленно поднимают тубус до появления отчетливого изображения препарата. Осторожно поворачивая револьвер, меняют объектив на 60^{\times} . Точная фокусировка достигается с помощью микрометрического винта. В случае невозможности найти плоскость препарата таким способом, разрешается использовать макрометрический винт. Но на большом увеличении операции с ним следует проводить очень осторожно, следя за тем, чтобы фронтальная линза не касалась стекла и не получила повреждения.
6. Включить знакопеременный генератор, отметить время включения в таблице отчета и зарегистрировать возвратно-поступательные движения клеток по окулярной линейке. Одна клетка - одно измерение. Измерения по окулярной линейке следует производить, только если движение клетки происходит в пределах делений линейки. Кроме того, обязательно ориентировать окуляр так, чтобы траектория движения была по направлению длины линейки. Отсчет амплитуды производить обязательно по одному и тому же краю клетки. Иногда во время измерений наблюдаются течения жидкости, вызванные неравномерным испарением воды из-под покровного стекла. Подобные течения изменяют истинную картину движения клеток, т.к. клетки в результате возвратно-поступательных движений каждый раз возвращаются не в то же самое место, откуда они начинали свое движение. Для устранения подобных ошибок следует фиксировать в таблице наблюдения 3 показания: L_1 - первое зафиксированное положение клетки, L_2 - положение клетки в результате одного смещения под действием 1/2 периода смены знаков на электродах, L_3 - положение клетки через 1 период смены знаков. В случае отсутствия течений значения L_1 и L_3 совпадают. Результаты измерений заносятся в таблицу в соответствующие столбцы. Смещение клетки под воздействием 1/2 периода смены знаков на электродах, выраженное в делениях линейки, вычисляется по формуле:

$$L_0 = \frac{|L_2 - L_1| + |L_2 - L_3|}{2} \quad (7)$$

В результате исследования определяют, какому числу делений окулярной линейки соответствует амплитуда колебания клеток, и умножают это число на цену деления окулярной линейки для данного увеличения микроскопа (1 деление шкалы линейки -

0,0023 мм, если окуляр - 10^{\times} , объектив - 60^{\times}). Таким образом, формула для вычисления абсолютного смещения клеток в миллиметрах имеет вид:

$$L_{abc} = 0,0023 \times L_0 \quad (8)$$

7. По достижении 10 измерений, либо по истечении 10 минут непрерывной работы знакопеременного генератора, отметить время окончания опыта и выключить прибор.
8. Исследовать таким образом 3 пробы одного образца воды, чтобы набрать достаточное количество данных для статистической обработки.
9. Повторить пункты 1...8 для каждого исследуемого раствора.
10. Произвести статистическую обработку полученных данных. Сравнить показатели образцов воды №1, №2, №3 и №4. Объяснить результаты, сделать заключения. Статистическая обработка начинается с вычисления абсолютного смещения клеток под действием поля по формуле (7). На основании полученных данных вычисляются среднее арифметическое - (9), дисперсия - (11), стандартное отклонение - (12), ошибка среднего - (13). Результаты вычислений, предварительно переведенные в стандартные единицы измерения с использованием формулы (8), заносятся в соответствующие столбцы таблиц отчета. Для каждого образца воды, по данным таблиц, определяется общая величина клеточной кинетики по формуле (15) и общая ошибка среднего по формуле (17).

3.2. Контрольные вопросы

1. Почему теория электрофореза не может удовлетворительно описать электрофоретическое движение биологических частиц?
2. Каким образом формируется электрический заряд на поверхности клетки?
3. Какие электрокинетические свойства клеточной поверхности можно определить методом микроэлектрофореза?
4. Перечислите основные требования к качеству питьевой воды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мирошников А.И., Фомченков В.М., Иванов А.Ю. Электрофизический анализ и разделение клеток. М.: Наука, 1986.
2. Духин С.С., Дерягин Б.В., Электрофорез // М, Изд-во Наука, 1976.
3. Соловьев А.А и др. // 1-й Международный симпозиум "Электрохимическая активация в медицине, сельском хозяйстве, промышленности", сб. докл.-М; ВНИИМТ АО НПО "Экран". 1997. с. 62-64.
4. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. / под ред. Егорова Н.С - 3-е изд., перераб. и доп. - изд-во МГУ, 1995. - 224с.: с ил.

ПРИЛОЖЕНИЕ

1. Обработка данных

Результаты планомерного учета фиксируются обычно в первичных документах - протоколах опытов, журналах, бланках и т.п. Собранный фактический материал подвергается затем статистической обработке.

Важнейшие понятия статистики

Генеральная совокупность - часть объектов, на которые распространяются выводы исследования. *Выборка* - часть генеральной совокупности, которая подвергается непосредственному наблюдению. Главное требование к выборке - *Репрезентативность* - соответствие выборки генеральной совокупности. Репрезентативность выборки оговаривается в применяемой методике.

Цель статистической обработки - извлечение из массы фактов заключенной в них информации, получение на основании проведенного исследования объективных и убедительных выводов.

Одной из важнейших обобщающих характеристик варьирующих признаков является средняя величина. Значение средних заключается в их свойстве нивелировать индивидуальные различия, в результате чего выступает более или менее устойчивая числовая характеристика клеточной кинетики для данных условий. Существует несколько видов средних. В данной работе используются среднее арифметическое и взвешенное среднее.

Арифметическое среднее

Из всех параметрических средних наиболее часто применяется средняя арифметическая (\bar{x}), представляющая частное от деления суммы всех вариантов совокупности на их общее число:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (9)$$

где \bar{x} - средняя величина; x_i - частная варианта; n - объем совокупности, на котором вычисляется средняя.

