

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ ЖИВОТНЫХ ПРИ ДЕЙСТВИИ ПОСТОЯННОГО ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ

Олешкевич А.А.

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина
ул. Ак. Скрябина 23, г. Москва, 109472, РФ; e-mail: kompsotita@gmail.com

Поступила в редакцию: 30.06.2018

Аннотация. Изучены эффекты постоянного электрического поля на функциональные особенности эритроцитов, проницаемость их мембран для глюкозы, динамику оксигенации гемоглобина, а также на изменение активности цитозольных ферментов. В зависимости от вида животных воздействие более 5 мин вызывало достоверное увеличение активности от 1,5 до 4 раз лактатдегидрогеназы КФ 1.1.1.27 и/или аспаратаминотрансферазы КФ 2.6.1.1 плазмы крови кошек, собак и лошадей. Регистрировали ряд физиологических деструктивных изменений форменных элементов крови: анизо- и пойкилоцитоз, увеличение площади тромбоцитов, агрегацию клеток, кариолизис, фрагментоз и др. Качественные и количественные изменения клеточных характеристик и параметров носили дозозависимый характер. Показано наличие видовых особенностей клеточного ответа.

Ключевые слова: электростатическое поле, биологические эффекты, клетки крови, ферменты.

За последние 20 лет проведено большое количество биофизических, физиологических и цитологических экспериментов по оценке влияния факторов электромагнитной природы на млекопитающих и человека [1-6]. В частности, показано, что электромагнитные поля в дальней зоне 1,2 мВт/см² могут являться генотоксическим стрессором для клеток млекопитающих и повреждать ДНК. Прежде, чем начать анализ возможных механизмов биологических эффектов физических полей, необходимо отметить, что волны (электромагнитные (ЭМИ) и акустические) в зависимости от частоты имеют различную глубину проникновения и коэффициенты поглощения на уровне целого организма. Так, для ЭМИ на частоте 3 ГГц (СВЧ-диапазон) в мышечной ткани и коже глубина проникновения составляет 15 см, а на частоте 37,4 ГГц (миллиметровые волны) – 0,3 мм. В зависимости от типов излучателей распределение энергии как на срезе излучателей (ближняя зона), так и на различных расстояниях, может быть крайне неоднородным. Поэтому при интегральном воздействии на биосистему часть тканей и клеток попадёт в зону, например, тепловых воздействий, а часть – в зону нетепловых воздействий. Результирующий эффект такого интегрального воздействия может быть равным нулю. Кроме того, биологические системы, в том числе и клетки, являются динамическими системами: разные клетки могут находиться на разных стадиях функционирования, каждая из которых при этом может иметь разную чувствительность к фактору воздействия. Например, воздействие на осциллирующие эритроциты в различные фазы процесса осцилляции могло приводить как к увеличению числа осцилляций при сохранении уровня выброса калия из клеток, так и к сохранению числа осцилляций на фоне увеличения выброса ионов калия [7].

При этом в ветеринарной медицине всё больше диагностических и терапевтических методов используют в качестве фактора воздействия электромагнитное излучение и постоянное электрическое поле. В связи с чем была поставлена задача на первом этапе исследований изучить механизмы действия постоянного электрического и магнитного полей на клетки крови *in vitro*, выявить функциональные особенности, после чего перейти к определению биологических эффектов сочетанного воздействия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Из домашних животных сформировали группы в соответствии с полом, возрастом и состоянием здоровья по принципу физиологических и биохимических аналогов. Проведение работ соответствовало «Международным рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и другим ветеринарным и зооигиеническим требованиям. При работе с биологическими объектами было выполнено не менее 12 повторов. Изучали влияние постоянного электрического поля на изменение функциональных особенностей эритроцитов, динамику оксигенации гемоглобина, проницаемость мембран клеток для глюкозы [8, 9], а также на изменение активности цитозольных эритроцитарных ферментов: лактатдегидрогеназы КФ 1.1.1.27 (ЛДГ) и аспаратаминотрансферазы КФ 2.6.1.1 (АсАТ). Активность ферментов определяли с помощью автоматического биохимического анализатора URIT – 8030. Получение эритроцитов и условия воздействия электростатическим полем проводили авторским методом [9]. Объём облучаемых образцов – 1,5-2,0 мл, время воздействия составляло от 1 до 30 мин, напряжённость постоянного электрического поля от 2,8 до 3,02 кВ/м. За изменением морфологии клеток в результате воздействия физического фактора наблюдали в световой микроскоп «ЛЮМО» (Россия). Мазки крови просматривали под иммерсией в проходящем свете микроскопа МИКМЕД-5 (объектив 100×/1.25, окуляр 10×/18), наблюдали изменения внешнего вида клеток (размер, форма, группировка, повреждение, лизис и тому подобное). С целью определения проницаемости цитоплазматических мембран (ЦПМ) использовали явление обращения

