

азота, феррицианиды окисляют железо в гем до Fe³⁺, при этом нарушается транспорт O₂ и CO₂. Однако, эти нарушения обратимы и менее опасны, чем образование HbCO, поскольку железо легко превращается ферментами обратно в Fe²⁺.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мосур Е.Ю. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ "HemoSpectr" № 2001610571, Омский государственный университет (Россия). 17.05.2001.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОЙ МИКРОФЛЮОРИМЕТРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Голосеев Ю.А., Демченко Е.Ю.,
Щербакова К.В., Абакумова М.А.

*Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт,
Волгоградский государственный м
едицинский университет*

По богатству и разнообразию возможностей флюоресцентный анализ не имеет себе равных и становится наиболее распространенным как в исследовательской работе, так и в практической деятельности. С помощью флюоресцентного анализа можно определять аминокислоты, белки, витамины, стероиды, неорганические, лекарственные и токсические вещества, ферменты. В основу метода флюоресцентного определения ферментативной активности положено измерение интенсивности свечения люминесцирующих продуктов распада флюорогенных субстратов под действием фермента. К настоящему времени извещено свыше 50 ферментов обладающих соответствующими флюорогенными субстратами. Среди них такие ферменты как щелочная фосфатаза, β-галактозидаза, пероксидаза широко применяемые в иммуноферментном анализе для получения иммуноконъюгатов. Целью настоящего исследования явилась разработка метода количественной микрофлюориметрии для определения активности ферментов. В работе в качестве примера использовали щелочную фосфатазу ("Serva", Германия). Концентрация фермента составляла 1мкг/мл. Флюорогенными субстратами служили: 3-метилфлюоресцеинфосфат (МФФ) и 4 - метилумбеллиферилфосфат (МУФ). Флюорогенными субстратами пропитывали фильтры GF/A Whatman (Англия) и вырезали из них штампом диски диаметром 9 мм. Изготовленные из боросиликатной стекломикрофибры фильтры обладают высокой химической стойкостью при низкой собственной флюоресценции. Исследуемый ферментсодержащий препарат в карбонатном буфере рН 9,8 объемом 20 мкл наносили на диски, помещали в чашку Петри и инкубировали 15 мин при 37°C. Активность щелочной фосфатазы оценивали по интенсивности люминесценции образующихся продуктов гидролиза субстратов: метилфлюоресцеина и 4-метилумбеллиферона. Интенсивность флюоресценции измеряли с помощью люминесцентного микроскопа "Люам ИЗ" с фотометрической насадкой ФМЭЛ-1. При необходимости можно воспользоваться

световым микроскопом с люминесцентной насадкой ЛН-120. Длина волны возбуждения составляла 490 и 365 нм, регистрации - 510 и 430нм для метилфлюоресцеина и 4-метилумбеллиферона соответственно. При использовании в качестве субстрата метилфлюоресцеина применяли светофильтры возбуждения ФС1-4, БЗ-28, и СЗС-24, запирающие светофильтры микроскопа - ЖС18 + ЖС19, для 4-метилумбеллиферона – УФС1-4, БЗ-28 и СЗС-24, увеличение объектива микроскопа x10, увеличение окуляра x10. В качестве источника излучения использовали ртутно-кварцевую лампу высокого давления ДРШ 250-3. Приемником флюоресценции служил фотоумножитель ФЭУ-79. Измерение проводили зондом диаметром 0,5 мм, который в комплекте с примененным объективом микроскопа обеспечивал фотометрирование участка объекта диаметром 50 мкм. Сигнал с фотонасадки измеряли цифровым вольтметром Ш1310. Контролем служили диски без фермента. Минимально определяемая концентрация фосфатазы, при которой специфическое свечение дисков с ферментом достоверно превышало уровень контроля вдвое характеризовала чувствительность метода. Сравнительный анализ определения щелочной фосфатазы с различными субстратами показал, что использование флюорогенного субстрата МУФ позволяло выявлять 4нг/мл, а флюорогенного субстрата МФФ- 15 нг/мл фермента. Время необходимое для определения фермента составляло 25-30 минут. Аналогичным образом можно определять активность β-галактозидазы и пероксидазы, используя в качестве флюорогенных субстратов 4-метилумбеллиферил-β-D-галактопиранозид и гомованилиновую кислоту. Таким образом, предложенный метод количественной микрофлюориметрии отличается простотой, высокой чувствительностью, требует минимальных объемов реагентов, что позволяет рекомендовать его для использования в лабораторной практике для определения активности ферментов.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ ЛИМФОИДНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ ЖЕЛУДКА ПОД ВЛИЯНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ХИМИЧЕСКИХ ВАНН

Гусейнова С.Т.
Махачкала

Бальнеологические факторы по данным Ю.И. Бородин и соавт. (2004), Т.С.Гусейнова (2004) оказывают значительное влияние на строение и функции многих органов и систем. Однако до сих пор детальное изучение лимфоидных узелков желудка при воздействии сероводородных ванн не произведено. В связи с этим, мы на 30 белых крысах (15-контрольные, 15-экспериментальные) исследовали морфологические изменения лимфоидных узелков желудка в эксперименте с использованием современных анатомических и гистологических методов исследования.

Установлено, что при приеме сероводородных ванн у белых крыс в лимфоидных узелках достоверно ($p < 0,05$) увеличивается количество клеток лимфоидного в 1,44 раза, в том числе малые лимфоциты в 2,84 раза, средние лимфоциты в 1,60 раза, а большие

лимфоциты уменьшаются в 1,1 раза. Плазматические клетки (зрелые и незрелые) при воздействии сероводородных ванн увеличивается в 1,15 раза. Содержание макрофагов возрастает в 1,4 раза. На фоне относительного увеличения лимфоидных узелков умень-

шается процент стромальных клеток (ретикулярные, фибробласты) в 2,2 раза. Более подробные морфометрические и клеточные изменения приведены в таблице 1.

