



## НОВЫЙ СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ

**ВЛАДИМИР НИКОЛАЕВИЧ ОСЛОПОВ**, докт. мед. наук, профессор, зав. кафедрой пропедевтики внутренних болезней ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития РФ, e-mail: kpvbol@yandex.ru

**ЮЛИЯ ВЛАДИМИРОВНА ОСЛОПОВА**, ассистент кафедры пропедевтики внутренних болезней

ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития РФ, тел. 8-917-287-94-56

**ИАНА ВИТАЛЬЕВНА САЙФУЛЛИНА**, аспирант кафедры биохимии, мл. науч. сотрудник НОЦ Фармацевтики

«Казанского (Приволжского) федерального университета», e-mail: divitsai@gmail.com

**ТАТЬЯНА ЮРЬЕВНА АФАНАСЬЕВА**, студентка 5-го курса лечебного факультета

ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития РФ, тел. 8-937-526-29-41

**Реферат.** Состояние клеток и их мембран является одним из наиболее изучаемых показателей при патологии человека, в том числе заболеваний сердечно-сосудистой системы, в первую очередь гипертонической болезни. Выраженность и соотношение показателей состояния клеток являются различными как в преморбиде, так и при развитии заболевания. Поскольку одной из составляющих наиболее обсуждаемой мембранной теории гипертонической болезни является дефицит энергии и уменьшение трансмембранного потенциала, то выявление этих состояний посредством новых методик, основанных на использовании электрохимических биосенсоров, может помочь как ранней диагностике этих состояний, так и при определении особенностей подходов к терапии в зависимости от выраженности изменения клеточных мембран, определяемых с помощью дзета-потенциала. Эти исследования являются в России пионерскими, поэтому приобретаемый опыт является важным для проведения как популяционных, так и клинических исследований.

**Ключевые слова:** электрохимические биосенсоры, дзета-потенциал, метаболическая активность, мембранные нарушения.

## A NEW METHOD OF HUMAN CELL STATE DIAGNOSTICS BASED ON ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS

**V.N. OSLOPOV, YU.V. OSLOPOVA, D.V. SAIFULLINA, T.YU. AFANASYEVA**

**Abstract.** The state of the cells and their membranes is one of the most studied characteristics of human pathology including cardiovascular diseases and in the first place, essential hypertension. Intensity of cell state characteristics and their correlation are different in premorbid state and in case of disease. As constituent parts of the most discussed membrane theory of essential hypertension are energy deficiency and transmembrane potential decrease, determining of these characteristics by new methods based on electrochemical biosensors might help both early diagnosing of these states and defining therapy features depending on cell membrane changes intensity determined by zeta-potential. This study is first in Russia so acquired experience is important for population-based and clinical studies.

**Key words:** electrochemical biosensors, zeta-potential, metabolic activity, membrane malfunction.

Исследование состояния клеток широко применяется в медицине для диагностики различных заболеваний. В настоящее время известно, что в качестве показателей состояния клеток могут определяться метаболическая активность и состояние мембран [11]. Разработка экспресс-методов оценки данных показателей является весьма актуальной задачей. Существующие в настоящее время способы оценки состояния клеток являются дорогостоящими, не всегда доступны и не позволяют проводить скрининг населения для выявления различных заболеваний, для которых характерно изменение состояния клеток. К настоящему моменту разработаны новые методы оценки состояния клетки путем исследования поверхностного заряда клеточной мембраны (дзета-потенциала) и окислительно-восстановительной активности метаболитов, которые могут позволить обследовать большую группу населения для ранней диагностики заболеваний без существенных экономических затрат.

Актуально изучение и определение состояния клеток и их мембран при таком заболевании, как гипертоническая болезнь. Согласно мембранной концепции развития гипертонической болезни Ю.В. Постнова, в основе ее лежат генетически детерминированные нарушения строения и функции клеточных мембран, которые можно определить по показателям ионных транспортных систем. Кроме того, при этом уменьшается величина трансмембранного потенциала (по Ю.В. Постнову, гипертоническая болезнь – болезнь низкого трансмембранного потенциала). Таким образом, ассоциация методов определения дзета-потенциалов и трансмембранных потенциалов способна расширить возможности диагностики гипертонической болезни и выявить различные ее варианты.

