

Vishnevetskiy Vyacheslav Yurievich

Taganrog Institute of Technology – Federal State-Owned Educational Establishment of Higher Vocational Education “Southern Federal University”.

E-mail: vvu@fep.tsure.ru

44, Nekrasovskiy, Taganrog, 347928, Russia, (8634)371795.

Department of Hydroacoustic and Medical Engineering, associate professor, Cand. Eng. Sc.

УДК 591.1:597.6

А.А. Буриков, М.А. Кутенко, А.А. Нехороший

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ МЕРЦАТЕЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ В МЕДИЦИНСКОМ МИКРОБИОРОБОТОСТРОЕНИИ

В работе исследовано влияние соляной и уксусной кислот различных концентраций, а также низкочастотной электромагнитной стимуляции на активность мукоцилиарного транспорта (МЦТ) пищевода лягушки озёрной.

Биоробот; мерцательный эпителий; мукоцилиарный транспорт; пищевод.

A.A. Burikov, M.A. Kutenko, A.A. Nekhoroshiy

POSSIBILITY OF APPLICATION OF CILIARY EPITHELIUM IN THE MEDICAL MICROBIOROBOTOENGINEERING

In the article, influence of hydrochloric and acetic acids of various concentration, and also low-frequency electromagnetic stimulations on activity of the rana ridibunda mucociliary transport system (MCT) of the gullet is investigated.

Biorobot; ciliary epithelium; mucociliary transport; gullet.

Имеющий место бум в области нано- и микронауки связан в первую очередь с развитием нано- и микросистемных технологий. Одно из важных направлений – это создание управляемых микро- и нанобиороботов на совершенно новой основе, таких как «информационная пыль» и «информационный планктон», имеющих двойное назначение, а также микророботов, имеющих медико-биологическое применение. Основная идея управляемых биотехнических систем заключается в том, чтобы с помощью технических устройств системы управления воздействовать на «управляющее устройство» биологического объекта, вызывая необходимое поведение, и корректировать это поведение на основе информации о текущем состоянии биообъекта. В современной литературе по нано- и микросистемам широко обсуждаются вопросы создания микродвигателей как чисто технических устройств, так и на биотехнической основе. Так, описываются биороботы, двигателями, которых являются мышечные клетки, устройства для доставки грузов на основе жгутиковой клетки – хламидомонады, молекулярные наномоторы на основе синтеза АТФ, а также молекул ДНК. Есть информация, что создан роторный наномотор из генетически модифицированного белка [1, 2, 3].

Открытое в 1683 г. Антониусом де Гайде движение, впоследствии названное мерцательным, вызвало значительный интерес, после того как было установлено, что эта форма движения реализована у большинства животных организмов. Так, например, пищевод лягушки выстлан мерцательным эпителием, прогоняющим секреты по направлению к желудку.

В данное время нас для создания микродвигателей биоробототехнических устройств более всего интересует именно мерцательный эпителий. Поэтому выяснение закономерностей, управляющих деятельностью мерцательного эпителия, представляет не только теоретический, но и большой практический интерес. Для создания микродвигателей биотехнических устройств нас более всего интересует мерцательный эпителий. Природа и регуляция мерцательного движения (МД) издавна интересовали Ростовских физиологов, таких как Рожанский Н.А., Шмагина А.П., Щитов С.И. Вышедшая 60 лет назад монография Шмагиной А.П., посвященная анализу (МД), до настоящего времени не утратила своего значения. Более современная литература [4], детально описывая разные механизмы движения, мало уделяет внимания механизмам работы (МД), особенно природе согласования и регуляции работы клеток реснитчатого поля.

У человека мерцательный (реснитчатый) эпителий представлен достаточно широко: в органах дыхания, начиная от надгортанника, распространяется на дыхательное горло и бронхи до бронхиол включительно; в органе слуха мерцательным эпителием выстлана евстахиева труба и значительная часть барабанной полости; в половых органах мужчин мерцательным эпителием выстланы выводные каналы яичка, а у женщин – фаллопьевы трубы и частично матка; в ЦНС – мерцательный эпителий распространяется на желудочки головного мозга, сильвиев водопровод и канал спинного мозга.

