

ИЗМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ВОЛН ТЕРАГЕРЦОВОГО ДИАПАЗОНА

© 2017 г. А.В. Дерюгина, Л.В. Ошевенский, М.Н. Таламанова, А.И. Цветков*, М.А. Шабалин, М.Ю. Глявин*, В.Н. Крылов

Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603600, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23

*Федеральный исследовательский центр «Институт прикладной физики РАН», 603950, Нижний Новгород, ул. Ульянова, 46

E-mail: kfg@bio.unn.ru

Поступила в редакцию 23.01.17 г.

После доработки 03.04.17 г.

Исследовано действие электромагнитного излучения гиротрона с рабочей частотой 263 ГГц на электрофоретическую подвижность эритроцитов крыс, концентрацию в них малонового диальдегида, АТФ и 2,3-дифосфоглицерата в экспериментах *in vitro*. Кровь облучали при непрерывном и импульсном режиме генерации гиротрона, с расчетным потоком падающей энергии на объект от 0,1 до 20 мВт/см². Установлено, что измеряемые характеристики эритроцитов изменялись разнонаправленно и зависели от режима и величины потока падающей энергии: при низкой величине потока падающей энергии и непрерывном режиме воздействия снижались скорость электрофоретической подвижности эритроцитов и концентрация АТФ, возрастали концентрации малонового диальдегида и 2,3-дифосфоглицерата, тогда как при импульсном режиме воздействия возрастали все исследуемые показатели. Увеличение потока падающей энергии вызывало снижение выявленных эффектов.

Ключевые слова: терагерцовое излучение, эритроциты, электрофоретическая подвижность эритроцитов, содержание АТФ, малоновый диальдегид, 2,3-дифосфоглицерат.

В терагерцовом диапазоне, занимающем промежуточное положение между микроволновым и оптическим участками спектра электромагнитных волн (область частот от 0,1 до 10 ТГц с длинами волн от 3 до 0,03 мм), до недавнего времени отсутствовали достаточно мощные источники излучения [1]. В свою очередь, отсутствие источников ограничивало применение терагерцового излучения, в том числе в медицине и биологии. Как известно, терагерцовый диапазон обладает рядом специфических особенностей, делающих его весьма привлекательным для широкого круга фундаментальных и прикладных исследований. В этом диапазоне находится большое число сильных линий колебательных и колебательно-вращательных переходов больших молекул, в том числе органических, что открывает возможности как для их исследования, так и для селективного воз-

действия на них [2,3]. Выявлено, что в терагерцовом диапазоне сосредоточены частотные спектры излучения и поглощения важнейших активных клеточных метаболитов (NO, O₂, CO₂, CO, OH⁻ и др.) [4–6]. Кроме того, согласно теоретическим оценкам, подтвержденным экспериментами, в области около 1 ТГц находятся собственные частоты колебаний мембраны, цитоскелета и клеток в целом. Это может вызывать резонансные эффекты при совпадении собственных частот клетки с частотами внешнего электромагнитного облучения [7]. Терагерцовое излучение обладает достаточно высокой проникающей способностью, но сравнительно безопасно для живых организмов. Поэтому в последнее время интенсивно развивается и расширяется сфера его применения как для диагностики патологических процессов в организме, так и для воздействия на них с целью профилактики и терапии распространенных заболеваний [8,9]. В то же время следует отметить, что исследователи работают в основном со спектрами излучения около 129 ГГц (спектр кислорода) и около 150 ГГц (спектр оксида

Сокращения: ЭФПЭ – электрофоретическая подвижность эритроцитов, ЭМИ – электромагнитное излучение, 2,3-ДФГ – 2,3-дифосфоглицерат, ППЭ – поток падающей энергии, Р_н – неорганический фосфат.

