

DOI: <https://doi.org/10.34883/PI.2020.8.2.003>
УДК 616-07:061.62

Косаковская И.А., Ватлицов Д.В., Андрияш В.В.
Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л. Шупика,
Киев, Украина

Kosakivska I., Vatlitsov D., Andryash V.
Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, Kyiv, Ukraine

Влияние высокочастотного тока на показатели клеточной гибели суспензии живых клеток

Influence of High-Frequency Current on the Indicators of Cell
Death of Suspension of Living Cells

Резюме

Введение. При совершенствовании традиционных хирургических методик перспективным направлением является использование высокочастотной биполярной электротермоадгезии биологических тканей.

Цель. Изучить влияние различных режимов высокочастотного тока на показатели клеточной гибели суспензии живых клеток при электротермоадгезии в эксперименте.

Материалы и методы. Проведены исследования с применением электротермоадгезии (ЭТА) на линейной перевиваемой культуре Namalwa в 24 луночных планшетах, концентрация 1×10^6 клеток/мл. В качестве высокочастотного источника тока использовали биполярный электрокоагулятор EK-300M1.

Результаты и обсуждение. Исследование влияния различных режимов ЭТА и гальванокаутера на показатели клеточной гибели показало, что даже непродолжительная экспозиция ЭТА и гальванокаутера приводит к значительным изменениям в показателях гибели клеток. Так, наблюдался рост количества Annexin V+/PI- клеток в образцах, которые подвергались ЭТА в режимах «сварка», «перекрытие» и «коагуляция», а также после использования гальванокаутера, на основании чего можно сделать вывод о мембранно-ориентированном влиянии указанных манипуляций. Изменения количества Annexin V+/PI+ указывают на отсутствие деструктивного влияния режимов ЭТА «сварка», «коагуляция» и гальванокаутера на цитоплазматическую мембрану клеток культуры Namalwa. Важным является тот факт, что ЭТА и гальванокаутер не оказывали влияния на митохондрии клеток, что отражалось в отсутствии изменений количества клеток с пониженным митохондриальным мембранным потенциалом (PI-/R123-). Наиболее деструктивным оказался режим ЭТА «резка», что подтверждается статистически значимо ($p < 0,05$) большими значениями количества Annexin V+/PI+ (поздняя стадия апоптоза) и PI+/R123- (некроз) клеток при снижении концентрации Annexin V+/PI-.

Выводы. Проведенные исследования выявили зависимость количества клеток, имеющих признаки гибели по различным типам, от режима ЭТА. Было показано, что наибольшее деструктивное влияние суспензия клеток претерпела под воздействием высокочастотного тока (66 кГц) в режиме «резка», а наименьшее – в режиме «сварка».

Полученные результаты указывают на то, что ЭТА влияет не только на молекулы коллагена или эластина, но и на структурные элементы цитоплазматической мембраны клеток. Интересен тот факт, что проведенные исследования не выявили влияния ЭТА на внутриклеточные структуры.

Ключевые слова: апоптоз, эксперимент, электротермоадгезия, биполярный электрокоагулятор, высокочастотный ток, суспензия живых клеток.

Abstract

Introduction. The use of high-frequency bipolar electric thermal adhesion of biological tissues is a promising direction in the improvement of traditional surgical methods.

Purpose. To study the effect of different modes of high-frequency current on the rates of cell death of living cells suspension in electric thermal adhesion in experiment.

Materials and methods. There were conducted the studies with the use of electric thermal adhesion (ETA) at the line of inoculation of Namalwa culture in 24-well plates with concentration of 1×10^6 cells/ml. Bipolar electric coagulator EK-300M1 was used as the source of high-frequency current.

Results and discussion. The study of the influence of various ETA and galvanocauter modes on cell death rates showed that even a short exposure of ETA and galvanocauter leads to significant changes in the cell death rates. Thus, the increase of the number of Annexin V+/PI- cells was observed in the samples subjected to ETA in the "welding", "overlapping" and "coagulation" modes, as well as after using a galvanocauter, on the base of which it is possible to make the conclusion about the membrane-oriented effect of these manipulations. Changes in the number of Annexin V+/PI+ indicate the absence of a destructive effect of the ETA "welding", "coagulation" and galvanocauter modes on the cytoplasmic membrane of Namalwa culture cells. It is important that ETA and the galvanocauter did not affect the mitochondria of the cells, which was reflected in the absence of changes in the number of cells with the reduced mitochondrial membrane potential (PI-/R123-). The most destructive ETA regime was "cutting", which is confirmed by statistically significant ($p < 0.05$) large values of the number of Annexin V+/PI+ (late stage apoptosis) and PI+/R123- (necrosis) cells with the decrease of the concentration of Annexin V+/PI-.

Conclusions. There was found the dependence of the number of cells with different signs of death on the mode of ETA. The cell suspension underwent the greatest destructive effect under the influence of the high-frequency current (66 kHz) in "cutting" mode and the minimum effect – in "welding" mode. The obtained results indicate that ETA affects not only the molecules of collagen or elastin, but also the structural elements of the cytoplasmic membranes of the cell. An important point is that the studies found no effect of ETA on intracellular structures.

Keywords: apoptosis, experiment, electric thermal adhesion, bipolar electric coagulator, high-frequency current, cells suspension.

