

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра биохимии и биофизики

**ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ОРГАНОВ ПИЩЕВАРЕНИЯ
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ
ЭЛЕКТРОСОПРОТИВЛЕНИЯ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДАХ СТРЕССА**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 2 курса 241 группы

направления подготовки 06.04.01 Биология

биологического факультета

Исмагуловой Альбины Булатовны

Научный руководитель

к.б.н. , доцент

М.В. Каневский

Зав. кафедрой биохимии и

биофизики, д.б.н., профессор

С.А. Коннова

Саратов 2020

ВВЕДЕНИЕ

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 имеют место гендерные различия по распространенности этого заболевания: заболеваемость раком желудка в два раза выше у мужчин, чем у женщин, смертность среди заболевших мужчин также в полтора раза выше, по сравнению с женщинами.

Существует множество в разной степени обоснованных предположений причин столь существенных гендерных различий распространения рака желудка, среди которых различия в характере питания, особенностях микроэлементного состава, нитритной нагрузкой пищи, курения, потребления излишнего количества соли, жареных и копченых продуктов, наличие лишнего веса и др. Кроме того, необходимо углубленное исследование взаимодействия между синергетическими факторами риска, которые приводят к повышенной заболеваемости и высокой смертности мужского населения от болезней ЖКТ.

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 повреждения 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 явилась оценка различий в изменениях электрических параметров тканей лабораторных животных в условиях сочетанного действия стрессов разной природы.

В связи с этим были поставлены следующие **задачи**:

1. Индуцировать предраковые состояния у лабораторных животных (мышей и крыс) стрессовыми факторами различной природы (избыточная освещённость и перенаселение) и химикатами (нитрит натрия и *m*-тоуидин) в хроническом эксперименте;

2. Определить, как изменяются электрические показатели тканей стрессированных мышей на фоне сочетанного действия освещения и химикатов;

3. Установить гендерные особенности изменения импеданса тканей желудка и печени мышей при совместном действии химического и физического стрессов.

4. Оценить изменение импеданса тканей крыс при сочетанном действии перенаселения и химических агентов;

5. Обнаружить половые различия электрических характеристик тканей желудка и печени у крыс, подвергавшихся интоксикации и действию стресса;

6. Исследовать гендерные и возрастные изменения электрических показателей тканей желудка и печени у крыс.

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

Структура выпускной квалификационной 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 мембраны. Раздел материалы и методы состоит из четырех подразделов: объекты исследования, приборы и материалы, условия моделирования процесса опухолеобразования, метод импедансометрии. Раздел результаты исследований состоит из трёх подразделов: обоснование выбора токсикантов и используемых типов стресса; исследование сочетанного действия интоксикации и избыточного освещения на показатели импеданса тканей желудка и печени мышей; исследование сочетанного действия интоксикации и перенаселения на показатели импеданса тканей желудка и печени крыс.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования.

Объекты исследования: Для моделирования процесса опухолеобразования были использованы мыши линии BALB/c в возрасте 2 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. А также в ходе работы были использованы белые беспородные крысы в возрасте 3-х и 6-ти месяцев в длительном эксперименте. Животные были разделены на 2 группы по 10 особей в каждой: 1-контрольная (отсутствие стрессовых воздействий); 2-опытная (химическая интоксикация и перенаселение как стрессовый фактор).

Приборы и материалы: Органы извлекали при вскрытии и использовали для импедансометрии. 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 и крыс вызывалась кормлением пищей, содержащей *m*-толуидин (25 мг/кг живого веса в сутки) в сочетании с раствором нитрита натрия в воде (0,2%) в течение 6 месяцев. Животных выводили из эксперимента декапитацией, исследовали образцы тканей желудка и печени.

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: $Z = \frac{R_0}{\sqrt{\frac{U_{in}^2}{U_{out}^2} - 1}}$, где U_{in} — входное напряжение; U_{out} — выходное напряжение; R_0 — образцовое сопротивление, равное 4,99 кОм. Затем строились дисперсионные кривые изменения импеданса гепатоцитов и клеток тканей желудка.

