

Влияние сверхвысокочастотного облучения дотепловой интенсивности на антипорт ионов через мембраны эритроцитов

Б. Г. Емец

Харьковский государственный университет
Пл. Свободы, 4, Харьков, 310077, Украина

Показано, что низкоинтенсивное СВЧ облучение оказывает влияние на эритроциты, в частности, на величину энергии активации антипорта ионов Cl^-/OH^- через эритроцитарные мембраны. Установлено также, что энергия активации понижается на 30 % после получасового облучения миллиметровыми радиоволнами дотепловой интенсивности. Предложено объяснение наблюдаемого эффекта с учетом роли воздушных микропузырьков в реализации уменьшения толщины пограничного примембранного слоя жидкости при облучении.

Введение. В последние десятилетия на Земле значительно увеличилась плотность распределения устройств, излучающих радиоволны (теле- и радиостанции, генераторы электромагнитных (ЭМ) полей для промышленного применения и т. п.). Хотя техногенный ЭМ фон имеет низкую интенсивность, он, безусловно, оказывает воздействие на окружающую природу. Актуальным поэтому представляется исследование биологического влияния небольших, так называемых дотепловых, интенсивностей на клетки крови, в частности, на эритроциты. (Принято считать дотепловым уровнем интенсивности ЭМ поля такое ее значение, при котором облучение не повышает температуры образца более чем на $0,1\text{ }^\circ\text{C}$ [1].) Цель настоящей работы состояла в выяснении того, дают ли «ответ» эритроциты на воздействие микроволн дотепловой интенсивности, а также в определении последовательности событий, происходящих в промежутке между попаданием ЭМ волны на бисреду и формированием биологического ответа.

Материалы и методы. В настоящей работе исследовали эритроциты донорской крови человека. Контролируемым параметром, по которому определяли уровень биологического ответа на воздействие ЭМ поля, являлась величина энергии активации

Cl^-/OH^- -обмена (антипорта ионов) через эритроцитарную мембрану, т. е. высота энергетического барьера. Антипорт реализуется при помещении эритроцитов в незабуференную изотоническую среду с пониженной концентрацией ионов хлора. При этом происходит выход некоторого количества указанных ионов из эритроцитов через плазматическую мембрану; взамен для поддержания электрического равновесия в клетках в эритроциты входят ионы гидроксила. При этом понижается рН межклеточной среды, а поскольку в среде отсутствует буфер, то изменение концентрации ионов OH^- в точности соответствует изменению концентрации ионов Cl^- . Появляется возможность, измеряя рН среды водородным электродом иономера, определять количество покинувших эритроциты ионов хлора. Отмеченный выход ионов хлора приводит к возникновению Cl^- -потенциала на мембране со знаком «плюс» внутри клетки. Следовательно, кинетика рН среды инкубации «отслеживает» изменение трансмембранного потенциала $\Delta\psi$. При $\Delta\psi$, превышающем некоторую критическую величину, закисление среды сменяется обратным защелачиванием. (В [2, 3] это объясняется выходом из клетки ионов калия в результате электрического пробоя мембран эритроцитов.) Типичная кривая изменения рН, несущая информацию о барьерных свойствах мембран эритроцитов, приведена на рис. 1. Начальную скорость закисления можно оценить, измеряя вре-

