

РАЗНОНАПРАВЛЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ НЕПРЕРЫВНОГО И МОДУЛИРОВАННОГО УЛЬТРАЗВУКА НА КЛЕТКИ КРОВИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ *in vitro*

© 2017 г. А.А. Олешкевич

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина,
109472, Москва, ул. Скрябина, 23

E-mail kompsoita@gmail.com

Поступила в редакцию 02.11.15 г.

После доработки 26.01.16 г.

Проведены исследования особенностей поведения клеток крови разных видов животных в ультразвуковом поле, выявлены диапазоны частот модуляции, вызывающих необратимые изменения. Обнаружены следующие цитоморфологические эффекты ультразвукового воздействия (несущая частота 880 кГц и 2,64 МГц, модуляция 10–1000 Гц) на эритроциты: изменение формы, образование симметричных групп вокруг клетки и цепочек эритроцитов без цитолиза, появление теней клеток. Изменение лейкограмм при равноэнергетическом воздействии не всегда зависело от вида животных. Лейкоциты изменялись раньше эритроцитов, спустя 12–20 с от начала озвучивания активными частотами. Действие на гранулоциты, ведущее к изменению цитоплазматической мембраны, а затем клетки в целом, начиналось раньше, чем на агранулоциты. В малых лимфоцитах дегенеративные изменения регистрировались значительно позже – через 50–90 с. У всех видов животных при воздействии ультразвуком в диапазоне мощности 0,2–0,7 Вт/см² и модуляции 10–100 Гц происходят одинаковые эффекты: лейкопения, цитолиз, деструкция и агрегация клеток, вспенивание цитоплазмы гранулоцитов, разрыв цитоплазматических мембран и взрыв ядер (общий), их деформация и нарушения границ.

Ключевые слова: клетки крови, животные, ультразвук, модуляция.

В настоящее время нет однозначной теории формирования частотно-зависимых ответов на акустическое воздействие. Ряд исследователей показали существенные отличия на уровне ткани в биологических эффектах непрерывных и модулированных волн различной физической природы [1,2]. При этом вызываемые изменения при воздействии модулированных волн выше, а степень и выраженность во многом зависят от частоты модуляций. Также было показано, что модулированное электромагнитное или ультразвуковое (УЗ) воздействие на некоторых частотах модуляции могут вызывать изменение ферментативной активности как в сторону активирования, так и ингибирования [3–5]. Нами на модельном объекте – клетках бактериальной культуры *Alivibrio fischeri* – был найден оптимальный режим и закономерности химико-биологического и физического воздействия при использовании по отдельности и комбинированно для стимуляции пролиферации светящихся бактерий [6]. Увеличение люминесценции после воз-

действия УЗ с интенсивностью 0,4 Вт/см² составило 35–45% по сравнению с контролем. Проведенные исследования показали, что применение УЗ оптимальной интенсивности в сочетании с цитостатиками вызывало резкое сокращение числа жизнеспособных клеток, уменьшение интенсивности свечения, углубляло супрессорное действие антибактериальных препаратов на клетку, замедляя ее рост, что в итоге позволяло снижать дозу внесенного лекарственного вещества, не только не ослабляя эффекта, а наоборот, усиливая его, вызывая торможение процессов метаболизма и клеточного деления.

Стимулирующий эффект непрерывного воздействия УЗ с частотой 880 кГц при обработке клеточной линии MDBK [7] был установлен в диапазоне интенсивности 0,03–0,05 Вт/см², при экспозиции 5–30 с. Прирост клеточной массы составил 65–130% по сравнению с контролем в зависимости от продолжительности экспозиции. Максимальный стимулирующий эффект наблюдали при интенсивности УЗ-воздействия 0,05 Вт/см² и экспозиции 10 с. Более высокая интенсивность облучения (0,1 Вт/см²) приводила к существенному снижению роста клеток, а

Сокращения: УЗ – ультразвук, ЦПМ – цитоплазматическая мембрана.

при воздействии УЗ с интенсивностью $0,2 \text{ Вт/см}^2$ наблюдалась их полная деструкция.

Кроме того, нами было доказано [8,9] повышение проницаемости мембран клеток различной этиологии под влиянием УЗ: по уменьшению в десятки раз концентраций экзогенных веществ – лекарственных препаратов циклофосфана и доксорубина, подавляющих интенсивность люминесценции фотобактерий; в сотни раз – количества экзогенных мутагенов, необходимых для увеличения пролиферативной активности MDBK, а также по увеличению выхода эндогенного продукта (интерферона). Полученный эффект увеличения проницаемости мембран, по нашему мнению, является одним из основных в понимании действия УЗ на клетки *in vitro* и *in vivo*. Биохимическая и клиническая полноценность дополнительно полученных с помощью УЗ препаратов показывает отсутствие разрушительного, денатурирующего действия применяемых интенсивностей [10,11]. В литературе есть сведения о том, что культуры клеток HeLa, облученные УЗ низких интенсивностей, давали большее число колоний по сравнению с интактными клетками [12]; ряд авторов определил также нелинейные эффекты изменения активности некоторых ферментов животных при воздействии модулированных микро-волн [4].

В исследованиях на мозге золотых рыбок выявлены эффективные частоты модуляции, активирующие и подавляющие активность нейронов [13] после действия амплитудно-модулированных УЗ-волн терапевтического диапазона интенсивностей. Была убедительно доказана видовая специфичность повреждения эмбрионов амфибий при повторении импульсов УЗ различного диапазона (10–20 Гц для *R. temporaria* и 110–130 Гц для *Xenopus laevis*) [1]. Все выявленные особенности могут быть связаны с параметрическими резонансными воздействиями модулирующих частот на процессы жизнедеятельности. Поэтому необходимо проведение исследований по поиску ключевых систем, отвечающих на модулированное ультразвуковое воздействие частотно-зависимым образом. Это позволило бы достаточно жестко управлять функциональным состоянием биосистем и направленно менять величину и знак биологического эффекта.

Ранее нами было изучено действие на биосистемы непрерывного УЗ с частотой 880 кГц; установлено, что воздействие УЗ интенсивностью $0,05 \text{ Вт/см}^2$ в течение 5–30 с не влияет на лейкограмму и жизнеспособность клеток крови здоровых животных. Динамика гематологических и цитоморфологических изменений у боль-

ных животных при увеличении экспозиции может являться диагностическим критерием выявления ранних стадий или латентных заболеваний [14,15]. В ходе дальнейших исследований проведено сравнение особенностей морфологии всех видов клеток крови разных животных в ультразвуковом поле, выявлены диапазоны частот модуляции, направленно влияющих на различные клеточные структуры и вызывающих необратимые изменения. Ниже будет приведен качественный анализ ряда выявленных цитоморфологических особенностей, которые, на наш взгляд, наиболее ярко отражают процессы, происходящие в клетках крови при УЗ-воздействии. Ранее мы сообщали о ряде найденных изменений в клетках тканей животного происхождения, инициируемых непрерывным и модулированным УЗ [16,17]. В данной статье мы продолжаем их описание, приводя новые режимы воздействия и фиксируя поведение и изменения клеток, не описанные ранее. (Предварительно материал, послуживший основой для статьи, был представлен на V съезде биофизиков России (Ростов-на-Дону, 4–10 октября 2015 г.) [18].) Остановимся на тех из них, которые выявлены с помощью оптической микроскопии мазков крови. Эти данные не были бы получены при анализе только изменений в лейкограммах (наиболее удобный и распространенный вид лабораторной диагностики в клиниках).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на кафедре биофизики и физики Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии К.И. Скрябина (после реорганизации – кафедра информационных технологий, математики и физики). Кровь забирали в ветеринарном центре «МедВет» (Москва) во время ежегодного контроля здоровья. Отбор производили из большой подкожной вены задней лапы и подкожной вены предплечья у кошек и собак и из яремной вены лошадей натошак в утренние часы. Ультразвуковой обработке подвергали только кровь здоровых животных. Группы животных разных пород, пола и возраста: собаки ($n = 10$), кошки ($n = 12$), верховые лошади ($n = 10$). Образцы крови объемом от 1,0 до 1,5 мл озвучивали в абсолютно одинаковых условиях по методу авторов [14]. Использовали бегущую УЗ-волну в непрерывном или импульсном режиме, а также режим модуляции. Контролем служили интактные клетки тех же животных. В качестве источников УЗ применяли аппараты для ультразвуковой терапии УЗТ–1–01 Ф; УЗТ–

