

ДЕГРАНУЛЯЦИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК КОЖИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ КРАЙНЕ ВЫСОКОЙ ЧАСТОТЫ

© 2001 г. В.И. Попов, В.В. Рогачевский, А.Б. Гапеев, Р.Н. Храмов*, Н.К. Чемерис, Е.Е. Фесенко

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущина Московской области;

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущин о Московской области

Поступила в редакцию 13.07.01 г.

С использованием световой и электронной микроскопии показано, что локальное воздействие низкоинтенсивным (50 мкВт/см^2) электромагнитным излучением крайне высокой частоты (42,0 ГГц) на проекцию точки акупунктуры МС-8 лао-гун лапы крысы приводит к дегрануляции тучных клеток дермы. Предполагается, что реакция тучных клеток кожи может быть важным усилительным механизмом в цепочке событий, ведущих к системному отклику организма на воздействие низкоинтенсивного электромагнитного излучения.

Ключевые слова: электромагнитное излучение крайне высокой частоты, кожа, точки акупунктуры, тучные клетки, морфологический анализ, электронная микроскопия.

Использование электромагнитного излучения крайне высоких частот (ЭМИ КВЧ) низкой интенсивности в клинической практике широко известно [1-4]. ЭМИ КВЧ применяется для профилактики, диагностики и лечения различных заболеваний. Значительные успехи были достигнуты при лечении ревматических артритов, остеоартритов, язвы пищевода, язвы желудка и двенадцатиперстной кишки, острой и хронической боли, гипертонии, рака, простатитов, ран, ишемических язв кожи, алкоголизма и злоупотребления наркотиками. Однако, несмотря на впечатляющие успехи КВЧ-терапии, ее применение пока строится на эмпирически полученных эффектах и слабо подкреплено знаниями о физико-химических механизмах биологического действия излучения этого диапазона.

Проблема первичной рецепции ЭМИ КВЧ на уровне целого организма до сих пор остается нерешенной. Также неясна взаимосвязь первичной рецепции ЭМИ КВЧ и реализации биохимического отклика на уровне отдельных клеток, тканей, органов и систем организма. Считается, что при облучении организма ЭМИ КВЧ может проникать в кожу по крайней мере на глубину 1 мм и, следовательно, достигает микроцирку-

ляторной системы кожи. Средняя толщина кожного покрова человека по некоторым оценкам составляет около 2 мм, включая толщину эпидермиса, равную 100-150 мкм. Характер кровотока в сосудистой сети кожи человека и большинства животных можно наблюдать главным образом в сосочковых капиллярах и на уровне горизонтального субпапиллярного сплетения [5]. Свойства кожи как регулятора различных физиологических функций широко используются в практической медицине: акупунктура, массаж, грязевые аппликации, горячие и холодные обливания, горчичники, мази и многие другие фармакологические и физические воздействия.

Кожа является первым барьером на пути любого физико-химического воздействия и, следовательно, ее элементы могут выполнять роль первичных рецепторов, в том числе ЭМИ КВЧ низкой интенсивности. В коже содержится большое количество различных нервных окончаний, которые участвуют, по крайней мере, в терморегуляции и механорецепции [5]. Особую роль в коже играют тучные клетки. Через тучные клетки осуществляется сложный каскад биохимических реакций, обеспечивающий синдром боли; тучные клетки содержат гистамин и ряд других физиологически активных веществ, вызывающих и пролонгирующих расширение капилляров с последующим выбросом из капилляров как всех компонентов сыворотки, в том

Сокращение: ЭМИ КВЧ - электромагнитное излучение крайне высоких частот.

