

УДК 591.1: 615.849.11

**ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО  
АППАРАТА ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ КРЫС ПРИ ИЗОЛИРОВАННОМ И  
КОМБИНИРОВАННОМ С ГИПОКИНЕЗИЕЙ ДЕЙСТВИИ  
НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭМИ КВЧ**

*Чуян Е.Н., Махонина М.М., Тарков В.Е.*

В настоящее время лимфоциты рассматриваются в качестве центральных клеток иммунной системы, поскольку они обладают уникальными свойствами – высокой изменчивостью, способностью к рециркуляции, обеспечивающими возможность иммунологического надзора, координацию работы иммунологических органов, связь с нейроэндокринной системой [1, 2]. Будучи мигрирующими клетками, лимфоциты способны переносить информацию о формировании метаболических и иммунологических процессов в организме другим клеточным элементам и отражать изменения, происходящие в организме [3, 4]. В то же время, сами клетки обладают регуляторными свойствами, опосредуемыми через систему синтезируемых ими эндогенных иммуномодуляторов – цитокинов [1, 5]. Поэтому лимфоциты имеют такие специфические свойства, которые могут служить индикаторами состояния организма, отражая его адаптивные и патологические изменения, что дало основание Р.П. Нарциссову [6] сформулировать положение о том, что исследование функциональной активности лимфоцитов периферической крови является «биопсией внутренних органов», «энзиматическим зеркалом организма», отражением его обменных процессов. В связи с этим лимфоциты, обладающие высокой чувствительностью к внешним воздействиям, служат удобным объектом исследования при изучении биологических эффектов факторов различной природы и интенсивности, в частности, низкоинтенсивных электромагнитных излучений (ЭМИ).

В многочисленных исследованиях показано, что наиболее остро реагирующими на действие ЭМИ крайне высокой частоты (КВЧ) являются клетки иммунной системы и периферической крови. В частности, зарегистрировано увеличение количества Т- и В-лимфоцитов [7], усиление функциональной активности лимфоцитов [8], изменение уровня хемилюминесценции лейкоцитов [9], увеличение синтеза цитокина, оказывающего на лимфоциты и фибробласты человека действие, подобное фактору роста [10]. Вместе с тем, изменение функциональной активности этих клеток под влиянием ЭМИ КВЧ изучается в основном *in vitro* [11, 12], однако, исследования функций отдельных клеток не могут дать полной информации о сложных процессах, происходящих в организме при воздействии ЭМИ КВЧ, тем

более, экспериментально доказано, что ответы на КВЧ-воздействие изолированных клеток часто не совпадают с таковыми, выявленными после общего облучения животных [13]. По-видимому, это связано с тем, что восприятие информационных ЭМИ возникает на уровне сложноорганизованных биологических систем и полностью проявляется только в целостном организме [14]. Поэтому необходимо изучение изменения функциональной активности лимфоцитов периферической крови при воздействии ЭМИ КВЧ *in vivo* с учетом многочисленных функциональных связей между органами и системами органов и отклика на уровне физиологических реакций целого организма.

Одним из наиболее перспективных методов изучения функционального состояния иммунокомпетентных клеток является люминесцентный микроспектральный анализ [15]. Исследование синтетической (функциональной) активности лимфоцитов крови флуоресцентным микроспектральным методом является способом интегральной оценки состояния не только иммунной системы, но и процессов, происходящих в целом организме [16, 17]. Однако изменение синтетической активности лимфоцитов при воздействии ЭМИ КВЧ не изучено.