1.02 С и УЗТ–3.06 (частоты генерации 0,88 и 2,64 МГц). В качестве модулирующего генератора был использован аппарат ГЗ-112. Интенсивность УЗ варьировала от 0,05 до 1,0 Вт/см², ее контроль осуществляли с помощью дифференциальной термопары, калиброванной по интенсивности. Интенсивность УЗ, прошедшего в ткань *in vitro*, составляла 90% от номинальной интенсивности. Воздействие амплитудно-модулированными волнами проводили при скважности, равной 2, независимо от частоты модуляции, обеспечивая тем самым равноэнергетическое воздействие на биологические объекты за равные промежутки времени. Обработку образцов крови проводили в специальной термостатируемой кювете при температуре 20°C (термостат У–7с). Изучали действие модулированного УЗ в широком диапазоне частот модуляции (10–1000 Гц). Длительность воздействия изменяли в разных сериях от 5 с до 5 мин. Для каждого эксперимента с фиксированными и абсолютно идентичными условиями облучения проводили 15–18 повторов. Облучение крови всех видов животных осуществляли в одинаковом режиме с целью получить сопоставимые результаты. О действии УЗ на клетки крови судили по количественным и качественным изменениям. Делали мазки, окрашивали по методу быстрого дифференциального окрашивания биопрепаратов набором «Диахим-Диффквик» («Абрис+», Россия) и определяли лейкограмму стандартным методом [14]. Результат воздействия наблюдали в световом микроскопе «Микмед-5» (режим иммерсии, объектив 100×/1,25, окуляр 10×/18). Статистическую обработку данных осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 6.0. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Действие непрерывного ультразвукового облучения на клетки крови животных. Ниже будут приведены некоторые параметры режимов облучения, краткие результаты и характерные особенности реакции клеток крови, присущие конкретным животным. У животных других видов при означенных режимах и указанной экспозиции подобные изменения не регистрировали.

Кошка. 0,7 Вт/см², 15 с – начало агрегации лимфоцитов; 45 с – начало агрегации тромбоцитов и сегментоядерных нейтрофилов.

Собака. 0,05 Вт/см², 45 с – лейкограмма без особенностей (у кошки при данном режиме УЗ-воздействия – сдвиг влево). Деформация клеток, у 5% лейкоцитов начало лизиса цитоплаз-

матической мембраны (ЦПМ). 0,4 Вт/см², 30 с – начало агрегации гранулоцитов.

Лошадь. 0,05 Вт/см², 45–75 с – лейкограмма без особенностей, но от 5% (при времени обработки 45 с) до 20% (время обработки 60 с) лейкоцитов имеют измененную или лизированную ЦПМ. После 75 с облучения – в мазке лейкопения. 0,2 Вт/см², 15–45 с – лейкограмма без особенностей, но происходит изменение объема цитоплазмы лимфоцитов по сравнению с контролем. 0,2 Вт/см², 90 с – у 20% сегментоядерных нейтрофилов и эозинофилов наблюдается лизис ЦПМ. Остальные виды лейкоцитов без особенностей. Изменения лейкограмм в пределах референсного ряда. 0,4 Вт/см², 30 с (рис. 1г) – лейкограмма без особенностей. Начало разрушения лейкоцитов. После 45 с – изменения в ядрах лимфоцитов и объема их цитоплазмы. 1,0 Вт/см², 40 с – агрегация тромбоцитов, лизис лейкоцитов (рис. 1г). 60 с – тромбоциты в огромных группах. Сохранились только лимфоциты, но 90% из них без цитоплазмы. Других лейкоцитов в мазке нет. Только в крови лошади (рис. 2е) под действием непрерывного УЗ регистрировали изменения эритроцитов. Так, после облучения при интенсивности 1,0 Вт/см² и времени более 30 с обнаружены включения в клетки, агрегация. При этом происходили дегенеративные изменения лейкоцитов.

С ростом экспозиции в лейкограммах всех животных увеличивалось абсолютное и относительное количество агранулоцитов на фоне общего лейкоцитарного сдвига влево (в сторону более молодых форм клеток). В отдельных исследованиях с лейкомассой авторами ранее было показано, что число агломератов лейкоцитов, образовавшихся за 5 мин воздействия непрерывным УЗ, увеличивалось с возрастанием интенсивности УЗ [19,20]. В экспериментах с животными, так же как и при озвучивании лейкомассы, в образцах крови кошек, собак и лошадей всех возрастов с увеличением УЗ-экспозиции наблюдали дозозависимый эффект точной агрегации. При низкой интенсивности облучения (0,01–0,1 Вт/см²) обнаруживали по четыре–восемь клеток в ассоциациях. При более высоких дозах УЗ наблюдали скопление из множества клеток, вплоть до сгустков. Под действием стоячих волн при интенсивности облучения 0,05–0,4 Вт/см² из лейкоцитов выходил практически важный метаболит интерферон [11,21]. Подавление свечения бактерий вызывало действие УЗ с интенсивностью выше 0,7 Вт/см², а роста культуры клеток MDBK – 0,2 Вт/см². Результаты воздействия могут свидетельствовать о направлении влияния ультра-

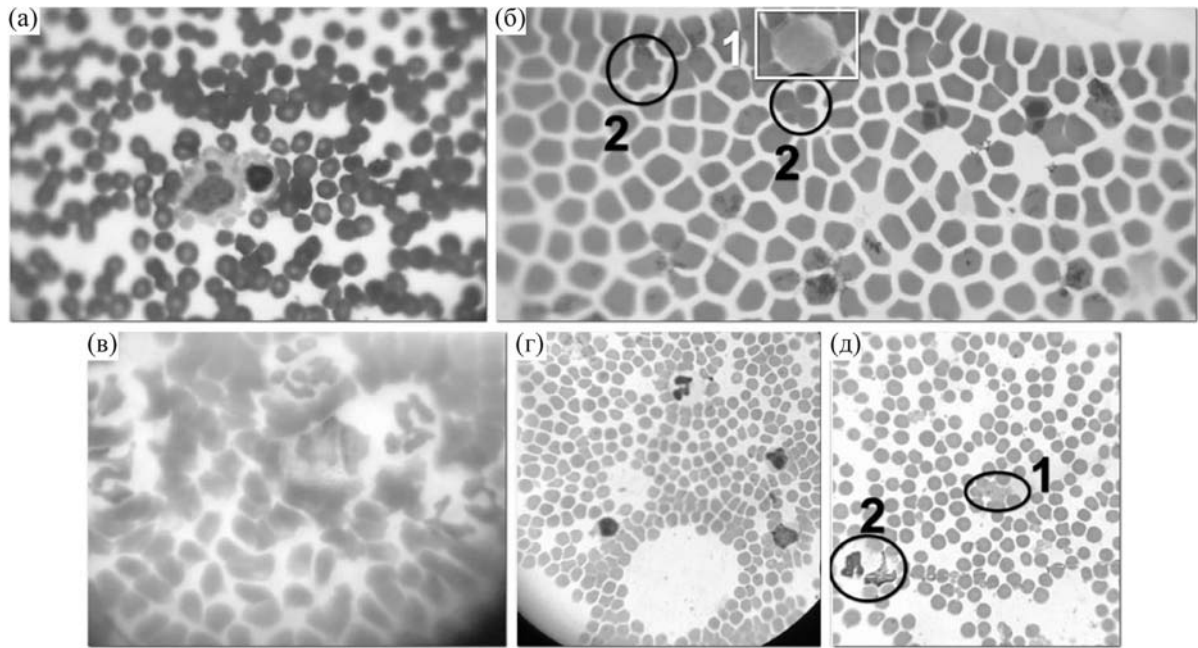


Рис. 1. Микрофотографии мазков крови лошади. Лейкоциты, режимы обработки: непрерывный и модуляция. (а) – 0,2 Вт/см², модуляция 25 Гц, 40 с. Агрегация; дегенеративные изменения лейкоцитов. (б) – 0,05 Вт/см², модуляция 90 Гц, 45 с. 1 – Лизис лимфоцита, 2 – «гантели» эритроцитов. Справа и в нижней части: клеточные включения. (в) – 0,05 Вт/см², модуляция 10 Гц, 45 с. Агрегация и дегенеративные изменения лейкоцитов. (г) – 0,4 Вт/см², непрерывный ультразвук, 30 с. Сегментоядерный нейтрофил (вверху) и три лимфоцита с признаками клеточного лизиса и деструкции. (д) – 1,0 Вт/см², непрерывный ультразвук, 40 с. 1 – Группа тромбоцитов, 2 – лизированные лейкоциты.

звука на ЦПМ. Отличие в выявленных диапазонах, спектрах и длительностях воздействия для достижения одинаковых эффектов в бактериальных и животных клетках обусловлено, по нашему мнению, структурой, составом и разной толщиной ЦПМ.

Действие модулированного ультразвукового облучения на клетки крови животных.

