

ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АКТИВАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ СВЕРХНИЗКО ИНТЕНСИВНЫХ МИКРОВОЛНОВЫХ РАДИОИЗЛУЧЕНИЙ

Пятакович Ф.А.¹, Надеждин С.В.¹, Евтущенко Н.Д.², Якунченко Т.И.¹,
Макконен К.Ф.¹, Мевша О.В.¹

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет (НИУ БелГУ), Белгород, e-mail: piatakovich@bsu.edu.ru;

²Губкинский филиал Белгородского государственного технологического университета имени В.Г. Шухова, Губкин

Данная статья посвящена анализу передовых научных исследований роли сверхнизко интенсивного СВЧ-воздействия на биологические объекты в виде стволовых клеток. Научную работу выполнила трансляционная группа исследователей, включающая врачей, биологов, инженеров, радиофизиков и программистов. Разработанный аппарат Synchropulsar AQUA использовался как источник сверхнизкой интенсивности <10 мкВт электромагнитного микроволнового излучения в диапазоне 1 ГГц. Экспериментальные исследования реализовали в течение 9 дней. Культуральные флаконы опытной группы с мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) ежедневно в течение 15 минут подвергались микроволновому облучению. После завершения эксперимента проводили оценку пролиферации клеток с подсчетом количества клеток при помощи счетчика клеток Scepter 2.0, с наконечниками 40 мкм (фирма «Millipore», Merck/Sigma-Aldrich, США). Исследование митохондриальной активности проводили при помощи флуоресцентного микроскопа Nikon Ti – S, предварительно добавив к культуре клеток красный флуоресцентный краситель MitoTracker™ Red CMXRos. Было установлено снижение количества МСК в опытных группах по сравнению с контролем. В контроле было выявлено $3,1 \times 10^6$ кл/мл, в режиме низкочастотной биомодуляции – $2,5 \times 10^6$ кл/мл; в режиме непрерывной генерации – $2,1 \times 10^6$ клеток/мл. Оценка интенсивности флуоресценции показала, что активность митохондрий выше в опытной группе при облучении в режиме биомодуляции – 12,40 усл. ед. (у.е.). При использовании режима непрерывной генерации активность митохондрий составила 9,33 у.е. В контрольной группе активность митохондрий составила 10,74 у.е.

Ключевые слова: МСК, СВЧ-излучение, сантиметровые волны, сверхнизкая интенсивность, режим низкочастотной биомодуляции, режим непрерывной генерации, флуоресцентный метод, митохондриальная активность.

DYNAMICS OF PROLIFERATION AND ACTIVATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS UNDER THE EFFECT OF ULTRA-LOW INTENSITY MICROWAVE RADIO- EMISSION

Pyatakovich F.A.¹, Nadezhdin S.V.¹, Evtushenko N.D.², Yakunchenko T.I.¹, Makkonen K.F.¹,
Mevsha O.V.¹

¹Belgorod State National Research University (BelSU), Belgorod, e-mail: piatakovich@bsu.edu.ru;

²Gubkin Branch of Belgorod State Technological University named after V.G. Shukhov, Gubkin

This paper is devoted to the analysis of advanced scientific research on the role of super-low-intensity microwave effects on biological objects in form of stem cells. The scientific work has been performed by a translational team of researchers, including doctors, biologists, engineers, radiophysicists, and programmers. Synchropulsar AQUA was used as a source of super-low intensity <10 μW of electromagnetic microwave radiation in the 1 GHz band. Experimental studies were implemented within 9 days. Culture flasks of the experimental group with mesenchymal stem cells (MSC) were being irradiated by microwave generator daily for 15 minutes. After completion of the experiment, cell proliferation was assessed by counting the number of cells using a Scepter 2.0 cell counter with 40 μm tips (Millipore, Merck/Sigma-Aldrich, USA). The study of mitochondrial activity was performed using a Nikon Ti-S fluorescent microscope, after adding the red fluorescent dye MitoTracker™ Red CMXRos to the cell culture. During the study, it was found that the number of cells is reduced in the experimental groups compared with the control. In the control it was calculated 3.1×10^6 cells/mL, in the low-frequency biomodulation mode it was found 2.5×10^6 cells/mL; in the continuous generation mode it was revealed 2.1×10^6 cells/mL. Assessment of the fluorescence intensity showed that the activity of mitochondria is higher in the experimental group under irradiation with mode modulation by biotropic parameters – 12.40 conventional units

