

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

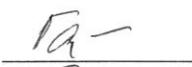
**СОЧЕТАННОЕ ДЕЙСТВИЕ КВЧ-ОБЛУЧЕНИЯ НА ЧАСТОТАХ  
МОЛЕКУЛЯРНОГО СПЕКТРА ОКСИДА АЗОТА (NO) И ДОНОРОВ  
NO-ГРУППЫ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕМБРАНЫ  
ЭРИТРОЦИТОВ**

АВТОРЕФЕРАТ ДИПЛОМНОЙ РАБОТЫ

студентки 5 курса 531 группы  
специальности 06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика  
биологического факультета  
Китаевой Алены Александровны

Научный руководитель:

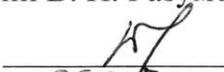
доцент, к.б.н.

  
05.06.2018 А.А. Галицкая

Научный консультант:

зав. кафедрой биохимии СГМУ имени В. И. Разумовского

д.м.н., профессор

  
05.06.2018 В.Б. Бородулин

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,

д.б.н., профессор

  
05.06.2018 С.А. Коннова

Саратов, 2018

**Введение.** Эритроциты являются хорошей моделью для изучения состояния клеточных мембран. Электрические показатели (сопротивление и электропроводность) клеток в норме являются постоянными величинами. Уменьшение резистентности клетки и усиление тока ионов через эритроцитарную мембрану может говорить о снижении функциональной способности и жизнестойкости клеток.

Существует целый ряд факторов, оказывающих влияние на состояние мембраны эритроцитов. К ним относится оксид азота (II). NO является важнейшим клеточным метаболитом, имеющим полифункциональное действие. Концентрация NO является главным фактором, обуславливающим его биологический эффект. Высокие концентрации NO оказывают цитотоксическое действие на любую клетку. В низких концентрациях NO способен активировать  $Ca^{+}$ -АТФазу и препятствовать эритроцитозису, что еще раз доказывает важную роль NO в поддержании нормального состояния мембраны и актуальность данного исследования.

В тоже время в медицине нашло широкое применение низкоинтенсивное электромагнитное излучение (ЭМИ) крайне высоких частот (КВЧ) на частоте молекулярного спектра излучения и поглощения (МСИП) NO (150 ГГц). Существует предположение, что КВЧ взаимодействует с молекулами эндогенного NO в эритроцитах и/или увеличивает продолжительность его существования в клетках, за счет активации NO-синтазы. Также обнаружено, что КВЧ-излучение нетепловых интенсивностей приводило к улучшению барьерных свойств мембран и увеличению электрической прочности эритроцитов.

Точный молекулярный механизм влияния КВЧ-излучения и мексидола на морфологию мембран эритроцитов не ясен, что подчеркивает новизну данной работы. Одним из предположительных механизмов действия данных агентов может являться их воздействие на ионную проницаемость мембраны эритроцитов.

Исходя из вышесказанного, целью данного исследования явилось изучение влияния КВЧ-облучения на частоте МСИП NO (150 ГГц) с участием нитропруссид натрия на электросопротивление эритроцитов.

Для реализации поставленной цели в ходе исследования были поставлены и решались следующие задачи:

1. Оценить изменение импеданса эритроцитов мышей при разном времени воздействия КВЧ-облучения и разных концентрациях нитропруссид натрия.
2. Выявить эффект совместного действия КВЧ-облучения и нитропруссид натрия на величину электросопротивления эритроцитов мышей.
3. Оценить влияние мексидола на величину электросопротивления эритроцитов мышей.
4. Сравнить действие КВЧ-излучения и мексидола на форму красных клеток крови мышей.

