

Оценка прямого воздействия динамической электронейростимуляции на культуру дермальных фибробластов *in vitro*

Аннотация

На примере дермальных фибробластов *in vitro* при помощи комплекса современных методов исследования показано и обосновано наличие непосредственного действия динамической электронейростимуляции (ДЭНС) на культуру дермальных фибробластов человека 7-го пассажа. Показана роль метода модуляционной интерференционной микроскопии в раскрытии механизма действия этого физического фактора на пролиферирующую культуру клеток.

Введение

В настоящее время в регенеративной медицине важная роль отводится физиотерапии, которая является одной из составляющих в медицинской реабилитации больных. Среди методов физиотерапии особое место занимает динамическая электронейростимуляция (ДЭНС). Это способ чрескожной электронейростимуляции, заключающийся в воздействии на рефлексогенные и акупунктурные точки тела пациента короткими импульсами тока, динамически реагирующими на изменение сопротивления кожи под электродом. Обезболивающий, противовоспалительный, антиспастический, сосудистый, противоотечный и другие эффекты большинство авторов рассматривают как результат изменения нервной регуляции [1]. В связи с этим возникает вопрос о наличии или отсутствии непосредственного воздействия ДЭНС на клетки и ткани. Такие работы практически отсутствуют.

Частично этот вопрос можно прояснить в исследованиях *in vitro*, используя в качестве модели культуры прикрепленных клеток млекопитающих. В работе с подобными культурами особую ценность имеют методы, позволяющие изучать клетки в нативном состоянии без длительной и трудоемкой пробоподготовки. Такую возможность дает метод модуляционной интерференционной микроскопии (МИМ), основанный на регистрации и анализе интерференционного изображения объекта в когерентном свете лазера.

Уникальной особенностью МИМ является алгоритм вычисления фазы отраженного от объекта волнового фронта, сочетающий в себе быстроедействие методов фазовых шагов [2] и сверхразрешение фазометрических методов (метод временных интервалов) [3]. Регистрируемая локальная разность хода интерферирующих лучей, фазовая толщина объекта (ФТ) зависят от разности показателей преломления объекта и окружающей среды. Такой подход позволяет осуществлять неинвазивные исследования клеточной структуры, получать изображение с нанометровым разрешением и проводить анализ оптических свойств объекта [2], максимально исключая погрешности и присутствие артефактов.

Целью нашей работы явилось изучение непосредственного воздействия ДЭНС на клетки мезенхимального происхождения *in vitro* при помощи комплекса современных методов исследования, в частности с использованием метода модуляционной интерференционной микроскопии.

Целью нашей работы являлось также исследование *in vitro* пролиферативной активности адгезивной культуры фибробластов методом модуляционной интерференционной микроскопии при непосредственном воздействии ДЭНС.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование было проведено в условиях лаборатории культур клеток Института экспериментальной медицины и биотехнологий СамГМУ на культуре дермальных фибробластов человека 7-го пассажа. Для комплексной оценки непосредственного воздействия ДЭНС на культуру

дермальных фибробластов были использованы культуральные, морфологические, морфометрические методы и метод модуляционной интерференционной микроскопии. В работе был использован тестируемый образец микроскоп МИМ-340, разработанный АО «ПО «УОМЗ» (Россия). Согласно руководству по эксплуатации данного микроскопа, изучаемый объект следует помещать под объектив только на диэлектрическом предметном стекле с зеркальным покрытием. Это и вызвало необходимость проведения отдельной серии эксперимента.

Забор первичного материала (биоптатов кожи) для выращивания культуры фибробластов производили у соматически здоровых и обследованных доноров после получения добровольного информированного согласия и одобрения комитетом по биоэтике при СамГМУ. Фибробласты выращивали по методике первичных эксплантатов (К.Н. Гринберг с соавт., 1988) [4] в собственной модификации.

