

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ ИМПЕДАНСА ТКАНЕЙ МЫШЕЙ
ПРИ СТРЕССЕ И ХИМИЧЕСКОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

биологического факультета

Исмагуловой Альбины Булатовны

Научный руководитель
Доцент кафедры биохимии и
биофизики, к.б.н., доцент

*Илья
20.05.2018*

И.К. Миронова

Зав. кафедрой биохимии и
биофизики, д.б.н., профессор

*С.А. Коннова
20.05.2018*

С.А. Коннова

Саратов, 2018

Актуальность. На сегодняшний день проблемы диагностики и терапии опухолей желудочно-кишечного тракта привлекают большое внимание исследователей и врачей практиков из-за широкой распространенности и высокой смертности пациентов. Причем, имеет место региональная дифференциация в частоте встречаемости той или иной формы рака. Возможно, эта региональная приуроченность связана с существованием в сходных условиях и воздействии неблагоприятных экологических факторов. Этот полиморфизм опухолей усложняет раннюю диагностику рака и, как следствие, снижает перспективы выявления рака на ранних стадиях.

Одним из подходов, позволяющих решить эту проблему, возможен биоимпедансный анализ, который основан на измерении полного электрического сопротивления биологических тканей, который напрямую зависит от гистологического строения объекта исследования, интенсивности кровотока, биохимических реакций и степени альтерации исследуемой ткани.

В настоящее время электроимпедансометрия внедрена в медицинскую практику как неинвазивная методика, которая позволяет получать информацию при отсутствии существенного повреждающего воздействия на организм или риска развития осложнений. Метод сравнительно прост в исполнении и недорог, это является существенным преимуществом перед традиционными методами неинвазивного контроля за состоянием организма. Он дает возможность оценки широкого спектра морфологических и физиологических показателей и основан на наличии закономерностей, связывающих значения импеданса с параметрами компонентного состава тела, при оценке количества жидкости в объекте.

Целью данного исследования явилось изучение особенностей изменения электросопротивления тканей мышей в условиях хронического светового и химического стресса.

В связи с этим были поставлены следующие задачи, выносимые на защиту:

1. Определить, как изменяются электрические показатели тканей стрессированных мышей на фоне введения м-толуидина в сочетании с

- раствором нитрита натрия в воде.
2. Обнаружить изменения электрических характеристик клеток желудка, печени и эритроцитов мышей при разных видах стресса.
 3. Обосновать полученные результаты, установить эффективность метода импедансометрии для оценки светового и химического стресса.

Для решения задач практического характера был использован метод импедансометрии, позволяющий выявить наличие патологии на ранних этапах ее развития.

Структура бакалаврской работы. Выпускная квалификационная работа состоит из пяти частей: введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Основная часть включает в себя три раздела: обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований. Раздел обзор литературы состоит из четырех подразделов: общие сведения о биоимпедансном анализе, метод измерения пассивных электрических свойств тканей, применение метода измерения импеданса в медицине и биологии, биологические мембранны. Раздел материалы и методы состоит из трех подразделов: объекты исследования, условия моделирования процесса опухолеобразования, метод импедансометрии.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования.

Объекты исследования: Для моделирования процесса опухолеобразования были использованы самцы мышей линии BALB/c в возрасте 6 месяцев в длительном эксперименте. Экспериментальные животные были разделены на 3 группы: 1 - контрольную; 2 - опытную, мыши которой подвергались световому стрессу; 3 - опытную, мыши которой подвергались световому стрессу и химической интоксикации; по 20 особей в каждой.

Приборы и материалы: Органы извлекали при вскрытии и использовали для импедансометрии, желудки отмывали физиологическим раствором, подсушивали и измеряли импеданс ткани. Импедансометрию выполняли на

установке, состоящей из генератора сигналов Г6-27, цифрового вольтметра В7-27 А/1, блока питания К762 и кюветы. Прибор предназначен для измерения величины импеданса в диапазоне частот 1 Гц- 1 МГц.