(c.u.). When using regime continuous generation the activity of mitochondria was 9.33 c.u. In the control group, mitochondrial activity was 10.74 c.u.

Keywords: MSC, Microwave radiation, centimeter waves, super-low intensity, regime low-frequency biomodulation, regime continuous modulation, fluorescent method, mitochondrial activity.

В настоящее время тканевая инженерия использует научные знания и достижения в разработке новых лекарственных средств и методов лечения в различных областях медицины для ускорения регенерации или замены тканей, таких как кости, хрящи, сухожилия и связки [1, 2]. Стандартный подход тканевой инженерии к решению задач репарации и регенерации тканей предполагает совместное использование композиционных материалов в виде трехмерных матриц, факторов роста и мультипотентных стволовых клеток [3].

Стволовые клетки – это неспециализированные клетки, обладающие способностью дифференцироваться (становиться другим типом клеток) и самообновляться (воспроизводиться без дифференцировки).

Определение стволовых клеток основано на их врожденных свойствах, таких как самообновление и дифференцировка. В научной литературе подробно рассматриваются различные способы дифференцировки стволовых клеток [4]. Процесс дифференцировки клеток реализуется под влиянием как внутренних, так и различных внешних факторов. К ним относятся нейрогуморальная регуляция и внешние факторы в виде ритма активности, света и температуры, электромагнитного излучения [5].

Следует подчеркнуть, что стволовые клетки находятся в среде электромагнитного поля информационного уровня, исходящего от функционирующих клеток тканей. Необходимо отметить, что стволовые клетки существуют также и в среде хронобиологических ритмов, таких как циркадианные ритмы, циклы гемодинамики, дыхания, микроциркуляции, периоды элонгации белка на рибосомах. Фундаментальные хронобиологические принципы биоуправления отражены в истории развития технических средств информационного воздействия на различные биологические объекты, а также ткани и органы человека.

В 1990-е гг. была получена, а в начале первого десятилетия XXI в. подтверждена информация о принципиально новых механизмах взаимодействия биологических объектов со сверхмалыми дозами биологически активных веществ и сверхслабыми электромагнитными излучениями [6, 7].

Следует особо подчеркнуть, что авторы [8, 9] совместного российско-итальянского научного исследования выявили факты краткосрочного и сверхнизко интенсивного воздействия микроволн на генетический аппарат человека.

Вместе с тем обращает на себя внимание отсутствие сведений в научной литературе о влиянии сверхслабых микроволновых излучений на стволовые клетки человека и животных. Это связано, прежде всего, с отсутствием как научно обоснованных методологических

приемов изучения сформулированной проблемы, так и необходимых технических средств реализации комплекса таких исследований.

В связи со сказанным изучение влияния сверхслабых микроволн на стволовые клетки является актуальной задачей.

Цель исследования была сформулирована как установление факта воздействия сверхслабого электромагнитного поля частотой 1 ГГц и мощностью менее 10 мкВт на мезенхимальные стволовые клетки: в режиме непрерывной генерации и в режиме низкочастотной модуляции биотропными параметрами человека.

