

УДК 612.111.7: 621.3029.3

ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ КВЧ-КОЛЕБАНИЙ НА ЧАСТОТАХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ СПЕКТРОВ ИЗЛУЧЕНИЯ И ПОГЛОЩЕНИЯ ОКСИДА АЗОТА

© 2000г. В. Ф. Киричук*, А. В. Майбородин**, М. В. Волин*,
А. П. Креницкий**, В. Д. Тупикин,**

*Саратовский государственный медицинский университет,

**ОАО Центральный научно-исследовательский институт измерительной
аппаратуры, г. Саратов

Изучено воздействие электромагнитных КВЧ-колебаний на частотах молекулярных спектров излучения и поглощения оксида азота с помощью специально созданного генератора в условиях *in vitro* на функциональную активность тромбоцитов больных нестабильной стенокардией. Показано, что при амплитудно-модулированном и непрерывном режиме КВЧ-облучения богатой тромбоцитами плазмы в течение 5, 15 и 30 минут происходит угнетение функциональной активности тромбоцитов, проявляющееся в снижении их активации и падении агрегационной способности. Степень угнетения функциональной активности тромбоцитов зависела от режима облучения и времени КВЧ-воздействия. Наиболее выраженные изменения наблюдались при непрерывном режиме облучения в течение 15 минут.

Ключевые слова: *тромбоциты, агрегация, оксид азота, КВЧ-волны.*

Наиболее важным открытием последних лет, имеющим фундаментальное значение и позволившим по-новому подойти к пониманию молекулярных механизмов ряда физиологических процессов в целом, является установление важной роли оксида азота (Волин М. С. и др., 1998; Реутов В. П., 1999; Северина И. С., 1998; Ignarro L.J. et al., 1981, 1987 а, 1987 б; Inarro L.J., 1990; Ignarro L.J., Murad F., 1995; Palmer R.M. et al., 1987, 1988 и др.). Он является нейротрансммитером, мощным фактором гемостаза, ингибирует агрегацию тромбоцитов, является эндогенным вазодилататором (Северина И. С., 1995, 1998; Matsuoka I., Suzuki T., 1983; Ignarro L.J. et al., 1987б; Knowles R.G. et al., 1989; Furchgott R.F. et al., 1991).

Молекулярный спектр вращательно-колебательных энергетических переходов молекул оксида азота находится в частотном КВЧ-диапазоне 150.176-150.644 ГГц (Башаринов А. Е. и др., 1968). Существующие в мединской практике КВЧ-генераторы перекрывают диапазон только до 65 ГГц и излучают сигнал одного типа колебаний H_{10} , E_{11} с одной поляризацией. Однако молекулярный спектр в соответствии с теорией Дирака представляет собой электромагнитные колебания различных типов, поляризаций и направлений распространения (Люиселл У., 1972). В связи с этим взаимодействие молекул оксида азота будет более эффективным с электромагнитным полем, имеющим структуру спектра излучения и поглощения этой молекулы.

В ОАО ЦНИИИА разработан КВЧ-генератор, имитирующий молекулярный спектр оксида азота. В его основе используется квазиоптический лучевод, возбуждаемый КВЧ-генератором через волновод-лучевые переходы и поляризаторы.

Целью настоящего исследования явилось изучение воздействия электромагнитных КВЧ-колебаний на частотах молекулярных спектров излучения и поглощения оксида азота на функциональную способность тромбоцитов больных нестабильной стенокардией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С помощью специально созданного генератора проводили облучение обогащенной тромбоцитами плазмы крови больных нестабильной стенокардией в условиях *in vitro* КВЧ-электромагнитными колебаниями на частотах молекулярных спектров излучения и поглощения оксида азота (NO).

Эффективность взаимодействия между электромагнитным полем и биосредой определялась впервые разработанным в ОАО ЦНИИИА (г. Саратов) панорамно-спектрометрическим измерительным комплексом с квазиоптическим трактом путем измерения коэффициента отражения от богатой тромбоцитами плазмы в частотном диапазоне 118-160 ГГц при различных поляризациях векторов E и H (Петросян В. И. и др., 2000).

