

УДК 615.849.11.015.44

ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНЫХ МИКРОВОЛН НА КЛЕТОЧНУЮ АКТИВНОСТЬ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

© 2013 г.

А.Г. Полякова, Д.Я. Алейник

Нижегородский НИИ травматологии и ортопедии

ag.polyakova@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.06.2013

Представлены результаты исследования влияния электромагнитного излучения крайне высокочастотного диапазона в шумовом режиме излучения на процессы пролиферативной и функциональной клеточной активности дермальных фибробластов здоровой и рубцово-измененной кожи. Полученные данные подтверждают гипотезы о различном влиянии микроволн на здоровые и патологически измененные клетки, а также о значении адаптационных реакций на уровне нейроиммунноэндокринных взаимодействий в ходе репаративной регенерации соединительной ткани.

Ключевые слова: репаративная регенерация, соединительная ткань, электромагнитное излучение, пролиферативная активность, адаптационные реакции.

Введение

Изучение закономерностей функционирования соединительной ткани (СТ) в процессе репаративной регенерации является актуальной проблемой фундаментальных исследований в медицине. Значимость СТ как регуляторного звена функционирования организма подчеркивается патоморфологическим определением соединительной ткани как «динамической саморегулирующей системы, стереотипно функционирующей по принципу обратных связей на основе межклеточных нейроэндокринноиммунных взаимодействий» [1]. С точки зрения системного анализа, процесс репаративной регенерации соединительной ткани представляется целостной тканевой реакцией на повреждение, в которой представлено единство компонентов воспаления, регенерации и фиброза, протекающего при участии клеточных элементов и факторов иммунной системы [2, 3]. Возможность целенаправленного влияния на ход репаративной регенерации СТ – одна из важнейших прикладных задач медицинской реабилитации, в первую очередь – больных травматолого-ортопедического профиля, включая последствия ожоговых травм.

В современных немедикаментозных технологиях восстановительного лечения в качестве лечебного стимула все чаще используется воздействие низкоинтенсивным электромагнитным излучением (ЭМИ) крайне высокочастотного (КВЧ) диапазона через точечные рефлексогенные зоны [4–7]. Накопленный эксперименталь-

ный материал свидетельствует о том, что механизмы взаимодействия ЭМИ КВЧ как с отдельной живой клеткой, так и с многоклеточным организмом в процессе репаративной регенерации затрагивают фундаментальные аспекты их жизнедеятельности [8–11]. По мнению авторов работы [12], морфофункциональным субстратом развивающихся при этом адаптационных и антистрессорных биоэффектов, наряду с нейроэндокринной системой, служит диффузная эндокринная система кожи, клетки которой выступают как «передовая линия быстрого реагирования на действие ЭМИ КВЧ, с которыми в процессе филогенеза организму встречаться не приходилось». Несомненно, что определение направленности действия сигналов ЭМИ КВЧ шумового диапазона и оптимизация энергетических параметров воздействия позволит более успешно применять их в клинике.

Тестовой моделью для разработки этой задачи служат культуры дермальных фибробластов, которые, будучи центральным клеточным элементом СТ, являются одной из простейших и чрезвычайно информативных систем для изучения биологических эффектов в связи с доступностью для различных манипуляций и возможностью точной дозиметрии излучения [13]. Выбор фибробластов обусловлен и тем, что созревание грануляционной ткани, формирование костного регенерата, процессы, происходящие в растягиваемой коже при лечении обширных ран и ряда других патологических состояний, протекают по единой, стандартной схеме морфологических изменений, стержневым звеном кото-

рой являются мелкие сосуды, а центральным клеточным элементом – фибробласты [14].

Однако, несмотря на имеющийся обширный клинико-экспериментальный материал, однозначного представления о механизмах действия ЭМИ КВЧ и выборе оптимальных режимов воздействия для получения целенаправленных корректирующих эффектов все еще нет. Это определило **цель** нашего исследования, которая заключается в изучении морфофункциональных особенностей, а также динамики пролиферативной и функциональной клеточной активности дермальных фибробластов различного генеза под влиянием облучения ЭМИ КВЧ шумового диапазона в системе *in vitro*.