азота), обосновывая выбор частотного диапазона механизмами резонансных ответов и соответствующим изменением регуляторных метаболических путей. Более высокие частоты остаются неизученными, равно как и вопрос оптимальной мощности излучения. И то и другое сегодня является актуальным для исследований, поскольку сегодня существуют источники (гиротроны и лазеры на свободных электронах), способные генерировать киловаттные (на частотах выше 0,3 ТГц) и даже мегаваттные (в диапазоне 0,1–0,2 ТГц) средние мощности излучения. В этой связи возникает проблема возможного негативного влияния больших доз терагерцового излучения на человеческий организм и вопрос определения допустимых для человека, с точки зрения профилактического и терапевтического воздействия, мощностей и доз излучения. В данной работе ставилась задача выявить возможную специфику физиологического действия излучения гиротрона с рабочей частотой 263 ГГц. Указанная частота относится к одному из мировых спектроскопических стандартов частоты и на ней работает подавляющее количество существующих ЯМР-спектрометров высокого разрешения (см., например, работу [10]). В настоящее время отсутствуют в достаточном количестве публикации, раскрывающие механизмы молекулярных превращений при действии излучения терагерцового диапазона на уровне систем, органов и клеток живого организма. Поэтому для раскрытия физиологических механизмов действия терагерцового излучения целесообразным представляется исследование данного вида воздействия в опытах *in vitro*. В этом плане удобным объектом исследования являются эритроциты крови, поскольку они отражают общие принципы структуры мембран клеток организма, при этом достаточно просто выделяются и обладают стабильностью в искусственной среде. Установлено, что одной из показательных характеристик функционального состояния эритроцитов и всего организма в целом является электрофоретическая подвижность, которая отражает изменения электрокинетических свойств эритроцитов, закономерно изменяющихся при стрессовых воздействиях и нарушениях функций организма разного патогенеза [11,12]. Поэтому представляет интерес изучение электрофоретической подвижности изолированных эритроцитов (ЭФПЭ) при действии на них электромагнитного излучения (ЭМИ) указанной выше частоты. Учитывая роль метаболических изменений в электрокинетическом статусе эритроцитов, представлялось важным также изучить сопря-

женность ЭФПЭ с изменением некоторых метаболических процессов в эритроцитах.

Целью работы являлось изучение влияния низкоинтенсивного ЭМИ гиротрона с рабочей частотой 263 ГГц на ЭФПЭ крыс, концентрацию в них малонового диальдегида, АТФ и 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) в экспериментах *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила кровь белых крыс. Облучение крови проводили дозированным по мощности терагерцовым излучением, источником которого служил гиротрон с рабочей частотой 263 ГГц, разработанный и изготовленный в ИПФ РАН совместно с ЗАО НПП ГИКОМ [13,14]. Были проведены три серии экспериментов. В первой и второй сериях кровь облучали при непрерывном режиме генерации гиротрона с мощностью излучения 1 Вт в течение 15 и 1 мин соответственно. С целью уменьшения дозы облучения объекта в третьей серии облучение проводили в импульсном режиме (длительность импульса 200 мс) в течение 1 мин. Расчетный поток падающей энергии (ППЭ, плотность мощности, плотность излучения) на объект составлял, в зависимости от расположения пробирок с эритроцитами, 0,1–20 мВт/см². Температура образцов оставалась постоянной с точностью 0,2°C за время сеанса облучения. Контролем служили «интактные» эритроциты.

Схема экспериментальной установки приведена на рис. 1.

Микроволновое излучение гиротрона направлялось на пластиковые пробирки, установленные в специальном держателе из тефлона, что обеспечивало минимальное искажение сформированного потока «пустой» (в отсутствие крови) системой.

В каждой серии экспериментов было проведено по десять сеансов. При анализе данных из массива проб были сформированы и обработаны две группы со средним значением ППЭ, близким к максимуму (при этом пробирки располагались на оси распространения узконаправленного микроволнового пучка) – 15–20 мВт/см² и близким к минимуму (на периферии пучка) – 0,5–1,5 мВт/см².