Плазма помещалась в специально разработанную для этих целей квазиоптическую согласованную нагрузку из фенoplastа ($\epsilon = 2.3$), обеспечивающую поглощение всей поступающей по лучеводу мощности. Для обеспечения повышенной фильтрации волн побочных типов использовались внутренние продольные ребра треугольного сечения.

Продолжительность облучения составляла 5, 15 и 30 минут при постоянной мощности облучения в режиме непрерывном и амплитудной модуляции сигнала на частоте 100 кГц.

Активацию и агрегацию тромбоцитов определяли методом, предложенным А. Габбасовым и сотр. (1989), при помощи лазерного анализатора агрегации «BIOILA». В качестве индуктора агрегации применяли АДФ («Технология-Стандарт», Россия) в конечной концентрации 2.5 мкМ. В качестве контроля в. использовалась плазма тех же больных нестабильной стенокардией, но не подвергавшаяся облучению.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследований обнаружено сильное поглощение богатой тромбоцитами плазмой КВЧ-поля в некоторых частотных поддиапазонах, в том числе и в поддиапазоне частот, близких к частотам молекулярного поглощения и излучения оксида азота (149.5-151 ГГц). На этих частотах измеренный коэффициент стоячей волны (КСВН) при возбуждении в лучеводу круговой поляризации вектора E составил 1.06, что свидетельствует о сильнейшем поглощении биосреды. Точность измерения частоты волномером измерительного комплекса составила 0.1 ГГц.

Установлено, что 5-минутное воздействие КВЧ-электромагнитных колебаний на частотах молекулярных спектров поглощения и излучения оксида азота при режиме амплитудной модуляции сигнала на частоте 100 кГц и непрерывном вызывает по сравнению с контролем угнетение функциональной активности тромбоцитов. Это сопровождается снижением активации кровяных пластинок и падением их способности к агрегации. Уменьшение активации тромбоцитов проявляется в снижении степени спонтанной агрегации и начальной скорости их агрегации, выраженное в одинаковой степени независимо от режима облучения.

Угнетение агрегационной способности кровяных пластинок сопровождалось уменьшением максимальной степени агрегации, максимальной скорости образования агрегатов, увеличением времени достижения образования максимального размера агрегатов. По остальным показателям, характеризующим способность тромбоцитов к агрегации, статистически достоверных сдвигов по сравнению с данными контрольных исследований выявлено не было.

Не обнаружено статистически достоверной разницы в показателях агрегатограмм в зависимости от режима амплитудной модуляции электромагнитных колебаний, что свидетельствует об одинаковом эффекте амплитудно-модулированного и непрерывного режимов облучения на процесс активации и агрегации тромбоцитов при пятиминутном воздействии на обогащенную тромбоцитами плазму.

Воздействие КВЧ-электромагнитных колебаний в течение 15 минут также приводит к угнетению функциональной активности тромбоцитов по сравнению с данными контрольных опытов. Однако в этом случае не происходит статистически достоверных изменений в степени спонтанной агрегации кровяных пластинок при обоих режимах облучения, начальной скорости агрегации тромбоцитов при амплитудно-модулированном режиме генерации электромагнитных волн, что свидетельствует об отсутствии активации кровяных пластинок. В то же время при непрерывном режиме облучения начальная скорость агрегации тромбоцитов в значительной степени снижена, что является показателем угнетения их активации.

Указанная временная экспозиция воздействия электромагнитных колебаний приводит к статистически достоверному снижению агрегационной активности тромбоцитов, что сопровождается снижением максимальной степени их агрегации при обоих режимах облучения, но в наибольшей степени выраженное при непрерывном режиме ($p < 0.01$), максимальной скорости образования агрегатов, уменьшением максимального размера образующихся агрегатов кровяных пластинок, уменьшением максимальной скорости образования максимальных размеров агрегатов, также наиболее выраженное при непрерывном режиме облучения ($p < 0.01$), возрастанием времени достижения максимального размера агрегатов тромбоцитов.

