

УДК 616.155.1:615.83:616.89-008.441.13

ВЛИЯНИЕ МИКРОВОЛНОВОЙ РЕЗОНАНСНОЙ ТЕРАПИИ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭРИТРОЦИТОВ БОЛЬНЫХ АЛКОГОЛИЗМОМ

Прокопьева В.Д., Патышева Е.В., Бохан Н.А.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт психического здоровья» СО РАМН,
Томск, e-mail: valyaprok@mail.ru

В эритроцитах больных алкоголизмом в состоянии абстиненции обнаружено повышенное содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и карбонилированных белков, выявлено увеличение амплитуды Ca^{2+} -зависимого гиперполяризационного ответа мембран эритроцитов, обусловленного Ca^{2+} -индуцированным выходом ионов калия через Ca^{2+} -зависимые K^+ -каналы. После курса микроволновой резонансной терапии (МВРТ) на фоне традиционной дезинтоксикационной терапии в течение 7 дней в эритроцитах пациентов происходит снижение продуктов ПОЛ и карбониллов белков, наблюдается нормализация Ca^{2+} -зависимого гиперполяризационного ответа мембран эритроцитов. В группе больных, которым МВРТ не проводили, через 7 дней дезинтоксикационной терапии достоверных изменений исследуемых параметров эритроцитов не обнаружено. Сделано заключение о способности электромагнитного излучения миллиметрового диапазона оказывать выраженное положительное действие на структурные и функциональные параметры мембран эритроцитов у больных алкоголизмом при микроволновой резонансной терапии.

Ключевые слова: белки, липиды, K^+ (Ca^{2+})-каналы эритроцитов, микроволновая резонансная терапия, алкоголизм

THE INFLUENCE OF MICROWAVE RESONANCE THERAPY ON STRUCTURAL-FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF ALCOHOLIC'S ERYTHROCYTES

Prokopeva V.D., Patysheva E.V., Bokhan N.A.

Mental Health Research Institute, Russian Academy of Medical Sciences,
Tomsk, e-mail: valyaprok@mail.ru

In erythrocytes of withdrawal alcoholics the increased content of lipid peroxidation products (LPP) and protein carbonyls as well as increase in the amplitude of the Ca^{2+} -induced hyper-polarization of erythrocytes membrane caused by Ca^{2+} -induced efflux K^+ over Ca^{2+} -sensitive K^+ -channel (K^+ (Ca^{2+})-channel) were revealed. After the 7-days course of microwave resonance therapy (MWRT) combined with traditional detoxicating therapy the content of LPP and protein carbonyls in the alcoholics' erythrocytes decreased, the Ca^{2+} -induced hyper-polarization of the erythrocyte membrane normalized. Significant changes of the erythrocytes characteristics were not revealed in the group of patients after the 7 days detoxicating therapy course without MWRT treatment. It was concluded that the millimeter range electromagnetic radiation has apparent positive impact on structural-functional characteristics of erythrocytes membrane of alcoholics undergoing the microwave resonance therapy.

Keywords: lipids, proteins, K^+ (Ca^{2+})-channel of erythrocyte, microwave resonance therapy, alcoholism

Микроволновая резонансная терапия (МВРТ) применяется для лечения различных заболеваний, в том числе алкогольного абстинентного синдрома [4]. Однако, несмотря на существование разных гипотез о молекулярных механизмах действия электромагнитного излучения (ЭМИ) миллиметрового диапазона (ММ-диапазона) на биологические объекты [1, 3], окончательного представления о механизмах и путях достижения благоприятного терапевтического эффекта МВРТ в настоящее время не существует.

При алкоголизме в организме формируется состояние окислительного стресса, наблюдается окислительная модификация белков (карбонилирование белков) и липидов (перекисное окисление липидов, ПОЛ) [2, 5, 9], изменяются функциональные параметры биологических мембран [7]. Существенно меняется работа ион-транспортующих систем клеточных мембран, в том числе и проводимость K^+ (Ca^{2+})-каналов эритро-

цитов [14]. Данный вид каналов играет важную роль в обеспечении деформируемости эритроцитов [10], которая необходима для предотвращения преждевременного разрушения клеток при их циркуляции в сосудах. Установлено, что регуляция K^+ (Ca^{2+})-каналов эритроцитов осуществляется через внутриклеточные сигнальные системы, связанные со вторичными посредниками, в частности с протеинкиназами А или С [11], определенную роль в регуляции K^+ (Ca^{2+})-каналов эритроцитов играет микровязкость липидного бислоя и состояние белков цитоскелета эритроцитов [14].

