

Применение метода диэлектрической спектроскопии для исследования свойств сыворотки крови мышей со злокачественным асцитом

© Ж.А. Сальникова¹, А.П. Смирнов¹, А.А. Богданов^{2,3}, Н.А. Верлов^{2,3}, Р.А. Кастро¹

¹ Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена, 191186 Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический), 197758 Санкт-Петербург, Россия

³ Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства, 197110 Санкт-Петербург, Россия
E-mail: recastro@mail.ru

Поступило в Редакцию 14 июля 2021 г.

В окончательной редакции 26 сентября 2021 г.

Принято к публикации 30 сентября 2021 г.

Приведены результаты исследования методом диэлектрической спектроскопии высокочастотных релаксационных процессов в сыворотке крови лабораторных животных (мышей): интактных (здоровых) и привитых асцитной формой карциномы Эрлиха. С использованием формализма электрического модуля проведен расчет релаксационных параметров для образцов сыворотки крови двух исследуемых систем.

Ключевые слова: электрический модуль, релаксационные параметры, злокачественный асцит.

DOI: 10.21883/JTF.2022.01.51864.216-21

Введение

Диэлектрическая спектроскопия является одним из наиболее информативных физических методов исследования релаксационных свойств диэлектрических сред в широком диапазоне частот $f = 10^{-3} - 10^{10}$ Hz [1–5]. В последние годы этот метод широко используется для исследования крови и ее компонент [6–9]. В работе [9] представлены значения $\epsilon'(f)$ и $\epsilon''(f)$ для цельной крови и плазмы для нескольких онкологических больных, измеренные в микроволновом диапазоне. При этом $\epsilon'(f) = 80 - 90$; $\epsilon''(f) = 70 - 15$.

Поскольку сыворотка крови (СК) обладает повышенной электропроводностью, скрывающей релаксационные явления, для их обнаружения мы использовали понятие комплексного электрического модуля — величины, обратной комплексной диэлектрической проницаемости. Опыт показывает, что использование этого метода позволяет выявить релаксационные пики СК, а математический аппарат — определить величины основных параметров релаксации. Данным методом можно пользоваться для любых образцов СК. При этом представляет интерес сравнение релаксационных параметров образцов СК, полученных от здоровых и имеющих патологию биологических объектов. Можно предположить, что параметры СК будут отличаться друг от друга, поскольку при выраженных патологиях изменяется качественный и количественный состав СК, что изменяет характер межмолекулярных взаимодействий между ее элемента-

ми и, таким образом, изменяет численные значения релаксационных параметров СК. Идея получать информацию о наличии и развитии патологического процесса в результате исследования температурно-частотных зависимостей релаксационных параметров СК является привлекательной.

Целью настоящей работы было выявление особенностей процессов высокочастотной диэлектрической релаксации и определение релаксационных параметров СК интактных мышей и мышей с асцитной формой карциномы Эрлиха.

1. Теория

1.1. Релаксационные уравнения

В рамках метода диэлектрической спектроскопии для анализа релаксационных свойств диэлектриков используется понятие комплексной диэлектрической проницаемости $\epsilon^*(f)$, которая определяется выражением: $\epsilon^*(f) = \epsilon'(f) - i\epsilon''(f)$, где f — частота приложенного электрического поля, i — мнимая единица, $\epsilon'(f)$ — вещественная диэлектрическая проницаемость среды, характеризующая степень экранировки внешнего электрического поля, $\epsilon''(f)$ — мнимая ее часть, характеризующая поглощение энергии с переводом ее в тепловую форму, т.е. диэлектрические потери. Значения $\epsilon'(f)$ и $\epsilon''(f)$ определяются экспериментально.

Релаксационные явления в общем виде описываются уравнением Гавриляка–Негами (Г–Н) [10]:

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{(1 + (i\omega\tau_0)^{1-\alpha})^\beta}, \quad (1)$$

где $\varepsilon_s, \varepsilon_\infty$ — статическая и высокочастотная диэлектрическая проницаемость $\varepsilon'(f)$ (ε_s — при $f \rightarrow 0$, ε_∞ — при $f \rightarrow \infty$), $\omega = 2\pi f$ — циклическая частота, τ_0 — наиболее вероятное время релаксации электрического отклика молекулярных агрегатов или молекул образца, α — ширина спектра времен релаксации, β — асимметрия этого спектра. Данные параметры изменяются в следующих пределах: $0 \leq \alpha < 1$, $0 < \beta \leq 1$. При этом чем больше величина α , тем больше частотная дисперсия численных значений времен релаксации молекул образца τ , т.е. шире релаксационный спектр; чем меньше β , тем больше степень его асимметрии.