Задачи исследования включают:

- 1) создание структуры биоуправляемого генератора сантиметровых волн сверхнизкой интенсивности;
- 2) разработку моделей низкочастотной модуляции сверхнизко интенсивного СВЧ-излучения посредством паттерна сигналов, включающих частоту сердечных сокращений, сигналы метрономизированного дыхания, ритмы микроциркуляции и ритмы элонгации белка на рибосомах;
- 3) разработку структуры циклического алгоритма управления СВЧ-излучением с заданной длительностью сигнала и функционирующего посредством микроконтроллера и блока таймера;
- 4) исследование влияния СВЧ-облучения в сверхнизко интенсивном режиме на пролиферацию и активность мезенхимальных стволовых клеток;
- 5) сравнение влияния на стволовые клетки сверхнизко интенсивного СВЧ-излучения частотой 1 ГГц в режиме низкочастотной биомодуляции и в режиме непрерывной генерации.

Материалы и методы исследования

Исследование проводили с использованием мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека, выделенных из жировой ткани. Культура клеток была приобретена у ООО «Биолот», Россия.

Разработанный нами аппарат Synchronopulsar AQUA был использован в качестве источника сверхнизко интенсивного $<10 \mu\text{W}$ электромагнитного излучения частотой 1 ГГц. Другие технические характеристики прибора в данной публикации не рассматриваются.

Продолжительность опыта составила 9 дней. Один раз в сутки флаконы опытной группы устанавливали на 15 минут на рамочную антенну. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) культивировали в колбах с полноценной питательной средой DMEM/F12 с 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой (ПанЭко, Россия). После облучения культуральные флаконы с МСК помещали в CO_2 -инкубатор и культивировали при 37°C , 5% CO_2 , 100% влажности.

После завершения эксперимента пролиферацию клеток оценивали путем подсчета количества клеток с помощью счетчика клеток Scepter 2.0 с наконечниками 40 мкм (Millipore, Merck/Sigma-Aldrich, США).

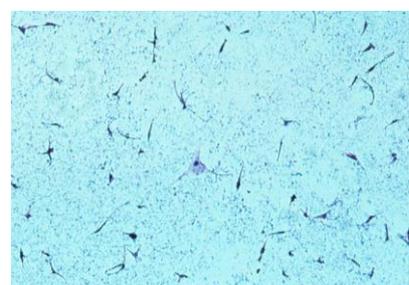
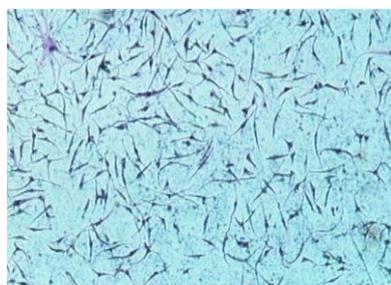
Митохондриальную активность изучали с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Ti-S (Nikon (Япония) со специализированным программным обеспечением Nikon EZ-C1 FreeViewer (Nikon, Япония) с использованием флуоресцентного красителя MitoTracker™ Red CMXRos (ThermoFisher MitoTracker Red CMXRos – красный флуоресцентный краситель, который окрашивает митохондрии в живых клетках. Данный краситель является флуоресцентным только при окислении в клетке, к этому красителю присоединена алкилирующая хлорметильная группа. Благодаря своему мембранному потенциалу функциональные митохондрии поглощают краситель.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета статистических программ STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., США). Данные считались значимыми при $p < 0,05$. Использовался непараметрический критерий Вилкоксона, который нечувствителен к конкретному статистическому закону распределения.

Результаты исследования и их обсуждение

Интерфейс программы Nikon EZ-C1 FreeViewer (Nikon, Япония) позволял получить цветные изображения с оконтуренными стволовыми клетками.

Как было указано выше, надежный подсчет количества делящихся стволовых клеток после проведенных экспериментов обеспечивал специальный счетчик Scepter 2.0. В ходе исследования было установлено снижение количества клеток в опытных группах по сравнению с контролем. На рисунке 1 представлены данные о влиянии микроволн на процессы пролиферации МСК. В контроле вычислено $3,1 \times 10^6$ кл/мл, в режиме низкочастотной биомодуляции – $2,5 \times 10^6$ кл/мл; в режиме непрерывной генерации выявлено $2,1 \times 10^6$ клеток/мл.