1. Тромбоциты. Выявлены диапазоны интенсивностей и частот модуляции, после обработки которыми все клетки крови, включая тромбоциты, прокрашивались одинаково качественно: частота 2,64 МГц, импульсный режим, I_{SATA} 0,05–0,7 Вт/см²; частота 880 кГц, диапазон частот модуляции 10–40 Гц и 800 Гц, интенсивность 0,05–0,7 Вт/см² (рис. 3в). Длительность воздействия составляла 12–17 с ($p < 0,05$). Это даст возможность разработать метод дифференциальной окраски всех форменных элементов одновременно одним стандартным набором красителей. Диапазоны частот и интенсивностей, действующих направленно на тромбоциты: 0,05 Вт/см² вблизи частот 150 Гц и 80 Гц, время от 15 с (для кошки); 0,05 Вт/см², 10 Гц, время облучения от 15 с и 0,4 Вт/см², 70–80 Гц, 30 с (для собаки).

2. Эритроциты. Наблюдается изменение формы – вытягивание клеток с постепенным образованием утолщений на противоположных концах и последующим наложением двух клеток крест-накрест подобно сложенным гантелям («гантели») – анизоцитоз. Формируются симметричные группы вокруг клетки и цепочки эритроцитов без признаков разрушения или цитолиза, тогда как лейкоциты уже модифицированы. Возможно появление теней клеток.

Ниже приводятся основные видовые особенности диапазона и спектров активных частот по разным группам экспериментальных животных.

Кошка. 0,7 Вт/см², 800 Гц, 10 Гц, 30–45 с. Начало изменения формы эритроцитов, их вытягивание и образование «гантелей». Одновременно регистрируются глубокие дегенеративные изменения лейкоцитов – «вспенивание» цитоплазмы и лизис ядер (рис. 4а).

0,7 Вт/см², 800 Гц, 30–45 с. Лейкоциты лизированы, а эритроциты «съезжены», также присутствуют тени эритроцитов (рис. 4в).

0,4 Вт/см², 800 Гц, 30–45 с. Такое количество «гантелей» в мазке не зарегистрировано больше ни при одной экспозиции (также и у других животных). В поле зрения микроскопа можно

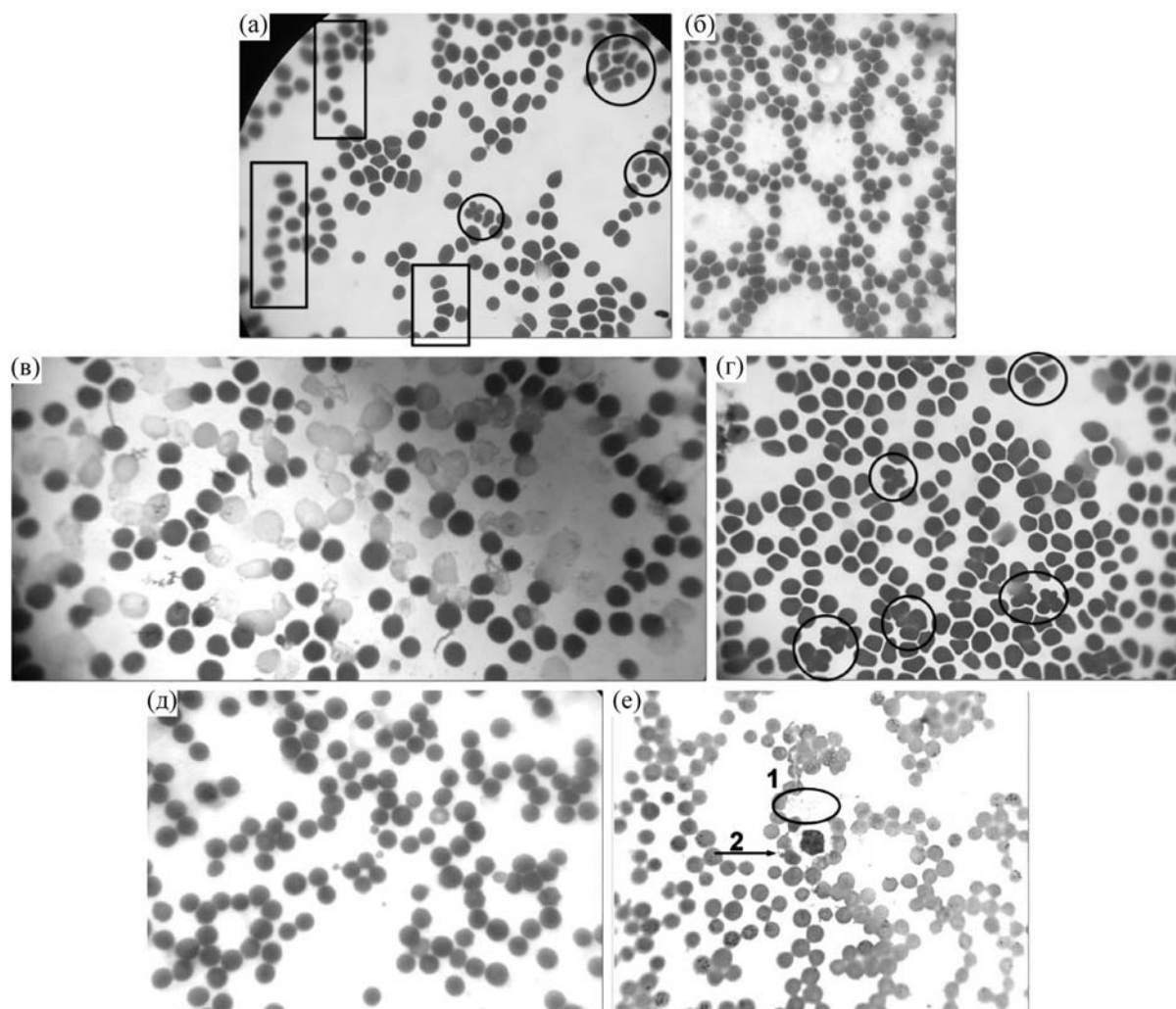


Рис. 2. Микрофотографии мазков крови лошади. Эритроциты. (а) – $0,2 \text{ Вт/см}^2$, модуляция 200 Гц, 45 с. Обведено в кружок – «гантели» и другие деформации эритроцитов, обведено прямоугольниками – относительно прямолинейные цепочки клеток. (б) – $0,4 \text{ Вт/см}^2$, модуляция 10 Гц, 30 с. Множество самопроизвольных построений в поле зрения: «соты» из эритроцитов, цепочки клеток и другие фигуры. (в) – $0,05 \text{ Вт/см}^2$, модуляция 500 Гц, 45 с. Тени эритроцитов (ср. с рис. 1е). (г) – $0,05 \text{ Вт/см}^2$, модуляция 100 Гц, 60 с. «Гантели» (пять объектов в поле зрения) и этапы их образования. (д) – $0,7 \text{ Вт/см}^2$, модуляция 100 Гц, 45 с. Цепочки, «соты». (е) – $1,0 \text{ Вт/см}^2$, непрерывный ультразвук, 30 с. Многочисленные включения в эритроциты (черные точки, не являющиеся паразитами либо дефектами съемки), агрегации. 1 – Тромбоциты, 2 – лимфоцит в окружении эритроцитов.

наблюдать одновременно все стадии образования «гантелей» – вытягивание и деформацию клеток, их сближение и наложение крест-накрест (рис. 4б,г,д). Появляются клеточные включения. Согласно заключению диагностической лаборатории, это не внутриклеточные паразиты и не артефакты. Природа подобных включений в эритроциты пока не выявлена.

0,4 Вт/см² 30 Гц 45–60 с. В мазках наблюдаются «тени» и цепочки неизменных эритроцитов на фоне лизиса и дегенеративных изменений лейкоцитов (рис. 4е, 5в).

Мы намеренно уходим от терминологического описания до тех пор, пока не будем

полностью уверены в природе и закономерностях выявленных цитологических изменений. Использование образного языка литературных сравнений на данном этапе видится более целесообразным.