Экспериментальная часть

В качестве источника ЭМИ КВЧ в шумовом режиме излучения частотного диапазона 53.57–78.33 ГГц нами в течение ряда лет используется прибор «АМФИТ-0,2/10-01» (разработчик ООО «ФизТех», Нижний Новгород). Неоднородность спектральной плотности мощности шума (СПМШ) излучателя прибора не превышает ± 3 дБ при значениях типичной спектральной плотности мощности шума $\approx 4 \cdot 10^{-17}$ Вт/Гц, что соответствует сигналам в области границы собственных шумов биообъекта и тем самым обеспечивает адекватность воздействия [15].

Влияние ЭМИ КВЧ на процесс пролиферации клеток соединительной ткани изучалось на 6 штаммах культур дермальных фибробластов, полученных из биоптатов кожи здоровых людей, и 8 штаммов из рубцово-измененной кожи [16]. Воздействие проводилось однократно различными дозами ЭМИ КВЧ: 0.6 – 1.2 – 1.8 – 3.6 мДж, что соответствовало экспозиции облучения 10, 20, 30 и 60 минут. Контролем служили культуры клеток, не подвергшиеся воздействию.

Для оценки пролиферации в эти сроки подсчитывали клетки на единицу площади (поле зрения инвертированного микроскопа при увеличении 250), после чего в ростовую среду вводили аналог тимидина – 5-бром-2-дизоксиуридин (БДУ) и инкубировали в течение 3 часов. Для определения числа клеток, вступивших в процесс деления, использовали иммунопероксидазный метод [17]. Затем определяли индекс меченых клеток.

Для исследования морфофункциональных особенностей и динамики функциональной клеточной активности дермальных фибробластов различного генеза в системе *in vitro* под влиянием ЭМИ КВЧ шумового диапазона изучали 8

культур фибробластов, полученных из биоптатов неизмененной кожи, и 8 культур фибробластов рубцово-измененной кожи. Культивирование проходило по стандартной технологии в условиях абсолютной влажности, 37°C, 5% CO₂. Для исследования использовали культуры 4–6 пассажа с исходной концентрацией 20000 клеток на 1 см² (лунка культурального планшета). Каждая культура высевалась в шесть лунок (по три опытные лунки и три контрольные) для изучения через 24 часа после воздействия, а также в каждый последующий день исследования. Через 24 часа после посева культура в опытных лунках подвергалась однократному воздействию ЭМИ КВЧ. Динамику фиксировали через 48 и 72 часа после облучения. Доза излучения во всех опытах составляла 1.8 мДж, что соответствовало экспозиции 30 минут. Полученные результаты сравнивали с контрольными клетками из необлученной кюветы.

Морфологический контроль состояния культур в процессе роста осуществляли с помощью инвертированного микроскопа «Leika» и компьютерной программы слежения за ростом культуры. Полученные данные верифицировались с помощью атомно-силовой микроскопии. Изменение состояния культуры в процессе роста фиксировали в течение 5 суток каждые 24 часа, в те же сроки забирали пробы культуральной среды из каждой лунки, которые разливали в микропробирки и замораживали при –40°C для последующего исследования функциональной активности дермальных фибробластов по синтезу одного из основных протеинов межклеточного матрикса фибронектина и медиаторов воспаления: интерлейкина (ИЛ-6) и фактора некроза опухоли (ФНО- α) в опытных и контрольных пробах. Количественное содержание протеинов определяли по методике твердофазного иммуноферментного анализа, проводимого с помощью фотометра «Sunrise», используя наборы реагентов *Bender MedSystems* (Австрия). Фиксировали изменение уровня фибронектина и цитокинов под воздействием ЭМИ КВЧ. Анализ результатов проводился на персональном компьютере по программе *Stadia 6.0*

Результаты и их обсуждение

Визуальное изучение клеток дермальных фибробластов разного генеза при стандартной микроскопии не выявило отчетливых различий. Все культуры формировали приблизительно в равные сроки монослой с характерной картиной и образованием типичного рисунка, сформирован-