Следовательно, при 15-минутном облучении богатой тромбоцитами плазмы происходит угнетение их функциональной активности. Характер его зависит от режима генерации электромагнитных волн: при амплитудно-модулированном режиме облучения активность тромбоцитов не изменяется, а процесс агрегации угнетается, при непрерывном режиме снижается как активация, так и последующая агрегация тромбоцитов.

Степень угнетения агрегационной способности тромбоцитов не зависит от режима генерации электромагнитных волн, так как нами не обнаружено статистически достоверных различий в показателях агрегации тромбоцитов при амплитудно-модулированном и непрерывном режиме воздействия КВЧ-поля.

При 30-минутном облучении плазмы КВЧ-полем также наблюдается угнетение функциональной активности тромбоцитов. Так, при амплитудно-модулированном и непрерывном режиме генерации КВЧ-электромагнитных волн происходит статистически достоверное ($p < 0.05$) уменьшение начальной скорости агрегации тромбоцитов, что является показателем падения их способности к активации на начальных этапах процесса агрегации кровяных пластинок. Способность тромбоцитов к индуцированной АДФ агрегации снижена, как и в предыдущих временных интервалах, причем в одинаковой степени это выражено под влиянием режимов амплитудно-модулированной и непрерывной генерации КВЧ-электромагнитных волн. Это сопровождается статистически достоверным уменьшением величин таких показателей агрегатограмм, как максимальная степень агрегации тромбоцитов, максимальной скорости образования тромбоцитарных агрегатов и увеличением времени достижения образования максимального размера агрегатов.

Таким образом, при 30-минутном воздействии наблюдается падение функциональной активности кровяных пластинок: происходит снижение как процесса активации, так и агрегации тромбоцитов. Причем, способность электромагнитных волн в режиме амплитудно-модулированного и непрерывного КВЧ-поля угнетать активацию и агрегацию тромбоцитов выражена в одинаковой степени.

При исследовании зависимости выраженности ответной реакции тромбоцитов от времени воздействия электромагнитных волн постоянной мощности на частотах излучения и поглощения оксида азота нами установлено, что снижение способности тромбоцитов к активации, как правило, не зависит от времени их облучения. В то же время уменьшение индуцированной агрегации тромбоцитов было выражено в наибольшей степени при 30-минутной экспозиции.

Угнетение функциональной активности тромбоцитов под влиянием облучения КВЧ-электромагнитными волнами на частотах молекулярных спектров поглощения и излучения оксида азота может быть обусловлено несколькими факторами. Механизм взаимодействия КВЧ-волн в диапазоне частот 150.176-150.644 ГГц можно рассматривать в двух основных направлениях: микровзаимодействие (молекулярное взаимодействие) и макровзаимодействие (взаимодействие макрочастиц - тромбоцитов).

Известно, что оксид азота образуется путем окисления аминокислоты L-аргинина под влиянием NO-синтазы (Волин М. С. и др., 1998; Реутов В. П., Сорокина Е. Г., 1998; Реутов В. П., 1999; Ignarro L.J. et al., 1981, 1987a, 1987b, 1990; Furchgott R.F. et al., 1991). Оксид азота взаимодействует с железом гема гуанилатциклазы и активирует ее (Северина И. С., 1995, 1998; Gerzer R., Gerbers D.L., 1982, Ignarro L.J., Wood K.S., 1987). Активная гуанилатциклаза катализирует биосинтез циклического 3'5'-гуанозинмонофосфата (цГМФ) - мощного регулятора метаболизма клетки, проявляющего антиагрегационное действие (Чирков Ю. Ю. и др., 1990; Северина И. С., 1995, 1998; Steer M.L., Salzman E.W. 1980, Mellion B. Th. Et. Al., 1981; Gerzer R. Et al., 1982; Matsuoka I. Suzuki T., 1983). Не исключено, что механизм антиагрегационного эффекта электромагнитных волн на частотах молекулярного спектра поглощения и излучения оксида азота обусловлен их воздействием на активность ферментов NO-синтазы и гуанилатциклазы (Киричук В. Ф. и др., 1999), приводящим в конечном итоге к образованию цГМФ, обладающего, наряду с цАМФ, мощными антиагрегационными свойствами.

