

В.Ю. Тегза¹, О.П. Резункова², Л.И. Корицова²,
С.Г. Кузьмин¹, П.П. Макаров¹, И.В. Лобачев¹

Крайне высокочастотная терапия пострадавших при Чернобыльской аварии

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

²Российский научный центр радиологии и хирургических технологий, Санкт-Петербург

Резюме. Рассмотрены возможности применения патогенетически обоснованного метода лечения последствий ионизирующей радиации – крайне высокочастотной терапии для пострадавших при аварии на Чернобыльской атомной станции. Выявлено, что в плазматической мембране лимфоцитов больных происходят структурные перестройки: увеличивается вязкость липидного бислоя, изменяются липидно-белковые взаимодействия. Показано, что рекомендованная терапия изменяет структуру плазматических мембран, восстанавливая физические свойства клеточных мембран лимфоцитов и нормализует работу клеток крови. Установлено, что противолучевые свойства крайне высокочастотной терапии, в первую очередь, связаны со способностью при небольшой мощности излучения оказывать значительное влияние на структурно-энергетический потенциал клеток, что дает им возможность для репарации после повреждений и приводит к мембраностабилизирующему эффекту. Метод крайне высокочастотной терапии не обременителен для больного и персонала, прост в исполнении, не требует дорогостоящих дополнительных затрат, легко воспроизводится, может многократно повторяться на всех этапах лечения.

Ключевые слова: Чернобыль, атомная станция, крайне высокочастотная терапия, плазматические мембраны, лимфоциты, флуоресцентные зонды, миграция энергии.

Введение. Контакт с источниками ионизирующего излучения может возникать при самых разных обстоятельствах: облучение населения по медицинским показаниям (с рентгенодиагностической и терапевтической целью), использование источников ионизирующего излучения в различных областях науки и промышленности, и он не исключает возможности облучения специалистов [4]. Применение ядерных технологий с использованием источников ионизирующего излучения в военных и мирных целях могут создавать опасность радиационных аварий, когда в результате радиоактивного загрязнения местности облучению могут подвергаться многочисленные группы людей, а внештатные ситуации на предприятиях ядерного комплекса могут приводить к переоблучению персонала [3]. Примерами таких ситуаций являются аварии на ядерном реакторе в Селлафилде в Англии в 1957 г., на производственном объединении «Маяк» на Урале в 1957 г., на атомной станции Три Майл Айленд в США в 1979 г., Чернобыльской атомной станции в 1986 г. и в Японии в 2011 г.

Одной из наиболее крупных, является катастрофа на Чернобыльской атомной станции (ЧАЭС), с момента которой прошло более 25 лет. В результате ее в зоне загрязнения почвы и воды радиоактивными осадками оказались территории государств Европы, на которых проживали более 50 млн человек. В зоне радиационного загрязнения оказались также 14 административных территорий в центре и на Юго-Западе страны, с населением около 16 млн человек, при этом около 600 тыс. жителей СССР занимались ликвидацией последствий катастрофы [2, 4].

Общеизвестно, что развитие лучевого поражения сопровождается образованием свободных радикалов и одновременно приводит к снижению содержания природных антиоксидантов в липидах биологических мембран с интенсификацией окислительных процессов. Нарушаются процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), снижается антиокислительная активность сыворотки крови, значительно повышается концентрация промежуточных и особенно конечных продуктов ПОЛ. Это является основой для развития в дальнейшем хронических заболеваний различных органов и систем [6].

Особенность клиники у пострадавших от аварии на ЧАЭС заключается в жесткой взаимной опосредованности иммунологического статуса и системы ПОЛ. Исследования, проведенные на протяжении довольно длительного времени свидетельствуют о том, что у всех пострадавших, независимо от вида клинически манифестирующей патологии выявляются изменения метаболизма, снижение активности антиоксидантной системы и накопление повреждающих факторов [5, 6]. В этой связи актуален поиск эффективных методов профилактики, лечения и практически непрерывной реабилитации последствий ЧАЭС.

Традиционно этап медицинской реабилитации предусматривает лечение пациента с помощью фармакологических препаратов. Однако лекарственной терапии порой оказывается недостаточно и в таких случаях прибегают к сочетанным методам лечения, включающим немедикаментозное воздействие. Все возрастающий интерес к немедикаментозным методам обусловлен преимуществами естественного,

более медленного и более полного выздоровления при неосложненном собственном цикле течения патологического процесса [5, 9].