Собака. Основные диапазоны частот управления состоянием: интенсивность облучения $0,2\text{--}0,7 \text{ Вт/см}^2$, частоты вблизи 10–20 Гц, время 15–50 с. Результаты воздействия рассмотрим на примере экспозиции, равной $0,2 \text{ Вт/см}^2$, при амплитудная модуляция 10 Гц и времени 15 с. Микрофотографии наглядно показывают все происходящие с клетками изменения (рис. 6а–е): образование «гантелей», формирование причуд-

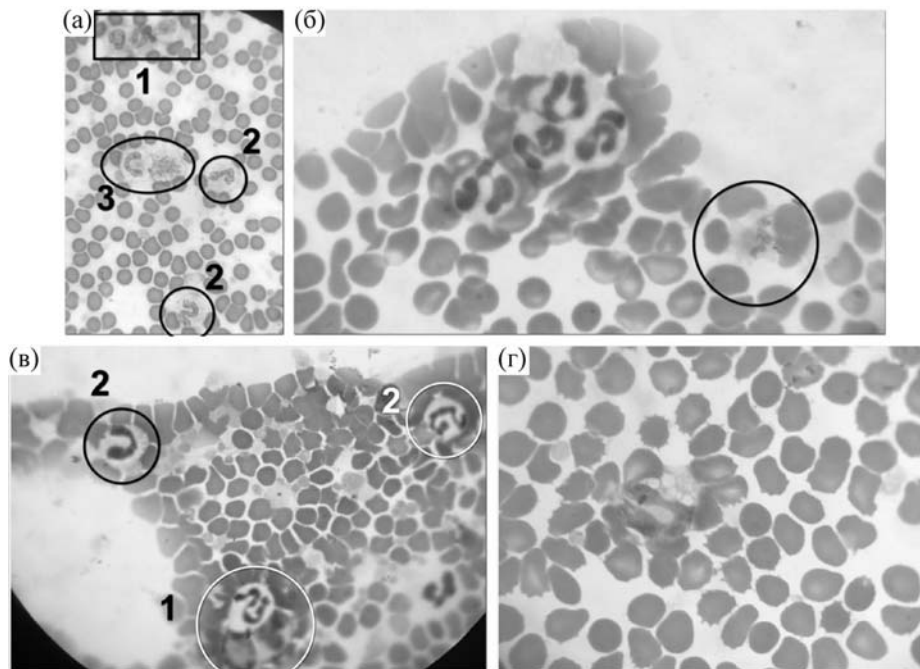


Рис. 3. Микрофотографии мазков крови собаки. Лейкоциты. (а) – 0,4 Вт/см², модуляция 10 Гц, 30 с. 1 – Агрегация лейкоцитов, 2 – разрыхление ядер нейтрофилов, 3 – слева разрыхление ядра, справа – готовое к взрыву ядро. (б) – 0,4 Вт/см², модуляция 70 Гц, 30 с. Агрегация нейтрофилов. Обведено кружком: лизис. (в) – 0,7 Вт/см², модуляция 40 Гц, 15 с. Хорошо прокрашенные тромбоциты. Агрегация лейкоцитов и тромбоцитов. 1 – Лизис агранулоцитов; 2 – разрыхление ядер, вспенивание цитоплазмы гранулоцитов. (г) – 0,7 Вт/см², модуляция 200 Гц, 15 с. Вакуолизация цитоплазмы и разрыхление ядра палочкоядерного (?) нейтрофила. Наблюдается неестественная «колючая» форма эритроцитов.

ливых агрегатов («цветков»), цепочек, «сот» и сложных геометрических фигур из лейкоцитов и эритроцитов. Клеточные «узоры» располагались на значительном расстоянии друг от друга, т.е. в поле зрения при микроскопии мазков появлялось пустое пространство, свободное от клеток крови. По мере роста количества эритроцитов в агломерате симметрия в соединении клеток между собой пропадала, образование принимало неправильную вытянутую форму. При этом у многих лейкоцитов была вспенена цитоплазма и разрушено ядро, а в эритроцитах появлялись клеточные включения. Показаны препараты из образцов крови разных животных. У разных особей могли наблюдаться разные эффекты, но экспозиция, диапазоны интенсивности и частот, их вызывающие, были одинаковы. Возможно, тип морфологических изменений зависит и от индивидуальных особенностей крови.

Лошадь. Диапазоны активных частот и интенсивностей (рис. 2а–д): 0,2 Вт/см², 10 Гц, 50 с (включения в эритроциты); 0,05–0,2 Вт/см², 200 Гц, 45–50 с («гантели» и «соты»); 0,05 Вт/см², 100 Гц, 60 с (максимальное количество «гантелей» в мазках, геометрические фигуры, в самих эритроцитах изменений нет);

0,05 Вт/см², 500 Гц, 45 с (тени клеток); 0,05 Вт/см², 90 Гц, 45–50 с.

Впервые изменение формы клеток после двухминутного УЗ-воздействия интенсивностью 1,0 Вт/см², появление цитоплазматических отростков и небольшая грануляция цитоплазмы были зарегистрированы экспериментально в 1977 г. на культуре клеток HeLa [22]. После увеличения времени обработки до 5 мин на отростках ЦПМ возникали булавовидные утолщения.

3. Лейкоциты. Изменение лейкограмм при равноэнергетическом воздействии зависело от вида и лейкоцитов, и животного (рис. 1, 3, 5, 7). Это, по-видимому, связано с размерами и строением клетки и ее ЦПМ. С определенной долей осторожности можно отметить ряд общих особенностей (таблица). Лейкоциты начинают реагировать значительно раньше эритроцитов, спустя 15–20 с от начала озвучивания на активных частотах. Действие на гранулоциты, ведущее к изменению ЦПМ, а затем клетки в целом, начинается раньше, чем на агранулоциты (рис. 5д). В малых лимфоцитах, наиболее молодых, дегенеративные изменения начинались значительно позже, чем в больших – через 60–90 с. При времени облучения выше 30 с

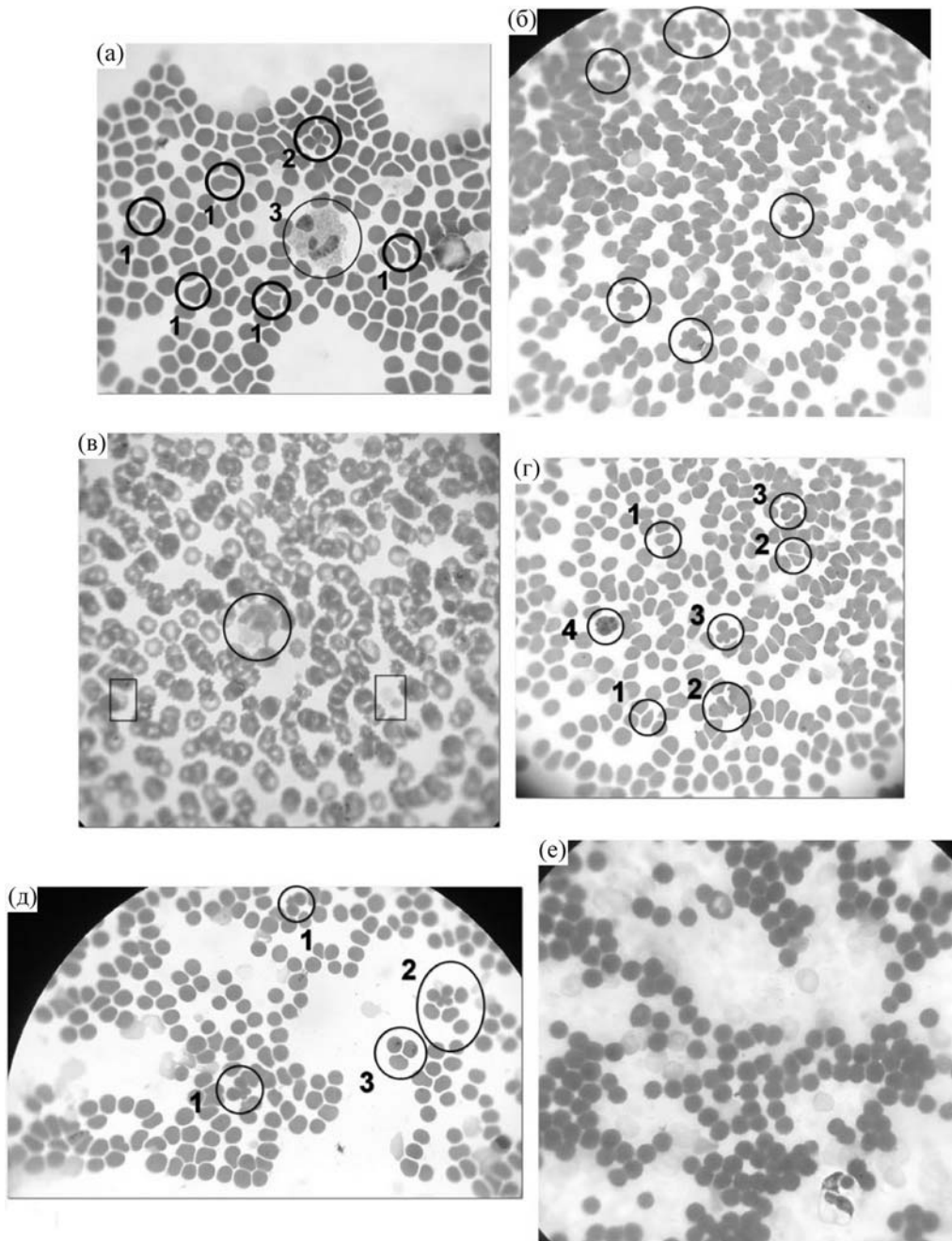


Рис. 4. Микрофотографии мазков крови кошки. Эритроциты. (а) – 0,7 Вт/см², модуляция 10 Гц, 45 с. 1 – Начало изменения формы эритроцитов; 2 – наложение эритроцитов подобно «сложенным гантелям»; 3 – «вспенивание» цитоплазмы эритроцитов, лизис ядер лейкоцитов (см. также правее 1). (б) – 0,4 Вт/см², модуляция 800 Гц, 45 с. «Гантели». (в) – 0,7 Вт/см², модуляция 800 Гц, 30 с. «Съезживание» эритроцитов, лизис лейкоцита (обведено кружком), образование теней эритроцитов (обведено прямоугольниками). (г) – 0,4 Вт/см², модуляция 800 Гц, 45 с. 1–3 – Последовательные стадии образования «гантелей»; 4 – необратимые изменения в лимфоците. (д) – 0,4 Вт/см², модуляция 800 Гц, 45 с. 1 – «Гантели»; 2 – «цветок на ножке»; 3 – включения в эритроциты (черные точки), также в кадре видны «тени» эритроцитов (выше и ниже поз. 3; левее обеих позиций 1). (е) – 0,4 Вт/см², модуляция 30 Гц, 60 с. Многочисленные тени эритроцитов; эритроциты, выстраивающиеся в длинные цепочки, уходящие за границу поля зрения.