Аналитическое выражение для функции распределения времен релаксаторов $G(\tau)$ относительно τ_0 может быть представлено в виде [11]:

$$G(\tau) = \frac{\left(\frac{\tau}{\tau_0}\right)^{\beta(1-\alpha)} \sin(\beta\theta)}{\pi\tau \left[\left(\frac{\tau}{\tau_0}\right)^{2(1-\alpha)} + 2\left(\frac{\tau}{\tau_0}\right)^{(1-\alpha)} \cos(\pi(1-\alpha)) + 1 \right]^{\beta/2}}, \quad (2)$$

где

$$\theta = \arctg \left[\frac{\sin(\pi(1-\alpha))}{\left(\frac{\tau}{\tau_0}\right)^{(1-\alpha)} + \cos(\pi(1-\alpha))} \right] \quad \text{и} \quad 0 \leq \theta \leq \pi.$$

При $\alpha = 0$ и $\beta = 1$ уравнение Г–Н переходит в уравнение Дебая [12]. При этом $G(\tau)$ является дельта-функцией $\delta(\tau_0)$, что соответствует состоянию, когда все молекулы системы обладают одинаковым временем релаксации τ_0 .

При $\alpha \neq 0$ и $\beta = 1$ уравнение Г–Н переходит в уравнение Коула–Коула [13]:

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + (i\omega\tau_0)^{1-\alpha}}. \quad (3)$$

При этом $G(\tau)$ является симметричной функцией относительно τ_0 .

При $\alpha = 0$ и $\beta \neq 1$ уравнение Г–Н переходит в уравнение Дэвидсона–Коула [14]:

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{(1 + \omega\tau_0)^\beta}. \quad (4)$$

При этом $G(\tau)$ является асимметричной функцией относительно τ_0 .

Параметры α, β, τ и $G(\tau)$ являются основными релаксационными параметрами объекта исследования. Их определяют, если имеются релаксационные пики на измеренной экспериментально зависимости $\varepsilon''(f)$. Если же этих пиков не удастся обнаружить, то и определение данных параметров этим методом становится

невозможным. В настоящей работе для их определения мы использовали метод комплексного электрического модуля. Ранее мы уже использовали этот метод для СК при хроническом лимфолейкозе [15].

1.2. Метод комплексного электрического модуля

Комплексным электрическим модулем $M^*(\omega)$ называется величина обратной комплексной диэлектрической проницаемости, определяемая выражением [16]: $M^*(\omega) = M'(\omega) + iM''(\omega)$. Величины $M'(\omega)$, $M''(\omega)$ называются соответственно вещественной и мнимой компонентами комплексного электрического модуля. Величина $M''(\omega)$ равна

$$M''(\omega) = \frac{\varepsilon''(\omega)}{\varepsilon'^2(\omega) + \varepsilon''^2(\omega)}. \quad (5)$$

Из уравнения Г–Н можно вывести уравнение $M''(\omega)$ [17]:

$$M''(\omega) = \frac{M_\infty M_s A^\beta (M_\infty - M_s) \sin \beta \phi}{A^{2\beta} M_s^2 + 2A^\beta (M_\infty - M_s) M_s \cos \beta \phi + (M_\infty - M_s)^2}, \quad (6)$$

где

$$M_\infty = \frac{1}{\varepsilon_\infty}, \quad M_s = \frac{1}{\varepsilon_s},$$

$$A = \left[1 + 2(\omega\tau_0)^{1-\alpha} \sin \frac{\pi\alpha}{2} + (\omega\tau_0)^{2(1-\alpha)} \right]^{1/2},$$

$$\phi = \arctg \left[\frac{(\omega\tau_0)^{1-\alpha} \cos \frac{\pi\alpha}{2}}{1 + (\omega\tau_0)^{1-\alpha} \sin \frac{\pi\alpha}{2}} \right].$$

При этом параметры α, β, τ_0 имеют тот же физический смысл, что в уравнении (1).