В связи с этим, целью нашего исследования явилось изучение изменения функционального состояния синтетического аппарата лимфоцитов крови крыс под действием ЭМИ КВЧ и его комбинации с экспериментальной стресс-реакцией.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены на 60 беспородных белых крысах-самцах массой 120-150 г., полученных из опытно-экспериментального питомника Института гигиены и медицинской экологии, фирма «Феникс» (г. Киев). Для эксперимента отбирали животных одинакового возраста, характеризующихся средним уровнем двигательной активности и низкой эмоциональностью в тесте «открытого поля». Подобный отбор позволил сформировать однородные группы животных, однотипно реагирующих на действие различных факторов. Предварительно отобранные животные были разделены на четыре группы по 15 особей в каждой. К первой группе были отнесены животные, содержащиеся в обычных условиях вивария (биологический контроль, К). Вторую группу составили крысы, подвергнутые действию стресса. Стресс индуцировался путем ограничения подвижности (гипокинезия – ГК). ГК создавалась помещением крыс в специальные пеналы из оргстекла, в которых они находились в течение 9 дней эксперимента по 22 часа в сутки. Животные третьей группы подвергались изолированному воздействию ЭМИ КВЧ (КВЧ). В четвертую группу вошли животные, находившиеся в условиях ГК и одновременно подвергавшиеся воздействию ЭМИ КВЧ (ГК+КВЧ). Воздействие ЭМИ КВЧ осуществлялось в течение 9 суток с помощью генератора «Луч. КВЧ-071» на затылочно-воротниковую область по 30 мин ежедневно ( $\lambda=7,1$  мм, плотность потока мощности 0,1 мВт/см<sup>2</sup>).

Кровь для исследования брали из хвостовой вены перед экспериментальными воздействиями (фон), на четвертые и девятые сутки эксперимента.

Обработка мазков крови проводилась в соответствии с методикой В.Н. Карнаухова и Н.А. Карноуховой [15-17]. Сухие мазки крови фиксировали в жидкости Карнуа (этанол: хлороформ: ледяная уксусная кислота – 6:3:1) в течение

**ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА  
ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ КРЫС ПРИ ИЗОЛИРОВАННОМ И КОМБИНИРОВАННОМ С  
ГИПОКИНЕЗИЕЙ ДЕЙСТВИИ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭМИ КВЧ**

10 мин, затем проводили через ряд нисходящих спиртов. Мазки, отмытые после фиксации, выдерживали 4 мин в цитрат-фосфатном буфере (рН 4.2) и окрашивали раствором акридинового оранжевого (АО) ( $10^{-4}$  М) на том же буфере в течение 10 мин. После отмывания в двух порциях цитрат-фосфатного буфера в течение 10 мин мазки накрывали покровным стеклом.

Окрашенные мазки исследовали методом микроспектрального флуоресцентного анализа с использованием люминисцентного микроскопа МЛ-4 с фотометрической насадкой ФМЭЛ-К. В данной работе исследованы лимфоциты без видимых повреждений в структуре (рис. 1). Спектры люминесценции регистрировались с помощью микрофлуориметра, возбуждение люминесценции осуществлялось на длине волны 436 нм. Размер фотометрируемого участка соответствовал размерам клетки.

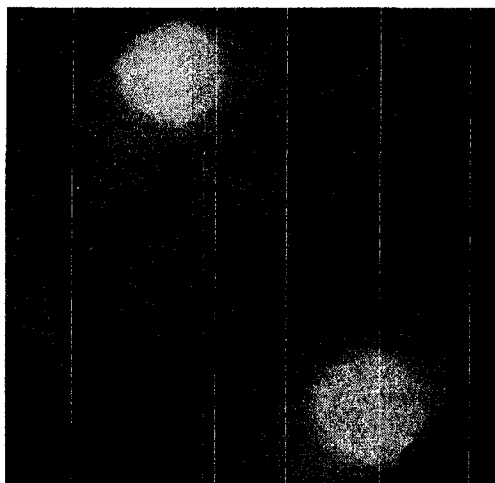


Рис. 1. Свечение окрашенных акридиновым оранжевым ядер лимфоцитов при возбуждении люминесценции длиной волны 436 нм.