из-за резкого изменения морфологии и деформации клеток затруднено их распознавание, при этом ~10% типизируемых клеток имели разрушенную ЦПМ. В зависимости от экспозиции у всех

видов животных происходят одинаковые эффекты: лейкопения, цитоллиз, деструкция и агрегация клеток, вспенивание цитоплазмы гранулоцитов, разрыв ЦПМ и взрыв ядер, их де-

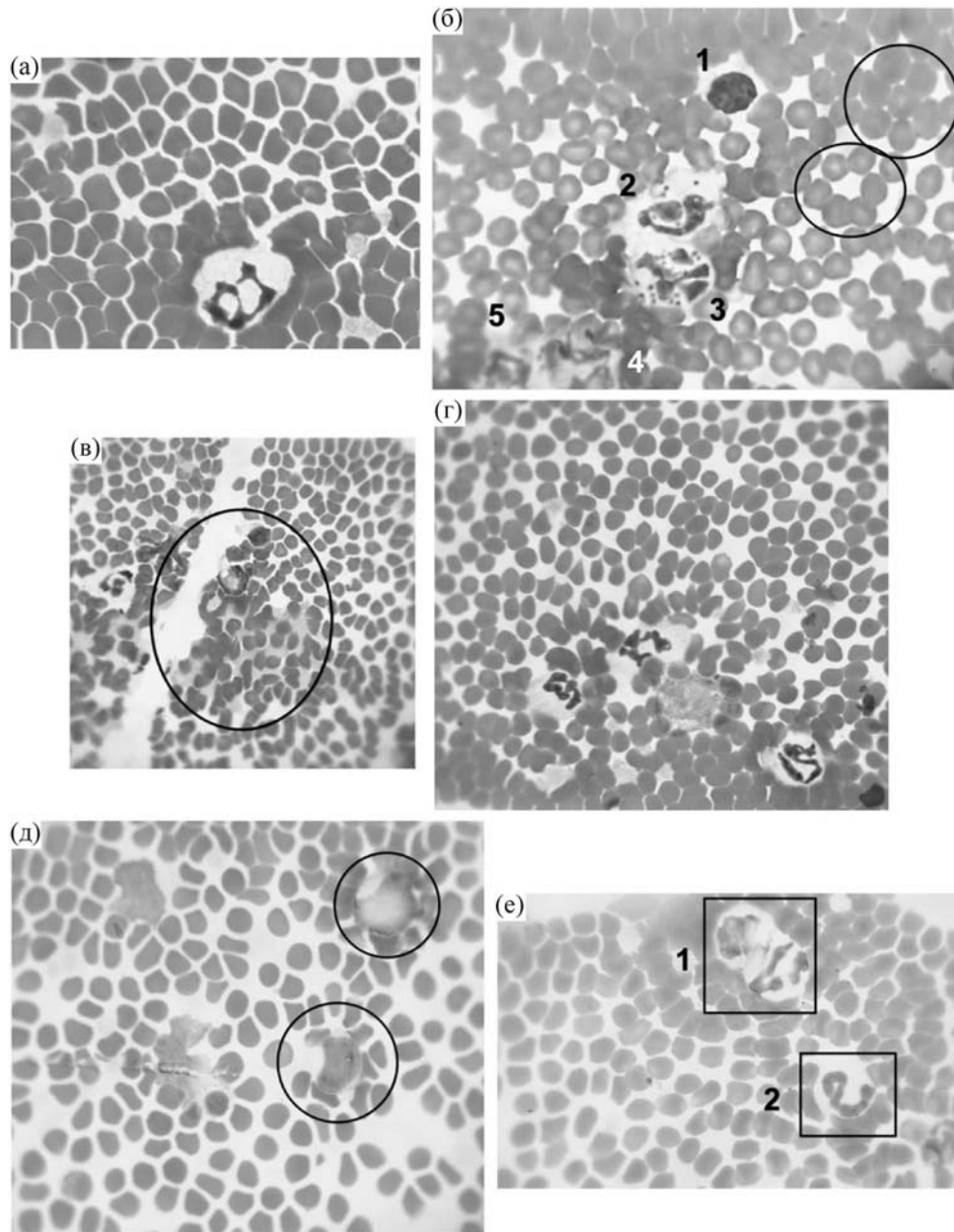


Рис. 5. Микрофотографии мазков крови кошки. Лейкоциты. (а) – 0,7 Вт/см², модуляция 10 Гц, 15 с. В нижней части – сегментоядерный нейтрофил в окружении эритроцитов. Агрегация, «вспенивание» цитоплазмы, разрыхление ядра. (б) – 0,4 Вт/см², модуляция 30 Гц, 45 с. Цитоплазматические включения в нейтрофилах; агрегация. 1–5 –Постадийное разрушение ядер лейкоцитов, в том числе 4, 5 – разрыв ядер (обведены кружками правильные фигуры из эритроцитов). (в) – 0,4 Вт/см², модуляция 30 Гц, 60 с. Дегенеративные изменения лейкоцитов: обширный выход цитоплазмы, разрыв ядер. (г) – 0,4 Вт/см², модуляция 800 Гц, 45 с. Дегенеративные изменения ядер нейтрофилов, излившаяся цитоплазма. (д) – 0,7 Вт/см², модуляция 30 Гц, 30 с. Дегенеративные изменения разных видов лейкоцитов. Начало лизиса ЦПМ. Горизонтальный артефакт слева-посередине – дефект съемки, не относящийся к исследуемому образцу. (е) – 0,7 Вт/см², модуляция 30 Гц, 45 с. Видны дегенеративные изменения. 1 – Клетка, в связи с изменениями не подлежащая идентификации, в процессе агрегации с сегментоядерным нейтрофилом; 2 – палочкоядерный нейтрофил.

формация, вплоть до нарушения границ (рис. 1, 3, 5, 7). При работе с клеточной линией MDBK (стоячая УЗ-волна, непрерывный режим) мы уже регистрировали аналогичные морфологические изменения в клетках. С ростом времени

экспозиции и увеличением интенсивности УЗ в культуре клеток уменьшалось число неповрежденных клеток, росло количество обрывков клеток в среде, изменялась морфология клеток: сильное уменьшение в размере, появление от-