Представляется перспективным для создания двигателей микророботов использовать собственные клетки конкретного индивида, что позволит исключить их отторжение организмом. Так, мерцательный эпителий органов дыхания человека легко «добывается» биопсией.

Известно, что реснитчатый аппарат мерцательных клеток вместе со слизью образует мукоцилиарную транспортную систему (от лат. *mucus* – слизь, *cilia* – ресничка) [7]. Для исследования особенностей функционирования мукоцилиарной транспортной системы в качестве модели используют трахеи быка, лошади, кошки, собаки [5], но наиболее доступными остаются небо или пищевод лягушки, которые помещают в определённые условия, обеспечивающие и поддерживающие активность реснитчатого (мерцательного) эпителия. В физиологическом растворе изолированный мерцательный эпителий может сохранять функционирование в течение нескольких дней.

В связи с этим целью нашей работы явилось изучение показателей двигательной активности мукоцилиарной транспортной системы пищевода лягушки озёрной при некоторых химических и импульсных низкочастотных электромагнитных воздействиях.

В эксперименте использовались лягушки озёрные (*Rana ridibunda*, Pallas, 1771) (обоёго пола в возрасте 2-3 лет и массой 100 – 200 грамм) в течение весеннего, летнего и осеннего периодов 2008 года. Лягушки отлавливались в естественном природном водоёме в окрестностях реки Дон (близ г. Ростова-на-Дону). На первом этапе оценивалось влияние кислот (соляной, фосфорной, уксусной) различных концентраций на скорость мукоцилиарного транспорта испытуемых животных. На втором этапе производилось изучение влияния низкочастотной электромагнитной стимуляции (ЭМС) на скорость мукоцилиарного транспорта, после предварительных химических стимуляций.

Животные, содержащиеся в условиях вивария при температуре 20 – 25°C в ваннах с дехлорированной водопроводной водой, были разделены на 4 группы: 1) Интактные животные, чей мерцательный эпителий пищевода не подвергался стимуляции (контроль). 2) Животные, мерцательный эпителий пищевода которых

подвергался воздействию соляной кислоты (СК) с концентрациями 0,005, 0,05 и 0,1 %, а также ЭМС с частотами в 1, 5, 10 и 15 Гц. 3) Животные, мерцательный эпителий пищевода которых был подвержен действию фосфорной кислоты (ФК) с концентрациями 0,005, 0,05 и 0,1 %, а также ЭМС с частотами в 1, 5, 10 и 15 Гц. 4) Животные, чей мерцательный эпителий подвергался действию уксусной кислоты (УК) с концентрациями 0,005, 0,05 и 0,1 %, а также ЭМС с частотами в 1, 5, 10 и 15 Гц.

Исследования проводились согласно общепринятым нормам биоэтики и в соответствии со статьёй 11-й Хельсинской декларации Второй медицинской ассоциации (1964), «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (приказ МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г.).

Изучение активности мукоцилиарного транспорта мерцательного эпителия проводилось с использованием методики фототелевизионной микроскопии пищеводов (с увеличением $\times 40$). Регистрация движения производилась с помощью микроскопа стереоскопического панкратического (МСП-1) с тринокулярной насадкой, в вертикальный тубус которой был установлен адаптер для проекции изображения на фотовидеокамеру (Canon). Видеоизображения редактировали с помощью программы Virtual Dub 1.8.0. Анализ производили визуально, а также с помощью фотометрической программы Image J на компьютере. Программа Image J позволяет просматривать всю запись, проводить покадровый просмотр, а также произвести измерение пройденного грузиком расстояния, представленного в видеофрагменте.

Достоверность различий между группами оценивали по t-критерию Стьюдента после проверки распределения на нормальность [6]. Для статистического анализа полученных результатов использовалась программа Statistica 6.0.