Условия моделирования процесса опухолеобразования: Токсикация у мышей вызывалась кормлением пищей, содержащей м-толуидин (25 мг/кг живого веса) в сочетании с раствором нитрата натрия в воде (0,2%) в течении 6 месяцев. Мышей выводили из эксперимента декапитацией без наркоза через 6 месяцев от начала эксперимента, исследовали образцы тканей желудка, печени, эритроцитов.

Метод импедансометрии: Оценку состояния биомембран проводили методом импедансометрии. Суспензия клеток вносится в измерительную кювету, через которую пропускается переменный ток. При помощи переключателя производилось измерения U_{in} и U_{out} , измеряемое в мВ, на частотах 10, 100, 1000, 10000, 100000, 1000000 Гц. Значение величины

импеданса в кОм вычислялось по формуле: $Z = \frac{R_0}{\sqrt{\frac{U^2_{in}}{U^2_{out}} - 1}}$, где U_{in} — входное

напряжение; U_{out} — выходное напряжение; R_0 — образцовое сопротивление, равное 4,99 кОм. Затем строились дисперсионные кривые изменения импеданса эритроцитов, гепатоцитов и клеток тканей желудка.

Строились дисперсионные кривые с подсчетом коэффициента поляризации. Достоверными считали различия для $p < 0,01$. Данные, полученные при измерении показателей импеданса тканей контрольных животных использовали в качестве физиологической нормы при оценке степени поражения тканей. Кп рассчитывали по формуле: $Kp = \lg Z_{10000\text{Гц}} / \lg Z_{1000000\text{Гц}}$.

Экспериментальные исследования проводились на базе кафедры биохимии и биофизики Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского, в 2017-2018 гг.

Обсуждение результатов исследования.

Современные исследования подтверждают немаловажную роль стрессовых факторов в формировании предраковых состояний ЖКТ. Несмотря на то, что рак желудка – достаточно частая патология, механизмы формирования и факторы, влияющие на возникновение онкологических заболеваний желудочно-кишечного тракта, до сих пор слабо изучены. Кроме того, крайне мало разработано клинических биомаркеров для ранней диагностики рака желудка, из-за низкой чувствительности и специфичности. Поэтому своевременная диагностика предраковых состояний больных и выявление показателей, коррелирующих с динамикой канцерогенеза и позволяющих исследовать механизм развития процесса на тканевом и клеточном уровнях, является актуальной задачей.

Из широкого спектра стрессовых факторов, действию которых подвергается человек, особо следует отметить те, которые нарушают циркадные ритмы. С изобретением электричества и началом повсеместного его использования в домах для освещения человек искусственно увеличивает время бодрствования. Это приводит к изменению в интенсивности синтеза мелатонина. Мелатонин, помимо того, что является регулятором суточных ритмов организма, обладает способностью связывать свободные радикалы, образующиеся в ходе перекисного окисления. Пик синтеза мелатонина в норме приходится на 2 часа ночи по местному солнечному времени. Избыток света снижает секрецию мелатонина, в то время как снижение освещённости приводит к увеличению синтеза этого гормона.

Другим важным стрессовым фактором является перенаселённость – состояние популяции, при котором численность особей превышает величину, соответствующую условиям нормального существования. С учётом темпов роста населения данный фактор также является весьма значимым в современном мире.

Среди прочих канцерогенов, с которыми организм человека сталкивается повседневно можно выделить пищевые добавки. Чаще всего эти

соединения используют в качестве консервантов и усилителей вкуса и цвета продуктов. К таким, например, относят нитриты (Е250), которые в желудочно-кишечном тракте под действием кислой среды желудочного сока вступают в реакции с вторичными аминами с образованием нитрозаминов, соединений которые обладают выраженным канцерогенным действием.

