

ИССЛЕДОВАНИЕ АДРЕНОРЕАКТИВНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ОДНОЧАСТОТНОЙ ДИЭЛЕКТРОМЕТРИИ В МИЛЛИМЕТРОВОЙ ОБЛАСТИ РАДИОВОЛН

Архипова Е.А., Красов П.С., Фисун А.И., Малахов В.А., Лычко В.В.,

Носатов А.В., Гетманенко А.В., Феденко А.В.

Введение

Исследование диэлектрических характеристик биологических объектов различных уровней организации, от макромолекул белков до суспензий клеток и тканей, находит свое широкое применение в различных областях науки. Диэлектрическая проницаемость (ДП) в каждом объекте отражает особенности поляризационных процессов в материалах в данном диапазоне. Различные методы диэлектromетрии позволяют получать информацию о строении молекул вещества и их симметрии [1], форме и геометрических размерах [2,3], содержании воды в различных веществах [4], а также структурных изменениях в биосистемах, происходящих под действием различных внешних физико-химических факторов [5-7]. Выбор метода, частотного диапазона и факторов воздействия определяется целью и объектом исследования. Однако, микроволновый диапазон частот радиоволн является для изучения биологических объектов наиболее информативным, что связано с физико-химическими особенностями воды – основного и наиболее важного компонента всех без исключения биосистем. Одним из таких методов, использующих область коротких миллиметров, является диэлектromетрия крайне высокочастотного диапазона (КВЧ).

Традиционно термин «КВЧ» в медицинской сфере ассоциируется с терапией [8]. Однако электромагнитное излучение данной частотной области можно использовать и в качестве «инструмента», который при правильном использовании знаний о самом биообъекте позволяет получать информацию о его функциональном состоянии, что открывает большие возможности в направлении диагностики. Именно об этом и пойдет речь в данной работе.

Основы методологии и метод одночастотной КВЧ диэлектromетрии

Особенностью диэлектromетрии КВЧ диапазона (область частот от 30 до 300 ГГц.) является наличие в нем так называемой области дисперсии свободной воды¹, т.е. зависимости от частоты величины ДП только этих молекул, но не любых других. Это означает, что в данном частотном диапазоне остальные компоненты изучаемой биосистемы не вносят вклад в процесс измерения, что позволяет анализировать исследуемый объект, используя молекулы свободной воды в качестве естественного маркера.

На первый взгляд непонятно, как вода, содержащаяся в объекте, может иметь какое либо отношение к диагностике. Однако, учитывая современные знания о роли воды в биологических структурах, этот вопрос проясняется. На сегодняшний день роль гидратации убедительно доказана многими методами. Известно, что вода является не только растворителем и участником процессов метаболизма, но и важным фактором, определяющим пространственную организацию, динамику, стабильность и реакцию на внешние воздействия [9,10]. Подтверждением тому является огромное количество работ, посвященных свойствам внутриклеточной воды и ее роли в патогенезе различных заболеваний [12-16]. При направленном действии различных внешних факторов происходит количественное перераспределение свободной и связанной воды в макромолекулах образца, что вносит вклад в изменение регистрируемого интегрального параметра – комплексной диэлектрической проницаемости ϵ^* (КДП).

Однако, подобные эффекты невелики и чтобы их зафиксировать, необходима специальная аппаратура, которая бы обладала высокой степенью чувствительности к изменениям ϵ^* . Специально для этих целей в Институте

¹ В биологических объектах вода представляет собой неоднородную по своим энергетическим и динамическим параметрам структуру (гидратное окружение) и подразделяется на несколько типов, в том числе свободную или объемную, т.е. не связанную прочно биоструктурой.

радиофизики и электроники им. А.Я. Усикова НАН Украины был разработан, а затем и усовершенствован аппаратный комплекс, который работает на фиксированной частоте 39,5 ГГц [17,18]. Использование одной частоты обосновывается тем, что во всей области дисперсии свободной воды результат зависит от одного и того же обстоятельства – изменения количества молекул свободной воды. Поскольку главная задача нашего подхода заключается не в поиске частот, где максимально интенсивно происходит это изменение, а именно в факте его регистрации, которое происходит в случае реализации эффекта, то нет необходимости перебирать весь спектр, достаточно выбрать частоту, которая бы входила в данную область дисперсии. Выбор частоты 39,5 ГГц был определен технологическими особенностями реализации измерительного комплекса, что позволяет использовать исследуемый образец в микромолярных объемах. Использование малых объемов образца и стимуляторов является одним из преимуществ данного метода.