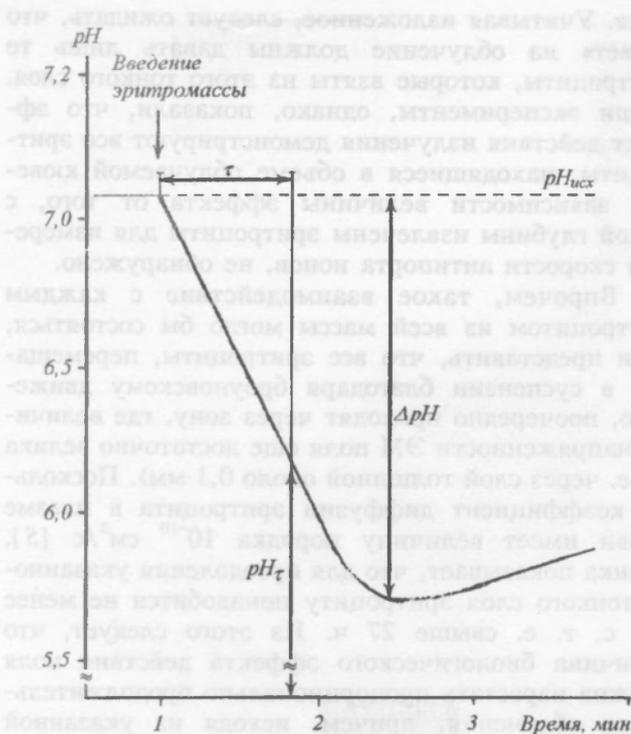


Рис. 1. Изменение pH среды после введения эритроцитарной массы. Обозначения см. в тексте

мя τ , за которое происходит закисление на величину $(1 - e^{-1})$ от полной амплитуды ΔpH , т. е. за время, когда значение pH уменьшается от $pH_{исх}$ до величины $pH_{\tau} = pH_{исх} - \Delta pH(1 - e^{-1})$; e — основание натурального логарифма. Очевидно, скорость $V = \Delta pH(1 - e^{-1})/\tau$ отражает уровень антипорта ионов Cl^-/OH^- через мембрану. Скорость закисления связана с температурой T соотношением Аррениуса $V = V_0 \exp(-E_a/RT)$, где E_a — энергия активации процесса. Определение энергии активации производится измерением скорости закисления среды с последующим построением графика в аррениусовских координатах. Типичный график изображен на рис. 2. Тангенс угла наклона прямой равен энергии активации антипорта.

Исследуемые эритроциты трижды отмывали в физиологическом растворе (0,85 % NaCl), pH = 7,0–7,2. Эритроцитарную массу содержали при температуре тающего льда. 20 мкл эритроцитарной массы вводили при непрерывном перемешивании в термостатируемую кювету, содержащую 5 мл 0,29 М раствора сахарозы («Reanal», Венгрия). При темпе-

ратурах 10, 13, 15, 18 и 20 °С регистрировали кинетику изменения pH с помощью иономера ЭВ-74 (электрод ЭСЛ-43-07) на самопишущем потенциометре КСП-4, после чего, используя вышеописанную процедуру, определяли энергию активации антипорта. Эритроцитарную массу облучали ЭМ колебаниями сверхвысокой частоты (СВЧ), вырабатываемыми генератором типа Г4-141. Частота колебаний 38,0 ГГц (длина волны 8 мм), мощность 0,4 Вт. Указанная мощность гарантировала дотепловой режим облучения; это подтвердила термометрия. Эритроцитарную массу при облучении также содержали при температуре тающего льда.

Результаты и обсуждение. Исследовали образцы, полученные от 15 доноров. Установлено, что СВЧ облучение во всех без исключения случаях приводило к понижению энергии активации антипорта Cl^-/OH^- . Эффект проявлялся тем сильнее, чем дольше облучали образец: 15-мин экспозиция снижала высоту энергетического барьера на 19 %; 30-мин — на 30 %; 45-мин — на 36 %; часовая — на 39 %; двухчасовая — на 40 %. (Приведенные цифры являются усредненными по всем 15 донорам. Абсолютные значения энергий активации у образцов, принадлежащих разным донорам, заметно отличались друг от друга и находились в пределах от 40 до 60 кДж/моль. Типичный пример, характеризующий влияние микроволн на эритроциты одного из доноров: до облучения энергия активации антипорта равнялась $46,2 \pm 1,5$ кДж/моль, после 30-мин облучения — $32,3 \pm 1,5$ кДж/моль, рис. 2.) Очевидно, что СВЧ воздействие дотепловой интенсивности приводит к вполне заметному ответу клетки.

В настоящей работе выполнены измерения продолжительности сохранения «памяти» эритроцитов о полученном СВЧ воздействии. Для этого в течение 6 ч после прекращения получасового облучения каждые 20 мин измеряли скорость антипорта Cl^-/OH^- при температуре 20 °С. Величина скорости монотонно падала со временем к исходному значению контрольного (необлученного) образца. Наблюдалась следующая динамика уменьшения скорости: сразу же после прекращения облучения прирост скорости относительно исходного (контрольного) значения составил 30 %, спустя 1 ч — 21 %, через 2 ч — 15 %, через 4 ч — 7 %. Через 6 ч прирост скорости составил 1 %. (Здесь приведены усредненные относительные изменения скорости по всем 15 донорам, поскольку индивидуальные значения скоростей антипорта у разных доноров сильно отличались. У некоторых доноров этой группы исходные (контрольные) значения скоростей различались между собой почти в 2 раза.)

