

Cherniavsky E.A.*PhD Chemistry, lead researcher**Research Science Institute for Physical and Chemical Problems of the BSU***Bolotina E.A.***Junior researcher**Research Science Institute for Physical and Chemical Problems of the BSU***Branovitskaya E.S.***Junior researcher**Research Science Institute for Physical and Chemical Problems of the BSU***Mikhaltsova N.M.***Intern**Research Science Institute for Physical and Chemical Problems of the BSU***Harutyunyan A.A.***PhD Veterinary, Senior researcher**Scientific-Research Centre,**Yerevan State Medical University after Mkhitar Heratsi***Yenkoyan K.B.***Doctor of Science in Biology and Medicine,**Professor in Biochemistry Department,**Yerevan State Medical University after Mkhitar Heratsi***EFFECTS OF ELECTROSTATIC FIELD ON FIBRINOGENOLYTIC ACTIVITY OF BLOOD CELLS****Чернявский Евгений Анатольевич***кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник**Научно-исследовательский институт физико-химических проблем**Белорусского государственного университета***Михальцова Наталья Михайловна***стажер младшего научного сотрудника**Научно-исследовательский институт физико-химических проблем**Белорусского государственного университета***Болотина Екатерина Александровна***младший научный сотрудник**Научно-исследовательский институт физико-химических проблем**Белорусского государственного университета***Брановицкая Екатерина Сергеевна***младший научный сотрудник**Научно-исследовательский институт физико-химических проблем**Белорусского государственного университета***Арутюнян Айк Ашотович***Кандидат ветеринарных наук, научный сотрудник**Научно-исследовательский центр,**Ереванский государственный медицинский университет имени Мхитара Гераци***Енкоян Константин Борисович***доктор медицинских наук, профессор кафедры биохимии**Ереванский государственный медицинский университет имени Мхитара Гераци***ЭФФЕКТЫ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ НА ФИБРИНОГЕНОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК КРОВИ**

Summary. The effect of an electrostatic field (ESF) of 100 kV / m on human blood cells was studied. It has been shown that ESF has a stabilizing effect on erythro-cytes. It was shown that during the treatment of both erythrocytes and platelets proteolytic enzymes were released in extracellular medium. In the case of leukocytes, the effect of ESF did not lead to the release of proteolytic enzymes.

Аннотация. Изучено влияния электростатического поля (ЭСП) напряженностью 100 кВ/м на клетки крови человека. Установлено, что ЭСП оказывало стабилизирующий эффект на клетки эритроцитов. Показано, что в процессе обработки, как эритроцитов, так и тромбоцитов из клеток высвобождались протеолитические ферменты. В случае лейкоцитов воздействие ЭСП не приводило к высвобождению во внеклеточную среду протеолитических ферментов.

Key words: *electrostatic field, plasma, blood, blood cells, erythrocytes, plates, leukocytes, proteases, fibrinogen.*

Ключевые слова: *электростатическое поле, плазма, кровь, клетки крови, эритроциты, тромбоциты, лейкоциты, протеазы, фибриноген.*

Постановка проблемы. На протяжении более 10 лет широкое распространение получило использование ЭСП в клинической практике. ЭСП способствует появлению различной степени выраженности вибрации в тканях, распространяющейся на значительную глубину. Эти колебания способны оказывать влияние на нервно-рецепторный аппарат, локально расположенные кровеносные и лимфатические сосуды, регулировать тонус мышц, воздействовать на функциональное состояние внутренних органов. Данный метод в настоящее время применяется при лечении патологий органов опоры и движения, заболеваниях центральной и периферической нервной системы, лимфотической и венозной недостаточности, патологии бронхолегочной системы и органов пищеварения. [1]

Не смотря на широкое распространение ЭСП их влияние живые организмы до сих пор полностью не изучены. В ряде исследований показаны отрицательные эффекты при действии электромагнитных полей, в то время как в других исследованиях отмечено отсутствие отрицательных последствий от воздействия данных полей на живые организмы. Исследование биологических эффектов показало, что наиболее чувствительны к электростатическому полю (ЭСП) центральная нервная система и сердечно-сосудистая система [2]. Довольно сложным является рассмотрение теоретической стороны этого вопроса в связи с многофункциональностью действия сил электромагнитного поля и сложностью структурных и надструктурных превращений, протекающих на микро- и макроуровнях в физико-химической системе [3].