Исходя из этого, нами были предложены две модели индуцирования предраковых состояний: химический канцерогенез на фоне избыточной освещённости и на фоне перенаселённости. Избыточная освещённость создавалась путём постоянного действия света интенсивностью 800 люкс. В нашем эксперименте был смоделирован процесс опухолеобразования на самцах мышей линии BALB/c. Для перенаселения были сформированы группы животных с плотностью населения 50 животных на 1 м². Мышей подвергали стрессу в виде постоянного освещения и токсикации кормлением пищей, содержащей м-толуидин (25 мг/кг живого веса) в сочетании с раствором нитрита натрия в воде (0,2 %) в течение 6-ти месяцев. Животных из контрольной и опытных групп выводили из эксперимента декапитацией, исследовали электрические показатели образцов эритроцитарной массы, тканей печени и желудка. По результатам вскрытия было обнаружено что, у 85% животных обнаружены множественные поражения кишечника в форме полипов, у 45% наблюдали поражения желудка, причём у 35% случаев - это язвы и полипы в желудке, у 10% - опухолевидные новообразования в желудке, у 5% - в печени

Исследования показали, что сочетанное токсическое и стрессорное воздействие на животных в течение 6 месяцев приводит к наиболее существенному снижению величины импеданса в эритроцитарной массе. Результаты представлены на рисунке 1, из которого видно, что достоверные различия в величине и крутизне дисперсионных кривых по сравнению с контролем характерны для 3 группы животных, к которым применялось сочетанное действие стресса и химической интоксикации.

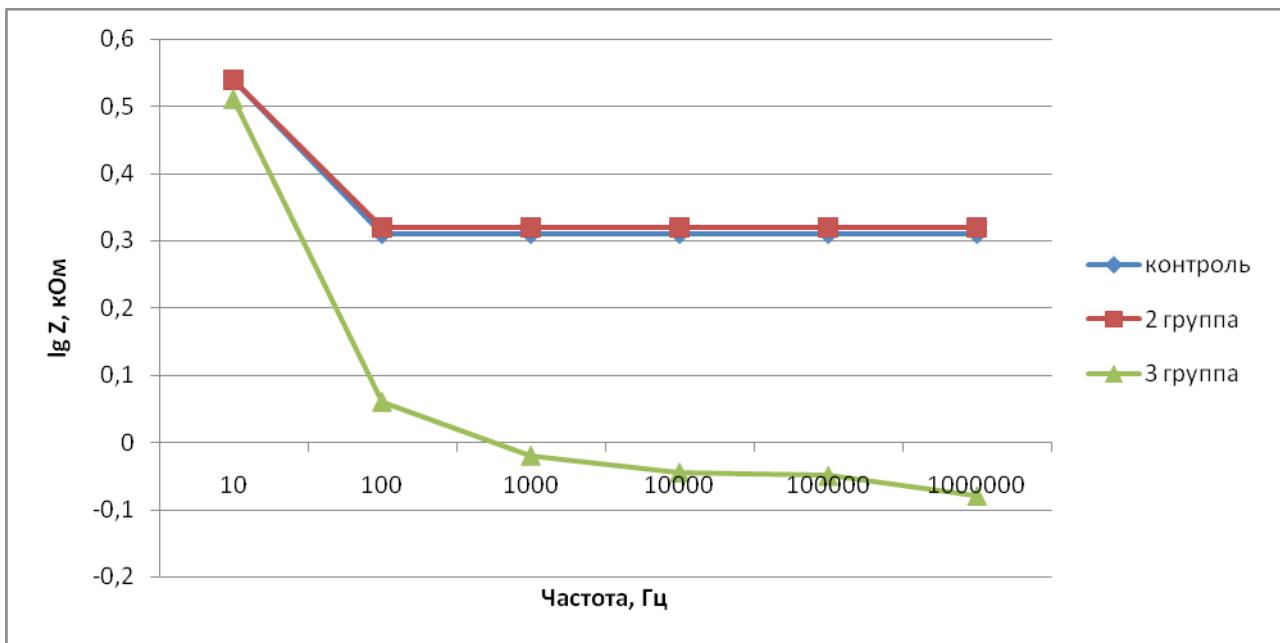


Рисунок 1 - Кривые дисперсии величины импеданса эритроцитов контрольной и опытных группах.