Установлено, что под действием 0,005 %-ной СК скорость МЦТ выше уровня контроля на 100 %. Возрастание скорости происходит при действии 0,005 %-ной СК в сочетании с ЭМС с частотами в 1 Гц (на 204 % относительно контроля и на 52 % по сравнению с 0,005 %-ной СК), 5 Гц (на 309 % по отношению к контролю и на 104 % относительно 0,005 %-ной СК), 10 Гц (на 406 % по сравнению с контролем и на 153 % относительно 0,005 %-ной СК), 15 Гц (на 507 % по сравнению с нормой и на 204 % по отношению к 0,005 %-ной СК).

СК с концентрацией 0,05 % увеличивает скорость МЦТ на 66 % относительно контрольной величины. Также показано, что происходит повышение скорости МЦТ под воздействием 0,05 %-ной СК совместно с ЭМС с частотами в 1 Гц (на 149 % относительно контроля и на 50 % по сравнению с 0,05 %-ной СК), 5 Гц (на 242 % относительно контрольного значения и на 106 % по сравнению с 0,05 %-ной СК), 10 Гц (на 346 % относительно контроля и на 168 % по отношению к 0,05 %-ной СК), 15 Гц (на 448 % по отношению к контрольной величине и на 230 % по сравнению с 0,05 %-ной СК).

Отмечено, что 0,1 %-ная СК снижает скорость МЦТ на 90 % относительно нормы, а также снижение скорости, но значительно медленнее, происходит под влиянием 0,1 %-ной СК в сочетании с ЭМС с частотами в 1 Гц (на 87 %), 5 Гц (на 82 %), 10 Гц (на 72 %), 15 Гц (на 57 %) по сравнению с контрольным показателем. Но по сравнению с группой (0,1 %-ная СК), 0,1 %-ная СК при совместном действии с ЭМС с частотами в 1 и 5 Гц недостоверно повышает скорость МЦТ на 29 и 84 % соответственно. ЭМС с частотой 10 Гц совместно с 0,1 %-ной СК достоверно увеличивает скорость на 185 % по сравнению с 0,1 %-ной СК. А ЭМС с частотой в 15 Гц одновременно с 0,1 %-ной СК достоверно повышает скорость МЦТ на 339 %.

Показано, что 0,005 %-ная ФК повышает скорость МЦТ на 143 % по сравнению с уровнем контроля. ФК с концентрацией 0,005 % повышает скорость в совместном действии с ЭМС с частотами в 1 Гц (на 249 % по отношению к контролю и на 44 % относительно 0,005 %-ной ФК), 5 Гц (на 368 % по сравнению с контролем и на 93 % относительно 0,005 %-ной ФК), 10 Гц (на 496 % по сравнению с контрольной величиной и на 145 % по отношению к 0,005 %-ной ФК), 15 Гц (на 622 % относительно контроля и на 197 % по сравнению с 0,005 %-ной ФК).

ФК с концентрацией 0,05 %-ная увеличивает скорость МЦТ на 99 % по сравнению с контрольным показателем. 0,05 %-ной ФК повышает активность МЦТ при сочетании с ЭМС с частотами в 1 Гц (на 176 % по сравнению с контролем и на 39 % по отношению к 0,05 %-ной ФК), 5 Гц (на 269 % относительно контрольной величины и на 86 % в сравнении с 0,05 %-ной ФК), 10 Гц (на 389 % по сравнению с уровнем контроля и на 146 % относительно 0,05 %-ной ФК), 15 Гц (на 535 % по сравнению с контрольной величиной и на 220 % относительно 0,05 %-ной ФК).

Под влиянием 0,1 %-ной ФК происходит понижение скорости МЦТ на 98 % по сравнению с нормой. Меньшее снижение скорости МЦТ происходит при одновременном воздействии 0,1 %-ной ФК и ЭМС с частотами в 1 Гц (на 97 %), 5 Гц (на 92 %), 10 Гц (на 88 %), 15 Гц (на 86 %) по сравнению с контролем. Нами отмечено недостоверное повышение скорости МЦТ относительно группы (0,1 %-ной ФК) под влиянием 0,1 %-ной ФК совместно с ЭМС с частотами в 1 Гц (на 87 %), 5 Гц (на 392 %), 10 Гц (на 621 %), 15 Гц (на 750 %).