Было проведено 2 серии экспериментов. Фибробласты высеивали в дозе 5×10^4 кл/стекло на предварительно простерилизованные предметные стекла и стекла с зеркальным покрытием [5] (25,4 x 76,2 мм): 1-я серия – прозрачные; 2-я серия – с зеркальным покрытием. Стекла выдерживали во влажной камере в течение 60 мин для обеспечения прикрепления клеток к поверхности, затем помещали в стерильные чашки Петри с полной ростовой средой: среда 199 – 90 %, эмбриональная телячья сыворотка – 10 % (среда и сыворотка – ООО «БиолоГ», РФ). Культивирование проводили в условиях CO₂-инкубатора («Sanyo – Incubator», «МСО-18 АС», Япония) при температуре 37 °С, 5 % CO₂ и постоянной влажности. Через 1 сутки после посева стекла в каждой серии были разделены на 2 группы: 1 – контрольная; 2 – опытная. Фибробласты опытных групп получили по 6 сеансов ДЭНС при помощи физиотерапевтического аппарата «ДЭНАС 1» (ООО «Тронитек», Екатеринбург), причем первый сеанс был проведен через 24 ч после посева. Характеристики воздействия: постоянный режим, минимальная мощность, частота 77 ± 3 Гц, время воздействия 5 мин, зазор между обратной стороной стекла и электродом 2 см.

Данное воздействие соответствует низкочастотному электромагнитному воздействию, которое соответствует собственным частотным колебаниям органов и структур организма человека (по Регистру лекарственных средств России, 2003; с. 39). Подобно человеческому организму, аппарат «ДЭНАС 1» формирует нейроподобные импульсы. Аналогичный процесс происходит и в организме человека: такие импульсы вырабатывает головной мозг, и мышечная система подчиняется его командам. Электрические импульсы ДЭНС воздействуют на органы человека аналогично естественному процессу, поэтому человеческий организм воспринимает их как естественное явление.

Фибробласты контрольных групп находились в аналогичных условиях, но без воздействия. Всего было использовано по 18 стекол из каждой группы.

Дермальные фибробласты 1-й серии в нативном состоянии изучали и фотографировали при помощи инвертированного микроскопа «Olympus CKX 41» («Olympus», Япония) с цвет-

ной цифровой камерой «Olympus SC100» («Olympus», Корея). Для обработки изображений было использовано программное обеспечение «CellSens Standart 1.7» («Olympus Corporation», Япония) при увеличении 100, 200, 400. Подсчет количества клеток в монослое на площади 1 мм² производили через сутки после посева (непосредственно перед началом воздействия), а затем через 2 ч после каждого сеанса.

Непосредственно перед началом воздействия, а затем по 3 стекла на каждый срок из обеих групп изымали из эксперимента, монослой окрашивали гематоксилином Майера и суданом IV по стандартной методике (в собственной модификации). Анализ изображений окрашенных препаратов производили при помощи системы визуализации с аппаратно-программным комплексом «Морфология 5.2 » («ВидеоТест», Россия).

Сравнительный анализ морфофункционального состояния опытных и контрольных культур в динамике проводили на основании анализа структурных особенностей клеток культуры и монослоя в целом, а также следующих показателей: плотность монослоя, индекс пролиферации (IP), время удвоения (TD), количество удвоений (ND). Показатели рассчитывали, как было описано нами ранее [6].

Препараты 2-й серии изучали при помощи интерференционного микроскопа МИМ-340 с объективом 40. После извлечения стекла с зеркальным покрытием с культурой из росто-вой среды по его периметру прокладывали спейсер высотой 10...15 мкм. На ограниченную спейсером поверхность наносили 20 мкл ростовой среды и накрывали покровным стеклом. Полученный таким образом препарат помещали под объектив микроскопа. Сначала монослой просматривали в навигационном канале. При помощи камеры белого света оценивали структурные особенности и характер роста фибробластов. Следует отметить, что изображения, получаемые в навигационном канале МИМ-340, практически соответствуют изображениям, получаемым при помощи инвертированного микроскопа [7].

