

## ИЗУЧЕНИЕ РАДИКАЛ-ГЕНЕРИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ АКТИВИРОВАННЫХ НЕЙТРОФИЛОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VITRO* В УСЛОВИЯХ МИКРОВОЛНОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ

Казаринов К.Д.<sup>1</sup>, Полников И.Г.<sup>1</sup>, Власова И.И.<sup>1,2</sup>, Михальчик Е.В.<sup>2</sup>, Гусев А.А.<sup>2</sup>, Баранова О.А.<sup>1,4</sup>, Щелконогов В.А.<sup>1,3,4</sup>, Чеканов А.В.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> ФирЭ им. В.А. Котельникова РАН

ул. Введенского, 4, г. Фрязино, Московская обл., 141190, РФ; e-mail: kazarinovkonstantin@yandex.ru

<sup>2</sup> ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА

ул. М. Пироговская, 1а, г. Москва, 119435, РФ

<sup>3</sup> МИРЭА – Российский технологический университет (ИТХТ)

просп. Вернадского, 86, г. Москва, 119571, РФ

<sup>4</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет

имени Н.И. Пирогова Минздрава России

ул. Островитянова, 1, г. Москва, 117997, РФ

Поступила в редакцию: 07.07.2021

**Аннотация.** Свободно-радикальные реакции играют важную роль в защите организма от инфекций, в частности, в ответе клеток иммунной системы – нейтрофилов и макрофагов на патогены. Результаты наших исследований показали, что ответ нейтрофилов на различные активаторы усиливался в результате воздействия микроволнового излучения. Облучение изменяло кинетику хемилюминесценции (ХЛ) цельной крови, к которой были добавлены активаторы, так что ХЛ проб крови, подвергшихся облучению, была значительно выше. Сравнение результатов нагревания образцов крови при воздействии микроволнового излучения и в термостате показало одинаковое увеличение ответа ХЛ активированных нейтрофилов. Измерение ХЛ изолированных нейтрофилов, ресуспендированных в плазме, доказало, что усиление активации нейтрофилов при облучении не опосредовано другими клетками крови или тромбоцитами. Морфологический анализ показал, что микроволновое излучение активирует нейтрофилы, т.е. повышает процент активированных клеток в суспензии. Было показано также, что излучение может слабо, но достоверно усиливать функциональный ответ миелопероксидазы – важного белка нейтрофилов, который способен продуцировать активные формы кислорода (АФК). Таким образом, наши исследования показали, что микроволновое излучение усиливает ответ нейтрофилов на индуктор активации в цельной крови, увеличивая продукцию АФК в крови.

**Ключевые слова:** микроволновое излучение, нейтрофилы крови человека, оксидативный стресс, хемилюминесценция, активные формы кислорода, миелопероксидаза, КВЧ-диапазон.

Микроволновое излучение КВЧ диапазона до сих пор незначительно использовалось в бытовых приборах и технике. Теперь же ситуация начинает кардинально меняться. Это вызвано тем, что из-за огромного роста мобильного трафика во всем мире руководства многих стран и частных компаний привлекают значительные ресурсы для развития системы связи пятого поколения (5G), в которой, наряду с сантиметровым предполагается использование частот миллиметрового диапазона [1]. Однако и этот стандарт уже рассматривается как промежуточный на пути к системе связи шестого поколения (6G), в котором будут задействованы частоты коротковолновой части миллиметрового диапазона, или, как часто ее называют, субтерагерцового диапазона. Возникшая ситуация ставит вопрос о дополнительных мерах по защите здоровья населения, и особенно, специалистов, занятых в производстве и внедрении этой техники. Известен также положительный опыт использования КВЧ излучения в медицинской практике [2]. Зискин М.С. с сотрудниками при локальном КВЧ воздействии низкой интенсивности на кожу человека продемонстрировали высвобождение эндогенных опиоидных пептидов и предположили, что перенос этих агентов кровотоком по всему телу может приводить к обезболиванию и многим другим полезным эффектам.