Одним из наиболее эффективных аппаратных методов лечения заболеваний в последние годы стала крайне высокочастотная (КВЧ), низкоинтенсивная лазерная физио- и рефлексотерапия. КВЧ-терапия обладает антиоксидантным, мембраностабилизирующим действием, способным эффективно ингибировать реакции ПОЛ и предотвращать образование конечных продуктов этих реакций, кроме того, КВЧ-терапия является универсальным адаптогеном, повышающим стрессоустойчивость, при наличии патологической реакции на стрессовую ситуацию [1, 9]. Ее можно использовать в качестве монотерапии (в том числе на поздних стадиях заболеваний), причем этот вид воздействия рассматривается как ведущий фактор, который потенцируется магнитным полем, действием водных процедур и других физиотерапевтических методик [1, 5].

Цель исследования. Изучение возможности применения КВЧ-терапии в лечении последствий ионизирующей радиации.

Материалы и методы. Обследовано 23 первичных больных (19 мужчин в возрасте от 36 до 61 года и 4 женщины в возрасте от 39 до 58 лет), лечившихся в клинике Российского научного центра радиологии и хирургических технологий, пострадавших при аварии на Чернобыльской атомной станции и 7 здоровых доноров в возрасте от 40 до 57 лет. Все больные были разделены на две группы: 1-ю группу составили 9 человек, которым не проводилась КВЧ-терапия, 2-ю группу – 14 пациентов, получавшие КВЧ-терапию.

Периферическая кровь больных исследовалась до и после проведенного лечения. Лимфоциты периферической крови выделяли методом седиментации в одноступенчатом градиенте плотности фиколла-верографина. Жизнеспособность всех выделенных лимфоцитов по тесту с трипановым синим была около 90% и в используемых концентрациях не изменялась после окрашивания флуоресцентными зондами. В работе использовались мембранные зонды: гидрофобные зонды пирен и перилен и отрицательно заряженный зонд АНС (1,8 анилинафталинсульфат). Основными критериями выбора зондов были высокий квантовый выход их флуоресценции в мембране по сравнению с водой, высокая чувствительность к полярности и жесткости микроокружения и оптимальные донорно-акцепторные свойства.

Спектры флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре «Hitachi MPF-650-40» (Япония) в специальных кюветах для светорассеивающих образцов объемом 1 мл. Клетки при этом были ресуспендированы в растворе Рингера-Кребса (рН=7,4). Рабочая концентрация клеточной суспензии $(1,5-2,5) \times 10^6$ в 1 мл. Концентрацию клеток в суспензии измеряли в камере Горяева.

Величину микровязкости липидного бислоя оценивали по отношению интенсивностей флуоресценции эксимерной ($\lambda=470$ нм) и мономерной ($\lambda=372$ нм) форм пирена, а также путем измерения вращательной деполяризации флуоресценции зонда перилена ($\lambda_{\text{возб}}=416$ нм, $\lambda_{\text{рег}}=445$ нм). Полярность микроокружения пирена – по соотношению интенсивностей пиков тонкой структуры: $\lambda=372$ нм и $\lambda=392$ нм. Площадь поверхности мембраны лимфоцитов в области локализации отрицательно заряженного зонда АНС определяли по эффективности миграции энергии с молекул пирена на АНС ($\lambda_{\text{возб}}=360$ нм $\lambda_{\text{рег}}=400$ и 520 нм).

Белковую триптофановую флуоресценцию возбуждали при $\lambda=290$ нм, регистрировали при $\lambda=335$ нм. Степень белок-липидных взаимодействий оценивали по эффективности миграции энергии с триптофанильных остатков мембранных белков на располагающийся в гидрофобной части липидного бислоя неполярный флуоресцентный зонд пирен. Интенсивность ультрафиолетовой флуоресценции белка измерялась до и после добавления пирена в концентрации 5 мкМ ($\lambda_{\text{возб. пирена}}=335$ нм).

О количестве белка, подвижности его структур (триптофановых остатков), степени погружения в липид можно косвенно судить по собственной ультрафиолетовой флуоресценции (УФФ) и переносу энергии с белка на зонд-акцептор. Нами в качестве акцептора взят неполярный зонд пирен. Пирен в мембране связывается преимущественно с липидом и распределяется по всему липидному каркасу, чем глубже белок погружен в липидную фазу, тем лучше будет происходить перенос энергии с остатков триптофана на пирен. Эффективность переноса характеризуется величиной $\ln F_n/F$, где F и F_n – интенсивность УФФ белка в отсутствии и при наличии зонда. Кроме интенсивности УФФ белка, была также измерена ее поляризация [7].

