

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
ФГАОУ ВО Национальный исследовательский  
Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского**

**Институт биологии и биомедицины  
Кафедра физиологии и анатомии**

Дерюгина А.В., Шабалин М.А., Грачева Е.А.

**Электрофоретическая подвижность эритроцитов в качестве  
маркера адаптационных реакций организма**

Методические рекомендации  
Рекомендовано методической комиссией Института биологии и  
биомедицины для студентов ННГУ, обучающихся по направлению  
подготовки 06.03.01 «Биология»

Нижегород  
2020 г.

УДК 612.1  
ББК Р 345.1

Электрофоретическая подвижность эритроцитов в качестве маркера адаптационных реакции организма. Дерюгина А.В., Шабалин М.А. Грачева Е.А.- Нижний Новгород: Издательство Нижегородского госуниверситета, 2020.- 21 с.

Рецензент: к.б.н. Кравченко Г.А.

В методической разработке представлен анализ электрофоретической подвижности эритроцитов как возможного маркера стрессовой реакции организма. Данное руководство включает теоретическую часть по общей характеристике эритроцитов, их мембран, структура которых определяет электрокинетические свойства эритроцитов. Функцией электрокинетических свойств эритроцитов является электрофоретическая подвижность эритроцитов. В разработке представлено подробное описание метода исследования электрофоретической подвижности эритроцитов. Данное руководство предназначено для студентов старших курсов, специализирующихся по направлению 06.03.01 «Биология», аспирантов направления 06.06.01 «Биологические науки» и может быть использовано при подготовке выпускных квалификационных работ бакалавров, магистров, а также научных квалификационных работ аспирантов.

Ответственный за выпуск:

Председатель методической комиссии Института биологии и биомедицины  
ННГУ к.б.н., доц. Воденеева Е.Л.

© Нижегородский государственный  
университет им. Н.И. Лобачевского, 2020

## Содержание

Введение .....	4
Общая характеристика эритроцитов. ....	5
Электрокинетические свойства эритроцитов .....	8
Электрофоретическая подвижность клеток крови .....	11
Определение электрофоретической подвижности эритроцитов.....	18

## Введение

Оптимальный баланс различных свойств эритроцитов приобретает особое значение при формировании ответной реакции на воздействия, увеличивающие потребности организма в кислороде или (и) уменьшающие кислородную емкость крови. Необходимость поддержания общей дыхательной поверхности крови при сохранении ее реологической устойчивости, естественно, вносит соответствующие коррективы в характер зависимости электрофоретической подвижности эритроцитов от количественных и качественных показателей красной крови. Так, увеличение объема и заряда эритроцитов при уменьшении их количества в сосудистом русле, является компенсаторной реакцией, направленной на оптимизацию кислородтранспортной функции крови не только при анемии, но и при адаптации организма к различным нагрузкам, сопровождающимся увеличением потребностей организма в кислороде. Однако при длительной или чрезмерной стимуляции эритропоэза свойственные норме связи между содержанием, размерами и электрофоретической подвижностью эритроцитов утрачиваются, что, вероятно, свидетельствует о снижении адаптационных возможностей системы крови с перспективой микроциркуляторных расстройств и других гемореологических нарушений. В связи с этим сохранение оптимального уровня заряда чрезвычайно важно, особенно в состояниях, характеризующихся напряжением регуляторных механизмов гомеостаза, в частности при патологии. В данном методическом пособии рассмотрены возможности анализа электрофоретической подвижности эритроцитов в качестве показателя, позволяющего анализировать состояние организма.

## Общая характеристика эритроцитов.

Кровь (sanguis) - жидкая ткань, осуществляющая в организме транспорт химических веществ (в т.ч. кислорода), благодаря которому происходит интеграция биохимических процессов, протекающих в различных клетках и межклеточных пространствах, в единую систему (Войтенко, 1984).

Кровь состоит из жидкой части - плазмы и взвешенных в ней клеточных (форменных) элементов. Нерастворимые жировые частицы клеточного происхождения, присутствующие в плазме, называют гемокониями (кровяная пыль). Объем крови в норме составляет в среднем у мужчин 5200 мл, у женщин 3900 мл.