K_p рассчитывали по формуле: $K_p = \lg Z_{10000 \text{ Гц}} / \lg Z_{1000000 \text{ Гц}}$.

Экспериментальные исследования проводились на базе кафедры биохимии и биофизики Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского.

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. А избыток света снижает секрецию мелатонина, в то время как снижение освещённости приводит к увеличению синтеза этого гормона.

Перенаселённость – это другой важный стрессовый фактор, это такое 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 они используются в качестве консервантов и усилителей вкуса и цвета продуктов. К таким, например, относят нитриты (E250), 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, а также на фоне перенаселённости. Избыточная освещённость создавалась путём постоянного действия света интенсивностью 800 люкс. В нашем эксперименте был смоделирован процесс опухолеобразования на самцах и самках мышей линии BALB/c. Мышей подвергали стрессу в виде постоянного освещения и токсикации кормлением пищей, содержащей *m*-толуидин (25 мг/кг живого веса) в сочетании с раствором нитрита натрия в воде (0,2 %) в течение 6-ти месяцев. А также в ходе работы были использованы самцы и самки белых беспородных крыс. Крыс также подвергали стрессу в виде перенаселения и токсикации пищи. Для перенаселения были сформированы группы животных с плотностью населения 50 животных на 1 м². Условия токсикации у крыс такие же. Животных из контрольной и опытных групп выводили из эксперимента декапитацией, исследовали электрические показатели образцов тканей печени и желудка.

При исследовании сочетанного действия интоксикации и избыточного освещения на показатели импеданса тканей желудка и печени мышей было показано, что длительное сочетанное воздействие (6 месяцев) нитритов в воде и ароматических аминов в пище приводило к развитию патологии желудочно-кишечного тракта. Хроническая нитритная интоксикация является достаточно распространенным патологическим процессом.

При исследовании общего сопротивления в клетках желудка было обнаружено, что дисперсионные кривые тканей самок второй группы животных располагаются достоверно ниже контрольных значений, а в третьей группе достоверно выше. Дисперсионные кривые тканей самцов второй и третьей групп немного выше на низких частотах, а на высоких

частотах – ниже. Данные исследования импеданса коррелируют с формированием у животных при длительном токсическом воздействии предраковых патологий желудка.

Но значения K_{Π} у самцов в этих группах достоверно ниже контрольных (контроль– 2,87; 2 группа – 1,11; 3 группа – 1,31). Также и у самок значения K_{Π} в контроле выше, чем в третьей группе, но ниже, чем во второй (контроль – 2,625; 2 группа – 2,83; 3 группа – 2,2). Это может свидетельствовать о том, что под действием стресса в клетках желудка как у самцов, так и у самок 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 мембраны и снижению электропроводности. Понижение K_{Π} в этих группах свидетельствует о развитии патологического процесса в них приводящего к снижению жизнеспособности этих тканей, изменению их химического состава и проницаемости.

Исследования выявили, что показатели величин импеданса ткани печени существенно отличаются от нормы как у самцов, так и у самок. У самок обнаружено повышение крутизны дисперсионной кривой по сравнению с контролем как во второй, так и в третьей группе животных. В клетках печени самцов было обнаружено, что дисперсионные кривые тканей второй и третьей групп животных располагаются достоверно ниже контрольных значений.

Значения K_{Π} у самцов в этих группах достоверно выше контрольных (контроль– 2,8; 2 группа – 2,9; 3 группа – 8). У самок значения K_{Π} в контроле не сильно отличаются от второй и третьей групп (контроль – 4,2; 2 группа – 3,83; 3 группа – 4). По нашим предположениям это может свидетельствовать о том, что длительное влияние стрессорного фактора и интоксикации приводит к уплотнению мембран гепатоцитов и снижению их электропроводности.

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.

Систематический прием токсических веществ (нитритов и аминов) вызывает компенсаторную перестройку метаболизма и развитие патологического типа обменных процессов, что и отражается на характере частотной зависимости импеданса.