числе и антител, так и клеточных элементов (например, диапедоз эритроцитов, выход в дерму различных лимфоидных клеток и т.д.). При дегрануляции тучных клеток также высвобождаются различные протеазы, стимулирующие секрецию α_2 -макроглобулина макрофагами, который является мощным радиопротектором и значимым гуморальным фактором эндогенного противоракового контроля [6]. Практически все системные заболевания организма человека так или иначе опосредуются через кожу, что, в частности, вызывает изменения ее структуры. Не менее интересен другой аспект кожи, а именно расположение на поверхности тела человека и животных специфических меридианов и точек акупунктуры, которые широко используются в рефлексотерапии [7]. Количественные морфо-метрические исследования кожи вдоль линий меридианов показали [8], что количество тучных клеток в этих зонах достоверно больше по сравнению с соседними участками на 34 и 43% для крысы и человека соответственно. Ранее мы предположили, что первичной клеточной мишенью при действии ЭМИ КВЧ на кожу являются тучные клетки, в которых после облучения происходила дегрануляция [9].

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы был анализ морфологических и функциональных изменений в тучных клетках кожи при облучении отдельных участков тела животного ЭМИ КВЧ низких (нетепловых) интенсивностей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты были проведены на 10 молодых крысах-самцах линии Вистар массой 100-120 г. За 30 мин до начала эксперимента животных анестезировали подкожным введением 100 мг/кг веронала. Животные были разделены на две группы по пять крыс в каждой - контрольную и опытную.

В качестве источника ЭМИ КВЧ использовали генератор Г4-141. Стабильность частоты генератора составляла $\pm 0,05\%$, паразитная девиация частоты выходного сигнала в режиме непрерывной генерации была не более 6 МГц. Частота выходного сигнала контролировалась волномером Ч2-25. Максимальная измеренная с помощью термисторной головки М5-49 выходная мощность генератора составляла 50 мВт. В качестве антенны использовали широкополосный желобковый излучатель с апертурой 17,5 x 12,5 мм, разработанный фирмой «ПИРС» (Особое конструкторское бюро информационных технологий, Россия) [10]. В опытной группе

облучали кожу внутренней поверхности кисти правой лапы крысы в дальней зоне желобкового излучателя (40 см от его торца) в течение 20 мин. Участок облучения кожи соответствовал проекции точки акупунктуры МС-8 лао-гун [7]. Чтобы остальная часть тела крысы не подвергалась облучению, ее экранировали от ЭМИ КВЧ эффективным многослойным поглотителем, не вызывающим искажения структуры электромагнитного поля в плоскости облучаемого объекта. Использовали частоту излучения 42,0 ГГц, приведенная к поверхности кожи плотность потока энергии излучения составляла 50 мкВт/см². Крысы контрольной группы помещали на 20 мин в зону облучения при отсутствии энергии на выходе излучателя (условия имитации облучения). Через 15 мин после процедур облучения или имитации облучения брали биопсию участка облученной кожи животного в проекции точки акупунктуры.

Образцы кожи размером 2 x 2 мм иссекали до подкожной фасции и фиксировали в растворе 3% параформальдегида и 2,5% глутарового альдегида в течение 2-4 ч с последующей фиксацией в 1% растворе четырехоксида осмия (2-12 ч). Оба фиксатора были приготовлены на 0,1 М Na-какодилатном буфере (рН 7,2-7,4). Фиксацию проводили при комнатной температуре. Образцы обезживали в серии возрастающего по концентрации этанола и в 100% ацетоне. Далее образцы полимеризовали при 70°C в смеси эпоксидных смол эпон 812 / аралдит М. После полимеризации из всех образцов были приготовлены 150-200 серийных полутонких срезов (толщиной 2 мкм) на ультрамикротоме Reichert (Австрия) с помощью стеклянных ножей. Срезы окрашивали метиленовым синим/азуром II и основным фуксином. Морфологический анализ проводили на световом микроскопе «Перавал-Интерфако» (Карл Цейс, Йена, Германия). Ультратонкие срезы толщиной 70-90 нм готовили на том же ультрамикротоме, окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца стандартным способом и исследовали в электронном микроскопе JEOL 100В (Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Эксперимент проводили по условиям двойного слепого метода. Животные были рандомизированы, и экспериментатор, проводивший облучение животных ЭМИ КВЧ, не знал, есть ли излучение на выходе генератора. Биопсийный материал был пронумерован случайным образом, и экспериментатор, проводивший морфологический анализ, не знал, какому из образцов принадлежит конкретный срез.