Метаболическая активность клетки является важным методом оценки состояния клеток. Содержание в клетках макроэргических биомолекул отражает энергетический статус клеток и изменяется при патологиче-

ских процессах, повреждении клеток и апоптозе [9,10]. Так, проведенные разными авторами исследования показали наличие корреляции между содержанием глутатиона в эритроцитах и болезнью Альцгеймера [13], ВИЧ [15], рассеянным склерозом [14], различными формами опухолей [17], а также сахарным диабетом [8].

В последние годы появились данные о причинной связи первичной гипертензии с тканевым дефицитом энергии (АТФ) в связи с нарушениями митохондриального энергообразования. Было установлено, что генетически детерминированная перегрузка клеток  $Ca^{2+}$  может активировать митохондриальные  $Ca^{2+}$ -каналы и приводить к снижению синтеза АТФ, что вызывает его дефицит и повышение активности вазомоторных центров и симпатического отдела вегетативной нервной системы [3, 4, 5, 6]. Таким образом, исследование метаболической активности клеток по содержанию АТФ с помощью электрохимических биосенсоров, вероятно, поможет определить возможность развития гипертонической болезни еще в преморбидном состоянии и будет способствовать устранению факторов риска у таких пациентов и лучшей профилактике.

Для анализа метаболитов клеток актуально использовать биосенсоры, которые позволяют быстро и селективно исследовать биомолекулы, находящиеся в прямом контакте с преобразователем сигнала [12]. Известно, что такого рода изменения имеют место при метаболическом синдроме, сахарном диабете, сердечно-сосудистых заболеваниях, болезни печени [1].

Дзета-потенциал (греч. ζητα – 6-я буква греческого алфавита, в системе греческой алфавитной записи чисел имеет числовое значение 7) – электрокинетический потенциал – разность потенциалов, возникающая между дисперсной фазой и дисперсионной средой в силу их взаимного перемещения (рис. 1). Дзета-потенциал возникает в результате накопления электрических зарядов на границе раздела твердой и жидкой фаз. В результате этого на фазовой границе образуется двойной электрический слой. Контактующие фазы приобретают заряды противоположного знака, но равной величины, что приводит к образованию двойного электрического слоя. Дзета-потенциал соответствует плоскости скольжения и является частью потенциала диффузного слоя. Плоскость скольжения образуется в

результате того, что при движении дисперсных частиц наиболее удаленная часть диффузного слоя не участвует в движении, а остается неподвижной. Поэтому появляется нескомпенсированность поверхностного заряда частицы и становятся возможными электрокинетические явления.

Известно, что большинство клеток человека на своей поверхности несут определенный отрицательный заряд, обусловленный присутствием ионизированных фосфатных и карбоксильных заместителей на внешней стороне поверхностных макромолекул [16, 18]. В ряде исследований показано, что значение дзета-потенциала клеток человека изменяется при различных заболеваниях. В частности, при ангиогемофилии (болезнь Виллебранда), тромбастении, отеке легких, сепсисе и инфекционных заболеваниях, обморожениях наблюдается уменьшение дзета-потенциала. При раке простаты и при лечении эстрогенами, наоборот, отмечается его увеличение [16].

Измерение дзета-потенциала возможно с помощью микроэлектрофореза и метода динамического светорассеяния. Величина электрокинетического потенциала определяется по скорости движения частиц при данном градиенте электрического поля. Отрицательный заряд на поверхности клеток определяет электрокинетические свойства клеток, т.е. скорость их передвижения в электрическом поле. Поскольку поверхностный заряд зависит от степени диссоциации ионогенных групп, величина электрофоретической подвижности будет изменяться при изменении рН окружающей среды [6]. Наиболее перспективным методом исследования дзета-потенциала является метод динамического светорассеяния – метод измерения размеров наночастиц, основанный на определении коэффициента диффузии дисперсных частиц в жидкости путем анализа характерного времени флуктуаций интенсивности рассеянного света.

Задача данного исследования заключается в получении значений содержания биомолекул, отражающих метаболическую активность клеток, и дзета-потенциала эритроцитов, характерных для здоровых людей, с целью их дальнейшего использования в качестве ориентиров для сравнения с этими же показателями при патологии.