Различают красные и белые кровяные тельца (клетки). В норме красных кровяных телец (эритроцитов) у мужчин  $4 - 5 \times 10^{12}/л$ , у женщин  $3,9 - 4,7 \times 10^{12}/л$ , белых кровяных телец (лейкоцитов) -  $4 - 9 \times 10^9/л$  крови. Кроме того, в 1 мкл крови содержится  $180—320 \times 10^9/л$  тромбоцитов (кровяных пластинок). В норме объем клеток составляет 35 - 45% объема крови (Ставицкий, 1999).

Эритроциты (около 85%) являются безъядерными двояковогнутыми клетками с ровной поверхностью (дискоцитами), диаметром 7—8 мкм. Объем клетки  $90 \text{ мкм}^3$  площадь  $142 \text{ мкм}^2$ , наибольшая толщина 2,4 мкм, минимальная - 1 мкм, средний диаметр на высушенных препаратах 7,55 мкм. Сухое вещество эритроцита содержит около 95% гемоглобина, 5% приходится на долю других веществ (негемоглобиновые белки и липиды). Ультраструктура эритроцитов однообразна. При исследовании их с помощью трансмиссионного электронного микроскопа отмечается высокая однородная электронно-оптическая плотность цитоплазмы за счет содержащегося в ней гемоглобина; органеллы отсутствуют. На более ранних стадиях развития эритроцита (ретикулоцита) в цитоплазме можно обнаружить остатки структур клеток-предшественников (митохондрии и др.). Клеточная мембрана эритроцита на всем протяжении одинакова; она

имеет сложное строение. Если мембрана эритроцитов нарушается, то клетки принимают сферические формы (стоматоциты, эхиноциты, сфероциты). При исследовании в сканирующем электронном микроскопе (растровая электронная микроскопия) определяют различные формы эритроцитов в зависимости от их поверхностной архитектоники. Трансформация дискоцитов вызывается рядом факторов, как внутриклеточных, так и внеклеточных.

Эритроциты в зависимости от размера называют нормо-, микро- и макроцитами. У здоровых взрослых людей количество нормоцитов составляет в среднем 70%.

Определение размеров эритроцитов (эритроцитометрия) дает представление об эритроцитопозе. Для характеристики эритроцитопоза используют также эритрограмму - результат распределения эритроцитов по какому-либо признаку (например, по диаметру, содержанию гемоглобина), выраженный в процентах и (или) графически.

Зрелые эритроциты не способны к синтезу нуклеиновых кислот и гемоглобина. Для них характерен относительно низкий уровень обмена, что обуславливает длительную продолжительность их жизни (приблизительно 120 дней). Начиная с 60-го дня после попадания эритроцита в кровяное русло постепенно снижается активность ферментов. Это приводит к нарушению гликолиза и, следовательно, к уменьшению потенциала энергетических процессов в эритроците. Изменения внутриклеточного обмена связаны со старением клетки и в итоге приводят к ее разрушению. Большое число эритроцитов (около 200 млрд.) ежедневно подвергается деструктивным изменениям и погибает.

Плазматическая мембрана эритроцита – важнейший элемент клетки: она одновременно является и механической оболочкой с регулируемыми физическими свойствами, и «диспетчерской» клетки, осуществляемой координацию работы клетки в зависимости от физических и химических сигналов, поступающих к ней в организме (Казеннов, Маслова, 1987).

Эритроцитарная мембрана состоит из билипидного слоя с периферическими и интегральными белками. Содержание белков – 50%, липидов – 40% и углеводов – 10%. Основная часть углеводов (93%) связана с белками, остальная – с липидами.

Липидный слой выполняет две функции – барьерную и структурную. От свойств липидной фазы мембран, таких, как вязкость, поверхностный заряд, полярность, зависит работа мембранных ферментов и рецепторов.