2. Методика эксперимента

В эксперименте использовали мышей линии CD-1 (самки, масса 22–24 г), полученные из питомника „СТЕ-ЗАР“. Животные содержались в клетках по 5 особей в каждой клетке со свободным доступом к питью и пище (комбинированный корм „Лабораторкорм“), зоогигиенические показатели у животных в момент начала эксперимента находились в пределах нормы. В рамках исследования были сформированы следующие группы: группа интактных животных (10 особей) и экспериментальная группа (5 особей, которым выполнялось внутрибрюшинное введение суспензии клеток асцитной формы карциномы Эрлиха с концентрацией $3 \cdot 10^5$ клеток на мышь). Забор крови у мышей в экспериментальной группе проводился на пятые сутки после введения суспензии. Все животные перед процедурой взятия биологического материала вводились в состояние наркоза (инъекция золетила 100[®] 2 mg/kg внутримышечно). Взятые образцы крови помещали в вакуумные пробирки VACUETTE объемом 2.0 ml с активатором

свертывания крови, после чего образцы центрифугировали в течение 10 min при 2000 rpm, далее выполнялся отбор сыворотки. Измерения параметров полученных образцов проводились в день взятия без заморозки. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Измерения диэлектрических спектров образцов СК были выполнены на спектрометре „Concept-81“ (Novocontrol Technologies GmbH), который предназначен для исследования диэлектрических и электропроводящих свойств широкого класса материалов, в том числе жидкостей [18]. Объем измерительной ячейки составлял 60 μl. Измерения производились в диапазоне частот $f = 10^6 - 1.5 \cdot 10^9$ Hz при комнатной температуре ($T = 20^\circ\text{C}$).

3. Результаты и обсуждение

Измеряли частотные зависимости вещественной $\epsilon'(f)$ и мнимой $\epsilon''(f)$ частей диэлектрической проницаемости для образцов СК, полученных от интактных животных и животных с асцитной формой карциномы Эрлиха. По формуле (5) строили частотную зависимость электрического модуля $M''(\omega)$ для каждого животного. Результаты для образцов СК от интактных животных представлены на рис. 1, для образцов СК от животных, привитых карциномой Эрлиха, — на рис. 2. Экспериментальные данные были аппроксимированы кривой по формуле (6). При этом были получены релаксационные параметры α, β, τ_0 , которые определяли эмпирически на основе принципа наилучшей аппроксимации экспериментальных результатов теоретической кривой $M''(\omega)$. Результаты аппроксимации представлены в таблице. Для образца I (рис. 2) представлены результаты аппроксимации только высокочастотного (правого) релаксационного пика. Для всех образцов СК от интактных животных при $T = 20^\circ\text{C}$ параметр α оказался равным 0 ($\alpha = 0$), а параметр $\beta \neq 1$, следовательно,

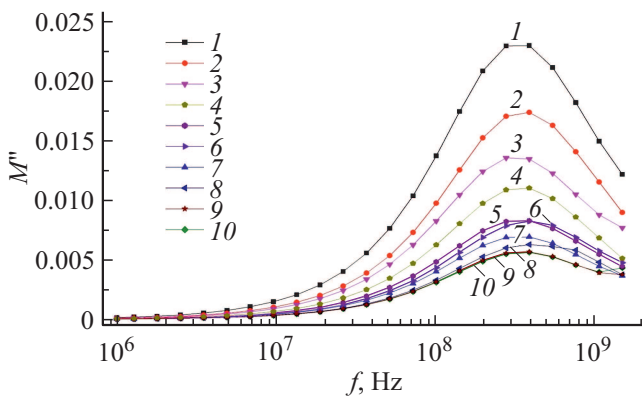


Рис. 1. Частотная зависимость мнимой части электрического модуля $M''(f)$ образцов СК, полученных от интактных животных: 1–10 — номер животного (см. таблицу).

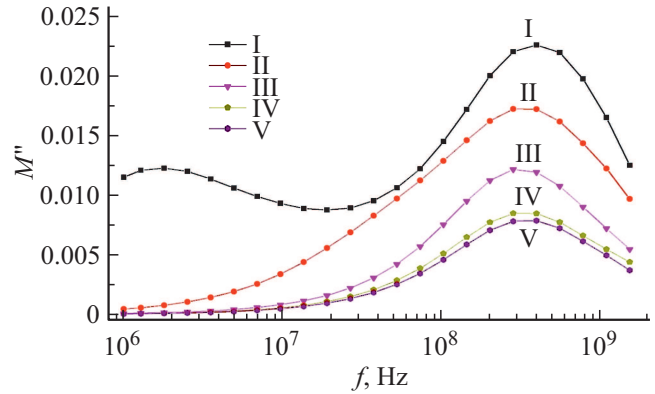


Рис. 2. Частотная зависимость мнимой части электрического модуля $M''(f)$ образцов СК, полученных от животных, привитых асцитной формой карциномы Эрлиха: I–V — номер животного (см. таблицу).