**Материал и методы.** Материалом настоящего исследования служат эритроциты человека, получаемые путем центрифугирования цельной крови. Методами исследования являются:

1) определение метаболической активности клеток по содержанию метаболитов (в частности, АТФ) с помощью квадратно-волновой вольтамперометрии на модифицированных электродах. Клетки, лизированные осмотическим шоком, переносятся в дистиллированную воду и перемешиваются на вортексе, затем в целях предотвращения разрушения метаболитов сразу после лизиса замораживаются при температуре  $-20^{\circ}C$  и размораживаются непосредственно перед электрохимическими измерениями;

2) определение дзета-потенциала эритроцитов в суспензии ( $1 \times 10^6$  клеток/мл) методом электрофоретического светорассеяния на анализаторе Zetasizer Nano ZS («Malvern Instruments», Великобритания) (рис. 2). Измерения проводятся в U-образной кювете с золотыми электродами при рН 7,4 и температуре  $25^{\circ}C$  в фосфатном буфере, не содержащем ионы хлора (рис. 3). Результаты обрабатываются с помощью программного обеспечения Dispersion Technology Software 6.2 («Malvern Instruments»).

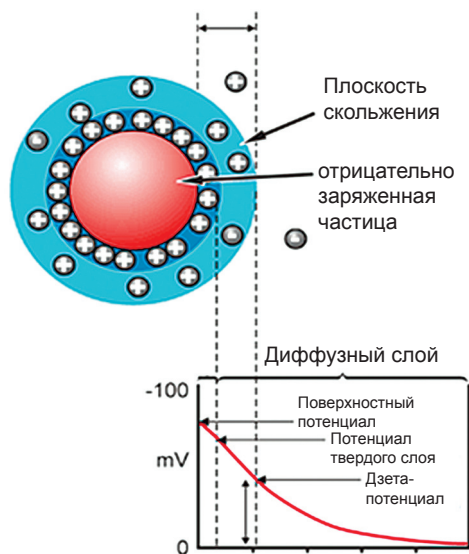


Рис. 1. Дзета-потенциал



Рис. 2. Zetasizer Nano ZS



Рис. 3. U-образные кюветы с золотыми электродами

**Результаты и их обсуждение.** В настоящее время для более рационального и экономичного использования реагентов происходит накопление материалов для исследования метаболической активности клеток по содержанию метаболитов (АТФ) с помощью квадратно-волновой вольтамперометрии на модифицированных электродах. В ранее проведенных исследованиях были получены данные о том, что чистые метаболиты, отражающие состояние клеток, окисляются на модифицированном электроде при различных, определенных для каждого вещества потенциалах (таблица). Исследование клеток линии HeLa методом квадратно-волновой вольтамперометрии на модифицированных электродах показало, что эти клетки генерируют 3 пика при потенциалах +0,8, +1,1 и +1,2 В, каждый из которых обусловлен определенными метаболитами, выделяющимися из клеток (рис. 4). При этом величина сигналов отражает количественное содержание метаболитов внутри клеток.

**Потенциалы окисления чистых метаболитов**

Метаболиты клеток	Потенциал окисления, В
Глутатион	+0,81
Цистеин	+0,82
Тирозин	+0,79
Белки	+0,8
Серотонин	+0,63
ГТФ	+1,06
АТФ	+1,2

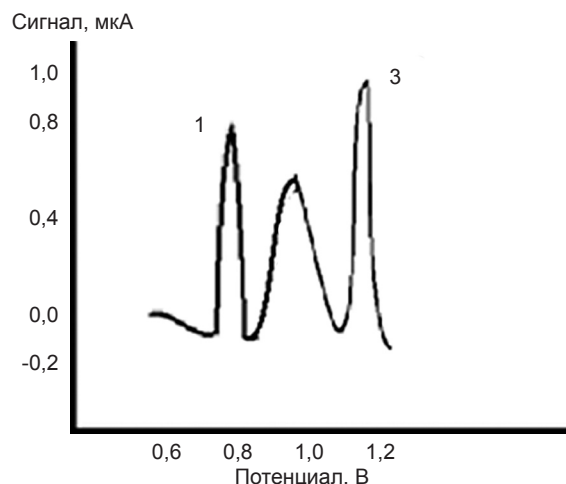


Рис. 4. Сигнал окисления клеток линии HeLa на модифицированном электроде (концентрация клеток 1 млн/мл)

В дальнейшем при получении данных о потенциалах окисления, при которых клетки человека, в частности эритроциты, генерируют пики, путем сравнения с потенциалами окисления чистых биомолекул можно будет определить качественное и количественное содержание метаболитов клеток.

