

УДК 616-006.484

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ИМПЕДАНСОМЕТРИИ ДЛЯ СРАВНИТЕЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ХИМИЧЕСКОГО СТРЕССА НА РАЗВИТИЕ ПАТОЛОГИЙ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА САМЦОВ И САМОК БЕЛЫХ БЕСПОРОДНЫХ КРЫС

© 2018 М.В. Каневский, И.К. Миронова, С.А. Коннова, А.А. Галицкая, И.М. Агранович, А.П. Хороводов, Е.Г. Борисова, О.В. Семячкина-Глушковская

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского

Статья поступила в редакцию 21.11.2018

Представлены результаты сравнительных анализов электрических свойств (импеданса и коэффициента поляризации) здоровых и патологических тканей на модели белых беспородных самцов и самок крыс. Показано, что моделирование хронического химического (диета с включением нитрита натрия и м-толуидина) и социального (перенаселение) стрессов в течение 270 суток приводит к развитию предопухолевых патологий и опухолей желудочно-кишечного тракта у 56 % животных, причем самцов среди заболевших в 1,6 раза больше, чем самок, что подтверждено данными гистологических исследований. Методом импедансометрии установлено, что такое комплекснострессовое воздействие индуцирует достоверные изменения электрических параметров эритроцитарной массы, а также тканей желудка и печени животных. В частности, выявлено достоверное снижение по сравнению с контролем коэффициента поляризации тканей у самцов и самок соответственно: в эритроцитарной массе на 17 и 6%; в слизистой оболочке желудка на 43 и 36%; печени 50 и 43%, что может характеризовать снижение жизнеспособности тканей и наличие некротических изменений в них. Показано, что изменения электрических показателей тканей у самцов выражены в большей степени, что соответствует частоте развития патологических состояний у самцов. Отмечено, что изменения электрических параметров эритроцитарной массы является удобным прижизненным мониторинговым подходом для исследований развития патологий, в том числе предраковых состояний желудочно-кишечного тракта.

Ключевые слова: импедансометрия тканей крыс, рак желудка, хронический стресс.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 18-15-00139.

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные опухоли желудка являются пятой по распространенности среди онкологических заболеваний (1,3 млн. случаев) и второй ведущей причиной смерти от рака во всем мире (819000 случаев) [1]. При этом отмечены гендерные различия по распространенности рака желудка (РЖ), который встречается в два раза чаще у мужчин, чем у женщин, и смертность среди заболевших мужчин также в полтора раза выше, по сравнению с женщинами [2]. Усугубляется проблема тем, что на момент постановки диагноза у

Каневский Матвей Владимирович, кандидат биологических наук, ассистент кафедры биохимии и биофизики. E-mail: matvejkanev@mail.ru

Миронова Ирина Константиновна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии и биофизики. E-mail: mironovaik@mail.ru

Коннова Светлана Анатольевна, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии и биофизики. E-mail: Konnovasa@yandex.ru

Галицкая Анна Алексеевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии и биофизики. E-mail: ann.gal@mail.ru

Агранович Илана Михайловна, аспирант кафедры

большинства пациентов выявляется поздняя стадия заболевания, что приводит к общей низкой выживаемости [3,4]. Несмотря на активное исследование канцерогенеза желудка механизм, лежащий в основе этого процесса, выяснен не полностью. Считается, что РЖ возникает вследствие длительного существования в условиях стресса, вызванного воздействием сложного комплекса факторов окружающей среды, среди которых не последнюю роль играет характер питания, в том числе нитритная нагрузка пищи [5,6].

Длительное воздействие токсикантов даже в низких дозах, а также инвазивность и слабая септикологичности человека и животных.

E-mail: ilana.agranovich@yandex.ru

Хороводов Александр Петрович, студент кафедры физиологии человека и животных.

E-mail: Khorovodov2012@yandex.ru

Борисова Екатерина Георгиевна, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных.

E-mail: ekaterina.borisova@gmail.com

Семячкина-Глушковская Оксана Валерьевна, доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой физиологии человека и животных.

E-mail: Konnovasa@yandex.ru

лективность методов ранней диагностики могут способствовать широкому распространению РЖ человека и животных. РЖ не имеет специфических симптомов на ранних стадиях, когда он хирургически излечим. В то же время, на поздних стадиях имеются ограниченные варианты лечения, поскольку РЖ проявляет относительную резистентность к химиотерапии/лучевой терапии [7,8]. Поэтому актуальным остается поиск минимально инвазивных методов для обнаружения РЖ на ранней стадии наряду с классическими диагностическими инструментами.