Считается, что воздействие на организм человека происходит при интенсивностях облучения, которые вызывают слабое нагревание ткани, но биохимические механизмы эффектов облучения до конца не изучены. Известно, что окислительный стресс играет существенную роль при патологических процессах (ишемии, воспалении), токсических воздействиях и т.п. В тканях окислительный стресс приводит к гибели клеток, основным механизмом которой является апоптоз (генетически запрограммированный процесс гибели клетки. Авторы работы [3] считают, что воздействия микроволнового излучения на клетки человека могут вызывать апоптоз. Образование свободных радикалов в организме или окислительный (оксидативный) стресс, стимулированный воздействием микроволнового излучения рассматривается многими специалистами как один из основных механизмов биологической активности данного вида излучения [4,5]. В ряде исследований показано, что микроволны могут влиять на различные процессы, связанные с развитием окислительного стресса: изменение структуры и функции ферментов, в частности, усиление активности пероксидаз, интенсивность свободно-

радикальных процессов в клетках и тканях и усиление активации клеток, изменение ответа клеток иммунной системы и модуляцию иммунного ответа организма в целом [6].

Результаты наших предшествующих экспериментов следует отнести к изучению влияния микроволнового излучения на клетки человека, которые находились в стрессовом состоянии [7]. Так, в частности, было показано, что активация комплекса кардиолипин-цитохром *c* (КЦ) микроволновым излучением в клетках может повысить чувствительность клеток к апоптотическим (в том числе, противораковым, агентам) и позволит модулировать ответ клеток на различные воздействия.

В работе [8] представлены экспериментальные результаты по изучению влияния микроволнового излучения на активацию нейтрофилов в образцах цельной крови. Следует отметить, что к настоящему времени выполнено слишком мало работ, которые посвящены изучению влияния микроволнового излучения на функциональную активность нейтрофилов, причем, данные этих работ противоречивы [9].

Мы изучали влияние микроволн в КВЧ диапазоне с длиной волны 7,7 мм (37 ГГц) на активацию нейтрофилов. Для характеристики продукции свободных радикалов и оксидантов активированными нейтрофилами мы выбрали метод люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ), который позволяет оценивать степень активации нейтрофилов немедленно после прекращения облучения образца крови. Для активации нейтрофилов к образцам цельной крови добавляли ОЗ (опсонизированный зимозан) (0,6 мг/мл) или лабораторный штамм *E. coli* (25 или 50 млн клеток в мл), после чего сравнивали активность нейтрофилов в контрольных пробах крови и образцах, подвергшихся воздействию микроволнового облучения в течение 5, 15 и 30 мин. По окончании инкубации брали пробы для измерения кинетики люминол-зависимой ХЛ крови. Кинетику люминол-зависимой ХЛ измеряли после добавления крови в раствор Кребса Рингера, содержащий 300 мкМ люминола. В 4-х независимых экспериментах было показано, что радикал-генерирующая активность нейтрофилов выше на 20-30% в пробах крови, которые были подвергнуты облучению в течение 15 мин. В тоже время КВЧ не вызывало активации нейтрофилов в крови, не содержащей индуктор активации нейтрофилов. Наши эксперименты показали, что излучение длиной волны 7,7 мм усиливает радикально-генерирующую способность активированных нейтрофилов, когда агонист добавляли к крови до облучения.

На основании экспериментальных данных было установлено, что уровень ХЛ был гораздо выше в случае КВЧ облучения образца по сравнению с контрольным образцом. Разница была более очевидной в течение первых нескольких минут ХЛ-замера. В отсутствие активаторов нейтрофилов (ОЗ или бактерий) параметры ХЛ контрольного образца и облученного были одинаковыми и практически не отличались от исходного значения ХЛ. Поэтому облучение цельной крови не вызывает активации нейтрофилов в крови, но усиливает радикально-генерирующую способность активированных нейтрофилов, когда агонист добавляли к крови до облучения.