Методом динамического светорассеяния определены дзета-потенциалы эритроцитов 23 здоровых человек от 17 до 32 лет. Среднее значение дзета-потенциала составляет -30,02 мВ, в диапазоне от -23,6 до -34,9 мВ.

**Вывод.** Полученные в исследовании данные будут служить ориентиром для сравнения с данными пациентов, в первую очередь страдающих сердечно-сосудистой патологией, в частности гипертонической болезнью.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Вельков, В.В. Многомерная биология XXI века и клиническая лабораторная диагностика / В.В. Вельков // Химия и жизнь. – 2007. – № 3. – URL: <http://www.cbio.ru/article.php?storyid=2715>  
Vel'kov, V.V. Mnogomernaya biologiya XXI veka i klinicheskaya laboratornaya diagnostika / V.V. Vel'kov // Himiya i zhizn'. – 2007. – № 3. – URL: <http://www.cbio.ru/article.php?storyid=2715>
2. Постнов, Ю.В. Первичная гипертония как патология клеточных мембран / Ю.В. Постнов, С.Н. Орлов. – М.: Медицина, 1987.  
Postnov, Yu.V. Pervichnaya gipertenziya kak patologiya kletochnyh membran / Yu.V. Postnov, S.N. Orlov. – M.: Medicina, 1987.
3. Постнов, Ю.В. К истокам первичной гипертонии: подход с позиций биоэнергетики / Ю.В. Постнов // Кардиология. – 1998. – № 12. – С. 41–48.  
Postnov, Yu.V. K istokam pervichnoi gipertenzii: podhod s pozicij bioenergetiki / Yu.V. Postnov // Kardiologiya. – 1998. – № 12. – S. 41–48.
4. Постнов, Ю.В. О роли кальциевой перегрузки митохондрий и энергетического дефицита в патогенезе первичной артериальной гипертонии / Ю.В. Постнов // Архив патологии. – 2001. – № 3. – С. 3–10.  
Postnov, Yu.V. O roli kal'cievoi peregruzki mitohondrii i energeticheskogo deficita v patogeneze pervichnoi arterial'noi gipertenzii / Yu.V. Postnov // Arhiv patologii. – 2001. – № 3. – S. 3–10.
5. Постнов, Ю.В. О роли недостаточности митохондриального энергообразования в развитии первичной гипертонии: нейрогенная составляющая патогенеза гипертонии / Ю.В. Постнов // Кардиология. – 2004. – № 6. – С. 52–58.