В процессе традиционной дезинтоксикационной терапии больных алкоголизмом, наряду с клиническими параметрами, улучшаются и метаболические показатели, снижается выраженность окислительного стресса [2, 5, 9]. Мы предположили, что при микроволновой резонансной терапии больных с алкогольной зависимостью, положительные клинические эффекты обеспечива-

ются, в частности, за счет благоприятного влияния микроволн на компоненты биомембран (белки и липиды), поврежденные в результате развития в организме больного окислительного стресса. Это предположение основано на данных литературы, согласно которым при облучении образцов крови ЭМИ ММ-диапазона *in vitro* повышается осмотическая устойчивость эритроцитов, снижается интенсивность ПОЛ [3], улучшаются реологические свойства крови и способность эритроцитов к деформации [8]. Методом проточной цитометрии показано, что после воздействия ЭМИ ММ-диапазона на эритроциты, в мембранах этих клеток происходит перераспределение фосфатидилсерина, что свидетельствует о существенных структурных перестройках в липидном бислое [15]. Есть данные о том, что ЭМИ ММ-диапазона способно влиять на липид-белковые взаимодействия в биологических мембранах [7].

Приведенные данные свидетельствуют о возможности с помощью ЭМИ миллиметрового диапазона изменять структурно-функциональное состояние биологических мембран. До настоящего времени систематических исследований влияния МВРТ на показатели, отражающие структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов у больных алкоголизмом, не проводилось. Такие исследования могут дать важную дополнительную информацию о механизмах положительного клинического эффекта МВРТ при лечении пациентов.

Целью настоящего исследования было изучение влияния МВРТ на структурно-функциональные показатели мембран эритроцитов больных алкоголизмом в состоянии абстиненции.

Материалы и методы исследования

В работе использовали отмытые эритроциты 46 мужчин, больных алкоголизмом II стадии (диагноз по МКБ 10 – F 10.2). Из них 30 человек на фоне традиционной дезинтоксикационной терапии прошли курс МВРТ из 7 процедур (основная группа). Другие 16 пациентов получали только традиционную дезинтоксикационную терапию в течение 7 дней, без МВРТ (группа сравнения). В контрольную группу вошли 15 здоровых мужчин. Группы доноров не различались достоверно по возрасту. У всех больных кровь для исследования брали дважды: при поступлении пациента в стационар в состоянии абстиненции (до начала лечения) и после 7 дней терапии. Для генерации миллиметровых волн применяли аппарат «Стелла-2» (ООО «Спинор», г. Томск), использовалось ЭМИ нетепловой интенсивности мощностью < 3 мВт/см² в диапазоне частот 59–61 ГГц, что соответствует 5,1–4,7 мм. Использовали режим сканирования (повторяющиеся циклы нарастания частоты со скоростью 40 МГц/с). Воздействие осуществлялось через диэлектрический волновод (площадь контакта 0,64 мм²) на аурикуляр-

ную биологически активную точку АТ55 по 30 минут через каждые 24 часа.

Продукты ПОЛ определяли спектрофотометрически по реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивные продукты, ТБК-РП), карбонилы белков – по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином.

Для оценки Ca²⁺-зависимой калиевой проницаемости мембран эритроцитов использовали метод, предложенный Орловым С.Н. и соавт. [6], который заключается в измерении изменений мембранного потенциала эритроцитов в ответ на добавку в среду инкубации клеток Ca²⁺-ионофора А23187 путем регистрации рН среды в присутствии протонифора карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразона. Данный метод подробно описан в статье [14]. Регистрацию рН проводили с помощью комбинированного рН-чувствительного электрода и рН-метра. Индуцированный А23187 входящий поток ионов кальция приводил к открыванию K⁺ (Ca²⁺)-каналов и выходу из эритроцитов ионов калия, что обуславливало гиперполяризацию мембран эритроцитов. Оценивали максимальную амплитуду гиперполяризационного ответа эритроцитов (ΔE , мВ), параметра, который является основной характеристикой работы K⁺ (Ca²⁺)-каналов [6, 12].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием U-критерия Манна – Уитни, t-критерия Стьюдента и критерия Вилкоксона для независимых и зависимых выборок, различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$. Проверку на нормальность проводили с помощью критерия Колмогорова – Смирнова.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования представлены в таблице. Обнаружено, что в эритроцитах больных алкоголизмом в состоянии абстиненции до начала лечения содержание продуктов ПОЛ и карбонилы белков повышено по сравнению со здоровыми донорами, что свидетельствует о развитии в организме данных пациентов окислительного стресса и согласуется с данными литературы [2, 5, 9].

