

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
\_\_\_\_\_ Е. И. Шишацкая  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2019 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**  
06.04.01 - Биология  
06.04.01.00.05 – Реконструктивная биоинженерия

Влияние кортизола сыворотки крови на кислотную резистентность эритроцитов, состояние иммунного и ионного гомеостаза при ишемической болезни сердца и диффузно-токсическом зобе

Научный руководитель	_____	<u>доцент, к.б.н.</u>	<u>Ф.А. Гершковрон</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Научный консультант	_____	<u>проф., д.м.н.</u>	<u>О.В. Смирнова</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____		<u>С. В. Милевская</u>
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Рецензент	_____	<u>доцент, к.м.н.</u>	<u>Т.В. Толмачева</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия

Красноярск 2019

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 Обзор литературы	8
1.1 Понятие стресса	8
1.1.1 Общий адаптационный синдром.....	9
1.1.2 Развитие общего адаптационного синдрома.....	11
1.2 Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система	14
1.2.1 Гипоталамус.....	14
1.2.2. Гипофиз.....	15
1.2.3 Надпочечники.....	16
1.2.4 Последствия активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы.....	19
1.3 Диффузно-токсический зоб	22
1.3.1 Состояние системы крови при ДТЗ.....	23
1.4 Ишемическая болезнь сердца	23
1.4.1 Эритроциты крови при ИБС.....	25
1.5 Эритроциты	27
1.5.1 Мембрана эритроцитов.....	28
1.5.2 Резистентность эритроцитов.....	29
1.6 Лейкоцитарная формула	30
1.6.1 Гематологические (лейкоцитарные) индексы.....	31
1.7 Кальций	32
1.8 Магний	33
2 Материалы и методы	35
2.1 Объекты исследования	35
2.2 Методы исследования	35
2.2.1 Метод кислотных эритрограмм.....	35
2.2.2 Определение содержания эритроцитов электроколориметрическим методом.....	38
2.2.3 Определение содержания гемоглобина.....	39

2.2.4	Подсчет лейкоцитарной формулы.....	40
2.2.5	Определения концентрации Mg колориметрическим методом.....	42
2.2.6	Определение концентрации Са унифицированным колориметрическим методом.....	43
2.2.7	Определение кортизола иммуноферментным анализом.....	44
3	Результаты и их обсуждения	47
3.1	Результаты исследования	47
3.2	Обсуждение результатов	54
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	56
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	57

В современном мире самой высокоинформативной и общительной средой человеческого организма выступает кровь. Потому что кровь является тем самым связующим звеном между системами организма и его органами. Непосредственно данные о системе крови дают, безусловно, полное представление об изменениях и повреждениях в обменных процессах человеческого организма и состоянии иммунной системы [10].

На первый взгляд, понятие «стресс–реакция» может быть изучено как вариант достижения устойчивости организма человека при действии избыточных факторов и являться приспособлением, с будущей перестройкой защитных механизмов организма человека. Но в то же время, сам стресс может быть фактором, оказывающим повреждающее и губительное действие на системы органов, что в итоге приводит к развитию патологического состояния. Длительное стрессовое влияние на человека вызывают изменения массы органов-маркеров стресса, изменения уровня гормонов стресс–реакции и нарушения физического состояния человека [8].

Для того чтобы определить все метаболические нарушения и изменения в организме человека требуется детальный анализ клеточного ответа на действие наружных поражающих элементов. Нарушения при патологическом состоянии затрагивают разные клеточные структуры, среди которых клеточная мембрана – одна из первых принимает весь удар на себя. Современные методики, которые используются для оценки не только качества мембраны в целом, но и структурно-функционального статуса отдельных ее компонентов. Последние используются как маркеры системных метаболических изменений. Красные клетки крови служат лучшим примером и объектом для выполнения таких исследований [11].

Данный интерес к эритроцитам при различных болезнях и заболеваниях вызван тем, что они участвуют в процессах, которые непосредственно связанных с поддержанием постоянства целого организма. Именно они представляют собой то важное звено механизма иммунорегуляции при патологическом стрессе [3].

Стоит сказать, что красные клетки крови вовлекаются в патологический процесс не исключительно при заболеваниях крови, но и подвергаются тяжелым изменениям структуры и функции в болезнях различного происхождения, например, заболевания сердечнососудистой системы, расстройства психики, злокачественных новообразованиях и т.д. [4]. Клинический анализ крови, к сожалению, дает неполное представление о состоянии эритроцитов [5]. Поэтому, для того чтобы определить их возрастной состав можно использовать метод химических эритрограмм Терского-Гительсона. Результаты данного метода могут показать степень повреждения самих эритроцитов, а также дегенеративность патологических отклонений в организме человека.

За последнее время, число больных с диффузно-токсическим зобом и ишемической болезнью сердца растет с каждым годом не только в мире, но и у нас в России, в том числе, и в Красноярском крае.

Среди общего количества эндокринных заболеваний, на долю болезни щитовидной железы приходится 45% , причем с уверенной тенденцией к росту. Без всякого сомнения, причина этому - глобальное ухудшение экологической обстановки, быстрое старение человеческой популяции и, несомненно, улучшенная диагностика населения [6]. Диффузно-токсический зоб является самым распространённым заболеванием щитовидной железы. Им страдают около 2% населения, в основном люди в возрасте от 20-40 лет.

Ишемическая болезнь сердца продолжает оставаться главной проблемой здравоохранения 21 века. Процент смертности от данного заболевания растет с каждым годом. К несчастью, им начинают страдать люди молодого возраста [46]. В нашей стране самый высокий показатель смертности от заболеваний сердца зарегистрирован в 2003 г. [47]. Стоит отметить, что во всем мире не происходит снижения смертности от ишемической болезни сердца. Медицинские исследования, которые представляет ВОЗ, это подтверждают. Поэтому главной задачей медицины стоит определить актуальность

целенаправленного изучения патофизиологических аспектов и противостояние этой патологии [48].

Всеми известно, что именно гормоны стресса вносят свой вклад в повышенную активацию энергетического обмена в организме человека. Ведь именно они осуществляют разные механизмы для адаптации организма к экстремальным условиям существования. Имеется масса работ, в которых представленная функция гормонов полностью изучена. Но стоит отметить, что по сей день мы не отчетливо осознаем те многочисленные побочные эффекты действия этих гормонов. В то же время существуют литературные данные и исследования о том, что гормоны стресса влияют на структуру цитоплазматических мембран клеток периферической крови, в первую очередь красных клеток крови [28]. Именно при высоких концентрация гормон коры надпочечников - кортизол способствует значительному повышению выделения кальция как с мочой, так и через кишечник, так как при этом тормозится всасывание кальция в кишечной стенке и реабсорбция его в канальцах почек. Также он понижает уровень магния в организме, тормозит превращение остеокластов в остеобласты. В результате увеличивается количество остеокластов и как следствие - резорбция костной ткани и развитие остеопороза.

Целью данной работы стало изучить влияние кортизола сыворотки крови на кислотную резистентность эритроцитов, состояние иммунного и ионного гомеостаза при ишемической болезни сердца (ИБС) и диффузно-токсическом зобе (ДТЗ).

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать содержание кортизола в сыворотке крови у больных при ИБС и ДТЗ;
2. Оценить кислотную резистентность эритроцитов у больных с ИБС и ДТЗ;
3. Определить гематологические индексы у больных с ИБС и ДТЗ;
4. Оценить содержание ионов кальция и магния у больных с ИБС и ДТЗ;

5. Выявить корреляционные взаимодействия между кортизолом и исследуемыми показателями.

# 1 Обзор литературы

## 1.1 Понятие стресса

Стресс - это неспецифическая реакция организма, которая возникает под действием различных экстремальных факторов, угрожающих нарушению гомеостаза, и характеризуется стереотипными изменениями функции нервной и эндокринной систем. [7].

Изучив вопросы о роли стресса в поддержании здоровья и развитии различных патологий в эволюции человека, мы можем сделать следующие выводы: во-первых, стресс является общей биологической реакцией, характерной как для животного, так и для растительного мира, и сама жизнь невозможна без Стресс, а во-вторых, стресс может оказывать двойственное влияние на здоровье организма: чрезмерный - может стать патогенетической основой при различных дисфункциях и заболеваниях, а кратковременный щадящий - фактором мобилизации защитных сил организма и адаптации ее к внешним условиям среда [6].

В 1936 году Дж. Селье впервые ввел эту концепцию, что означало стресс как реакцию организма, а понятие «стрессор» было определено как активный стимул. Спустя некоторое время он сформулировал теорию стресса как общего адаптационного синдрома (ОАС), сопровождающуюся увеличением активности коры надпочечников, уменьшением тимолимфатического аппарата, точечными кровоизлияниями и кровотокающими язвами на слизистой мембрана желудка и кишечника. [5].

Стресс возник в процессе эволюции человека как физиологическая реакция мобилизации организма для защиты или нападения или адаптации к агрессивным или неблагоприятным факторам окружающей среды и сыграл значительную роль в его выживании. В процессе исторического развития человека стресс был в основном одним из движущих факторов эволюции, а в онтогенезе, особенно когда на организм воздействуют экстремальные факторы окружающей среды, стресс стал патогенетической основой расстройства



здоровья, которое основано на стандартном неспецифическом адаптивном ответе всего организма на сверхсильный стимул или угрозу.[3,7].

### **1.1.1 Общий адаптационный синдром**

Совокупность характерных стереотипных общих реакций организма на действие раздражителей самой разнообразной природы, реакций, имеющих прежде всего защитное значение, была обозначена Гансом Селье как «общий адаптационный синдром».

ОАГ развивается в основном при участии симпатoadреналовой системы и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Симпатoadреналовая система состоит из симпатической нервной системы и мозгового вещества надпочечников, которые выделяют адреналин и норадреналин в кровь. Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система включает гипоталамус, аденогипофиз и кору надпочечников. [16].

На сегодняшний день известно, что общий адаптационный синдром состоит из трех этапов.

Первый этап - это этап тревоги. Характеризуется мобилизацией защитных сил организма. На стадии беспокойства подстадия шока выделяется, когда происходит снижение адаптационной способности, и антишока - когда происходит увеличение адаптационной способности. Стадия тревоги наступает через несколько минут после воздействия стрессора и длится 6–48 часов. Он включает гормоны, такие как адреналин, вазопрессин, окситоцин, кортиколиберин, кортизол. Наблюдается резкое уменьшение количества секреторных гранул в коре и мозговом веществе надпочечников, эрозия желудочно-кишечного тракта и инволюция лимфатического аппарата тимуса. Следует также отметить выброс соматотропных гормонов, гормонов щитовидной железы, паратиреоидных гормонов и системы ренин - ангиотензин, активацию симпатoadреналовой системы, включение гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Основными факторами, вызывающими запуск стресс-реакции, в этих случаях будут: повышение

температуры в терморецепторах гипоталамуса и других органов; сигналы от интенсивно работающих мышц, повышение уровня CO<sub>2</sub> в крови; различные цитокины и липидные медиаторы воспаления; ангиотензин II и некоторые другие гормоны [16, 33].

