

## Влияние микроволновой резонансной терапии на $Ca^{2+}$ -зависимую калиевую проницаемость мембран эритроцитов больных алкоголизмом

**БОХАН Н.А.**

д.м.н., профессор, руководитель отделения аддиктивных состояний НИИ ПЗ СО РАМН, Томск  
634014, г.Томск, ул. Алеутская, 4, тел.: (3822) 72-43-79, факс: (3822) 72-44-25,  
e-mail: redo@mail.tomsknet.ru

**ПАТЫШЕВА Е.В.**

врач клинической лабораторной диагностики клиничко-иммунологической лаборатории  
ФБУ ЛИУ-1 УФСИН России по Томской области;  
г.Томск, ул. Ключева, 1, e-mail: patisheva@mail.ru

**ПРОКОПЬЕВА В.Д.**

д.б.н., в.н.с. лаборатории нейробиологии НИИ ПЗ СО РАМН, Томск  
634014, г.Томск, ул. Алеутская, 4, тел.: (3822) 72-32-09, факс: (3822) 72-44-25, e-mail: valyaprok@mail.ru

Изучена  $Ca^{2+}$ -индуцированная гиперполяризация мембран эритроцитов, обусловленная выходом ионов калия из клетки через  $Ca^{2+}$ -зависимые  $K^+$ -каналы ( $K^+(Ca^{2+})$ -каналы), у больных алкоголизмом в состоянии абстиненции до и после однократного и курсового применения микроволновой резонансной терапии (МРТ). В эритроцитах пациентов до проведения МРТ амплитуда ( $\Delta E$ ) и скорость развития ( $V_1$ )  $Ca^{2+}$ -индуцированного гиперполяризационного ответа (ГО) (показателей, характеризующих проводимость  $Ca^{2+}$ -зависимых  $K^+$ -каналов) были достоверно выше соответствующих показателей эритроцитов здоровых лиц. При этом скорость восстановления мембранного потенциала ( $V_2$ ), характеризующая работу  $Ca^{2+}$ -насоса, была ниже, чем в эритроцитах здоровых доноров. После однократного применения МРТ измеряемые параметры  $Ca^{2+}$ -зависимой калиевой проводимости существенно не изменились. После курса МРТ обнаружено достоверное (до контрольных величин) снижение  $\Delta E$  и  $V_1$ , при этом  $V_2$  оставалась сниженной по сравнению с контролем. Сделано заключение, что после курса МРТ у больных алкоголизмом нормализуется проводимость  $K^+(Ca^{2+})$ -каналов мембран эритроцитов, при этом на активность  $Ca^{2+}$ -насоса эритроцитарных мембран МРТ существенного влияния не оказывает.

Ключевые слова: эритроциты,  $Ca^{2+}$ -активируемые  $K^+$ -каналы, микроволновая резонансная терапия, алкоголизм

### Введение

В настоящее время широкое распространение в медицине получила МРТ — использование электромагнитного излучения (ЭМИ) миллиметрового диапазона (ММ-диапазона, ММ-волн) [5]. Положительные клинические эффекты МРТ выявлены и при купировании алкогольного абстинентного синдрома [1, 4].

Чтобы понять механизмы положительного терапевтического действия МРТ на организм при различных патологиях, ведутся научные исследования, благодаря которым в настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что ЭМИ ММ-диапазона оказывает существенное влияние на биологические мембраны. Так, было показано, что воздействие ММ-волн *in vitro* способствует структурным перестройкам в биомембранах [6, 17]. Обнаружена способность ММ-волн оказывать выраженное действие на мембраны эритроцитов больных алкоголизмом при МРТ [8]. Существуют данные о том, что ММ-волны способны влиять и на белки клеток — увеличивать гидратацию белковых молекул, что может отражаться как на их структуре, так и на функциональных свойствах [2].

При алкоголизме нарушается водно-солевой баланс, существенно меняется работа ион-транспортующих систем клеточных мембран, в том числе и проводимость  $K^+(Ca^{2+})$ -каналов эритроцитов [3], которые играют важную роль в обеспечении способности эритроцитов к обратимым деформациям, необходимым для минимизации физического повреждения клеток при их циркуляции в сосудах и предотвращения их преждевременного гемолиза. Не исключено, что МРТ больных с алкогольной зависимостью может отражаться и на функционировании  $K^+(Ca^{2+})$ -каналов их эритроцитов, активность которых, по данным литературы [3, 10], существенно повышена. Для проверки данного предположения мы изучали влияние однократного и курсового применения МРТ на  $Ca^{2+}$ -зависимую калиевую проницаемость мембран эритроцитов больных алкоголизмом в состоянии абстиненции.

