

НАНОСЕКУНДНЫЕ МИКРОВОЛНОВЫЕ ИМПУЛЬСЫ ВЛИЯЮТ НА СКОРОСТЬ ПРОЛИФЕРАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Большаков М.А.^{1,3}, Самойлова А.В.^{1,3,4}, Гостюхина А.А.^{1,2,3}, Дорошенко О.С.^{2,3}, Кутенков О.П.¹, Зайцев К.В.², Ростов В.В.¹

¹Институт сильноточной электроники СО РАН
пр. Академический, 2/3, г. Томск, 634055, РФ

²Томский НИИКиФ ФФГБУ ФНКЦ МРиК ФМБА России
ул. Р. Люксембург, 1, г. Томск, 634009, РФ

³Национальный исследовательский Томский государственный университет
пр. Ленина, 36, г. Томск, 634050, РФ

⁴Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России
Московский тракт, 2, г. Томск, 634050, РФ; e-mail: antariks-tomsk2015@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbc.2022.0498

Аннотация. На 17 культурах стволовых клеток (СК), выделенных из бедренной кости лабораторных крыс «Wistar» экспериментально исследовано изменение скорости пролиферации клеток *in vitro* после облучения 4000 наносекундных микроволновых импульсов с пППМ 140 и 1500 Вт/см² при частотах повторения импульсов 8 и 13 Гц. Установлено, что воздействие наносекундным ИПМИ с обеими интенсивностями оказывает влияние на скорость пролиферации СК. После воздействия 4000 импульсов ИПМИ с пППМ 140 и 1500 Вт/см² и частотой повторения импульсов 8 Гц наблюдалось ингибирование пролиферации клеток относительно контрольной группы. После воздействия с частотой повторения импульсов 13 Гц при тех же самых интенсивностях имело место стимулирование пролиферации, в результате чего количество стволовых клеток в исследуемых культурах увеличивалось. Основной выявленной закономерностью является зависимость эффекта (от частоты повторения импульсов и, отчасти, от интенсивности). Понимание закономерностей позволит выбирать и использовать наиболее оптимальный режим воздействия для достижения необходимого результата, а знание первичного механизма позволит усилить или ослабить эффект, в частности, сочетанным воздействием ИПМИ с другими факторами.

Ключевые слова: наносекундные микроволновые импульсы, стволовые клетки, пролиферация, эффекты.

Для клеточной трансплантологии и терапии особый интерес и важность представляют новые методы масштабирования стволовых клеток для дальнейшего эффективного использования в регенеративной медицине. В настоящее время особое внимание уделяется исследованиям, посвящённым оценке пролиферативного потенциала и регенеративных возможностей СК. Для регулирования этих процессов используются дорогостоящие и труднодоступные импортные специализированные питательные среды, которые, не смотря на их эффективность, требуют продолжительного применения для получения необходимого количества стволовых клеток. Полагают, что эффективным способом активации пролиферации стволовых клеток могут быть различные физические факторы [1]. Существенный научный интерес с точки зрения влияния на пролиферативные способности клеточных культур может представлять использование наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения (ИПМИ). При малых длительностях импульсов излучение имеет высокую напряженность электрического поля, может варьировать по частоте повторения импульсов, их количества, что позволяет использовать разные варианты воздействия для достижения необходимого биологического эффекта. Как было установлено ранее, ИПМИ при определённых параметрах эффективно влияет на функциональное состояние целого ряда клеток и тканей [2-5].

Целью настоящей работы являлось экспериментально оценить способность наносекундных микроволновых импульсов изменять скорость пролиферации стволовых клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 17 культурах СК, выделенных из бедренной кости лабораторных крыс «Wistar» общепринятым стандартным методом [6]. Все процедуры с животными выполнялись в соответствии с международными правилами и нормами биоэтики [7]. На 12-14 сутки культивирования формировался 95-100% монослой стволовых клеток, которые далее подвергались воздействию ИПМИ. Жизнеспособность СК после культивирования составляла 91,5±2%. Полученные культуры были разделены на группы: контрольная – культуры клеток, которые не подвергались никаким воздействиям и располагались в CO₂ инкубаторе и облученные группы – культуры клеток, которые подвергались однократному воздействию ИПМИ. Просмотр клеток и их подсчёт проводился на микроскопе Optika XDS-2SFL (Италия) при 20-кратном увеличении. Каждая культура до начала эксперимента содержала в себе 5–8 (×10⁶) СК.