Функциональное состояние синтетического аппарата клетки описывается безразмерным параметром  $\alpha$ , представляющим собой отношение флуоресценции в красной ( $I_{640}$ ) и зеленой ( $I_{530}$ ) областях спектра лимфоцитов, окрашенных АО. Флуоресценция в красной области спектра обусловлена димерами АО, связанными с односпиральными нуклеиновыми кислотами (преимущественно функционально активной рибосомальной РНК в зрелых дифференцированных клетках), в то время как в зеленой – мономерами АО, интеркалированными в двуспиральные нуклеиновые кислоты (преимущественно ДНК):

$$\alpha = \frac{I_{640}}{I_{530}} = \frac{k_1 \text{НК}_1}{k_2 \text{НК}_2} = \frac{K(\text{АРНК})}{\text{ДНК}},$$

где АРНК – активная компонента РНК одиночной клетки;  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $K$  – коэффициенты связывания АО с нуклеиновыми кислотами (НК) [16].

Изменение параметра  $\alpha$  при различных функциональных состояниях клетки главным образом связано с окрашиванием односпиральных областей РНК.

Это было подтверждено нами с помощью обработки препаратов раствором РНКазы, которая значительно уменьшала красную флуоресценцию, в то время как зеленая практически не менялась (табл. 1).

Таблица 1. Флуоресцентные характеристики лимфоцитов крови крыс до и после обработки РНКазой

Условия измерения	Длина волны флуоресценции		$\alpha$
	530 нм	640 нм	
В отсутствии РНКазы	8,80±0,76	4,23±0,33	0,64±0,04
В присутствии РНКазы	8,21±0,71	0,97±0,08	0,16±0,01

Таким образом, изменение параметра  $\alpha$  при различных функциональных состояниях клетки, как по нашим данным, так и по данным авторов методики, главным образом связано с окрашиванием односпиральных РНК [17].

Для определения достоверности между выборками использовался критерий Стьюдента.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты проведенных исследований, средние значения параметра  $\alpha$  для контрольных животных лежали в диапазоне от 0,6 до 0,8, что соответствует данным авторов методики [17].

Функциональное состояние синтетического аппарата лимфоцитов животных изменялось при различных воздействиях (рис. 2).

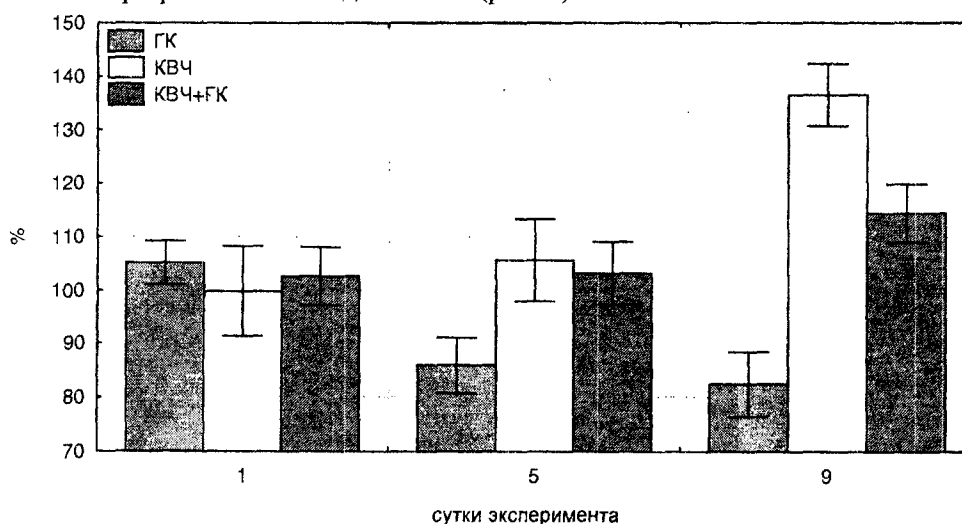


Рис. 2. Изменение показателя  $\alpha$  при воздействии гипокинезии (ГК), ЭМИ KBЧ (KBЧ) и их комбинации (ГК+KBЧ) (в % относительно значений в контрольной группе.)

