

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ КВЧ ОБЛУЧЕНИЯ НА КЛЕТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Казаринов К.Д., Баранова О.А., Щелконогов В.А., Чеканов А.В.

ФГБУН Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН

ул. Введенского, 4, г. Фрязино, 141190, РФ; e-mail: kazarinov@ms.ire.rssi.ru

Поступила в редакцию: 24.07.2019

Аннотация. В области изучения биологического действия микроволнового излучения клеточная биология занимает особое место. Клетки, как основные структурные элементы органов и тканей, а также межклеточное взаимодействие, которое, в конечном счете, управляет процессами функционирования, рождения и смерти организмов остаются всегда в центре внимания специалистов. Результаты наших предшествующих экспериментов посвящены изучению влияния микроволнового излучения на клетки человека, находящиеся в стрессовом состоянии. Окислительный стресс играет существенную роль при патологических процессах. В тканях окислительный стресс приводит к апоптозу, которому подвергаются не только ядросодержащие клетки, но и безъядерные клетки, такие как эритроциты и тромбоциты. Функционирование тромбоцитов является одной из основных причин сосудистых патологий – клеток кровяного русла. Однако не всегда удается преодолеть агрегацию тромбоцитов и предотвратить развитие тромботических осложнений с помощью антитромбоцитарных препаратов. В данной работе рассматривается один из аспектов применения крайне высокочастотного (КВЧ) в микроволновом диапазоне излучения в медицинских приложениях, а именно, как фактор коррекции нарушений реологических свойств крови в клинической практике. Модулируя с помощью микроволнового излучения активацию тромбоцитов мы, тем самым, можем осуществлять выбраковку различных субпопуляций тромбоцитов. Кроме того, КВЧ излучение за счет влияния на водную среду и структуру мембран тромбоцитов способно ускорить процесс корректировки состояния тромбоцитов. В наших экспериментах обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) инкубировали при комнатной температуре в условиях КВЧ облучения в течение 30 минут и затем измеряли уровень и скорость агрегации тромбоцитов. Результаты наших экспериментов показывают, что КВЧ излучение снижает степень агрегации и угол наклона агрегатограммы по сравнению с контролем при добавлении индуктора ристомидина. Добавление этанола в среду тромбоцитов способствовало дальнейшему снижению контролируемых параметров. Предполагается, что микроволновое облучение, стимулируя увеличение скорости образования свободных радикалов в ОТП, может регулировать агрегационную активность тромбоцитов. Рассматривается механизм обнаруженного эффекта, связанный с усилением апоптоза клеток.

Ключевые слова: КВЧ излучение, межклеточное взаимодействие, обогащенная тромбоцитами плазма, этанол, индукторы агрегации, алкогольная интоксикация, механизм биологического действия КВЧ излучения.

Известно, алкоголь вызывает апоптоз (программируемую смерть клеток) в эукариотических клетках, таких как гепатоциты, нервные клетки, фибробласты роговицы и недавно было показано, что алкоголь стимулирует апоптоз тромбоцитов, что приводит к снижению числа циркулирующих клеток и ухудшает гемостаз *in vivo*. Эти данные показывают возможный патогенез геморрагических симптомов у пациентов с алкогольной интоксикацией [1]. Кроме того, известны литературные экспериментальные данные о влиянии этанола на агрегацию тромбоцитов. Так, при потреблении крысами этанола в течение 21 дня было обнаружено снижение агрегации тромбоцитов [2]. В исследованиях [3] было показано, что снижение уровня холестерина – ЛПВП (липопротеинов высокой плотности) может объяснить только 50% защитного эффекта алкогольных напитков; остальные 50% могут быть частично связаны с уменьшением активности тромбоцитов. Эта антитромбоцитарная активность вина объясняется как этанолом, так и полифенольными компонентами, которыми богаты красные вина.