Низкие значения импеданса свидетельствуют о высокой электропроводности эритроцитов, что может быть связано с сильными повреждениями структуры мембран. Об этом свидетельствует и низкий показатель K_p (рисунок 2).

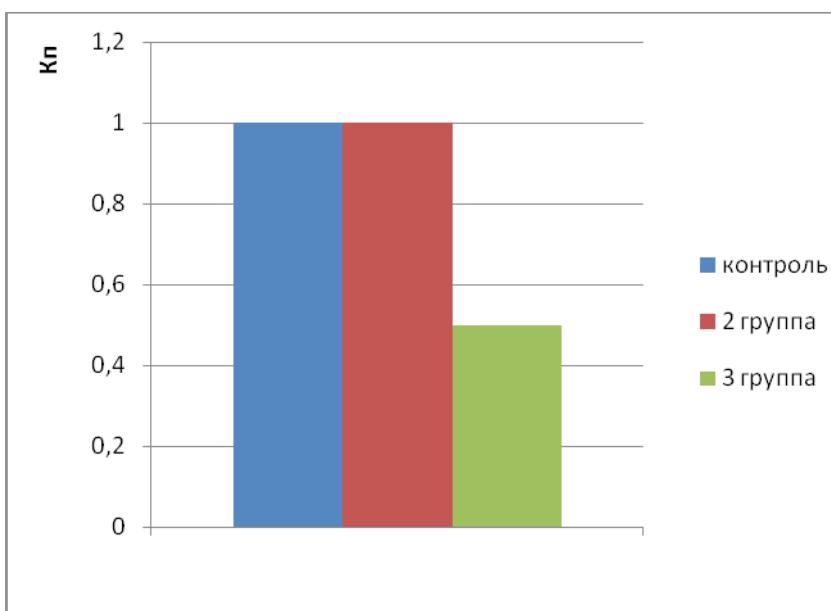


Рисунок 2 - Показатели коэффициента поляризации в эритроцитах.

При исследовании величин импеданса клеток печени обнаружено повышение крутизны дисперсионной кривой по сравнению с контролем как во второй так и в третьей группе животных (рисунок 3).

При подсчете коэффициента поляризации в этих группах достоверных различий выявлено не было (1 группа – 4,06; 2 группа – 4,41; 3 группа – 4,41) По нашим предположениям это может свидетельствовать о том, что длительное влияние стрессорного фактора и интоксикации приводит к уплотнению мембран гепатоцитов и снижению их электропроводности.