### **Основное содержание работы.**

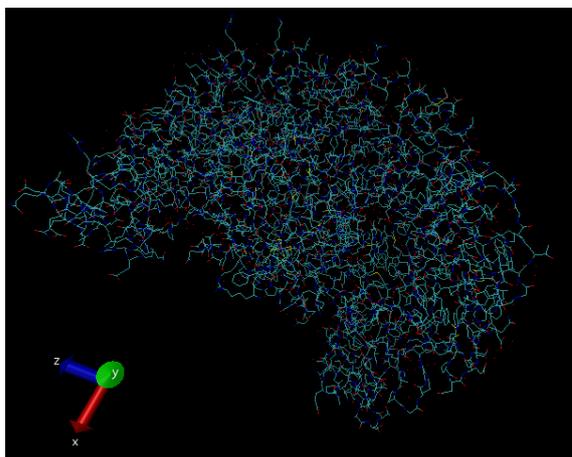
Структура работы обусловлена целью и задачами исследования, включает введение, три раздела (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты и их обсуждение), заключение, список использованных источников и три приложения.

Обзор литературы состоит из 20 подразделов. Проанализировано 49 источников отечественных и иностранных авторов. Они составили теоретическую и методологическую основу исследования. Также здесь представлены результаты биоинформатического исследования ферментов синтеза оксида азота (NO).

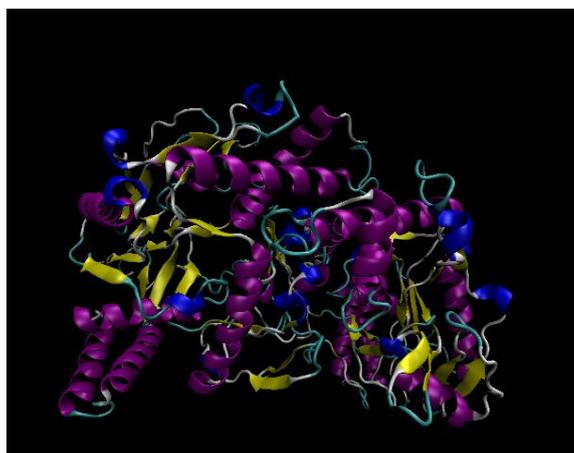
В разделе Материалы и методы исследования описана структура экспериментов, перечислены основные методики. Объектом исследования являлась кровь самцов беспородных белых мышей массой 30 г. Для изучения электрических свойств эритроцитов мышей использовался метод импедансометрии, а цитологический анализ проводили с помощью световой иммерсионной микроскопии.

В разделе Результаты и их обсуждение представлен экспериментальный материал и анализ полученных результатов.

Эндогенный оксид азота непрерывно синтезируется в организме человека и животных ферментами NO-синтазами, делящимися на 3 вида в зависимости от места локализации. В связи с этим нами был проведен анализ пространственной структуры молекулы фермента эндотелиальной NO-синтазы с помощью программы Visual molecular dynamics (VMD). VMD – это компьютерная программа молекулярного моделирования и визуализации. Путем построения 3D модели молекулы фермента мы рассмотрели структуры белка в различных видах представления молекулы: полноатомное представление, ленточная структура, поверхность белковой молекулы (рисунок 1).



а



б

Рисунок 1 – Полноатомное представление (а) и ленточная структура (б) молекулы бычьей эндотелиальной NO-синтазы.

Экспериментальное исследование влияния различных факторов на морфологию эритроцитов мышей включало в себя 2 блока опытов.

Первый блок исследований касался цитологического исследования мазков крови после облучения ее КВЧ в разных временных диапазонах или добавления раствора мексидола. Поскольку при внутривенном и внутримышечном введении препарата в дозе 400-500 мг его концентрация в крови составит примерно 5 мМ, целесообразно было исследовать близкий диапазон концентраций мексидола: 1,5; 2; 3; 4; 6; 8 и 12,5 мМ. Инкубирование

эритроцитов с мексидолом в каждой концентрации производили в течение 15 и 30 мин.

Основным критерием для оценки воздействий на эритроциты КВЧ-облучения на частоте МСИП NO, доноров NO-группы и мексидола была выбрана дисперсия импеданса. Поэтому второй блок исследований включал измерение импеданса эритроцитов мышей после:

- КВЧ-облучения в течение 5, 10 и 15 мин;
- добавления NO-донора в концентрациях  $10^{-4}$ М и  $10^{-6}$  М;
- совместного действия облучения ЭМИ на МСИП NO в течение 15 мин и нитропруссид натрия в концентрации  $10^{-6}$  М;
- воздействия раствора мексидола в концентрации 12,5 мМ в течение 15 мин и 6 мМ в течение 30 мин.