Цитокины являются белково-пептидными факторами, продуцируемыми клетками, которые осуществляют кратковременную регуляцию межклеточных и межсистемных взаимодействий. Они играют важную роль в двунаправленной связи между иммунной, эндокринной и нервной системами. Их взаимодействие очень разнообразно. Это гарантирует, что возникновение угрозы клеточному, тканевому или системному гомеостазу надежно передается в гипоталамус.

Второй этап - это этап сопротивления. Он заключается в частичной адаптации, выявлено напряжение отдельных функциональных систем, особенно нейрогуморальных. Он включает кортизол, соматотропный гормон (гормон роста). Наблюдается гипертрофия надпочечников, количество гранул в коре надпочечников значительно превышает исходное, нарушение полового цикла, задержка роста, лактация. Катаболизм, атрофия, некроз преобладают. После устранения угрозы организм возвращается к исходному или сбалансированному уровню гормонов и нейротрансмиттеров. Время, необходимое для завершения вышеупомянутых процессов восстановления, зависит от состояния стресса ограничивающих систем, а также от силы и продолжительности стрессора. [39].

Третий этап - это этап адаптации или истощения. При истощении происходит общее снижение адаптационных гормонов, и повреждение накапливается. Секреция глюкокортикоидов начинает снижаться и, наконец, снижается. Постоянный приток адреналина и кортикостероидов в кровь приводит к уменьшению количества гранул в коре надпочечников, что приводит к истощению коры, а затем и мозгового вещества надпочечников. Состояние организма либо стабилизируется, и происходит устойчивая адаптация, либо в результате истощения ресурсов организма происходит нарушение адаптации. Конечный результат зависит от характера, силы,

продолжительности действия стрессоров, индивидуальных возможностей и функциональных резервов организма. [25].

Сочетание этих явлений приводит к повреждению и стойкому нарушению функций органов, в том числе ответственных за интегративные процессы регуляции: органов центральной нервной системы и желез внутренней секреции. Организм перестает быть целостным структурно-функциональным комплексом, его внутренние метаболические процессы нарушаются, что неизбежно влияет на функциональные механизмы адаптации и снижает его эффективность. [43].

### **1.1.2 Развитие общего адаптационного синдрома**

Любой внешний стимул, вызывающий стрессовую реакцию, сначала должен быть воспринят сенсорными рецепторами нервной системы. Восприняв это раздражение, сенсорные рецепторы посылают по сенсорным путям периферической нервной системы импульсы к мозгу. В центральной нервной системе от главных путей, восходящих к неокортексу, ответвляются нервные коллатерали, которые направляются в ретикулярную формацию. Посредством этих коллатералей воспринимаемые события окружающей среды могут быть интегрированы с эмоциональными состояниями, кодируемыми в гипоталамусе и лимбической системе. Эти коллатерали отвечают за «эмоциональные реакции» внутренних органов, которые человек иногда испытывает в ответ не только на психосоциальные стимулы, но и на телесные повреждения, вызывающие боль [33, 35].

Интерпретация сигналов, осуществляемая в неокортексе, затем переходит по каналам обратной связи в лимбическую систему. Если кортикально-лимбическая интерпретация стрессора приводит к восприятию его как угрозы, вызова или крайне чего-то неприятного, тогда вероятнее всего за этим последует эмоциональное возбуждение [45].

Для стресса характерна активация как симпатического, так и парасимпатического отдела вегетативной нервной системы. Участие

вегетативной нервной системы в стресс–реакции может быть представлено в виде следующей цепочки: рецепторы нервной системы – проводники – неокортекс и лимбическая интеграция – гипоталамус. Принято считать, что симпатическая иннервация является результатом возбуждения задней доли гипоталамуса, а парасимпатическая – передней доли гипоталамуса. Далее от ядер гипоталамуса сигналы передаются на гипофиз, который продуцирует тропные гормоны, а именно, соматотропный гормон, отвечающий за регуляцию роста всего организма, тиреотропный гормон (ТТГ), отвечающий за стимуляцию секреции гормонов щитовидной железы, адренокортикотропный гормон (АКТГ), стимулирующий секрецию кортизола корой надпочечников и гонадотропный гормон, который в свою очередь действует на половые железы [32]. На рисунке 1 представлена гипоталамо–гипофизарная система, где видно, каким образом стресс–стимулы воздействуют на организм.

В свете вышеописанного, можно выделить три основных механизма развития стрессовой реакции: адренокортикальный, соматотропный и тиреоидный.

Высшим центром адренокортикального механизма является септально–гипоталамический комплекс. Из его центра по моноаминергическим волокнам нервные импульсы идут вниз к срединному возвышению гипоталамуса [34]. Нервно–секреторные клетки срединного возвышения под влиянием моноаминергических медиаторов выделяют кортикотропин–релизинг фактор (КРФ) в гипоталамо–гипофизарную воротную систему. КРФ проходит через область воронки к клеткам передней доли гипофиза. Хромофобные клетки аденогипофиза чувствительны к КРФ и реагируют на него выделением в кровотоки АКТГ, который в конечном счете, стимулирует секрецию глюкокортикоидов пучковой зоны коры надпочечников [37].

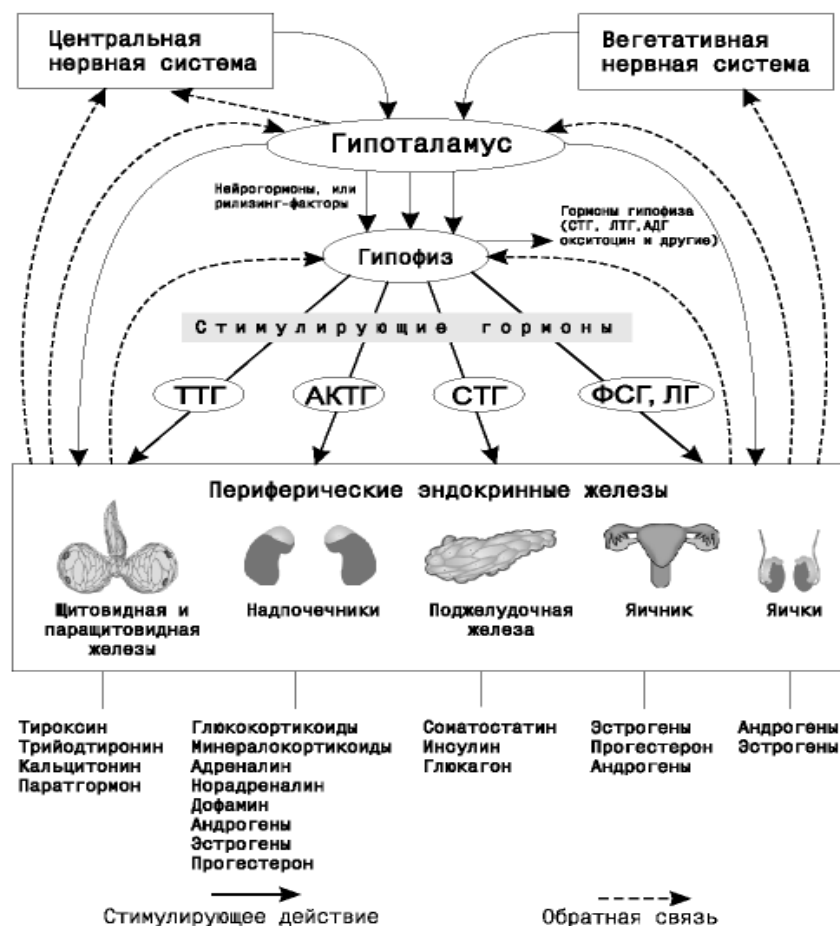


Рисунок 1 – Гипоталамо-гипофизарная система

Принципиальный механизм выделения соматотропного гормона аденгипофизом мало отличается от механизма выделения АКТГ. Разница состоит лишь в том, что клетки гипофиза, продуцирующие СТГ, стимулируются соматотропин-релизинг фактором. СТГ усиливает секрецию минералокортикоидов клубочковой зоны коры надпочечников, повышает резистентность организма к инсулину, а также ускоряет мобилизацию накопленных в организме жиров. Результатом этого является возрастание концентрации свободных жирных кислот и глюкозы в крови [2].

Выброс тиреотропного гормона передней долей гипофиза стимулируется тиреотропин–релизинг фактором. Тиреоидная активность особенно увеличивается при действии на организм человека низких температур и под влиянием эмоциональных стимулов. Тиреоидные гормоны повышают общий

уровень метаболизма, частоту и силу сердечных сокращений, увеличивает систолическое и пульсовое давление, а также повышают чувствительность некоторых тканей к катехоламинам [13].

Оценка гормонального статуса во время стресса приводит к мысли о том, что одновременная активация гормонов с явно катаболическим эффектом: АКТГ, ТТГ, глюкокортикоидов, глюкагона, тиреоидных гормонов, способствует мобилизации необходимых энергетических ресурсов. Одновременно снижается содержание гормонов с анаболическим эффектом – инсулина и половых гормонов. [18].

## **1.2 Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система**

Гипоталамо-гипофизарная система – морфофункциональное объединение структур гипоталамуса и гипофиза. На примере данной системы наиболее четко прослеживается тесная связь между нервной и гуморальной регуляцией. Главными факторами гуморальной регуляции являются гормоны [20].

Гормоны – биологически высокоактивные вещества, синтезирующиеся и выделяющиеся во внутреннюю среду организма эндокринными железами и оказывающие регулирующее влияние на функции удаленных от места их секреции органов и систем организмов [22].

Эндокринная железа – анатомическое образование, основной функцией которого является внутренняя секреция гормонов. К эндокринным железам относятся гипофиз, эпифиз, щитовидная железа, надпочечники и др.[25].

### **1.2.1 Гипоталамус**

Гипоталамус организует регуляцию и интеграцию обменных, трофических, эндокринных и других функций организма. В нем продуцируются гипофизотропные гормоны, которые регулируют секрецию гормонов гипофиза. Среди гормонов гипоталамуса можно выделить: либерины, активирующие секрецию гормонов гипофиза, и статины, которые действуют противоположно. К либеринам относят: кортиколиберин, соматолиберин, тиролиберин,

гонадолиберин, пролактолиберин. К статидам в свою очередь можно отнести: соматостатин, меланостатин [26].