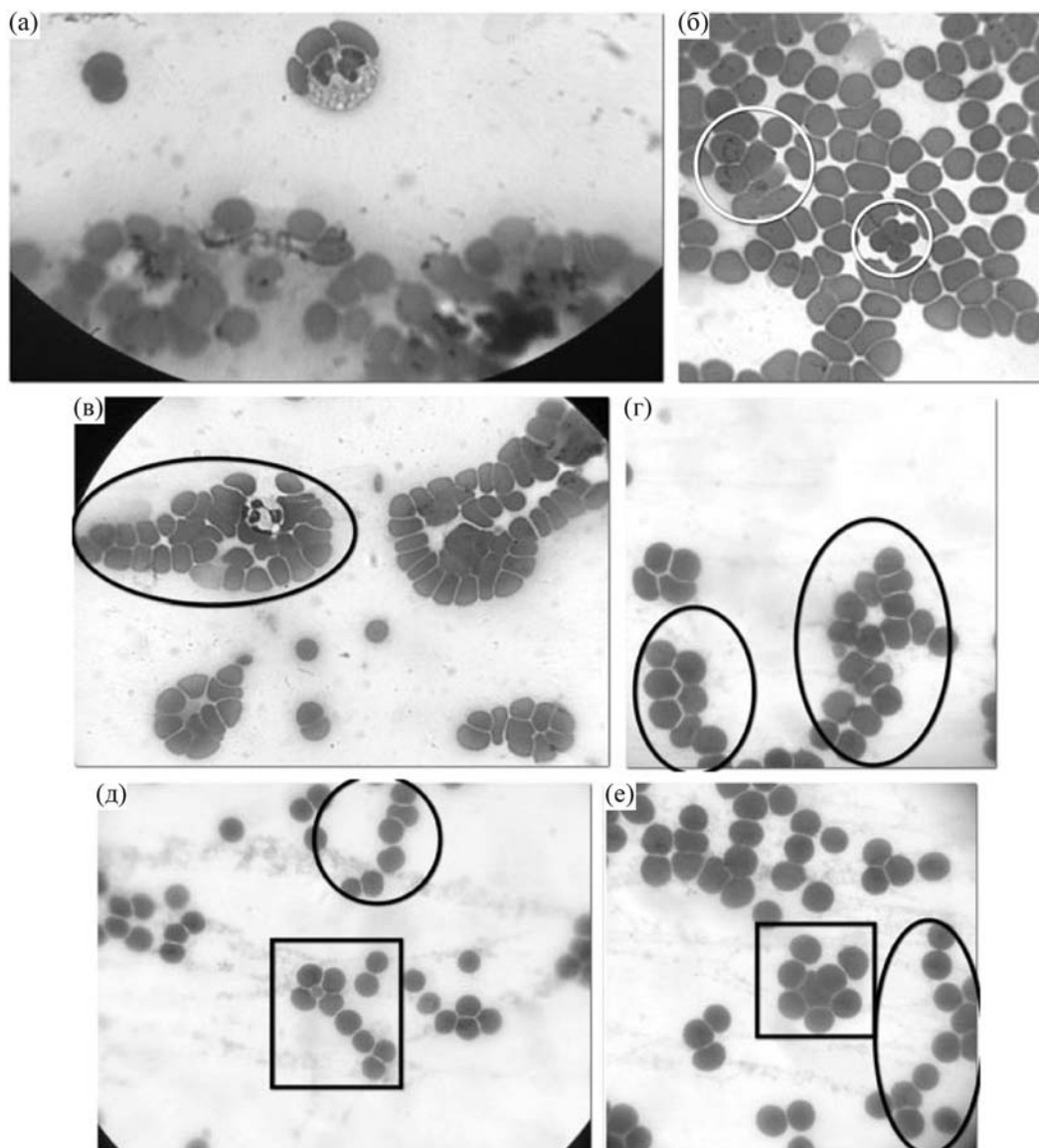


Рис. 6. Микрофотографии мазков крови собаки. Эритроциты. (а) – $0,2 \text{ Вт/см}^2$, модуляция 10 Гц, 15 с. Вверху: разрушение ядра, вспенивание цитоплазмы. Цитоплазматические включения. Агрегация лейкоцита и эритроцита. (б) Тот же режим. Обведено: «гантели» на разных этапах формирования. Заметны включения в цитоплазму. (в) Тот же режим. Картина разительно отличается от предыдущих. Включения в цитоплазму; сильная агрегация клеток крови, в том числе разнородных (обведено). (г) – (е) – $0,7 \text{ Вт/см}^2$, модуляция 30 Гц, 10 с. Образование в ультразвуковом поле сложных геометрических фигур, цепочек, узоров. Обведено: эллипсами – цепочки из эритроцитов, прямоугольниками – «цветки» из клеток.

ростков ЦПМ, разрыхление цитоплазмы, разрыв клеточной оболочки, ядер и митохондрий, а также полная дегенерация клеток [7].

На микрофотографиях, представленных на рис. 5, отражены основные изменения в лейкоцитах кошки. Видно, что эритроциты сохраняли целостность при экспозициях УЗ, разрушающих лейкоциты (так же, как у собак и лошадей (рис. 1, 3, 7)). Например, при облучении в режиме $0,4 \text{ Вт/см}^2$, 30 Гц, 45 с (рис. 5б) или $0,7 \text{ Вт/см}^2$, модуляция 10 Гц, 45 с (рис. 4а) шло

разрушение ядер лейкоцитов, а эритроциты без видимых повреждений начинали перестраиваться в виде геометрических фигур («цветков» и окружность). Во многих случаях цитологические изменения столь значительны (рис. 1а), что было сложно идентифицировать клетки. В одной пробе могли находиться лейкоциты разной степени разрушения или деструкции, что связано с достаточно неоднородным распределением интенсивностей в ультразвуковом поле [23]. Необходимо отдельно отметить режим

Основные направления воздействия модулированного УЗ на разные виды лейкоцитов животных *in vitro*

Интенсивность $I_{УЗ}$, Вт/см ²	Частота модуляции, Гц	Время, с	Эффект
Кошка			
0,05	80	15	Агрегация тромбоцитов. Лизис ЦПМ у сегментоядерных нейтрофилов и моноцитов
	150		Ядра лимфоцитов неровные. Агрегация тромбоцитов. «Каша» из клеток; общий гемолиз
	800	30	Лейкограмма б/о, после 45 с разрушено 50% лимфоцитов, др. клетки б/о. После 60 с ядра «вытекают» из всех клеток
Кошка, собака			
0,4	30	15	Лизис нейтрофилов. Изменение лимфоцитов
	800	15	Лейкопения, лизис ядер. Лимфоцитоз
Собака			
0,05	10	15	Тромбоциты в группах. До 40 с других изменений нет
	300	15	У 10% лейкоцитов с лизис ЦПМ, вакуолизация цитоплазмы
	600	60	В мазке лимфоциты, преобладают мелкие. Фрагменты ядер других лейкоцитов. «Тени» клеток крови (только здесь!), общий розовый фон мазков вместо бесцветного
0,4	10–20	15	Избирательное действие на ядра гранулоцитов
	25	50	Начало вакуолизации цитоплазмы
	50 и 100	15	Взрыв ядер лейкоцитов
	70	30	Тромбоциты в группах, других изменений нет
	80	30	Лизис ЦПМ тромбоцитов
0,2	10	45	Деформация ядер, разрыв ЦПМ
Лошадь			
0,05	800	20	Разрыв ядер и ЦПМ, клетки невозможно идентифицировать
0,2	10	25–40	Лейкопения. Эритроциты и тромбоциты б/о
0,4	10–30	30–45	Разрыв ядер и ЦПМ лейкоцитов, фигуры из эритроцитов, анизоцитоз
	60	20	Деформация ядер гранулоцитов
	70–80	20–60	Действие на лимфоциты: деформ. и разрушение ядер и ЦПМ
	100	60	Нейтрофилы все изменены: деформация и разрушение ядер и ЦПМ. Лимфоциты б/о
	300; 600	20–40	Только лимфоциты, др. разрушены
0,7	900	40	Разрушение ядер лейкоцитов
	10	20	50% лимфоцитов деформировано или разрушено
	50	40	Деформация ЦПМ и ядра
1,0	10	15	30% лимфоцитов деформированы; лейкограмма б/о

обработки, который вызывал изменения только в базофилах (0,05 Вт/см², 40 Гц, 15 с). Клеток этого вида в крови очень мало, у собак их нет вообще, поэтому статистическую обработку результатов в этом случае проводить сложно, но после такого облучения зернистость базофилов становилась ярче, крупнее и контрастнее. Другая экспозиция – 0,05 Вт/см², 80 Гц, 15–20 с –

направленно действовала на моноциты и тромбоциты.

Диапазоны частот и интенсивностей, действующих на лимфоциты: 0,05 Вт/см², вблизи частоты 150 Гц, время от 15 с и 800 Гц, 30 с (для кошки); 0,4 Вт/см², вблизи частот 70–80 Гц, время от 20 с, а также 0,7–1,0 Вт/см², модуляция 10 Гц (для лошади).

