

МИНОБРНАУКИ РОССИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.  
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра биохимии и биофизики

**ИЗМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КРОВИ  
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО  
СТРЕССА РАЗНОЙ ПРИРОДЫ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

Направления подготовки 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Кутисовой Алёны Рафиковны

Научный руководитель:

к.б.н.,

\_\_\_\_\_ М.В. Каневский  
дата, подпись

Зав.кафедрой биохимии и

биофизики, д.б.н., профессор

\_\_\_\_\_ С. А. Коннова  
подпись, дата

Саратов, 2020

## **ВВЕДЕНИЕ**

**Актуальность темы.** Процессы индустриализации, ускорение темпов развития технологий приводят к увеличению количества стрессов, с которыми ежегодно приходится сталкиваться каждому человеку.

А длительная стресс-реакция приводит к некоторым нарушениям физиологического состояния различных систем организма.

К основным стрессовым воздействиям, с которыми человек сталкивается в городской среде, относят нервное напряжение, шумовое загрязнение окружающей среды, перенаселение, избыточная освещённость. Поэтому в эксперименте, в качестве физического стресса, были рассмотрены такие факторы как перенаселение и свет. Так же, исследовались модели, которые принимали вместе с пищей химические агенты с ярко выраженной канцерогенной активностью, с которыми человек сталкивается в повседневной жизни, это нитриты и амины.

При действии чрезвычайно сильного и длительно действующего раздражителя стресс-реакция организма из общего адаптационного синдрома превращается в фактор патогенеза.

Протекание воспалительных процессов сопровождается часто разрушением клеток и выходом электролитов в кровяное русло. Последнее легко заметить по изменению электрических параметров крови. При интоксикации также происходят изменения форменных элементов крови. Наиболее подвержены этим воздействиям – эритроциты. Также эритроцитатрная масса наиболее проста в получении из крови, что делает её удобным объектом для изучения.

Современные исследования доказывают немаловажную роль стрессовых факторов на развитие патогенной микрофлоры в ЖКТ и формировании предраковых состояний пищеварительной системы. Так *Helicobacter pylori* – одна из значимых причин развития заболеваний желудка и двенадцатиперстной кишки, таких как язвенная болезнь, гастрит и т.д.

Исходя из выше сказанного, **цель работы** состояла в выявлении влияния сочетанного воздействия стрессовых факторов на электрические показатели крови лабораторных животных.

Для реализации поставленной цели были сформулированы и решались следующие **задачи**:

1. Индуцировать предраковые состояния у лабораторных животных в хроническом эксперименте стрессовыми факторами и химическими агентами;

2. Оценить изменения импеданса цельной крови и эритроцитарной массы при использовании перенаселения и круглосуточного освещения в качестве стрессовых факторов.

3. Исследовать гендерную зависимость интенсивности произошедших изменений.

4. Определить интенсивность изменений у молодых и старых животных.

5. Оценить наличие бактерий рода *Helicobacter* в желудке и фекалиях лабораторных животных.

**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, результаты и обсуждения. Раздел обзор литературы состоит из четырех подразделов: роль стресса как фактор развития патологий и канцерогенеза ЖКТ, *Helicobacter pylori* как причина развития канцерогенеза ЖКТ общие сведения о биоимпедансном анализе. Раздел материалы и методы состоит из трёх подразделов: объекты исследования, выявление бактерий рода *Helicobacter*, метод импедансометрии. Раздел результаты и обсуждения состоит из четырех подразделов: обоснование выбора объектов, обоснование используемых стрессовых факторов и токсикантов, исследование совместного действия стресса и токсикантов на изменение импеданса крови

лабораторных животных, исследование смывов слизистой желудка и фекалий на наличие бактерий рода *Helicobacter* методом ПЦР

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы.

Нами были предложены две модели: химический (I) стресс на фоне избыточной освещённости и (II) на фоне перенаселённости.

Для создания модели I были использованы мыши, а для модели II – крысы. Поскольку важно исследовать хронический аспект воздействия факторов, эксперимент проводили в течение 100 дней для мышей и 300 дней для крыс.

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:

$$Z = \frac{R_0}{\sqrt{\frac{U_{in}^2}{U_{out}^2} - 1}}, \text{ где}$$

$U_{in}$  — входное напряжение;

$U_{out}$  — выходное напряжение;

$R_0$  — образцовое сопротивление, равное 4,99 кОм.

Затем строились дисперсионные кривые изменения импеданса эритроцитов.

Известно, что наиболее информативным интегральным показателем происходящих в организме изменений при действии стрессовых факторов, является система крови.

## Результаты и обсуждения

При любых патологических процессах происходят изменения показателей крови, поэтому нами было предпринято исследование электрических параметров цельной крови, а также эритроцитов лабораторных животных.

Для каждой ткани характер изменения дисперсионной кривой – это специфический показатель, поэтому изменения крутизны кривой дисперсии наряду с изменением величины импеданса является признаком происходящих изменений. В нашем случае – развития патологических процессов.

Эксперименты, проведённые на мышах, продемонстрировали снижение величины импеданса цельной крови опытных животных по сравнению с контрольными. Величина импеданса была снижена в 2-2,5 раза к концу эксперимента, что свидетельствует о глубоких изменениях, произошедших в организме животного.

Поскольку кровь состоит из плазмы и форменных элементов, важно уточнить, что именно вносит вклад в снижение сопротивления. Проведённые эксперименты с отмытыми физиологическим раствором эритроцитами показали аналогичную картину снижения сопротивления. Хотя для эритроцитов уменьшение показателя не превышало 50% для опытной группы, в которой животные подвергались сочетанному действию интоксикации и химического стресса.