Представленные в предшествующей нашей публикации [4] результаты по изучению эффектов КВЧ излучения на элементы крови человека свидетельствуют о том, что КВЧ излучение низкой интенсивности в условиях нашего эксперимента способно снизить активность межклеточного взаимодействия. Эффект облучения проявлялся в снижении степени агрегации тромбоцитов по сравнению с контролем при добавлении индуктора агрегации – ристомидина, а также в уменьшении скорости агрегации тромбоцитов.

Повышенная агрегация тромбоцитов лежит в основе патогенеза большого количества заболеваний. Тромбоциты, как известно, являются одними из основных участников сосудистых катастроф при ишемической болезни сердца (ИБС). Однако не всегда удается преодолеть агрегацию тромбоцитов и предотвратить развитие тромботических осложнений с помощью антитромбоцитарных препаратов. Известно, что апоптозу подвергаются не только ядросодержащие клетки, но и безъядерные клетки, такие как эритроциты [5] и тромбоциты [6].

Попыткой преодолеть некоторые нежелательные явления, связанные с активацией тромбоцитов, а также регламентировать их участие в различных патологических состояниях, обусловлен поиск иных подходов к

проблеме, в том числе и рассмотрение участия в апоптозе этих клеток известных индукторов агрегации: коллагена, арахидоновой кислоты, тромбина, АДФ, ионофора кальция А23187 и др. [7]. Установлен бимодальный характер влияния, в зависимости от величины концентрации индуктора. При низких концентрациях наблюдается активация тромбоцитов, а при высоких – запускается программа апоптоза (транслокация фосфатидилсерина с внутренней поверхности цитоплазматической мембраны на внешнюю, открытие гигантских митохондриальных пор и выход *сyt c*, каскадная активация каспаз и фрагментация клетки для последующей утилизации фагоцитами). При апоптозе прерываются патологические процессы, приводящие к стимуляции тромбообразования. Модулируя с помощью микроволнового излучения активацию тромбоцитов мы, тем самым, можем осуществлять выбраковку различных субпопуляций тромбоцитов [8].

В данной статье рассматривается только случай низких концентраций индуктора, приводящий к коррекции агрегационной функции тромбоцитов.

Эксперименты проводились *in vitro* на образцах крови, взятых у относительно здоровых доноров в полистирольные вакуумные пробирки с цитратом натрия IMPROVACUTER Кат. № 455689. Кровь, стабилизированную цитратом натрия, центрифугировали 10 минут при 200g со скоростью 1000 оборотов в минуту для получения обогащенной эритроцитами плазмы (ОТП). Далее ОТП отбиралась в чистую пробирку. Оставшуюся плазму повторно центрифугировали в течение 25 минут при 400g со скоростью 2800 оборотов в минуту, для получения бедной тромбоцитами плазмы. Далее БТП отбиралась в отдельную чистую пластиковую пробирку. Образцы хранили при +37 °С не более 3 часов.

После выделения ОТП производился подсчет клеток. Проба была объемом 250 мкл. Количество клеток составляло примерно 300 тыс/мл. Затем добавляли индуктор агрегации - водные растворы ристомицина. Конечная концентрация составляла 0,1 мг/мл.

Для исследования влияния КВЧ на агрегацию тромбоцитов использовался метод агрегометрии. Измерения были проведены на четырехканальном приборе AggRam Helena (Великобритания). Кюветы для данного прибора были из силиконизированного стекла, размер их составлял 8 × 60 мм². Температура инкубации - 37°C ± 1°C. Длина волны, на которой проводились измерения – 650 нм. Для перемешивания использовались магниты с покрытием, размером 3,5 × 4 мм².

