

браны, в первую очередь ее вязкости [1]. Несмотря на это, потенциодинамическим методом получают точные значения внутримембранного скачка потенциала. В случае  $\varphi_i = 0$  мВ кривые емкостного тока, полученные на прямом и обратном ходах симметричной развертки, полностью совпадают. Появление трансмембранного скачка потенциала (например, при изменении ионной силы электролита) по одну из сторон мембраны приводит к трансформации потенциодинамической кривой (см. рис. 3). Размер этого скачка легко определить из результата смещения пилообразного напряжения относительно нулевого значения, необходимого для совмещения потенциодинамических кривых при различной полярности подаваемого напряжения. Для полного совмещения кривых конкретной мембраны необходимо подбирать оптимальную скорость развертки пилы. На практике нет необходимости добиваться полного совмещения кривых, достаточно совмещения правых круто восходящих ветвей (см. рис. 3). Метрологические характеристики установки определяются линейностью генератора пилообразного напряжения (0,01 %) и уровнем шумов преобразователя ток — напряжение (0,2 нА<sup>1</sup>). Точность определения зависит от емкости конкретной мембраны и составляет в среднем 5 мВ.

1. Абидор И. Г., Айтян С. Х., Черный В. В. и др. Измерение внутримембранного скачка потенциала потенциодинамическим методом // Докл. АН СССР. — 1979. — 245, № 4. — С. 977—981.

Одес. ун-т им. И. И. Мечникова  
МЕСО УССР

Поступила 01.03.84

УДК 615.217.22+615.357:612.014.4:611—018.51

## Методические подходы к исследованию модулирующих эффектов простагландина $E_2$ в гормонально-стимулируемой аденилатциклазной системе эритроцитов

Л. Т. Малай, Т. Ю. Щеголева, Л. К. Бахова

Различные виды воздействия простагландинов (ПГ) трудно поддаются обобщению, так как ряд реакций организма на введение простагландинов имеет видовую и тканевую специфичность, зависит от способа введения и дозировки. Чрезвычайно трудно оценить, является ли реакция организма в каждом конкретном случае прямой или опосредованной [1].

Ранее было установлено, что простагландин  $E_2$  (ПГЕ<sub>2</sub>) защищает мембрану кардиомиоцитов и эритроцитов от повреждения в условиях перегрузки кардиомиоцитов кальцием [2, 3]. Представляет, по нашему мнению, интерес сопоставить эти данные с определяемой в аналогичных условиях характеристикой такого параметра, как гидратное окружение функционально активных эритроцитов у крыс и человека.

Цель настоящей работы — сопоставление данных реакции на введение ПГЕ<sub>2</sub> *in vivo* и *in vitro*, полученных методом СВЧ-диэлектрометрии и сравнение их с результатами других методических подходов.

### Методика

Измерение диэлектрической проницаемости проведено на волне длиной 7,6 мм с помощью СВЧ-диэлектрометра, разработанного в Институте радиофизики и электроники АН УССР и специально модифицированного для этих задач [4]. Погрешность измерения  $\epsilon'$  и  $\epsilon''$  составляет 3 %. Объем суспензии эритроцитов, заливаемой в измеритель-

<sup>1</sup> Уровень шумов, приведенный к входу.

ную ячейку, не превышает 0,01 мл. На данном уровне интерпретация проницаемости использованы кривые функционального состояния мембран.

Исследования *in vivo* осуществлялись на модели кальциевых каналов stein и соавт. [8]. Животных контрольные животные, которых в ту же массу тела животного

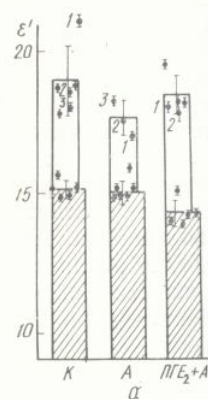


Рис. 1.  $\epsilon'$  — действительная часть диэлектрической проницаемости эритроцитов:

К — контроль; А — адrenaлeктомия; ПГ — простагландин; в условиях *in vivo*; светлые столбики — крысы; темные — крысы; 1—3 — индивидуальные значения пробы эритроцитов человека; 1' —

Рис. 2. Зависимость  $\epsilon'$  — действительной части диэлектрической проницаемости суспензии эритроцитов от концентрации адrenaлeктомии (1 — без добавок; 2 — с добавками: 2 — реноблокатор (дигидроэрготамин); 3 — налгин; 4 — адrenaлин+изопропранолон; 5 —

вную перегрузку кардиомиоцитов — животные, которым вводили адrenaлин. Через 15—16 часов кровь животных собирали, и ЭДТА, а затем в эритроцитах катехоламинов и ДОФА [5], с липидов [7], активность хеморецепторных мембран.