В дальнейшей работе, чтобы подтвердить, что увеличение выработки АФК в крови было вызвано прямой активацией нейтрофилов при КВЧ облучении, а не опосредовано активацией других клеток или белков, мы провели эксперименты с изолированными нейтрофилами и измерили активность миелопероксидазы (МПО) – основным ферментом нейтрофилов, секретируемым при активации.

Опсонизированный зимозан (ОЗ) или бактерии были добавлены к суспензии изолированных нейтрофилов в плазме. Подобно нашим экспериментам с цельной кровью, мы сравнили кинетику ХЛ контрольного образца и образца, подвергнутого КВЧ воздействию в течение 15 минут. Для обоих агонистов в виде частиц величина ХЛ облученных образцов была выше в течение первых нескольких минут измерений по сравнению с контрольными образцами. Это различие показало достоверное увеличение продукции АФК в суспензии облученных нейтрофилов.

Активность МПО в плазме измеряли двумя независимыми методами: окисление OD (*o*-dianisidine) субстрата пероксидазы и контроль свободных тиолов в разбавленной плазме, инкубированной с МПО и глюкозо-глюкозооксидазой, которая является источником перекиси водорода. Окисление SH-групп или OD не было обнаружено без добавления МПО и / или глюкозооксидазы в плазму.

Временной ход окисления OD регистрировали путем измерения накопления в растворе продукта окисления с максимумом поглощения при 450 нм. В плазме, дополненной ферментами, после 1-минутного латентного периода продукты окисления начинали накапливаться, и поглощение раствора увеличивалось. В случае облучения скорость накопления продукта была выше. Значимость различий между контрольным окисления ( $p < 0,05$ ).

Глюкоза или глюкозооксидаза, добавленные одновременно, вызывали уменьшение количества свободных тиолов в разбавленной плазме. Если плазму подвергали воздействию КВЧ излучения, концентрация групп SH уменьшалась быстрее. Концентрация свободных SH-групп в экспонированных образцах составляла  $(110 \pm 2)\%$  от концентрации в контрольных образцах после 45-минутной инкубации, как было измерено в 6 независимых экспериментах. Критерий Уилкоксона со знаком ранга выявил разницу между контрольными и экспонированными образцами как в течение 20, так и 45 мин инкубации.

Активационное состояние нейтрофилов в начале воздействия может иметь решающее значение для регистрации эффектов КВЧ излучения. Сафронова с сотрудниками ранее показали, что начальный функциональный статус биообъектов определил их чувствительность к КВЧ облучению низкой интенсивности [10]. Ряд исследований, касающихся биологической чувствительности к микроволновому облучению в широком диапазоне длин волн также показал, что излучение само по себе может не влиять на лейкоциты, но усиливает реакцию клеток на индуктор. Исследования *in vitro* мононуклеарных клеток периферической крови, подвергнутые воздействию СВЧ-сигналов, не выявили статистически значимых изменений параметров

функциональной активности лимфоцитов, моноцитов и других иммунных клеток, измеренных после воздействия [11,12]. Тем не менее, иммунная активность лимфоцитов и моноцитов может быть дополнительно усилена микроволнами 900 МГц: микрокультуры моноядерных клеток, подвергнутых воздействию микроволн, показали значительно более высокий ответ на митогены [13]. Было показано, что низкочастотная ЭМИ (<200 Гц) усиливает активацию нейтрофилов только в том случае, если клетки были инкубированы с низкими дозами миристатацетата, но не в случае нестимулированных клеток [13].