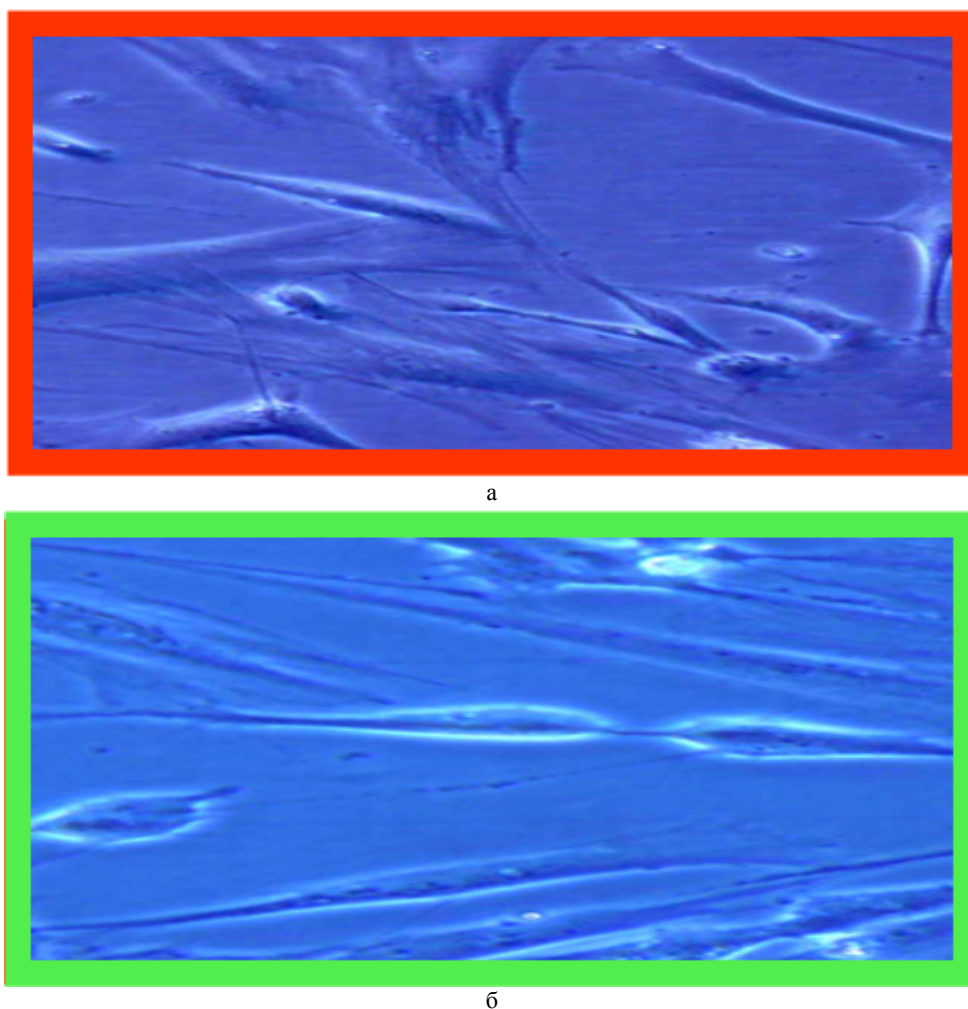


Рис. 1. Клеточный монослой с образованием типичного рисунка культуры дермальных фибробластов в условиях стандартной микроскопии: а – культура фибробластов рубцово-измененной кожи, б – культура фибробластов здоровой кожи

ного преимущественно клетками веретеновидной, реже звездчатой формы с четкими контурами, выраженными отростками и плотными ядрами (рис. 1).

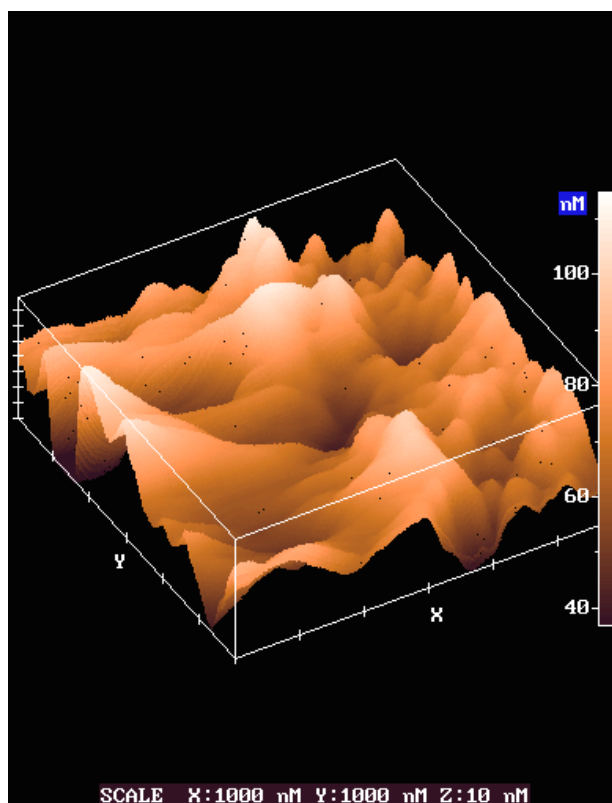
Несмотря на визуальное сходство, при исследовании на ультраструктурном уровне с помощью атомно-силовой микроскопии были зарегистрированы имеющиеся достоверные отличия мембран фибробластов различного генеза (рис. 2, табл. 1).