Аналогичные воздействия в логическом растворе эритроцитов изучали состояние гидратного

### Результаты и их обсуждение

Для определения способов опробованы три эксперимента заключается в обычном  $\epsilon^*$  для разных особей в зависимости от дозы. Видно, что в этом случае чтобы получить достаточное исключение погрешности в пробе, в следующем эксперименте к одному количеству пробной плотности суспензии позволяет добиться

ную ячейку, не превышает 0,01 мл. Продолжительность измерения не более 2—3 мин. На данном уровне интерпретации полученные значения комплексной диэлектрической проницаемости использованы как параметр, характеризующий только факт изменения функционального состояния мембран.

Исследования *in vivo* осуществляли на 30 крысах-самцах линии Вистар массой 180—220 г на модели кальциевой перегрузки кардиомиоцитов, вызываемой по Fleckapstein и соавт. [8]. Животных разделили на три группы. Первую группу составили контрольные животные, которым вводили физиологический раствор в объеме, соответствующем массе тела животного; вторую — животные, у которых вызывали кальцие-

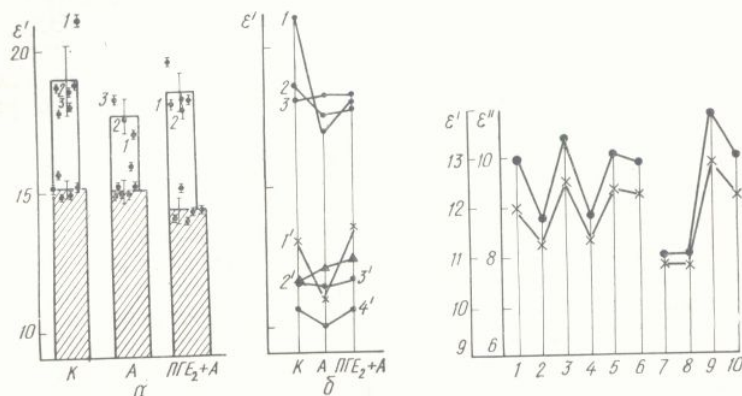


Рис. 1.  $\epsilon'$  — действительная часть комплексной диэлектрической проницаемости суспензии эритроцитов:

К — контроль; А — адреналин;  $PGE_2+A$  — простагландин  $E_2$  + адреналин. На а: заштрихованные столбики в условиях *in vivo*; светлые — *in vitro*. 1—3 — индивидуальные номера проб эритроцитов крысы; На б: 1—3 — индивидуальные номера проб эритроцитов крысы; 1'—4' — индивидуальные номера проб эритроцитов человека; 1', 3', 4' — норма; 2 — патология.

Рис. 2. Зависимость  $\epsilon'$  — действительной и  $\epsilon''$  — мнимой части диэлектрической проницаемости суспензии эритроцитов человека (● —  $\epsilon'$ ; × —  $\epsilon''$ ):

1 — без добавок; 2 —  $PGE_2$ ; 3 —  $PGE_2+Ca^{2+}$  (1); 4 —  $PGE_2+Ca^{2+}$  (2); 5 —  $PGE_2+\alpha$ -адреноблокатор (дигидроэрготамин); 6 —  $PGE_2+\beta$ -адреноблокатор обзидан (пропранолол); 7 — адреналин; 8 — адреналин + изоптин; 9 — адреналин +  $PGE_2$ ; 10 — адреналин +  $PGE_2$  + изоптин.