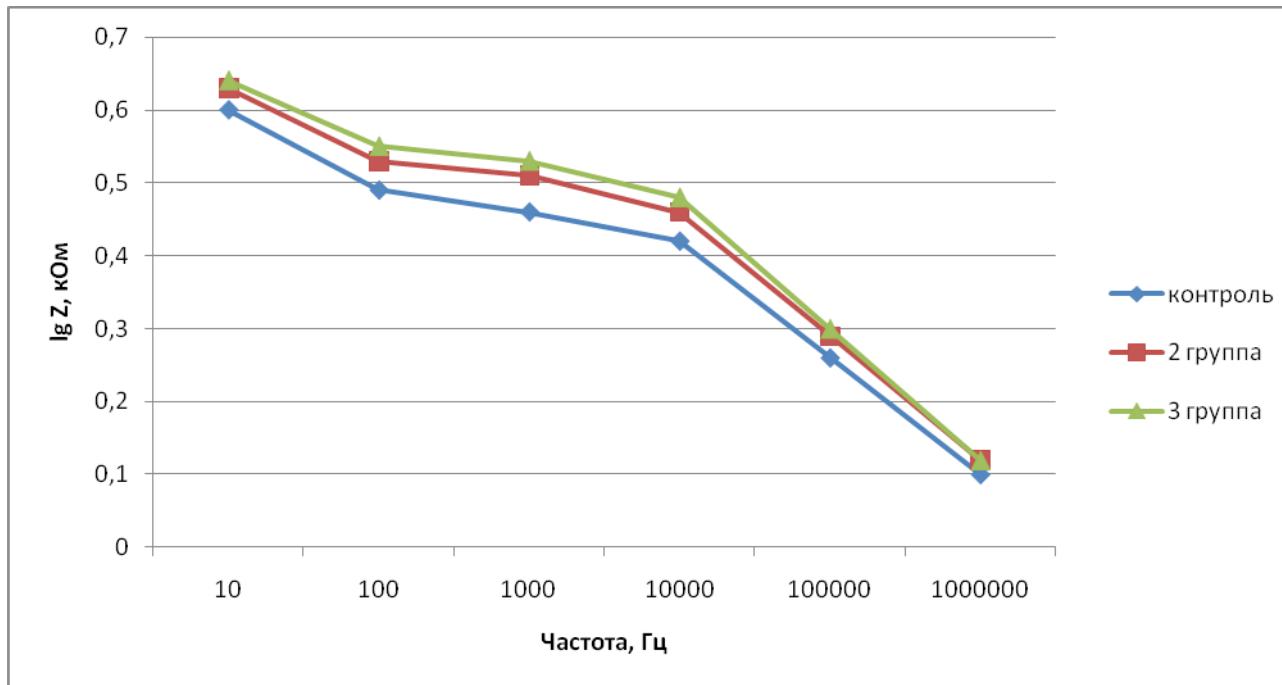


Рисунок 3 - Дисперсионные кривые изменения импеданса гепатоцитов в трех группах животных.

При исследовании общего сопротивления в клетках желудка было обнаружено что дисперсионные кривые тканей второй группы животных располагаются достоверно ниже контрольных значений а в третьей группе достоверно выше (рисунок 4). Но значения K_p в этих группах достоверно ниже контрольных (1 группа -2,87; 2 группа – 1,11; 3 группа – 1,31). Это может свидетельствовать о том, что под действием стресса в клетках желудка происходит увеличение электропроводности связанной с изменением проницаемости мембран клеток и к увеличению выхода свободных ионов. А под действием длительной интоксикации приводящей к появлению новообразований наоборот уплотнению мембранны и снижению электропроводности. Понижение K_p в этих группах свидетельствует о развитии патологического процесса в них приводящего к снижению

жизнеспособности этих тканей, изменению их химического состава и проницаемости (рисунок 5).