Так как измерения оптической плотности ограничены пределами стандартной рамки (отображающей площадь интерференционного канала), мы избрали ядро фибробласта в качестве объекта для детального исследования при помощи лазера (измеряли фазовую толщину ядер фибробластов). В исследовании были включены ядра жизнеспособных фибробластов в интерфазе клеточного цикла. Предварительное изучение монослоя под инвертированным микроскопом позволило отнести крупные распластанные клетки полигональной формы с 2...4 короткими отростками, крупными светлыми ядрами, содержащими 1...2 ядрышка, и ядерно-цитоплазмным отношением (ЯЦО) 0,08 и менее к фазе G0. Поперечные размеры ядер таких клеток превышали площадь стандартной рамки, поэтому в исследование включены не были.

Для контроля жизнеспособности клеток как на обычных, так и на диэлектрических стеклах использовали общеприня-

тую методику окраски витальным красителем трипановым синим.

Статобработка

Результаты были представлены в виде среднего арифметического значения (M) и стандартного отклонения (σ). Для определения равнозначности сравниваемых групп использовали метод Вилкоксона-Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при вероятности ошибки первого рода менее 0,05 ($p < 0,05$). Статистический анализ проводили с использованием программы «Excel 2010» («Microsoft corp.», США).

Результаты

Измерение фазовой толщины (ФТ) ядер в пролиферирующей культуре фибробластов и анализ принадлежности измеренных ядер определенным клеткам, проведенный с использованием инвертированного микроскопа и навигационного канала МИМ, позволили по показателям ФТ выделить 4 класса: 1 класс – ФТ до 100 нм; 2 класс – ФТ от 101 до 170 нм; 3 класс – ФТ от 171 до 240 нм; 4 класс – ФТ от 241 нм и более.

- 1 класс. Дермальные фибробласты, ядра которых отнесены к 1-му классу по показателю фазовой толщины, полигональные или немного вытянутые, с 2...3 отростками, оптически гомогенной цитоплазмой и компактными ядрами. Площадь клеток – до 1200 мкм². ЯЦО – от 0,25 до 0,14. Это молодые, только что разделившиеся клетки.
- 2 класс. В клетках ядра мелкие, компактные, с гладкой нуклеолеммой. Площадь клеток – от 1201 до 2000 мкм². ЯЦО – от 0,12 до 0,08. Ядра округлые или овальные, с 1 или 2 ядрышками; принадлежат распластанным полигональным и вытянутым клеткам, образующим диффузный монослой. Такие характеристики позволяют отнести данные клетки к фазе G1 (рис. 1).
- 3 класс. Площадь клеток – от 2001 до 2800 мкм². ЯЦО – от 0,11 до 0,06. Поперечные размеры таких ядер больше, чем в классах 1 и 2. Фибробластов с такими ядрами может быть много в сформированном монослое, конfluence которого меньше 70 %. Данные параметры соответствуют фазе S.
- 4 класс. Площадь клеток – от 2801 до 3500 мкм². ЯЦО – от 0,08 и ниже. Клетки с такими ядрами «средних» размеров, что соответствует фазе G2 (рис. 2).

В опытной серии через 2 ч после первого воздействия физиотерапевтическим прибором «ДЭНАС 1» *in vitro* видимых изменений формы, размеров, характера роста фибробластов в монослое мы не обнаружили. Это связано с тем, что воздействие проводили до окончания логарифмической фазы клеточного цикла, когда клетки еще не начали активную пролиферацию. В популяции преобладали мелкие удлинённые и полигональные клетки с округлыми и овальными ядрами. Эти данные коррелируют с результатами измерения фазовой толщины ядер фибробластов: большинство ядер находятся в 1 и 2 классах.