### 1.2.2. Гипофиз

Гипофиз – основная железа внутренней секреции, продуцирующая ряд тропных гормонов, оказывающих непосредственное влияние на функцию периферических эндокринных желез. Он расположен в гипофизарной ямке турецкого седла клиновидной кости и через ножку связан с мозгом. Масса его составляет 0,5–0,6 г., которая варьирует в зависимости от возраста и пола. Гипофиз состоит из передней, средней и задней долей [25].

Передняя доля представляет собой скопление клеток, секретирующих гормоны. В эмбриогенезе передняя доля гипофиза образуется из выроста крыши первичной ротовой полости, называемого карманом Ратке. Состоит из дистальной, бугорной и промежуточной частей. Передняя доля гипофиза имеет характер железистого эпителия. Аденогипофиз не связан нервными путями с центральной нервной системой (ЦНС), и его функциональная активность полностью регулируется нейrogормонами. Он состоит из клеток трех типов: ацидофильные, базофильные и нейтрофильные клетки. Передняя и задняя доли гипофиза разделены тонким слоем клеток, образующих промежуточную долю, которая иннервируется нервами, идущими из гипоталамуса. Промежуточная доля имеет большое значение у низших позвоночных и значительно меньшее у млекопитающих. Передняя и средняя – образуют аденогипофиз, который составляет 75% массы гипофиза [19, 21].

В гипоталамусе имеются две группы очень крупных клеток, образующих супраоптическое и паравентрикулярное ядра. Аксоны образующих эти ядра нейронов проходят по ножке гипофиза в турецкое седло и образуют здесь заднюю долю гипофиза. В ней происходит накопление окситоцина (ОКС) и вазопрессина (антидиуретического гормона, АДГ), которые синтезируются нейросекреторными клетками супраоптического и паравентрикулярного ядер гипоталамуса. Эти гормоны по нервным волокнам гипоталамо–гипофизарного

тракта транспортируются в заднюю долю гипофиза, депонируют и выделяются в кровь. Задняя доля, воронкоподобная доля и срединная возвышенность серого бугра составляет нейрогофиз [19, 23].

В аденогипофизе секретируются АКТГ, ТТГ, гонадотропин (ГТГ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ), соматотропин и пролактин. В нейрогофизе накапливается вазопрессин и окситоцин, продуцирующиеся в гипоталамусе [27].

### **1.2.3 Надпочечники**

Надпочечник – парная железа внутренней секреции, расположенная в забрюшинном пространстве над верхним полюсом почки, имеет богатое кровоснабжение [50]. Надпочечники состоят из двух морфофункционально самостоятельных эндокринных желез – мозгового и коркового веществ, имеющих различное эмбриональное происхождение. Корковое вещество дифференцируется из интерреналовой ткани, которая представляет собой часть мезодермы, расположенной между двумя первичными почками. Мозговое вещество имеет общее происхождение с нервной системой, развиваясь из симпатобластов, которые, выселяясь из симпатического ствола, внедряются в интерреналовое тело [25]. Гистологически в коре надпочечника, на долю которой приходится 80–90% ткани всего органа, выделяют три зоны. Непосредственно под капсулой располагается клубочковая зона, которая секретирует минералокортикоиды и не зависит от влияния АКТГ. К ней прилежит пучковая зона, основными продуктами которой являются глюкокортикоидные гормоны. Самая внутренняя зона – сетчатая, которая в основном секретирует андрогены. Пучковая и сетчатая зоны зависят от концентрации адренкортикотропного гормона, выделение которого регулируется кортикотропин–рилизинг–гормоном по принципу отрицательной обратной связи [9].

Основная функция минералокортикоидов – регулирование водно-солевого обмена в организме. Секреция альдостерона клубочковой зоны коры



надпочечников регулируется системой ренин–ангиотензин–альдостерон, автономно от эффектов АКТГ аденогипофиза. АКТГ влияет только на начальные стадии биосинтеза минералокортикоидов. Глюкокортикоиды, в первую очередь кортизол, играют важную роль в метаболизме глюкозы, белковом и липидном обмене, а также в адаптации к стрессу. Половые гормоны идентичны гормонам, синтезируемые гонадами [27].

Кроме того, известно, что надпочечники играют важную роль в адаптации организма ко многим видам «стрессов», таких, как травма, тяжелые инфекционные заболевания, интоксикации [33].

### **1.2.3.1 Кортизол**

Кортизол –основной глюкокортикоидный гормон стероидной природы, синтезируемый надпочечниками. На его долю приходится 80% всех глюкокортикоидов. Остальные 20% – кортизон, кортикостерон, 11-дезоксикортизол и 11–дезоксикортикостерон [2].

Секреция кортизола, находится под влиянием гипоталамо–гипофизарно–надпочечниковой системы, которая начинается от гипоталамуса кортикотропин-рилизинг-гормоном. Его выделение усиливается при действии на организм стрессорных стимулов различной природа, что является пусковым моментом для развития адаптационного синдрома. Кортиколиберин стимулирует высвобождение адренокортикотропного гормона из передней доли гипофиза. АКТГ, в свою очередь, действует на кору надпочечников, стимулируя синтез и высвобождение кортизола. Кортизол по принципу отрицательной обратной связи подавляет секрецию АКТГ и КРФ [18].

Работа гипоталамо–гипофизарно–надпочечниковой системы подвержена суточным колебаниям. Суточная динамика плазменной концентрации кортизола определяется циркадным ритмом секреции АКТГ. Концентрация АКТГ максимальна в 8 утра. После 8 утра происходит постепенное дневное снижение секреции АКТГ и кортизола соответственно.

Плазменный уровень кортизола в 8:00 составляет 100–500 нмоль/л, в 20:00 – 55–250 нмоль/л [22].

Холестерин является предшественником всех стероидных гормонов, выделяемых надпочечниками. Источником холестерина выступают липопротеины низкой плотности (ЛПНП), которые поглощаются рецепторами ЛПНП, расположенными на тканях надпочечников. Также холестерин может быть синтезирован *de novo* в коре из ацетил-КоА [26].

Большая часть холестерина подвергается этерификации и накапливается в цитоплазме в виде эфиров. При синтезе гормонов происходит активация фермента холестерол эстеразы, и образующийся свободный холестерол транспортируется в митохондрии, где превращается в прегненолон. Прегненолон транспортируется в эндоплазматический ретикулум, и там через ряд промежуточных метаболитов превращается в стероидные гормоны [32].

Более 90% глюкокортикоидов циркулирует в крови, взаимодействуя с такими белками как альбумини транскортин. Около 4% кортизола плазмы является свободной фракцией. Время циркуляции определяется прочностью связывания транскортином, например, время полужизни кортизола составляет до 2 ч [1].

Конъюгирование липофильного кортизола для дальнейшей экскреции осуществляется преимущественно в печени, где формируются конъюгаты с глюкуронидом и сульфатом. Модифицированные глюкокортикоиды – водорастворимые соединения, способные к экскреции.

Конъюгированные формы глюкокортикоидов выделяются с желчью в желудочно–кишечный тракт (ЖКТ), 20% из них теряется с калом, 80% всасывается в кишечнике. Из крови 70% глюкокортикоидов экскретируется с мочой [16].

Кортизол, как и другие стероидные гормоны, оказывает свое воздействие взаимодействуя с внутриклеточными рецепторами в клетках–мишенях. Поскольку кортизол липофильное соединение, он может легко проникать через

клеточную мембрану. Оказавшись внутри клетки, кортизол связывается с цитоплазматическим рецептором, образуя лиганд–рецепторный комплекс, что обеспечивает транспорт молекулы гормона в ядро, там кортизол связывается с ядерным рецептором, активируя регуляторные последовательности ДНК, и индуцирует или подавляет транскрипцию генов [3].

Глюкокортикоиды увеличивают или уменьшают транскрипции многих генов, изменяя синтез мРНК белков, которые опосредуют их многочисленные физиологические эффекты. Большинство метаболических эффектов кортизола требуют от 45 до 60 минут для синтеза белков, и до нескольких часов или дней, чтобы полностью развить клеточный ответ. Также глюкокортикоиды могут иметь некоторые быстрые негеномные воздействия на клеточные мембраны ионного транспорта, что может способствовать развитию их терапевтических эффектов [26].

#### **1.2.4 Последствия активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы**

В стрессорной реакции принимают участие нервные, нейроэндокринные и эндокринные факторы, среди которых важнейшую роль играют симпатико-адреналовая и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая системы.

В ответ на стрессор повышаются артериальное давление, частота сердцебиений и сердечный выброс, увеличивается поступление крови в мышцы за счет вазоконстрикции в мезентерии и почках и вазодилатации в мышцах [14].

Кортизол является важным элементом в развитии стресс–реакции и противостоит воспалению. Почти любой тип стресса, как физический, так и эмоциональный, вызывает немедленное и заметное увеличение секреции КРФ, который стимулирует выработку АКТГ аденогипофизом, затем значительно увеличивается секреция кортизола надпочечниками [29].

Выделившийся в кровь кортизол достигает клеток-мишеней (лимфоидная, эпителиальная (слизистые оболочки и кожа), жировая, костная и мышечная ткани, печень). Благодаря своей липофильной природе легко

проникает через клеточную мембрану в цитоплазму и ядро, где связывается со специфическими рецепторами и активирует транскрипцию определённых участков ДНК [39].

Основной метаболический эффект кортизола и других глюкокортикоидов – это способность стимулировать глюконеогенез из кетокилот [16]. Данный эффект осуществляется двумя различными путями. В первом случае кортизол увеличивает количество ферментов, необходимых для преобразования аминокислот в глюкозу в клетках печени. Это осуществляется путем активации транскрипции ДНК в ядрах клеток печени, с образованием матричных РНК [42]. Во втором случае кортизол вызывает мобилизацию аминокислот, главным образом, из мышц. Вследствие чего аминокислоты становятся доступными для глюконеогенеза в печени, и тем самым способствует образованию глюкозы.

Гормон стресса увеличивает синтез гликогена в печени за счет активации фосфатаз и дефосфорилирования гликогенсинтазы. Кортизол также тормозит потребление глюкозы периферическими тканями.

Не менее важным эффектом кортизола на метаболические системы организма является снижение уровня белков практически во всех клетках организма, за исключением печени. Это вызвано уменьшением синтеза белков и увеличением их катаболизма в клетках. Оба этих эффекта могут быть вызваны из-за снижения транспорта аминокислот во внепеченочные ткани, либо угнетением образования РНК и последующего синтеза белка во многих внепеченочных тканях, особенно в мышечной и лимфоидной ткани [25, 27].