Каждый эксперимент был проведен в двух повторностях. По окончании облучения или инкубации отмытые эритроциты помещали в кювету прибора для импедансометрии и проводили измерение электросопротивления (Z) в двух аналитических повторах. По результатам эксперимента был проанализирован характер изменения дисперсионной кривой импеданса.

Результаты импедансометрии укладывались в нормальное распределение данных, поэтому достоверность различий между средними значениями в контрольной и опытной группах устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента.

В качестве экзогенного NO-донора использовали нитропруссид натрия - периферический вазодилататор с антигипертензивным эффектом. Выбор рабочих концентраций был также осуществлен на основе анализа литературных данных. Результаты ряда проведенных ранее исследований показали, что нитропруссид в концентрации  $10^{-6}$ М вызывал достоверное увеличение степени деформируемости эритроцитов и не стимулировал работу калиевых каналов, а в больших концентрациях ( $10^{-4}$ М) приводил к снижению деформируемости и блокаде работы калиевых каналов.

В проведенном нами исследовании КВЧ-облучение или добавление НО-донора приводили только к увеличению или уменьшению величины  $Z$ , однако характер изменения кривой оставался практически неизменным, что может свидетельствовать о том, что произошедшие изменения не носят критического характера для клеток.

КВЧ-облучение в течение 5 мин не вызывало достоверного изменения величины  $Z$  по сравнению с контрольными образцами, аналогичная картина наблюдалась и при 10, 15 мин экспозиции. Такой результат может объясняться тем, что, согласно литературным данным, нормализующий характер КВЧ-излучения приводит в норму только отклонившиеся физиологические параметры. Параметры интактных образцов, находящиеся в норме, не реагируют на облучение. Проведенные нами цитологические исследования мазков крови после облучения ЭМИ также показали отсутствие негативных эффектов на эритроцитарную мембрану.

Добавление нитропрусида натрия в концентрации  $10^{-4}$  М не приводило к достоверным изменениям сопротивления эритроцитов. Следует отметить, что в более низкой концентрации ( $10^{-6}$  М) нитропруssid приводил к увеличению сопротивления и, соответственно, снижению электропроводности мембран эритроцитов (рисунок 2).

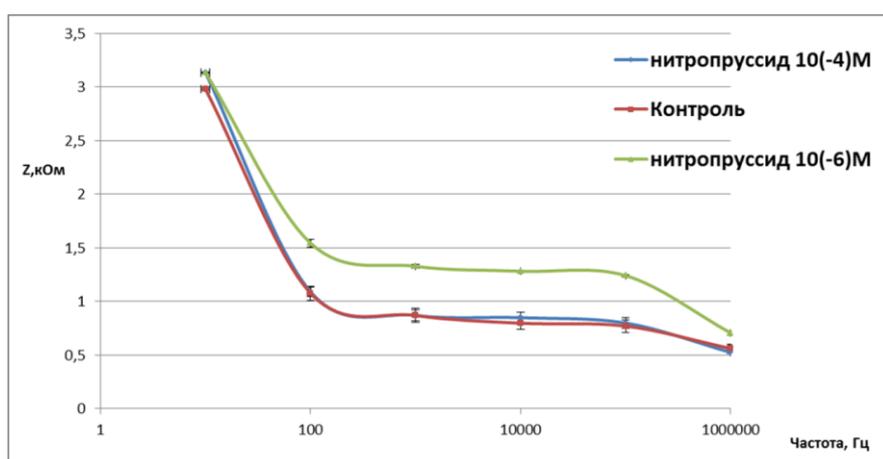


Рисунок 2 - Влияние нитропрусида натрия в концентрациях  $10^{-4}$  М и  $10^{-6}$  М на величину импеданса эритроцитов мыши.