В основной группе пациентов после воздействия МВРТ содержание ТБК-РП в эритроцитах снизилось практически до контрольного значения. У больных из группы сравнения, не получавших МВРТ, содержание ТБК-РП в эритроцитах после 7 дней традиционного лечения оставалось практически на том же уровне, что и до лечения. То есть микроволновая резонансная терапия оказывала выраженное положительное действие на содержание продуктов ПОЛ в эритроцитах.

Уровень карбонилы белков после МВРТ в эритроцитах пациентов основной группы также достоверно снизился практически до контрольного уровня. В группе сравнения за то же время (7 дней) применения только традиционной дезинтоксикационной терапии данный показатель достоверно не изменился. То есть МВРТ способствует снижению карбонилы белков в эритроцитах.

Содержание продуктов ПОЛ (ТБК-РП) и карбониллов белков в эритроцитах и амплитуда Ca^{2+} -индуцированного гиперполяризационного ответа (ΔE) мембран эритроцитов доноров исследуемых групп

Параметры	Здоровые доноры (контрольная группа) ($n = 15$)	Пациенты в состоянии абстиненции до лечения ($n = 46$)	Пациенты после курса МВРТ (основная группа) ($n = 30$)	Пациенты после традиционной терапии (группа сравнения) ($n = 16$)
ТБК-РП в эритроцитах (нмоль/мл эритроцитов)	$3,624 \pm 0,038$	$3,969 \pm 0,106^*$	$3,623 \pm 0,152^\#$	$3,996 \pm 0,163^*$
Карбонилы белков в эритроцитах (нмоль/мг Hb ⁺)	$2,732 \pm 0,073$	$3,521 \pm 0,203^*$	$2,660 \pm 0,211^\#$	$3,888 \pm 0,324^*$
ΔE , (-мВ)	$34,9 \pm 1,1$	$44,4 \pm 2,1^*$	$39,2 \pm 1,4^\#$	$42,6 \pm 1,8^*$

Примечания: ⁺Hb – гемоглобин; * – достоверные различия по сравнению со здоровыми донорами ($p < 0,05$); # – достоверные различия по сравнению с больными до лечения ($p < 0,05$); n – количество человек в группе.

Полученные результаты демонстрируют способность микроволновой резонансной терапии снижать количество окисленных белков и липидов в эритроцитах больных алкоголизмом, уровень которых до терапии оказывается повышенным в результате развития в организме пациентов окислительного стресса.

Для оценки действия МВРТ на функциональные свойства эритроцитов больных алкоголизмом проведено исследование влияния курсового применения микроволновой резонансной терапии на Ca^{2+} -зависимую калиевую проницаемость мембран эритроцитов больных алкоголизмом в состоянии абстиненции. Выявлено, что в этот период у пациентов существенно увеличена амплитуда гиперполяризационного ответа мембран эритроцитов на добавку в среду инкубации Ca^{2+} -ионофора, обусловленная Ca^{2+} -индуцированным выходом ионов калия через K^+ (Ca^{2+})-каналы (см. таблицу). Этот результат согласуется с данными литературы [14] и свидетельствует об ускоренном выходе ионов калия из эритроцитов больных алкоголизмом через K^+ (Ca^{2+})-каналы по сравнению с эритроцитами здоровых доноров. Данный факт, согласно литературе, может являться причиной снижения способности эритроцитов к деформации [10] и их гемолитической устойчивости [13], часто выявляемых у пациентов с алкогольной зависимостью.

В группе сравнения через 7 дней традиционной дезинтоксикационной терапии без МВРТ каких-либо достоверных изменений параметра, характеризующего проводимость K^+ (Ca^{2+})-каналов, выявлено не было.

У пациентов основной группы после применения МВРТ на фоне дезинтоксикационной терапии в течение 7 дней обнаружено достоверное снижение максимальной

амплитуды гиперполяризационного ответа эритроцитов на добавку в среду инкубации Ca^{2+} -ионофора практически до контрольного значения. Полученные результаты демонстрируют способность МВРТ нормализовать повышенную у больных алкоголизмом в состоянии абстиненции проводимость Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов эритроцитов.