В присутствии высокой концентрации кортизола происходит стимуляция липолиза в жировой ткани благодаря увеличению синтеза ТАГ-липазы, что усиливает эффект СТГ, глюкагона и катехоламинов. Кортизол также имеет прямое воздействие на усиление окисления жирных кислот в клетках.

Повышенная мобилизация жиров, в сочетании с увеличением окислением жирных кислот в клетках, помогает сдвигать метаболические процессы в клетках от утилизации глюкозы для обеспечения энергии к утилизации жирных кислот. Тем не менее, повышенное использование жирных кислот для

образования энергии является важным фактором для долгосрочного сохранения глюкозы и гликогена [32].

Противовоспалительный и иммунодепрессивный эффекты кортизола заключается в: увеличении перемещения лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов и базофилов в лимфоидную ткань; повышении уровня лейкоцитов в крови за счет их выброса из костного мозга и тканей; подавлении функций лейкоцитов и тканевых макрофагов через снижение синтеза эйкозаноидов посредством нарушения транскрипции ферментов фосфолипазы  $A_2$  и циклооксигеназы [1].

Гормон коры надпочечников - кортизол способствует значительному повышению выделения кальция как с мочой, так и через кишечник, так как при этом тормозится всасывание кальция в кишечной стенке и реабсорбция его в канальцах почек. Также он понижает уровень магния в организме, тормозит превращение остеокластов в остеобласты. В результате увеличивается количество остеокластов и как следствие - резорбция костной ткани и развитие остеопороза.

Вследствие повышенных концентраций данного гормона можно наблюдать:

- снижение толерантности к глюкозе – аномальная гипергликемия после сахарной нагрузки или после еды;
- гипергликемия из-за активации глюконеогенеза;
- увеличение объема лица и туловища;
- глюкозурия;
- повышение катаболизма белков и повышение азота крови;
- остеопороз и усиление потерь кальция, магния и фосфатов;
- снижение роста и деления клеток – лейкопения, иммунодефициты, истончение кожи, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки;
- нарушение синтеза коллагена и гликозамингликанов;
- гипертония благодаря активации ренин-ангиотензиновой системы.

### 1.3 Диффузно-токсический зоб

В настоящее время диффузно-токсический зоб рассматривается как органоспецифическое аутоиммунное генетически обусловленное заболевание, которое характеризуется появлением аутоантител к рецепторам плазматических мембран тиреоцитов, близким к рецепторам тиреотропина. Эти аутоантитела получили название тиреостимулирующих иммуноглобулинов [19].

Заболевание провоцируют острые и хронические инфекции, заболевания гипоталамо-гипофизарной системы, черепно-мозговая травма с последующим развитием энцефалита, поражение периферических нервов, перегревание организма (избыточная инсоляция и т. д.), беременность, прием больших доз йода. При тяжелой форме диффузного токсического зоба может быть угнетена функция костного мозга. В связи с этим развиваются анемия и лейкопения (уменьшение количества красных и белых кровяных телец) [38].

Тиреотоксикоз сопровождается увеличением объема циркулирующей крови и эритроцитарной массы. Причиной увеличения эритроцитарной массы служит изменение уровня сывороточного эритропоэтина, т.к. изменяется сывороточный уровень тироксина, что приводит к увеличению массы эритроцитов. Одновременно обнаруживают уменьшение содержания калия и рост натрия в эритроцитах, гипомагниемия, гиперкальциемия, гиперфосфатемия [28].

Наиболее часто встречается (более 80% больных) аутоиммунный тиреотоксикоз, который характеризуется избыточной секрецией тиреоидных гормонов, а также диффузным увеличением щитовидной железы [20,25].

Ключевая роль в развитии данного заболевания отводится нарушению во взаимодействии различных составляющих иммунной системы, что приводит к лимфоцитарной инфильтрации щитовидной железы [21]. Инфильтрация лимфоцитами стимулируется пролиферацией тиреоцитов щитовидной железы через адгезию внутриклеточных адгезивных молекул-1, а также лимфатического функционального антигена-1. Это является главным фактором, приводящим к увеличению объема железы и развитию зоба при ДТЗ [16].

Гиперплазия щитовидной железы и повышенная продукция ее гормонов, связаны аутоиммунными механизмами при ДТЗ, но в патогенезе остаются не совсем изучено взаимодействие различных звеньев иммунной системы с тиреоидными антигенами, что приводит к различной степени увеличения щитовидной железы, сочетанию с офтальмопатией или претибиальной микседемой [44].

### **1.3.1 Состояние системы крови при ДТЗ**

Тиреотоксикоз сопровождается увеличением объема циркулирующей крови и эритроцитарной массы. Причиной увеличения эритроцитарной массы служит изменение уровня сывороточного эритропоэтина, т.к. изменяется сывороточный уровень тироксина, что приводит в конечном итоге к увеличению количества эритроцитов. Одновременно обнаруживают уменьшение содержания калия и рост натрия в эритроцитах, гипомagneмия, гиперкальциемия, гиперфосфатемия.

При диффузном токсическом зобе наблюдается выраженная гиперлипидемия: общий холестерин и триглицериды в сыворотке крови превышают показатели средних значений нормы.

Одним из последствий нарушения функции ЩЖ является повышение концентрации липидов сыворотки крови. Происходит нарушение нормальных взаимоотношений компонентов жирового обмена и транспортных форм липидов. Высокая концентрация ХС, ТГ, ЛПНП и ЛПОНП позволяет судить о перераспределении компонентов липидного спектра, смена их структуры, развитие дислипидемии [12].

## **1.4 Ишемическая болезнь сердца**

Ишемическая болезнь сердца – несоответствие доставки кислорода коронарным кровотоком уровню его потребления миокардом, чаще всего является следствием коронарной болезни сердца, которая имеет периоды стабильного течения и обострения [32].

Ишемия – это недостаток кровоснабжения. Когда доставка кислорода по коронарным артериям не удовлетворяет потребности миокарда, возникает ишемия миокарда [33]. Вследствие этого ишемия может возникнуть или увеличение потребности миокарда к кислороду (на фоне снижения способности коронарных артерий к увеличению коронарного кровотока – уменьшение коронарного резерва), или же первичное снижение коронарного кровотока [38].

В настоящее время используется следующая классификация ИБС:

- Внезапная сердечная смерть (первичная остановка сердца).

Стенокардия.

- Стабильная стенокардия напряжения;
- Нестабильная стенокардия: (впервые возникшая стенокардия напряжения; прогрессирующая стенокардия напряжения; спонтанная стенокардия);
- Инфаркт миокарда: (крупноочаговый (трансмуральный); мелкоочаговый (нетрансмуральный));
- Постинфарктный кардиосклероз [34].

Повышение уровня стресса связано с ишемической болезнью сердца через активацию стрессовых механизмов при воздействии: учащение ритма сердца, повышение артериального давления, задержка жидкости в организме [35]. Под воздействием факторов стресса происходит нарушение баланса между парасимпатической и симпатической активностью в сторону активации симпатической части вегетативной нервной системы. Симпатико-адреналовая гиперактивность с постоянно повышенными уровнями кортизола норадреналина активирует каскад периферических патофизиологических эффектов, например, повышенную предрасположенность к воспалению [29, 30], гиперкоагуляции [31], снижению выработки омега-3 жирных кислот и фолиевой кислоты [30], инсулинорезистентности, метаболическому синдрому, центральному ожирению, СД и артериальной гипертонии [33].

Стандартный эффект при хроническом стрессе, состоит в стабильном повышении ЧСС покоя, а также нарушенной и избыточной физиологической



реактивности. Она характеризуется повышенной реактивностью ЧСС и артериального давления в ответ на воздействие внешних стимулов. Такая повышенная реактивность приводит к ускоренному развитию ИБС [34]. Здесь же рассматривается еще негативное одно патофизиологическое звено – снижение вариабельности сердечного ритма, которая отражает сниженный парасимпатический тонус. Сниженная вариабельность сердечного ритма ведет к дисбалансу симпатической стимуляции сердца, что располагает к развитию желудочковых аритмий, повышенной адгезивности тромбоцитов и, следовательно, повышает риск развития сердечно-сосудистых катастроф [35].

Еще одно важное звено – свертывающая система крови. Доказано, что у больных, находящихся под влиянием стресса, вне зависимости от наличия ИБС, имеются значительные физиологические дефекты тромбоцитов, например, высокий уровень внутриклеточного свободного кальция, гиперчувствительность серотониновых (5-НТ) и катехоламиновых рецепторов, гиперпродукция фактора 4 и  $\beta$ -тромбоглобулина [36]. Эти изменения приводят к повышенной вазоконстрикции и более активной агрегации тромбоцитов. Для пациентов, находящихся в состоянии стресса характерен высокий уровень катехоламинов в крови. Это повышает риск активации процессов агрегации тромбоцитов и дальнейшего тромбообразования, тесно связанных с развитием острых коронарных синдромов [37,38]. У пациентов, подверженных стрессовым воздействием и повышенным уровнем кортизола снижается концентрация гормона роста и половых гормонов, отмечается большая частота деминерализации костей и остеопороза.

#### **1.4.1 Эритроциты крови при ИБС**

В патогенезе острых форм ишемической болезни сердца имеют значение нарушения реологических свойств крови как одного из возможных механизмов, участвующих в генезе и динамике заболевания. Повышенная вязкость крови как один из факторов риска способствует прогрессированию атеросклероза, механически воздействуя на сосудистый эндотелий и атеросклеротическую

бляшку, затрудняя кровоток в местах бифуркаций и области стенозов [39]. Важнейшими детерминантами вязкости крови являются мембранная и внутренняя вязкость эритроцитов. Усиление агрегационных свойств эритроцитов и изменение их деформируемости приводит к так называемому синдрому гипервязкости, при котором снижается скорость, способствует вытеснению тромбоцитов в зону высоких скоростей сдвига и ведет к их разрушению и активации свертывающей системы крови [30].

Изменения реологических свойств эритроцитов обнаружены при различных клинических формах ИБС [26,27]. Наибольшая степень снижения деформации эритроцитов и повышение их агрегации наблюдается у больных при инфаркте миокарда с зубцом Q. У больных с нестабильной стенокардией изменения реологии эритроцитов носят принципиально тот же характер, хотя степень снижения деформации менее выражена [28]. При стабильной стенокардии напряжения также снижена деформация и повышена агрегация.

Возможно, ухудшение реологических параметров при ИБС может быть следствием повышенной абсорбции либо содержания ХС в липидном биоматриксе мембран, поскольку имеется достоверная связь между уровнем общего холестерина и скоростью агрегации у больных с ИБС [29].