Действие ЭМИ KBЧ на интактных животных проявилось в тенденции к увеличению показателя синтетической активности лимфоцитов на четвертые сутки эксперимента и его достоверном увеличении на девятые сутки на 36,5% ( $p < 0,001$ )

## ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ КРЫС ПРИ ИЗОЛИРОВАННОМ И КОМБИНИРОВАННОМ С ГИПОКИНЕЗИЕЙ ДЕЙСТВИИ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭМИ КВЧ

относительно значений этого показателя в контрольной группе животных, что свидетельствует о повышении активности иммунной системы.

Под влиянием девятисуточной ГК происходило уменьшение параметра  $\alpha$  на 17,6% ( $p < 0,001$ ) относительно значений этого показателя в контрольной группе, что, вероятно, являлось результатом неспецифической депрессии синтетических процессов в клетках и связано с нарушением метаболизма и энергетики лимфоцитов, происходящим в результате развития стресс-реакции.

Комбинированное воздействие ЭМИ КВЧ и ГК вызвало достоверное повышение параметра  $\alpha$  относительно такового у животных, также находившихся в условиях ГК, но дополнительно не подвергавшихся действию ЭМИ КВЧ. Так, на четвертые сутки значение параметра  $\alpha$  было выше на 17,4% ( $p < 0,01$ ), а на девятые на 32% ( $p < 0,05$ ) относительно значений этого показателя у гипокинезированных животных. При этом данный коэффициент не имел достоверных отличий при сопоставлении его с контрольными значениями в течение всего эксперимента ( $p > 0,05$ ).

В исследованиях авторов использованной нами методики В.Н. Карнаухова и Н.А. Карнауховой показано изменение показателя  $\alpha$  у животных при остром и хроническом  $\gamma$ -облучении [17], воздействии слабых низкочастотных полей [18], изменении солнечной активности [19]. Наши исследования продемонстрировали чувствительность этого параметра к действию факторов как высокой интенсивности (стресс-фактор), так и низкоинтенсивное (ЭМИ КВЧ).

### ВЫВОДЫ

При воздействии ЭМИ КВЧ произошло увеличение синтетической активности, что свидетельствует о повышении уровня иммунной резистентности организма и подтверждает наши предыдущие исследования, в которых показана способность ЭМИ КВЧ изменять параметры иммунных реакций организма посредством увеличения функциональной активности лимфоцитов и нейтрофилов крови и содержания цитокинов в крови (интерферона- $\gamma$  и фактора некроза опухолей- $\alpha$ ) у животных, подвергнутых ограничению подвижности и/или инфицированию [20].

### Список литературы

1. Абрамов В.В. Взаимозависимость функционирования иммунной и нервной систем // Успехи соврем. биологии. – 1991. – Т. 111, № 6. – С. 840 – 843.
2. Хаитов Р.М., Лесков В.П. Иммуитет и стресс // Российский физиол. журнал им. И.М. Сеченова. – 2001. – Т. 87, № 8. – С. 1060-1072.
3. Кузнецов С.И., Семенова И.В. Клетки иммунной системы как посредники в реакции других систем организма на стрессорное воздействие // Пат. физиология и экспериментальная терапия. – 1997. – № 2. – С. 27-29.
4. Робинсон М.В., Топоркова Л.Б., Труфакин В.А. Морфология и метаболизм лимфоцитов. – Новосибирск: Наука. 1986. – 125 с.
5. Пальцев М.А., Иванов А.А. Межклеточные взаимодействия. – М., 1995. – 346 с.
6. Нарциссов Р.П. Прогностические возможности клинической цитохимии // Советская педиатрия. – 1984. – Вып. 2. – С. 267-294.
7. Лобода В.Ф., Зоря Л.В., Боярчук О.Р. Імунорегулююча дія НВЧ-терапії при хронічній гастродуоденальній патології у дітей // Матеріали І національного конгресу фізіотерапевтів і курортологів України «Фізичні чинники в медичній реабілітації». – Хмельник. – 1998. – С. 112-113.