Выделяют три основных класса липидов в эритроцитарной мембране по их химической природе (Богач и др. 1981): фосфолипиды – 60% (к ним относятся нейтральные – фосфотидилхолин (ФТХ), сфингомиелин (СМ), фосфотидилэтаноламин (ФТЭА) и кислые – фосфотидилсерин и фосфотидилинозитол), холестерин – 25%, гликолипиды – 15%. Гликолипиды в составе мембраны разделяют, в зависимости от вида полярной головки, на нейтральные (глобозиды – 5 - 7%, церамиды – 2 - 3%) и кислые (ганглиозиды – 2%), несущие сложные олигосахариды, включающие сиаловые кислоты.

Лизофосфолипиды являются обязательными компонентами мембран, определяют её динамические свойства, проницаемость, но чрезмерное накопление этого в монослой, ведёт к нарушению проницаемости для ионов, активности ферментов, приводит к образованию гидрофильных каналов.

Изменения фосфолипидного состава мембран эритроцитов отводится большая роль в регуляции трансмембранного транспорта ионов, модификации активности интегральных и периферических белков мембраны, активность ферментных систем, фосфотидилинозитол выполняет сигнальную функцию. Поддержание соотношения между фракциями фосфолипидов (ФЛ) мембраны на физиологическом уровне является условием нормального функционирования эритроцитов.

Гликолипиды, представленные ганглиозидами, определяют адгезию и электрофоретическую подвижность клеток.

Холестерин является фактором, определяющим текучесть мембран и механическую прочность бислоя.

Белки в эритроцитарной мембране обеспечивают транспорт, выполняют каталитическую и рецепторную функцию, определяют морфологические и механические свойства. В зависимости от расположения в мембране их делят на периферические (внутренние) и интегральные. Основная часть мембранных белков располагается на внутренней (цитоплазматической) стороне мембраны и образует сеть филаментов, которая служит для поддержания двояковогнутой формы.

### Электрокинетические свойства эритроцитов

Адаптивный или повреждающий эффект любого фактора, а тем более такого сложного комплекса факторов, как стресс, реализуется в условиях целостного организма опосредованно – через мембранные системы клеток. Состояние мембраны во многом определяет протекание физиологических и биохимических процессов и тем самым является исходным звеном в сложной цепи приспособительных модификаций на всех уровнях. Оценить морфо-функциональное состояние мембран позволяет изучение электрофоретической подвижности клеток. Учитывая, что в основе жизнедеятельности организма лежат общие приспособительные реакции к постоянно меняющимся факторам окружающей среды, актуальность изучения электрофоретической подвижности клеток крови возрастает при поиске неспецифических критериев оценки при развитии в организме стресс-реакции. Электрофоретическая подвижность эритроцитов (ЭФПЭ) закономерно изменяется при развитии в организме стресс-реакции: в первую фазу стресса – уменьшается, во вторую – увеличивается, в дальнейшем может происходить ее восстановление до показателей нормы, либо при истощении организма - данный показатель не восстанавливается.



Первая фаза - снижение ЭФПЭ связана с активацией выделения эндогенных катехоламинов, вторая фаза – повышение ЭФПЭ определяется нарастанием в крови гормонов коры надпочечников. Механизм изменения ЭФПЭ под влиянием стресс-реализующих гормонов реализуется через их непосредственное воздействие на эритроцит. Повышенный уровень катехоламинов и адренореактивность эритроцитов приводят к торможению Na,K-АТФазы, к накоплению кальция в цитозоле эритроцита с повышением его реактивности, разупорядочиванию липидных доменов их мембран, модификации состава электрофоретических полос эритроцитарной мембраны, снижению относительного содержания полос 3,6 и 7 и увеличению содержания белка полосы 2.3. Кортизол, влияя на липидную фазу, уменьшает подвижность полярных группировок мембранных фосфолипидов.

Электрофоретическая подвижность эритроцитов определяется поверхностным зарядом клеток, который, в свою очередь, зависит от структуры мембраны эритроцитов. Диссоциация кислотных и основных групп поверхности мембраны создает мозаику отрицательных и положительных зарядов, но вследствие преобладания кислотных групп, эритроцит несет на своей поверхности избыточный отрицательный заряд.