### Пациенты и методы исследования

В работе использовали кровь 22 мужчин, больных алкоголизмом (диагноз по МКБ-10 — F10.3). Из них 12 чел. на фоне традиционной дезинтоксикационной терапии прошли курс МРТ из семи процедур (основная группа). Другие 10 пациентов получали в

течение 7 дней только традиционную дезинтоксикационную терапию без МРТ (группа сравнения). В контрольную группу вошли 10 здоровых мужчин, не употреблявших алкоголь, по крайней мере, в течение 10 дней перед проведением исследования. Группы доноров не различались достоверно по возрасту. Для проведения МРТ применяли аппарат «Стелла-2» (ООО «Спинор», г. Томск) (мощность  $<3$  мВт/см<sup>2</sup>, диапазон частот 59—61 ГГц, что соответствовало 5,1—4,7 мм), использовали режим сканирования. Воздействие осуществлялось на аурикулярную биологически активную точку АТ55 через диэлектрический волновод (площадь контакта 0,64 мм<sup>2</sup>) каждые 24 ч, длительность процедуры — 30 мин.

Взятие крови производилось из локтевой вены при поступлении пациента в стационар в состоянии абстиненции (до начала лечения), а также после 1 и 7 дней терапии. Кровь забирали в пробирки с гепарином (25 ЕД на 1 мл крови), затем центрифугировали (5 мин, 3 тыс. об./мин, 4°C) и удаляли плазму и клетки белой крови. Эритроциты дважды промывали 5 мМ Na-фосфатным буфером, приготовленным на 150 мМ NaCl. Затем клетки однократно промывали средой, содержащей 150 мМ NaCl, 1 мМ KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub> и 10 мМ глюкозы (все реактивы получены от ЗАО «Мосреактив»).

Для оценки Ca<sup>2+</sup>-зависимой калиевой проницаемости мембран эритроцитов использовали метод, предложенный С.Н. Орловым с соавторами [7], который заключается в измерении изменений мембранного потенциала (МП) эритроцитов в ответ на добавку в среду инкубации клеток Ca<sup>2+</sup>-ионофора А23187 («Sigma» Chemical Co., USA) путем регистрации рН среды в присутствии протонифора карбонилцианид-т-хлорфенилгидразона (СICCP, «Calbiochem» Chemical Co, USA). Регистрацию рН проводили с помощью комбинированного рН-чувствительного электрода HI 1332 (HANNA Instruments) и рН-метра ТУР N517 (Польша). Индуцированный А23187 входящий поток ионов кальция приводил к открыванию K<sup>+</sup>(Ca<sup>2+</sup>)-каналов и выходу из эритроцитов ионов калия, что обуславливало гиперполяризацию мембран эритроцитов. Так как среда инкубации содержала протонифор, изменившийся мембранный потенциал эритроцитов приводил к перераспределению ионов водорода между средой и цитоплазмой клеток, что отражалось в изменении рН среды инкубации. Защелачивание среды инкубации при добавке А23187 отражало процесс гиперполяризации мембраны, а восстановление рН — фазу ее реполяризации. Оценивали максимальную амплитуду гиперполяризационного ответа (ГО) эритроцитов (ΔЕ, мВ) и скорость его развития (V<sub>1</sub>, мэквОН<sup>-</sup>/мин\*л клеток) — параметры, являющиеся

основными характеристиками работы K<sup>+</sup>(Ca<sup>2+</sup>)-каналов. Кроме того, рассчитывали скорость восстановления МП (V<sub>2</sub>, мэкв H<sup>+</sup>/мин\*л клеток) — параметра, который позволяет косвенно оценить активность Ca<sup>2+</sup>-насоса мембран эритроцитов [7, 14].

Для статистической обработки результатов использовали критерий Колмогорова—Смирнова, непараметрические критерии Манна—Уитни и Вилкоксона. Параметры представлены в виде среднего значения и ошибки среднего (M±m).