плазмолиза, которое регистрировали турбидиметрически. Для каждого анализируемого показателя определяли среднее арифметическое, среднее квадратичное отклонение, ошибку среднего. Для оценки влияния факторов проводили однофакторный дисперсионный анализ, регрессионный анализ. При анализе влияния изучаемых факторов проводили многофакторный дисперсионный анализ признаков сопряжённости с использованием главной линейной модели. Связь между показателями оценивали с помощью корреляционного анализа. Сравнение анализируемых показателей проводили с помощью критерия Стьюдента, непараметрического параметра Вилкоксона-Мана-Уитни [9]. Различия считали статистически значимыми при вероятности нулевой гипотезы $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физиологические изменения эритроцитов определяли методом световой микроскопии. Примеры изменений клеток крови кошек и лошадей приведены на рисунках 1 и 2. Регистрировали анизо- и пойкилоцитоз, движение веретенообразных эритроцитов в электростатическом поле. Качественные и количественные изменения клеточных характеристик и параметров не всегда носили дозозависимый характер. Так, преципитация метгемоглобина на внутренней стороне ЦПМ отмечена только в эритроцитах кошек и лошадей, что показывает наличие видовых особенностей клеточного ответа. При этом изменение динамики оксигенации гемоглобина регистрировали в пробах крови всех животных. Из обработки полученных результатов получили значения константы проницаемости мембран эритроцитов для глюкозы, что являлось количественным критерием воздействия электрического поля на проницаемость мембран по глюкозе. Установлено, что при воздействии постоянным электростатическим полем 5 и 10 минут проницаемость мембран для глюкозы незначительно снижается относительно контроля, а при воздействии 15 минут возрастает в 4–5 раз [9].

Известно, что под действием непрерывных и импульсных электромагнитных полей (ЭМП) высоких и ультравысоких частот (1–100 МГц) суспендированные частицы угля, крахмала и молока, эритроциты и лейкоциты выстраиваются в цепочки, расположенные параллельно электрическим силовым линиям. Для каждого типа частиц имеется оптимальный диапазон частот, в пределах которого эффект возникает при минимальной напряжённости поля. Теоретические исследования показали, что формирование цепочек происходит в результате притяжения между частицами, в которых под действием ЭМП индуцируются дипольные заряды. В неполярной диэлектрической среде этот эффект возникает при низких частотах даже в электростатическом поле, но в воде и физиологическом растворе ионы и дипольные молекулы шунтируют поле низкой частоты и эффект возможен только при достаточно высоких частотах (выше десятков МГц). Постоянная времени формирования цепочек пропорциональна кубу радиуса частиц (она равна 1 с при радиусе в 1 мкм; размер эритроцитов кошек и собак составляет 5–9 мкм) и мало зависит от напряжённости E в слабых полях и обратно пропорциональна E^2 в сильных полях. В импульсных ЭМП эффект определяется средним значением E . Несимметричные частицы ориентируются либо параллельно, либо перпендикулярно направлению силовых линий. Для электрических параметров, близких к биологическим, это зависит от соотношения между удельной проводимостью частиц и окружающей их среды и от частоты ЭМП. В случае нашего эксперимента эритроциты (рис. 1, 2) выстраивались в длинные цепочки параллельно электрическим силовым линиям. Изменение формы и площади эритроцитов животных ранее мы регистрировали и в акустическом поле (рис. 3).