Далее регистрировали кинетику агрегации в течение 20 минут. В качестве контроля использовали пробу, которая представляла ОТП с добавлением индуктора. Калибровка прибора осуществлялась с помощью бедной тромбоцитами плазмы. Оценка производилась по изменению светопропускания ОТП, при добавлении индуктора агрегации, в нашем случае ристомицина. После добавления индуктора образуются агрегаты тромбоцитов. Параллельно с этим процессом увеличивается светопропускание до достижения плато, что указывает на необратимую агрегацию. Степень агрегации представляет собой разницу между минимальным и максимальным процентами светопропускания. Скорость агрегации оценивалась по тангенсу угла наклона агрегатограммы [4]. Полученные результаты обрабатывались с помощью программ Excel (Microsoft office) и STATISTICA версия 6, StatSoft Corporation (USA). Для анализа различий количественных признаков в трех и более несвязанных группах использовался статистический критерий Краскелла-Уоллиса ANOVA, в двух несвязанных группах применялся критерий Манна-Уитни. Достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Генератор на основе диода Ганна с частотой в диапазоне от 32,9 до 39,6 ГГц (длина волны, соответственно, от 9,1 до 7,6 мм) и мощностью излучения от 3 до 30 мВт использовался в качестве источника микроволнового излучения. Установка микроволнового облучения обеспечивала подведение излучения к исследуемому объекту с помощью волновода сечением 7,2x3,4 мм² с согласующими элементами. Осуществлялся контроль режима бегущей волны, мощности микроволнового излучения и длины волны излучения. Образцы подвергались микроволновому воздействию в ближнем поле рупорной антенны, расположенной вертикально, и находясь над ней на расстоянии 6 см от открытого конца рупора, т.е. в ближней зоне облучателя. Образцы перемешивали осторожным встряхиванием каждые 5 мин. Температуру в образцах измеряли с использованием волоконно-оптического микротермодетектора МТ-4МО (Россия) с точностью 0,05°C

Оценка межклеточного взаимодействия производилась по изменению светопропускания обогащенной тромбоцитами плазмы, при добавлении индуктора агрегации, в нашем случае ристомицина. После добавления индуктора образуются агрегаты тромбоцитов, в результате этого процесса увеличивается светопропускание обогащенной тромбоцитами плазмы крови (ОТП) до достижения плато, что указывает на необратимую агрегацию. В ходе активации тромбоцитов происходит изменение структуры плазматической мембраны, осуществляется активное перераспределение и движение ионов через мембрану, наблюдается гидролиз инозитольных фосфолипидов, что приводит к присоединению или отсоединению от биомембраны различных белков. Также происходит высвобождение и окисление арахидоновой кислоты и изменение метаболизма циклических нуклеотидов.

На рисунках 1, 2 представлены результаты, показывающие влияние КВЧ в присутствии этанола на степень агрегации и скорость агрегации тромбоцитов. Данные были получены при обработке агрегатограмм здоровых доноров. Как видно добавление 1 мкл этанола вызывало незначительное повышение степени агрегации тромбоцитов, что возможно обусловлено образованием гидроксэтильных радикалов, которые являются дополнительными модуляторами тромбоцитарной активности [9, 10].

На основании результатов недавних исследований можно предположить, что активированные тромбоциты образуют две субпопуляции, одна из которых способна эффективно агрегировать, а другая осуществляет

экстернализацию фосфатидилсерина на внешней стороне мембраны и таким образом ускоряет ход мембранно-

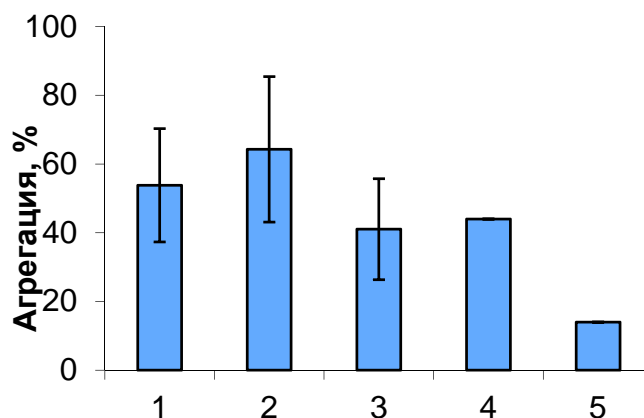


Рисунок 1. Влияние КВЧ на степень агрегации тромбоцитов в присутствии этанола: 1 – ОТП + КВЧ облучение; 2 – ОТП + КВЧ облучение/этанол 1 мкл; 3 – ОТП + КВЧ облучение/этанол 2,5 мкл; 4 – ОТП + КВЧ облучение/этанол 10 мкл; 5 – ОТП + КВЧ облучение/этанол 15 мкл