Для количественного анализа подсчитывали число гранул на профиль тучной клетки для 2-3 проекций клеток, выбранных случайным образом на каждом из срезов. После идентификации образцов строили суммарные гistogramмы распределений тучных клеток по количеству гранул на профиль клетки для контрольных и облученных образцов. Статистический анализ данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы показали, что после облучения ЭМИ КВЧ (60 ГГц, 50 мВт/см², 5 мин) кожи крысы в области проекции точки акупунктуры МС-8 происходила дегрануляция тучных клеток и расширение капилляров [9]. На основе этих данных мы предположили, что первичной клеточной мишенью при действии ЭМИ КВЧ на кожу могут быть тучные клетки. Позднее подобные исследования были продолжены [11,12]. Было подтверждено, что при действии ЭМИ КВЧ с частотой 52 ГГц и плотностью потока энергии 50 мВт/см² происходит расширение капилляров в сосочковом слое дермы, диapedез элементов крови в межклеточный матрикс дермы, наблюдается уменьшение числа гранул в тучных клетках [11]. Кроме того, ЭМИ КВЧ с частотой 42 ГГц и плотностью потока энергии 50 мВт/см² вызывало морфологические изменения в нервах кожи [12]. Однако в цитируемых работах используемая интенсивность излучения была столь высока (перегрев на поверхности кожи составлял 3-4°C), что обнаруженные эффекты объясняются авторами исключительно с позиций теплового механизма действия КВЧ-излучения. Применение ЭМИ КВЧ столь высоких интенсивностей в медицинской практике стало уже исключением из правил. В рамках данного исследования мы поставили задачу провести не только качественный, но и количественный анализ морфологических изменений тучных клеток кожи при действии ЭМИ КВЧ низких интенсивностей, не вызывающих нагрев облучаемого объекта.

Типичная структура точки акупунктуры представлена на полутонких срезах (толщина 1-2 мкм) (рис. 1а,б). В точках акупунктуры наблюдается скопление инкапсулированных миелинизированных нервных окончаний и капилляров, которые сопровождаются относительно многочисленными тучными клетками, богатыми гранулами (рис. 1а,б). Гистологические исследования позволили провести качественный анализ изменений в коже после действия ЭМИ КВЧ. Из 10 исследованных образцов кожи све-

томикроскопический анализ позволил качественно (по видимой плотности гранул на профиль тучной клетки) идентифицировать 8 образцов, 2 образца не были идентифицированы: один контрольный и один после облучения. После действия низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ с частотой 42,0 ГГц наблюдалась дегрануляция тучных клеток. Качественный анализ на полутонких срезах не позволяет точно оценить степень изменений при действии ЭМИ КВЧ. Поэтому мы использовали ультраструктурный анализ.

На рис. 2а,б показана типичная ультраструктура тучных клеток, содержащих многочисленные гранулы. Как видно на рис. 2в,г, после облучения происходит их дегрануляция с выбросом гранул в экстраклеточное пространство. Важной особенностью тучных клеток после действия ЭМИ КВЧ является наличие в них более крупных гранул с относительно низкой электронной плотностью. Подсчет числа гранул на профиль тучной клетки был произведен на 137 профилях клеток на срезах контрольных образцов и на 146 профилях клеток на срезах опытных образцов. После усреднения по всем контрольным и опытным образцам оказалось, что среднее число гранул на профиль тучной клетки в контроле составило $61,8 \pm 1,8$, в опыте - $52,2 \pm 1,5$ (указаны стандартные ошибки). Отметим высокую степень достоверности полученных данных ($p < 0,00005$), несмотря на то, что имелись образцы, которые по среднему числу гранул на профиль тучной клетки не удалось правильно отнести к соответствующей группе. Суммарные гistogramмы распределения тучных клеток по числу гранул на профиль клетки показаны на рис. 3. Исходя из формы полученных распределений, можно сделать следующие выводы. Для контрольных образцов полученное распределение подобно нормальному распределению Гаусса. Для облученных образцов максимум распределения смещается в сторону меньшего числа гранул на профиль клетки. Это может свидетельствовать о дегрануляции тучных клеток, содержащих, по-видимому, наибольшее число гранул.