Релаксационные параметры α, β, τ_0 для образцов СК, полученных от интактных и привитых асцитной формой карциномы Эрлиха животных

Номер образца*	α	β	τ_0 (с)
1	0.00	0.85	$1.03 \cdot 10^{-9}$
2	0.00	0.91	$1.38 \cdot 10^{-9}$
3	0.00	0.85	$8.42 \cdot 10^{-10}$
4	0.00	0.80	$8.30 \cdot 10^{-10}$
5	0.00	0.67	$4.52 \cdot 10^{-10}$
6	0.00	0.56	$4.44 \cdot 10^{-10}$
7	0.00	0.62	$6.12 \cdot 10^{-10}$
8	0.00	0.78	$5.34 \cdot 10^{-10}$
9	0.00	0.66	$5.32 \cdot 10^{-10}$
10	0.00	0.91	$1.05 \cdot 10^{-9}$
I	0.26	1.00	$1.82 \cdot 10^{-9}$
II	0.25	1.00	$5.95 \cdot 10^{-10}$
III	0.01	0.90	$5.72 \cdot 10^{-10}$
IV	0.01	0.82	$6.01 \cdot 10^{-10}$
V	0.01	0.98	$2.29 \cdot 10^{-8}$

Примечание. * 1–10 — интактные животные, I–V — животные, привитые асцитной формой карциномы Эрлиха.

релаксационный спектр для них описывается уравнением Дэвидсона–Коула (4). Этот результат показывает, что молекулы СК обладают различающимися друг от друга временами релаксации τ , расположенными на горизонтальной шкале несимметрично относительно τ_0 , т.е. функция $G(\tau)$ является асимметричной.

На рис. 3 представлена функция $G(\tau)$, полученная по результатам исследования СК от животных 1 и 3. Для

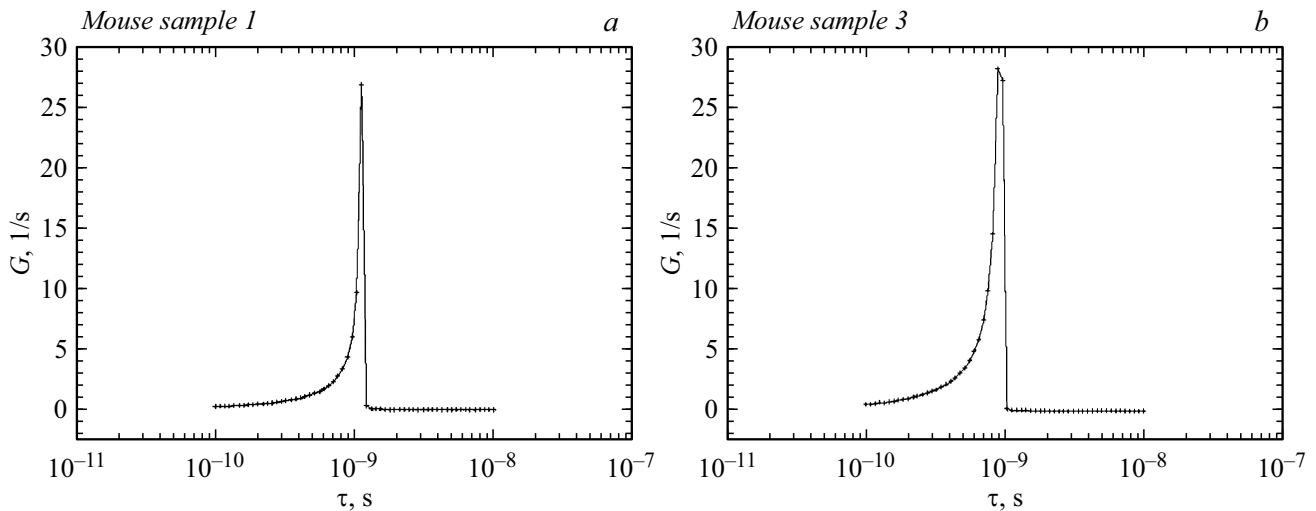


Рис. 3. Функция распределения времен релаксации $G(\tau)$ для интактных животных: a — животное 1, b — животное 3 (см. таблицу).