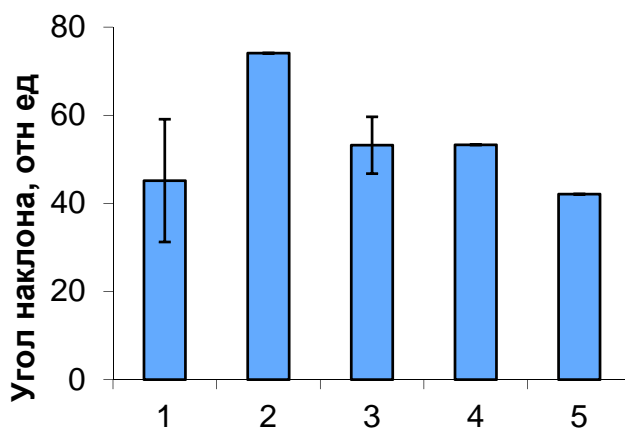


Рисунок 2. Влияние КВЧ на скорость агрегации тромбоцитов в присутствии этанола: 1 – ОТП + КВЧ облучение; 2 – ОТП + КВЧ облучение/этанол 1 мкл; 3 – ОТП + КВЧ облучение/этанол 2,5 мкл; 4 – ОТП + КВЧ облучение/этанол 10 мкл; 5 – ОТП + КВЧ облучение/этанол 15 мкл

зависимых реакций свертывания крови. При этом происходит активация тромбоцитов и увеличение концентрации кальция в его цитоплазме. В дальнейшем происходит аккумуляция кальция в митохондриях до «критического уровня», что является пусковым моментом апоптоза в тромбоцитах. Запускается процесс «митохондриального некроза» тромбоцитов, который сопровождается активным выходом кальция и свободных радикалов из митохондрий, а также деградацией и разрушением цитоскелета, что сопровождается сильным увеличением размера тромбоцитов [11, 12]. В работе [13] было показано, что в активированных тромбоцитах повышается синтез активных форм кислорода. Этанол индуцирует митохондриально-опосредованный внутренний апоптоз тромбоцитов, приводит к снижению количества циркулирующих тромбоцитов. Он вызывает деполяризацию митохондриального внутреннего трансмембранного потенциала, активацию Вах, подавление Bcl-2 и активацию каспазы-3, блокирует поверхностную экспрессию связывания Р-селектина или РАС-1 [1]. Эта последовательность реакций приводит к гибели значительного количества тромбоцитов, участвующих в агрегации и, следовательно, к снижению регистрируемого уровня агрегации и скорости ее нарастания в процессе эксперимента.

Итак, в результате выполнения данной экспериментальной работы было установлено, что КВЧ облучение низкой интенсивности в длинноволновой области снижало уровень агрегации тромбоцитов. Эффект облучения проявлялся в снижении степени агрегации тромбоцитов по сравнению с контролем при добавлении индуктора агрегации – ристомидина, а также в уменьшении угла наклона агрегатограммы (скорости агрегации тромбоцитов). Добавление в среду этанола способствовало дальнейшему снижению уровня агрегации и угла наклона агрегатограммы в зависимости от количества этанола добавленного в среду инкубации. Предложен механизм наблюдаемого эффекта, связанный с тем, что этанол индуцирует митохондриально-опосредованный внутренний апоптоз тромбоцитов и приводит к снижению количества циркулирующих тромбоцитов. КВЧ излучение за счет влияния на водную среду и структуру мембран тромбоцитов ускоряет этот процесс [14, 15]. Результаты работы открывают перспективы применения КВЧ излучения, как безопасного фактора воздействия с

целью коррекции патологий реологических свойств крови человека и, в частности, при алкогольной интоксикации.