Измерение электрофоретической подвижности эритроцитов проводили методом микроэлектрофореза в нашей модификации [15]. Для определения ЭФПЭ готовили взвесь отмытых эритроцитов, которые получали трехкратным центрифугированием (200 Гр, 10 мин, 0,85% NaCl). Суспензию клеток разводили 10 мМ

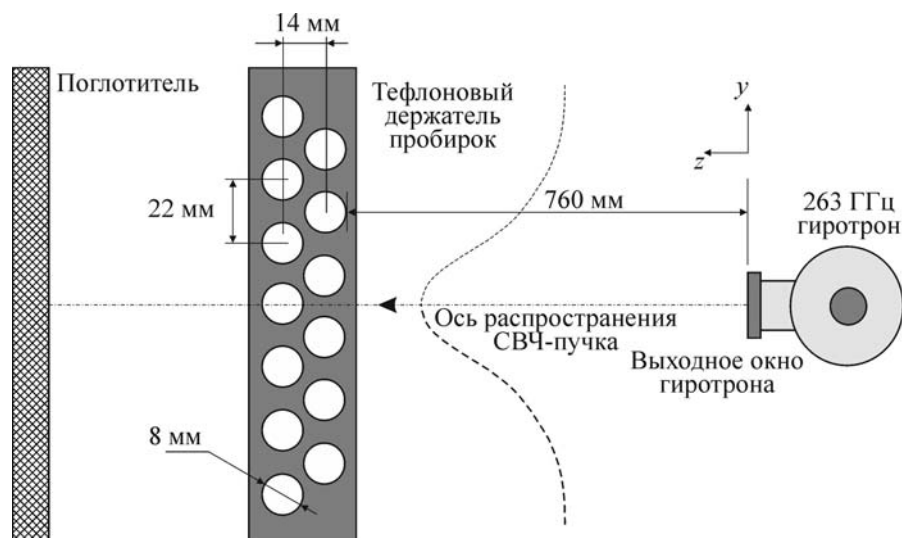


Рис. 1. Схема экспериментальной установки (вид сверху).

трис-НСI-буфером (рН 7,4) и измеряли ЭФПЭ, регистрируя время прохождения эритроцитами (t , с) расстояния 100 мкм в трис-НСI-буфере с рН 7,4. Величину ЭФПЭ ($\text{мкм}\cdot\text{см}\cdot\text{с}^{-1}\cdot\text{В}^{-1}$) определяли по формуле V/E , где $V = 100/t$; $E = U/L$ (E – напряженность электрического поля), $U = 12$ В (U – напряжение на электродах), $L = 16,5$ мм (L – длина рабочей камеры кюветы).

Концентрацию малонового диальдегида, характеризующую интенсивность свободнорадикального окисления липидов, оценивали по образованию окрашенного триметинового комплекса с максимумом поглощения при 530 нм при реакции с тиобарбитуровой кислотой [16].

Содержание 2,3-ДФГ, отражающего изменение сродства гемоглобина к кислороду, и АТФ в суспензии отмытых эритроцитов исследовали неэнзиматическим методом, определяя неорганический фосфор в гидролизатах (трихлоруксусной кислотой) эритроцитов [17]. Из фильтрата гемолизированных эритроцитов удаляли нуклеотиды (АТФ, АДФ, АМФ) путем адсорбции на активированном угле с последующим центрифугированием. В супернатанте (0,5 мл) определяли неорганический фосфор (P_n) (пробирка 1). Часть ТХУ фильтрата (0,5 мл) подвергали озолению, добавляя 0,5 мл 5%-го раствора нитрата магния, кипятили и после охлаждения содержимое пробирки растворяли в 0,5 мл 0,36 N H_2SO_4 . В 0,5 мл супернатанта измеряли P_n (пробирка 2). Определяли P_n в каждой пробирке, добавляя 0,36 N серной кислоты (0,5 мл); 4,6% аскорбиновой кислоты (0,25 мл), 0,9% молибденовокислого аммония (0,25 мл), 0,5 мл стабилизирующего раствора (9% цитрата Na, 9% арсената Na, 9% уксусной