С позиций полученных данных о морфологических ультраструктурных отличиях дермальных фибробластов различного генеза можно объяснить следующие результаты разнонаправленного воздействия ЭМИ КВЧ на пролиферативную и функциональную клеточную активность, что подтверждает существующую гипотезу о конформации клеточной мембраны как основного аспекта механизма действия ЭМИ КВЧ на организм [18]. Так, при воздействии на фибробласты здоровой кожи был зафик-

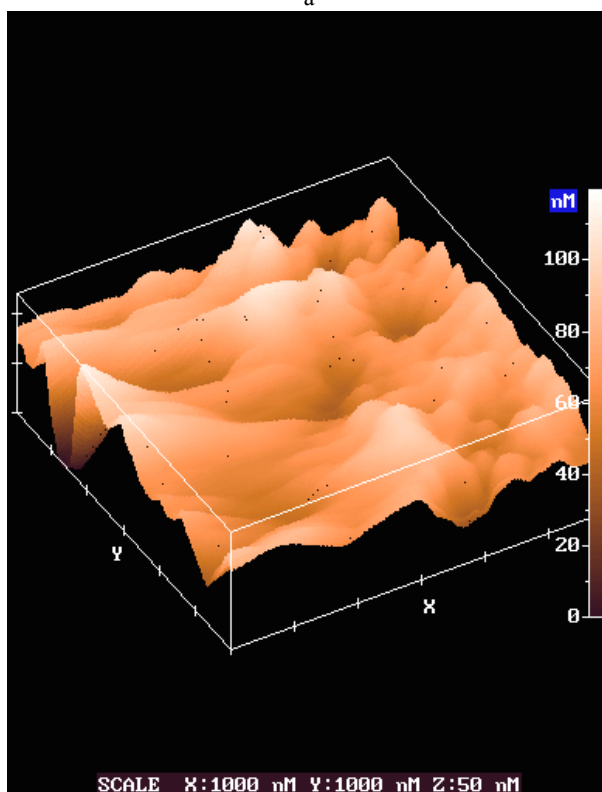
сирован достоверный дозозависимый пролиферативный эффект (рис. 3).

На графике видно, что при дозе 0.6 мДж процент клеток, меченых БДУ, сравним с контролем; при дозах облучения 1.2 и 1.8 мДж (соответствующих экспозициям облучения 20 и 30 минут) этот процент достоверно увеличивался в среднем на 20 и 60% соответственно. Дальнейшее увеличение экспозиции и дозы облучения клеток вело к угнетению стимулирующего эффекта.

Аналогичные результаты были получены при изучении влияния ЭМИ КВЧ в шумовом режиме частотного диапазона 30–170 ГГц с выходной мощностью 1мВт на пролиферативную активность лимфоцитов крови человека в системе *in vitro* [19]. Оказалось, что отклик различных субпопуляций Т-клеток также является функцией времени облучения. Максимальные отклонения в реакции облученных лимфоцитов по сравнению с контрольными клетками наблюдались при экспозиции 20–30 минут, в то время как 60-минутная экспозиция приводила к



а



б

Рис. 2. Достоверные отличия клеточной мембраны на ультраструктурном уровне при атомно-силовой микроскопии: а – поверхность клеток рубцово-измененной кожи, б – поверхность клеток неизменной кожи

нивелированию клеточной активности, сравнимой с необлученным контролем. Совпадение результатов исследований, на наш взгляд, свидетельствует об общей закономерности клеточ-

ных реакций, связанных с процессом адаптации к воздействию микроволн.