Одним из возможных путей решения этой проблемы является исследование изменений электрических параметров: импеданса и коэффициента поляризации тканей на начальных этапах развития опухолевого процесса. По показателям импеданса тканей (например, взятых у пациента при диагностической биопсии) или эритроцитарной массы крови можно по снижению коэффициента поляризации определить наличие злокачественных новообразований, некротических изменений, оценить жизнеспособность тканей организма [9-11].

Полное электрическое сопротивление (импеданс) тканей, измеренное на высоких частотах, позволяет оценить внутриклеточные изменения, а в низкочастотном диапазоне импеданс обуславливается размерами межклеточных пространств, уровнем кровенаполнения и гидратации тканей. На практике же, как правило, анализируют относительные показатели импеданса здоровых тканей для оценки физиологической нормы и импеданса пораженного участка ткани. Исследуют также коэффициент поляризации (КП), равный отношению величин/показателей импеданса на двух фиксированных частотах низкой и высокой. КП характеризует общее состояние структурной организации тканей. При нарушении структуры, сопротивление на этих частотах постепенно выравнивается, и значение КП приближается к 1. Таким образом имеется возможность по показателям биоимпеданса судить о степени жизнеспособности ткани [12, 13].

Цель работы: на основе анализа изменений электрических параметров биотканей выявить влияние хронического химического стресса на развитие патологий желудочно-кишечного тракта самцов и самок белых беспородных крыс.

Объекты и методы исследований. Исследование проводили на 80 беспородных белых крысах массой 220-250 г, разделенных на четыре (две опытные и две контрольные) группы по половой принадлежности, которые существовали в условиях перенаселения с соотношением см²/г массы тела = 0.3 (социальный стресс). Контрольные группы содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Животным в опытных группах в рацион

добавляли 0,2% раствор NaNO₂ в питьевой воде и ароматический амин м-толуидин (25 мг/кг веса) натошак вместе с кормом, расчет дозы осуществляли в соответствии с литературными данными. Продолжительность эксперимента составляла 270 суток. Из опыта крыс выводили декапитацией под легким эфирным наркозом. При работе с животными соблюдали правила в соответствии с протоколами Женевской конвенции и принципами надлежащей лабораторной практики (Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009).

Гистологические исследования проводили по стандартной методике с изготовлением парафиновых блоков и окраской тонких срезов (3-5 мкм) гематоксилином и эозином.

Измерение электрического импеданса выполняли в образцах тканей желудка, печени и отмытых эритроцитах. Эритроциты отделяли от сыворотки крови и отмывали 0,9% раствором хлорида натрия центрифугированием.

Импедансометрию проводили на многоканальном анализаторе, состоящем из генератора сигналов Г6-27, цифрового вольтметра В7-27 А/1, блока питания К762 и кювет. Прибор предназначен для измерения величины импеданса в диапазоне частот 1 Гц - 1 МГц. Измерения выполняли на шести дискретных частотах от 50 гц до 100 кГц используя кювету (2 мл) с платиновым электродом для жидкой среды и игольчатые электроды погруженного типа, закрепленные на общем основании. Длина погруженной части 2 мм расстояние между иглами 15 мм. Рассчитывали коэффициент поляризации (или дисперсии) равный отношению импедансов на двух фиксированных частотах 100 гц и 100 кГц. Статистический анализ полученных данных проводили с использованием критерия Манна-Уитни. Различия считались достоверными при $p < 0,05$. Полученные данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам хронического воздействия нитритов, ароматического амина и социального стресса перенаселением после выведения животных из эксперимента при вскрытии были визуализированы патологии желудочно-кишечного тракта и селезенки у 56% животных обоего пола, соотношение которых представлено на диаграмме рис.1, а примеры патологических изменений слизистой оболочки желудка на рис.2.