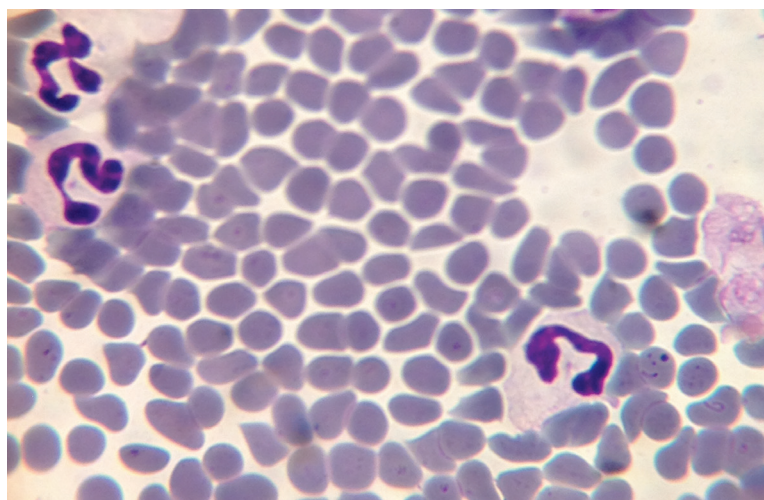


Рисунок 1. Фотография клеток крови кошки в электростатическом поле: $E = 3,02$ кВ/м, 10 мин. Изменение формы и площади эритроцитов. Агрегация тромбоцитов. Преципитация метгемоглобина на внутренней стороне ЦПМ эритроцитов. Деструктивные изменения и агрегация сегментоядерных нейтрофилов

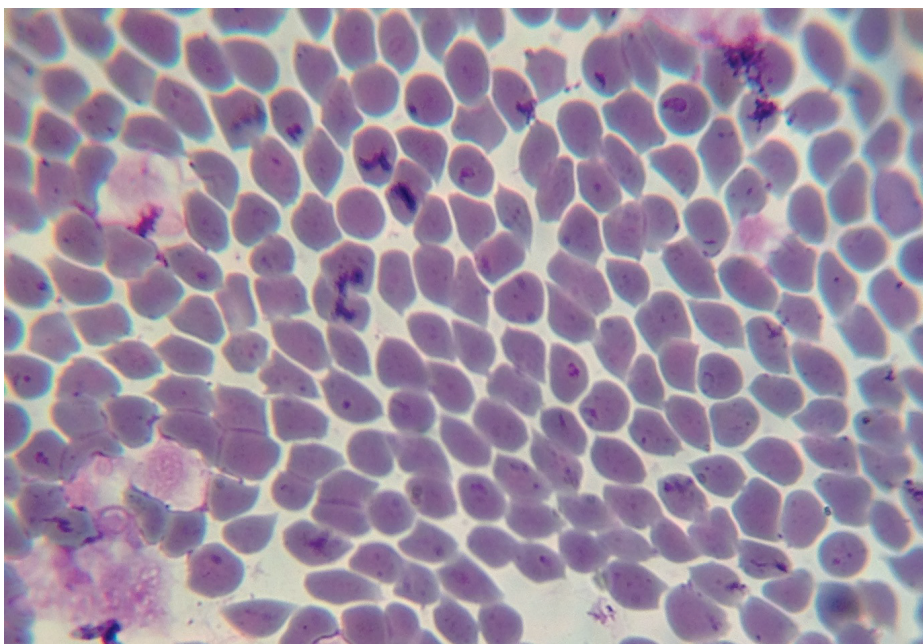


Рисунок 2. Фотография клеток крови кошки в электростатическом поле: $E = 2,857 \text{ кВ/м}$, 20 мин. Цепочки эритроцитов, расположенные параллельно электрическим силовым линиям. Анизоцитоз и пойкилоцитоз. Гиперагрегация тромбоцитов. Преципитация метгемоглобина на внутренней стороне ЦПМ эритроцитов