### Результаты и обсуждение

В результате проведенных экспериментов было обнаружено, что амплитуда (ΔЕ) и скорость развития гиперполяризационного ответа (V<sub>1</sub>) в эритроцитах больных алкоголизмом в состоянии абстиненции были значительно увеличены по сравнению с эритроцитами здоровых доноров (рис. 1 и 2). Скорость восстановления мембранного потенциала эритроцитов пациентов (V<sub>2</sub>), наоборот, была значительно ниже таковой у здоровых лиц (рис. 3). Эти результаты согласуются с данными литературы [3, 10] и свидетельствуют об ускоренном выходе ионов калия из эритроцитов больных алкоголизмом по сравнению с эритроцитами здоровых доноров через K<sup>+</sup>(Ca<sup>2+</sup>)-каналы, что, согласно данным литературы, может служить причиной снижения способности эритроцитов к деформации [11—13] и их гемолитической устойчивости [3, 9, 16], часто выявляемых у пациентов с алкогольной зависимостью. Снижение скорости восстановления мембранного потенциала V<sub>2</sub>, характеризующей активность Ca<sup>2+</sup>-насоса эритроцитов, у больных алкоголизмом в состоянии абстиненции по сравнению с нормой может быть связано с повышением концентрации ионов Ca<sup>2+</sup> внутри эритроцитов [15].

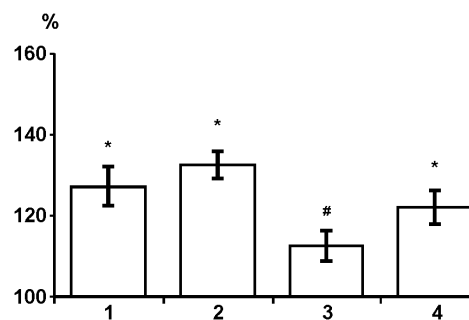


Рис. 1. Амплитуда гиперполяризационного ответа эритроцитов (ΔЕ, %): величина амплитуды гиперполяризационного ответа эритроцитов здоровых доноров принята за 100% (ΔЕ=-34,91 мВ); 1 — больные алкоголизмом в состоянии абстиненции до лечения; 2 — больные после однократного применения МРТ; 3 — больные после курса МРТ; 4 — больные после курса традиционного лечения (без МРТ); \* — достоверные отличия по отношению к здоровым донорам (p<0,05); # — достоверные отличия по отношению к тем же больным до лечения (p<0,05)

Параметры, характеризующие  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую калиевую проницаемость мембран эритроцитов больных алкоголизмом ( $M \pm m$ )

Параметры	1	2	3	4
Амплитуда гиперполяризационного ответа эритроцитов ( $\Delta E$ , %)	127,2 $\pm$ 4,7*	132,5 $\pm$ 3,1*	112,5 $\pm$ 3,6#	122,0 $\pm$ 4,2*
Скорость развития гиперполяризационного ответа эритроцитов ( $V_1$ , %)	139,6 $\pm$ 5,8*	137,1 $\pm$ 5,9*	111,8 $\pm$ 7,6#	131,4 $\pm$ 8,3*
Скорость восстановления мембранного потенциала эритроцитов ( $V_2$ , %)	64,5 $\pm$ 4,1*	67,5 $\pm$ 3,9*	60,6 $\pm$ 6,2*	55,7 $\pm$ 4,1*

Примечание. 1 — больные алкоголизмом в состоянии абстиненции до лечения; 2 — больные после однократного применения МРТ; 3 — больные после курса МРТ; 4 — больные после курса традиционного лечения (без МРТ). Значения параметров здоровых доноров, принятые за 100%:  $\Delta E = -34,91$  мВ;  $V_1 = 2,45$  мМ  $\text{OH}^-/\text{мин} \cdot \text{л.кл.}$ ;  $V_2 = 2,62$  мМ  $\text{H}^+/\text{мин} \cdot \text{л.кл.}$ ; \* — достоверные отличия по отношению к здоровым донорам ( $p < 0,05$ ); # — достоверные отличия по отношению к тем же больным до лечения ( $p < 0,05$ )

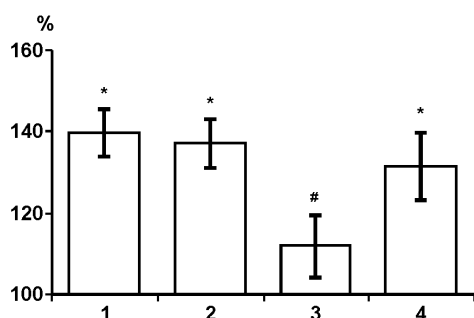


Рис. 2. Скорость развития гиперполяризационного ответа эритроцитов ( $V_1$ , %):