Таблица 1. Клеточный состав лимфоидных узелков пилорической части желудка у белых крыс (X ± Sx)

Клетки	Контроль	Сероводородные ванны
Стромальные	8,16 ± 0,79	3,73 ± 1,5
Большие лимфоциты	0,48 ± 0,13	0,47 ± 0,23
Средние лимфоциты	2,08 ± 0,37	3,33 ± 0,63
Малые лимфоциты	6,72 ± 1,27	19,13 ± 4,56
Плазмоциты	2,92 ± 0,5	3,93 ± 0,4
Макрофаги	0,52 ± 0,33	0,73 ± 0,43

ИЗМЕНЕНИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ И СИСТЕМНОЙ ГЕМОДИНАМИКИ В ОТВЕТ НА ТРАНЗИТОРНУЮ ГИПЕРКАПНИЮ И ГИПОКСИЮ У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

Заболотских Н.В.

Кубанская государственная медицинская академия

С помощью дыхательных проб можно изучить реакцию периферической и системной гемодинамики в ответ на изменения метаболических факторов. При пробе Штанге (ПШ) наблюдается транзиторная гипоксия, гипо- и гиперкапния, возникают рефлекторные реакции в ответ на возбуждение механорецепторов легких, диафрагмы, межреберных мышц, плевры. В доступной нам литературе не найдены сведения о взаимоотношениях параметров системного кровообращения с характеристиками периферической гемодинамики, что явилось основанием для проведения данного исследования.

Цель. Выявление взаимоотношений между показателями периферического кровотока и системной гемодинамики в покое и при транзиторной гиперкапнии и гипоксии.

Материалы и методы исследования. Обследовано 11 практически здоровых мужчин в возрасте 20-26 лет. Испытуемый находился в горизонтальном положении в состоянии спокойного бодрствования с закрытыми глазами. Производилась параллельная регистрация характеристик периферического кровотока (Vsist, Vdiast. лучевой артерии с расчетом Vmean, RI, RI по стандартной методике с помощью доплерографа «Сономед» - 315/М) и системной гемодинамики (АДс, АДд, ЧСС, САД, УИ, СИ, ОПСС, вегетативного индекса Кердо (ИК)) с помощью монитора Philips – М3046А.

Продолжительность исследования до и после ПШ (произвольное пороговое апноэ на высоте максимального вдоха) составляла 10 мин, фиксировалось от 15 до 20 значений показателей системной и периферической гемодинамики (количество регистраций было ограничено продолжительностью измерения АД). Статистический анализ осуществлялся методом ранговой корреляции Спирмена (* - достоверность корреляционной связи $p < 0,05$). Обработка данных производилась с помощью программного обеспечения Microsoft Excel для Windows XP.

Результаты. Изучение корреляционной зависимости между показателями системной и периферической гемодинамикой показало, что до ПШ преобладали слабые связи (67,1%), сильные связи составили лишь 1,6%. Достоверные связи наблюдались между Vsist и АДс, ЧСС ($r = -0,84^*$, $r = -0,70^*$ соответственно), Vdiast и УИ, СИ, ОПСС, ИК ($r = -0,71^*$, $r = -0,80^*$, $r = 0,74^*$, $r = -0,75^*$ соответственно), Vmean и СИ ($r = 0,74^*$), RI и СИ, ОПСС, ИК ($r = 0,76^*$ – $0,82^*$, $r = -0,72^*$, $r = 0,73^*$ соответственно), RI и УИ, СИ, ОПСС, ИК ($r = 0,72^*$, $r = 0,70$ – $0,81^*$, $r = -0,75^*$, $r = 0,76^*$ соответственно).

После проведения ПШ увеличилось количество средних по силе связей до 43,3%, количество сильных связей практически не изменилось (1,7%). Достоверные связи наблюдались между Vsist и ЧСС ($r = -0,78^*$), Vdiast и УИ ($r = -0,73^*$), Vmean и УИ ($r = -0,71^*$), RI и ЧСС, УИ ($r = 0,85^*$, $r = 0,72^*$ соответственно), RI и УИ ($r = 0,71^*$). Ослабление отрицательной связи является маркером напряжения регуляторных систем в ответ на гиперкапнию и гипоксию.

Практически у всех обследуемых во время ПШ отмечалось снижение показателей линейной скорости кровотока в лучевой артерии и повышение показателей периферического сосудистого сопротивления, что свидетельствовало о рефлекторной симпатической активации. После пробы показатели кровотока возвращались к исходному уровню. При этом отмечалось увеличение АДд, САД, а изменения АДс и ЧСС имели разнонаправленный характер. У 71,4% исследуемых отмечалось снижение УИ, СИ и ИК с параллельным возрастанием ОПСС, что свидетельствовало о преобладании гиподинамия кровообращения в сочетании с нарастанием парасимпатического тонуса. Но данная реакция наблюдалась не у подавляющего числа исследуемых, по всей видимости, в связи с неоднородностью исследуемых по продолжительности произвольного порогового апноэ, нейрорефлекторной регуляции сердечно-сосудистой системы, толерантностью здоровых людей к транзиторной гипоксии, гиперкапнии.

Таким образом, преобладание слабых корреляций между показателями системной и периферической гемодинамики в покое и выявленные разнонаправленные сдвиги их в ответ на транзиторную гиперкапнию и гипоксию у здоровых людей свидетельствуют о неоднородности регуляторных механизмов в обеспе-