Среди этих животных с выявленными патологиями было 28 самцов (70%, 28 из 40) и 17 самок (42%, 17 из 40), таким образом количество самцов с подтвержденными гистологией опухолями желудка было в 1,6 раза выше, чем у самок. У 14 самок (35%) и 12 самцов (30%) выявили



Рис. 1. Диаграмма распределения частоты встречаемости патологий крыс как результат хронического воздействия химического и социального стрессов

атрофический гастрит и дисплазию желез в желудке (рис. 3Б), которые являются предраковыми состояниями. Метастазы в печени и легких наблюдались у 70% крыс с аденокарциномой желудка (рис. 3В) независимо от пола животных. Метастатические узлы были представлены кластерами атипичных клеток с большими гиперхроматическими ядрами. 23% самцов крыс (9 из 40) продемонстрировали пептические язвы без предраковых или раковых изменений в желудке. Нормальные желудочные ткани представлены на рисунке 3А.

Хроническая нитритная интоксикация является достаточно распространенным патологическим процессом, в котором эритроцитар-



А

Б

В

Рис. 2. Фотографии нормальной (А) и пораженной (Б – язва желудка, В – новообразование в желудке) слизистой оболочки желудка крыс, как результат воздействия хронического стресса

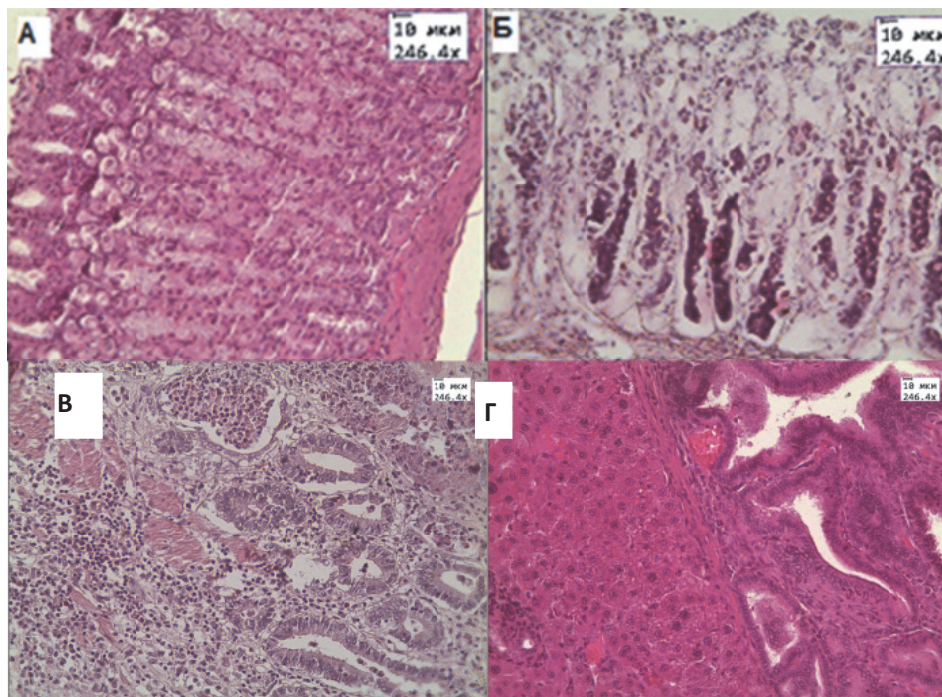


Рис. 3. Гистологический анализ различных органов крыс:

А – нормальная слизистая желудка; Б – дисплазия желез в желудке; В – высокодифференцированная аденокарцинома желудка; Г – метастазы в печени. Окраска гематоксилином и эозином