Это может объясняться дозозависимыми эффектами нитропруссидов на деформируемость и работу калиевых каналов. Также известен факт, что мембрана эритроцитов проницаема для анионов и непроницаема для катионов и гемоглобина, за счет этого они участвуют в регуляции ионного состава плазмы. Поэтому, возможным объяснением влияния донора NO-группы может являться то, что нитропруссид в результате диссоциации образует двухвалентный анион, который способен взаимодействовать с молекулами на поверхности мембраны, формируя своеобразные сшивки. Это может приводить к уплотнению мембраны и нарушению работы ионных каналов, которое проявляется в уменьшении потоков свободных ионов, следовательно, уменьшению электропроводности.

Однако совместное действие КВЧ-облучения в течение 15 мин и нитропруссидов натрия в концентрации  $10^{-6}$  М на эритроциты компенсирует изменение электросопротивления под действием низкой концентрации нитропруссидов.

Морфологическое исследование эритроцитов осуществляли при помощи иммерсионной световой микроскопии при увеличении объектива  $\times 100$ . Количество измененных эритроцитов подсчитывали на 8 микроскопических полях зрения, сумму клеток делили на 8 и получали среднее количество эритроцитов с различной формой. Среднее количество клеток разной формы выражали в процентах. Оценку морфологии мембран эритроцитов проводили по классификации В. Н. О'Conner (1984). К нормальным клеткам относили дискоциты - клетки дисковидной двояковогнутой формы, к обратимо деформированным эритроцитам (ОДЭ) – эхиноциты и стоматоциты, к необратимо деформированным (НОДЭ) – шизоциты. В связи с тем, что пойкилоцитоз (процесс изменения формы эритроцитов) регистрируется, если в мазке обнаруживается более 25% эритроцитов измененной формы, то в описании результатов количество НОДЭ и ОДЭ превышающее 25% считалось патологическим.

По результатам цитологического исследования была выполнена

параметрическая статистическая обработка фактического материала, но т. к. значения не укладывались в нормальное распределение данных, в качестве дополнения использовался непараметрический U-критерий Манна-Уитни для определения достоверности различий при попарном сравнении выборок. Полученные данные представлены на рисунках 3 и 4.

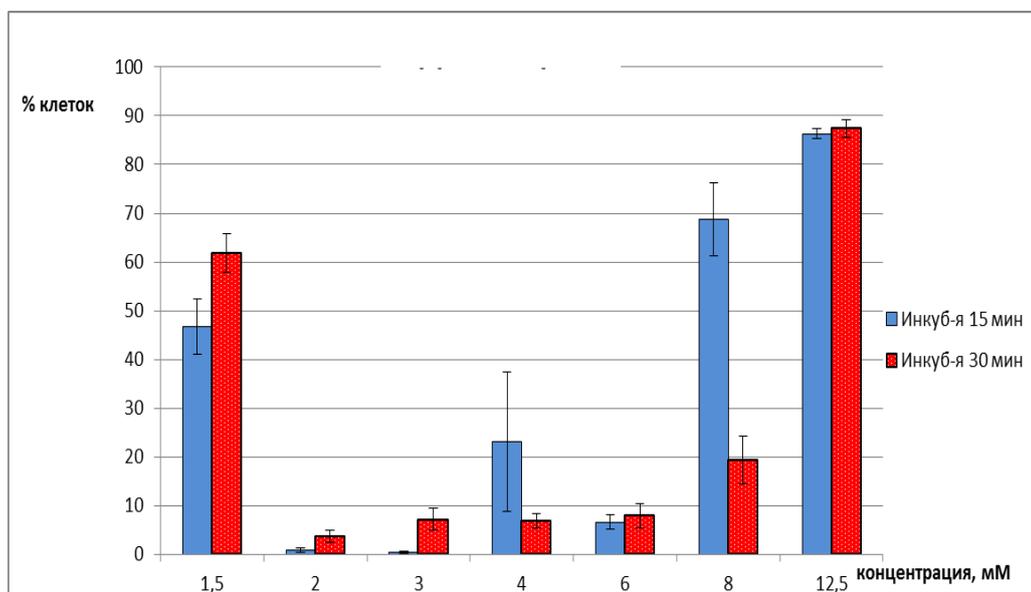


Рисунок 3 - Количество дискоцитов (в %) после инкубации крови с мексидолом.