Анализ результатов воздействия ЭМИ КВЧ с аналогичными дозировками на клетки рубцово-

Таблица 1
Сравнительная оценка параметров поверхности мембран фибробластов ($M \pm m$) различного генеза при атомно-силовой микроскопии ($p < 0.05$)

Характеристика мембран	R_{\max} *	R_{\min} **	H_{mean} ***
Источники клеток			
Рубцы	347±194	101±44	33±4
Контроль	139±43	76±21	11±2

* Максимальная величина микровыростов мембраны в нанометрах,

** минимальная величина микровыростов мембраны в нанометрах,

*** перепад высот микровыростов мембраны в нанометрах.

Таблица 2
Изменение плотности фибробластов рубцово-измененной кожи на единицу площади после воздействия ЭМИ КВЧ

Сроки культивирования после воздействия ЭМИ КВЧ						
Штаммы клеток	1		2		3	
Время, ч	48	72	48	72	48	72
Группы						
Опыт	33.97	48.56	44.36	55.47	18.01	38.77
Контроль	35.07	47.57	45.23	59.51	21.42	34.92

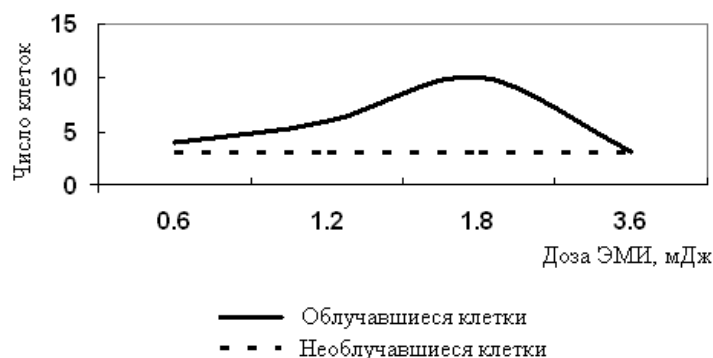


Рис. 3. Зависимость числа клеток дермальных фибробластов, поглотивших БДУ (%), от дозы воздействия ЭМИ КВЧ

измененных культур показал отсутствие статистически достоверного дозозависимого эффекта стимуляции пролиферативной активности, как это отмечалось при облучении здоровых дермальных фибробластов. Результаты подсчета плотности клеток на единицу площади трех штаммов рубцово-измененных фибробластов после облучения их ЭМИ КВЧ с дозой 1.8 мДж через 24, 48 и 72 часа в сравнении с контрольными клетками, не подвергавшимися облучению, представлены в табл. 2.

Зарегистрированный эффект в очередной раз подтверждает мнение [20] о разнонаправленных реакциях организма на ЭМИ КВЧ в норме и при патологии и уточняет механизм действия ЭМИ КВЧ на биообъекты. Этот факт имеет важное прикладное значение для грамотного использования КВЧ-пунктуры в процессе комплексной

медицинской реабилитации больных с последствиями ожогов на стадии формирования кожных рубцов. Принципиальным моментом является достоверное отсутствие стимулирующего пролиферативного эффекта. Кроме того, анализ влияния ЭМИ КВЧ на цитокиновый баланс зарегистрировал различный характер синтеза фибронектина фибробластами разного происхождения. В культурах неизменной кожи после воздействия ЭМИ КВЧ и через 24, и через 48 часов уровень фибронектина не отличался от контроля, в то время как в культурах рубцово-измененной кожи отмечалась отчетливая тенденция к нарастанию синтеза фибронектина (приблизительно на 15%). Эти данные подтверждают известное положение [20] о нормализующем действии миллиметровых волн при наличии каких-либо функциональных отклонений

у биообъекта любого уровня и, вместе с тем, уточняют один из аспектов механизма нормализующего действия ЭМИ КВЧ на процессы репаративной регенерации соединительной ткани через оптимизацию синтеза фибронектина. Поскольку данный протеин способствует выработке нормального коллагена [14], можно предполагать получение целенаправленного терапевтического эффекта ЭМИ КВЧ в целях профилактики образования гипертрофических рубцов. Однако нельзя забывать о соблюдении принципа биоадекватности используемых значений энергии ЭМИ, при которых не нарушается нормальное функционирование организма. Превышение дозы, по мнению [21], может привести к угнетению физиологических реакций – вызывать не только дисфункциональные, но деструктивные нарушения (резкую локальную атонию, пристеночное тромбообразование, деструкцию синапсов, нервных волокон, ультраструктурные повреждения митохондрий, образование вакуолей в цитоплазме). Поэтому высказывания некоторых авторов об отсутствии негативных побочных эффектов воздействия ЭМИ КВЧ правомерно лишь при соблюдении адекватных дозировок.