В формировании отрицательного заряда наружной поверхности мембраны эритроцита участвуют N-ацетилнейраминная кислота, содержащаяся в гликопротеинах и гликолипидах; боковые  $\beta$ -COOH группы аспаргиновой кислоты и  $\gamma$ -COOH группы глутаминовой, COOH-группы кислых фосфолипидов, что составляет  $1,6 \times 10^7$  отрицательно заряженных групп на клетку. Сиаловые кислоты определяют 60-90% отрицательного заряда клетки.

Положительный заряд создается аминогруппами лизина, гидроксизина и аргинина; конечными  $\alpha$ -аминогруппами белковых цепей; имидазольными группами гистидиновых остатков; фосфо- и гликолипидными атомами азота и аммонийными группами холинов.

Количество положительно заряженных групп на поверхности клетки является незначительным ( $9 \times 10^5$  на клетку), по сравнению с отрицательными ионогенными группами.

Распределение заряда на поверхности мембраны неравномерно: более высокая его плотность на выпуклых сторонах.

Эритроциты, суспензированные в плазме, окружены электрическим слоем, вследствие притяжения из окружающей среды противоионов, которые под воздействием электростатических сил стремятся приблизиться к ионизированным группам клеточной мембраны.

На структуру двойного электрического слоя клеток крови оказывает влияние рН среды и наличие в системе поливалентных ионов, которые могут вызывать сжатие двойного слоя клетки и изменить знак ее заряда.

В организме человека в нормальных условиях отмечается постоянство рН среды и минерального состава плазмы, благодаря этому электрический заряд клеток крови относительно постоянен.

Показателями электрокинетических свойств клеток крови являются их электрофоретическая подвижность и величина  $\zeta$ -потенциала. Согласно уравнению электрофоретическая подвижность клеток в электрическом поле составляет:

$$U = S \cdot g \cdot \chi / t \cdot I,$$

где  $U$  - электрофоретическая подвижность,  $I$  - сила тока,  $\chi$  - удельная электропроводность среды,  $g$  - поперечное сечение в камере.

Электрофоретическая подвижность связана с  $\xi$ -потенциалом уравнением Гельмгольца-Смолуховского:

$$\zeta = 4 \cdot \pi \cdot \eta \cdot U / \epsilon,$$

где  $\eta$  - вязкость плазмы,  $\epsilon$  - диэлектрическая проницаемость.

Величина  $\zeta$ -потенциала зависит от толщины двойного электрического слоя клетки: чем толще двойной электрический слой, тем больше величина  $\zeta$ -потенциала. При перемещении эритроцитов в электрическом поле их

поверхность смещения не совпадает с разделом твердой и жидкой фаз, поэтому на границе отрыва частицы с прочнофиксированным слоем ионов от основной массы жидкости образуется скачок электрокинетического ( $\zeta$ ) потенциала.

В случае клеточного электрофореза экспериментально измеряемой величиной является ЭФП клеток, определяющаяся теми нескомпенсированными зарядами, которые находятся в данной период жизнедеятельности клетки и при данных параметрах среды в плоскости скольжения.

### Электрофоретическая подвижность клеток крови

Исследование электрофоретической подвижности (ЭФП) клеток крови проводят макрометодом, иначе методом подвижных границ, и микрометодом. Результаты, полученные макро- и микрометодом, совпадают, но по сравнению с макрометодом микрометод обладает рядом преимуществ:

1. Определение ЭФП клеток в макроаппаратах возможно лишь при относительно высоких концентрациях электролитов, тогда как в микрометоде не имеется подобных ограничений;
2. В макроаппаратах быстрая седиментация крупных частиц (эритроцитов и других биологических объектов) искажает показатели истинной ЭФП;
3. Для определения ЭФП клеток микрометодом нужно не более 2-х минут вместо 20-30 минут, необходимых для такого же исследования в макроаппаратах.

Принцип микрометода заключается в том, что в специально сконструированных микроаппаратах с помощью секундомера и окулярной сетки измеряется под микроскопом скорость перемещения каждой клетки в электрическом поле.