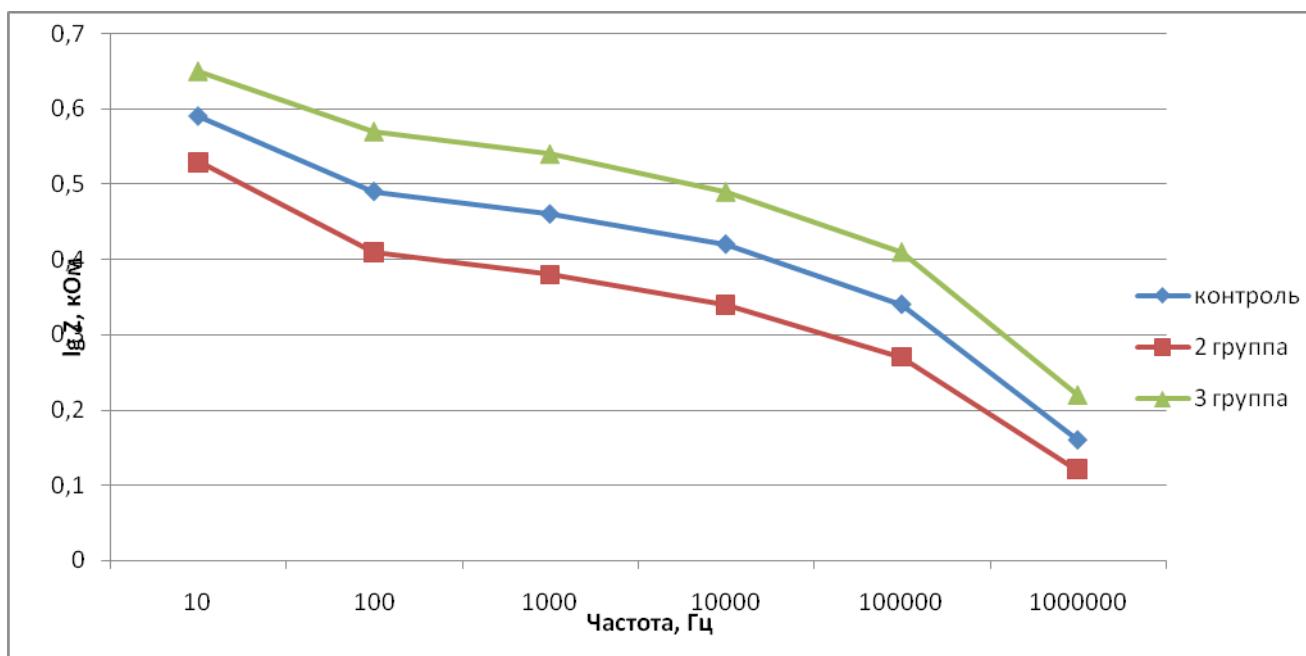


Рисунок 4 - Дисперсионные кривые величин импеданса желудка в трех группах животных.

Наблюдаемое убывание сопротивления при токсическом воздействии может быть связано с характерным для воспаления набуханием клеток, уменьшением сечения межклеточных промежутков. При измерениях на низких частотах основное сопротивление определяется таковым именно межклетников. При дальнейшем развитии патологии изменяется химический состав тканей, увеличивается проницаемость мембран для ионов, что ведет к уменьшению электроемкости и сопротивления клеток и, в конечном счете, к значительному снижению импеданса и падению крутизны дисперсии, что может свидетельствовать о развитом токсическом процессе. Данные исследования импеданса коррелируют с формированием у животных при длительном токсическом воздействии опухолей кишечника и предраковых патологий желудка.

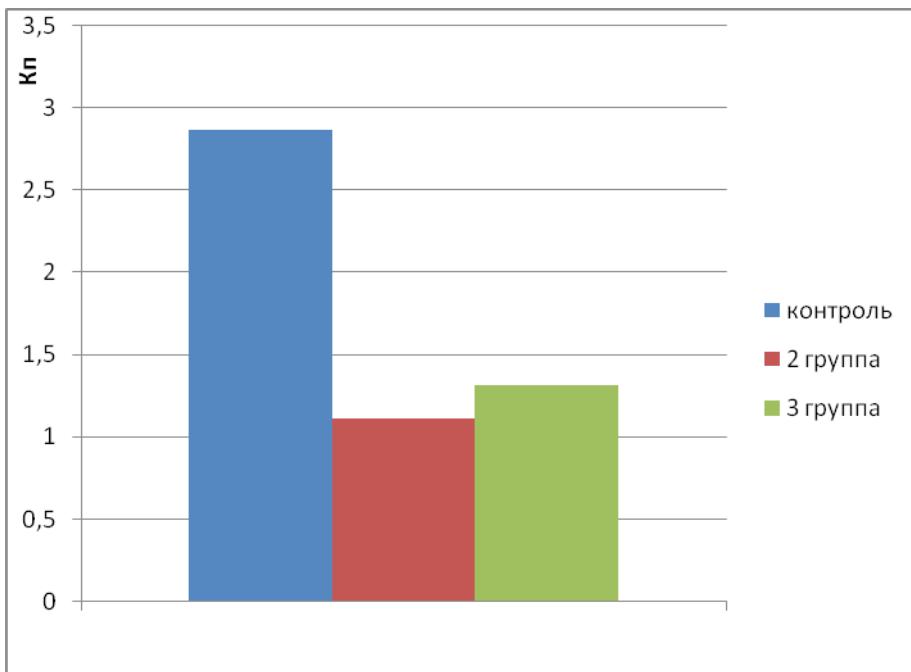


Рисунок 5 - Показатели коэффициента поляризации в клетках желудка.