Предлагаемый метод направлен на изучение мембранно-рецепторной регуляции адренорецепторов эритроцитов (АРЭ) адреномиметиками и имеет следующие предпосылки.

Во-первых, одним из способов определения функционального состояния организма человека может быть оценка симпато-адреналовой системы на клеточном уровне, имеющей непосредственное отношение к ряду патологий, в особенности сердечно-сосудистой этиологии. Работа мембранно-рецепторного комплекса обуславливает конечный эффект действия гормонов и характеризует механизм адаптации организма человека к стрессу. Одним из путей проявления дезадаптации является нарушение механизмов сопряжения «сигнал-функция», то есть мембранно-рецепторных соотношений, обеспечивающих передачу гормонального сигнала в клетку [19-23]. Во-вторых, в литературе имеются данные, свидетельствующие о правомерности такого подхода к изучению механизмов дезадаптации при раннем развитии кардиальной патологии. Наиболее ярким примером этого является «мембранная теория» о нарушении механизма ион-транспортных систем клеточных мембран и их рецепции при

развитии артериальной гипертензии, выдвинутая в 1987 году Постновым Ю.В. и Орловым С.Н. [24,25]. И, в-третьих, данный подход был успешно апробирован в ряде работ [26,27], в которых проведено исследование адrenoрецепции тромбоцитов пациентов с артериальной гипертензией.

Таким образом, используя комплексный подход, сочетающий в себе диэлектromетрию и традиционные подходы изучения гормон-рецепторной регуляции, стало возможным исследовать функциональное состояние клеток *in vitro*. Поставленная цель достигается путем оценки функциональной активности мембранно-рецепторного комплекса клетки по измеренным значениям КДП до и после воздействия специфических биорегуляторов (адrenomиметики) относительно их контроля (интактных образцов без добавления регуляторов). Если в результате воздействия адrenomиметиком наблюдается статистически достоверное изменение КДП, значит механизм сопряжения «сигнал-функция» в норме, т.е. клетки реагируют на стимуляцию, что характеризуется положительным эффектом для контрольной группы (условно здоровых доноров).

Методология, впервые разработанная группой ученых во главе со Щеголевой Т.Ю. [17], была взята за основу авторами данной статьи, и, в дальнейшем, модифицирована в направлении мониторинга адренореактивности эритроцитов методом одночастотной волновой миллиметровой диэлектromетрии. В данной работе приведена часть результатов, полученных при оценке адренореактивности эритроцитов (АРЭ) больных ишемическим инсультом (ИИ).

Подготовка эритроцитов к исследованию. В качестве объекта исследования выбраны эритроциты человека, что обусловлено наличием в их мембране адренорецепторов, функционально и структурно схожих с адренорецепторами клеток миокарда, сосудов и др. [28], а также их доступностью. Немаловажно и то, что по диэлектromетрии эритроцитов накоплено немало результатов [2,3, 29].

Подготовка объекта занимает наибольшую по времени часть исследования и играет важную роль в ходе дальнейшей экспериментальной работы. Кровь для исследования получали венопункцией, затем стабилизировали гепарином из расчета 0,01 мл 1% раствора гепарина на 2 мл крови. Экспериментально было установлено, что использование в качестве антикоагулянта гепарина в процессе измерений диэлектрической проницаемости предпочтительнее, чем цитрат натрия, хоть и сокращает время жизнеспособности образцов до 3 ч. Также, безусловно, выбор антикоагулянта определяется целью гематологических исследований. Для выделения эритроцитов из цельной крови полученный материал центрифугировали на протяжении 10 минут при 1000 об/мин (113g). Такой режим центрифугирования соответствует физиологически мягким условиям и минимально повреждает клетки крови. Затем образовавшийся супернатант отбирали, а осадок эритроцитов дважды отмывали от плазмы физиологическим раствором центрифугированием в том же режиме [30].

Полученную эритроцитарную суспензию содержали в стеклянной закупоренной посуде, чтобы исключить взаимодействие образцов с воздухом. Добавки биологически активных регуляторов адреналина ($4 \cdot 10^{-5}$ мг/мл крови или 10^{-7} М), осуществляли в количестве 0,01 мл на 0,2 мл суспензии эритроцитов по схеме «контрольный образец + физ.раствор - исследуемый образец+адреналин» за 20-25 мин до начала измерений при комнатной температуре. Дозировки стимуляторов были выбраны из учета их применения в медицинской практике [31].