Было продемонстрировано, что основным механизмом, лежащим в основе воздействия ЭМИ на биологические объекты, является нагрев, при котором из кожи выделяются регуляторы, оказывающие влияние на весь организм. Как тепловое воздействие окружающей среды, так и воздействие КВЧ облучения 35 ГГц вызывают высвобождение медиаторов, активирующих макрофаги в плазме крыс, приводящих к последующим ответам в клетках и тканях [14]. Хотя мы не исключаем нетепловых эффектов, наше исследование ясно показало, что нагрев крови, вызванный КВЧ облучением, является основным механизмом усиления реакции нейтрофилов на агонисты в наших экспериментальных условиях.

Чтобы выяснить источник повышенной продукции АФК в крови при КВЧ воздействии, мы провели исследование влияния КВЧ излучения на изолированные нейтрофилы и на функциональную активность МРО - основного фермента, секретируемого нейтрофилами в местах воспаления. КВЧ воздействие на неочищенные изолированные нейтрофилы в плазме крови не вызывало активации клеток. Если в суспензию нейтрофилов добавляли агонист, КВЧ-излучение усиливало генерацию АФК клетками, о чем свидетельствует повышенный уровень люминол-зависимой ХЛ. Облучение плазмы, содержащей МРО и глюкозооксидазу (в качестве источника H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), привело к небольшому (10-15%), но статистически значимому увеличению окислительной активности МРО. Как было показано ранее, воздействие на растворы белка КВЧ излучения может вызвать изменения в структуре и функциях фермента и повысить активность пероксидаз [15].

Мы оценивали влияние КВЧ на клетки крови, характеризуя морфологические изменения клеток при концентрации бактерий 50 миллионов на мл. Световые микрофотографии свидетельствуют о том, что добавление бактерий в кровь вызывало активацию нейтрофилов и, в меньшей степени, моноцитов. Морфологически нормальный нейтрофил представляет собой сферическую клетку с сегментированным ядром и равномерно распределенную цитоплазматическую нейтрофильную грануляцию. При активации нейтрофилы подвергаются изменению формы клеток, становясь более аморфными, образуются цитоплазматические вакуоли и наблюдается набухание ядер с потерей ядерной сегментации. Мы считали нейтрофилы высокоактивными, если они содержали 2-3 крупных вакуоли диаметром 3-5 мкм в цитоплазме или во многих вакуолях диаметром 1-3 мкм (так что вакуоли покрывали 10-40% клеточной цитоплазмы). Слабо активированные нейтрофилы содержат 2-4 вакуолей в цитоплазме диаметром 1-2 мкм (так что вакуоли покрывают 1-10% клеточную цитоплазму). Интактные нейтрофилы не имеют вакуолей в цитоплазме или содержат одну небольшую вакуоль диаметром менее 1 мкм (менее 1% клеточной цитоплазмы). Без добавления нейтрофилов *E. coli* как контрольные, так и облученные образцы были неповрежденными (> 99%). Через 15 мин после добавления бактерий в обоих образцах наблюдались морфологические изменения, характерные для активированных нейтрофилов, но количество интактных нейтрофилов и нейтрофилов с морфологическими признаками легкой и сильной активации различалось по двум образцам. Более половины нейтрофилов были неповрежденными (55 ± 2,5%) в контрольном образце, а процент сильно активированных клеток был низким (6,5 ± 1,1%). Напротив, в облученных образцах активированные нейтрофилы содержали более 80% клеток (40,5 ± 2,2% слабоактивированных и 41,6 ± 2,5% высокоактивных нейтрофилов), а количество интактных клеток было низким (17,9 ± 1,7%).

Известно, что КВЧ излучение плохо проникает в биологические ткани, поэтому прогрев тканей может происходить на глубине не более нескольких миллиметров. Повышение температуры происходит медленно и незначительно. Неглубокое проникновение КВЧ в биологические ткани открывает возможности использования его использования для целевой локальной терапии с минимальными побочными эффектами и повреждением окружающих тканей.