скорость развития гиперполяризационного ответа эритроцитов здоровых доноров принята за 100% ( $V_1 = 2,45$  мМ  $\text{OH}^-/\text{мин} \cdot \text{л.кл.}$ ); 1 — больные алкоголизмом в состоянии абстиненции до лечения; 2 — больные после однократного применения МРТ; 3 — больные после курса МРТ; 4 — больные после курса традиционного лечения (без МРТ); \* — достоверные отличия по отношению к здоровым донорам ( $p < 0,05$ ); # — достоверные отличия по отношению к тем же больным до лечения ( $p < 0,05$ )

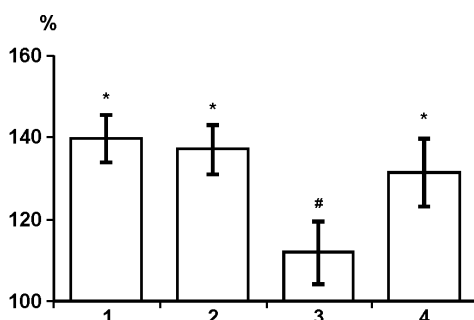


Рис. 3. Скорость восстановления мембранного потенциала эритроцитов ( $V_2$ , %):

скорость восстановления мембранного потенциала здоровых доноров принята за 100% ( $V_2 = 2,62$  мМ  $\text{H}^+/\text{мин} \cdot \text{л.кл.}$ ); 1 — больные алкоголизмом в состоянии абстиненции до лечения; 2 — больные после однократного применения МРТ; 3 — больные после курса МРТ; 4 — больные после курса традиционного лечения (без МРТ); \* — достоверные отличия по отношению к здоровым донорам ( $p < 0,05$ )

В группе сравнения через 7 дней традиционной дезинтоксикационной терапии без МРТ, как и в основной группе после однократного применения МРТ, каких-либо достоверных изменений параметров, характеризующих проводимость  $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов и  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса, выявлено не было.

После курсового применения МРТ обнаружено достоверное снижение до нормы максимальной амплитуды и скорости развития гиперполяризационного ответа эритроцитов (рис. 1 и 2). При этом скорость восстановления мембранного потенциала после курсового воздействия МРТ существенно не изменилась (рис. 3). Полученные результаты демонстрируют способность МРТ нормализовать повышенную у больных алкоголизмом в состоянии абстиненции проводимость  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^+$ -каналов эритроцитов. В то же время нами не выявлено влияния МРТ на работу  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса мембран эритроцитов.

Известно, что в регуляции проводимости  $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов существенную роль играют белки мембранного каркаса эритроцитов [10]. У больных алкоголизмом происходит окислительная модификация белков эритроцитов — их карбонилирование и кросслинкинг [3, 8]. Это, вероятно, может быть одной из причин изменения проводимости каналов в эритроцитах у данных пациентов. После МРТ уровень карбонилирования белков снижается [8]. Уменьшение выраженности окислительной модификации белков эритроцитов под действием МРТ может быть одним из молекулярных механизмов нормализации проводимости  $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов.

### Список литературы

1. Арзуманов Ю.А., Колотыгина Р.Ф., Абакумова А.А. Перспективность использования ММ-волн в клинике алкоголизма // 11-й Российский симпозиум с международным участием «Миллиметровые волны в квантовой медицине». — 1997. — С. 72—76.