УК (0,005 %) повышает скорость МЦТ на 170 % по отношению к контрольной группе. Также возрастает скорость при одновременном действии данной кислоты и ЭМС с частотами в 1 Гц (на 289 % по отношению к контрольной группе и на 44 % по сравнению с 0,005 %-ной УК), 5 Гц (на 405 % относительно уровня контроля и на 87 % относительно 0,005 %-ной УК), 10 Гц (на 507 % в сравнении с контролем и на 124 % по отношению к 0,005 %-ной УК), 15 Гц (на 648 % относительно контрольного показателя и на 177 % по сравнению с 0,005 %-ной УК).

Зафиксировано, что 0,05 %-ная УК увеличивает скорость МЦТ на 45 % относительно контрольного значения. Увеличение скорости отмечается при совместном действии данной кислоты и ЭМС с частотами в 1 Гц (на 142 % по сравнению с контролем и на 66 % по отношению к показателю 0,05 %-ной УК), 5 Гц (на 219 % относительно контроля и на 119 % по отношению к 0,05 %-ной УК), 10 Гц (на 315 % по сравнению с контрольным уровнем и на 185 % в сравнении с 0,05 %-ной УК), 15 Гц (на 400 % по сравнению с уровнем контроля и на 243 % по отношению к 0,05 %-ной УК).

Отмечено, что 0,1 %-ная УК ведёт к уменьшению скорости МЦТ на 100 % в сравнении с контрольным значением. Установлено понижение скорости МЦТ под влиянием 0,1 %-ной УК в её кооперированном действии с ЭМС с частотами в 1 Гц (на 99 % относительно контроля), 5 Гц (на 99 % относительно контрольного показателя), 10 Гц (на 99 % по сравнению с уровнем нормы), 15 Гц (на 97 % в сравнении с контрольным значением). Показано, что происходит недостоверное увеличение показателей скорости МЦТ по отношению к группе (0,1 %-ная УК) при действии 0,1 %-ной УК в сочетании с ЭМС с частотами в 1 Гц (выше на 125 %), 5 Гц (на 200 %), 10 Гц (на 400 %) и 15 Гц (на 950 %).

Из полученных результатов видно, что кислотное действие выражается в том, что более низкие концентрации кислот (0,005 %), вызывают повышение активности мукоцилиарного транспорта, а дальнейшее увеличение концентрации (до 0,05 и 0,1 %) даёт постепенное замедление и в отдельных случаях полную оста-

новку. Таким образом, органическая кислота (уксусная), несомненно, даёт более сильный эффект, чем неорганические (соляная и фосфорная). Неорганические кислоты обладают весьма низкой проницаемостью, являясь в этом отношении противоположностью более слабых органических кислот, проникающих в клетки с большей быстротой. Следовательно, мерцательные клетки наравне с другими оказываются менее проницаемыми с увеличением силы кислоты. Слабо диссоциирующие кислоты действуют сильнее. Причиной кислотного эффекта являются изменения, наступающие при внутриклеточном расщеплении молекул кислоты. Дальнейшие процессы, результатом которых является задержка движения, по видимому, имеют характер коагуляции надмолекулярных субклеточных структур.

Известно, что кислотная «остановка» без повреждения клетки носит обратимый характер. Например, перенесение мерцательных клеток из сильного раствора кислоты в слабый даёт быстро проходящее восстановление активности ресничек, а помещение их в слабощелочной раствор даёт вполне устойчивое восстановление. Но на сегодняшний день нет данных о влиянии электромагнитного излучения на двигательную активность мерцательного поля денервированного пищевода, а значит и на мукоцилиарный транспорт, в условиях химической стимуляции.

Нами наблюдалось резкое снижение скорости МЦТ вплоть до полной остановки под действием 0,1 % растворов кислот (особенно уксусной). После ЭМС в ряде случаев было отчётливо видно восстановление движения МЦТ, особенно при увеличении частоты ЭМС. Из полученных результатов видно, что во многих случаях ЭМС оказывала активирующее влияние, даже в ситуации сильного торможения мукоцилиарной активности, но под влиянием уксусной кислоты электромагнитная стимуляция не оказывала выраженного восстанавливающего действия на активность мерцательного эпителия.