Существенно, что каких-либо изменений в структуре миелина инкапсулированных нервных окончаний не было выявлено (рис. 2г,д). Т.е. при выбранных нами условиях воздействия низкоинтенсивное ЭМИ КВЧ, вызывая дегрануляцию тучных клеток, не влияло на структуру миелина в отличие от данных, приводимых в работе [13]. Важно также отметить, что свето-микроскопический и ультраструктурный анали-

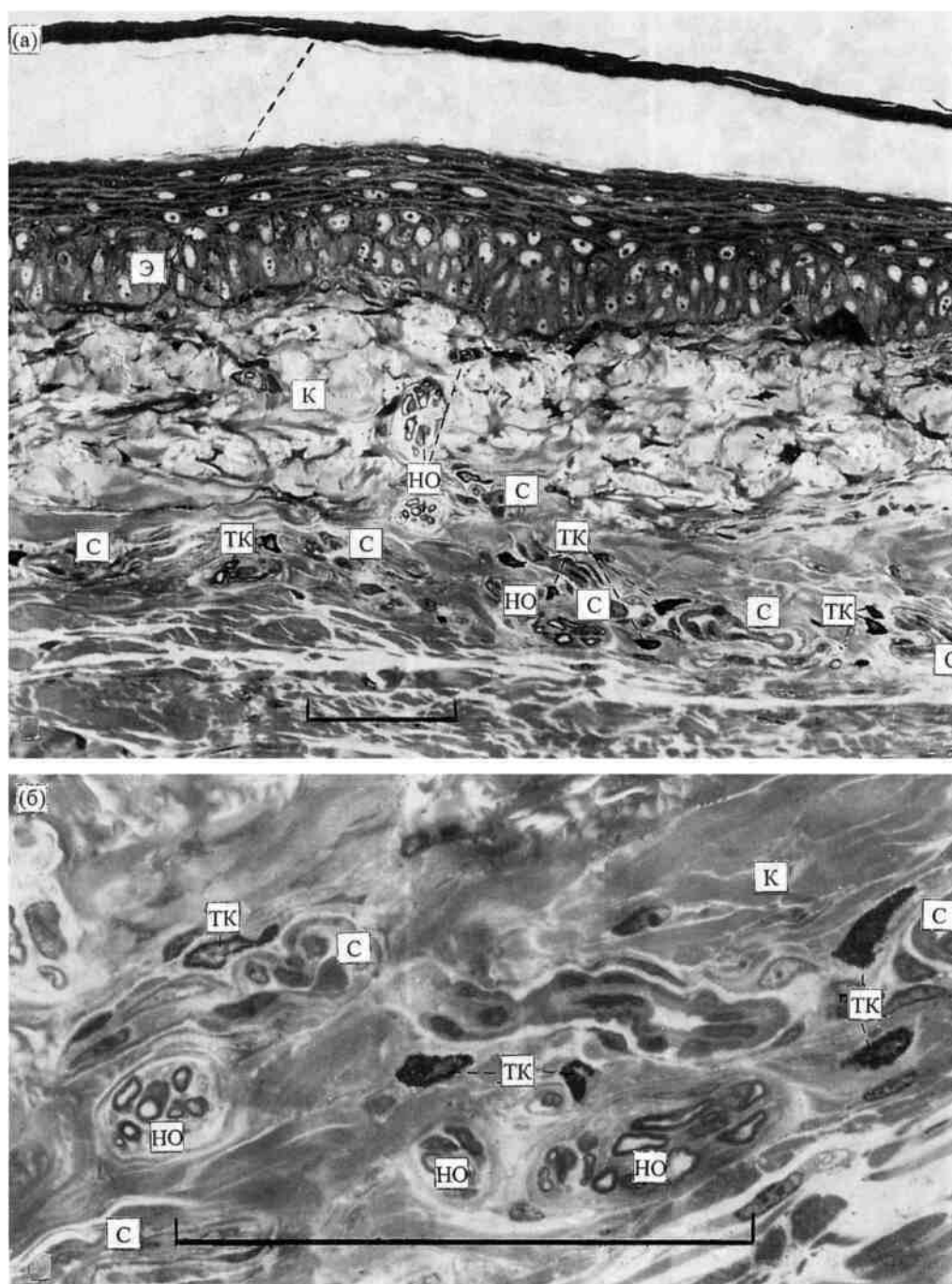


Рис. 1. Морфология участка кожи в точке акупунктуры МС-8 лао-гун характеризуется скоплениями в дерме многочисленных нервных окончаний (НО), кровеносных сосудов (С), представленных капиллярами. Как нервные окончания, так и капилляры сопровождаются тучными клетками (ТК). Э - эпидермис с отслоившимся роговым слоем; К - коллагеновые фибриллы. Шкала - 100 мкм.

зы не выявили качественных изменений непосредственно в самом эпидермисе и в дерме.

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что дегрануляция тучных клеток *in vivo* может быть использована как относительно

простой критерий для оценки эффекта излучения даже при условии нетепловых интенсивностей ЭМИ КВЧ. Известно, что тучные клетки могут модифицировать целый спектр воспалительных и иммунологических процессов, ответственных за системный отклик организма, бла-