Выяснение механизмов действия электростатических полей как на ключевые компоненты и системы крови в конечном итоге, дает возможность прогнозирования действия ЭСП на различные системы организма.

Анализ последних исследований и публикаций. В литературе приводятся данные, указывающие на те или иные сдвиги в функционировании организма в результате повышения напряженности внешних ЭСП. Особое внимание отводится изучению влияния ЭСП на систему про-/антиоксидантного гомеостаза. Было показано, что внешние ЭСП приводят к увеличению внутриклеточных реактивных форм кислорода (РФК), а также вызывают исходное понижение активности антиоксидантных ферментов с последующей адаптивной активацией. Кроме того, показан эффект внешних ЭСП как на естественные, так и на искусственные биологические мембраны. Имеются данные об изменении активности системы свертывания крови под влиянием ЭСП [4-9]. Ранее нами было показано, что ЭСП приводит к существенным сдвигам в функционировании системы гемостаза. Данный эффект наблюдался лишь в присутствии клеток [10-13]

Выделение нерешенных ранее частей общей проблемы. Исследования по влиянию ЭСП на биологические системы крайне малочисленны, отры-

вочны и часто противоречивы. Тем не менее, имеются весомые предпосылки того, что система свертывания крови подвержена влиянию внешнего ЭСП. Выяснение данной проблемы и вскрытие механизмов воздействия внешнего ЭСП на процессы гемостаза составляет суть данной научной работы. Поставленная проблема, насколько можно судить по доступной литературе, до сих пор не решена.

Цель статьи. Цель работы заключалась в изучении влияния электростатического поля на протеолитические ферменты плазмы и клеток крови.

Изложение основного материала.

Материалы и методы исследования. В работе использовали: кровь, свежесамороженную цитратную плазму донорской крови и тромбоцитарную массу («Республиканская станция переливания крови», Минск, Беларусь), Фибриноген, эритроциты и лейкоциты выделяли из донорской крови.

Выделение лейкоцитов проводили по методике [14]. Кровь получали от здоровых доноров из вены с использованием 3,8% цитрата натрия в качестве противосвертывающего агента. Образец крови смешивали с равным объемом 1% раствора желатина и инкубировали 1 час при 37°C. После осаждения эритроцитов, супернатант отбирали в отдельную пробирку и трижды отмывали раствором Хенкса, центрифугируя по 10 мин при 3000 об/мин.

Выделение эритроцитов проводили по методике [15]. В пробирку с кровью добавляли двукратный избыток буфера 50 мМ Tris-HCl с pH 7,4, содержащего 150 мМ NaCl, центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин. Далее супернатант удаляли и полученные эритроциты 3 раза промывали избытком буферного раствора, центрифугируя по 10 мин при 2000 об/мин.

Для анализа белков использован метод капиллярного электрофореза (прибор: P/ACE MDQ Capillary electrophoresis System (Beckman Coulter Inc., США), капилляры диаметром 50 мкм, эффективная длина 21 см, спектрофотометрический детектор);

Спектрофотометрические измерения проводились на спектрофотометре Solar PB2201 (Беларусь), с использованием программ регистрации спектров поглощения. Применяли кварцевые кюветы с длиной оптического пути 10 мм.

Для определения протеолитической активности использовали модифицированный метод М.Л. Ансона [16]. Метод основан на гидролизе 2% белка (в данной работе использовали фибриноген) препаратом фермента при $(37,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$, с последующей инактивацией фермента и осаждением непрогидролизованного белка 0,3 М трихлоруксусной кислотой (далее ТХУ). Для полного осаждения раствор выдерживали 20 мин при $(37,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ и фильтровали.