Оценка интенсивности флуоресценции стволовых клеток в контроле и при различных режимах микроволнового излучения рассмотрена на рисунках 2, 3, 4.

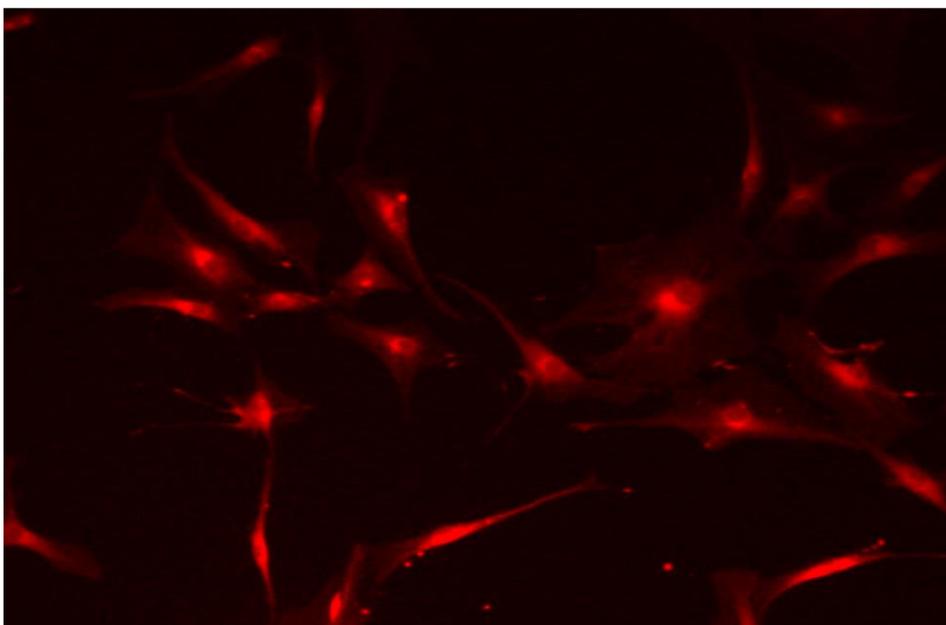
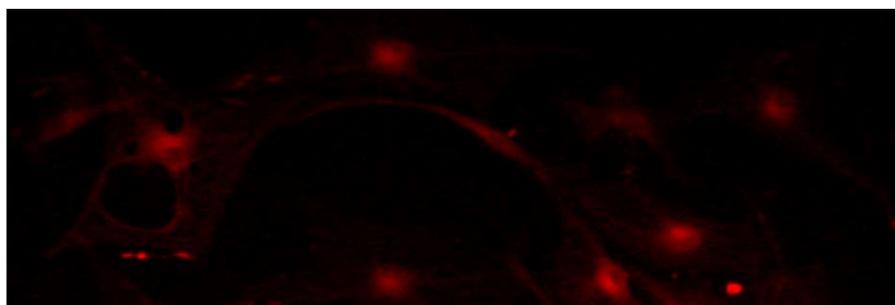


Рис. 2. Флуоресценция МСК в контрольной группе

Как следует из рисунка 2, интенсивность флуоресценции стволовых клеток составила 10,74 усл. ед. (у.е.). На рисунке 3 видно, что при воздействии посредством режима непрерывной генерации интенсивность флуоресценции уменьшилась до 9,33 у.е. Из рисунка 4 следует, что при использовании режима низкочастотной биомодуляции флуоресценция увеличилась до 12,40 усл. ед.