Также известно, что при ИБС понижается активность супероксиддесмутаза. Низкие показатели активности данного фермента следует рассматривать как неблагоприятный прогностический признак, указывающий на снижение резистентности эритроцита. Это приводит к усилению процессов перекисного окисления липидов, который в эритроцитах индуцирует гидролиз фосфолипидов, образующиеся при этом высокополярные соединения (лизосомолипиды, свободные жирные кислоты) вызывают трансформацию дискоцитов в эхиноциты и стоматоциты. Эти же процессы сопровождаются усилением образования микровезикул – фрагментов цитоплазматической мембраны [30].

Углеводные компоненты мембраны также претерпевают изменения, так гликопротеиды в норме у которых углеводная цепочка оканчивается остатком

сиаловой кислоты, при ишемической болезни сердца оканчивается остатком галактозы. Известно, что в физиологических условиях, гликопротеиды с «сиаловыми хвостами» должны разрушаться в лизосомах специализированных клеток плазмалеммы печени, имеющих рецепторы для «узнавания и захвата» нормальных гликопротеидов. Вероятно, наличие аномальных гликопротеидов способствует повреждению гликокаликса эритроцита [31].

## 1.5 Эритроциты

Эритроциты являются безъядерными форменными клетками крови, которые участвуют в процессе поддержания гомеостаза и содержат гемоглобин. Эритроцит человека представляет собой двояковогнутый диск диаметром 7-8 мкм и толщиной 1,5-2,5 мкм, объем эритроцита 90 мкм<sup>3</sup> (размеры важны для диагностики). Поддержание дисковидной формы обусловлено отрицательным осмотическим давлением внутри клетки, состоянием мембраны, стромы эритроцита и работой Na<sup>+</sup>-насоса [3].

Такая форма эритроцита не случайна, она связана с транспортом O<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub>. Преимущество такой формы связано. Во-первых, с тем, что при такой форме эритроцита все молекулы Hb, участвующие в транспорте газов, максимально приближены к поверхности клетки и практически все обеспечивают газообмен. Во-вторых, возрастает относительная поверхность клетки на 20-30%, а чем больше поверхность, тем лучше газообмен. В третьих, при такой форме эритроцит приобретает своеобразную пластичность, он может легко менять форму и проходить по капиллярам, имеющим меньший диаметр, чем у самого эритроцита [4].

Эритроцит – универсальная модель для изучения процессов, происходящих в клеточной мембране под действием самых различных агентов. Детальное исследование изменений свойств эритроцитов под влиянием различных химических раздражителей, с которыми живой организм сталкивается в процессе естественных взаимоотношений с природой, позволяет

полнее установить возможные последствия и определить наиболее эффективные пути их коррекции при различной патологии. Занимая значительную долю (до 10%) от общего клеточного объема организма и обеспечивая газообмен, красные кровяные клетки выполняют еще ряд важных функций: контролируют кислотно-щелочное равновесие, распределение электролитов и воды между кровью и тканями, осуществляют сорбцию и транспорт разнообразных неорганических и органических молекул, в том числе азотсодержащих. Поэтому их функциональное состояние, резистентность к внешним воздействиям и тем более вопросы, связанные с гибелью эритроцитов, имеют ключевое значение для организма в целом [12].

В кровотоке эритроциты живут от 60 до 120 суток. Продолжительность жизни у мужчин на 10-20 дней больше, чем у женщин [5]. Старые эритроциты попадают в селезенку, где и разрушаются. При различных заболеваниях количество эритроцитов может уменьшаться или увеличиваться [3].

### **1.5.1 Мембрана эритроцитов**

Состояние биомембран эритроцитов является одним из важных факторов регуляции гомеостаза и обеспечения биохимических и физиологических процессов в организме. Изменение в их структуре и функциях рассматривается в настоящее время как одно из основных универсальных звеньев в патогенезе различных заболеваний [12].

Как было сказано ранее, в качестве клеточной модели для исследований на мембранном уровне используются эритроциты, мембранная организация которых аналогична мембранам других клеток. Отсутствие в эритроцитах межклеточных сочленений, других тканевых структур и внутриклеточных образований облегчает трактовку полученных результатов, так как их легко связать с изменениями свойств мембран [13].

В исследованиях последних десятилетий было установлена большая зависимость между изменениями свойств мембран форменных элементов крови

(эритроцитов) и характеристиками гомеостаза клеток внутренних органов. Такое заключение дает сделать вывод о том, что этот механизм имеет универсальное значение. То есть, данные об изменении проницаемости мембран эритроцитов могут с определенной точностью рассматриваться как показатель общей клеточной проницаемости и состояния организма в целом [14].

### **1.5.2 Резистентность эритроцитов**

Многочисленные исследования показали, что прогрессирование системных нарушений на уровне организма сопровождается выраженными изменениями морфофункционального статуса красных кровяных клеток. Их значимая морфологическая перестройка приводит к изменениям деформационных характеристик, мембранной проницаемости, осмотической и кислотной резистентности, повышению агрегационной способности и, в конечном счете, к разрушению [15].

Важная функция эритроцитарных мембран – создание барьера для прохождения веществ и осуществления избирательного их транспорта. Высокие барьерные свойства определяются липидным бислоем мембран. Основным показателем стойкости эритроцитарных мембран – резистентность, устойчивость к действию различных факторов. При экстремальных воздействиях ее характеристики изменяются [7].

Непрерывность липидного бислоя мембраны в процессе жизненного цикла клетки может нарушаться с образованием структурных дефектов типа сквозных гидрофильных пор. Примером дестабилизации биологических мембран выступает гемолиз эритроцитов, при котором мембрана растягивается и в ней появляются гидрофильные поры, но поры быстро захлопываются. При определенном пороговом уровне натяжения мембраны гидрофильные поры обеспечивают выход гемоглобина и низкомолекулярных веществ. Превращение поры в гидрофильную обусловлено переориентацией липидных молекул. Выход веществ сопровождается снижением разности осмотического давления,

при этом натяжение мембраны уменьшается, и поры залечиваются. Однако, если размер поры выше критического значения, происходит нарушение мембраны [16].

Для оценки резистентности эритроцитов актуальны исследования кислотной устойчивости. Резистентность характеризует структурно-функциональное состояние эритроцитарных мембран, ее определение имеет важное диагностическое значение и связано с решением одной из важнейших задач физиологии и патологии системы крови – изучение качественного состава функционирующих эритроцитов [17].

Кислотный (химический) тип гемолиза включает ряд последовательно протекающих стадий: предгемолитическая, стадия гемоглинолиза, строматопороза, строматолиза. Главный критерий предгемолитической стадии – выход ионов калия в окружающую среду и сферуляция эритроцитов. Гемоглинолиз протекает в зависимости от свойств гемолитика. Например, при химическом гемоглинолизе происходит нарушение физико-химических свойств связанного гемоглобина вследствие распада гемолипостроматинного комплекса, в котором липиды образуют комплекс с гемоглином и строматином. На стадии строматопороза под влиянием, например, концентрированного сапонина происходит нарушение морфологической целостности эритроцита. Строматолиз (полная деградация клеточных структур) наступает при действии холево-, дезоксихолево-, олеиновокислого натрия [19].

Гемолитическое влияние сильных кислот и оснований обусловлено высокорекреционным действием ионов  $H^+$  и  $OH^-$ , вызывающих повреждение мембраны, которое приводит к повышению внутриклеточного осмотического давления. В результате эритроцит сферулирует, а при достижении критического объема – гемолизует [18].

## 1.6 Лейкоцитарная формула

Лейкоцитарная формула представляет собой процентное соотношение разных видов лейкоцитов, которое определяется методом подсчета их в мазке крови. Лейкограмма дает возможность выявлять и характеризовать многие патологические процессы в организме. Лейкограмма подсчитывается как в процентном соотношении, так и в абсолютных числах. Объектами наблюдения при данном подсчете являются: нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, моноциты и лимфоциты.

Исследование нейтрофилов при данном анализе имеет важное диагностическое значение, так как можно судить о наличии или скорости развития патологического процесса.

При сдвиге лейкоцитарной формулы влево наблюдается увеличение палочкоядерных (незрелых) нейтрофилов. Данный сдвиг может указывать на воспалительные и некротические процессы, инфекционные заболевания и отравления.

Сдвиг лейкограммы вправо говорит о преобладании сегментоядерных (зрелых) нейтрофилов над (незрелыми) палочкоядерными. Данный сдвиг может свидетельствовать о лучевой болезни, недостатке витамина В12, болезнях печени и почек.

Увеличение числа нейтрофилов может быть признаком многих патологий. Его можно наблюдать при возникновении различных инфекционных заболеваниях, раковых опухолей, ревматизме, гипергликемии при сахарном диабете и т.д. После тяжелых эмоциональных, физических и болевых нагрузок также увеличивается количество нейтрофилов.

Нормальными считаются следующие значения: сегментоядерные нейтрофилы 47-72%, палочкоядерные нейтрофилы 1- 6%, лимфоциты 19-37%, моноциты 3-11%, эозинофилы 0,5-5%, базофилы 0-1%.

### 1.6.1 Гематологические (лейкоцитарные) индексы

Известны различные интегральные гематологические показатели, характеризующие состояние иммунного гомеостаза организма: индекс соотношения лимфоцитов и эозинофилов (ИСЛЭ) — отражает соотношение процессов гиперчувствительности немедленного и замедленного типа; индекс соотношения нейтрофилов и моноцитов (ИСНМ) - показывает соотношение компонентов макрофагальной системы; индекс соотношения лимфоцитов и моноцитов (ИСЛМ) — определяет взаимоотношение афферентного и эффекторного звеньев иммунологического процесса; лимфоцитарный индекс (ЛИ) — отношение лимфоцитов к сегментоядерным нейтрофилам и взаимоотношение гуморального и клеточного звеньев иммунной системы; индекс соотношения нейтрофилов и лимфоцитов (ИСНЛ) — индекс соотношения клеток неспецифической и специфической защиты.

### 1.7 Кальций

Кальций является внутриклеточным катионом, большая часть его входит в состав костной ткани. Са в организме находится в трех формах: связанный с белком, главным образом с альбумином; входит в комплекс с бикарбонатом, лактатом, фосфатом и цитратом; ионизированном виде ( $\text{Ca}^{++}$ ). Именно ионизированная фракция обладает физиологической активностью.

Основное депо кальция - костная ткань. В эритроцитах обнаруживаются следы кальция, в то время как в плазме содержание его составляет 2,25–2,80 ммоль/л. Кальций принимает активное участие в процессах нервно-мышечной возбудимости (как антагонист ионов  $\text{K}^+$ ), мышечного сокращения, свертывания крови, образует структурную основу костного скелета, влияет на проницаемость клеточных мембран и т.д.