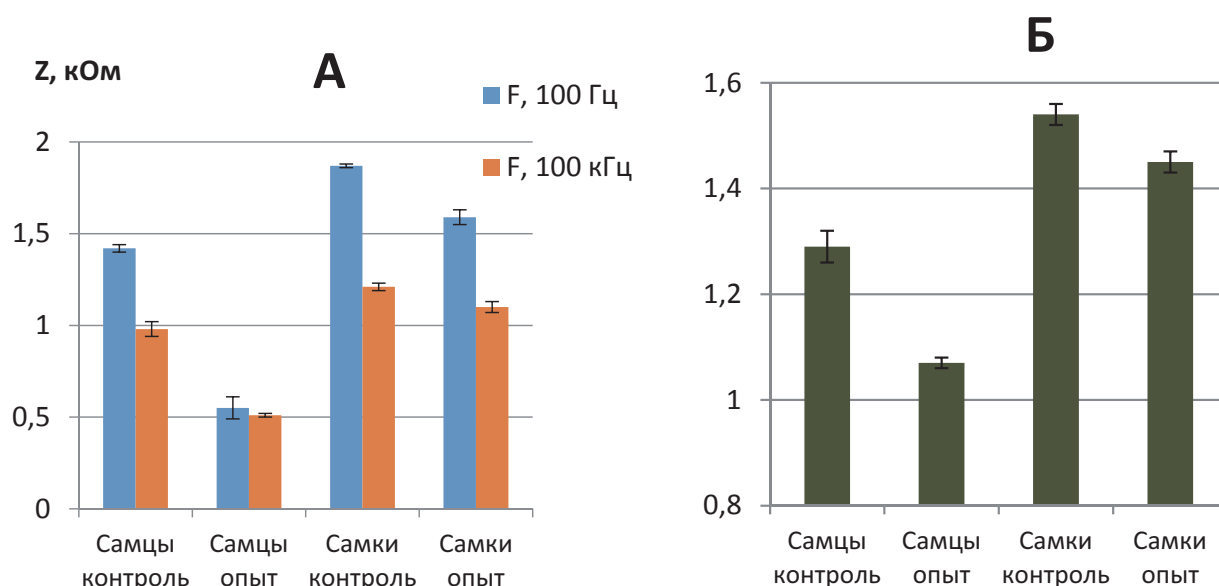


Рис. 4. Электрические показатели эритроцитарной массы на двух фиксированных частотах в контрольных и опытных группах самок и самцов белых беспородных крыс:

А – показатели импеданса (Z); Б – коэффициента поляризации (КП)

Примечание: различия статистически значимы при ($p < 0,05$)

ная система рассматривается в качестве первой мишени действия нитритов [14].

В результате проведенного анализа электрических параметров эритроцитарной массы животных обоего пола (рис.4) установлено достоверное снижение коэффициента поляризации по отношению к контрольным группам как у самцов, так и у самок. Однако у самцов этот процесс проходил более интенсивно и КП снижался на 17%, а у самок только на 6% и оставался выше единицы (величина КП для самцов -1,07, для самок -1,45), что может свидетельствовать о частичной сохранности частотного градиента электропроводности и, соответственно, структуры ткани.

Электроимпедансометрия слизистой оболочки желудка успешно применяется для диа-

гностики форм гастрита, доброкачественных и злокачественных опухолей. По литературным данным известен интервал КП, характерный для злокачественных опухолей, он составляет от 15 до 40% снижения по сравнению с данными здоровой слизистой [13].

Данные, полученные в нашем эксперименте, свидетельствуют о снижении КП слизистой желудка на 43% у самцов и на 36% у самок (табл. 1), что соответствует развитию в тканях патологического процесса.

Исследования выявили, что показатели величины импеданса ткани печени существенно отличаются от нормы как у самцов, так и у самок. Коэффициент поляризации понизился на 50 и 43% соответственно (табл.1). Обратил на себя

Таблица 1. Показатели импеданса (Z) и коэффициента поляризации (КП) тканей печени и желудка контрольных и опытных групп животных

Печень				
Пол животных	Группы животных	Z, кОм		КП
		F=100 Гц	F=100кГц	
Самцы	Контроль	4,25±0,01	0,91±0,02	4,62±0,12
	Опыт	2,31±0,04*	1,00±0,01*	2,31±0,02*
Самки	Контроль	4,61±0,12	1,21±0,08	3,81±0,11
	Опыт	3,00±0,15*#	1,37±0,06*#	2,17±0,13*#
Желудок				
Самцы	Контроль	2,06±0,05	0,92±0,03	2,22±0,04
	Опыт	1,23±0,10	0,82±0,04	1,26±0,05
Самки	Контроль	2,34±0,04	0,93±0,01	2,51±0,05
	Опыт	1,88±0,07	1,16±0,02	1,62±0,07

Примечания: достоверные различия показателей: * между контролем и опытом в каждой группе; # - экспериментальными группами самцов и самок; различия статистически значимы при ($p < 0,05$). F – частота

внимание случай визуализации крупной опухоли на печени одного из животных (самца). Выявлено, что абсолютный показатель импеданса тканей печени, в которой диагностирована опухоль, при низкой частоте снижался на 67%, а КП – на 70% по сравнению с контрольным значением. Таким образом, можно констатировать, что уровень снижения исследуемых показателей соответствует степени развития заболевания [15].