Результаты и обсуждение

Все исследуемые образцы были поделены на 2 группы. Контрольная группа – эритроциты условно здоровых доноров 28-35 лет обоих полов (10 человек) и исследуемой группы – пациентов с ишемическим инсультом (ИИ) в первые часы поступления (до медикаментозного лечения) 58-65 лет (10 человек).

В результате измерения КДП были получены следующие результаты (табл.1). С целью повышения точности измерений каждый образец был измерен не менее 3 раз. Статистическая обработка результатов была проведена методом Стьюдента.

Таблица 1

Значения разницы ДП $\Delta\epsilon'$ эритроцитов (реакция клеток) после воздействия стресс-фактора адреналина относительно контроля (эритроцитов с эквивалентной добавкой 0,9 % NaCl) в контрольной и исследуемой группах

№	Контрольная группа		Исследуемая группа (ИИ)
	$\Delta\epsilon'$	Показатель β -АРМ*, усл.ед.	$\Delta\epsilon'$
1	-0,86±0,15	7,1	0,19±0,48
2	-1,2±0,10	18,5	0,38±0,29
3	-0,98±0,24	20,0	-0,38±0,24
4	-1,25±0,28	24,9**	0,2±0,37
5	-0,88±0,22	12,7	-0,6±0,34
6	-0,78±0,16	13,2	0,3±0,18
7	-2,1±0,43	19,8	-0,12±0,10
8	-0,85±0,14	8,4	-0,24±0,14
9	-1,62±0,31	13,5	-0,36±0,31
10	-1,59±0,41	18,9	-0,57±0,42

*показатель β -АРМ (адренореактивности мембран эритроцитов):

нормальный показатель: 2-20 усл.ед., патология: >20 [32];

**показатель выше нормы, но без установленной патологии.

Для контрольной группы также методом изменения осмотической резистентности при действии β -блокаторов были измерены показатели β -АРМ [32]. Данный показатель приведен для валидации контрольной группы, чтобы убедиться в отсутствии патологии.

Для наглядности результаты из табл. 1 можно представить в виде диаграммы отличий КДП $\Delta\epsilon'$ (рис.2.), на которых видны величины эффектов и данные статистической обработки.

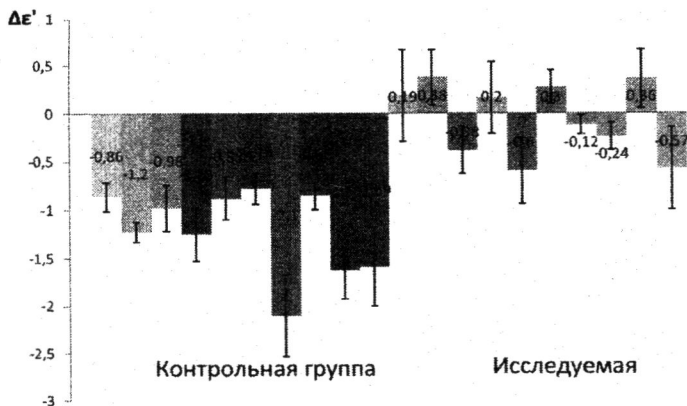


Рис. 1. Сравнение реакции эритроцитов на стимуляцию адреналином в контрольной и исследуемой группах.

Как видно из таблицы и диаграмм, в исследуемой группе реакция эритроцитов на адреналин достоверно отсутствует в 80% случаев. Это может свидетельствовать об эффекте десенсибилизации (потери чувствительности) адренорецепторов эритроцитов в процессе заболевания. В контрольной группе величина эффекта достоверно превышает изменения в исследуемой группе, и составляет не менее 0,8. Следует также отметить, что величина всех эффектов в контрольной группе отрицательная. Такое разнесение полученных изменений КДП, скорее всего, свидетельствует о принадлежности к патологии. Данные результаты являются первым этапом развития данного теста и требуют дальнейшего экспериментального и теоретического изучения, а также с использованием большего числа клинического материала и различной патологии сердечно-сосудистой этиологии.

Выводы

Экспериментально получены значения КДП для эритроцитов двух групп людей, условно здоровых и пациентов с ИИ в первые часы поступления до медикаментозного лечения. Данные значения показывают с высокой

достоверностью, что при воздействии адреналином на клетки, реакция в виде уменьшения КДП наблюдается только в контрольной группе. Это позволяет предположить, что данный параметр может быть диагностическим критерием при оценке функциональных мембранно-рецепторных взаимодействий.