Протеолитическую активность в ед/мл вычисляли по формуле:

$$A = \frac{D \cdot 4 \cdot 1000}{1,15 \cdot 10 \cdot m}$$

где D – оптическая плотность, измеренная спектрофотометрически;
 4 – отношение объемов реакционной смеси и раствора фермента после добавления ТХУ;
 $1,15$ – тирозиновый эквивалент;
 10 – время гидролиза субстрата, мин;
 m – количество ферментного препарата, взятого на протеолиз (в мг на 1 мл ферментного раствора);
 1000 – переводной коэффициент полученных единиц на 1 г ферментного препарата.

Электростатическое поле генерировали с использованием блока питания постоянного тока высокого напряжения, с диапазоном напряжений до 2 кВ, двух прямоугольных пластин-электродов на расстоянии 2 см друг от друга, установленных на

диэлектрике, конденсатора высокой емкости. Интенсивность электростатического поля составляла от 10 до 100 кВ/м.

Результаты и обсуждение.

Эксперименты по изучению электростатического поля на клеточные элементы крови проводили с использованием клеток, суспендированных в плазме крови. Для выяснения возможных эффектов на саму плазму проводили измерение протеолитической активности образцов плазмы, обработанной ЭСП (100 кВ/м) в течение 1 часа и контрольного образца (1 час при комнатной температуре). Сравнение данных контрольного образца и обработанного ЭСП показало отсутствие статистически значимых отличий (рис. 1).

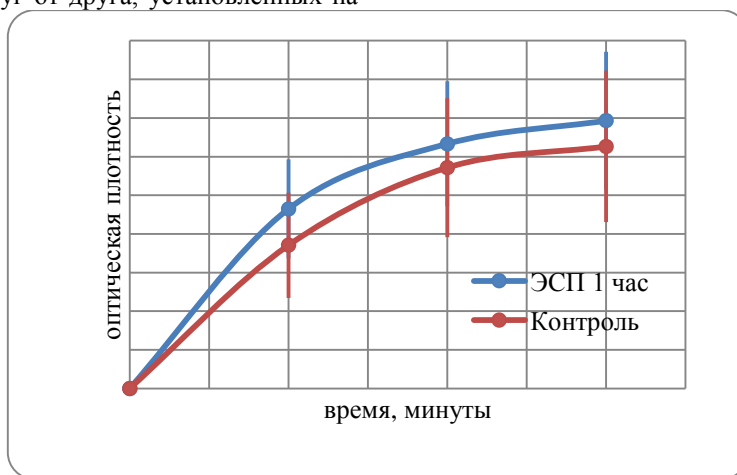


Рисунок 1. Зависимость оптической плотности водорастворимых пептидов, высвобождающихся при гидролизе фибриногена ферментами плазмы крови от времени гидролиза.

В качестве модельной системы использовали суспензию тромбоцитов в плазме крови. При обработке суспензии тромбоцитов ЭСП протеолитическая активность образцов по отношению к фибриногену увеличивалась по сравнению с необработанными образцами. На рисунке 2 показан график изменения протеолитической активности подвергнутых действию ЭСП образцов суспензии тромбоцитов по сравнению с контрольными необработанными образцами. Из рисунка 2 видно, что увеличение времени предварительной обработки ЭСП

приводило к повышению протеолитической активности суспензии тромбоцитов. Обработка суспензии тромбоцитов ЭСП в течение 2 часов при комнатной температуре приводила к повышению протеолитической активности суспензии тромбоцитов на 1000 ед/мл, что составляло 28,3 % по сравнению с необработанными образцами. Дальнейшее увеличение времени до 4 ч. не приводило к увеличению протеолитической активности.