Воздействие ЭМИ КВЧ на фибробласты различного происхождения по-разному изменяло цитокиновый баланс, отражающий процессы адаптации на клеточном уровне. Продукция ИЛ-6 по сравнению с контролем, нарастала как через 24 часа, так и через 48 часов после облучения. При этом в культурах неизменной кожи нарастание синтеза ИЛ-6 было достоверно интенсивнее, чем в культурах рубцово-измененной кожи. Достоверных отличий изменения уровня ФНО- α в процессе роста культур не выявлено.

Можно предположить, что обнаруженные нами экспериментально ультраструктурные изменения дермальных фибробластов различного генеза на уровне клеточных мембран могут приводить к усилению репаративных процессов, увеличению скорости пролиферации эпидермиса нормализации функциональной активности поврежденных клеток с развитием каскада адаптационных реакций. Подобные локальные изменения, согласно мнению [22], порождают синтез биологически активных веществ в клетках кожи и, тем самым, вызывают эффекты КВЧ на уровне всего организма.

Заключение

Таким образом, нами доказана роль воздействия ЭМИ КВЧ в шумовом режиме излучения,

как управляющего сигнала в развитии биологических эффектов на клеточном уровне, подтвержден пороговый характер эффекта и продемонстрирована зависимость качественных и количественных характеристик ответа клеточной системы от параметров (экспозиции и дозы) действующего сигнала. На ультраструктурном уровне с помощью атомно-силовой микроскопии выявлены достоверные отличия клеточных мембран фибробластов здоровой и рубцово-измененной кожи. Этим, по-видимому, можно объяснить клеточные механизмы реализации действия ЭМИ КВЧ и дифференцированный ответ клеток здоровой и рубцово-измененной кожи в процессе репаративной регенерации соединительной ткани.

Полученные данные могут быть использованы в комплексной медицинской реабилитации больных ортопедо-травматологического профиля как инструмент для воздействия на репаративные процессы в очаге поражения для восстановления или поддержания органотипической регенерации тканевых структур опорно-двигательного аппарата. Результаты также имеют значение для развития представлений о фундаментальных механизмах реакции биообъектов на ЭМИ КВЧ диапазона.

Список литературы

1. Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология). М.: Медицина, 1981. 312 с.
2. Берченко Г.Н. Морфологические аспекты заживления осложненных ран: автореферат дис. ... д-ра мед. наук. М.: Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова, 1997. 43 с.
3. Данилов Р.К., Григорян Б.А., Гололобов В.Г. и др. Экспериментально-гистологический анализ раневого процесса // Вопросы морфологии XXI века. СПб.: СПб ГМА им. И.И. Мечникова: ДЕАН, 2008. Вып. 1. С. 100–104.
4. Каменев Ю.Ф. Применение электромагнитного излучения в травматологии и ортопедии // Миллиметровые волны в биологии и медицине. 1999. № 2. С. 20–24.
5. Полякова А.Г. Использование электромагнитного излучения миллиметрового диапазона в восстановительном лечении больных с патологией опорно-двигательной системы // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. Сер. Биология. 2003. Вып. 1 (6). С. 87–95.
6. Аникеев К.И., Яценко С.К. Влияние КВЧ-терапии на течение репаративного процесса длительно незаживающих ран // Матер. VIII науч.-практ. конф. «Совершенствование диагностики и лечения часто встречающихся заболеваний». Душанбе, 2002. С. 148–149.