Конструктивно аппарат для микроэлекторофореза состоит из микрокамеры и двух электродных отведений, соединенных друг с другом.

По своим особенностям микрокамеры могут быть горизонтальными или вертикальными с цилиндрическим или прямоугольным сечением. Чтобы заполнить их, необходимо от 1 до 10 мл жидкости.

При определении ЭФП клеток в микрокамерах необходимо учитывать электроосмотические токи жидкости. В связи с тем, что воды заряжена по отношению к стеклу положительно, у верхней и нижней стенки камеры она переносится под влиянием электроосмоса к катоду, а в средних слоях оттекает в обратном направлении. Поэтому ЭФП клеток на разных глубинах камеры неодинакова. Однако средняя скорость клеток на всех глубинах будет соответствовать их истинной скорости. В тоже время нет необходимости измерять скорость движения частиц на всех глубинах камеры. Согласно теории потока жидкостей в микрокамерах (M. Smoluchowski, 1921) можно ограничиться измерениями на  $1/5$  глубины от верхней или нижней стенок камеры, где скорость частиц соответствует истинной скорости.

Наиболее важной деталью прямоугольной камеры является капилляр с плоскими параллельными стенками, глубиной 0,5 мм. Если глубина капилляра менее 0,5 мм, точность измерений снижается. Что касается длины камеры, то она должна быть такой, чтобы удобно было производить измерения под микроскопом, не создавая слишком большого сопротивления для прохождения электрического тока, которое возрастает с увеличением длины капилляра. Стенки капилляра должны быть строго параллельны, иначе площадь поперечного сечения в различных местах камеры будет неодинаковой, что повлечет за собой неравномерное падение потенциала в зоне наблюдения за скоростью перемещения клеток.

Концы капилляра через стеклянные или пластиковые трубки соединяются с неполяризуемыми электродами. Расстояние между электродами не должно быть меньше 120 мм, в противном случае на ЭФП

клеток могут влиять происходящие на концах трубки электроэндоосмотические явления и возможно поступление электродного электролита в измерительную ячейку.

Источником постоянного электрического тока служит выпрямленный через выпрямители для электрофореза белков крови стабилизированный ток от городской сети.

Провода от полюсов постоянного тока присоединяются к капиллярам полярного переключателя потенциометрического устройства, а затем – к неполяризуемым электродам камеры. Благодаря потенциометрическому устройству и полярному переключателю можно в любой момент изменить напряжение до нужных пределов, а также направление электрического тока в камере. Сила тока в камере регистрируется миллиамперметром.

В связи с тем, что электрическое поле в камере создается постоянным током, электроды должны быть неполяризуемыми. Кроме того, нельзя допускать, чтобы электролиты из электродного пространства проникали в измерительную ячейку. Для этого используются электродные системы: Zn/ZnSO<sub>4</sub>, Cu/CuSO<sub>4</sub>, Ag/AgCl и другие, соединенные с измерительной ячейкой агаровыми или желатиновыми сифонами. Использовать электроды из платины можно только при сравнительно низких плотностях электрического тока, тогда они ведут себя как обратимые. В то же время обратимые электроды типа Ag/AgCl обеспечивают использование гораздо больших плотностей электрического тока.

Если в камере с агаровыми или желатиновыми сифонами падение потенциала превысит 10-12 в/см, выделится значительное количество джоулевого тепла. В результате наступит разжижение агара или желатины и нарушится герметичность камеры.

Для изготовления агаровых или желатиновых сифонов используются растворы агара и желатины, соответственно 3 и 10%, в 10% растворе хлористого калия. Желательно перед заполнением сифон покрыть тонким слоем коллоида, высушить до образования на нем тонкой прозрачной

пленки и затем заполнить его раствором агара или желатины. Так удается обеспечить более прочное сцепление коллоида со стенками сифона. При заполнении сифонов в коллоидном пространстве не должны оставаться пузырьки воздуха.

Сифоны следует периодически перезаряжать, чтобы предупредить проникновение ионов металлов из электродного пространства в измерительную ячейку. После исследования их нужно хранить в насыщенном растворе хлористого кальция, а перед использованием промывать дистиллированной водой.