Молекулярное взаимодействие электромагнитного поля и молекулы оксида азота можно объяснить также наличием неспаренного электрона в молекуле NO. Экспериментально подтверждено сильное взаимодействие с вращающимся электрическим полем E волны (Девятков Н. Д. и др., 1991), возбуждаемым в квазиоптической согласованной нагрузке с тромбоцитами. Таким образом

повышается реакционная способность NO.

Механизм макровзаимодействия следует рассматривать как соотношение размеров макрочастицы R и длины волны $\lambda \approx 0.2$ мм КВЧ-поля в биосреде с диэлектрической проницаемостью $\epsilon \approx 81$. Частицу или тромбоцитарный агрегат можно представить в виде открытого диэлектрического резонатора, например, в виде шара с $\epsilon \approx 81$, имеющего собственную резонансную частоту (Ильченко М. Е. и др., 1989):

$$f_P = \frac{150 \cdot p}{\pi \cdot R \cdot \sqrt{\epsilon}}$$

где $p \equiv 3$ или 4 - параметр, зависящий от типа колебаний поля H_{101} или E_{101} соответственно.

Из приведенной формулы следует, что КВЧ-поле E_{101} типа колебаний молекулярной частоты NO 150.176 ГГц будет вступать в резонансное взаимодействие с тромбоцитарным агрегатом размером $R \approx 0.146$ мм. Причем во взаимодействие может вступать и 1-я гармоника поля ($f_p \approx 300$ ГГц с частицей, имеющей $R \approx 0.07$ мм, т.е. на порядок больше размера тромбоцита. Поэтому КВЧ-поле не оказывает сильного влияния на тромбоцит, кроме поляризующего действия, т. к. $\lambda \gg R$, где R - радиус тромбоцита.

Однако если тромбоциты начинают агрегировать, то размер частицы растет и как только ее размер становится соизмеримым с длиной волны поля она вступает в резонансное взаимодействие с полем, что приводит к дезагрегации кровяных пластинок (Киричук В. Ф. и др., 1999). Таким образом, частота облучающего поля определяет тот размер «агрегатов», с которого начинается процесс дезагрегации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволяют заключить, что при воздействии электромагнитных КВЧ-колебаний на частотах молекулярных спектров излучения и поглощения оксида азота (150.176-150.644 ГГц) с помощью панорамно-спектрометрического измерительного комплекса с квазиоптическим трактом путем измерения коэффициента отражения от среды в частотном диапазоне 118-160 ГГц при различных поляризациях векторов E и H (Петросян В. И. и др., 2000) в условиях *in vitro* сопровождается снижением функциональной способности тромбоцитов больных нестабильной стенокардией. Это обусловлено угнетением как процесса активации кровяных пластинок, так и агрегационного ответа на агонист. Степень угнетения функциональной способности тромбоцитов зависит от режима облучения (непрерывный или амплитудной модуляции сигнала) и времени воздействия на биологический объект. Так, 5-минутное воздействие на обогащенную тромбоцитами плазму оказывает одинаковый эффект на процесс активации и агрегации тромбоцитов как при амплитудно-модулированном, так и непрерывном режиме облучения. При 15-минутном облучении характер сдвигов в функциональной активности тромбоцитов зависит от режима генерации электромагнитных волн: при амплитудно-модулированном режиме облучения активация тромбоцитов не меняется, а процесс агрегации угнетается; при непрерывном режиме снижается как активация, так и последующая агрегация кровяных пластинок. При 30-минутном воздействии наблюдается снижение как процесса активации, так и агрегации тромбоцитов, причем способность электромагнитных волн в режиме амплитудно-модулированного и непрерывного КВЧ-поля угнетать активацию и агрегацию тромбоцитов выражена в одинаковой степени.

ЛИТЕРАТУРА

Башаринов А. Е., Тучков Л. Г., Поляков В. М., Аланов Н. И. Измерение радиотепловых и плазменных излучений в СВЧ-диапазоне. М.: Советское радио, 1968. 380 с.