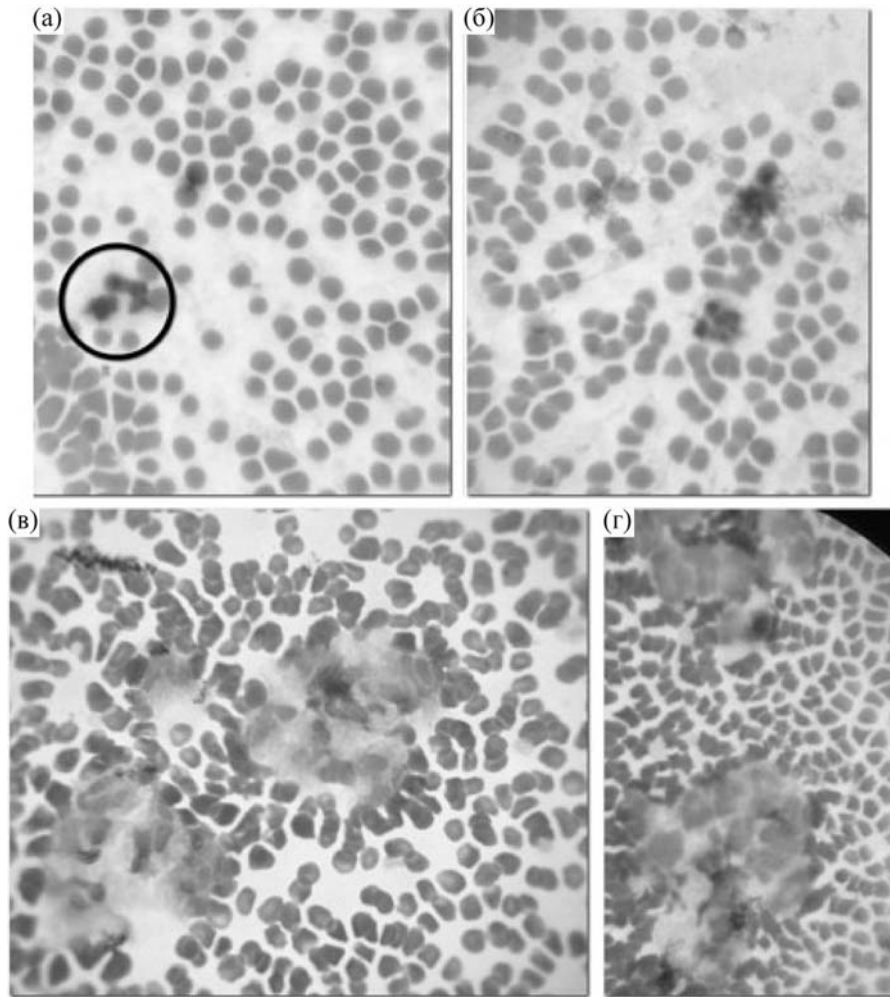


Рис. 7. Микрофотографии мазков крови лошади. Лейкоциты. (а) – 0,2 Вт/см², модуляция 10 Гц, 40 с. Обведено кружком: лизис лейкоцитов. Выше, между эритроцитами – дефект съёмки. (б) – 0,2 Вт/см², модуляция 20 Гц, 90 с. Разрыхление и разрыв ядер лейкоцитов. (в) – 0,05 Вт/см², модуляция 14 Гц, 45 с. Агрегация и деструкция нейтрофилов. (г) – 0,05 Вт/см², модуляция 500 Гц, 30 с. Агрегация и лизис лейкоцитов.

Частоты и интенсивности, действующие на нейтрофилы: 0,05 Вт/см², вблизи 80 Гц (для кошки); 0,4 Вт/см², 30 Гц (для кошки и собаки); 0,4 Вт/см², 100 Гц (для лошади).

Диапазоны частот и интенсивностей УЗ-облучения, изменяющих ядра лейкоцитов. Общие диапазоны: для кошки и лошади – 0,05 Вт/см², вблизи частоты 800 Гц; для собаки и лошади – 0,4 Вт/см², вблизи частот 10–30 Гц, 50–60 Гц и 100 Гц. Индивидуальные диапазоны: 0,4 Вт/см², вблизи частоты 800 Гц (для кошки), 0,2 Вт/см², модуляция 10 Гц (для собаки) и 0,7 Вт/см², 50 Гц (для лошади).

Диапазоны частот и интенсивностей УЗ-облучения, изменяющих ЦПМ: 0,05 Вт/см² вблизи частот 80 Гц (для кошки), 300 Гц (для собаки) и 800 Гц (для лошади); а также 0,2 Вт/см², 10 Гц для собак; 0,4 Вт/см² в частотных диа-

пазонах 10–30, 70–80 и 100 Гц; 0,7 Вт/см², 50 Гц – для лошади.

Для биологических жидкостей при частоте УЗ 1 МГц толщина пограничного слоя у поверхности препятствий, помещенных в ультразвуковое поле, составляет примерно 4 мкм, что значительно меньше длины волны ($\lambda = 1,5$ мм). Размеры клеток крови разных видов животных варьируют в следующих пределах: тромбоциты – 2,5–4,0 мкм; нейтрофилы и базофилы – 7,0–15,0 мкм; эозинофилы – от 8,2 до 19,8 мкм у лошади (гранулы до 3 мкм); малые лимфоциты от 4,5 до 6,5 мкм, средние – от 6,5 до 10 мкм, большие – от 10,0 до 18,0 мкм; моноциты – от 10,0 до 20,0 мкм. Эритроциты верховых лошадей достаточно крупные – 5,8 мкм, но меньше, чем у собаки (7 мкм) или кошки (5,9 мкм). Из-за указанной вариабельности при общем направлении действия УЗ на клетки од-

ного и того же животного режимы, действующие на конкретную клетку, будут отличаться [24–26]. Градиент скорости может в биологической среде при интенсивности 1 Вт/см^2 и частоте 1 МГц достигать $10^4\text{--}10^5 \text{ с}^{-1}$. Это приводит к разрыву клеточных мембран, нарушениям внутриклеточной структуры, деградации молекул ДНК и РНК [27]. При взаимодействии УЗ-волны с органеллами клеток, имеющими отличную от среды плотность, могут возникать микротечения. Предполагается [27], что многие биоэффекты обусловлены именно УЗ-микротоками. Кроме того, могут отмечаться изменения соотношения ионов внутри и вне клетки в результате возникновения потенциала Дебая, а также акустические потоки в образцах крови в докавитационном режиме (при мощности $0,05 \text{ Вт/см}^2$) способны «смыть» макромолекулы с поверхности ЦПМ. Весьма вероятно, что именно эти эффекты и приводят к «избирательной» агрегации эритроцитов и лейкоцитов, образованию строгих геометрических фигур, «цветков» и «сот», а впоследствии и к лизису ЦПМ и цитоплазмы. Возможность внешних изменений ядер клеток, доступных для наблюдения в световом микроскопе, была отмечена и в работе [28]. Был описан единственный вид повреждений – щелевидные вакуоли на ядерных мембранах. Сделано предположение, что внутри клеток могут образовываться кавитационные пузырьки и что мембраны ядер митохондрий и гранулярной эндоплазматической сети могут играть роль кавитационных зародышей.

Ранее было показано, что эффект непрерывного УЗ на развитие зародышей лягушки зависит от интенсивности и частоты генерации. Стимулирующий эффект при одинаковой длительности воздействия наблюдали при интенсивности воздействия $0,05\text{--}0,4 \text{ Вт/см}^2$, супресорный – $0,7\text{--}1,0 \text{ Вт/см}^2$. Было обнаружено, что наиболее высокой выживаемостью обладали зародыши, взятые в эксперимент на стадии бластулы и обработанные в течение 5 мин модулированным УЗ с частотой генерации $0,88 \text{ МГц}$, интенсивностью $0,4 \text{ Вт/см}^2$, вблизи частот модуляции 40 Гц и 100 Гц . В то же время обнаружены некоторые диапазоны частот модуляции, приводящие к снижению выживаемости таких зародышей относительно контроля [1]. Из анализа всех приведенных выше данных видно, что диапазоны биологически активных частот, выявленных разными авторами, часто пересекаются. Это может служить косвенным подтверждением «работы» одних и тех же клеточных механизмов при облучении УЗ.

Таким образом, проведенные разными авторами исследования показали способность УЗ-

облучения вызывать нарушение проницаемости клеточных и тканевых мембран, влиять на активность ферментных систем, локализованных в поверхностных слоях клетки и клеточных компонентов, нарушать пространственные взаимоотношения внутриклеточных субмикроскопических структур. Ультразвук, изменяя проницаемость клеточной мембраны, поверхностный заряд клеток и активность ферментов, связанных непосредственно с поверхностью клетки и мембраной, может стимулировать глубокие структурные и функциональные перестройки в клетке.

ВЫВОДЫ

1. Найден способ окраски тромбоцитов после УЗ-воздействия, включающий обработку образцов крови *in vitro* бегущей УЗ-волной с частотой генерации $2,64 \text{ МГц}$ в импульсном режиме ($I_{\text{САТА}} 0,05\text{--}0,7 \text{ Вт/см}^2$), а также с интенсивностью воздействия $0,05\text{--}0,7 \text{ Вт/см}^2$ в диапазоне частот модуляции $10\text{--}30 \text{ Гц}$ и 800 Гц , частоте генерации 880 кГц . Длительность воздействия составляла $12\text{--}17 \text{ с}$.

2. Выявлены основные цитоморфологические эффекты действия модулированного УЗ с несущей частотой 880 кГц и частотой модуляции $10\text{--}1000 \text{ Гц}$ на эритроциты, лейкоциты и тромбоциты кошек, собак и лошадей.

3. Направленное действие на эритроциты вызывает вначале изменение формы без внешних признаков разрушения или цитолиза, затем формирование групп вокруг клеток и цепочек. Возможно появление теней клеток.