Для определения в микрокамерах ЭФП клеток крови необходимо знать величину градиента потенциала в том месте камеры, где ведется наблюдение за перемещением клеток. Наиболее удобно вычислять градиент потенциала по данным измерения удельной электропроводности среды и силы тока в камере. Между градиентом и силой тока существует отношение:

$$N=I/qx, \text{ где } N\text{- величина градиента потенциала в } \text{v}/\text{см},$$
$$q \text{ – поперечное сечение камеры в см}^2,$$
$$x \text{ – удельная электропроводность среды в } \Omega\text{-}1.$$

ЭФП исследуемых клеток будет равна:

$U=S/tN$ , где  $S$  - расстояние, на которое переместились исследуемые клетки в микронах;

$t$ - время в секундах, в течение которого клетки переместились на указанное расстояние;

$N$ -градиент потенциала в  $\text{v} \cdot \text{c}^{-1}$

$U$ -подвижность клеток в  $\mu \cdot \text{сек}^{-1} \cdot \text{v}^{-1} \cdot \text{см}$  ( $\text{мкм см В}^{-1} \text{ с}^{-1}$ ).

Исследуемые клетки получают из стабилизированной крови, предварительно отделив их от плазмы, трижды промывают 0,145M раствором хлористого натрия центрифугированием (при 3000 об/мин для эритроцитов), а затем один раз буферным раствором, который в

дальнейшем служит электрофоретической средой. Буферные растворы имеет заданные величины рН и ионной силы.

Концентрация клеточной взвеси в исследуемом буфере должна примерно соответствовать 0,05% суспензии. Если же она будет большей, возникнут затруднения с определением скорости перемещения клеток, станут возможными столкновения клеток между собой.

Заполняя камеру клеточной взвесью, необходимо следить за тем, чтобы в камере не было пузырьков воздуха, которые создают дополнительное сопротивление для проходящего электрического тока.

Наблюдают за перемещением клеток под микроскопом с окуляром 40x и менее. Источником света служат осветители с конденсорами темного поля.

Точное расстояние, на которое перемещаются клетки, определяется по окулярной микрометрической сетке, «цена» ее деления предварительно устанавливается для данного увеличения микроскопа с помощью микрометрической линейки. Дистанция, на которую перемещаются клетки, зависит от вида клеток, состава буферного раствора и градиента потенциала. Однако ее не следует слишком уменьшать, так как это отразится на точность измерений.

Рекомендуется наблюдать за перемещением 10-15 клеток. Измеряют время прохождения клеток определенного расстояния при фиксированной силе тока через ячейку. Скорость движения каждой клетки измеряется в трех направлениях: справа - налево, слева – направо и снова справа – налево. Общая ошибка измерений составляет 3%. Скорость движения каждой клетки во всех направлениях должна быть одинаковой. Разность полученных результатов свидетельствует о неисправности аппарата. Затем вычисляется средняя арифметическая ЭФП всех исследуемых клеток.

На воспроизводимость результатов оказывает влияние:

- 1 – плохая промывка аппарата после предыдущего исследования;
- 2 – использование старого, долго хранящегося буфера;

З–использование бывшего в многократном употреблении электродного раствора.

Кроме того при исследовании ЭФП клеток крови необходимо учитывать следующие теоретические положения.

Работы по определению ЭФП проводятся обычно в суспендирующей жидкости при физиологическом рН равном 7,0-7,4. При изменении его в ту или иную сторону в связи с усиливающейся ионизацией катионных или анионных групп наружной мембраны клетки наступает изменение ее заряда и соответственно ЭФП. ЭФП эритроцитов в ряду рН от 3,0 до 11,0 значительно изменяясь, достигает наибольшей величины при рН – 11,0. При сдвиги рН в щелочную сторону происходит диссоциация анионных групп на поверхности мембраны клетки в результате чего общий отрицательный заряд клеточной поверхности увеличивается и усиливается ЭФП. При сдвиге рН в кислую сторону, в связи с диссоциацией основных групп и подавлением диссоциации кислых групп, общий отрицательный заряд уменьшается и ЭФП падает. При определенных рН клетка теряет электрический заряд и ее ЭФП становится равной нулю (изоэлектрическая точка). По разным данным изоэлектрическая точка эритроцитов рН 2,0-3,9, лимфоцитов рН 1,9-2,0, нейтрофилов рН 2,0, тромбоцитов рН 3,2-3,9. Определение изоэлектрической точки эритроцитов сложно, так как при рН 3 начинается лизис клеток.