Облучение стволовых клеток наносекундным ИПМИ. В качестве источника ИПМИ использовался лабораторный импульсный генератор на основе магнетрона МИ-505 (изделие серийного производства ОАО «Тантал», Россия). Облучение СК проводилось в культуральных флаконах в дальней зоне рупора антенны сечением 40×90 мм на расстоянии 20 см от культуры клеток, что обеспечивало равномерное воздействующее поле. Клетки облучались однократно 4000 импульсами ИПМИ (несущая частота генератора 10 ГГц, выходная пиковая мощность 180 кВт, длительность импульсов на половинном уровне мощности 100 нс) с частотами повторения импульсов 8 и 13 Гц и длительностью экспозиции 8 и 5 минут, соответственно. Пиковые интенсивности 140 и 1500 Вт/см² оценивались с помощью стандартных методик на основе антенных измерений и калориметрических калибровок [8]. Во время радиочастотного электромагнитного воздействия осуществлялся температурный контроль с помощью волоконно-оптического термометра МТ-4МО-1 (Россия). По скорости роста температуры в клеточной культуре рассчитывалось значение удельной поглощаемой мощности (УПМ) в соответствие с [9].

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью пакета прикладных программ Statsoft STATISTICA for Windows 8.0. При обработке результатов они проверялись на нормальность распределения исследуемого признака с помощью критерия Шапиро–Уилка. Результаты представлены в виде процента (%) стволовых клеток в культуре [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные эксперименты показали, что стволовые клетки, выделенные из бедренной кости лабораторных крыс, по своему состоянию являются чувствительными к воздействию наносекундным ИПМИ. Облучение наносекундными микроволновыми импульсами влияет на скорость пролиферации СК и эффект зависит от частоты повторения импульсов.

Было установлено, что после воздействия 4000 импульсов ИПМИ с пПМ 140 и 1500 Вт/см² при частоте повторения импульсов 8 Гц происходит ингибирование пролиферации стволовых клеток в культуре как относительно контрольной группы и обучаемых клеток до воздействия (табл. 1). Облучение стволовых клеток ИПМИ с теми же интенсивностями, но при частоте повторения импульсов 13 Гц инициировало стимуляцию пролиферации, что сопровождалось увеличением количества стволовых клеток в исследуемых культурах (табл. 1). При продолжительном наблюдении (в течение 20 дней) за культурами клеток, облученных с интенсивностью 140 Вт/см² и частотой 13 Гц было отмечено более быстрое образование монослоя на 4-6 суток в сравнении с контролем (12-14 суток).

Проведенный термометрический контроль нагрева клеточных культур показал, что после воздействия 4000 импульсов при частоте повторения импульсов 13 Гц и интенсивности ИПМИ 140 Вт/см² нагрев в культуре не превышал 0,1°C. На линейном участке роста температуры продолжительностью 40-50 с скорость нагрева была оценена приблизительно как 0,002 градуса за секунду. Значение УПМ при такой скорости роста температуры составила около 1.0 Вт/кг. Исходя из этого представляется, что первичный физический механизм влияния наносекундного ИПМИ на стволовые клетки имеет нетепловую природу.

Физиологический механизм формирования эффекта ИПМИ на СК можно рассматривать как итоговый баланс контроля скоростей пролиферации двумя противоположно молекулярно-клеточными системами, активируемыми воздействием ИПМИ. При этом воздействие с частотой повторения 13 Гц активирует преимущественно процессы стимуляции пролиферации, в то время как после облучения с частотой повторения 8 Гц инициируется процесс ингибирования. Механизм подобной частотной зависимости, возможно, аналогичен тому, что предполагает модель «частотно-энергетических окон» W.R. Adey [11]. Согласно этой модели, наибольший эффект формируется при оптимальных интенсивностях электромагнитного микроволнового воздействия, частоте модуляций и важную роль играют ионы кальция. В процессе управления скоростью пролиферации клеток принято учитывать ряд обстоятельств: пути передачи сигналов, время их проведения, уровень и длительность конкретного сигнала, поскольку эти переменные влияют на физиологический клеточный

Таблица 1. Количество стволовых клеток лабораторных крыс в культуре после воздействия наносекундным ИПМИ (в % по отношению к контрольным значениям)

Группа		Исходное количество СК, % (n×10 ⁶)	Через 24 часа, %		Через 72 часа, %	
			1	2	1	2
Контроль		100 (5,9)	101	101	105	105
8 Гц	140 Вт/см ²	100 (7,9)	125	94	40	31
	1500 Вт/см ²	100 (6,7)	93	78	61	56
13 Гц	140 Вт/см ²	100 (6,1)	112	109	120	123
	1500 Вт/см ²	100 (7,6)	120	110	144	131

Примечание: результаты представлены в виде показателя % СК в культуре; 1 – показатель % СК в облученной культуре по отношению к контролю в соответствующие часы измерения; 2 – показатель % СК внутри соответствующей облученной культуры в сравнении исходными значениями

ответ [12]. В реализации перечисленных обстоятельств ключевую роль играют также ионы кальция [13]. Подобное совпадение актуализирует использование модели W.R. Adey применительно к регулированию пролиферации стволовых клеток воздействием ИПМИ.