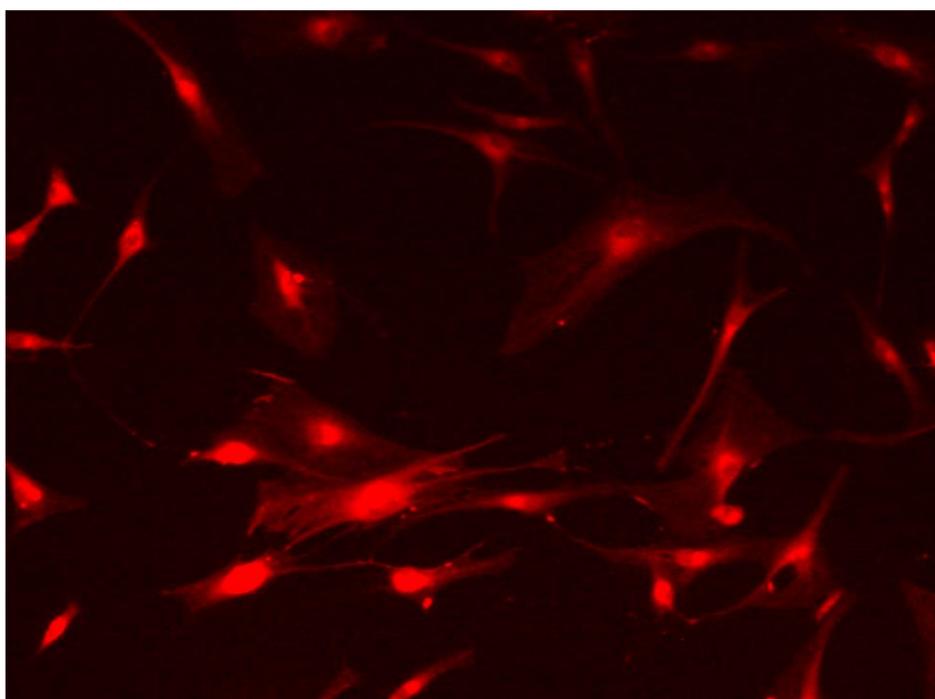


Рис. 4. Флюоресценция МСК в режиме биомодуляции

Таким образом, сравнительный флуоресцентный анализ митохондрий показывает, что использование низкочастотной биомодуляции несущего СВЧ-сигнала приводит к значительному увеличению активности митохондрий.

Рассмотрим, каковы механизмы наблюдаемых изменений мезенхимальных стволовых клеток, происходящих под влиянием сверхнизко интенсивного СВЧ-излучения?

В начале XXI в. модели живого состояния клетки изучались многими известными биологами. Однако сообщалось, что биологи в то время не учитывали проблемы биоэнергетики клетки. В связи с этим рассматриваемые модели не стали общепринятыми теориями.

Как известно, все биохимические и физиологические процессы реализуются в водной среде. Только в 2009 г. петербургскими учеными была предложена новая концепция молекулярного механизма передачи энергии, а также восприятия сверхслабых воздействий живыми системами [10]. В дальнейшем все положения этой концепции были обоснованы.

Далее рассматриваются взгляды цитированных выше авторов на так называемую молекулярную ячейку, или молекулярный модуль. В основу концепции ими были положены методы нелинейной математической физики при описании движения энергии по молекулярным цепочкам и квантово-механические представления о формировании сигналов в анизотропных средах. Было рассмотрено представление о молекулярной единице как едином структурном модуле, интегрированном в биологическую систему, которая проявляет коллективные свойства единства молекул, объединенных водной средой и окружающих ее физических полей, в процессах восприятия и переноса энергии. Также было показано, что межмолекулярный перенос энергии и усиление сверхслабых эффектов являются элементами единого энергетического процесса в живой системе, а физической основой обоих процессов служит единство молекулярного и водно-полевого окружения молекулярного модуля. Таким образом, в последнем случае молекулярный модуль определяется авторами «как временное образование двух или более биополимеров, находящихся некоторое время наиболее близко друг к другу, но все же разделенных водной средой».