Роль пола, расы и группы крови не оказывает влияния на величину электрофоретической подвижности эритроцитов.

На ЭФП клеток оказывает влияние температура среды, при которой производится исследование. Повышение температуры на 1°С повышает ЭФП на 2%. При повышении силы тока с 2мА до 25 мА ЭФП повышается в 150 раз.

ЭФП эритроцитов зависит от возраста клеток: по мере старения клеток отрицательный заряд ее наружной мембраны уменьшается.



Исследование ЭФП клеток проводят с использованием стабилизированной крови. В качестве стабилизирующих растворов можно использовать 3,8% раствор цитрата натрия; 0,1 М раствор щавелевокислого натрия ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ); гепарин с соответствующим антисептиком. При соблюдении соотношений концентраций обычно используемых при заготовке крови (1 часть стабилизатора и 4 части крови) ЭФП эритроцитов в среднем существенно не меняется, и некоторые колебания находятся в пределах ошибки измерения.

На ЭФП эритроцитов оказывает влияние срок хранения образцов крови. ЭФП эритроцитов, независимо от применяемого стабилизатора, при хранении снижается. За сутки падение (при  $T=+4^\circ\text{C}$ ) составляет  $0,05 \text{ мкм} \cdot \text{см} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ , ко 2-м суткам  $0,1 \text{ мкм} \cdot \text{см} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ , к 4-м суткам снижается существенно достигая минимальных значений к концу второго месяца от взятия крови.

При применении глубокого замораживания наблюдается снижение ЭФП независимо от сроков хранения: у эритроцитов в незначительной степени и гораздо большей у лейкоцитов.

ЭФП отмытых эритроцитов несколько отличается от неотмытых. Отмытые эритроциты имеют более высокую ЭФП в сравнении с подвижностью неотмытых. Сам процесс отмывания эритроцитов не оказывает влияния на величину их ЭФП. ЭФП зависит от адсорбционных компонентов плазмы. Инкубация клеток с гамма-глобулинами вызывает понижение их ЭФП. Существует зависимость ЭФП эритроцитов от молекулярного веса полимера. С ростом молекулярного веса ЭФП эритроцитов закономерно уменьшается в связи с адсорбцией компонентов на клеточной поверхности с соответствующей маскировкой по крайней мере части отрицательного заряда.

ЭФП эритроцитов в среде содержащей собственную сыворотку составляет  $1,26-1,28 \text{ мкм} \cdot \text{см} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ . ЭФП эритроцитов суспензированных

в буферных растворах при pH 7,4 составляет 1,05-1,33 мкм •см •В<sup>-1</sup> •с<sup>-1</sup> в зависимости от вида используемого буфера.

Для контроля правильности результатов нужно до начала опыта в принятых стандартных условиях исследовать отмытые эритроциты крови здоровых людей или провести контрольные опыты по измерению ЭФП контрольной группы животных и только затем проводить исследование ЭФП клеток опытных групп.

Кроме изучения ЭФП эритроцитов микрометодом можно исследовать ЭФП лейкоцитов и тромбоцитов. Однако литература по методам определения ЭФП лейкоцитов и тромбоцитов не многочисленна.

#### Определение электрофоретической подвижности эритроцитов

##### Реактивы и материалы:

1) Агар: 2% агар в 0,1М КСl. Для приготовления 0,1 М КСl необходимо взять 372,5 мг КСl и развести в 50 мл дистиллированной воды, затем к полученному раствору добавить 1 г агара и прокипятить в колбе из термостойкого стекла с закрытым ватно-марлевым тампоном.