Полученные результаты позволяют говорить о том, что свет как стрессовый фактор практически не влияет на электрические параметры крови, а сочетанное действие приводит к глубоким изменениям. Основываясь на полученных результатах, можно сказать, что электрические параметры плазмы крови также незначительно изменяются. Но основной вклад вносит изменение сопротивления клеток крови. Это может быть обусловлено изменением проницаемости мембран, вызванное действием стресса и токсикантов.

Ввиду того, что основной вклад в изменение электропроводности вносят клетки, а не плазма, при оценке работоспособности модели с крысами исследования проводились на эритроцитах.

Поскольку реакции на стресс протекают с разной интенсивностью в зависимости от пола, нами были предприняты эксперименты по исследованию электросопротивления тканей самцов и самок крыс. Поскольку реакции на стресс протекают с разной интенсивностью в зависимости от пола, нами были предприняты эксперименты по исследованию электросопротивления тканей самцов и самок крыс.

Эксперименты не выявили гендерных различий по форме дисперсионных кривых, однако у самок они располагались в низкочастотной области достоверно выше, чем у самцов в образцах эритроцитарной массы.

Немаловажно отметить, что патологические изменения под влиянием стресса протекают с разной интенсивностью в зависимости от возраста, поэтому на завершающем этапе мы предприняли исследование влияния сочетанного действия стрессовых факторов на самцов крыс разного возраста. Нами были использованы самцы крыс, поскольку для них было показано более снижение сопротивления, а, следовательно, их устойчивость ниже.

Исследования показали, что токсическое воздействие на цельную кровь молодых животных в течение 1 месяца приводит к наиболее существенному за весь период эксперимента снижению величины импеданса как на низких так и на высоких частотах. Показатели уменьшились в среднем на 50%. Исследования выявили значительно более низкие показатели величин значений импеданса в цельной крови старых крыс даже в контрольной группе по сравнению с таковыми у интактных молодых крыс. Также наблюдался более ступенчатый характер снижения показателя импеданса с течением времени показателей импеданса.

Изменение импеданса компонентов крови контрольных молодых животных не отличалось по характеру от такового у старых животных – оно было ступенчатым в обоих случаях. Отличия были в показателях.

У старых животных также наблюдается поэтапное снижение значений импеданса форменных элементов крови через месяц, три, шесть и десять месяцев действия токсикантов. На низких частотах крутизна дисперсии импеданса цельной крови особенно высока и значения показательны для характеристики развития воспалительного процесса.

Хотелось бы отметить, что к концу эксперимента, и у молодых и у старых крыс к 10 месяцу были обнаружены гистологически подтверждённые новообразования и язвы желудка, кишечника и печени.

В работе был рассмотрен один из факторов образования раковых и предраковых состояний – наличие бактерий рода *Helicobacter*. В результате ПЦР в тканях желудка мышей выявлены бактерии рода *Helicobacter*

Высокий процент ПЦР-позитивных проб при культивировании из содержимого желудка (64,9%) и низкий процент ПЦР-позитивных проб при культивировании микрофлоры из фекалий (29,8%) может быть связан с тем, что бактерия очень чувствительна к воздействию желчных кислот и пониженному содержанию кислорода. Поэтому при пассаже химуса через двенадцатиперстную и толстую кишку количество бактерий значительно снижается.

Выявление закономерностей развития стресса и адапционных возможностей организма — одна из актуальных проблем. Исходя из этого, особое значение приобретает поиск методов диагностики, одновременно отвечающих требованиям оперативности, надежности и простоте. Физико-химические свойства крови отражают состояние всего организма в целом, так как имеют тесную связь с его различными функциями.

Таким образом, метод импедансометрии может применяться для оценки состояния тканей лабораторных животных в динамике эксперимента.

Однако данный метод может служить лишь первоначальным диагностическим методом оценки состояния тканей или экспресс методом сравнения состояния «подозрительной» и здоровой ткани в ходе операции.

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.

Таким образом, импедансометрия может быть рассмотрена как перспективный неинвазивный метод оценки состояния организма. Однако полученные результаты должны быть подкреплены иными лабораторными исследованиями.

Использование фекалий для диагностики присутствия бактерий рода *Helicobacter* не оправдало себя в роли неинвазивного метода, поскольку более чем у 50% особей, у которых хеликобактерии были найдены в желудке, не было их обнаружено в экскрементах, что делает данный метод недостоверным.

## ВЫВОДЫ

1. Показано, что при сочетанном воздействии токсикантов и стрессовых факторов происходит снижение величины импеданса цельной крови и эритроцитарной массы у мышей и крыс.

2. Установлено, что изменение импеданса форменных элементов крови крыс носит постепенный характер, в то время как для цельной крови величина импеданса существенно снижается за первые месяцы эксперимента, а в дальнейшем остаётся практически неизменной.

3. Обнаружено, что в динамике эксперимента у старых животных величина импеданса крови и форменных элементов снижается аналогично тому, как это происходит у молодых особей. Отличия в том, что у старых животных более низкие значения электросопротивления.

4. Выявлено, что под влиянием токсикантов и стрессовых факторов большее снижение показателя импеданса клеток крови наблюдается у самцов.

5. Методом ПЦР-диагностики было установлено, что в 45,9% случаев бактерии рода *Helicobacter* не обнаруживаются в фекалиях, несмотря на их наличие в желудке.