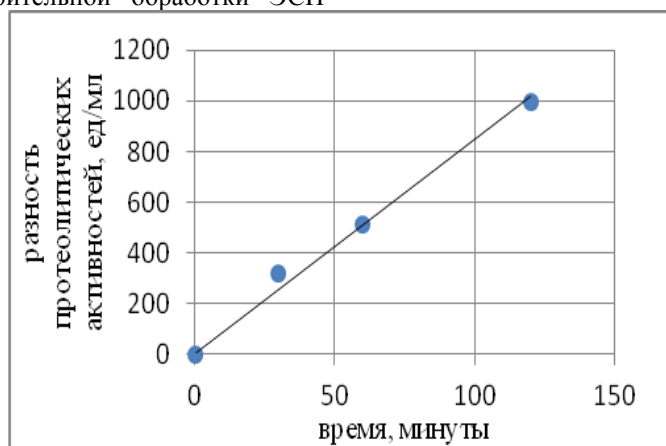


Рисунок 2. Зависимость разности протеолитической активности образца суспензии тромбоцитов, обработанного ЭСП в течение разного промежутка времени, и контрольного образца, не подверженного действию ЭСП от времени обработки ЭСП.

Далее было изучено действие ЭСП на лейкоциты. В работе были использованы отмывые клетки лейкоцитов в растворе, содержащем 4 % сывороточного альбумина и 0,9 % хлорида натрия. Установлено, что как контрольная суспензия лейкоцитов, так и суспензия лейкоцитов, подвергнутая воздействию ЭСП в течение 4 часов не обладала протеолитической активностью по отношению к таким белковым субстратам, как фибриноген.

Для изучения действия ЭСП (100 кВ/м) на изолированные клетки эритроцитов человека были использованы две модельные системы: отмывые

клетки эритроцитов в изотоническом растворе хлорида натрия и цельная венозная кровь человека. На рисунке 3 показана электрофореграмма высвобождающихся из эритроцитов продуктов белковой природы при обработке суспензии клеток в изотоническом растворе ЭСП в течение 30 мин (рис 3.а) и контрольного образца, инкубированного при комнатной температуре в течение 30 мин (рис 3.б). Из рисунка видно, что при наложении ЭСП процесс гемолиза замедлялся, что проявлялось в меньшем содержании белков в растворе.

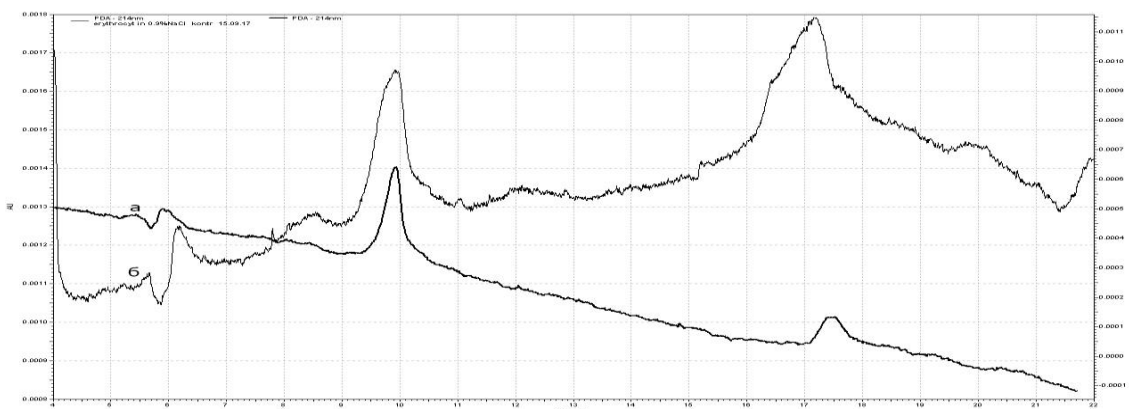


Рисунок 3 – Анализ высвобождающихся из эритроцитов белков методом капиллярного электрофореза.