кислоты в равных объемах). Через 15 мин регистрировали плотность окраски на фотометре КФК-3 (Россия) при длине волны 660 нм. Концентрацию P_n определяли по калибровочной кривой, используя стандартный раствор KN_2PO_4 . Расчет концентрации 2,3-ДФГ проводили по формуле: $(P_n(\text{пробирка 1}) \cdot 100 - P_n(\text{пробирка 2}) \cdot 10) / 2$.

Для статистической обработки полученных результатов использовали программы Microsoft Excel 2007 и Statistica 6.0. После доказательства принадлежности экспериментальных данных к нормальному распределению с использованием критерия Шапиро–Уилка определяли значения средних арифметических и стандартных отклонений. Для сравнения двух групп использовали t -критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Было установлено, что при терагерцовом облучении образцов крови в непрерывном режиме воздействия (15 мин или 1 мин) во всем диапазоне ППЭ (0,5–20 мВт/см²) ЭФПЭ замедлялась со значимым изменением показателя в диапазоне ППЭ 0,5–1,5 мВт/см². В отличие от этого, облучение образцов в импульсном режиме в течение 1 мин приводило к повышению ЭФПЭ также во всем диапазоне изученных ППЭ (рис. 2). При этом больший эффект повышения ЭФПЭ (на 45% относительно контроля) был выявлен при максимальном ППЭ (15–20 мВт/см²).

Было показано, что терагерцовое облучение приводило к разнонаправленному изменению концентрации малонового диальдегида в эрит-

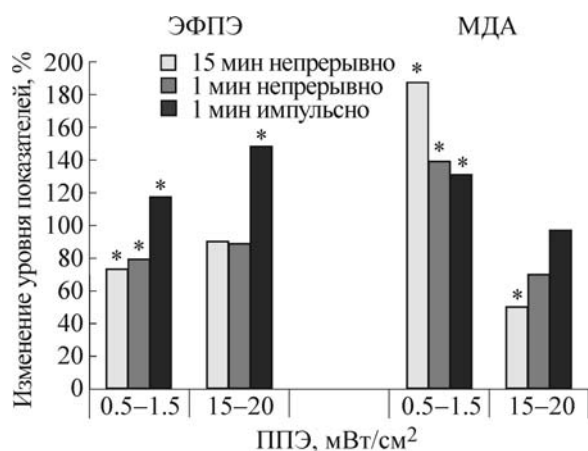


Рис. 2. Изменение ЭФПЭ и концентрации малонового диальдегида при действии ЭМИ терагерцового диапазона. По оси ординат – изменения уровня исследуемых показателей в % (100% – уровень значений контроля). По оси абсцисс – ППЭ, мВт/см². * – Статистически значимые различия ($p < 0,05$) с контролем.

роцитах в зависимости от мощности излучения: она повышалась при минимальных ППЭ и, наоборот, снижалась при максимальных ППЭ при непрерывном и импульсном режимах воздействия (рис. 2).

Изменение метаболических показателей при терагерцовом облучении крови также зависело от мощности излучения и от режима воздействия. Было установлено, что при непрерывном воздействии в течение 15 или 1 мин снижалась концентрация АТФ и повышалась концентрация 2,3-ДФГ (рис. 3). Другие закономерности были выявлены при импульсном режиме терагерцового воздействия: уровень 2,3-ДФГ изменялся так же, как и при непрерывном одноминутном режиме воздействия, тогда как концентрация АТФ возрастала со статистически значимым изменением показателя при минимальных значениях ППЭ.