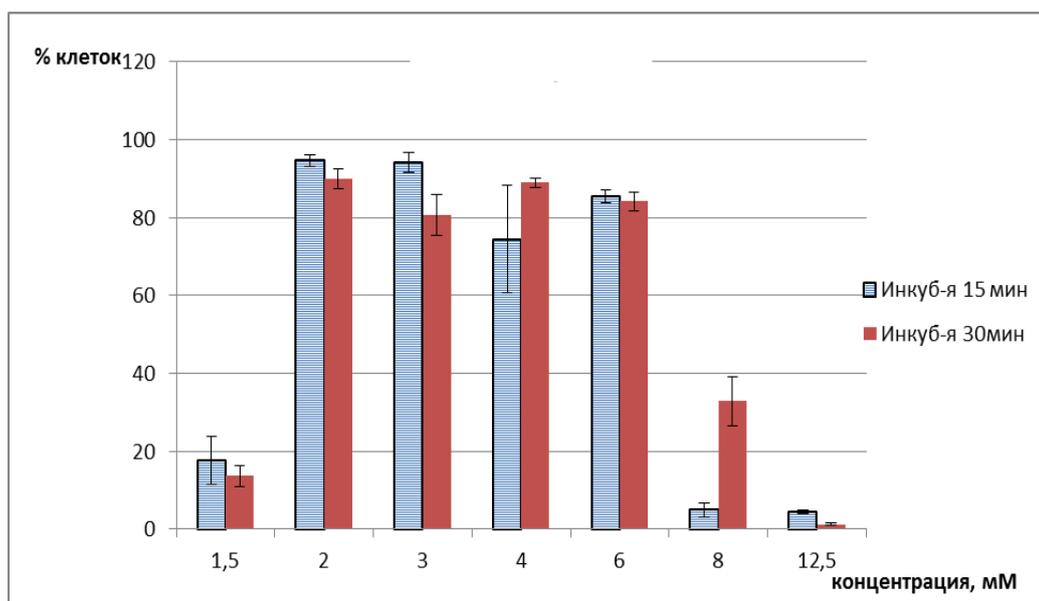
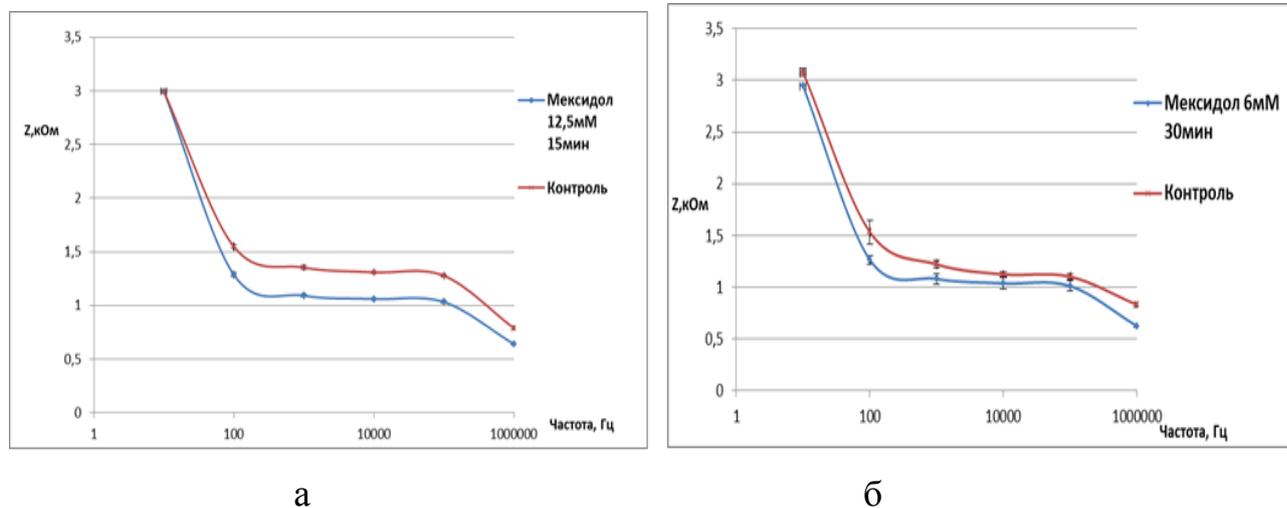


Рисунок 4 - Количество дискоцитов (в %) после инкубации крови с мексидолом.