Наша работа показывает возможность применения КВЧ излучения для направленной регуляции локальных воспалительных процессов на небольших участках кожи без повреждения здоровых тканей. КВЧ облучение зараженной области может способствовать активации нейтрофилов в ране, что приведет к локальному усилению противомикробной активности нейтрофилов. С другой стороны, наши результаты показывают необходимость осторожного использования КВЧ излучения для терапии пациентов с инфекционными заболеваниями.

*Работа выполнена в рамках госзадания ФИПЭ им. В.А. Котельникова РАН.*

#### **Список литературы / References:**

1. Agiwal M., Roy A., Saxena N. Next generation 5G wireless networks: a comprehensive survey. *IEEE Commun Surveys Tuts*, 2016, vol. 18, pp. 1617-1655.
2. Ziskin M.C. Millimeter waves: Acoustic and electromagnetic. *Bioelectromagnetics*, 2013, vol. 34, pp. 3-14.
3. Szabo I., Kappelmayer J., Alekseev S.I., Ziskin M.C. Millimeter wave induced reversible externalization of phosphatidylserine molecules in cells exposed in vitro. *Bioelectromagnetics*, 2006, vol. 27, pp. 233-244.
4. Meena R., Kajal, K., Kumar, J., Rajamani P., Verma H. N., Kesari K.K. Therapeutic approaches of melatonin in microwave radiations induced oxidative stress mediated toxicity on male fertility pattern of Wistar rats. *Electromagnetic Biology Medicine*, 2014, vol. 33, pp. 81-91.

5. Yakymenko I., Tsybulin O., Sidorik E., Henshel D., Kyrylenko O., Kyrylenko S. Oxidative mechanisms of biological activity of low-intensity radiofrequency radiation. *Electromagn Biol Med.*, 2016, vol. 35, pp. 186-202.
6. Koyama S., Narita E., Suzuki Y., Taki M., Shinohara N., Miyakoshi J. Effect of a 2.45- GHz radiofrequency electromagnetic field on neutrophil chemotaxis and phagocytosis in differentiated human HL-60 cells. *Journal of Radiation Research*, 2015, vol. 56, pp. 30-36.
7. Казаринов К.Д., Борисенко Г.Г., Полников И.Г. Влияние ЭМИ низкой интенсивности микроволнового диапазона на окислительные процессы в клетках. *Электронная техника. Сер. 1. СВЧ – техника*, 2018, вып. 1, № 536, с. 60-68. [Kazarinov K.D., Borisenko G.G., Polnikov I.G. Influence of low-intensity EMR in the microwave range on oxidative processes in cells. *Electronic equipment. Ser. 1. Microwave - technology*, 2018, vol. 1, no. 536, pp. 60-68. (In Russ.)]
8. Казаринов К.Д., Власова И.И., Михальчик Е.В. Хемиллюминесцентные исследования влияния микроволнового излучения на активацию нейтрофилов. *VI съезд биофизиков России. Сборник научных трудов*, 2019, т. 2, с. 37. [Kazarinov K.D., Vlasova I.I., Mikhanchik E.V. Chemiluminescent studies of the effect of microwave radiation on the activation of neutrophils. *VI Congress of Biophysicists of Russia. Collection of scientific papers*, 2019, vol. 2, p. 37. (In Russ.)]
9. Poniedzialek B., Rzymiski P., Nawrocka-Bogusz H., Jaroszyk F., Wiktorowicz K. The effect of electromagnetic field on reactive oxygen species production in human neutrophils in vitro. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 2013, vol. 32, no. 3, pp. 333-341.
10. Safronova V.G., Gabdoulkhakova A.G., Santalov B.F. Immunomodulating action of low intensity millimeter waves on primed neutrophils. *Bioelectromagnetics*, 2002, vol. 23, no. 8, pp. 599-606.
11. Tuschl H., Novak W., Molla-Djafari H. In vitro effects of GSM modulated radiofrequency fields on human immune cells. *Bioelectromagnetics*, 2006, vol. 27, no. 3, pp. 188-196.
12. Lantow M., Lupke M., Frahm J., Mattsson M.O., Kuster N., Simko M. ROS release and Hsp70 expression after exposure to 1,800MHz radiofrequency electromagnetic fields in primary human monocytes and lymphocytes. *Radiation Environmental Biophysics*, 2006, vol. 45, no. 1, pp.55-62.
13. Stankiewicz W., Dabrowski M.P., Kubacki R., Sobiczewska E., Szmigielski S. Immunotropic influence of 900MHz microwave GSM signal on human blood immune cells activated in vitro. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 2006, vol. 25, no. 1, pp. 45-51.
14. Sypniewska R.K., Millenbaugh N.J., Kiel J.L., Blystone R.V., Ringham H.N., Mason P.A., Witzmann F.A. Protein changes in macrophages induced by plasma from rats exposed to 35 GHz millimeter waves. *Bioelectromagnetics*, 2010, vol. 31, no. 8, pp. 656-663.
15. Barteri M., De Carolis R., Marinelli F., Tomassetti G., Montemiglio L.C. 2016. Effects of microwaves (900MHz) on peroxidase systems: A comparison between lactoperoxidase and horseradish peroxidase. *Electromagn Biol Med.*, 2016, vol. 35, pp.126-133.