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что воздействие терагерцового облучения на кровь крыс в изучаемых режимах и мощностях ППЭ приводит, в зависимости от режима воздействия (непрерывный или импульсный) и ППЭ, к разнонаправленному изменению исследуемых характеристик эритроцитов. Это согласуется с литературными данными, где установлено как повреждающее [18,19], так и саногенетическое [20] действие излучений миллиметрового диапазона.

Следует отметить, что действие выбранных доз и режимов терагерцового излучения определяло не только величину, но и знак эффекта. Так, в диапазоне ППЭ 0,5–1,5 мВт/см² наблю-

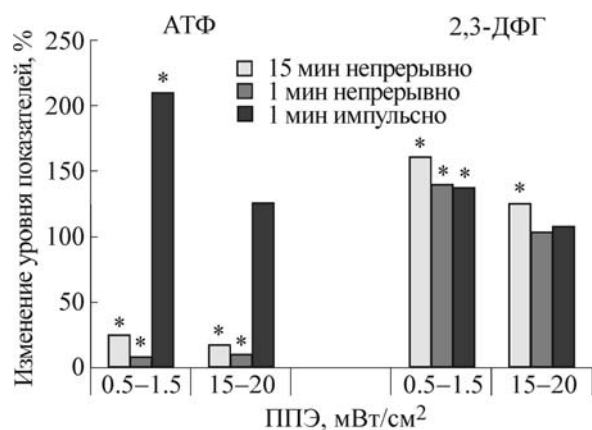


Рис. 3. Изменение концентрации АТФ и 2,3-ДФГ при действии ЭМИ терагерцового диапазона. Обозначения те же, что и на рис. 2.

далось более значимое повреждающее воздействие по сравнению с диапазоном ППЭ 15–20 мВт/см², что выражалось в увеличении процессов липопероксидации со снижением активности перекисного окисления липидов. Выявленные окислительные изменения мембран эритроцитов, вероятно, обусловлены гиперрадиочувствительностью мембран клеток при облучении их в сверхмалых дозах, когда не работают системы адаптации, поскольку организм способен приспосабливаться лишь к «привычным» воздействиям, лежащим в обычном диапазоне интенсивностей. Для физических факторов (например, облучения) эффект усиливается с понижением интенсивности воздействия в определенных пределах [21]. С увеличением дозы облучения включаются системы восстановления (или адаптации), и биоэффекты сохраняются на том же уровне или уменьшаются вплоть до элиминирования [22].

Обсуждая молекулярно-клеточные механизмы действия терагерцового излучения, можно предположить, что они оказались сходными с действием других видов излучения, обусловленным развитием первичных фотофизических эффектов за счет генерации электронно-возбужденного состояния атомов и молекул с последующей миграцией электронного возбуждения, что приводит к запуску вторичных фотохимических реакций. В результате первичных реакций происходит перестройка белковых полимеров и увеличение генерации синглетного кислорода и других его реактивных форм. Следствием этого в облученных клетках могут включаться такие реакции, как увеличение внутриклеточной концентрации АТФ, активация Na,K-АТФазы, увеличение внутриклеточной концентрации Ca²⁺, изменений концентрации

цАМФ, активация трансмембранных ионных токов, деполяризация клеточной мембраны [23].

Применительно к полученным результатам можно полагать, что при непрерывном режиме воздействия в диапазоне ППЭ 0,5–1,5 мВт/см² в большей степени проявляются первичные реакции системы клеток: увеличение активных форм кислорода за счет радиолитического разложения воды с образованием H₂O₂, O₂[•], OH[•] [24], активация процессов липопероксидации, изменение биополимеров, в частности, молекул белков [25], нарушение трансмембранных ионных потоков с развитием ацидоза в клетках и, как следствие, увеличение концентрации 2,3-ДФГ. Рост 2,3-ДФГ сопровождается диссоциацией спектрина, увеличением интегральной подвижности белков мембраны эритроцитов, увеличением площади и уменьшением объема клеток [26], что проявляется снижением ЭФПЭ. Увеличение ППЭ терагерцового излучения, вероятно, приводит к включению систем адаптации клеток, как один из вариантов, за счет активации антиоксидантных систем клеток. В частности, показано, что при действии ЭМИ терагерцового диапазона увеличивается активность каталазы и супероксиддисмутазы [27].