Волин М. С., Дэвидсон К. А., Каминска П. М., Фейнгерш Р. П., Мохаззаб Х. К. М. Механизмы передачи сигнала оксидант-оксид азота в сосудистой ткани // Биохимия. 1998. Т. 63 № 7. с. 958-965.

Габбасов В. А., Попов Е. Г., Гаврилов И. Ю., Позин Е. Я., Маркосян Р. А. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов // Лаб. дело. 1989. № 10. с. 15-18.

Девятков Н. Д., Голанд Н. Б., Бецкий О. В. ММ-волны и их роль в процессах жизнедеятельности. М.: Радио и связь, 1991. 168 с.

Ильченко М. Е., Взятыхшев В. Ф. Диэлектрические резонаторы. М.: Радио и связь, 1989. 328 с.

Киричук В. Ф., Головачева Т. В., Чиж А. Г. КВЧ-терапия. Саратов: Изд-во Саратов, мед. университета, 1999. 360 с.

Люиселл У. Измерения и шумы в квантовой электронике. М.: Наука, 1972. 400 с.

Петросян В. И., Сеницин Н. И., Елкин В. А. и др. Проблемы косвенного и прямого наблюдения резонансной прозрачности водных сред в миллиметровом диапазоне // Электронная промышленность. 2000. № 1. С. 99-103.

Реутов В.П. Биохимическое предопределение NO-синтазной и нитритредуктазной компонент цикла оксида азота // Биохимия. 1999. т.64. № 5. с. 34-651.

Реутов В.П., Сорокина Е.Г. NO-синтазная и нитроредуктазная компоненты цикла оксида азота // Биохимия. 1998. т.63. № 7. с.1029-1040.

Северина И.С. Растворимая гуанилциклаза в молекулярном механизме физиологических эффектов окиси азота // Биохимия. 1998. т.63. № 7. с.939-997.

Чирков Ю.Ю., Белушкина Н.Н., Тыщук И.А., Северина И.С. Роль гуанилатциклазы в регуляции агрегации тромбоцитов человека // Вестник АМН СССР. 1991. № 10. с. 51-54.

Furchgott R.F., Jothianandan D. Endothelium-dependent and independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light // Blood Vessels. 1991. V.28. P.52-61.

Gerzer R., Radany E. W., Garbers D. L. The separation of the heme and apoheme forms of soluble guanylate cyclase // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1982. V. 108. P. 678-686.

Ignarro L. J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1990. V. 30. P. 535-560.

Ignarro L. J., Wood K. S. Activation of purified soluble guanylate cyclase by arachi-donic acid requires absence of enzyme-bound heme // Biochim. Biophys. Acta. 1987a V 928. P. 160-170.

Ignarro L. J., Buga G. M., Wood K. S., Byrns R. E., Chaudhuri G. Endothelium-relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987b. V. 84 P. 9265-9269.

Ignarro L. J., Lipton K, Edwards J. C. et al. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates // J. Pharmacol. Exp. Ther 1981 V 218. P. 739-749.

Ignarro L, Murad F. (eds). Nitric Oxide: Biochemistry, Molecular Biology and Therapeutic Implications // Adv. Pharmacol. 1995 V. 34. P. 1-516.

Knowles R. G., Palacios M., Palmer R. M., Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 5159-5162.

Matsuoka I., Suzuki T. Мepacrine-induced elevation of cyclic GMP levels and acceleration of reversal of ADP-induced aggregation in washed rabbit platelets // J. Cyclic Nu-cleotide Protein Phosphor. Res. 1983. VT 9. P. 5341-5353.

Mellion B. Th, Ignarro L. J., Ohlstein E. U. et al. Evidence for the inhibitory role of guanosine 3',5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators // Blood. 1981. V. 57. Xs 5. R946-499.

Palmer R. M., Ashton D. S., Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine // Nature. 1988. V. 333. P. 6174-6646.

Palmer R. M., Ferrige A. G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor // Nature. 1987.V.327.P. 524-526.

Steer M. L, Salzman E. W. Cyclic nucleotides in hemostasis and thrombosis // Adv. Cyclic Nucleotide Res. 1980. V. 12. P. 71-92.