Был рассмотрен и «жизненный процесс» молекулярного модуля. Как стало известно, в состав молекулярного модуля входят три обязательных участника: биополимеры, водная среда (так называемая фрактальная «шуба») и электромагнитное поле в виде солитонных волн. Все они взаимодействуют на основе нелинейных законов, в результате чего молекулярный модуль и проявляет свойства «живой системы». Молекулярные модули входят в состав клеточных структур, которым необходим постоянный приток энергии из внешней среды. Такая энергия выделяется солитонами в режиме так называемого разряда. В результате вода, окружающая биополимеры в живых системах, модифицируется с образованием фрактальных структур, закрепленных на гидрофильных участках биополимеров. Водные фракталы по сути являются антеннами и переизлучают часть энергии на остальные биополимеры молекулярного модуля. Таким способом осуществляется и коррекция нарушенных функций в процессе патологии за счет восстановления информационной и структурной составляющей биополимеров молекулярного модуля.

Фактически мы только что рассмотрели двухструктурную динамическую фрактально-кластерную модель надмолекулярной организации жидкой фазы воды. Модель включает шестимолекулярные молекулы $(\text{H}_2\text{O})_6$ – гексагоны и мономолекулы H_2O – триады. В процессе метаболизма может происходить двусторонняя миграция триад в полости гексагонов с

образованием комплексов $[(\text{H}_2\text{O})_6 + \text{H}_2\text{O}]$, или так называемых клатратов. Динамическое объединение клатратов в кластеры n -го порядка приводит к появлению фрактальных ассоциатов $6n$ $[(\text{H}_2\text{O})_6 + \text{H}_2\text{O}]$. В результате получается структура, напоминающая матрешку, в которой при внешнем воздействии микроволнового сверхнизко интенсивного излучения происходит резонансное возбуждение ассоциата, как целого, так и независимых от него молекул, а именно: триад, гексагонов, клатратов и кластеров. После прекращения внешнего воздействия сразу начинается переизлучение кластерных структур на присущей им частоте в окружающую среду. Это переизлучение сохраняется сколь угодно долго после прекращения внешнего воздействия. Процесс непрерывно продолжается в связи с постоянным поступлением свежей воды и превращением ее в цепочку кластеров и ассоциатов.

Ассоциированная вода, помимо всего вышеперечисленного, обеспечивает высокую степень гидратации белковых и белково-липидных структур в клетках, а также позволяет стимулировать эффективный внутриклеточный перенос электронов и транспорт внутриклеточных метаболитов, а также оказывать стабилизирующее действие и регулирующее влияние на клеточный цикл.

Следовательно, первичной мишенью для воздействия сверхслабым СВЧ-полем являются структурные образования воды: гексагоны, клатраты, кластеры и ассоциаты, которые, видоизменяясь, приводят к трансформации свойств мембраны и, как следствие, к изменению функционального состояния и активности стволовых клеток. При использовании режима низкочастотной модуляции СВЧ-излучения на основе биоритмов сердечного цикла, резонансного дыхания и ритмов элонгации белка на рибосомах получены признаки увеличения интенсивности свечения митохондрий. Это, по-видимому, связано с процессами синхронизации окислительного и энергетического обмена и, в свою очередь, свидетельствует о повышении активности митохондрий.

Снижение количества МСК в опытной группе при использовании режима непрерывной генерации может свидетельствовать о начале процесса дифференцировки МСК.

Выводы

1. Разработан специальный прибор «Synchropulsar Aqua» для изучения воздействия сверхнизко интенсивного электромагнитного излучения на мезенхимальные стволовые клетки человека.

Устройство работает на частоте 1 ГГц и мощности излучения менее 10 мкВт и включает два режима: непрерывную генерацию и низкочастотную модуляцию с использованием биотропных параметров пульса, метрономизированного дыхания, циклической микроциркуляции и ритмов элонгации белка на рибосомах.