Воздействие раствора мексидола на кровь в концентрациях от 1,5 до 6 мМ во всех интервалах инкубации вызывало образование высокой степени патологии у эритроцитов.

Воздействие раствора мексидола в концентрации 8 мМ в течение 15 мин не оказывало резко негативного воздействия на клетки, т.к. в данном интервале количество измененных форм было близко к границе патологии (25% измененных форм) и составило 30%. При увеличении времени инкубации с препаратом до 30 мин степень патологии увеличивалась в 2,7 раза.

Воздействие раствора мексидола в концентрации 12,5 мМ в обоих интервалах инкубации не вызывало отклонения от нормы по морфометрическим показателям, следовательно данная концентрация может считаться безопасной для красных клеток крови. Однако электропроводность при воздействии данной концентрации в течение 15 мин была выше, чем в контрольном образце (рисунок 5 а). В то же время, воздействие мексидола в концентрации 6 мМ в течение 30 мин не привело к достоверному изменению импеданса (рисунок 5 б), хотя при цитологическом анализе было выявлено



а – 12,5 мМ, инкубация 15 мин; б – 6 мМ, инкубация 30 мин

Рисунок 5 – Изменение величины импеданса эритроцитов мыши после воздействия мексидола.

высокое содержание измененных форм эритроцитов при использовании данной концентрации. Применение других концентраций мексидола также оказывало неоднозначные эффекты на морфологию клеток.

**Заключение.** В результате нашего исследования было выявлено, что КВЧ-облучение при всех временных диапазонах не вызывало достоверного изменения величины импеданса по сравнению с контрольными образцами. Такой результат может объясняться тем, что нормализующий характер КВЧ-излучения приводит в норму только отклонившиеся физиологические параметры. Проведенные нами цитологические исследования мазков крови после облучения ЭМИ также показали отсутствие негативных эффектов на эритроцитарную мембрану.

Добавление нитропруссид натрия в концентрации  $10^{-4}$  М не приводило к достоверным изменениям сопротивления эритроцитов. Был отмечен дозозависимый эффект действия препарата: в более низкой концентрации нитропруссид приводил к увеличению сопротивления и, соответственно, снижению электропроводности мембран эритроцитов. При этом дополнительное воздействие КВЧ-облучением в течение 15 мин на эритроциты компенсирует изменение электросопротивления под действием низкой концентрации нитропруссид.

Было изучено влияние препарата Мексидол на морфологию и электрические свойства эритроцитов. Выявлено неоднозначное влияние действующего вещества на морфологию и электрические показатели клеток.

### **ВЫВОДЫ:**

1. КВЧ-облучение не вызывало достоверного изменения величины импеданса по сравнению с контролем и не оказывало влияния на морфологию эритроцитов.
2. Нитропруссид натрия в концентрации  $10^{-4}$  М не вызывал достоверного изменения величины импеданса по сравнению с контролем. Добавление нитропруссид натрия в концентрации  $10^{-6}$  М приводило к достоверному повышению величины импеданса на 40% по сравнению с контролем, при этом выявлен эффект нормализации электросопротивления в случае дополнительного облучения ЭМИ на частоте NO.

3. Инкубация эритроцитов крови с мексидолом в концентрации 12,5 мМ в течение 15 мин приводила к достоверному снижению величины импеданса по сравнению с контролем в среднем на 15% по всему частотному диапазону.
4. Мексидол в концентрации 12,5 мМ не вызывал отклонения от нормы и появление патологических форм эритроцитов, однако во всех остальных исследованных концентрациях его воздействие приводило к появлению ОДЭ и НОДЭ в разном процентном соотношении.

*Кетя*