Известно, что в регуляции проводимости K^+ (Ca^{2+})-каналов значительную роль играет система внутриклеточных вторичных посредников [11], а также белки цитоскелета и микровязкость липидного бислоя эритроцитов [14]. Окислительная модификация белков и липидов эритроцитов у больных алкоголизмом приводит к изменению функциональных свойств биомолекул, изменению жидкостности липидного бислоя и снижению способности мембранного каркаса клетки к обратимым деформациям. Это может быть одной из важных причин изменения проводимости K^+ (Ca^{2+})-каналов у данных пациентов. Наши исследования показали, что применение МВРТ снижает уровень окислительной модификации белков и липидов эритроцитов. Это, вероятно, отражается и на функциональных параметрах мембраны эритроцита, в частности на проводимости K^+ (Ca^{2+})-каналов. Таким образом, снижение выраженности окислительной модификации белков и липидов эритроцитов под действием МВРТ у пациентов с алкогольной зависимостью может быть одним из молекулярных механизмов нормализации проводимости K^+ (Ca^{2+})-каналов их эритроцитов.

Список литературы

1. Бецкий О.В., Лебедева Н.Н. Современные представления о механизмах воздействия низкоинтенсивных миллиметровых волн на биологические объекты // Миллиметровые волны в биологии и медицине. – 2001. – № 3. – С. 5–18.

2. Иванова С.А., Бойко А.С., Бурдовицина Т.Г., Гончикова И.А., Аболонин А.Ф., Асланбекова Н.В., Бохан Н.А. Активность аминотрансфераз сыворотки крови больных алкоголизмом в динамике фармакотерапии реамберином // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2012. – № 4. – С. 10–14.

3. Корягин А.С., Ястребова А.А., Крылов В.Н., Корнаузов А.В. Влияние электромагнитного излучения на резистентность мембран эритроцитов, перекисное окисление липидов и активность ферментов плазмы крови // Миллиметровые волны в биологии и медицине. – 2000. – № 2 (18). – С. 8–10.

4. Мандель А.И., Артемьев И.А., Ветлугина Т.П., Иванова С.А., Невидимова Т.И., Прокопьева В.Д., Аболонин А.Ф., Шушпанова Т.В. Биологические предикторы, клинко-патогенетические механизмы формирования и профилактика аддиктивных состояний в различных социальных группах // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2013. – № 4 (79). – С. 40–48.

5. Мингазов А.Х., Кривулин Е.Н., Бабин К.А., Шагрова Ю.М., Виноградов Д.Б. Гендерные особенности окислительной модификации белков плазмы крови больных алкоголизмом позднего возраста // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2013. – № 3 (78). – С. 9–13.

6. Орлов С.Н., Петрова И.В., Покудин Н.И., Баскаков М.Б. Ca²⁺-активируемые калиевые каналы эритроцитов, исследованные методом регистрации Ca²⁺-индуцированных изменений мембранного потенциала // Биологические мембраны. – 1992. – Т. 9, № 9. – С. 885–903.

7. Патышева Е.В., Прокопьева В.Д., Кисель Н.И., Бохан Н.А. Действие миллиметровых волн на клетку и ее компоненты в норме и при алкоголизме // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2009. – № 1. – С. 33–36.

8. Подоляко В.А., Макарич А.В., Янкевич Ю.Д. КВЧ-модуляция in vitro реологических свойств крови больных в остром периоде ишемического инсульта // Миллиметровые волны в биологии и медицине. – 2000. – № 4 (20). – С. 53–55.

9. Ярыгина Е.Г., Прокопьева В.Д., Аржаник М.Б., Молькина Л.Г., Бохан Н.А. Рандомизированное плацебо-контролируемое исследование эффективности применения севитина у больных алкоголизмом на этапе формирования ремиссии. Сиб. мед. журн. – 2010. – Т. 25, № 4. – Вып. 1. – С. 84–88.

10. Apovo M., Benzard V., Galacteros F., Bachir D., Girand F. The involvement of the Ca²⁺-dependent K⁺-channel and of the KCl co-transport in sickle cell dehydration during cyclic deoxygenation // Biochim. Biophys. Acta. – 1994. – Vol. 1225. – P 255–258.

11. Del Carlo B., Pellegrini M., Pellegrino M. Modulation of Ca²⁺-activated K⁺-channels of human erythrocytes by endogenous protein kinase C // Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – Vol. 1612. – С. 107–116.

12. Macey R.I., Adorante J.C., Orme F.W. Erythrocyte membrane potentials determined by hydrogen ion distribution // Biochim. Biophys. Acta. – 1978. – Vol. 512. – P. 284–295.

13. Prokopieva V.D., N.A. Bohan N.A., Johnson P., Abe H., Boldyrev A.A.. Effects of carnosine and related compounds on the stability and morphology of erythrocytes from alcoholics // Alcohol and Alcoholism. – 2000. – Vol. 35, № 1. – P. 44–48.