2) 5%раствор трехзамещенного цитрата натрия (С<sub>6</sub>Н<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>О<sub>7</sub> 5Н<sub>2</sub>О)

3) Трис НСl буфер: 1,21 г триса развести в 1-м литре предварительно приготовленного 0,9 % хлорида натрия. Довести pH раствора до 7,4 используя НСl.

4) 0,5 Н НСl. Для приготовления используют 4,15 мл конц. НСl и доводят до 100 мл Н<sub>2</sub>О.

5) Электроды. При использовании агаровых сифонов с электродами типа Ag/AgCl предварительно проводят хлорирование электродов, помещая их в 0,5 Н НСl и через полярный переключатель подсоединяют к источнику тока (сила тока 10мА). Замыкание цепи

производят по 30 сек на каждой полярности. Переключение полярного переключателя проводят 5 раз.

#### Забор крови:

1) Предварительно промывают капиллярную пипетку от аппарата Панченкова раствором цитрата натрия, затем набирают этот раствор до метки «Р» и выдувают его в центрифужную пробирку. Тем же капилляром из пальца набирают 2 раза кровь до метки «К» и спускают ее каждый раз в ту же пробирку. Хорошо перемешивают.

2) В центрифужную пробирку наливают 0,1 мл 0,1 М раствора щавелевокислого натрия и добавляют до 1 мл крови (разведение 1:9); либо 0,2 мл стабилизатора и 0,8 мл крови (соотношение 1 часть стабилизатора и 4 части крови).

#### Ход работы:

Пробирку с кровью полностью заполняют физиологическим раствором и центрифугируют при 3000 об/мин 10 мин, надосадочную жидкость сливают, а к осадку эритроцитов опять добавляют физиологический раствор и повторяют центрифугирование. Следующее центрифугирование осуществляют с буферным раствором, который в дальнейшем служит электрофоретической средой. После центрифугирования надосадочную жидкость сливают. Из осадка готовят взвесь эритроцитов, помещая в 10 мл трис HCl буфера 0,02-0,05 мл эритроцитов.

Заполняют камеру для электрофореза клеточной взвесью, таким образом, чтобы в камере не было пузырьков воздуха, закрывают капилляр покровным стеклом и в лунки камеры опускают электроды типа Ag/AgCl.

Наблюдают за перемещением 10 клеток в одной пробе под микроскопом с окуляром 40х. Фиксируют, с помощью секундомера, время перемещения эритроцитов на одинаковое расстояние, меняя полярным

переключателем полярность на электродах. Расстояние, на которое перемещаются клетки, определяется по окулярной микрометрической сетке.

Сила тока через ячейку

составляет 8-10мА. Используя формулу, по времени движения клеток, определяют ЭФП клеток.

Пример.

$U = \frac{12 \text{ мкм} \times 0,04 \text{ см} \times 0,094 \text{ А/см} \times В}{4,42 \text{ с} \times 0,008 \text{ А}} = 1,28 \text{ мкм} \times \text{см} / \text{В} \times \text{с}$ , где

4,42 с × 0,008 А

12 мкм – расстояние, на которое переместились клетки;

0,03 см – поперечное сечение камеры;

0,094 А/см×В – удельная электропроводность среды;

4,42 с – время перемещения клеток на указанное расстояние;

0,008 А – сила тока.

Электрофоретическая подвижность эритроцитов в качестве  
маркера адаптационных реакций организма

Методические рекомендации

Дерюгина Анна Вячеславовна  
Шабалин Михаил Александрович  
Грачева Елена Александровна

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского  
Национальный исследовательский университет  
603950, Нижний Новгород, проспект Гагарина, 23.

Подписано к печати. Формат 60×84 1/16  
Бумага офсетная. Печать офсетная. Гарнитура Таймс.  
Усл.печ.л. 1,5 Уч.-изд.л.  
Заказ. Тираж 100 экз.

Отпечатано в типографии госуниверситета им. Н.И.Лобачевского  
603600, г.Н.Новгород, ул. Большая Покровская, 37  
Лицензия ПД № 18-0099 от 14.05.01.