Анализ результатов влияния электрического поля на активность ферментов здоровых животных показал, что, в зависимости от видовых особенностей, воздействие более 5 мин вызывает достоверное ($p < 0,05$) двух–четырёхкратное увеличение активности ЛДГ плазмы крови *кошек*; АсАТ и ЛДГ – плазмы крови *собак* от 2 до 3,8 раз ; и активности АсАТ плазмы крови *лошадей* от 1,5 до 2,7 раз (табл. 1). Регистрировали морфологические изменения клеток: анизоцитоз и пойкилоцитоз, увеличение площади тромбоцитов, агрегацию клеток, кариолизис, фрагментоз и ряд других физиологических деструктивных изменений. Качественные и количественные изменения клеточных характеристик и параметров носили дозозависимый характер. Показано наличие видовых особенностей клеточного ответа: преципитация метгемоглобина на внутренней стороне ЦПМ отмечена только в эритроцитах кошек и лошадей (рис. 1, 2). Изменение динамики оксигенации гемоглобина регистрировали в пробах крови всех животных. Проведённый анализ результатов свидетельствует изменении проницаемости мембран клеток крови, интенсивности клеточного дыхания и процессов транспорта через ЦПМ.

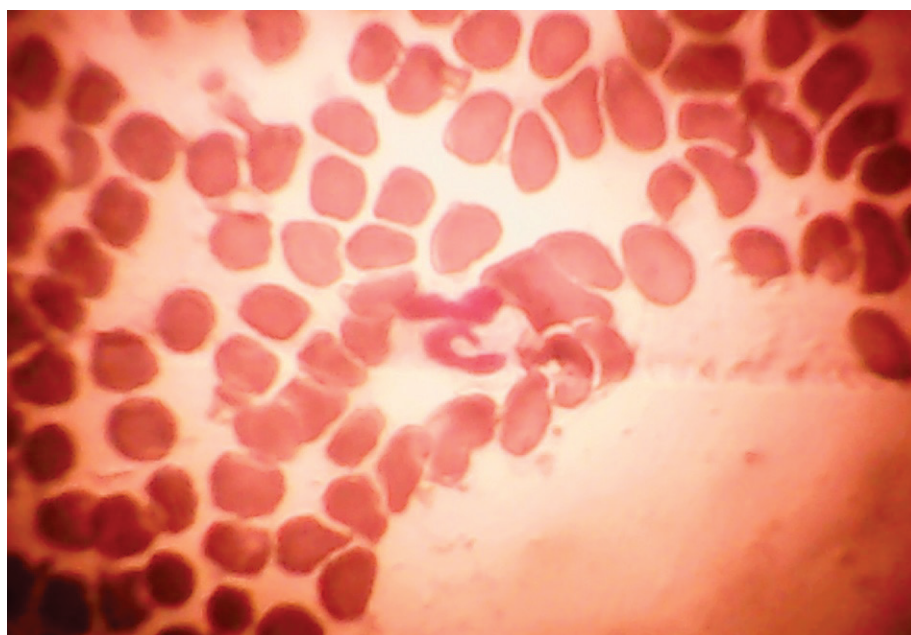


Рисунок 3. Фотография клеток крови лошади в модулированном ультразвуковом поле ($I = 0,7 \text{ Вт/см}^2$, частота модуляции 100 Гц, время обработки 20 с). Анизоцитоз и пойкилоцитоз

Таблица 1. Примеры изменения активности ферментов плазмы крови животных в электростатическом поле

Животные / Время обработки	АсАТ, МЕ/л	ЛДГ, МЕ/л
Кошки. Здоровые особи 3–7 лет		
Норма	4.8–45	55–164
Контроль, интактные клетки	27±3	60±4
1 мин	25±2	67±5
5 мин	30±4	70±6
10 мин	24±5	150±5*
15 мин	29±4	229±8*
Собаки. Здоровые особи 7–8 лет		
Норма	8–42	24–219
Контроль, интактные клетки	45±2	200±6
1 мин	41±2*	210±7*
5 мин	47±3*	217±10*
10 мин	99±7*	500±10*
15 мин	163±8*	723±11*
Лошади. Здоровые особи 6–12 лет		
Норма	115–287	125–381
Контроль, интактные клетки	175±5	199±4
1 мин	180±7	200±8
5 мин	183±7	221±13
10 мин	280±10*	231±9
15 мин	464±9*	206±5
20 мин	476±4*	210±7
25 мин	263±3*	320±6