Мы полагаем, что зарегистрированные достоверные изменения электрических характеристик клеток печени могут быть следствием длительного воздействия токсикантов, нарушивших барьерную функцию мембран, баланс ионов и трансмембранную разность потенциалов.

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. Для образцов тканей крыс, находившихся в условиях стресса и интоксикации, показана большая частота встречаемости предраковых патологий слизистой желудка и метастазов в печени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в ходе эксперимента результаты свидетельствуют о наличии гендерных различий в электрических показателях тканей крыс при хроническом химическом стрессе, что может быть использовано для исследования динамики канцерогенеза *in vivo* на основе анализов импеданса эритроцитарной массы или исследования биоптатов. Показана большая подверженность процессам канцерогенеза особой мужского пола. Однако не выявлено различий в характере патологий, как ответной реакции на стресс. При моделировании хронического воздействия на животных мы использовали низкие концентрации токсикантов, с которыми люди сталкиваются в обычной жизни, потребляя продукты, содержащие повышенные концентрации нитритов, и ароматические амины, встречающиеся в копченых и жареных продуктах. Кроме того, использовано перенаселение клеток с животными, как вариант социального стресса, которому также подвержены люди. Вместе с тем разработанная нами модель является более информативной для выявления роли отдельных, главным образом физиологических факторов, в индуцировании РЖ без сопутствующих этому социально-экономических, этнических и религиозно-культурных различий, характерных для людей, которым приписывается существенная роль при канцерогенезе [16].

Поскольку одной из важнейших проблем онкологии является позднее выявление забо-

левания, развитие неинвазивных методов диагностики в значительной мере может облегчить решение этой задачи, поскольку они характеризуются быстротой, безболезненностью, простотой, экономической доступностью и отсутствием побочных эффектов, что позволяет обеспечить быстрый предварительный мониторинг больших групп населения. Исследование электрических параметров как мониторингового метода может стать одним из важных элементов системы «настороженности» медперсонала по отношению к РЖ, что важно для снижения распространения этого агрессивного заболевания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 / J. Ferlay, H.R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, D.M. Parkin // *Int. J. Cancer*. 2010. № 127. P. 2893-2917.
2. Cancer statistics / R. Siegel, J. Ma, Z. Zou, A. Jemal // *CA Cancer J. Clin.* 2014. № 64. P. 9-29.
3. Kamangar, F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world / F. Kamangar, G.M. Dores, W.F. Anderson // *J. Clin. Oncol.* 2006. № 24. P. 2137-2150.
4. Gastric cancer / H.H. Hartgrink, E.P. Jansen, N.C. van Grieken, C.J. van de Veld // *Lancet*. 2009. № 374. P. 477-490.
5. Forman, D. Gastric cancer: global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors / D. Forman, V.J. Burley // *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2006. № 20. P. 633-649.
6. Двойрин, В.В. Статистика рака желудка в России / В.В. Двойрин, Н.Н. Транезинков // *Вестник Онкологического центра РАМН*. 1995. Т. 6. № 3. С. 3-14.
7. Lin, J.T. Screening of Gastric Cancer: Who, When, and How // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2014. № 12. P. 135-138.
8. Гаджиагаев, В.А. Методы и технические средства раннего обнаружения злокачественной опухоли / В.А. Гаджиагаев, Д.А. Магомедов // *Вестник Дагестанского государственного технического университета. Технические науки*. 2014. Т. 3. № 34. С. 36-41
9. Зуев, А.Л. Физические основы применения методов регистрации биоэлектрического импеданса в медицине / А.Л. Зуев, В.Ю. Мишланов // *Пермский мед. Журнал*. 2008. Т. 25. № 1. С. 13-18.
10. Родин, А.В. Биоимпедансный анализ в медицине // *Патология, физиология и экспериментальная терапия*. 2014. № 2. С. 80-86.
11. Диагностические возможности неинвазивной биоимпедансометрии / Ю.В. Торнуев, Д.Л. Непомнящих, Д.Б. Никитюк, Г.А. Лапий, О.П. Молодых, Р.Д. Непомнящих, Е.В. Колдышева, Ю.М. Криницына, С.М. Балахнин, Р.А. Манвелидзе, Д.Е. Семенов, Б.В. Чуринов // *Фундаментальные исследования*. 2014. Т. 10. № 4. С. 782-788.
12. Леонов, С.Д. Измерение импеданса опухолевой ткани при электрохимическом лизисе / С.Д. Леонов, Д.Н. Панченков, А.В. Барсуков // *Анализы хирургической гепатологии*. 2011 Т. 16. № 3. С. 60-63.