4. Найденны основные диапазоны воздействия на эритроциты и спектры активных частот для разных видов животных: для собаки – $0,2\text{--}0,7 \text{ Вт/см}^2$, $10\text{--}20 \text{ Гц}$, $30\text{--}50 \text{ с}$; для лошади – $0,05\text{--}0,2 \text{ Вт/см}^2$, 200 Гц , $45\text{--}50 \text{ с}$; $0,05 \text{ Вт/см}^2$, 100 Гц , 60 с ; $0,05 \text{ Вт/см}^2$, 500 Гц , 45 с ; $0,05 \text{ Вт/см}^2$, 90 Гц , $45\text{--}50 \text{ с}$; $0,4 \text{ Вт/см}^2$ 10 Гц , $30\text{--}45 \text{ с}$; $0,4 \text{ Вт/см}^2$, 800 Гц , $45\text{--}50 \text{ с}$; $0,7 \text{ Вт/см}^2$, 100 Гц , 45 с ; для кошки – $0,4\text{--}0,7 \text{ Вт/см}^2$, 800 Гц , $30\text{--}45 \text{ с}$; $0,7 \text{ Вт/см}^2$, 10 Гц , $30\text{--}45 \text{ с}$.

5. Частоты модуляции, интенсивности и экспозиция УЗ, инициирующие начало изменения эритроцитов, необратимо модифицируют лейкоциты. Лейкоциты разрушаются спустя $15\text{--}20 \text{ с}$ от начала озвучивания активными частотами.

6. Определены диапазоны частот и интенсивностей, действующих направленно на тромбоциты животных: $0,05 \text{ Вт/см}^2$ вблизи частот 150 Гц и 80 Гц , при времени воздействия от 15 с (для кошки); $0,05 \text{ Вт/см}^2$, 10 Гц время облучения от 15 с ; $0,4 \text{ Вт/см}^2$, $70\text{--}80 \text{ Гц}$, 30 с (для собаки).

7. Определены общие диапазоны частот и интенсивностей УЗ, изменяющих ядра лейкоцитов у разных видов животных: у кошки и лошади – 0,05 Вт/см² вблизи частоты 800 Гц; у собаки и лошади – 0,4 Вт/см² вблизи частот 10–30 Гц, 50–60 Гц и 100 Гц.

8. Диапазон воздействия и активная частота воздействия на базофилы кошек составляют 0,05 Вт/см², 40 Гц, 15 с; на моноциты – 0,05 Вт/см², 80 Гц, 15 с.

9. Диапазоны частот и интенсивностей, действующих на лимфоциты кошки – 0,05 Вт/см² вблизи частот 150 Гц, время от 15 с и 800 Гц, 30 с; лошади – 0,4 Вт/см² вблизи частот 70–80 Гц, время от 20 с, а также 0,7–1,0 Вт/см², модуляция 10 Гц.

10. Частоты и интенсивности, действующие на нейтрофилы животных: 0,05 Вт/см² вблизи 80 Гц (для кошки); 0,4 Вт/см², 30 Гц (для кошки и собаки); 0,4 Вт/см², 100 Гц (для лошади).

11. Действие УЗ на гранулоциты, ведущее к изменению ЦПМ, а затем клетки в целом, начинается раньше, чем на агранулоциты. В малых лимфоцитах дегенеративные изменения начинались значительно позже, чем в зрелых – через 60–90 с.

12. У всех видов животных происходят одинаковые, но зависящие от экспозиции, эффекты: лейкопения, цитолиз, деструкция и агрегация клеток, вспенивание цитоплазмы гранулоцитов, разрыв ЦПМ, деформация и взрыв ядер.

Автор приносит искреннюю благодарность терапевту клиники «МедВет» Э.М. Комаровой за проведение лабораторной диагностики и предоставление образцов крови животных для научных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. К. Утешев, Т. Н. Пашовкин и Э. Н. Гахова, Вестн. новых мед. технологий, № 4, 7 (2010).
2. Д. Ж. МаксUTOва, Проблемы репродукции, № 2, 30 (2009).
3. D. J. Panagopoulos, A. Karabarbounis, and L. H. Margaritisa, Biochem. Biophys. Res. Commun. **298**, 95 (2002).
4. М. С. Пашовкина, И. Г. Акoев и Т. Н. Пашовкин, в сб. *Биологические эффекты слабых электромагнитных излучений* (Пушино, 2002), сс. 26–37.
5. М. С. Пашовкина и И. Г. Акoев, Биофизика **45** (1), 130 (2000).
6. А. А. Олешкевич, А. М. Носовский и Е. В. Каминская, Биомед. радиоэлектроника, № 2, 53 (2014).
7. А. А. Олешкевич, Е. В. Каминская и А. М. Носовский, Биомед. радиоэлектроника, № 3, 33 (2014).
8. N. I. Botyan, V. B. Akopyan, and A.A. Oleshkevich, in *Proc. V Nat. Conf. on Biomed. Physics & Engineering* (Bulgaria, 1989), pp. 109–110.
9. А. А. Олешкевич, Ветеринарная медицина, № 3–4, 35 (2012).
10. А. А. Олешкевич, В. Б. Акоюн и Л. П. Смирнова, А. с. СССР № 1597387 А1. Бюл. №37, опубликовано 08.06.1990.
11. А. А. Олешкевич, В. П. Кузнецов и В. Б. Акоюн, А. с. СССР № 1575362. Бюл. №37, опубликовано 07.11.1990.
12. Н. И. Шарый, В. М. Ковалёва и Г. В. Крюкова, Гигиена и санитария, № 2, 48 (1979).
13. T. N. Pashovkin, in *Abstr. 5th Intern. Symp. on Therapeutic Ultrasound* (Harvard Medical School. Boston, 2005), p. 77.
14. А. А. Олешкевич и Т. Н. Пашовкин, Аграрная Россия, № 6, 13 (2015).
15. А. А. Олешкевич и Т. Н. Пашовкин, Заявка на патент РФ 2014150623/15, МПК G01N 33/49, заявл. 15.12.2014. Получено решение о выдаче патента на изобретение от 03.09.2015.
16. А. А. Oleshkevich, Int. J. Biomed. **4** (1), 30 (2015).
17. А. А. Олешкевич и Т. Н. Пашовкин, Ветеринария, зоотехния и биотехнология, № 5, 27 (2014).
18. А. А. Олешкевич, в сб. *Материалы V Съезда биофизиков России* (ЮФУ, Ростов-на-Дону, 2015), т. 2, с. 107.
19. А. А. Олешкевич, А. М. Носовский и Е. В. Каминская, Биомед. радиоэлектроника, № 8, 45 (2014).
20. В. П. Кузнецов, В. Б. Акоюн и А. А. Олешкевич, Докл. АН СССР **298** (3), 732 (1987).
21. А. А. Олешкевич, В. П. Кузнецов, А. М. Носовский и Е. В. Каминская, Биомед. радиоэлектроника, № 11, 45 (2014).
22. D. J. Watmough, P. P. Dendy, L. M. Eastwood, et al., *Ultrasound in Med. & Biol.* **3**, 205 (1977).
23. А. А. Олешкевич и И. В. Кутликова, Научное обозрение, № 13, 145 (2015).
24. Т. Н. Пашовкин и А. П. Сарвазян, в кн. *Методы вибрационной диагностики реологических характеристик мягких материалов и биологических тканей* (ИПФ АН СССР, Горький, 1989), сс. 105–115.
25. Т. Н. Пашовкин и Д. Г. Садикова, Акустич. журн. **55**, (4–5), 575 (2009).
26. Д. Г. Садикова, А. А. Андреев, А. Н. Шкидченко и Т. Н. Пашовкин, Биомед. радиоэлектроника, № 8–9, 95 (2006).
27. В. Б. Акоюн и Ю. А. Ершов, *Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами* (МГТУ им. Н. Э. Баумана, М., 2005).
28. D. L. Miller, *Ultrasound in Med. & Biol.* **13** (8), 443 (1987).

Various *in vitro* Effects of Continuous and Modulated Ultrasound on Blood Cells of Different Animal Species

A.A. Oleshkevich

Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, ul. Skryabina 23, Moscow, 109472 Russia

The investigations on determination of the behavior features of blood cells of different animal species in ultrasonic field were carried out. The ranges of modulation frequency that caused irreversible changes were revealed. The following cytomorphological ultrasound effects (the carrier frequency of 880 kHz and 2.64 MHz, modulation range from 10 Hz to 1000 Hz) in the red blood cells were detected: a change of shape, the formation of symmetric groups around the cell and red blood cell chains without cytolysis, the appearance of shadow cells. The leukogram change didn't always depend on the animal species under the constant energy impact. White blood cells were changed before erythrocytes, after 12–20 sec insonation by the active frequencies. The effect on granulocytes, that led to damage to the cytoplasmic membrane and then to the whole cell, occurred earlier than that on agranulocytes. In small lymphocytes degenerative changes were recorded much later, after 50–90 seconds. In all animal species the similar effects occurred at the intensity range of 0.2–0.7 W/cm² over the modulation frequency of 10–100 Hz: leukopenia, cytolysis, destruction and cell aggregation, foaming of the cytoplasm of granulocytes, the gap of cytoplasmic membrane and nuclear explosion (general), their deformation and trespassing.

Keywords: blood cells, animals, ultrasound, modulation