Работа выполнена в рамках государственного задания.

Список литературы / References:

1. Liu L., Chen M., Zhao L., Zhao Q., Hu R., Zhu J., Yan R., Dai K. Ethanol Induces Platelet Apoptosis. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 2017, vol. 42, no 2, pp. 291-298
2. Baysan O., Kaptan K., Erinif K., Oztas Y., Coskun T., Kayir H., Uzun M., Uzbay T., Beyan C., Isik E. Chronic heavy ethanol consumption is associated with decreased platelet aggregation in rats. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 2005, no 2, pp. 85-90
3. Ruf J.C. Alcohol, wine and platelet function. *Biol Res*, 2004, vol. 37, no 2, pp. 209-15.
4. Казаринов К.Д., Баранова О.А., Щелконогов В.А., Чеканов А.В. Экспериментальные результаты изучения эффектов КВЧ излучения на межклеточные взаимодействия в плазме крови человека. *Электронная техника. СВЧ-техника*, 2019, вып. 2, т. 545, с. 79-86. [Kazarinov K.D., Baranova O.A., Shchelkonogov V.A., Chekanov A.V. Experimental results of studying the effects of EHF radiation on intercellular interactions in human plasma. *Elektronnaya tekhnika. SVCH-tehnika*, 2019, iss. 2, vol. 545, pp. 79-86. (In Russ.)]
5. Birka C., Lang A.P., Kempe S.D. Enhanced susceptibility to erythrocyte «apoptosis» following phosphate. *Eur. J. Physiol*, 2004, vol. 448, pp. 471-477.
6. Leytin V., Mykhaylov S., Starkey A.F. et al. Intravenous immunoglobulin inhibits anti-GPIIb-induced platelet apoptosis in a murine model of ITP. *Br. J. Haematol*, 2006, vol. 133, pp. 78-82.
7. Alberio L., Safa O., Clemetson K.J., Esmon C.T., Dale G.L. Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin. *Blood*, 2000, vol. 95, pp. 1694-702
8. Березовская Г.А. Апоптоз тромбоцитов: причины недостаточной эффективности антиагрегационных препаратов. *Бюллетень СО РАМН*, 2011, т. 32, № 4, с. 17-27 [Berezovskaya G.A. Platelet apoptosis: causes of insufficient efficacy of antiplatelet drugs. *Byulleten' SO RAMN*, 2011, vol. 32, no. 4, pp. 17-27. (In Russ.)]
9. Ермолаева Е.Н., Кривохижина Л.В., Кантюков С.А., Сурина-Марышева Е.Ф. Свободнорадикальное окисление в интактных и активированных тромбоцитах. *Фундаментальные исследования*, 2014, № 7-1, с. 61-65. [Ermolaeva E.N., Krivokhizhina L.V., Kanyukov S.A., Surin-Marysheva E.F. Free radical oxidation in intact and activated platelets. *Fundamental'nyye issledovaniya*, 2014, no. 7-1, pp. 61-65. (In Russ.)]
10. Sobotková A., Mášová-Chrastinová L., Suttnar J. Antioxidants change platelet responses to various stimulating events. *Free Radic Biol Med.*, 2009, vol. 47, no. 12, pp. 1707-1714.
11. Терентьева В.А., Свешникова А.Н., Пантелеев М.А. Биофизические механизмы контактной активации свертывания плазмы крови. *Биофизика*, 2017, т. 62, № 5, с. 909-919. [Terentyeva V.A., Sveshnikova A.N., Panteleev M.A. Biophysical mechanisms of contact activation of blood plasma coagulation. *Biofizika*, 2017, vol. 62, no. 5, pp. 909-919. (In Russ.)]
12. Obydenny S.I., Sveshnikova A.N., Ataulakhanov P.M. Dynamics of calcium spiking, mitochondrial collapse and phosphatidylserine exposure in platelet subpopulations during activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2016, vol. 14, no. 9, pp. 1867-1881.
13. Hartwig J.H. The platelet: form and function. *Seminars in hematology*, 2006, vol. 43, no 1, pp. 94-100. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2005.11.004.
14. Казаринов К.Д., Борисенко Г.Г., Полников И.Г. Действие КВЧ низкой интенсивности на окислительные процессы. *Научные труды VIII Международного конгресса «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине»*, СПб: 2018, с. 43 [Kazarinov K.D., Borisenko G.G., Polnikov I.G. Effect of low-intensity EHF on oxidative processes. *Nauchnyye trudy VIII Mezhdunarodnogo kongressa «Slabye i sverkhslabye polya i izlucheniya v biologii i meditsine»*, St. Petersburg: 2018, p. 43. (In Russ.)]
15. Казаринов К.Д. Исследование мембранотропной активности ЭМИ в широком диапазоне длин волн. *Электронная техника. Сер. 1. СВЧ – техника*, 2018, Вып. 2, С. 62-75 [Kazarinov K.D. Investigation of the membranotropic activity of electromagnetic radiation in a wide range of wavelengths. *Elektronnaya tekhnika. Ser. 1. SVCH – tekhnika*, 2018, vol. 2, pp. 62-75. (In Russ.)]