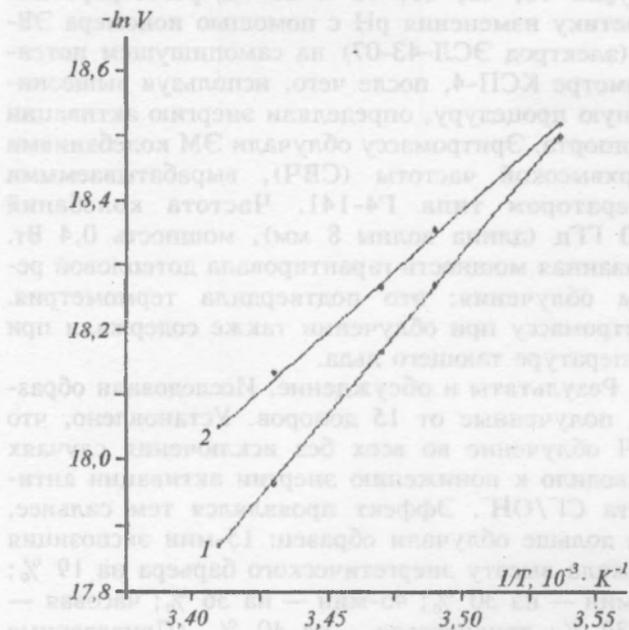


Рис. 2. График Аррениуса для скорости закисления среды: 1 — эритроциты (контроль); 2 — эритроциты после 30-мин СВЧ облучения

Таким образом, по нашим данным, СВЧ облучение эритроцитов даже столь низкой (дотепловой) интенсивности приводит к достаточно продолжительному последствию на характеристики эритроцитарных мембран.

Естественно, возникает вопрос о механизме, благодаря которому ЭМ энергия СВЧ излучения обеспечивает появление биологического ответа. В [1] изложена гипотеза об «информационном» взаимодействии миллиметровых волн и биообъектов, реализующемся при совпадении частоты облучающего поля с частотой колебаний биосистемы. При этом предполагается, что ЭМ поле «контактирует» с клетками, т. е. проникает в межклеточную жидкость достаточно глубоко, так, чтобы, например, как в нашем случае, облучить все эритроциты, находящиеся в кювете. Заметим, что глубина проникновения миллиметровых волн в воду невелика. Например, излучение на длине волны 2 мм проникает в воду лишь на 0,1 мм [4]. Поле на этой глубине ослабляется в 2,718 раза (число «e»). Применительно к нашему случаю это означает, что лишь те эритроциты, которые содержатся в суспензии в верхнем слое такой толщины (если облучение ведется сверху), попадают в зону действия

поля. Учитывая изложенное, следует ожидать, что «ответ» на облучение должны давать лишь те эритроциты, которые взяты из этого тонкого слоя. Наши эксперименты, однако, показали, что эффект действия излучения демонстрируют все эритроциты, находящиеся в объеме облучаемой кюветы; зависимости величины эффекта от того, с какой глубины извлечены эритроциты для измерения скорости антипорта ионов, не обнаружено.

Впрочем, такое взаимодействие с каждым эритроцитом из всей массы могло бы состояться, если представить, что все эритроциты, перемещаясь в суспензии благодаря броуновскому движению, поочередно проходят через зону, где величина напряженности ЭМ поля еще достаточно велика (т. е. через слой толщиной около 0,1 мм). Поскольку коэффициент диффузии эритроцита в плазме крови имеет величину порядка 10^{-10} см²/с [5], оценка показывает, что для преодоления указанного тонкого слоя эритроциту понадобится не менее 10^5 с, т. е. свыше 27 ч. Из этого следует, что величина биологического эффекта действия поля должна нарастать пропорционально продолжительности облучения, причем, исходя из указанной оценки, факт облучения всех без исключения эритроцитов, содержащихся в объеме стандартной кюветы, может быть гарантирован лишь при экспозиции свыше нескольких суток. Однако результаты наших опытов свидетельствует о том, что биологический эффект увеличивается почти пропорционально продолжительности облучения лишь при экспозициях, меньших 45 мин. Энергия активации антипорта при экспозициях в пределах 45 мин — 2 ч изменяется примерно на одинаковую величину. Иными словами, начиная с 45-мин экспозиции эффект действия поля «выходит на насыщение».