Отчетливое повышение уровня кальция в плазме крови наблюдается при развитии опухолей в костях, гиперплазии или аденоме паращитовидных желез. В таких случаях кальций поступает в плазму из костей, которые становятся ломкими. Важное диагностическое значение имеет определение уровня кальция



при гипокальциемии. Состояние гипокальциемии наблюдается при гипопаратиреозе. Нарушение функции паращитовидных желез приводит к резкому снижению содержания ионизированного кальция в крови, что может сопровождаться судорожными приступами.

## **1.8 Магний**

Магний является одним из важнейших внутриклеточных элементов, выступает в качестве универсального регулятора биохимических и физиологических процессов, участвует в энергетическом, пластическом и электролитном обмене. По содержанию в организме, магний занимает 4-ое место, после натрия, калия и кальция. От концентрации магния в клетке напрямую зависит ее метаболическая активность.

Ионы магния участвуют в окислении жирных кислот, выработке энергии, построении белков, а также метаболизме глюкозы. Можно добавить, что данный элемент является кофактором различных ферментов, большая часть которых утилизирует АТФ.

Магний является физиологическим регулятором клеточного роста, поддерживает необходимый запас пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов для синтеза ДНК и РНК. Данный ион чрезвычайно важен для нормального функционирования нервной системы, он участвует в многосторонних процессах регуляции деятельности всего организма.

Магний – природный и физиологический антагонист кальция. Ион магния образует более прочные связи, чем ион кальция, и является более активным катализатором ферментативных процессов, вследствие меньшего радиуса иона и большей энергии ионизации.

Оказывая антагонистическое кальцию действие, магний конкурирует с ним на всех уровнях клетки. Магний играет важную роль в действии противосвертывающей системы крови. При недостатке магния выявлено уменьшение времени свертывания крови, повышение агрегации тромбоцитов, активация процессов тромбообразования. Магний влияет на тонус сосудистой

стенки, способствуя её дилатации. Низкая концентрация внеклеточного магния приводит к спазму сосудов. Недостаток магния влияет на жирнокислотный состав липидов: при дефиците магния в крови повышено содержание триглицеридов, хиломикронов, липопротеидов очень низкой плотности и низкой плотности, при этом снижен уровень липопротеидов высокой плотности. Также недостаток магния снижает антиоксидантную защиту организма; повышает чувствительность организма к вирусной и бактериальной инфекции. Дефицит магния сопровождается снижением общей иммунорезистентности организма, что приводит к формированию различных воспалительных заболеваний.

Общее количество магния в организме взрослого человека составляет 24–25 г. Наибольшая его часть – 60% – содержится в костях, формируя в содружестве с кальцием их структуру. Наибольшие количества магния содержится в тканях с наиболее интенсивными обменными процессами. Концентрация магния в сыворотке крови составляет в норме 0,75–0,95 ммоль/л.

Особое значение ионы  $Mg^{+}$  имеют в поддержании трансмембранного потенциала. Он способен подавлять автоматизм, проводимость и возбудимость, увеличивать абсолютную и укорачивать относительную рефрактерность в тканях (миокард, миоэпителий).

## **2 Материалы и методы**

### **2.1 Объекты исследования**

Было проведено исследование крови, взятой из локтевой вены натощак у пациентов с патологией: диффузно-токсический зоб (n=50), ишемическая болезнь сердца (n=45), в качестве контроля использовалась кровь здоровых людей (n=30). Объект исследования – цельная кровь и сыворотка крови.

### **2.2 Методы исследования**

В ходе данной работы были использованы следующие методы: Для определения концентрации гормона кортизола применялся иммуноферментный метод с использованием моноклональных антител. Метод химических (кислотных) эритрограмм Терскова-Гительзона для определения кислотной резистентности эритроцитов, электроколориметрический метод для определения содержания эритроцитов, гемоглобинцианидный метод для определения гемоглобина. Лейкоцитарную формулу определяли с помощью микроскопирования окрашенных мазков крови. Для подсчета интегральных гематологических индексов использовался программа «Смирнова». Для определения концентрации Mg в сыворотке крови использовали колориметрический метод без депротеинизации. А концентрацию Ca в сыворотке крови определяли унифицированным колориметрическим методом.

#### **2.2.1 Метод кислотных эритрограмм**

Определение кислотной резистентности эритроцитов крови проводилось по методу Терскова-Гительзона [10].

Принцип метода кислотных эритрограмм заключается в определении убыли эритроцитов в результате гемолиза через определенные промежутки времени до полного окончания убыли.

Заранее готовят раствор хлорида натрия 0,85–0,9%. Стандартный раствор гемолитика изготавливают из фиксанала соляной кислоты хлорида натрия.

Измерение кинетики гемолиза производится на установке, основой которой является фотоэлектрический колориметр. Для этого в левую кювету наливают изотонический раствор и устанавливают прибор в нулевое положение; готовят стандартную взвесь эритроцитов. Для этого левый барабан прибора выводят на показание 0,700 по шкале оптической плотности, что соответствует разведению крови 1 на 1000, вследствие этого равенство световых потоков нарушается, и стрелка гальванометра отклоняется от нулевого положения. В кювету, содержащую физиологический раствор, вводят пипеткой взвесь эритроцитов до тех пор, пока они своим рассеянием не уравниют световые потоки, и стрелка гальванометра не вернется к нулю.

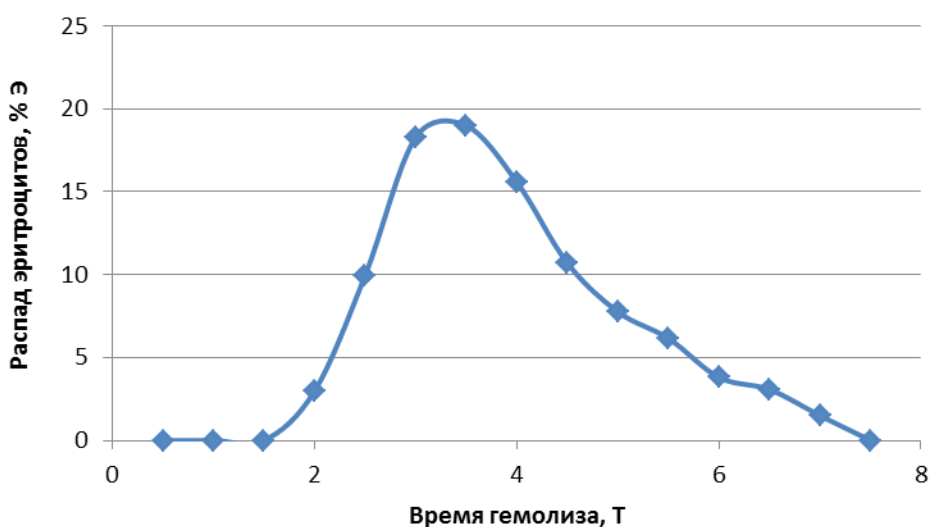
Из кюветы, содержащей теперь стандартную концентрацию эритроцитов, специальной пипеткой отбирают 2 мл взвеси, излишек удаляют водоструйным насосом, 2 мл возвращают в кювету.

Отдельной пипеткой отмеряют 2 мл стандартного гемолитика и при помешивании быстро вводят в кювету. Таким образом, в кювете создается определенная концентрация эритроцитов и гемолитика (0,04N HCL) Температура строго поддерживается  $24^{\circ} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ .

В стабильных условиях начинается распад эритроцитов, измеряемый по падению светорассеяния взвеси. Падение светорассеяния нарушает равенство световых потоков в плечах прибора, вызывая отклонения стрелки гальванометра. Выравнивание освещенности осуществляется поворотом барабана, связанного с диафрагмой. Угол поворота, необходимый для восстановления нулевого положения стрелки гальванометра, отсчитывается по шкале оптической плотности и является мерой степени гемолиза. Падение оптической плотности в этих условиях линейно связано с числом

распадающихся эритроцитов.

Мерой стойкости в этом методе служит время, прошедшее от введения кислоты до распада характеризуемой группы эритроцитов. Отсчет показаний прибора производят через каждые 30 секунд. Счет времени начинается с момента введения кислоты.



В результате опыта получается ряд значений оптической плотности, соответствующих распределению эритроцитов по стойкости, причем число групп эритроцитов, которые

удается выделить, определяется числом сделанных отсчетов. Отсчеты ведутся до тех пор, пока не будет получаться 2-3 совпадающих показания, что служит признаком конца гемолиза.

Рисунок 2 - Эритрограмма распределения эритроцитов по стойкости без патологии (норма)

Гемолиз нормальной крови человека длится в этих условиях 6,5 – 7,5 минуты, что позволяет различать в ней 13 – 14 групп эритроцитов. Процентное распределение эритроцитов по стойкости удобно изображать графической кривой зависимости процентов стойкости эритроцитов от времени гемолиза, эта кривая называется эритрограммой. На рисунке 1 приводится эритрограмма распределения эритроцитов по стойкости здорового человека. В таблице 1 представлены группы стойкости эритроцитов.

Таблица 1 - Группы стойкости эритроцитов у здоровых людей

Группа	Стойкость эритроцитов, мин	Возраст эритроцитов, дни	Количество эритроцитов, %
Повышенностойкие	7-5	28-30	20-25
Среднестойкие	4,5-3,5	30-90	45-55
Пониженностойкие	3-1,5	Более 90	20-25

Кривая распределения эритроцитов по стойкости позволяет определить состояние эритроцитов при данном анамнезе человека. Максимум при соблюдении указанных выше условий гемолиза приходится на 3,5 мин, начало гемолиза на 1,5-2 мин, конец гемолиза – на 7-7,5 мин. Кривая распределения ассиметрична. При нарушениях равновесия в системе крови возникают отклонения от нормы и распределения эритроцитов по стойкости.

Эритрограммы обнаруживают зависимость между стойкостью эритроцитов и их состоянием и позволяют характеризовать динамику качественного состава красной крови при физиологических и патологических процессах [7].

При нарушениях равновесия в системе крови возникают отклонения от нормы и распределения эритроцитов по стойкости.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программ Microsoft Excel XP и пакета программ для статистического анализа Statistica 8,0.

## **2.2.2 Определение содержания эритроцитов электроколориметрическим методом**

Пипеткой отмерьте 8 мл разводящего раствора (3,5% раствор NaCl), перенесите в сухую пробирку. Далее добавьте 1 капилляр Сали крови, что составляет 20 мкл.

Затем произведите измерение оптической плотности на ФЭКе при красном светофильтре в кювете толщиной 3 мм. Предварительно нужно выставить ноль по разводящему раствору. Показания снимайте по левой красной шкале.