2. Установлено статистически значимое снижение количества мезенхимальных стволовых клеток при обоих режимах воздействия. Однако при использовании режима низкочастотной модуляции биотропными параметрами сверхнизко интенсивного СВЧ-излучения отмечено достоверно меньшее снижение количества мезенхимальных стволовых клеток.

3. Выявлено усиление флуоресценции мезенхимальных стволовых клеток, когда воздействующими факторами являлись микроволны с низкочастотными ритмами модуляции, а именно: частоты пульса, метрономизированного дыхания, периодики микроциркуляции и элонгации белка на рибосомах. Полученные факты свидетельствуют об активации митохондрий мезенхимальных стволовых клеток.

4. Снижение количества МСК в опытной группе при использовании режима непрерывной генерации, возможно, свидетельствует о начале процесса дифференцировки МСК.

Список литературы

1. Wang Q., Detamore M.S., Berkland C. Hybrid hydroxyapatite nano-particle colloidal gels are injectable fillers for bone tissue engineering. *Tissue Eng.* 2013. Vol. 19. № 23-24. P. 2586-2593.
2. Yang C., Tibbitt M.W., Basta L. Mechanical memory and dosing influence stem cell fate. *Nat. Mater.* 2014. Vol. 13. P. 645-652.
3. Zhang F.A., Song Q.X., Huang X. Novel High Mechanical Property PLGA composite Matrix Loaded with Nanodiamond-Phospholipid Compound for Bone Tissue Engineering. *CS Appl. Mater. Inter.* 2016. Vol. 8. P. 1087-1097.
4. Briggs J.A., Victor C. Li, Seungkyu Lee, Clifford J. Woolf, Allon Klein, Marc W. Kirschner. Mouse embryonic stem cells can differentiate via multiple paths to the same state. *Life.* 2017. Vol. 6. P. 26945. DOI: 10.7554/eLife.26945.
5. Xiong L.G., Chen Y.J., Tong J.W., Gong Y.S., Huang J.A., Liu Z.H. Epigallocatechin-3-gallate promotes healthy lifespan through mitohormesis during early-to-mid adulthood in *Caenorhabditis elegans*. *Redox Biol.* 2017. Vol. 14. P. 305-315.
6. Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Мальцева Е.Л. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов. Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, РАН // *Химическая физика.* 2003. Т. 22 № 2. С. 21-40.
7. Petrosyan V.I., Yelkin V.A., Gylyayev Y.V., Krysko V.A., Zhitenyova E.A., Sinitsin N.I., Krysko D.V. Theory of resonant transmission wave propagation in a medium of coupled harmonic oscillator. *Teth. International Conference on Nonlinearity, Bifurcation and Chaos: the Doors to the*

Future. Proceedings of the ICNBC, Lodz-Dobieszkow: Technical University of Lodz. 1996. P. 208-212.

8. Pyatakovich F.A., Yakunchenko T.I., Makkonen K.F., Bulgakova O.Yu., Stagnaro S., Caramel S. Study of the influence of short-term and super low intensity millimeter radiation on biological objects. Proceedings of the International Congress "The weak and super-weak fields and radiation in biology and medicine" St. Petersburg, 2015. Vol. 7. P. 191-192.

9. Pyatakovich F.A., Caramel S., Stagnaro S., Yakunchenko T.I. Makkonen K.F., Moryleva O.N. Background millimeter radiation influence in cardiology on patients with metabolic and pre-metabolic syndrome. Journal of Infrared and Millimeter Waves. 2014. Vol. 33 (1). P. 1-18.

10. Галль Л.Н., Галль Н.Р. Механизм межмолекулярной передачи энергии и восприятия сверхслабых воздействий химическими и биологическими системами // Биофизика. 2009. Т. 59. Вып.3. С. 563-574.