8. Хоменко А.Г., Новикова Л.Н., Каминская Г.О., Ефимова Л.Н., Голант М.Б. Оценка функционального статуса фагоцитов крови при выборе оптимального режима КВЧ-терапии у больных туберкулезом легких // Сб. докладов 10 Российск. симпоз. с междуна. участием «Миллиметровые волны в биологии и медицине». – М.: МТА КВЧ. – 1995. – Т. 9-10. – С. 13-15.
9. Мудрик Д.Г., Голант М.Б., Извольская В.Е. Исследование хемилюминесценции лейкоцитов крови человека после воздействия низкоинтенсивного электромагнитного поля крайне высокой частоты // Сб. докладов 10 Российск. симпоз. с междуна. участием «Миллиметровые волны»
10. Говалло В.И., Барер Ф.С., Волчек И.А. Продукция ЭМИ-облученными лимфоцитами и фибробластами человека фактора, активирующего пролиферацию клеток // Сб. докл. Межд. симп. «Миллиметровые волны в медицине». – Т. 2. – М.: ИРЭ АН СССР. – 1991. – С. 340-344.
11. Аловская А.А., Габдулхакова А.Г., Гапеев А.Б., Дедкова Е.Н., Софронова В.Г., Фесенко Е.Е., Чемерис Н.К. Биологический эффект ЭМИ КВЧ определяется функциональным статусом клеток // Вестник новых медицинских технологий. – 1998. – Т. 5, № 2. – С. 11-14.
12. Гапеев А.Б., Чемерис Н.К. Действие непрерывного и модулированного ЭМИ КВЧ на клетки животных. Обзор Часть I. Особенности и основные гипотезы о механизмах биологического действия ЭМИ КВЧ // Вестник новых медицинских технологий. – 1999. – Т. 6, № 1. – С. 15-22.
13. Огай В.Б., Новоселова Е.Г., Фесенко Е.Е. Исследование влияния низкоинтенсивного электромагнитного излучения сантиметрового и миллиметрового диапазонов на пролиферативную и цитотоксическую активность лимфоцитов селезенки мышей // Биофизика. – 2003. – Т. 48, вып. 3. – С. 511-520.
14. Лушников К.В., Гапеев А.Б., Садовников В.Б., Чемерис Н.К. Влияние крайневисокочастотного электромагнитного излучения низкой интенсивности на показатели гуморального иммунитета здоровых мышей // Биофизика. – 2001. – Т. 46, № 4. – С. 753-760.
15. Карнаухов В.Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки. – М., 1978. – 209 с.
16. Карнаухова Н.А. Люминесцентные параметры ядерных клеток крови в процессе иммунного ответа организма // Биофизика – 1984. – Т. 29, № 2. – С. 276-279.
17. Карнаухова Н.А., Сергиевич Л.А., Аксенова Г.Е. Изменение флуоресцентных характеристик окрашенных акридиновым оранжевым лимфоцитов крови крыс после острого  $\gamma$ -облучения. // Биофизика – 1994. – Т. 39, № 1. – С. 123-128.
18. Карнаухова Н.А., Сергиевич Л.А., Квакина Е.Б., Барсукова Л.П., Марьяновская Г.Я., Кузьменко Т.С. Исследование функционального аппарата лимфоцитов крови при действии слабых низкочастотных магнитных полей // Биофизика – 2000. – Т. 45, № 4. – С. 716-722.
19. Карнаухов В.Н. Спектральный анализ в клеточном мониторинге состояния окружающей среды. М.: Наука, 2001, – 186 с.
20. Чуян Е.Н., Темуриянц Н.А., Московчук О.Б. и др. Физиологические механизмы биологических эффектов низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ. – Симферополь: ЧП «Эльниньо», 2003. – 448 с

*Поступила в редакцию 15.11.2004 г.*