Из представленных данных следует, что при выбранных экспозициях прямого взаимодействия ЭМ поля миллиметрового диапазона со всей массой эритроцитов, содержащихся в облучаемой кювете, не происходит. Поэтому остается предположить, что ЭМ поле, по-видимому, изменяет состояние межклеточной среды (физиологического раствора), которое в свою очередь влияет на изменение энергии активации антипорта ионов. Укажем на возможный механизм изменения состояния межклеточной среды, обусловленный наличием в ней воздушных пузырьков. (Как известно, в реальной жидкости (в воде) помимо растворенного воздуха всегда присутствует воздух в свободном состоянии (пузырьки). Средний размер пузырьков порядка 10^{-6} см. Полностью удалить свободный воздух из водных систем невозможно; это обусловлено молекулярными механизмами взаимодействия в системе

жидкость — газ [6, 7].) Можно создать условия, при которых воздушные пузырьки будут двигаться в одном и том же направлении, накапливаясь в определенной зоне. Подобные условия реализуются, например, если нагревать сверху жидкость в кювете. При этом возникает температурный градиент по толщине, в поле которого на воздушный пузырек радиуса R действует сила, перемещающая его к более теплой области образца (термокапиллярный эффект) [8]: $F_m = -2\pi R^2 \nabla T d\sigma/dT$. (Здесь ∇T — температурный градиент, поддерживаемый вдали от пузырька; σ — коэффициент поверхностного натяжения.) Оценки, выполненные в [9], показывают, что направленное движение воздушных пузырьков в воде может происходить и при совсем небольшом температурном градиенте — порядка 0,05 К/м. (Не меньший температурный градиент реализовался в наших опытах при облучении эритроцитарной суспензии миллиметровыми волнами мощностью 0,4 мВт, т. е. в так называемом низкоинтенсивном, дотепловом режиме воздействия.)

При движении пузырьков в жидкости происходит перемешивание последней. Поскольку воздушные пузырьки распределены во всем объеме жидкости, в том числе и в непосредственной близости к эритроцитам — в примембранном слое воды (в диффузионном слое Нернста), то этот слой также перемешивается, что облегчает трансмембранный перенос ионов. Таким образом, низкоинтенсивные микроволны, незначительно нагревая тонкий слой жидкости, обеспечивают направленное движение воздушных микропузырьков, в результате чего перемешивается примембранный слой воды. Поскольку энергетическим барьером для трансмембранного переноса ионов является совокупность, состоящая из собственно мембраны (липидного бислоя) и примыкающего к ней водного диффузионного слоя Нернста [10], то неудивительно, что перемешивание последнего понижает энергию активации антипорта ионов.

Известно, что при фиксированных температуре и давлении в водной среде существует вполне определенная равновесная функция распределения воздушных пузырьков по размерам [6]. Плотность размещения пузырьков в объеме межклеточной жидкости является более или менее равномерной. Если возникает температурный градиент, то реализуются и новая функция распределения пузырьков по размерам, и неравномерное размещение пузырьков по объему. После прекращения облучения (т. е. после снятия температурного градиента) происходит восстановление равновесной функции распределения пузырьков по размерам и равномерно-

сти их размещения по объему межклеточной жидкости. В ходе этих процессов пузырьки перемещаются и перемешивают жидкость. Такое «пузырьковое» перемешивание продолжается вплоть до момента установления указанных равновесных параметров, т. е. может длиться сравнительно долго. Этим может быть объяснено наличие наблюдаемого нами проявления «памяти» эритроцитов о полученном СВЧ воздействии: уменьшенное значение энергии активации антипорта ионов сохранялось и спустя 4 ч после прекращения получасового облучения.

На основании вышеизложенного можно заключить, что СВЧ облучение дотепловой интенсивности является биологически значимым фактором. Оно ускоряет трансмембранный антипорт Cl^-/OH^- опосредованно, стимулируя перемещение в жидкости воздушных включений (пузырьков). Их движение обеспечивает перемешивание жидкой среды, что приводит к уменьшению толщины примембранного слоя жидкости, который ионы могут преодолевать лишь путем диффузии.