**STUDY OF THE RADICAL-GENERATING CAPACITY OF ACTIVATED NEUTROPHILS IN THE IN VITRO EXPERIMENT UNDER MICROWAVE IRRADIATION****Kazarinov K.D.<sup>1</sup>, Polnikov I.G.<sup>1</sup>, Vlasova I.I.<sup>1,2</sup>, Mikhailchik E.V.<sup>2</sup>, Gusev A.A.<sup>2</sup>, Baranova O.A.<sup>1,3</sup>, Shchelkonogov V.A.<sup>1,3,4</sup>, Chekanov A.V.<sup>1,3</sup>**<sup>1</sup> Kotelnikov Institute of Radioengineering and Electronics (Fryasino branch)*Vvedensky sq., 4, Fryazino, Moscow region, 141190, Russia; e-mail: kazarinovkonstantin@yandex.ru*<sup>2</sup> Research Institute for Physico-Chemical Medicine*M. Pirogovskaya Str., 1a, Moscow, 119435, Russia*<sup>3</sup> MIREA-Russian technological University (ITHT)*Vernadsky prospectus, 86, Moscow, 119571, Russia*<sup>4</sup> Russian National Research Medical University (RNRMU),*Ostrovitianov str., 1, Moscow, 117997, Russia*

**Abstract.** Free radical reactions play an important role in protecting the body from infections, in particular, in the response of cells of the immune system - neutrophils and macrophages to pathogens. The results of our studies showed that the response of neutrophils to various activators was enhanced as a result of exposure to microwave radiation. Irradiation changed the chemiluminescence (CL) kinetics of whole blood, to which activators were added, so that the CL of the irradiated blood samples was significantly higher. Comparison of the results of heating blood samples under the influence of microwave radiation and in a thermostat showed the same increase in the CL response of activated neutrophils. Measurement of CL of isolated neutrophils resuspended in plasma proved that the enhancement of neutrophil activation during irradiation is not mediated by other blood cells or platelets. Morphological analysis showed that microwave radiation activates neutrophils, i.e. increases the percentage of activated cells in suspension. It was also shown that radiation can weakly but reliably enhance the functional response of myeloperoxidase, an important neutrophil protein that is capable of producing reactive oxygen species (ROS). Thus, our studies have shown that microwave radiation enhances the response of neutrophils to the activation inducer in whole blood, increasing the production of ROS in the blood.

**Key words:** *microwave radiation, human blood neutrophils, oxidative stress, chemiluminescence, reactive oxygen species, myeloperoxidase, EHF range.*