вую перегрузку кардиомиоцитов, вводя адреналин в дозе 300 мкг/100 г массы; третью — животные, которым вводили  $PGE_2$  в дозе 6 мкг/100 г массы за 20 мин до введения адреналина. Через 15—16 ч после введения препаратов крыс декапитировали. Кровь животных собирали, используя в качестве антикоагулянта 6 %-ный раствор ЭДТА, а затем в эритроцитах и плазме исследовали ряд показателей: содержание катехоламинов и ДОФА [5], общих (ТБК-активных) продуктов перекисного окисления липидов [7], активность хемилюминесценции и состояние гидратного окружения эритроцитарных мембран.

Аналогичные воздействия исследовали *in vitro* на интактных, отмытых в физиологическом растворе эритроцитах крыс и человека. В исследованиях *in vivo* и *in vitro* изучали состояние гидратного окружения эритроцитов.

## Результаты и их обсуждение

Для определения способа достоверной сравнительной оценки данных опробованы три экспериментальных подхода (рис. 1). Первый подход заключается в обычном вариационном анализе полученных значений  $\epsilon^*$  для разных особей в каждой группе животных. На рис. 1, а приведены данные с учетом разброса результатов в условиях эксперимента. Видно, что в этом случае требуется очень большое число вариантов, чтобы получить достаточную степень достоверности различий. Для исключения погрешностей, вызванных разбросом числа эритроцитов в пробе, в следующем эксперименте предварительно приводили все пробы к одному количественному показателю для эритроцитов по оптической плотности суспензии эритроцитов ( $\lambda$  — 580 нм). Такой способ позволяет добиться разброса значений концентраций, который на-

ходится в пределах погрешности диэлектromетра. Необходимая добавка физиологического раствора определяется по формуле:

$$\Delta V_2 = V_2 \frac{\Delta V''}{V''},$$

где  $\Delta V_2$  — объем физиологического раствора, который добавляется в пробу для диэлектromетрии;  $V_2$  — объем взятой для исследования исходной эритроцитарной взвеси;  $V''$  — объем залитой в кювету ФЭКа точно разведенной эритроцитарной суспензии;  $\Delta V''$  — объем физиологического раствора, который нужно добавить в кювету ФЭКа, чтобы уравнивать концентрации. Однако, как показывает эксперимент, такая обработка уменьшает погрешность при определении отличий показателей незначительно, что позволяет сделать вывод о том, что разброс в данном случае определяется индивидуальными отличиями особей.

Второй подход заключается в том, что в эксперименте *in vitro* без приведения к одинаковым показателям концентрации эритроцитов в исследуемой пробе по ФЭКу использовали обычную статистическую обработку данных. При этом наблюдался даже больший по сравнению с аналогичными исследованиями *in vivo* (см. рис. 1, а) разброс данных.

Третий подход заключается в том, что сравниваются индивидуальные отличия в экспериментах *in vitro* на эритроцитарной суспензии одной особи. На рис. 1, б даны значения диэлектрической проницаемости суспензии эритроцитов человека и крысы при такой постановке задачи. На эритроцитах крыс (см. рис. 1, б, 1—3) видно, что эффект воздействия адреналина и ПГЕ<sub>2</sub> достаточно индивидуален. Аналогичный результат получен на эритроцитах человека, при этом в норме для всех особей характер воздействий остается постоянным, меняется лишь его амплитуда. В условиях патологии характер воздействий агентов имеет иную направленность и значительно отличается от обнаруживаемого у здоровых лиц (см. рис. 1, б, 1'—4'). Причем эффект значительно превышает погрешность эксперимента.

В настоящее время имеется ряд методов, кроме СВЧ-диэлектromетрии, позволяющих в той или иной мере оценить характер действия ПГЕ<sub>2</sub> на разных уровнях организации живого. В эксперименте *in vitro* в условиях кальциевой перегрузки кардиомиоцитов (ишемия миокарда) обнаружен четкий модулирующий эффект ПГЕ<sub>2</sub> на повреждающее воздействие высоких концентраций катехоламинов крови. Как было установлено нами ранее [2, 3], *in vivo* наблюдалась значительная закономерная активация функциональной активности симпат-адреналовой системы, сопровождающаяся катехоламинемией, усилением захвата адреналина эритроцитами и активацией процессов перекисного окисления липидов в эритроцитарной мембране при ишемии миокарда у крыс. Модулирующее действие ПГЕ<sub>2</sub> в условиях эксперимента заключалось в снижении захвата эритроцитами адреналина и активности процессов перекисного окисления липидов. Также уменьшались содержание гидроперекисей, активность хемилюминесценции в плазме и, по-видимому, микровязкость эритроцитарных мембран, о чем свидетельствует некоторое незначительное увеличение ( $P > 0,05$ ) этих показателей в эритроцитах.