Результаты и их обсуждение. Установлено, что интенсивность УФФ лимфоцитов у больных была в пределах или чуть выше нормы. Проведенная КВЧ-терапия мало изменяет УФФ лимфоцитов. Эффективность переноса энергии с триптофана на пирен в группе больных ниже нормы в среднем на 30%. После КВЧ-терапии эффективность переноса нормализуется, оставаясь на 10% ниже нормы. Полагаем, что в мембране лимфоцитов больных белок погружен в липидный каркас клеточных мембран незначительно или флуоресценция погруженных в липид белков частично гасится. Результаты измерений и вычислений белково-липидных взаимодействий клеточных мембран лимфоцитов приведены в таблице.

Собственная флуоресценция клеток в ультрафиолетовой области спектра связана, прежде всего, с триптофаном, содержащимся в белках плазматической мембраны, поэтому изменение интенсивности и поляризации УФФ клеток, а также интенсивности переноса энергии с белка на пирен связываются со структурной перестройкой белков плазматической мембраны лимфоцитов и с изменением жесткости

Таблица

Характеристики белков и белково-липидных взаимодействий клеточных мембран лимфоцитов

Группа	Интенсивность УФФ	$\ln F_p/F$	S (АНС)	$A_{пер}/(A_o - A_{пер})$	$1/k_s$	F_{372}/F_{394}
Доноры, n=7	30±8	0,33±0,03	9,0±0,7	0,34±0,02	0,19±0,02	0,94±0,02
Больные, n=23	33±7	0,25±0,06	10,7±2,8	0,47±0,01	0,25±0,01	0,94±0,03
Больные после КВЧ, n=14	32±6	0,30±0,05	10,0±1,4	0,37±0,03	0,20±0,01	0,93±0,02

микроокружения триптофановых остатков белков. С этими структурными перестройками, по видимому, связано и изменение площади поверхности мембраны в области локализации отрицательно заряженного зонда АНС, которая определяется по переносу энергии между двумя зондами.

Поскольку плазматические белки растворены в липидном каркасе мембраны, важно знать и состояние самого растворителя. Состояние липидного бислоя клеточной поверхности анализировалось с помощью гидрофобных флуоресцентных зондов перилена и пирена. Физическое состояние липидной фазы характеризует микровязкость, которая определяется путем измерения вращательной деполяризации флуоресценции зонда перилена, локализованного в липидном слое. При увеличении скорости вращательной диффузии молекул зонда анизотропия флуоресценции уменьшается. Установлено, что в случае однородных сред величина $A/(A_o - A)$ пропорциональна ее вязкости. Для биологических мембран, содержащих кластеры с существенно различающимися физико-химическими характеристиками, получается усредненное значение вязкости [7]. При использовании этого метода нами установлено, что величина $A/(A_o - A)$ для мембран лимфоцитов группы больных на 40% выше контроля.

Микровязкость липидной фазы мембраны можно измерить, используя другой подход – эффект эксимеризации пирена. В спектре флуоресценции этого зонда можно вычленивать флуоресценцию мономеров (F_m при 372 нм) и эксимеров (F_s при 470 нм). Вероятность сближения молекул пирена и образование эксимеров возрастает по мере увеличения латеральной диффузии, т.е. скорости движения молекул в плоскости мембраны.

Микровязкость, оцениваемая по F_m/F_s , не тождественна микровязкости, определяемой с помощью анизотропии флуоресценции перилена. Тем не менее, вязкость липидной фазы мембран лимфоцитов, оцененная по $1/k_s$ (k_s – константа эксимеризации, пропорциональна коэффициенту поступательной диффузии пирена и обратно пропорциональна вязкости мембраны), оказалась у больных также больше контроля. После КВЧ-терапии различий с контролем по этому параметру нет.

Использованный для липидной зоны зонд пирен имеет ярко выраженную колебательную структуру, причем форма спектра чутко реагирует на поляр-

ность окружения зонда. Соотношение интенсивности колебательных полос при 372 и 394 нм увеличивается с ростом полярности окружения. Измерение этого параметра показывает, что полярность микроокружения пирена в мембране лимфоцитов доноров и больных не отличается. После КВЧ-терапии полярность окружения пирена несколько снижается (статистически не достоверно).

Выявлено, что в плазматической мембране лимфоцитов больных происходят разнонаправленные структурные перестройки. Увеличение вязкости липидного бислоя, приводит к ограничению подвижности мембранных липидов, что в свою очередь изменяет липидно-белковые взаимодействия. Результатом этого являются конформационные изменения белковых молекул, регистрирующиеся при изучении интенсивности и поляризации УФФ, а также эффективности переноса энергии с белка на зонд и между зондами. Это все приводит к нарушению целостности белково-липидного каркаса и неспособности мембранной системы кооперативно отвечать (функционировать) как единое целое. Так как физические свойства клеточных мембран связаны с уровнем клеточного метаболизма, увеличение жесткости (вязкости) как липидной, так и белковой фаз плазматической мембраны лимфоцитов очевидно затрудняет работу ферментов, что приводит к невосприимчивости клеток к внешнему регуляторному сигналу. КВЧ-терапия частично (параметры: интенсивность белковой УФФ, миграция энергии с белка на флуоресцентные зонды, подвижность гидрофобных зондов) восстанавливает физические свойства клеточных мембран лимфоцитов больных.