Примечание. * $p < 0.05$

Список литературы / References:

1. Hardell L., Hallquist A. No association between the use of cellular or cordless telephones and salivary Glu-tumors. *Occup. Environ. Med.*, 2004, vol. 61, pp. 675-679.
2. Maes A., Collier M.V.L. Cytogenetic effects of 900 MHz (GSM) microwaves on human lymphocytes. *Bioelectromag.*, 2001, vol. 22, pp. 91-96.
3. McNamee J.P., Bellier P.V. DNA damage and micronucleus induction in human leukocytes after acute *in vitro* exposure to a 1.9 GHz continuous-wave radiofrequency field. *Radiation Research*, 2002, vol. 158, pp. 523-533.
4. Vijayalaxmi B.Z., Obe G. Controversial cytogenetic observations in mammalian somatic cells exposed to radiofrequency radiation. *Radiation Research*, 2004, vol. 162, pp. 481-496.
5. Vijayalaxmi B.Z., Pickard W.F. Micronuclei in the peripheral blood and bone marrow cells of rats exposed to 2450 MHz radiofrequency radiation. *Int. J. Rad. Biol.*, 2001, vol. 77, pp. 1109-1115.
6. Пряхин Е.А., Аклеев А.В. Влияние неионизирующих электромагнитных излучений на животных и человека. Монография. Челябинск: Полиграф-Мастер, 2006, 220 с. [Pryakhin E.A., Akleev A.V. Influence of non-ionizing electromagnetic radiation on animals and humans. Monograph. Chelyabinsk: Polygraph-Master, 2006, 220 p. (In Russ.)]
7. Kim Y.A., Fomenko B.S., Holmuhamedov E.L., Akoev I.G. Effects of microwave-radiation on inducible ion-transport of rat erythrocytes. *Charge and field effects in biosystems*, 1989, pp. 223-231.
8. Novikova, A.V. Change in acid erythrogram of laboratory animals in constant electric and magnetic field. *Book of abstracts. 6th International Conference on radiation and applications in various fields of research, RAD 6*, Ohrid, Macedonia: Univ, 2018, URL: rad-conference.org/books.php.
9. Novikova A.V. Effect of constant electric field on the change of erythrocyte membrane permeability for glucose. *Book of abstracts. 6th International Conference on radiation and applications in various fields of research, RAD 6*, Ohrid, Macedonia: Univ, 2018, URL: rad-conference.org/books.php.
10. Hirsch R.P., Riegelman R.K. *Statistical operations: analysis of health research data*. Massachusetts: Blackwell Science, 1996, 490 p.

FUNCTIONAL CHANGES IN ANIMAL ERYTHROCYTES IN A CONSTANT ELECTRIC FIELD

Oleshkevich A.A.

Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology

Scriabin Str., 23, Moscow, 109472, Russian Federation; e-mail: kompsotita@gmail.com

Abstract. The effects of a constant electric field on the functional features of erythrocytes, the permeability of their membranes for glucose, the dynamics of hemoglobin oxygenation, and the change in the activity of erythrocyte cytosolic enzymes were studied. Depending on the type of an animal, 5-minute and longer exposure caused 1.5-4-fold increase of lactate dehydrogenase KF 1.1.1.27 and/or aspartate aminotransferase KF 2.6.1.1 activity in blood plasma of cats, dogs and horses. Several physiological destructive changes in blood cells were recorded: aniso- and poikilocytosis, an increase in platelet area, aggregation of cells, karyolysis, fragmentogenesis, etc. Qualitative and quantitative changes in cellular characteristics and parameters were dose-dependent. The presence of specific features of the cellular response is shown.

Key words: *electrostatic field, biological effects, blood cells, enzymes.*