13. Абдуллаев, Н.А. Критерии дифференциальной диагностики новообразований, гастритов и язвенной болезни желудка по показателям биоимпеданса / Н.А. Абдуллаев, С.М. Балахнин, Г.М. Бушманова // *Фундаментальные исследования*. 2015. №1 С. 1775-1779.
14. Буеверов, А.О. Оксидативный стресс и его роль в повреждении печени// *Гепатология сегодня*. 2002.Т.12. №4.С. 21-23.
15. Оценка показателей полного электрического сопротивления паренхимы печени у пациентов с заболеваниями гепатопанкреатодуоденальной зоны при лапароскопической и пункционной биоимпедансометрии / Д. Н. Панченков, С. Д. Леонов, Ю. В. Иванов, Н. А. Соловьев, А. А. Нечунаев, А. В. Родин // *Эндоскопическая хирургия*. 2015. Т. 21. № 2. С. 30-33.
16. Антипова, С.И. Гендерные проблемы онкологии в Беларуси / С.И. Антипова, В.В. Антипов, Н.Г. Шебеко // *Проблемы общественного здоровья и реформирования здравоохранения*. 2013. № 3. С. 31-41.

APPLICATION OF THE IMPEDANCE METHOD FOR COMPARATIVE RESEARCH OF THE CHRONIC CHEMICAL STRESS IMPACT ON THE DEVELOPMENT OF THE GASTROINTESTINAL TRACT PATHOLOGY OF MALE AND FEMALE WHITE OUTBRED RATS

© 2018 M.V. Kanevsky, I.K. Mironova, S.A. Konnova, , A.A. Galitskaya, I.M. Agranovich, A.P. Khorovodov, E.G. Borisova, O.V. Semyachkina-Glushkovskaya

Saratov State University

The results of comparative analyzes of the electrical properties (impedance and polarization coefficient) of healthy and pathological tissues of male and female white outbred rats are presented. It is shown that simulation of chronic chemical (diet with the inclusion of sodium nitrite and m-toluidine) and social (overcrowding) stress for 270 days leads to the development of pretumor pathologies and tumors of the gastrointestinal tract in 56% of animals, and there are 1.6 times more males with tumors than females, which is confirmed by histological studies. Measuring the impedance, it has been established that such a complex stress effect induces significant changes in the electrical parameters of the erythrocyte mass, as well as the tissues of the stomach and liver. In particular, a significant decrease was found in comparison with the control of the tissue polarization coefficient in males and females, respectively: in erythrocyte mass by 17 and 6%; in the gastric mucosa by 43 and 36%; in liver by 50 and 43% - this altogether may characterize the decrease in tissue viability and the presence of necrotic changes in them. It is shown that changes in the electrical parameters of tissues in males are more pronounced, which corresponds to the frequency of pathology development in males. It is noted that changes in the electrical parameters of erythrocyte mass is a convenient in vivo monitoring approach for studying the development of pathologies, including precancerous conditions of the gastrointestinal tract.

Keywords: rat tissue impedancemetry, gastric cancer, chronic stress.

Matvey Kanevsky, Ph.D. in Biology, Assistant Lecturer at the Department of Biochemistry and Biophysics. E-mail: matvejkaney@mail.ru

Irina Mironova, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor at the Department of Biochemistry and Biophysics. E-mail: mironovaik@mail.ru

Svetlana Konnova, Doctor of Biological Sciences, Professor, Head at the Department of Biochemistry and Biophysics. E-mail: Konnovasa@yandex.ru

Galitskaya Anna, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor at the Department of Biochemistry and Biophysics. E-mail: ann.gal@mail.ru

Ilana Agranovich, Graduate Student of the Department

of Human and Animal Physiology.

E-mail: ilana.agranovich@yandex.ru

Alexander Khorovodov, Student of the Department of Human and Animal Physiology.

E-mail: Khorovodov2012@yandex.ru

Ekaterina Borisova, Candidate of Physical and Mathematical Sciences, Associate Professor at the Department of Human and Animal Physiology.

E-mail: ekaterina.borisova@gmail.com

Oksana Semyachkina-Glushkovskaya, Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Human and Animal Physiology.

E-mail: Konnovasa@yandex.ru