Анализ импульсного режима терагерцового воздействия свидетельствует о том, что при максимальном ППЭ (15–20 мВт/см²) также, вероятно, наблюдается вышеописанная цепь событий, как и для непрерывного режима максимального ППЭ – с включением адаптационных процессов. При снижении ППЭ (0,5–1,5 мВт/см²) в импульсном режиме терагерцового излучения в большей степени, возможно, проявляются вторичные реакции в облученных клетках – с увеличением содержания АТФ, активацией транспортных ионных токов и развитием деполяризации мембраны, которые вносят большой вклад в реакцию повышения ЭФПЭ по сравнению с процессами перекисного окисления липидов.

Таким образом, в ходе проведенных экспериментов установлено, что при терагерцовом облучении эритроцитов происходит последовательная перестройка функционального состояния клеток крови. При непрерывном режиме воздействия ЭМИ терагерцового диапазона деструктивные изменения морфофункционального состояния клеток проявляются при низких значениях ППЭ, тогда как импульсный режим воздействия позволяет активировать процессы метаболизма с сохранением высокого электрокинетического потенциала эритроцитов. Данный факт позволяет рассматривать данный режим воздействия как благоприятный, который может способствовать улучшению реологиче-

ских характеристик крови и микроциркуляции. Выявленные режимы и дозы терагерцового излучения могут быть использованы как при разработке допустимых санитарных норм, так и для использования этого диапазона в качестве терапевтических воздействий при нарушениях функций организма.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Министерства промышленности и инноваций Нижегородской области в рамках проекта № 15-44-02358; эксперименты выполнены на установке, созданной в рамках проекта Российского научного фонда № 14-12-00887.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. Л. Братман, А. Г. Литвак и Е. В. Суворов, *Успехи физ. наук* **181** (8), 867 (2011).
2. E. A. Nanni, A. B. Barnes, and R. G. Griffin, *IEEE Trans. Terahertz Sci. Technol.* **1** (1), 145 (2011).
3. А. Н. Иванов. *Бюл. мед. Интернет-конференций* **2** (6), 392 (2012).
4. О. В. Бецкий, А. П. Креницкий, А. В. Майбородин и др., *Биомед. технологии и радиоэлектроника*, № 7, 5 (2007).
5. L. S. Rothman, K. Chance, D. Jacquemart, et al., *J. Quant. Spectroscopy & Irradiative Transfer* **82** (1–4), 5 (2003)
6. A. Ramundo-Orlando. *J. Infrared, Millimeter and Terahertz Waves* **30** (12), 1308 (2009).
7. Ю. В. Гуляев, А. П. Креницкий, О. В. Бецкий и др. *Успехи соврем. радиоэлектроники*, № 9, 8 (2008).
8. K. Humphreys, et al. *Proc. IEEE Conf. Eng. Med. Biol. Soc.* **2**, 1302 (2004).
9. В. Ф. Киричук, Е. В. Андронов, О. Н. Антипова и др. *Бюл. мед. интернет-конференций* **2** (6), 421 (2012).
10. V. Denysenkov, M. J. Prandolini, and M. Gafurov. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12** (22), 5786 (2010).
11. В. Н. Крылов, А. В. Дерюгина и Е. А. Антипенко. *Вестн. биотехнологии и физ.-хим. биологии им. Ю.А. Овчинникова* **9** (2), 39 (2013).
12. В. Н. Крылов, А. В. Дерюгина, И. С. Симутис и Г. А. Бояринов, *Биомедицина* **2**, 37 (2014).
13. А. И. Цветков, М. В. Морозкин, М. Ю. Глявин и др., *Изв. вузов. Радиофизика* **58** (9), 709 (2015).
14. M. Yu. Glyavin, A. V. Chirkov, G. G. Denisov, et al., *Rev. Sci. Instr.* **86** (5), 054705, (2015).
15. В. Н. Крылов, А. В. Дерюгина и А. И. Константинова, *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова* **100** (11), 1297 (2014).
16. В. Н. Крылов, А. В. Дерюгина, С. Н. Плескова и В. А. Калинин, *Биофизика* **60** (1), 102 (2015).
17. И. Л. Виноградова, С. Ю. Багрянцева и Г. В. Дервиз, *Лаб. дело* **7**, 424 (1980).
18. Е. Б. Родзаевская, Ю. В. Полина, И. А. Уварова и др. *Саратовский науч.-мед. журн.* **5** (1), 36 (2009).