Выводы. Облучение эритроцитов электромагнитными СВЧ колебаниями дотепловой интенсивности приводит к понижению энергии активации антипорта Cl^-/OH^- через эритроцитарные мембраны.

Повышенное вследствие СВЧ облучения значение скорости трансмембранного антипорта Cl^-/OH^- сохраняется сравнительно продолжительное время после прекращения облучения.

Наблюдаемые изменения параметров трансмембранного переноса ионов могут быть объяснены наличием «пузырькового» механизма перемешивания примембранного слоя жидкости. (СВЧ воздействие обеспечивает перемещение пузырьков за счет возникающих при облучении термокапиллярных сил.)

Б. Г. Ємець

Вплив надвисокочастотного опромінення дотеплової інтенсивності на антипорт іонів через мембрани еритроцитів

Резюме

Висота енергетичного бар'єра для пасивного транспорту іонів через еритроцитарну мембрану знижується внаслідок впливу радіохвиль НВЧ дотеплової інтенсивності. Це зумовлено зменшенням товщини прикордонного шару рідини, котрий іони можуть подолати лише завдяки дифузії. Зменшення товщини спричинене перемішуванням міжклітинної рідини, що ефективно здійснюється повітряними бульбашками, які рухаються у рідині в полі температурного градієнта. Температурний градієнт, який створюється навіть низькоінтенсивним електромагнітним опроміненням рідини, є достатнім для ефективного впливу на примембранний шар водного розчину.

B. G. Yemets

The influence of microwaves of very low intensity on antiport of ions through erythrocyte membranes

Summary

The energy barrier for passive transporting of ions through an erythrocyte membrane is lowered as a result of effects of the very low intensity microwaves. This occurs due to decreasing the thickness of a boundary unmixed liquid layer which can be passed through by the ions only by diffusion. The thickness decreasing is caused by intercellular liquid being actively intermixed; this activation is provided by decelerating motions of air bulbs present in the liquid in a temperature gradient field. The temperature gradient caused by the very low intensity microwaves is sufficient for such effects on the water layer situated close to the membrane.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Девятков Н. Д., Голант М. Б., Бецкий О. В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности.—М.: Радио и связь, 1991.—168 с.
2. MacCoy R. L., Adorante G. S., Orme F. W. Membrane red cell potential defined by distribution ion H^+ // Biophys. et biochim. acta.—1978.—512, N 2.—P. 284—295.
3. Путвинский А. В., Попов С. А., Пучкова Т. В., Данилов Ю. А., Владимиров Ю. А. Электрический пробой мембран эритроцитов за счет диффузионной разности потенциалов

// Биофизика.—1983.—28, № 3.—С. 505—506.

4. Chamberlain J. E., Chantry G. W., Gebbie H. A., Stone N. W. B., Taylor T. B., Wyllie G. Submillimetre absorption and dispersion of liquid water // Nature.—1966.—210, N 5038.—P. 790—791.
5. Регупер С. А. Лекции по биологической механике.—М.: Изд-во МГУ, 1980.—Ч. 1.—144 с.
6. Гаврилов Л. П. Содержание свободного газа в жидкости и акустические методы его измерения // Акуст. журн.—1969.—15, № 3.—С. 321—335.
7. Бункин Н. Ф., Виноградова О. И., Куклин А. И., Лобеев А. В., Мовчан Т. Г. К вопросу о наличии воздушных субмикробузырей в воде // Письма в ЖЭТФ.—1995.—62, № 8.—С. 659—662.
8. Кузнецов В. М., Луговцов Б. А., Шер Е. И. О движении газовых пузырьков в жидкости под действием градиента температуры // Журн. прикл. математ. и техн. физики.—1966.—№ 1.—С. 124—126.
9. Емец Б. Г. Эффективное извлечение газа из жидкости с помощью микроволн при практически неизменной температуре // Письма в ЖТФ.—1996.—22, № 8.—С. 22—24.
10. Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт.—М.: Мир, 1980.—341 с.

Поступила в редакцию 17.12.97
УДК 577.352.465 :537.868