Среднее арифметическое величина именованная, она выражается теми же единицами измерения, что и характеризуемый ею признак.

Среднее арифметическое - важнейшая статистическая характеристика. Но она ничего не говорит о величине варьирования признака. Между тем без учета степени варьирования нельзя составить полную характеристику варьирующего признака. Отсюда следует, что наряду с использованием средних величин нужны еще и показатели вариации изучаемых признаков. Наиболее подходящей мерой варьирования служат:

Дисперсия и стандартное отклонение

Дисперсия показывает средний квадрат отклонений каждой переменной от их средней арифметической. Т.е. если квадрат отклонений $d_i^2 = (x_i - \bar{x})^2$, тогда

$$\sigma^2 = \frac{1}{n} \sum d_i^2 \quad (10)$$

где σ^2 - дисперсия; d_i - отклонение x_i от среднего \bar{x} .

Для облегчения расчетов можно использовать другую формулу:

$$\sigma^2 = \frac{(\bar{x}^2 - (\bar{x})^2)n}{n-1} \quad (11)$$

На практике удобнее пользоваться средним квадратическим отклонением или стандартным отклонением (σ или S). Вычисляется по формуле:

$$S = \sqrt{\sigma^2} \quad (12)$$

Стандартное отклонение - это мера того, насколько широко разбросаны точки данных относительно их среднего. Чем сильнее варьирует признак, тем больше величина стандартного отклонения, и наоборот.

Стандартное отклонение величина именованная и выражается в тех же единицах измерения, что и признак. Таким образом, можно представлять результаты одного опыта в виде: *Арифметическое среднее ± стандартное отклонение = $(\bar{x} \pm S)$* .

Среднее арифметическое и стандартное отклонение дают полную количественную характеристику клеточной кинетики в исследуемом растворе. Среднее арифметическое отображает *действие на живые биосистемы основных причин*, определяющих типичный для данных условий уровень клеточной кинетики. Тогда как стандартное отклонение характеризует варьирование значений этого признака вокруг центра распределения, т.е. средней арифметической, является мерой *степени влияния* на клеточную кинетику различных *второстепенных причин*.

Основная задача стандартного отклонения описать варьирование результатов для серии измерений одной выборки. *Стандартные отклонения разных выборок не сравнимы*.

Для сравнения и последующего объединения результатов измерений применяется другой вид записи: *Арифметическое среднее ± ошибка среднего = $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$*

Ошибка среднего ($S_{\bar{x}}$)

В математической статистике доказывается, что выборочные средние варьируют в \sqrt{n} раз меньше чем отдельные варианты одной и той же генеральной совокупности. Отсюда следует, что среднее стандартное отклонение, характеризующее варьирование выборочных средних вокруг их генерального параметра, равняется:

$$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n-1}} \quad (13)$$

где $S_{\bar{x}}$ - ошибка среднего; S - стандартное отклонение; n - количество вариантов в выборке; $(n-1)$ - число степеней свободы для выборок небольшого объема, при $n \geq 30$ разница между n и $n-1$ практически не оказывается на величине ошибки, поэтому ее можно вычислять по формуле:

$$S_{\bar{x}} = S / \sqrt{n} \quad (14)$$

Значение ошибки среднего: она указывает на точность, с какой определена сопровождаемая ею средняя величина. При увеличении числа испытаний ошибка среднего будет уменьшаться, т.е. при $n \rightarrow \infty$ $S_{\bar{x}} \rightarrow 0$. Величина средней ошибки зависит также от размаха варьирования признака: чем больше размах вариации, тем больше будет и величина $S_{\bar{x}}$, и наоборот.

Объединение результатов разных измерений

Прежде всего, результаты опытов, представленные в виде $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$, должны быть непротиворечивы. Т.е. различия средних арифметических между собой *не должны* быть намного больше, чем любая из погрешностей.

После проведения нескольких испытаний одной пробы воды необходимо объединить полученные результаты, чтобы получить единственную наилучшую оценку. При вычислении среднего арифметического каждое измерение вносит одинаковый вклад в конечный результат, в то время как более точному отсчету следует приписать больший вес. Для этого применяют:

Взвешенное среднее

Главное требование к конечному результату серии опытов: *Результат наиболее точного опыта должен вносить наибольший вклад в единственную наилучшую оценку для данной пробы воды.*

Это требование выполняется при вычислении взвешенного среднего по формуле:

$$\overline{X} = \frac{\sum_{i=1}^n \omega_i \overline{x}_i}{\sum_{i=1}^n \omega_i} \quad (15)$$

где \overline{X} - наилучшая оценка; \overline{x}_i - среднее арифметическое; i -ого опыта; *веса* ω_i - это обратные значения квадратов соответствующих погрешностей:

$$\omega_i = \frac{1}{S_x^{-2}} \quad (16)$$

Погрешность полученного результата можно вычислить по формуле:

$$\overline{S_x^{-2}} = \left(\sum_{i=1}^n \omega_i \right)^{-1/2} \quad (17)$$

Допускается к защите

Широносовым В. Г.

заведующий кафедрой Биомедфизики, к.ф.-м.н.,

«13» 06 2002 г.

подпись

Научный руководитель:

зав. кафедрой Биомедфизики,

к.ф.-м.н., Широносов В. Г

«13» 06 2002 г.

подпись

Рецензенты:

зав. кафедрой Общей физики, доцент, к.ф.-м.н.

Милютин И.В.

«14» 06 2002 г.

подпись

зав. кафедры Гистологии ИГМА, доцент, к.м.н.

Соловьев А.А.

«14» 06 2002 г.

подпись



гр. Соловьев А.А.
СПЕЦИАЛИСТ ПО
КАДРОВОЙ РАБОТЕ