а: электрофореграмма образца супернатанта предварительно инкубированной при комнатной температуре в ЭСП (100кВ/м) в течение 30 мин суспензии клеток эритроцитов в изотоническом растворе хлорида натрия;

б: электрофореграмма образца супернатанта предварительно инкубированной при комнатной температуре в течение 30 мин суспензии клеток эритроцитов в изотоническом растворе хлорида натрия.

На рисунке 4 представлены результаты капиллярного электрофореза плазмы необработанной крови (рис 4.а), плазмы, полученной из образца крови после выдерживания в ЭСП в течение 30 мин (рис 4.б) и плазмы контрольного образца крови, инкубированного при комнатной температуре в течение 30 мин (рис 4.в). Из рисунка видно, что при инкубировании крови при комнатной температуре в

плазму высвобождались белки, о чем свидетельствует увеличение на электрофореграммах пиков, соответствующих фракциям α и γ глобулинов. При этом, как и в случае суспензии эритроцитов, ЭСП поле оказывает стабилизирующее действие на клеточные компоненты крови.

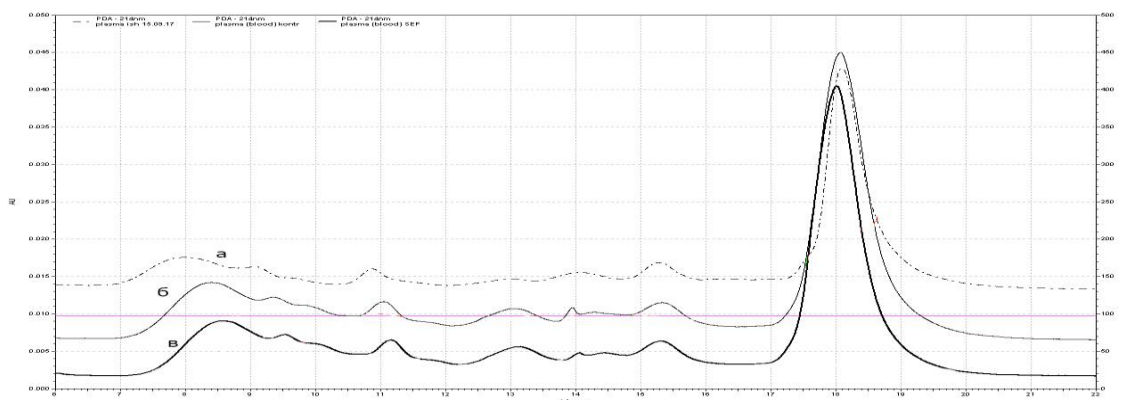


Рисунок 4 – Анализ плазмы крови методом капиллярного электрофореза

а – электрофореграмма исходной плазмы крови;

б – электрофореграмма плазмы предварительно инкубированной при комнатной температуре в течение 30 мин крови;

в – электрофореграмма плазмы предварительно инкубированной при комнатной температуре в ЭСП (100кВ/м) в течение 30 мин крови

В результате обработки образцов крови ЭСП в течение 1 часа при комнатной температуре и дальнейшем центрифугировании пробы, в суспензии эритроцитов наблюдалось уменьшение протеолитической активности ферментов, а в супернатанте наблюдалось повышение протеолитической активности. Таким образом, можно сделать вывод, что из эритроцитов под действием ЭСП высвобождались протеолитические ферменты во внеклеточную среду.

Выводы и предложения. Изучено влияния электростатического поля (ЭСП) напряженностью 100 кВ/м на клетки крови человека. Установлено, что ЭСП оказывает стабилизирующий эффект на эритроциты. Показано, что в процессе обработки, как эритроцитов, так и тромбоцитов из клеток высвобождались протеолитические ферменты. В случае лейкоцитов воздействие ЭСП не приводило к высвобождению во внеклеточную среду протеолитических ферментов. Установлено, что время образования плазменного и кровяного сгустков увеличивалось в ЭСП. Механизм данного явления требует дальнейшего изучения.

Работы выполнены при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б17Арм-051) и Государственного комитета по науке Министерства образования и науки Республики Армения (грант НВ16-56).