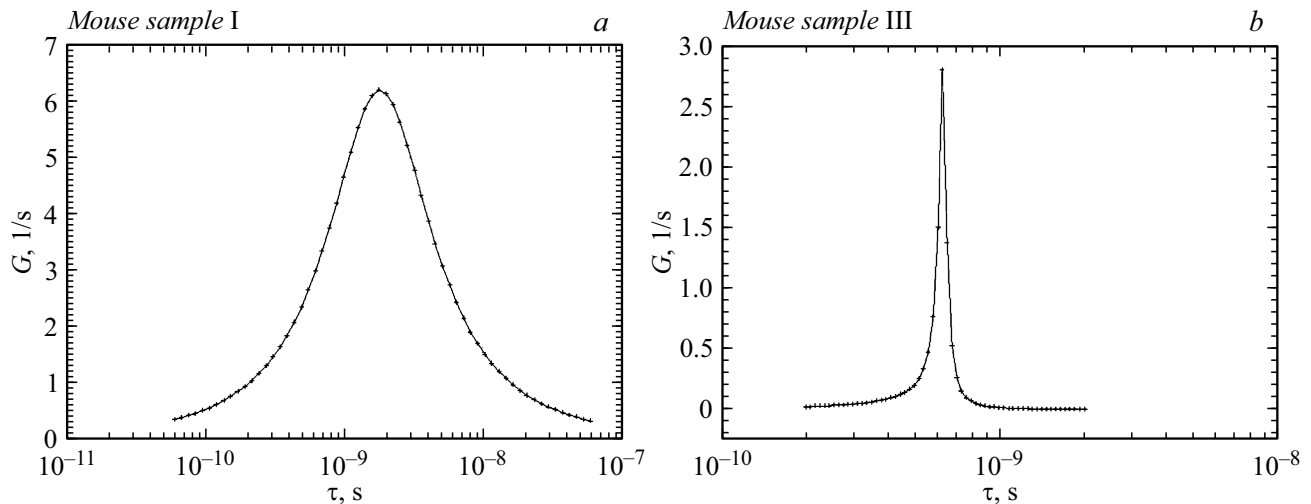


Рис. 4. Функция распределения времен релаксации $G(\tau)$ для животных, привитых асцитной формой карциномы Эрлиха: a — животное I, b — животное III (см. таблицу).

образцов СК от всех остальных интактных животных данные графики выглядят аналогично: распределение релаксаторов по временам релаксации асимметрично относительно τ_0 .

Как видно из таблицы, для образцов СК от животных, привитых асцитной формой карциномы Эрлиха, при $T = 20^\circ\text{C}$ параметр $\alpha \neq 0$. Для образцов I и II $\beta = 1$, откуда следует, что релаксационный спектр для них описывается уравнением Коула–Коула (3). Следствием данного уравнения является то, что молекулы обладают различными временами релаксации τ , расположенными симметрично относительно τ_0 , т.е. функция $G(\tau)$ является симметричной. На рис. 4 представлена функция $G(\tau)$ для животных I и III. Как видно из графиков, распределение симметрично. Визуальное отличие рис. 4, a от рис. 4, b связано с большей величиной параметра α

для образца I. Для образца II функция $G(\tau)$ выглядит так же, как для образца I, для образцов животных IV, V функция $G(\tau)$ такая же, как и для образца III. Для образцов III, IV, V $\alpha \neq 0$ и $\beta \neq 1$, однако для них среднее значение параметра β ($\langle\beta\rangle = 0.90$) значительно ближе к единице, чем для образцов интактных животных ($\langle\beta\rangle = 0.76$). Следовательно, их релаксационный спектр можно приближенно описывать уравнением Коула–Коула (3), как и для образцов СК I и II.

Наличие в образцах сыворотки макромолекул с различными временами релаксации τ следует из теоретического описания диэлектрической релаксации для независимых диполей с несколькими дискретными состояниями ориентации [19]. Учет кооперативного характера переориентации макромолекулы, при котором переориентация диполя осуществляется в виде одиночных

переходов, но вероятность переориентации или энергия активации переориентации зависит от ориентации соседей [20], приводит к возникновению спектра времен релаксации τ , показанного на рис. 3 и 4. Для более вытянутых молекул спектр времен релаксации будет асимметричным (поскольку их перескоки из одного положения равновесия в другое зависят от ориентации соседей и энергии взаимодействия с ними), а для макромолекул, близких по форме к шарообразным, спектр времен будет симметричным (поскольку для шарообразных молекул ориентация соседей неважна). Таким образом, отличие в релаксационных спектрах образцов СК от интактных животных и животных, привитых карциномой Эрлиха, возможно, связано с изменением конформации макромолекул белка в составе сыворотки крови при развитии злокачественного процесса.