Таблица 1

Пролиферативная активность культуры дермальных фибробластов при воздействии прибором «ДЭНАС 1»

Кол-во сеансов	Кол-во клеток/1 мм ²		Индекс пролиферации		Время удвоения, ч		Кол-во удвоений	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
24 ч	23,6	23,6	–	–	–	–	–	–
1 сеанс	23,6 ± 1,3	23,6 ± 1,3	–	–	–	–	–	–
2 сеанса	44,9 ± 1,6	42,5 ± 1,8 *	1,9 ± 0,8	1,8 ± 0,3	26,0 ± 0,3	28,3 ± 0,4	–	–
3 сеанса	89,7 ± 1,7	80,7 ± 2,1 *	2,0 ± 0,7	1,9 ± 0,5	24,0 ± 0,7	25,9 ± 0,2	–	–
4 сеанса	170,8 ± 2,5	161,4 ± 2,2 *	1,9 ± 0,4	2,0 ± 0,7	25,9 ± 1,8	24,0 ± 0,5	–	–
5 сеансов	255,8 ± 1,8	290,5 ± 2,0 *	1,5 ± 0,6	1,8 ± 0,8 *	41,0 ± 0,5	26,0 ± 0,3 *	–	–
6 сеансов	332,5 ± 12,9	464,8 ± 8,2 *	1,3 ± 0,5	1,6 ± 0,5 *	63,0 ± 0,4	35,4 ± 0,8 *	3,8	4,3 *

Примечание: * $p < 0,5$ по сравнению с контролем.

Дальнейшее наблюдение показало, что до 5-х суток в опытной культуре увеличение плотности монослоя несколько отстает от контроля, вместе с тем с этого срока (т. е. в культурах, получивших 4 сеанса ДЭНС) начинается увеличение пролиферативного индекса и укорочение времени удвоения культуры, такая тенденция сохраняется до окончания эксперимента (табл. 1). В результате уже через 7 суток эксперимента (после 6 сеансов ДЭНС) увеличение плотности монослоя опережает таковое в контрольной культуре. Характерно, что опытная культура за время эксперимента проходит достоверно больше удвоений (4,3), чем контрольная (3,8). Следует отметить: несмотря на то, что плотность насыщения, характерная для культурального пластика, на стеклах к концу эксперимента не достигается, пролиферация заметно тормозится. Особенно

это видно при анализе динамики показателя фазовой толщины ядер, который косвенно отражает распределение фибробластов по фазам клеточного цикла (рис. 3). Так, воздействие ДЭНС несколько ускоряет «переход» ядер из одного класса в другой; это помогает подтвердить и обосновать, почему опытная культура проходит большее количество удвоений, чем контрольная.

Заключение

Метод модуляционной интерференционной микроскопии (МИМ) позволил неинвазивно изучить пролиферативную активность адгезивной культуры фибробластов при непосредственном воздействии на них ДЭНС. При помощи МИМ стало возможным распределять клетки по фазам клеточного цик-

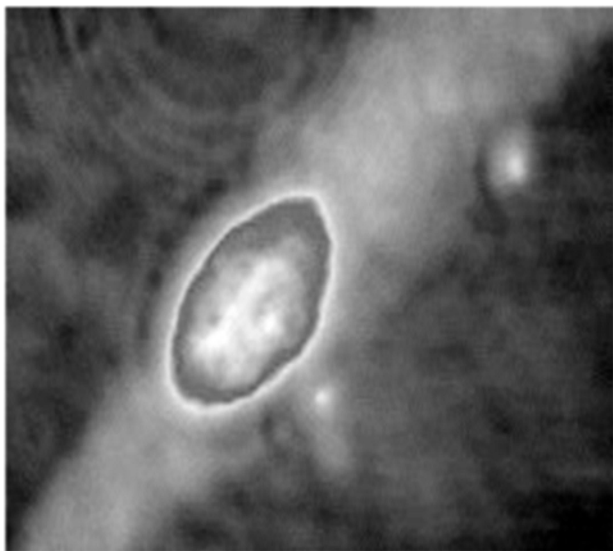


Рис. 1. Фазовое изображение ядра фибробласта. Клетки к фазе G1. Лазерная интерференционная микроскопия