Список литературы:

1. Применение низкочастотного электростатического поля в клинической практике / А.Г. Куликов, Е.Г. Кузовлева // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация – 2016 – N.4. – С. 44-53
2. Comparison between two models for interactions between electric and magnetic fields and proteins in cell membranes / M.N. Halgamuge [et al.] // Environmental engineering science. – 2009. – Vol.26. – P. 1473-1480.
3. Microwave effects on the nervous system / J.A. D'Andrea [et al.] // Bioelectromagnetics – 2003. – Vol.6. – P. 39-62/
4. Calcium bursts induced by nanosecond electric pulses / P.T. Vernier [et al.] // Biochem Biophys Res Commun – 2003. Vol.310 – P. 286-295.
5. Sahakyan, G.V. The in vitro and in vivo influences of external electrostatic fields on the membranes of erythrocytes / G.V. Sahakyan, G.G. Artsruni // New Medical Armenian J. – 2010. Vol.4. P. 140.
6. Poghosyan, G. A. The influence of electrostatic fields on the electrokinetic's potential of erythrocytes / G.A. Poghosyan, G.V. Sahakyan, G.G. Artsruni // Biological J. of Armenia – 2007. – Vol.1-2. – P. 136-138.

7. Sahakyan G.V. The influence of electrostatic fields on hormonal regulation of spermatogenesis and structural and functional state of rat testes / G.V. Sahakyan, G.G. Artsruni // New Armenian Med. J. – 2009 – Vol.3. – P. 36 – 43.

8. Harutyunyan, H Biological effects of static electric field: plasma/serum proteome analysis of rats / H. Harutyunyan, G. Artsruni. // Electromagnetic Biology and Medicine – 2013. – Vol.32. – P. 79-94.

9. Harutyunyan H., Mkrtchyan V. et al. Biological effects of electrostatic field: effects of in vivo and in vitro exposures to electrostatic field on some hematological parameters in rats // Bioelectromagnetics. 2016. V.37, P. 513-526

10. Harutyunyan H.A. Prothrombin and fibrinogen carbonylation: how that can affect the blood clotting. Redox Report. 2016. DOI: 10.1080/13510002.2016.1200289.

11. Влияние электростатического поля на клетки эритроцитов in vitro. / Е.А. Чернявский, Е.С. Бондаренко, А. Арутюнян, В.М. Шкуматов // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Международная научная конференция; XII съезд Белорусского Общественного Объединения фотобиологов и биофизиков, 28-30 июня 2016г. Минск, Беларусь: Сборник статей в 2 ч. Ч. 2 / редкол. И.Д. Волоотовский (отв. ред.) [и др.]. – Минск: Изд. Центр БГУ, 2016. – С. 290-293

12. Harutyunyan H., Mkrtchyan V., Sukiasyan K., Sahakyan G., Poghosyan G., Soghomonyan A., Chernyavsky E., Bondarenko E., Shkumatov V. Biological effects of electrostatic field: effects of in vivo and in vitro exposures to electrostatic field on some hematological parameters in rats. Bioelectromagnetics. 2016 (DOI: 10.1002/bem.22000);

13. Влияние электростатического поля на сериновые протеазы и процессы протеолиза с их участием / Е.А. Чернявский, Е.С. Бондаренко, А. Арутюнян, В.М. Шкуматов // I Белорусский биохимический конгресс, 5-6 июля 2016г. Гродно, Беларусь: Сборник статей в 2 ч. Ч. 2 С. 50-56

14. Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов : МУ 1.2.2635-10. — Введ. 24.05.2010. — Москва : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010 г.

15. 4 Jacques, J.A. Modulation of glucose transport in human red blood cells by Atp // Biochimica et Biophysica Acta. – 1983. – Vol. 727. – P. 367-378.

16. Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности : ГОСТ 20264.2-88. — Введ. 01.07.90. — Москва : Гос. комитет СССР по стандартам : Издательство стандартов, 1988. — 15 с.