Использованные нами в эксперименте методы исследования гормональных эффектов, реализации механизмов повреждения и модулирующего действия ПГЕ<sub>2</sub> требуют большой статистики и могут быть использованы, как сказано выше, для изучения механизма модулирующего действия ПГЕ<sub>2</sub> на молекулярном уровне лишь опосредованно.

Четкий эффект модулирующего действия ПГЕ<sub>2</sub>, обнаруженный при учете индивидуальных отличий как у человека, так и у крыс в опытах *in vitro* методом СВЧ-диэлектromетрии, хорошо коррелирует с результатами, полученными *in vivo* и дает вместе с тем более обширную информацию о механизме такого действия. Причем, как и следовало ожидать, обычные методы вариационной статистики только осложняют оценку модулирующего эффекта ПГЕ<sub>2</sub>, исключают учет индивидуальной

реакции организма. При индивидуальном делении погрешность метода Сходимости результатов цитов, и систематических  $\leq 3\%$  по  $\epsilon'$ ,  $\epsilon''$  (указанных измерениях можно

Резюмируя, можно сказать, что функционального СВЧ-диэлектromетрии гормонально-стимулирующего коррелирует с клеточного повреждения ценовой перегрузки кар

Полученные *in vitro* суются с хорошо известными. Так, например, хронической стимуляцией аденилат ПГЕ<sub>2</sub> [6] как модулятора двойная модуляция действием ПГЕ<sub>2</sub> и концентрации. Таким образом, в можно решить *in vitro* удобной моделью явля

#### PROCEDURE APPROACHES TO STUDY THE EFFECTS OF E<sub>2</sub> PROSTAGLANDIN ON ADENYLATE CYCLASE SYSTEM

L. T. Malaya, T. Yu. Shchegoleva

Modulating PGE<sub>2</sub> effects in erythrocytes have been studied by the method of external catecholamines in the UHF-methods. This method of measuring the calcium addition with the calcium addition is shown to be highly sensitive at the cellular level. The correlation between the results has been demonstrated by the bi

Institute of Therapy, Kharkov Institute of Radiophysics and Academy of Sciences of the U

1. Берштейн Л. М. Простагландины. — 1975. — 6, № 2. — С. 1—10.
2. Малая Л. Т., Лазарева С. В. Влияние адреналина на повреждение введением Эпидемиология, профилактика. — Харьков. — 1984. — С. 16—17.
3. Малая Л. Т., Лазарева С. В. Повреждение миокарда дозирования простагландинов. — Харьков. — 1984. — С. 16—17.
4. Щеголева Т. Ю. Гидратная диэлектromетрия // Биофизика. — 1987. — 32, № 1. — С. 1—10.
5. Матлина Э. Ш. Флюориметрия в периферической крови // Методы определения гормонов. — М.: Медицина. — 1987. — С. 1—10.
6. Меерсон Ф. З. Патогенез ишемического сердца. — М.: Медицина. — 1987. — С. 1—10.
7. Asakawa I., Matsushita S. Lipid hydroperoxides // Lipid hydroperoxides. — New York: Pergamon press. — 1987. — С. 1—10.
8. Fleckanstein G., Rona G. Lipid hydroperoxides. — New York: Pergamon press. — 1987. — С. 1—10.

Харьков. ин-т терапии М-в Ин-т радиопизики и электр

реакции организма. Работа же *in vitro* с эритроцитами одной особи или индивидуума делает эти эффекты очевидными, так как реальная погрешность метода СВЧ-диэлектromетрии, включающая и воспроизводимость результатов при заливке одной и той же суспензии эритроцитов, и систематическую статистическую погрешность измерения  $\epsilon^* \leq 3\%$  по  $\epsilon'$ ,  $\epsilon''$  (указана на рис. 1). Изменение же  $\epsilon^*$  при неоднократных измерениях можно фиксировать с точностью  $\leq 1\%$  по  $\epsilon'$ ,  $\epsilon''$ .