7. Лунева И.О., Шуб. Г.М., Островский Н.В. и др. О возможности использования миллиметровых волн в лечении раневой и ожоговой инфекции // Сб. докл. конф. «Миллиметровые волны в биологии и медицине». М.: ИРЭ РАН, 2003. С. 36–37.
8. Гапеев А.Б., Чемерис Н.К. Действие непрерывного и модулированного ЭМИ КВЧ на клетки животных. Часть 1 // Вестник новых медицинских технологий. 1999. Т. 6. № 1. С. 15–22.
9. Медведев Д.С. Механизмы и эффекты лечебного воздействия электромагнитных волн крайне высокой частоты на организм человека // Матер. науч.-практ. конф. «КВЧ-технологии в биологии и медицине». СПб., 2009. С. 102–111.
10. Темурыянц Н.А., Чуян Е.Н. Модификация неспецифических адаптационных реакций с помощью низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты // Сб. докл. конф. «Миллиметровые волны в биологии и медицине». М.: ИРЭ РАН, 2003. С. 87–88.
11. Быков А.Т. Участие адаптации в самовосстановлении // Руководство «Восстановительная медицина и экология человека». М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 200 с.
12. Богданов Н.Н., Мельников В.Н., Островерхий Ю.Н. и др. К проблеме механизма действия КВЧ-терапии // Электронная промышленность. 1991. № 3. С. 76–79.
13. Крылов В.Н., Преснухина Н.Г., Курников Г.Ю. и др. Влияние КВЧ-терапии на липидный спектр и электрокинетические показатели эритроцитов при псориазе // Вестник Нижегородского университета. Сер. Биология. 2004. Вып. 1 (7). С. 21–26.
14. Саркисов Д.С., Амирасланов Ю.А., Алексеев А.А. и др. Структурные основы так называемых пластических свойств соединительной ткани // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1998. Т. 126. № 9. С. 244–248.
15. Корнаузов А.В., Анисимов С.И., Алябина Н.А. и др. Аппарат КВЧ-терапии с шумовым излучением «АМФИТ-0,2/10-01» и некоторые аспекты его применения в медицине // Миллиметровые волны в биологии и медицине. 1999. № 2 (14). С. 49–52.
16. Алейник Д.Я., Заславская М.И., Корнаузов А.В. и др. Некоторые биологические эффекты КВЧ-излучения // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1999. Т. 127. № 5. С. 416–419.
17. Моренков О.С., Манцигин Ю.А. Выявление пролиферирующих клеток с помощью моноклональных антител к бром-дизокси-уредину (БДУ) методом пероксидазы-антипероксидазы // Цитология. 1990. Т. 32. № 12. С. 1225–1229.
18. Бецкий О.В., Кислов В.В., Лебедева Н.Н. // Миллиметровые волны и живые системы. М.: Сайнс пресс, 2004. 271 с.
19. Пивоварова А.И., Веденский О.Ю., Колесник О.Л. и др. Влияние электромагнитного излучения на пролиферативную активность лимфоцитов крови человека *in vitro* // Сб. статей конф. с междунар. участием «Миллиметровые волны нетепловой интенсивности в медицине». М., 1991. С. 408–414.
20. Девятков Н.Д., Голант М.Б. Об информационной сущности нетепловых и некоторых энергетических воздействий электромагнитных колебаний на живой организм // Письма в ЖТФ. 1982. Т. 8. Вып. 1. С. 39–41.
21. Мирютова Н.Ф., Левицкий Е.Ф. Физическая и лечебная значимость так называемых слабых воздействий в физиотерапии // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физкультуры. 2003. № 1. С. 21–25.
22. Воронков В.Н., Завгородний С.В., Хижняк Е.П. и др. Ультраструктурные изменения кожи мышей, вызванные КВЧ-облучением // Сб. докл. 11 Рос. симп. с междунар. участием «Миллиметровые волны в медицине и биологии». М.: ИРЭ РАН, 1997. С. 117–118.

INFLUENCE OF LOW INTENSITY MICROWAVES ON CELLULAR ACTIVITY OF DERMAL FIBROBLASTS OF DIFFERENT GENESIS

A.G. Polyakova, D.Ya. Aleinik

Investigation results are presented on the influence of microwave noise radiation on proliferative and functional cellular activities of dermal fibroblasts of healthy and scar-damaged skin. The obtained data confirm the hypothesis on the different impact of microwaves on healthy and pathologically changed cells, as well as the importance of adaptive reactions at the level of neuro-immune-endocrine interactions in the course of connective tissue reparative regeneration.

Keywords: reparative regeneration, connective tissue, electromagnetic radiation, proliferative activity, adaptive reactions.