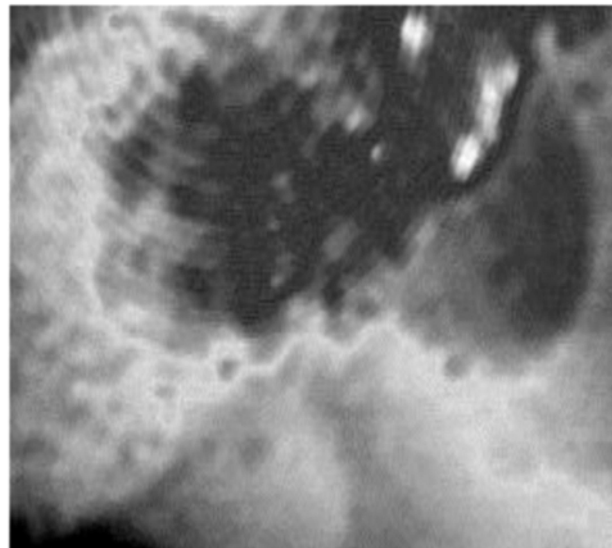


Рис. 2. Фазовое изображение ядра фибробласта. Клетки в фазе G2. Лазерная интерференционная микроскопия

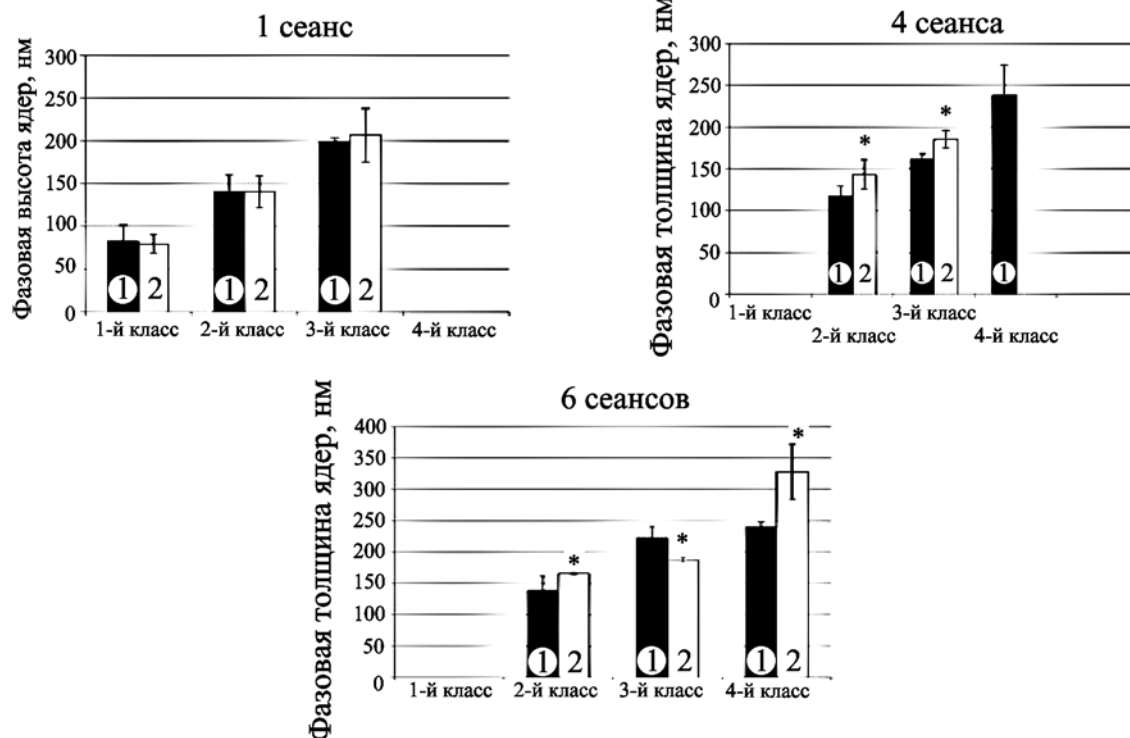


Рис. 3. Фазовая толщина ядер фибробластов в культуре *in vitro* при многократном воздействии ДЭНС: 1 сеанс, 4 сеанса, 6 сеансов (1 – контроль; 2 – опыт; * – отличия значимы)

ла, что позволяет использовать его не только в научных исследованиях, но и в практической медицине.