2. 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.
3. Бохан Н.А., Прокопьева В.Д. Молекулярные механизмы влияния этанола и его метаболитов на эритроциты *in vitro* и *in vivo*. — Томск: Изд-во Томского университета, 2004. — 166 с.
4. Иванова С.А., Бохан Н.А., Ветлугина Т.П. Иммуномодулирующие эффекты сочетанной КВЧ-терапии и энтеросорбции в комплексной реабилитации больных алкоголизмом // Информационно-волновые технологии в комплексной реабилитации пациентов в лечебных и санаторно-курортных учреждениях. — 2004. — С. 72—76.
5. Кожемякин А.Н. КВЧ-терапия: Сборник методических рекомендаций и пособий для врачей. — Томск, 2003. — 63 с.
6. Крылов В.Н., Дерюгина А.В., Капустина Н.Б., Максимов Г.А. Влияние КВЧ-воздействия на электрофоретическую подвижность эритроцитов // Миллиметровые волны в биологии и медицине. — 2000. — №2. — С. 5—7.
7. Орлов С.Н., Петрова И.В., Покудин Н.И., Баскаков М.Б., Медведев М.А.  $Ca^{2+}$ -активируемые калиевые каналы эритроцитов, исследованные методом регистрации  $Ca^{2+}$ -индуцированных изменений мембранного потенциала // Биологические мембраны. — 1992. — Т. 9, №9. — С. 885—903.
8. Патышева Е.В., Прокопьева В.Д., Бохан Н.А. Влияние микроволновой резонансной терапии на белки и липиды эритроцитов и плазмы крови больных алкоголизмом // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2009. — Т. 148, №7. — С. 46—48.
9. Прокопьева В.Д., Бохан Н.А., Джонсон П., Болдырев А.А. Влияние карнозина и его N-ацетильного производного на стабильность эритроцитов больных алкоголизмом в состоянии абстиненции // Вопросы медицинской химии. — 1998. — Т. 44, №5. — С. 474—478.
10. Прокопьева В.Д., Петрова И.В., Ситожевский А.В., Кремено С.В., Корюкин В.И., Баскаков М.Б., Бохан Н.А., Новицкий В.В. Исследование роли липидного матрикса и белков мембранного каркаса в регуляции  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$ -каналов эритроцитов у больных алкоголизмом и сахарным диабетом II типа // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2002. — Т. 134, №10. — С. 401—404.
11. Apovo M., Benzard V., Galacteros F., Bachir D., Girard F. The involvement of the  $Ca^{2+}$ -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.
12. Brugnara C. Membrane transport of Na and K and cell dehydration in sickle erythrocytes // *Experientia.* — 1993. — Vol. 49. — P. 100—109.
13. Brugnara C., Armsby C.C., De Franceschi L., Crest M., Euclaire M.F., Alper S.L.  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$ -channels of human and rabbit erythrocytes display distinctive pattern of inhibition by venom peptide toxins // *J. Membr. Biol.* — 1995. — Vol. 147. — P. 71—82.
14. 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.
15. Meltzer H.L., Alexopoulos G.M.D. Increased erythrocytes calcium in alcoholism // *J. Clin. Pharmacol.* — 1982. — Vol. 22. — P. 466—469.
16. Prokopyeva V.D., 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.
17. 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—244.

## INFLUENCE OF MICROWAVE RESONANCE THERAPY ON $Ca^{2+}$ -INDUCED EFFLUX $K^+$ OF ERYTHROCYTES MEMBRANE OF ALCOHOLICS

**BOKHAN N.A., PATYSHEVA E.V., PROKOPYEVA V.D.**

Mental Health Research Institute, Russian Academy of Medical Sciences

The Ca-induced hyper-polarization of erythrocytes membrane caused by Ca-induced efflux  $K^+$  over  $Ca^{2+}$ -sensitive  $K^+$ -channel ( $K^+(Ca^{2+})$ -channel) from withdrawal alcoholics before and after single and course application of microwave resonance therapy (MRT) was studied. In erythrocytes of patients at baseline (before MRT) the amplitude ( $\Delta E$ ) and rate of development ( $V_1$ ) of  $Ca^{2+}$ -induced hyper-polarization response (indices, characterizing conductivity of  $Ca^{2+}$ -sensitive  $K^+$ -channels) are reliably higher than respective indices of erythrocytes of healthy subjects. At the same time, the rate of membrane potential restoration ( $V_2$ ), characterizing the work of  $Ca^{2+}$ -pump, was lower than in erythrocytes of healthy donors. After single application of MRT, measured parameters of Ca-induced efflux  $K^+$  over  $Ca^{2+}$ -sensitive  $K^+$ -channels did not substantially alter. After MRT course, reliable (up to control parameters) decrease of  $\Delta E$  and  $V_1$  was detected, while  $V_2$  remained decreased as compared with control. It was concluded that MRT course normalizes conductance of  $K^+(Ca^{2+})$ -channels of alcoholics erythrocytes membranes, and doesn't have significant influence on their  $Ca^{2+}$ -pump activity.

**Key words:** erythrocytes,  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$ -channels, microwave resonance therapy, alcoholism