При исследовании сочетанного действия интоксикации и перенаселения на показатели импеданса тканей желудка и печени крыс не выявлено гендерных различий по форме дисперсионных кривых, однако у самок они располагались в низкочастотной области достоверно выше, чем у самцов в образцах тканей желудка и печени.

При сравнении K_{Π} исследуемых тканей было установлено, что показатель K_{Π} печени уменьшается у опытных животных более чем на 50%, в то время K_{Π} желудка снижается не так интенсивно.

Поскольку процессы канцерогенеза протекают с разной интенсивностью в зависимости от возраста, нами были предприняты эксперименты по исследованию электросопротивления тканей самцов и самок крыс разного возраста.

Исследования показали, что токсическое воздействие на животных в течение 1 месяца приводит к наиболее существенному за весь период эксперимента снижению величины импеданса в тканях желудка и печени как на низких так и на высоких частотах. Показатели уменьшились в среднем на 50%. В ходе хронического воздействия отмечено дальнейшее достоверное по отношению к контролю, но менее значимое в динамике эксперимента, снижение показателей импеданса. Понижение коэффициента поляризации в большей степени выражено в клетках желудка, что указывает на меньшую устойчивость к воздействиям токсических веществ их мембран. Снижение показателей импеданса может говорить об увеличении количества свободных

ионов вследствие угнетения метаболизма под влиянием токсикантов. Дальнейшее воздействие на животных при мониторинге методом импедансометрии демонстрирует низкую крутизну кривых дисперсии. В тканях желудка со 2 по 6 месяцы наблюдений происходит снижение величины импеданса на 40%, а для тканей печени еще меньше – лишь на 25%.

Исследования выявили значительно более низкие показатели величин значений импеданса в тканях старых крыс даже в контрольной группе по сравнению с таковыми у интактных молодых крыс, что особенно ярко прослеживается на примере тканей печени.

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.

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 мембраны, 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 при токсическом воздействии.

Полученные в ходе эксперимента результаты свидетельствуют о наличии гендерных различий в электрических показателях тканей мышей при хроническом химическом стрессе, что может быть использовано для исследования динамики канцерогенеза *in vivo* на основе анализов импеданса тканей желудка и печени. При моделировании хронического воздействия на животных мы использовали низкие концентрации токсикантов, с которыми люди сталкиваются в обычной жизни, потребляя овощи, содержащие повышенные концентрации нитратов, и ароматические амины, встречающиеся в копченых и жареных продуктах. Кроме того, использовано перенаселение клеток с животными, как вариант социального стресса, которому также подвержены люди.

Исследование проблемы половых различий в устойчивости к стрессу предполагает изучение различных уровней стрессорных реакций. Полученные в ходе эксперимента данные свидетельствуют о наличии гендерных различий в электрических показателях тканей мышей при хроническом химическом стрессе. Таким образом, можно заключить, что электрические параметры тканей (импеданс и коэффициент поляризации),

являясь индикатором процессов жизнедеятельности, реагируют на морфофункциональные изменения в организме вызванные прижизненным экзогенным химическим воздействием.

ВЫВОДЫ

1. У мышей линии BALB/c при длительном токсическом и стрессорном воздействии наблюдается снижение величины импеданса, которое согласуется с формированием предраковых патологий желудка и печени, как у самцов, так и у самок;

2. Установлено, что индуцирование образования патологии желудочно-кишечного тракта воздействием на протяжении 6 месяцев нитритами и м-толуидином, достоверно изменяют значение дисперсии импеданса на всех частотах по сравнению с контролем в клетках желудка и печени;

3. Показано, что сочетанное действие перенаселения и интоксикации приводит к достоверному снижению электрических показателей тканей самцов и самок крыс.

4. Определено, что при использовании обеих моделей индуцирования предраковых состояний наблюдаются изменения величин импеданса и коэффициента поляризации тканей печени и желудка лабораторных животных;

5. В ходе исследования гендерных и возрастных особенностей изменения показателя импеданса у крыс было установлено, что старые особи более подвержены развитию патологического процесса, чем молодые, а также самки более устойчивы к действию стрессовых факторов и интоксикации чем самцы.

6. 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.