Важным преимуществом данного метода является возможность исследования в реальном времени без нарушения структуры объекта, а также использование малых количеств образцов и действующих веществ (для проведения исследования необходимо от 1 до 2 мл суспензии клеток от каждого донора).

Представленные результаты являются первым этапом разработки данного теста с привлечением КВЧ диэлектromетрии, метода, который является уникальным и ранее при исследовании крови пациентов с ИИ не использовался.

Литература

1. Naoki Shinyashiki, Yasuhide Matsumura, Nobuhiro Miura, Shin Yagihara, Satoru Mashimo. Dielectric study of water structure in polymer solution // J. Chem. Phys. – 1994. - 98 (51), pp. 13612–13615.
2. Asami K. Simulation of dielectric spectra of erythrocytes with various shapes // J. Phys. D: Appl. Phys. – 2009. – 42. - pp.135503 (7).
3. Yoshihito Hayashi, Ikuya Oshige, Yoichi Katsumoto, Shinji Omori, Akio Yasuda and Koji Asami. Dielectric inspection of erythrocyte morphology // Phys.Med.Biol. – 2008. – 53. - pp. 2553-2564.
4. Pethig R. Protein-water interactions determined by dielectric methods // Annu. Rev. Phys. Chem. - 1992. - 43. - pp. 177-205.
5. Щеголева Т.Ю., Колесников В.Г., Васильева Е.В., Васильев Ю.М., Алтухов А.Л. Применение миллиметрового диапазона радиоволн в медицине. – Харьков: ХИМБ, 1999. – 233 с.

6. Hackl E.V., Gatash S.V., Nikolov O.T. Using UHF-dielectrometry to study protein structural transitions // J. Biochem. Biophys. Methods. – 2005. – 63. - pp.137–148.
7. Кашпур В.А., Малеев В.Я., Хорунжая О.В. Применение метода дифференциальной КВЧ диэлектрометрии в молекулярной биофизике // Радиофизика и электроника. - 2008. -13, 446-454.
8. Девятков Н. Д., Голант М. Б., Бецкий О. В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности.— М.: Радио и связь, 1991.
9. Брандтс Дж. Ф. Конформационные переходы белков в воде и смешанных водных растворителях. – Структура и стабильность биологических макромолекул. М.: Наука. 1973. с. 174-254.
10. Щеголева Т.Ю. Исследование гидратации методом СВЧ-диэлектрометрии. Автореф. диссерт. канд. физ. - мат. наук.- М.: МГУ.- 1981.- 185с.
11. Clegg J.S. Intracellular Water and the Cytomatrix: Some Methods of Study and Current Views // The Journal of Cell Biology. – 1984. - vol.99, no.1. - pp. 167-171.
12. Watterson J.G. A role for water in cell structure // Biochem. J. – 1987. - 248, pp. 615-617.
13. Аксенов С.И. Вода и ее роль в регуляции биологических процессов. М.: Наука.-1990.- 118 с.
14. Малеев В.Я., Семенов М.А., Гасан А.И., Кашпур В.А. Физические свойства системы ДНК-вода // Биофизика. – 1993. – Т.38, №5. - С.768-790.
15. Литвинов А.В. Изучение гидратации компонентов крови в гематологической практике. Математ. Морфология. – 1997. - 163с.
16. Структура воды в крови: клинические аспекты /Под ред. Н.Ф. Фаращука. –Смоленск. - 2007. – 297с.
17. Щеголева Т.Ю. Исследование биологических объектов в миллиметровом диапазоне радиоволн. - Киев: Наукова думка.-1996.-182 с.

18. Красов П.С. Одночастотный рефлектометр на основе четырехзондовой измерительной линии // Прикладная радиоэлектроника. – Т.7. – №2. – 2008. – С.188-191.

19. Малая Л.Т., Щеголева Т.Ю., Бахова Л.К. Исследование методом СВЧ-диэлектromетрии параметров нативного аденилатциклазного комплекса при модуляции его активности //Биофизика.-1988.-4.-С.629-633.

20. Щёголева Т.Ю., Колесников В.Г. Изменение гидратного окружения эритроцитов при гормональной стимуляции // Биофизика. – 1996. – Т. 41. – Вып. 5. – С. 1082-1085.