Заключение

Использование метода комплексного электрического модуля позволяет определять релаксационные параметры α, β, τ и функцию $G(\tau)$ для образцов СК, полученных от интактных и привитых асцитной формой карциномы Эрлиха животных. При температуре 20°C для интактных и больных животных данные параметры несколько отличаются друг от друга. Эти различия, вероятно, могут быть более значимыми при физиологических температурах 35–41°C. При развитии заболеваний может изменяться состав СК, что влияет на межмолекулярные взаимодействия, следовательно, и на релаксационные свойства СК. Установление взаимосвязи изменения релаксационных параметров с наличием и стадией заболевания, например, онкологического, может быть темой дальнейших исследований. Изучение вопроса возможного изменения конформации молекул белка в составе СК при развитии патологического процесса требует применения дополнительных физических методов исследования. При этом принципиально необходимо выполнение корреляционного анализа между данными, получаемыми методом диэлектрической спектроскопии, и данными биохимических анализов крови для различных заболеваний.

Полученные результаты позволяют предположить, что метод диэлектрической спектроскопии в перспективе может быть использован для диагностики заболеваний, например онкологических, основанной на выявлении особенностей молекулярных физических процессов жидкостей организма.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Б.И. Сажин. *Электрические свойства полимеров* (Химия, Л., 1986)
- [2] Э.П. Блайт, Д. Блур. *Электрические свойства полимеров* (Физматлит, М., 2008)
- [3] Ю.А. Гороховатский, Е.А. Карулина, Д.Э. Темнов. *Физика полимерных диэлектриков* (Изд-во РГПУ им. А.И. Герцена, СПб., 2013)
- [4] R.A. Castro, A.I. Ignatiev, N.V. Nikonov, A.I. Sidorov, M.V. Stolyarchuk. *J. Non-Crystall. Solid.*, **461**, 72 (2017).
- [5] N.A. Nikonova, A.A. Kononov, H.T. Dao, R.A. Castro. *J. Non-Crystall. Solid.*, **511**, 109 (2019).
- [6] M. Wolf, R. Gulich, P. Lunkenheimer, A. Loidl. *Biochim. Biophys. Acta*, **1810** (8), 727 (2011).
- [7] K. Asami. *J. Non-Crystall. Solid.*, **305**, 268 (2002).
- [8] T. Chelidze. *J. Non-Crystall. Solid.*, **305**, 285 (2002).
- [9] А.Н. Романов, Е.Ю. Винокурова, А.О. Ковригин, А.Ф. Лазарев, В.А. Лубенников, Н.А. Романова, С.А. Комаров. *Диэлектрические характеристики биологических жидкостей человека при развитии онкологических заболеваний (микроволновый диапазон)* (Азбука, Барнаул, 2008)
- [10] S. Havriliak, S. Negami. *J. Polymer Science Part C*, **14** (1), 99 (1966).
- [11] S. Havriliak, S. Negami. *Polymer*, **8**, 161 (1967).
- [12] П. Дебай *Полярные молекулы* (ГНТИ, М.-Л., 1931)
- [13] K.S. Cole, R.H. Cole. *J. Chem. Phys.*, **9**, 341 (1941)
- [14] D.W. Davidson, R.H. Cole. *J. Chem. Phys.*, **19**, 1484 (1951); **18**, 1417 (1950)
- [15] Zh.A. Salmikova, L.V. Plotnikova, A.P. Smirnov, A.D. Garifullin, A.Yu. Kuvshinov, S.V. Voloshin, A.M. Polyanchko. *AIP Conf. Proceed.* **2308**, 030018 (2020); DOI: 10.1063/5.0035270
- [16] N.G. McCrum, B.E. Read, G. Williams In: *Anelastic and Dielectric Effects in Polymeric Solids* (Wiley, London, 1967), p. 108–111.
- [17] Zh.A. Salmikova, A.A. Kononov. *AIP Conf. Proceed.* **2308**, 030017 (2020); DOI: 10.1063/5.0034028
- [18] Электронный ресурс. Описание прибора „Novocontrol Concept–81“ <https://ckpo.herzen.spb.ru/?page=dielectrici>
- [19] Г. Фрелих. *Теория диэлектриков* (ИИЛ, М., 1960)
- [20] Ю.Я. Готлиб, А.А. Даринский, Ю.Е. Светлов. *Физическая кинетика макромолекул* (Химия, Л., 1986)