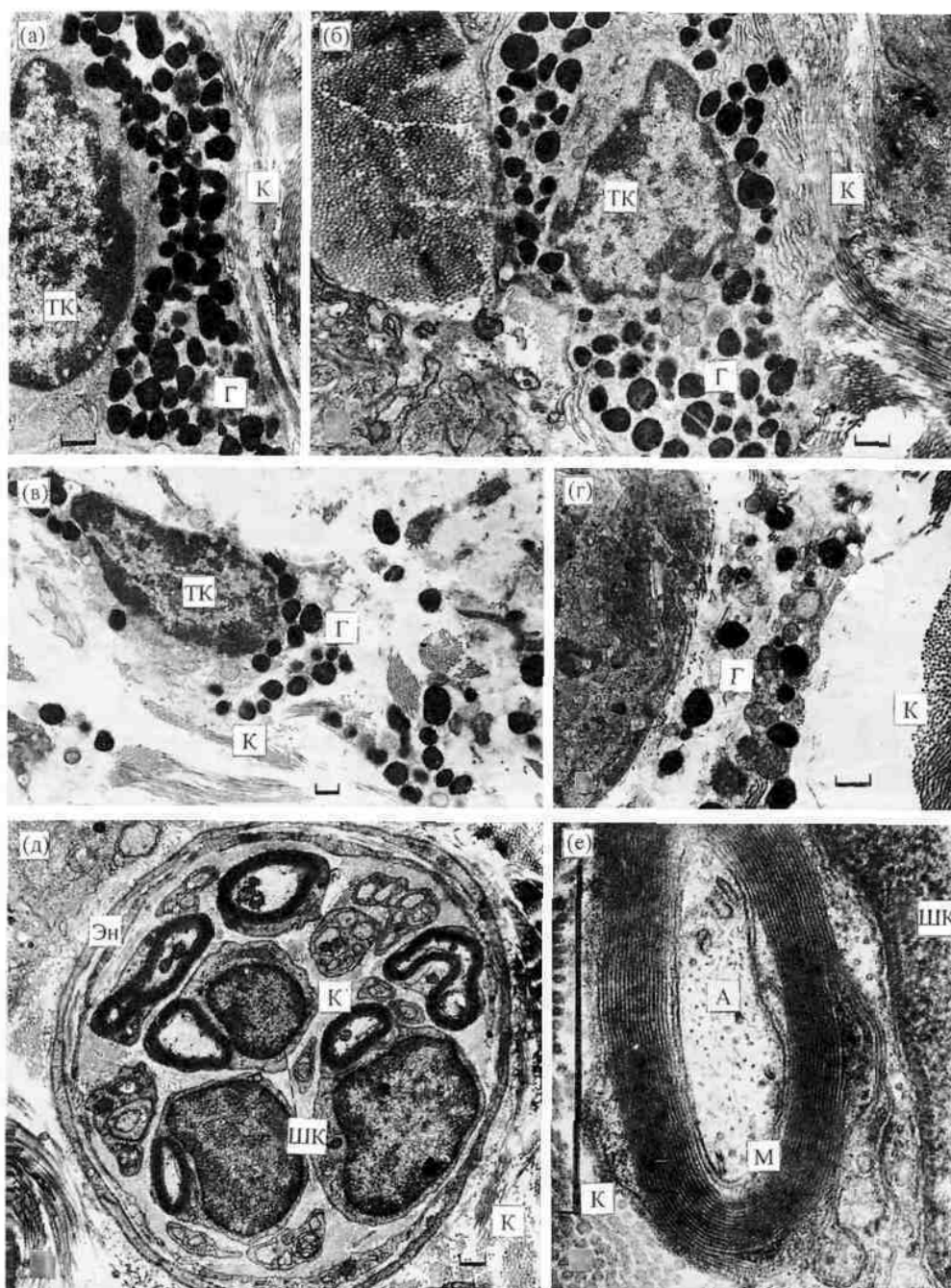


Рис. 2. Ультраструктура тучных клеток (ТК) в контроле (а,б) и после облучения ЭМИ КВЧ (в,г). Видно, что в контроле гранулы (Г) плотно упакованы в цитоплазме тучных клеток, плазматическая мембрана которых имеет многочисленные цитоплазматические выросты (б). После облучения (в,г) происходит дегрануляция тучных клеток с выбросом гранул в экстраклеточное пространство и исчезновение цитоплазматических выростов на плазматической мембране (в). После облучения не обнаружено нарушений в ультраструктуре капсулированных нервных окончаний (НО) как на уровне эндотелия (ЭН), швановских клеток (ШК), так и в структуре образуемых ими миелиновых (М) оболочек (д,е), окружающих, в частности, аксоны (А). К - коллагеновые фибриллы. Шкала - 1 мкм.

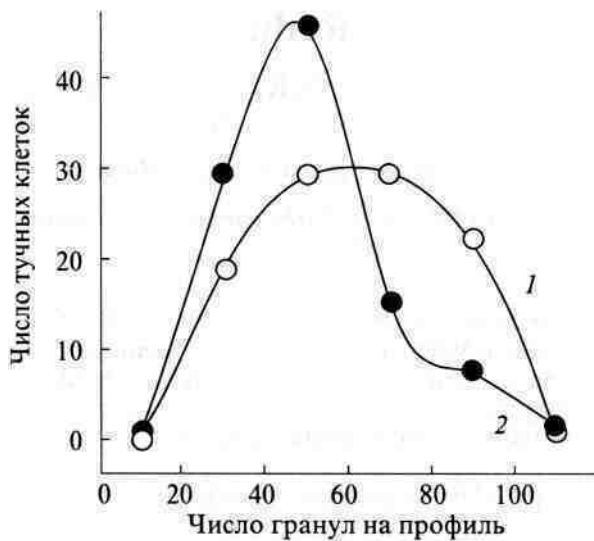


Рис. 3. Гистограмма распределения тучных клеток по числу гранул на профиль тучной клетки в контрольных (1) и в облученных ЭМИ КВЧ (42,0 ГГц, 50 мкВт/см², 20 мин) образцах (2).

годаря своей способности синтезировать, накапливать и секретировать ряд биологически активных веществ. Тучные клетки являются инициаторами реакции соединительной ткани и сосудов, взаимодействия между соединительной тканью и плазмой крови, регулируют проницаемость сосудов микроциркуляторного русла и функции клеток соединительной ткани и крови. Наличие реакции тучных клеток в ответ на облучение указывает на необходимость исследования реактивности других иммунокомпетентных клеток как эпидермиса, содержащего так называемые мононуклеарные дендритные клетки, которые относятся к различным Т-клеткам и клеткам Лангерганса, так и дермальных макрофагов.