- Postnov, Yu.V.* O roli nedostatochnosti mitochondrial'nogo energoobrazovaniya v razvitii pervichnoi gipertenzii: neirogenaya sostavlyayuschaya patogeneza gipertenzii / Yu.V. Postnov // *Kardiologiya*. – 2004. – № 6. – S. 52-58.
6. *Ребров, В.Г.* Исследования электрических свойств поверхности клеток: учеб. пособие / В.Г. Ребров. – 2009. – С. 1–8.  
*Rebrov, V.G.* Issledovaniya elektricheskikh svoystv poverhnosti kletok: ucheb. posobie / V.G. Rebrov. – 2009. – S. 1–8.
7. *Хасанов, Н.Р.* Оценка роли глутаматовой системы в регуляции артериального давления у больных гипертонической болезнью методом молекулярно-генетического анализа / Н.Р. Хасанов, Д.Р. Хасанова, В.Н. Ослопов // *Практическая медицина*. – 2012 (in press).  
*Hasanov, N.R.* Ocenka roli glutamatovoi sistemy v regulyacii arterial'nogo davleniya u bol'nyh gipertonicheskoi bolezni'yu metodom molekulyarno-geneticheskogo analiza / N.R. Hasanov, D.R. Hasanova, V.N. Osloпов // *Prakticheskaya medicina*. – 2012 (in press).
8. *Beard, K.M.* Metabolism, not autoxidation, plays a role in alpha-oxoaldehyde- and reducing sugar-induced erythrocyte GSH depletion: relevance for diabetes mellitus / K.M. Beard, N. Shangari, B. Wu [et al.] // *Molecular and cellular biochemistry*. – 2003. – Vol. 252. – P. 331–338.
9. *Crouch, M.S.P.* The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity / M.S.P. Crouch, R. Kozlowski, J.K. Slater, J. Fletcher // *J. Immunol. Methods*. – 1993. – Vol. 160(1). – P. 81–88.
10. *Eltzschig, H.K.* ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function / H.K. Eltzschig, T. Eckle, A. Mager [et al.] // *Circ. Res.* – 2006. – Vol. 99(10). – P. 1100–1108.
11. *Goodacre, R.* In *Metabolic Profiling: Its Role in Biomarker Discovery and Gene Function Analysis* / R. Goodacre, D.B. Kell, G.G. Harrigan, R. Goodacre eds. – Kluwer Academic Publishers: Boston, 2003. – P. 337.
12. *Iost, R.M.* Electrochemical nano(bio)sensors: advances, diagnosis and monitoring of diseases / R.M. Iost, W.C. da Silva, J.M. Madurro [et al.] // *Front Biosci (Elite Ed)*. – 2011. – Vol. 1(3). – P. 663–689.
13. *Liu, H.* Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease / H. Liu, H. Wang, S. Shenvi [et al.] // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2004. – Vol. 1019. – P. 346–349.
14. *Polidoro, G.* Superoxide dismutase, reduced glutathione and TBA-reactive products in erythrocytes of patients with multiple sclerosis / G. Polidoro, C. Di Ilio, A. Arduni [et al.] // *The international journal of biochemistry*. – 1984. – Vol. 16(5). – P. 505–509.
15. *Repetto, M.* Oxidative stress in blood of HIV infected patients / M. Repetto, C. Reides, M.L. Gomez Carretero [et al.] // *Clin. Chim. Acta*. – 1996. – Vol. 255. – P. 107–117.
16. *Stoltz, J.F.* Electrochemical properties of platelets: clinical and pharmacological applications / J.F. Stoltz // *Ann. NYAS*. – 1983. – Vol. 416. – P. 720–741.
17. *Subapriya, R.* Oxidant-antioxidant status in patients with oral squamous cell carcinomas at different intraoral sites / R. Subapriya, R. Kumaraguruparan, C.R. Ramachandran, S. Nagini // *Clin. Biochem.* – 2002. – Vol. 35. – P. 489–493.
18. *Wilson, W.W.* Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements / W.W. Wilson, M.M. Wade, S.C. Holman, F.R. Champlin // *J. of Microbiol. Meth.* – 2001. – № 43. – P. 153–164.

© Кадыров Р.К., 2012

УДК 616.37-005.4:615.272

## ВЛИЯНИЕ КСИМЕДОНА НА ДЕСТРУКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ, ВЫЗВАННЫЕ ИШЕМИЕЙ

**РЕНАТ КАРИМОВИЧ КАДЫРОВ**, канд. мед. наук, ассистент кафедры нормальной анатомии ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, тел. 8-903-314-76-95, e-mail: kadrenat59@mail.ru

**Реферат.** Целью данного исследования было изучение структуры поджелудочной железы на разных сроках ишемии при предварительном введении ксимедона. Исследование проведено с помощью гистологических методов, а также методов ЭПР- и ЯМР-спектроскопии. Установлено, что при внутрибрюшинном введении ксимедона в дозе 3,3 мг/кг ишемические повреждения в структуре поджелудочной железы кошки развиваются медленнее, чем без применения ксимедона. Исходя из вышеизложенного, следует предложить использование ксимедона в качестве протекторного средства в комплексном лечении ишемических панкреонекрозов.

**Ключевые слова:** ксимедон, поджелудочная железа, ишемия, ЭПР-спектроскопия, ЯМР-спектроскопия.

## EFFECT OF XYMEDONE ON DESTRUCTIVE CHANGES IN THE PANCREAS CAUSED BY ISCHEMIA

**R.K. KADYROV**

**Abstract.** Studying of structure of a pancreas on different terms of an ischemia at preliminary introduction xymedone was an objective of this research. Research is spent by means of histologic methods, and also methods ЭПР – and NMR – spectroscopy. It is established that at intraperitoneal introduction xymedone in a 3,3mg/kg dose ischemic damages to structure of a pancreas of a cat develop more slowly, than without application xymedone. Proceeding from the above-stated, it is necessary to offer use xymedone in quality protector means in complex treatment ischemic pancreatic necrosis.

**Key words:** xymedon, pancreas, ischemia, EPR-spectroscopy, NMR-spectroscopy.

Проблема ишемического повреждения поджелудочной железы, а также необходимость максимального уменьшения выраженности ишемической деструкции остается одной из самых

актуальных и недостаточно изученных в медицине. Перспективным в этом направлении может оказаться подход с фармакологической коррекцией ишемических повреждений, что активно используется