В ходе эксперимента животные в опытных группах становились менее активными в отличие от контрольных групп, что может свидетельствовать о развитии патологических процессов под действием стрессовых факторов и химических соединений.

Электросопротивление биологических объектов тесно связано как со свойствами клеточных мембран, так и со свойствами клеточных и межклеточных жидкостей, поэтому получить сведения о явлениях, происходящих в тканях можно наблюдая за относительным изменением этого параметра. Развитие патологического процесса вызывает изменения в проницаемости мембран, увеличении ионных потоков, набухании и сжатии клеток, что немедленно отражается на величинах сопротивления изучаемых тканей. Известно, что общее сопротивление тканей (импеданс) изменяется в зависимости от частоты тестирующего тока, причем кривая дисперсии имеет сравнительно плавный ход, то есть импеданс тканей вне зависимости от ее специализации понижается с увеличением частот.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Общее сопротивление (импеданс) зависит от степени повреждения живой ткани и отражает широкий круг электромагнитных процессов, в том числе и индуктивных, в биологических объектах, служит показателем уровня обмена (жизнеспособности) ткани. В нашем случае продемонстрированы возможности метода импедансометрии в характеристике состояния тканей желудка и печени при индуцировании процесса развития предраковых состояний.

Очевидно, что разрушение клеточных мембран, вызванное воздействием синтезированных в желудке нитрозаминов, как результат совместного потребления нитритов и аминов, приближает показатели импеданса плотных тканей к показателям импеданса жидких сред. При дальнейшем развитии патологии изменяется химический состав тканей, увеличивается проницаемость мембран для ионов, что ведет к уменьшению электроемкости и сопротивления клеток и, в конечном счете, к значительному снижению импеданса, что может свидетельствовать о развитом токсическом процессе. Об этом же свидетельствуют понижение Кп тканей со временем воздействия, показателя.

Известно, что импеданс тканей испытывает дисперсию в зависимости от частоты тестирующего тока, причем кривая дисперсии имеет сравнительно плавный ход, то есть импеданс тканей вне зависимости от ее специализации понижается с увеличением частот.

В проведённых экспериментах выявленная частотная дисперсия тканей контрольных животных, которая укладывается в общие представления о закономерностях изменения импеданса плотных клеточных тканей, имеющих полупроницаемые клеточные и внутриклеточные мембранны, создающие препятствия для свободного распространения тока. В результате по частотной дисперсии сопротивления можно судить о соотношении вне- и внутриклеточной жидкости в тканях, а в желудке – о свойствах слизистой оболочки.

Полученные в ходе исследований результаты позволяют провести сравнительный мониторинг тканей модельных животных – грызунов, и выбрать наиболее характеристические частоты для измерения импеданса с целью прогнозирования состояния эпителия желудка, тканей печени и эритроцитарной массы при токсическом воздействии

ВЫВОДЫ

1. Изменения величины импеданса хорошо согласуются с формированием у мышей линии BALB/c при длительном токсическом и стрессорном воздействии опухолей кишечника и предраковых патологий желудка;
2. Установлено, что индуцирование образования патологии желудочно-кишечного тракта воздействием на протяжении 6 месяцев нитритами и амином, достоверно изменяют значение дисперсии импеданса на всех частотах по сравнению с контролем в эритроцитах и в клетках желудка и печени;
3. Определено, что понижение Кп в большей степени выражено в эритроцитах, это указывает на их меньшую устойчивость к воздействиям токсических веществ;
4. Обнаружено, что по расположению дисперсионных кривых величин импеданса тканей опытных животных по отношению к контролю можно судить о различных воздействиях на них стрессорного и токсического факторов.

Над