Необходимо отметить, что в условиях *in vitro* не удается инициировать заметной дегрануляции выделенных перитонеальных тучных клеток крыс при действии нетепловых излучений как светового (630 нм) [14], так и КВЧ-диапазонов. Однако *in vivo* дегрануляция тучных клеток наблюдается как при действии низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ, так и при действии на кожу низкоинтенсивного лазерного излучения с длинами волн 632 нм [15] или 820 нм [16]. Таким образом, не исключено, что дегрануляция тучных клеток *in vivo* под действием

КВЧ-излучения является следствием цепи процессов, запускаемых излучением в коже (организме), а не результатом его прямого действия на тучные клетки, которые могли бы играть роль первичной мишени.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 99-04-48169 и 01-04-06280-мас).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреев Е.А., Белый М.У., Ситко С.П. // Вести. АН СССР. 1985. № 1. С. 24-32.
2. Бессонов А.Е., Калмыкова Е.А., Конягин Б.А. Информационная медицина. М.: ИИС «Парус», 1999. 592 с.
3. Теппоне М.В. КВЧ-пунктура. М.: Логос, Колояр, 1997. 314 с.
4. Rojavin M.A., Ziskin M.C. // QJM. 1998. V. 91, № 1. P. 57-66.
5. Кожа (строение, функция, общая патология и терапия) / Под ред. А.М. Чернуха и Е.П. Фролова. М.: Медицина, 1982. 336 с.
6. Родитат И.В. // Вести, новых медицинских технологий. 1998. Т. V, № 2. С. 131-133.
7. Лувсан Г. Традиционные и современные аспекты восточной рефлексотерапии. М.: Наука, 1990.
8. Zhu Z., Xu R. // Chen. Tzu. Yen. Chiu. 1990. V. 15(2). P. 157-158 [Article in Chinese].
9. Khramov R.N., Voronkov V.N., Zinchenko V.P., Ilyasova E.N., Popov V.L., Khutsyan S.S. // Proc. 1st Arab Conf. on Medical Biophysics. Cairo, 15-17 January, 1991, Cairo University Press. P. 45.
10. Ганеев А.Б., Чемерис Н.К. // Вести, новых медицинских технологий. 1999. Т. VI, № 2. С. 39-45.
11. Kpizpnyak Ye.P., Betskii O.V., Voronkov V.N., Yaremenko Yu.G. // Biological Aspects of Low Intensity Millimeter Waves / By eds. N.D. Devyatkov, O.V. Betskii. M.: IRE, 1994. P. 250-261.
12. Завгородний С.В., Хижняк Е.П., Воронков В.Н., Садовников В.Б. // Биомедицинская радиоэлектроника. 1999. № 1. С. 31-45.
13. Zavgordny S.V., Khizhnyak Y.P., Voronkov V.N., Sadovnikov V.B. // Crit. Rev. Biomed. Eng. 2000. V. 28(3-4). P. 641-658.
14. Граевская Е.Э., Ахалая М.Я., Енсу Хан, Пархоменко И.М., Страховская М.Г., Гончаренко Е.Н. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2000. Т. 129, № 4. С. 423-425.
15. Вержбицкая Н.И. Морфофункциональные характеристики и реактивность структурных элементов точек акупунктуры и коррелирующих с ними внутренних органов. Калинин: ПИК ВИНТИ, 1988. С. 105.
16. Sayed S.O., Dyson M. // Lasers Surg. Med. 1996. V. 19(4). P. 433-437.

Degranulation of Skin Mast Cells by the Effect of Low-intensity Extremely High-frequency Electromagnetic Radiation

V.I. Popov*, V.V. Rogachevsky*, A.B. Gapeev*, R.N. Khramov, N.K. Chemeris*, and E.E. Fesenko***

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchmo, Moscow Region, 142290 Russia

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchmo, Moscow Region, 142290 Russia

It was shown by light and electron microscopy that local exposure of the projection of the MC-8 lao-gun acupuncture point in rat pad to low-intensity (0.05 mW/cm^2) extremely high-frequency (42 0 GHz) electromagnetic radiation caused a degranulation of derma mast cells. It was suggested that the response of skin mast cells is an important amplifying mechanism in the chain of events leading to a systemic response of the organism to low-intensity electromagnetic radiation.

Key words extremely high-frequency electromagnetic radiation, skin, acupuncture points, mast cells, morphological analysis, electronic microscopy