Резюмируя, можно сказать, что в системе *in vitro* при исследовании функционального состояния эритроцитарных мембран методом СВЧ-диэлектromетрии обнаружено модулирующее действие ПГЕ<sub>2</sub> на гормонально-стимулируемую аденилатциклазную систему, которое надежно коррелирует с модулирующими эффектами ПГЕ<sub>2</sub> на механизмы клеточного повреждения в условиях экспериментально вызванной кальциевой перегрузки кардиомиоцитов.

Полученные *in vitro* методом СВЧ-диэлектromетрии данные согласуются с хорошо известными эффектами ПГЕ<sub>2</sub> на молекулярном уровне. Так, например, хорошо известен факт сопряжения потока  $\text{Ca}^{2+}$  со стимуляцией аденилатциклазной системы катехоламинами и участие ПГЕ<sub>2</sub> [6] как модулятора гормональных эффектов. На рис. 2 представлена двойная модуляция аденилатциклазной системы эритроцитов действием ПГЕ<sub>2</sub> и концентрационного градиента кальция.

Таким образом, видно, что целый ряд экспериментальных задач можно решить *in vitro*, а не *in vivo* и в этом аспекте достаточно удобной моделью является эритроцит.

#### PROCEDURE APPROACHES TO THE INVESTIGATION OF MODULATING EFFECTS OF E<sub>2</sub> PROSTAGLANDIN IN HORMONAL-STIMULATED ADENYLATE CYCLASE SYSTEM OF ERYTHROCYTES

L. T. Malaya, T. Yu. Shchegoleva, L. K. Bakhova

Modulating PGE<sub>2</sub> effects in hormonal-stimulated adenylate cyclase system of the rat erythrocytes have been studied under conditions of cardiomyocyte by calcium induced by external catecholamines in the *in vivo* and *in vitro* experiment using the dielectrometry UHF-methods. This method has been used to compare the PGE<sub>2</sub> protection effect combining with the calcium additions on the membrane of human erythrocytes. The method is shown to be highly sensitive to the individual features of the organism at the molecular level. The correlation effects «*in vivo*» and «*in vitro*» on the rat erythrocytes have been demonstrated by the biochemical methods.

Institute of Therapy, Kharkov  
Institute of Radiophysics and Electronics,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kharkov

1. Берштейн Л. М. Простагландины и их физиологическое значение // Успехи физиол. наук.— 1975.— 6, № 2.— С. 111—129.
2. Малая Л. Т., Лазарева С. А., Бахова Л. К., Загоруйко Г. Е. Коррекция клеточного повреждения введением ПГЕ<sub>2</sub> в условиях кальциевой перегрузки кардиомиоцитов // Эпидемиология, профилактика и лечение болезней сердечно-сосудистой системы.— Харьков.— 1984.— С. 16—21.
3. Малая Л. Т., Лазарева С. А., Бахова Л. К. и др. Применение ПГЕ<sub>2</sub> с целью защиты поврежденного миокарда // II Всесоюз. совещ. «Синтетические и прикладные исследования простагландинов», Уфа, сент.— окт. 1984 г.— Уфа, 1984.— С. 1.
4. Щеголева Т. Ю. Гидратное окружение макромолекул биополимеров по данным СВЧ-диэлектromетрии // Биофизика.— 1984.— 29, № 6.— С. 935—939.
5. Матлина Э. Ш. Флюорометрический метод определения адреналина и норадреналина в периферической крови адсорбцией на окиси алюминия и окисления ферроцианидом // Методы определения гормонов.— Киев: Наук. думка, 1980.— С. 345—346.
6. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца.— М.: Медицина, 1984.— 272 с.
7. Asakawa J., Matsushita S. Coloric conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides // Lipids.— 1980.— 15.— P 137—140.
8. Fleckanstein G., Rona G. Ricing advances in cardiac extraction and metabolism.— New York: Pergamon press, 1973.— Vol. 6.— 426 p.

Харьков. ин-т терапии М-ва здравоохранения УССР;  
Ин-т радиопизики и электроники АН УССР, Харьков

Поступила 29.09.85