Полученный результат оптической плотности нужно умножить на  $10^7$ , в результате получается количество эритроцитов в 1 мкл (мм<sup>3</sup>) крови.

## **2.2.3 Определение содержания гемоглобина**

Для определения гемоглобина используется гемоглобинцианидный метод. Принцип метода состоит в том, что к крови добавляется специальный трансформирующий раствор, содержащий сильный окислитель (цианид), при взаимодействии с которым эритроциты разрушаются, гемоглобин выходит в раствор и образует окрашенное соединение гемоглобинцианид. Интенсивность окраски пропорциональна количеству гемоглобина и фиксируется на ФЭКе или спектрофотометре.

В пробирку пипеткой перенесите 5 мл трансформирующего раствора. Заберите из пальца кровь капилляром Сали до метки 0,02 и выпустите в трансформирующий раствор. Раствор крови в трансформирующем растворе аккуратно, но тщательно перемешайте и оставьте на 10-15 мин при комнатной для полного развития окраски (раствор остается стабильным в течение более 24 ч). Таким же образом подготовьте пробу со стандартным раствором гемоглобина: 5 мл трансформирующего раствора и один капилляр стандартного раствора гемоглобина (120 г/л).

Далее производят измерение оптической плотности на ФЭКе опытной и стандартной проб при длине волны 520-560нм (зеленый светофильтр) в кювете толщиной 10мм. Предварительно выставляется ноль по трансформирующему раствору.

Поскольку содержание гемоглобина в стандартном растворе известно, содержание гемоглобина в опытной проб рассчитывают в соответствии с пропорцией:

$$D_c - 120 \text{ г/л}$$

$$D_o - X \text{ г/л}$$

где:  $D_c$  - оптическая плотность стандартной пробы,

$D_o$  - оптическая плотность опытной пробы.

При использовании спектрофотометра определение оптической плотности проводят при длине волны 540 нм в кювете толщиной 10мм. Содержание гемоглобина рассчитывают по формуле[]:

$$Hb \text{ (г/л)} = D \times 367,7$$

где:  $D$  – оптическая плотность раствора.

#### **2.2.4 Подсчет лейкоцитарной формулы**

Исследование морфологии лейкоцитов производят микроскопированием мазков крови, окрашенных по Романовскому. Принцип метода окраски мазков состоит в избирательном поглощении веществами клетки трех красящих веществ – азура, метиленового синего и эозина. Азур имеет амфотерноосновную реакцию, метиленовая синька – щелочную, эозин – кислую.



#### **2.2.4.1 Приготовление мазков крови**

Каплю крови поместите на край чистого обезжиренного предметного стекла и сделайте мазок с помощью другого предметного стекла со шлифованным краем. Вторым предметным стеклом со шлифованным краем прикоснитесь к капле крови и как только капля, коснувшись подвижного стекла, разойдется по линии соприкосновения стекол, верхним стеклом, держа его под углом  $45^{\circ}$ , проведите по первому стеклу в направлении от капли, чтобы получился мазок. Мазок должен быть достаточно тонким, чтобы клетки крови располагались в один слой; в то же время следует избегать чрезмерного надавливания, для исключения деформации лейкоцитов. Приготовленные мазки высушивают на воздухе и затем фиксируют и окрашивают с использованием нескольких способов.

#### **2.2.4.2 Фиксация и окраска мазков крови**

Свежеприготовленный, высушенный на воздухе мазок зафиксируйте метиловым или этиловым спиртом. Для этого мазок поместите горизонтально в ванночку на подставки и накапывайте спирт каплями, чтобы он полностью покрывал мазок крови. Подождите несколько минут до испарения спирта.

Окраску фиксированных мазков производите свежеприготовленным водным раствором краски Романовского-Гимза. Для этого на 1 мл воды добавьте 1 каплю краски (~40мкл). Для получения хорошей окраски рН воды должно составлять ~6,8-6,9. Поэтому желательно использовать вместо воды фосфатный буфер с рН 6,8-6,9. На один мазок потребуется 2-3 мл водного раствора краски.

Окрашивание производите нанесением водного раствора краски каплями на горизонтально расположенный на подставках в ванночке мазок до полного покрытия мазка. Красьте 15-20 мин, после чего смойте краску холодной водопроводной водой и высушите мазок на воздухе.

Окрашенный и высушенный мазок исследуйте под микроскопом с иммерсией. На мазок нанесите каплю иммерсионного масла, осторожно опустите объектив до соприкосновения с маслом, затем объектив

приподнимите на 1 мм. При этом силы поверхностного натяжения удерживают масло в контакте с линзой. После этого настройте поле зрения, медленно опуская объектив до появления контуров клеток. Для окончательной фокусировки используйте микровинт.

Двигаясь по мазку, исследуйте лейкоциты в каждом поле зрения. При движении по мазку крови рекомендуется пересекать мазок по схеме, представленной на рис. 3.

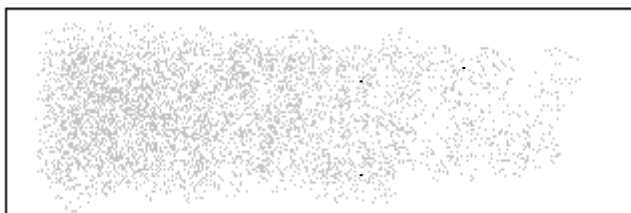


Рисунок 3 – Схема движения по мазку крови при исследовании морфологии лейкоцитов

Произведите исследование 100 лейкоцитов, идентифицируя каждый лейкоцит; подсчитайте количество лейкоцитов в каждом классе. Поскольку исследуется 100 клеток, результаты выражаются в % количестве лейкоцитов каждого типа среди всех лейкоцитов крови.

### **2.2.5 Определения концентрации Mg колориметрическим методом**

Набор предназначен для количественного определения содержания магния в сыворотке (плазме) крови, моче и ликворе колориметрическим методом без депротенинизации. Использовать только для *In vitro* диагностики.

Ионы магния образуют окрашенный комплекс с ксилитидиловым синим в щелочной среде, интенсивность окраски которого при длине волны 520 (505-540) нм прямо пропорциональна концентрации магния в пробе.

Линейность: отклонение не более 6% в диапазоне концентраций 0,2-2,0 ммоль/л (0,5-5,0 мг/дл).

Чувствительность: 0,2 ммоль/л (0,5 мг/дл)

Коэффициент вариации: не более 6%.

1. Фотометр, полуавтоматический или автоматический анализатор, длина волны 520 (505-540) нм.
2. Дозаторы со сменными одноразовыми наконечниками.
3. Вода деионизованная или бидистиллированная.
4. Контрольные материалы с известным содержанием магния, аттестованные данным методом.

Перед началом работы необходимо довести реагенты до выбранной температуры проведения анализа.

Длина волны: 520 (505-540) нм.

Длина оптического пути: 1 см (5мм).

Температура инкубации: комнатная (18-25°C) или 37°C.

Фотометрирование: против холостой пробы.

Пробы закрыть и тщательно перемешать. Инкубировать 10 минут при 18-25°C или 5 минут при 37°C. Измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб. Оптическая плотность стабильна в течение часа при 18-25°C или не менее 30 минут при 37°C.

### **2.2.6 Определение концентрации Са унифицированным колориметрическим методом**

Набор предназначен для количественного определения содержания кальция в сыворотке (плазме) крови и моче колориметрическим методом с о-крезолфталеинкомплексом. Использовать только для *in vitro* диагностики.

Кальций в щелочной среде образует окрашенный комплекс с о-крезолфталеинкомплексом. Интенсивность окраски при длине волны 570 (540-590) нм прямо пропорциональна концентрации кальция в пробе.

Линейность: отклонение не более 5% в диапазоне концентраций 0,25-3,75 ммоль/л (1-15мг/дл).

Чувствительность: 0,15 ммоль/л.

Коэффициент вариации: не более 5%.

1. Фотометр, полуавтоматический или автоматический анализатор, длина волны 570 (540-590) нм.
2. Дозаторы со сменными одноразовыми наконечниками.
3. Вода деионизованная или бидистиллированная.
4. Контрольные материалы с известным содержанием кальция, аттестованные данным методом.

Перед началом работы необходимо довести реагенты до температуры проведения анализа.

Длина волны: 570 (540-590) нм.

Длина оптического пути: 1 см (5мм).

Температура инкубации: комнатная (18-25°C) или 37°C.

Фотометрирование: против холостой пробы.

Пробы тщательно перемешать и инкубировать 5 минут при 18-25 (37)°C. Измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против холостой пробы. Окраска стабильна не менее часа после окончания инкубации при предохранении от прямого солнечного света.

### **2.2.7 Определение кортизола иммуноферментным анализом**

Метод определения основан на твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца и конъюгата кортизол–пероксидаза, во время инкубации происходит конкурентное связывание сывороточного кортизола и кортизола, конъюгированного с пероксидазой, с моноклональными антителами к кортизолу, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок планшета.

При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного с антителами конъюгата кортизол–пероксидаза, причем

количество связанного обратно пропорционально концентрации кортизола в анализируемом образце сыворотки крови.

Во время инкубации с ТМБ–Субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связанного антителами конъюгата кортизол–пероксидаза. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывалась концентрация кортизола в исследуемых образцах.

Для анализа использовался набор для количественного определения кортизола методом иммуноферментного анализа (ДС–ИФА–Стероид–Кортизол), являющийся продукцией ООО Научно–Производственного Объединения «Диагностические системы».

Состав набора:

1) Иммуносорбент – полистероловый 96–луночный разборный планшет с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к кортизолу – 1 шт;

2) Конъюгат – кортизол, меченный пероксидазой хрена, прозрачная опалесцирующая жидкость розового цвета – 1 фл. (12мл);

3) 6 калибровочных проб на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества кортизола, прозрачные или опалесцирующие жидкости светло–желтого цвета;

4) Контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием кортизола, прозрачная или опалесцирующая жидкость светло–желтого цвета – 1 фл. (0,5 мл);

5) промывочный раствор, 25–кратный концентрат, прозрачная слегка опалесцирующая, бесцветная или светло–жёлтого цвета жидкость допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании – фл. (50 мл) ;

6) ТМБ–Субстратный раствор; прозрачная бесцветная жидкость – 1 фл. (12 мл.);

7) Стоп–реагент (0,2 М серная кислота), прозрачная бесцветная жидкость –1 фл. (15 мл.);

8) Инструкция по применению – 1 шт.

**Проведение анализа:** Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры.

Вносили стандартные калибровочные пробы и контрольную сыворотку в лунки по 25 мкл, по 2 повтора.