14. Prokopieva V.D., Sizohevskii A.V., Bokhan N.A., Johnson P. The role of the erythrocyte membrane and cytoskeleton in Ca²⁺-induced hyper-polarization in alcoholism and diabetes // Biological and Biomedical Reports. – 2012. – Vol. 2 (3). – P. 149–158.

15. Szabo I., Kappelmayer J., Alekseev S.I., Ziskin M.C. Millimeter wave induced reversible externalization of phosphatidylserine molecules in cells exposed in vitro // Bioelectromagnetics. – 2006. – Vol. 3. – P. 233–44.

References

1. Betskiy O.V., Lebedeva N.N. *Millimetrovye volny v biologii i meditsine*, 2001, no.3, pp. 5–18.

2. Ivanova S.A., Boyko A.S., Burdovitsina T.G., Gonchikova I.A., Abolonin A.F., Aslanbekova N.V., Bokhan N.A. *Sibirskiy vestnik psikhiiatrii i narkologii*, 2012, no. 4, pp. 10–14.

3. Koryagin A.S., Yastrebowa A.A., Krylov V.N., Kornaukhov A.V. *Millimetrovye volny v biologii i meditsine*, 2000, no. 2 (18), pp. 8–10.

4. Mandel A.I., Artemev I.A., Vetlugina T.P., Ivanova S.A., Nevidimova T.I., Prokopeva V.D., Abolonin A.F., Shushpanova T.V. *Sibirskiy vestnik psikhiiatrii i narkologii*, 2013, no. 4 (79), pp. 40–48.

5. Mingazov A.Kh., Krivulin E.N., Babin K.A., Shatrova Yu.M., Vinogradov D.B. *Sibirskiy vestnik psikhiiatrii i narkologii*, 2013, no. 3 (78), pp. 9–13.

6. Orlov S.N., Petrova I.V., Pokudin N.I., Baskakov M.B. *Biologicheskie membrany*, 1992, tom.9, no. 9, pp. 885–903.

7. Patysheva E.V., Prokopeva V.D., Kisel N.I., Bokhan N.A. *Sibirskiy vestnik psikhiiatrii i narkologii*, 2009, no. 1, pp. 33–36.

8. Podolyako V.A., Makarchik A.V., Yankelevich Yu.D. *Millimetrovye volny v biologii i meditsine*, 2000, no. 4(20), pp. 53–55.

9. Yarygina E.G., Prokopeva V.D., Arzhanik M.B., Molkina L.G., Bokhan N.A. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*, 2010, tom 25, no.4, vyp.1, pp. 84–88.

10. Apovo M., Benzard V., Galacteros F., Bachir D., Girand F. The involvement of the Ca²⁺-dependent K⁺-channel and of the KCl co-transport in sickle cell dehydration during cyclic deoxygenation // Biochim. Biophys. Acta. 1994. Vol. 1225. pp 255–258.

11. Del Carlo B., Pellegrini M., Pellegrino M. Modulation of Ca²⁺-activated K⁺-channels of human erythrocytes by endogenous protein kinase C // Biochim. Biophys. Acta. 2003. Vol. 1612. pp. 107–116.

12. Macey R.I., Adorante J.C., Orme F.W. Erythrocyte membrane potentials determined by hydrogen ion distribution // Biochim. Biophys. Acta. 1978. Vol. 512. pp. 284–295.

13. Prokopieva V.D., N.A. Bohan N.A., Johnson P., Abe H., Boldyrev A.A.. Effects of carnosine and related compounds on the stability and morphology of erythrocytes from alcoholics // Alcohol and Alcoholism. 2000. Vol. 35, no. 1. pp. 44–48.

14. Prokopieva V.D., Sizohevskii A.V., Bokhan N.A., Johnson P. The role of the erythrocyte membrane and cytoskeleton in Ca²⁺-induced hyper-polarization in alcoholism and diabetes // Biological and Biomedical Reports. 2012. Vol. 2 (3). pp. 149–158.

15. Szabo I., Kappelmayer J., Alekseev S.I., Ziskin M.C. Millimeter wave induced reversible externalization of phosphatidylserine molecules in cells exposed in vitro // Bioelectromagnetics. 2006. Vol. 3. pp. 233–44.

Рецензенты:

Семке А.В., д.м.н., профессор кафедры психиатрии, наркологии и психотерапии, ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск;

Невидимова Т.И., д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии, ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск.

Работа поступила в редакцию 10.06.2014.