По результатам, полученным при выполнении исследования, основной выявленной закономерностью является зависимость эффекта (по его величине и характеру реализации) от частоты повторения импульсов и, отчасти, от интенсивности. Понимание закономерностей позволит выбирать и использовать наиболее оптимальный режим воздействия для достижения необходимого результата, а знание первичного механизма позволит усиливать или ослаблять эффект, в частности, сочетанным воздействием ИПМИ с другими факторами (химическими, фармакологическими и др.).

Таким образом, из полученных экспериментальных данных следует, что облучение СК наносекундными импульсными микроволнами допускает изменение их скорости пролиферации. Это допускает возможность в управлении скорости роста клеток *in vitro*. Исходя из этого становятся актуальными дальнейшие исследования и уточнения оптимальных режимов воздействия ИПМИ (пППМ, частота повторения импульсов, количество импульсов и повторности воздействия). При этом такие биофизические показатели воздействия необходимо выявлять из конкретных задач регенеративной медицины при замещении в поврежденной ткани специфических клеток, репродуцируемых из стволовых клеток. Более того, при разработке портативного оборудования на основе наносекундного ИПМИ для персонализированной медицины с последующим их внедрением и активным использованием в учреждениях медицинского профиля также необходимо учитывать эти данные.

Список литературы / References:

1. Москвин С.В., Ключников Д.Ю., Антипов Е.В., Горина А.И., Киселева О.Н. Воздействие непрерывного низкоинтенсивного лазерного излучения красного (635 нм) и зеленого (525 нм) спектров на мезенхимальные стволовые клетки человека *in vitro*: обзор литературы и собственные исследования. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*, 2016, № 2, с. 32-42. [Moskvin S.V., Klyuchnikov D.Yu., Antipov E.V., Gorina A.I., Kiseleva O.N. The influence of continuous low-intensity laser radiation at the red (635 nm) and green (525 nm) wavelengths on the human mesenchymal stem cells *in vitro*: a review of the literature and original investigations. *Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoj fizicheskoy kul'tury*, 2016, no 2, pp. 32-42. (In Russ.)]
2. Жаркова Л.П., Князева И.Р., Иванов В.В., Большаков М.А., Кутенков О.П., Ростов В.В., Влияние импульсно-периодического рентгеновского и микроволнового излучений на уровень перекисей в изолированных гепатоцитах. *Вестник Томского государственного университета*, 2010, № 333, с. 161-163. [Zharkova L.P., Knyazeva I.R., Ivanov V.V., Bolshakov M.A., Kutenkov O.P., Rostov V.V. Repetitive pulsed X-ray and microwaves effect on peroxide level in isolated hepatocytes. *Vestnik TSU*, 2010, no. 333, doi: 10.17223/15617793 (In Russ.)]
3. Князева И.Р., Медведев М.А., Жаркова Л.П., Гостюхина А.А., Кутенков О.П., Ростов В.В., Большаков М.А. Действие наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения на процессы регенерации. *Бюллетень сибирской медицины*, 2011, т. 10, № 6, с. 109-113. [Knyazeva I.R., Medvedev M.A., Zharkova L.P., Gostyukhina A.A., Kutenkov O.P., Rostov V.V., Bolshakov M.A. The influence of nanosecond microwave pulses on the regeneration processes. *The Bulletin of the Sib. Med.*, 2011, vol. 10, no. 6, pp. 109-113. (In Russ.)]
4. Кереев А.В., Большаков М.А., Жаркова Л.П. и др. Эффект воздействия наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения на эпидидимальную жировую ткань мышей. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2014, т. 54, № 6, с. 606-612. [Kereev A.V., Bolshakov M.A., Zharkova L.P. i dr. Effekt vozdejstviya nanosekundnogo impul'sno-periodicheskogo mikrovolnovogo izlucheniya na epididimal'nyuyu zhirovuyu tkan' myshej. *Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya*, 2014, vol. 54, no. 6, doi: 10.7868/S0869803114060071. (In Russ.)]
5. Кереев А.В., Большаков М.А., Ходанович М.Ю., Немирович-Данченко Н.М., Кутенков О.П., Ростов В.В. Оценка степени активности белка c-fos в структурах мозга мышей на воздействие наносекундных микроволновых импульсов. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2017, т. 57, № 2, с. 179-184. [Kereev A.V., Bolshakov M.A., Khodanovich M.Yu., Nemirovich-Danchenko N.M., Kutenkov O.P., Rostov V.V. Evaluation of mice brain reactions after nanosecond microwave pulses using c-fos expression. *Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya*, 2017, vol. 57, no. 2, pp. 179-184, doi: 10.7868/S0869803117020072. (In Russ.)]
6. Шахов В.П. и др. *Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей*. Томск: STT, 2004, 386 с. [Shahov V.P. i dr. *Vvedenie v metody kul'tury kletok, bioinzhenierii organov i tkanej*. Tomsk: STT; 2004, 386 p. (In Russ.)]
7. РФ ГОСТ Р-53434-2009 *Принципы надлежащей лабораторной практики*. М.: Стандартинформ, 2010. [RF GOST R-53434-2009 *Principles of Good Laboratory Practice*. М.: Standartinform, 2010. (In Russ.)]
8. Klimov A.I., Eltchaninov A.A., Konobeeva E.Yu. Measurements of Parameters of X-Band High-Power Microwave Pulses. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Fizika. Russian Physics Journal*, 2006, vol. 49, no. 11, pp. 431-434.
9. Bolshakov M.A., Alekseev S.I. Bursting Responses of Lymnaea Neurons to Microwave Radiation. *Bioelectromagnetics*, 1992, vol. 13, no. 3, pp. 119-129, doi: 10.1002/bem.2250130206.
10. Медик В.А. *Статистика в медицине и биологии*. М.: Медицина, 2000, 412 с. [Medic V.A. *Statistics in medicine and biology*. М.: Medicine, 2000, 412 p. (In Russ.)]
11. Adey W.R. Biological effects of electromagnetic fields. *J. Cell Biochem*, 1993, vol. 51, no. 4, pp. 410-416.