В остальные лунки вносили по 25 мкл исследуемых образцов сывороток крови, 2 лунки оставляли пустыми.

Во все лунки планшета, кроме А–1 и А–2, внести по 100 мкл конъюгата, закрывали планшет крышкой и инкубировать на шейкере при встряхивании со скоростью от 500 до 800 об/мин в течение 30 минут при температуре  $(37 \pm 0,5)$  °С. По окончании инкубации содержимое лунок удаляли с помощью промывочного устройства в ёмкость для сбора инфицированного материала, планшет промывали 5 раз рабочим промывочным раствором, добавляя во все лунки планшета по 300 мкл рабочего промывочного раствора и удаляя рабочий промывочный раствор с помощью промывочного устройства в ёмкость для сбора инфицированного материала. После последнего промывания тщательно удаляли остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Немедленно вносили во все лунки планшета по 100 мкл ТМБ–Субстратного раствора и инкубировали планшет в темноте при комнатной температуре (18–24°С) в течение 20–30 минут.

Далее добавляли во все по 150 мкл стоп–реагента для остановки ферментной реакции и встряхивали планшет на шейкере в течение 5–10 секунд.

Измеряли на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм.

### **3 Результаты и их обсуждения**

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Агаджанян, Н.А. Основы физиологии человека: учебн. / Н.А. Агаджанян // – М.: РУДН, 2001. – 408с.
- 2 Адамян, Л. В. Миома матки. Диагностика, лечение и реабилитация: учебн. / Л. В. Адамян // - М, 2015. - 380с.
- 3 Ашкинази, И. Я. Разрушение эритроцитов / И. Я. Ашкинази // Физиология системы крови. Физиология эритропоэза: Руководство по физиологии. Л : Наука, 1979.
- 4 Баисова, Б. И. Гинекология : учебник / Б. И. Баисова и др. // ; под ред. Г. М. Савельевой, В. Г. Бреусенко // . - 4-е изд., перераб. и доп. - 2011. - 432 с.
- 5 Балаболкин, М. И. Эндокринология : учебник / М. И. Балаболкин // . – Москва : Универсум паблицинг, 1998. – 300 с.
- 6 Болдырев, А. А. Биологические мембраны и транспорт ионов. М : Изд-во МГУ, 1990.
- 7 Васильев, Н. В. Система крови и неспецифическая резистентность в экстремальных климатических условиях. Новосибирск : Наука.Сиб. отд-е., 1992.
- 8 Гайворонский, И. В. Анатомия и физиология человека: учебник / И. В. Гайворонский [и др.]. – Москва : Издательский центр «Академия», 2011. – 496 с.
- 9 Геннис, Р. Биомембраны. Молекулярная структура и функции / Р. Геннис // М. : Мир, 1997.
- 10 Гительзон, И. И. Эритрограммы как метод клинического исследования крови : учебное пособие / И.И. Гительзон, И.А. Терсков // – Красноярск : Издательство Сибирского отделения Академии наук СССР, 1959. .
- 11 Городецкая, И.В. Роль йодсодержащих тиреоидных гормонов в формировании ответной реакции организма при хроническом стрессовом воздействии / И. В. Городецкая // Вестник ВГМУ. – 2012. – Т. 11, №3. – С. 28–35.



- 12 Ингерлейб, М. Б. Анализы. Полный справочник / М. Б. Ингерлейб // - Москва : Астрель, 2011.
- 13 Камкин, А. Г. Физиология и молекулярная биология мембран клеток: Учебное пособие. / А. Г. Камкин, И. С. Киселев // М.: Академия : б.н/ : б.н., 2008.
- 14 Крепс, Е. М. Липиды клеточных мембран. Л : Наука, 1981. 114 с..
- 15 Кузнецов, С. Л. Лекции по гистологии, цитологии и эмбриологии : учебное пособие / С. Л. Кузнецов, М. К. Пугачев // – 3-е изд. – Москва : Медицинское информационно агентство, 2014. – 480 с.
- 16 Курепина, М. М. Анатомия человека : учебник / М. М. Курепина, А. П. Ожигова, А. А. Никитина // – Москва : Владос, 2010. – 384 с.
- 17 Леви, Дж. Взаимодействие гормонов с рецепторами. Молекулярные аспекты.: учебник / Дж. Леви: пер. с англ.: А. Н. Смирнова, З. Ф. Утешева // – Москва: Мир, 1979. – 432 с.
- 18 Литвицкий, П. Ф. Патология эндокринной системы: этиология и патогенез эндокринопатий. Расстройства гипоталамо–гипофизарной системы / П. Ф. Литвицкий // Вопросы современной педиатрии. – 2011. – № 4. – С. 47–61.
- 19 Михайлис, А. А. Концептуальная модель стресс – индуцированной динамики кислотно–гемалитической стойкости эритроцитов / А. А. Михайлис // Современные наукоемкие технологии. – 2010. – № 10. – С. 19–23
- 20 Мороз, В. В. Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях / В. В. Мороз, А. М. Голубев [и др.]. // Общая реаниматология. – 2012. – № 8. – С. 52–60.
- 21 Натан, Д. Г. Регуляция кроветворения. Гематология и трансфузиология. б.м. : №2, 1994.
- 22 Новицкий, В. В. Патофизиология : учебник / В.В. Новицкий [и др.]. // – Москва : ГЭОТАР-медиа, 2009. – Т.1. – 848 с.
- 23 Орлов, Р. С. Нормальная физиология : учебник / Р. С. Орлов // – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 832 с.

24 Павлов, А. Д. Регуляция эритропоэза: физиологические и клинические аспекты. М : Медицина, 1987.

25 Панин, Л. Е. Основы многоуровневой мезомеханики наноструктурных переходов в мембранах эритроцитов и их разрушения при взаимодействии с гормонами стресса / Л. Е. Панин, Б. Н. Зайцев [и др.]. // Физическая мезомеханика. – 2011. – № 14. – С. 5–17.

26 Покровский, В. И. Малая медицинская энциклопедия / В. И. Покровский // — М.: Медицинская энциклопедия. 1991—96 г.

27 Покровского, В. М. Физиология человека. Учебник. / Покровского, В.М. Коротько Г.Ф. // Издательство: М.: Медицина 2003.

28 Северин, Е. С. Биохимия : учебник / Е. С. Северин // – Москва : ГЭОТАР–Медиа, 2003. – 779 с.

29 Селье, Г. Стресс без дистресса : учебное пособие / Г. Селье // – Москва : Прогресс, 1989. – 120 с.

30 Сисла, Б. Руководство по лабораторной гематологии : учебн. / Б.Сисла // – Москва: Практическая медицина, 2011. – 352 с.

31 Татарчук, Т. Ф. Стресс и репродуктивная функция женщины / Т. Ф. Татарчук // Международный эндокринологический журнал. – 2006. –№ 3 (5). – С. 32–51.

32 Ткаченко, Б. И. Физиология человека : учебное пособие / Б. И. Ткаченко [и др.]. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 496 с.

33 Трошкина, Н. А. Эритроцит: строение и функции его мембраны / Н. А. Трошкина, В. И. Циркин [и др.]. // Вятский медицинский вестник. – 2007. – № 2–3. – С. 32–40.

34 Фурдуй, Ф. И. Стресс, эволюция человека, здоровье и санокреатология : материалы пленарного доклада на 2 съезде физиологов СНГ, 29 – 31 октября 2008 г. / под ред. Ф. И. Фурдуй // – Кишинев, 2008. – 4 – 13 с.

35 Черенков, В.Г. Клиническая онкология : учебное пособие / В. Г. Черенков // – Москва : Медицинская книга, 2010. – 434 с.

36 Bratosin, D. Programmed cell death in mature erythrocytes: A model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ.* / Bratosin D., Estaquier J., Petit F., Arnoult D., Quatannens B., Tissier J. P., et al // 2008. 1143-5.

37 Becker, R.C. The role of blood viscosity in the development and progression of coronary artery disease. / R.C. Becker // – *Clevl Clin J Med*, 1993 – 353-358 p.

38 Elaine, N. *Human anatomy and physiology : manual* / N. Elaine, K. Hoehn // – Boston : Pearson College Div, 2012. – 1270 p.

39 Kaushansky, K. *Williams hematology : manual* / K. Kaushansky [etc]. // – California : Copyright, 2010. – 605 p.

40 Lechago, J. *Bloodworth's Endocrine Pathology* / J. Lechago // – Williams and Wilkins, Baltimore, 1997.

41 Martini, F. H. *Human anatomy : manual* / F. H. Martini, M. J. Timmos, R. B. Tallitsch // – Boston : Pearson College Div, 2012. – 905 p.

42 Melmed, S. *Williams textbook of endocrinology : manual* / S. Melmed [etc] // – Philadelphia : Elsevier Saunders, 2011. – 1816 p.

43 Rhoades, R. A. *Medical Physiology : principles for clinical medicine : manual* / R. A. Rhoades, D. J. Bell // – 4th ed. – Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2013. – 612 p.

44 Shier, D. *Hole's essentials of human anatomy and physiology : manual* / D. Shier, J. Butler, R. Lewis // – New York : Connect learn succeed, 2012. – 641 p.


45 Silverthorn, D. U. *Human physiology: an integrated approach : manual* / D. U. Silverthorn // – Edition 5. – San Francisco : Pearson Benjamin Cummings, 2010. – 991 p.

46 Tortora, G. J. *Principles of human anatomy : manual* / G. J. Tortora, Nielsen M. T. – Canada // : John Wiley and Sons, 2012. – 1054 p.

47 Young, W. F. *The netter collection of medical illustration: endocrine system : manual* / W. F. Young // – Philadelphia : Elsevier Saunders, 2011. – 256 p.




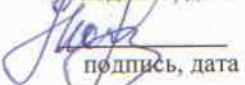
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ  
  
Заведующий кафедрой  
Е. И. Шишацкая

« 5 » июль 2019 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**  
06.04.01 - Биология  
06.04.01.00.05 – Реконструктивная биоинженерия

Влияние кортизола сыворотки крови на кислотную резистентность  
эритроцитов, состояние иммунного и ионного гомеостаза при ишемической  
болезни сердца и диффузно-токсическом зобе

Научный руководитель	 подпись, дата	доцент, к.б.н. должность, ученая степень	<u>Ф.А. Гершкорон</u> инициалы, фамилия
Научный консультант	 подпись, дата	проф., д.м.н. должность, ученая степень	<u>О.В. Смирнова</u> инициалы, фамилия
Выпускник	 подпись, дата		<u>С. В. Милевская</u> инициалы, фамилия
Рецензент	 подпись, дата	доцент, к.м.н. должность, ученая степень	<u>Т.В. Толмачева</u> инициалы, фамилия