19. Г. Е. Бриль, В. И. Петросян, Н. И. Синицын и др., Биомед. радиоэлектроника, № 2, 29 (2000).
20. В. И. Петросян, Б. П. Чесноков, Г. Е. Бриль и др., Биомед. радиоэлектроника, № 2, 19 (2014).
21. Е. Б. Бурлакова, А. А. Конрадов и Е. Л. Мальцева, Хим. физика 2, 21 (2003).
22. Ю. Б. Кудряшов, Радиационная биология. Радиоэкология 5, 531 (2001).
23. Л. В. Кожура, А. К. Кирсанова и И. С. Новодержкина, Общая реаниматология, № 11, 171 (2004).
24. И. М. Чекрыгина, А. Э. Чекрыгин и В. Э. Чекрыгин, Радиоэлектроника на службе здоровья (БАННЭРплюс, Таганрог, 2009).
25. В. И. Федоров, Биомед. радиоэлектроника, № 2, 17 (2011).
26. Н. Ю. Брызгалов, Н. А. Браже, А. И. Юсипович и др., Биофизика 54 (3), 442 (2009).
27. Е. А. Пронина, Г. М. Шуб, А. П. Креницкий и др., Биомед. радиоэлектроника, № 8, 57 (2009).

Change of Electrokinetic and Biochemical Characteristics of Erythrocytes in Case of Action of Electromagnetic Waves of Terahertz Range

A.V. Deryugina*, L.V. Oshevskiy*, M.N. Talamanova*, A.I. Tsvetkov,
M. A. Shabalin*, M.Yu. Glyavin**, and V.N. Krylov***

**Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, prosp. Gagarina 23, Nizhny Novgorod, 603600 Russia*

***Federal Research Center Institute of Applied Physics, Russian Academy of Sciences,
ul. Ulyanova 46, Nizhny Novgorod, 603950 Russia*

Effects of electromagnetic radiation of the gyrotron with the operating frequency of 263 GHz on the electrophoretic mobility of rat erythrocytes, the concentration of malonic dialdehyde, ATP and 2,3-diphosphoglycerate in these erythrocytes in in vitro experiments were studied. Blood samples were exposed to continuous-wave and pulsed emission modes of generation of the gyrotron, with the estimated flux of the incident energy on an object from 0,1 to 20 mW/cm². It was established that the measured characteristics of erythrocytes changed multidirectionally and depended on the mode and value of incident energy flux: with low value of incident energy flux and under continuous exposure the rate of the electrophoretic mobility of erythrocytes and ATP concentration decreased, concentrations of malonic dialdehyde and 2,3-diphosphoglycerate increased, while in pulsed emission mode all studied parameters became greater. A rise in value of incident energy flux caused a reduction in the effects revealed.

Keywords: terahertz radiation, erythrocytes, electrophoretic mobility of erythrocytes, ATP content, malonic dialdehyde, 2,3-diphosphoglycerate