21. Щеголева Т.Ю. Функциональная система связей компонентов аденилатциклазного комплекса эритроцитов //Успехи современной биологии.-1997.-117.- 4.- с 442-454.

22. Киселева Н.Э. Исследование методом КВЧ-диэлектromетрии молекулярных механизмов функционирования комплекса аденилатциклазная система - цитоскелет в эритроцитах и тромбоцитах //Врачебная практика, 1999, 4, С.7-14.

23. Малая Л.Т., Щеголева Т.Ю., Бахова Л.К. О некоторых молекулярных механизмах развития сердечно-сосудистой патологии. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.-1992.- в.6.- с.572-574.

24. Постнов Ю.В., Орлов С.Н. Первичная гипертензия как патология клеточных мембран. – М.: Медицина, 1987.

25. Введение в биомембранологию/Под ред.А.А. Болдырева. – М.: Изд-во МГУ. – 1990. – 208с.

26. Ковалева О.Н., Щеголева Т.Ю., Колесников В.Г., Смирнова В.И., Лепеева Е.А. Взаимосвязь рецепторного комплекса тромбоцитов и гипертрофии левого желудочка у больных гипертонической болезнью// Медицина сегодня и завтра, 2001, № 3, с. 37-40.

27. Патент N 1755192 Способ прогнозирования перехода гипертонической болезни II стадии в гипертоническую болезнь третьей стадии. Васильева Е.В.,

Бахова Л.К., Щеголева Т.Ю., Васильев Ю.М., Малая Л.Т. - Заявлено 09.01.89, №4634097/14. Оpubл.в Б.И., 1992, №30.

28. Авакян О.М. Фармакологическая регуляция функции адrenoрецепторов. – М.: Медицина, 1988. – 256 с.

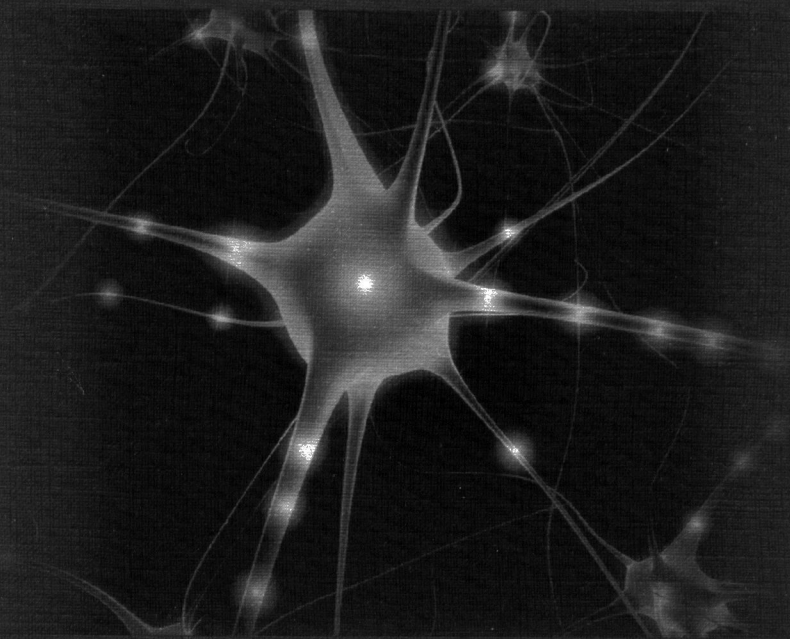
29. Pauly H. and Schwan H. P. Dielectric properties and ion mobility in erythrocytes // Biophysical Journal, Vol. 6. - 1966. – pp.621-639.

30. Балуда В.П., Баркаган З.С., Гольдберг Е.Д. и др. Лабораторные методы исследования системы гемостаза. – Томск, 1980. – 314 с.

31. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – М.: Новая волна, 2000. – 540 с.

32. Стрюк Р.И., Длусская И.Г. Адrenoреактивность и сердечно-сосудистая система. - М.: Медицина, 2003.

**АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ
НЕВРОЛОГИИ И
НЕЙРОРЕАБИЛИТАЦИИ**



**ХАРЬКОВСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ**

**АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ
НЕВРОЛОГИИ И
НЕЙРОРЕАБИЛИТАЦИИ**

Сборник научных работ, посвященный 30-летию кафедры лечебной физкультуры, спортивной медицины и реабилитации Харьковской медицинской академии последипломного образования и 30-летию научно-педагогической деятельности Малахова Владимира Александровича

Харьков 2012