В результате проведенного исследования *in vitro* было выявлено, что воздействие ДЭНС в терапевтических дозах не приводит к выраженным структурным изменениям в клетках, при этом пролиферативная активность клеток увеличивается, что является положительным эффектом.

Список литературы:

1. Рязкин С.Ю., Власов А.А., Николаева Н.Б., Сафронов А.А., Умникова М.В. Практическое руководство по динамической электронейростимуляции. – Екатеринбург: Токмас-Пресс, 2011. 151 с.
2. Лопарев А.В., Игнатьев П.С., Индукаев К.В., Осипов П.А., Мазалов И.Н., Козырев А.В. Высокоскоростной модуляционный интерференционный микроскоп для медико-биологических исследований // Измерительная техника. 2009. № 11. С. 60-64.
3. Тычинский В.П., Николаев Ю.А., Лисовский В.В., Кретушев А.В., Вышенская Т.В., Муликин А.Л., Сузина Н.А., Дуда В.И., Эль-Регистан Г.И. Исследование ранних стадий прорастания спор *Bacillus Licheniformis* методом динамической фазовой микроскопии // Микробиология. 2007. Т. 76. № 2. С. 191-199.
4. Гринберг К.Н., Кухаренко В.И., Ляшко В.Н., Терехов С.М., Пичугина Е.М., Фрейдин М.И., Черникова В.Г. Культивирование фибробластов человека для диагностики наследственных болезней / Методы культивирования клеток. Сборник научных трудов. – Л.: Наука, 1988. С. 250-257.
5. Болтовская В.В., Нефедова И.Ф., Россинская В.В., Долгушкин Д.А., Кулагина Л.Н. Способ обработки предметных стекол с зеркальным покрытием / Патент на изобретение № 2639768. 22.12.2017.
6. Котельников Г.П., Колсанов А.В., Николаенко А.Н., Волова Л.Т., Россинская В.В., Болтовская В.В., Попов Н.В., Щербовских А.Е., Приходько С.А. Тестирование аддитивных материалов на культурах клеток фибробластов человека // Клиническая и экспериментальная хирургия. 2018. Т. 6. № 2 (20). С. 67-74.
7. Нефедова И.Ф., Россинская В.В. Применение метода интерференционной микроскопии для изучения характеристик дермальных фибробластов в культуре // Альманах клинической медицины. 2018. № 46 (8). С. 778-783.

Виолетта Викторовна Болтовская,
канд. мед. наук, ст. научный сотрудник,
Виктория Викторовна Россинская,
канд. мед. наук, доцент,
ведущий научный сотрудник,
биотехнологический отдел,
Ирина Феликсовна Нефедова,
зав. отделом,
отдел экспериментальной морфологии,
Лариса Николаевна Кулагина,
гл. специалист,
биотехнологический отдел,
Институт экспериментальной медицины
и биотехнологий,
ФГБОУ ВО «Самарский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации,
г. Самара,
e-mail: violetta.boltovskaya@yandex.ru

**ВНИМАНИЮ ПОДПИСЧИКОВ,
РУКОВОДИТЕЛЕЙ СЛУЖБ ИНФОРМАЦИИ И БИБЛИОТЕК!**

**ПРЕДЛАГАЕМ ПОДПИСАТЬСЯ НА ИЗДАВАЕМЫЙ МЕЖДУНАРОДНЫМ
НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИМ ОБЩЕСТВОМ ПРИБОРОСТРОИТЕЛЕЙ
И МЕТРОЛОГОВ ЖУРНАЛ**

«ПРИБОРЫ»

НА 2022 ГОД.

Вы можете оформить льготную подписку через редакцию.

Наши тел.: (495) 695-10-70, 695-10-71.

Стоимость комплекта (12 номеров) – 14400 руб.