12. Hou J.F. In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. *Laser Surgery Medicine*, 2008, vol. 40, no. 10, pp. 726-733.

13. Kaivosoja E. The effect of pulsed electromagnetic fields and dehydroepiandrosterone on viability and osteo-induction of human mesenchymal stem cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2015, vol. 9, no. 1, pp. 31-40.

NANOSECOND MICROWAVE PULSES AFFECT STEM CELL PROLIFERATION RATE

Bolshakov M.A.^{1,3}, Samoylova A.V.^{1,3,4}, Gostyukhina A.A.^{1,2,3}, Doroshenko O.S.^{2,3}, Kutenkov O.P.¹, Zaitsev K.V.², Rostov V.V.¹

¹ Institute of High Current Electronics SB RAS
Akademicheskoy Ave., 2/3, Tomsk, 634055, Russia

² Federal Scientific and Clinical Center of Medical Rehabilitation and Balneology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia

R. Luxembourg Str., 1, Tomsk, 634009, Russia

³ National research Tomsk State University
Lenin Str., 36, Tomsk, 634050, Russia

⁴ Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation
Moscow tract, 2, Tomsk, 634050, Russia; e-mail: antariks-tomsk2015@yandex.ru

Received 07.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0498

Abstract. On 17 cultures of stem cells (SK) isolated from the femur of laboratory rats «Wistar», the change in the rate of cell proliferation in vitro after irradiation with 4000 nanosecond microwave pulses with a pPFD of 140 and 1500 W/cm² at pulse repetition rates of 8 and 13 Hz was experimentally studied. It has been established that exposure to nanosecond RPMR with both intensities affects the rate of proliferation SK. After exposure to 4000 RPMR pulses with 140 and 1500 W/cm² pPFD and a pulse repetition rate of 8 Hz, inhibition of cell proliferation was observed relative to the control group. After exposure to a pulse repetition rate of 13 Hz at the same intensities, stimulation of proliferation took place, as a result of which the number of stem cells in the studied cultures increased. The main revealed pattern is the dependence of the effect (on the pulse repetition rate and, in part, on the intensity). Understanding the patterns will allow choosing and using the most optimal mode of exposure to achieve the desired result, and knowledge of the primary mechanism will make it possible to enhance or weaken the effect, in particular, the combined effect of RPMR with other factors.

Key words: nanosecond microwave pulses, stem cells, proliferation, effects.