STUDYING THE EFFECT OF EHF IRRADIATION ON HUMAN BLOOD CELLS

Kazarinov K.D., Shchelkonogov V.A., Baranova O.A., Chekanov A.V.

Kotelnikov Institute of Radioengineering and Electronics, RAS (Fryasino branch)

Vvedensky sq., 1, Fryazino, 141190, Russia; e-mail: kazarinov@ms.ire.rssi.ru

Abstract. Cell biology occupies a special place in the study of the biological effects of microwave radiation. Cells as the main structural elements of organs and tissues, as well as intercellular interaction, which ultimately controls the processes of functioning, birth and death of organisms are always the focus of attention of specialists. The results of our previous experiments are devoted to studying the effect of microwave radiation on human cells that are under stress. Oxidative stress plays a significant role in pathological processes. In tissues, oxidative stress leads to apoptosis, which affects not only nucleated cells, but also non-nuclear cells, such as red blood cells and platelets. Platelet function is one of the main causes of vascular pathologies. However, it is not always possible to overcome platelet aggregation and prevent the development of thrombotic complications with the help of antiplatelet drugs. In this paper, one of the aspects of the application of extremely high frequencies (EHF) radiation in medical applications is considered, namely, as a factor in the correction of disturbances in the rheological properties of blood in clinical practice. By modulating the activation of platelets with the help of microwave radiation, we can thereby reject various subpopulations of platelets. In addition, EHF radiation due to the influence on the aquatic environment and the structure of platelet membranes can accelerate the process of adjusting the state of platelets. In our experiments, platelet-rich plasma (PRP) was incubated at room temperature under EHF irradiation for 30 minutes, and then the level and rate of platelet aggregation was measured. The results of our experiments show that EHF radiation reduces the degree of aggregation and the angle of inclination of the aggregatogram compared to the control with the addition of the inducer ristomycin. The addition of ethanol to the platelet medium contributed to a further decrease in the monitored parameters. It is assumed that microwave irradiation, by stimulating an increase in the rate of formation of free radicals in PRP, can regulate platelet aggregation activity. The mechanism of the observed effect associated with increased cell apoptosis is considered.

Key words: EHF radiation, intercellular interaction, platelet-rich plasma, ethanol, aggregation inducers, alcohol intoxication, mechanism of the biological action of EHF radiation.