Таким образом, низкочастотное электромагнитное излучение оказывает стимулирующее влияние на различные биохимические и физиологические процессы, в данном случае стимулирует активность мукоцилиарной системы путём увеличения клиренса, а низкие концентрации соляной, фосфорной и уксусной кислот приводят к усилению скорости МЦТ, но дальнейшее повышение концентрации кислот приводит к заметному снижению двигательной способности мукоцилиарной системы, что вероятно связано с нарушением большинства внутриклеточных биохимических процессов, которые приводят к нарушению молекулярной структуры отдельных органоидов и всей клетки в целом.

Проделанная работа и подробный анализ литературы указывают на перспективность использования двигательной, а возможно и сенсорной активности мерцательного эпителия в сферах медицинского микробиороботостроения.

Работа поддержана Грантом РФФИ 09-08-00812-а «Разработка методов и средств телеуправления биоробототехническими системами».

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Буриков А.А. Биотехнические системы: проблемы, перспективы – точка зрения биолога. «Морские физиологические и биотехнические системы двойного назначения». – Ростов-на-Дону, 2005. – С. 19-20.
2. Буриков А.А., Каляев И.А., Капустян С.Г., Севостьянова М.В. Биороботы – это реально // Мат. Юбилейной междунард. конф. по нейрокибернетике. – Ростов-на-Дону, 2002. – С. 58-59.
3. Каляев И.А., Капустян С.Г., Буриков А.А., Севостьянова М.В. Перспективы создания биороботов // Мехатроника, автоматизация, управление. – 2003. – №3. – С. 29-33.
4. Капуччинелли П. Подвижность живых клеток. – М.: Мир, 1982. – 124 с.

5. *Кобылянский В.И.* Основные методы исследования мукоцилиарной транспортной системы // Терапевтический архив. – 2001. – №3. – С. 73-76.
6. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
7. *Рихельман Г., Лопатин А. С.* Мукоцилиарный транспорт: экспериментальная и клиническая оценка // Российская ринология. – 1994. – № 4. – С. 33-47.

Буриков Алексей Алексеевич

Педагогический институт федерального государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Южный федеральный университет».

E-mail: aleksey-burikov@yandex.ru.

344082, г. Ростов-на-Дону, ул. Большая Садовая, 33, тел.: (928)1549129.

Зав. каф. общей биологии, зав. лаб. нейробиологии поведения, профессор, д.б.н.

Burikov Alexey Alekseevich

Pedagogical Institute – Federal State-Owned Educational Establishment of Higher Vocational Education «Southern federal university».

E-mail: aleksey-burikov@yandex.ru.

33, Bolshaya Sadovaya street, Rostov-on-Don, 344082, Russia, Phone: (928)1549129.

Department of General Biology, professor, Doct. Biol. Sc.

Нехороший Андрей Александрович

Педагогический институт федерального государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Южный федеральный университет».

E-mail: momigel@yandex.ru.

344082, г. Ростов-на-Дону, ул. Большая Садовая, 33, тел.: (906)4299596.

Кафедра общей биологии, аспирант.

Nekhoroshiy Andrey Aleksandrovich

Pedagogical Institute – Federal State-Owned Educational Establishment of Higher Vocational Education «Southern federal university».

E-mail: momigel@yandex.ru.

33, Bolshaya Sadovaya street, Rostov-on-Don, 344082, Russia, Phone: (906)4299596.

Department of General Biology, post-graduate student.

Кутенко Михаил Андреевич

Педагогический институт федерального государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Южный федеральный университет».

E-mail: nej-lab@yandex.ru.

344082, г. Ростов-на-Дону, ул. Большая Садовая, 33, тел.: (904)3454474.

Кафедра общей биологии, аспирант.

Kutenko Mihail Andreevich

Pedagogical Institute – Federal State-Owned Educational Establishment of Higher Vocational Education «Southern federal university».

E-mail: nej-lab@yandex.ru.

33, Bolshaya Sadovaya street, Rostov-on-Don, 344082, Russia, Phone: (904)3454474.

Department of General Biology, post-graduate student.