Закключение. Установлено, что КВЧ-терапия приводит к изменениям в структуре плазматических мембран лимфоцитов, прежде всего изменяя вязкость липидной фазы, и тем самым нормализует работу клеток крови. По-видимому, противолучевые свойства КВЧ-терапии связаны со способностью при небольшой мощности излучения, оказывать значительное влияние на структурно-энергетический потенциал клеток и тканей [5, 8], что дает им возможность для репарации после повреждений и приводит к мембраностабилизирующему эффекту.

Метод КВЧ-терапии не обременителен для больного и персонала, прост в исполнении, не требует дорогостоящих дополнительных затрат, легко воспро-

изводится, может многократно повторяться на всех этапах лечения. Внедрение данного метода терапии в комплексное лечение пострадавших при аварии на атомной станции может способствовать более эффективной реабилитации больных.

Литература

1. Бецкий, О.В. Миллиметровые волны и живые системы / О.В. Бецкий, В.В. Кислов, Н.Н. Лебедева // М.: Сайнс-пресс. – 2004. – 272 с.
2. Гуськова, А.К. Медицинские последствия аварии на Чернобыльской АЭС. Основные итоги и нерешенные проблемы / А.К. Гуськова // Мед. радиология и радиационная безопасность. – 2010. – Вып. 55– № 3. – С. 17–28.
3. Гуськова, А.К. Атомная отрасль страны глазами врача / А.К. Гуськова // М.: Реальное время. – 2004. – 240 с.
4. Исследование воздействия облучения на население / под ред. Л.А. Ильина // Техногенное облучение и безопасность человека. – М., 2006. – С. 123–149.
5. Корытова, Л.И. Показания к использованию и клиническому применению КВЧ-терапии при лучевом лечении онкологических больных: пособие для врачей / Л.И. Корытова, С.Д. Иванов, О.П. Резункова. – СПб.: ЦНИРРИ МЗ РФ – 1995. – 11 с.
6. Корытова, Л.И. Онкология, КВЧ и тиолдисульфидная антиоксидантная система организма / Л.И. Корытова, Е.Ю. Бусина, О.П. Резункова // Миллиметровые волны в биологии и медицине. – М., 2004. – № 1. – С. 40–47.
7. Резункова, О.П. Комплексное биофизическое исследование состояния популяции лимфоцитов тимуса животных после облучения в разных дозах: автореф....дис. ... канд. биол. наук / О.П. Резункова СПб.: ЦНИРРИ МЗ РФ. – 1992. – 16 с.
8. Старик, А.М. Влияние электромагнитного излучения миллиметрового диапазона и ионизирующей радиации на организм и тимocyты мышей и крыс / А.М. Старик и др. // Цитология. – 1995. – Т. 37. – № 4. – С. 304–310.
9. Чуюн, Е.Н. Физиологические механизмы биологических эффектов низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ / Е.Н. Чуюн [и др.] // Симферополь. – 2003. – 448 с.

V.Yu. Tegza, O.P. Rezunkova, L.I. Korytova, S.G. Kuzmin, P.P. Makarov, I.V. Lobachev

The extremely high-frequency therapy of victims at Chernobyl failure

Abstract. Possibilities of application of a well-founded method of treatment of consequences of ionising radiation – the extremely high-frequency therapy for victims are considered at failure at Chernobyl nuclear station. It is revealed that in a plasmatic membrane of lymphocytes of patients there are structural reorganizations: viscosity lipidic a layer increases, lipidno-albuminous interactions change. It is shown that the spent extremely high-frequency therapy leads to changes in structure of plasmatic membranes of lymphocyte, first of all changing viscosity lipidic phases and normalising work of blood cells. It is established that antiradiation properties of the extremely high-frequency therapy, first of all, are connected with ability at small capacity of radiation to make considerable impact on structurally-energy potential cages that gives the chance to them for a reparation after damages and leads to effect of stabilization of a membrane. The extremely high-frequency therapy method isn't burdensome for the patient and the personnel, is simple performed by, doesn't demand expensive additional expenses, easily is reproduced, can repeatedly repeat at all stages of treatment.

Key words: Chernobyl, nuclear station, the extremely high-frequency therapy, plasmatic membranes, lymphocytes, fluorescent probes, energy migration.

Контактный телефон: 8-921-390-18-32; e-mail: ararog@mail.ru