■ ВВЕДЕНИЕ

Традиционно для разъединения и соединения тканей и гемостаза во время хирургических вмешательств используют скальпель, монополярный электронож, зажимы, шовный материал. Данные методики имеют определенные недостатки, в частности, отторжение шовного материала, ожог и некроз тканей, необходимость длительного времени для хирургического вмешательства и гемостаза, длительное заживление ран, образование рубцов и деформации тканей, что отрицательно влияет на конечный результат лечения.

Перспективным направлением при совершенствовании традиционных хирургических методик является использование высокочастотной биполярной электротермоадгезии (ЭТА) биологических тканей [1].

Оборудование для сварки живых тканей состоит из двух частей, которые вместе составляют единый электросварочный хирургический комплекс. Это высокочастотный источник питания (генераторы высокочастотного тока) и специализированный электрохирургический инструментарий.

Рабочая частота тока источника ЕК-300М1 составляет 66 кГц и имеет 4 режима работы: резка, коагуляция, перекрытие (ручная сварка) и сварка (автоматическая сварка). Данный аппарат может работать с любыми инструментами, созданными для сварки живых тканей.

Высокочастотный ток подается на биполярный инструмент и подводится к тканям оперируемого пациента. Электрохирургический эффект резки, коагуляции и сварки базируется на обеспечении достаточно высокой степени воздействия на биологическую ткань узкого потока высокочастотного тока между концами биполярного сварочного электроинструмента. Ток и напряжение в процессе сварки задаются и контролируются системой автоматического управления.

В основе высокочастотной биполярной электросварки биологических тканей лежит принцип использования термической энергии для разъединения и соединения тканей [2]. В результате действия температурного фактора (в пределах 40–70 °С) происходит испарение внеклеточной и внутриклеточной жидкости, разрыв клеточных мембран и образование гомогенного субстрата, который состоит из денатурированных белковых молекул эластина и коллагена. При застывании они образуют «белковые мостики», которые удерживают соединенные поверхности тканей [3, 4]. Под воздействием электрического тока происходит дозированная денатурация молекул белков. Свободные окончания молекул белка в дальнейшем вступают в соединение друг с другом. Вариантами соединения являются как реполяризация, так и запуск различных реакций. Реполяризация волокон коллагена, образование соединений между различными коллагеновыми волокнами, коллагеновыми и мышечными волокнами, волокнами и мембранами клеток приводит к соединению двух участков ткани. Наличие полноценных волокон коллагена на линии шва создает морфологическую основу прочности электросварочного соединения.

Доказанным является тот факт, что изменение полярности или электрохимического потенциала мембран клеток приводит к активации программируемой клеточной гибели. Одним из триггерных механизмов запуска программы гибели является деполяризация плазматической мембраны клеток, что активирует FAS-рецепторы клеток [5], также перемобилизация мембран приводит к запуску каспаза-независимых путей развития апоптоза [6].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение влияния различных режимов высокочастотного тока на показатели клеточной гибели суспензии живых клеток при электротермоадгезии в эксперименте.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на линейной перевиваемой культуре *Natalwa* в 24 луночных планшетах, концентрация 1×10^6 клеток/мл.

Использовали культуральную среду RPMI-1640 с L-глутамином (Sigma), добавлением 10% FBS (Sigma) и антибиотиков в бактериостатической концентрации.

Обработку суспензии клеток проводили в асептических условиях с использованием аппарата биполярного высокочастотного (66 кГц) коагулятора EK-300M1 в режимах «сварка», «коагуляция», «перекрытие», «резка» и гальванокаутера («каутер») с экспозицией 1 с. в культуральной среде с максимальным погружением без касания стенок планшета.

Состояние клеток после применения различных режимов ЭТА оценивали по показателям индекса апоптоза и изменениям митохондриального мембранного потенциала. Для определения влияния различных режимов ЭТА изучали уровень апоптоза по анексиновому методу и изменениям мембранного потенциала митохондрий после 3 часов инкубации на питательной среде при 37 °С.

Исследование уровня апоптоза анексиновым методом с использованием набора для определения апоптоза Annexin V-FITC Apoptosis detection Kit I (BD Bioscience Pharmingen, США) и изменений мембранного потенциала митохондрий (ММП), по общепринятой методике с родамином 123 («Fluka»), проводили на проточном цитометре PAS (Partec, Германия). Результаты, полученные с использованием проточного цитометра, дифференцировали следующим образом: Annexin V+ (AnV+) – клетки на разных стадиях апоптоза; AnV+/PI– – клетки на ранней стадии апоптоза; AnV+/Propidium Iodide+ (PI+) – клетки на поздней стадии апоптоза; Rhodamine 123– (R123–)/PI– – клетки, погибшие в результате апоптоза; R123–/PI+ – клетки, погибшие в результате некроза; R123+/PI+ – клетки с нарушением проницаемости цитоплазматической мембраны.

Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica, применяли t-критерий Стьюдента и описательную статистику. Доверительные интервалы средних значений определяли путем подсчета стандартной ошибки. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования прямого влияния ЭТА на злокачественно трансформированные клетки иммунной системы (Namalwa) обнаружили статистически значимые отличия влияния различных режимов ЭТА на уровень Annexin V+ (апоптотические) (рис. 1). Так, 1 с. экспозиция в режиме «сварки» привела к статистически значимому ($p < 0,05$) увеличению количества Annexin V+ клеток до $8,65 \pm 1,63\%$ (здесь и далее – $M \pm SD$) относительно контрольного значения $6,81 \pm 0,60\%$, в режиме «коагуляция» – до значения $10,24 \pm 0,67\%$, в режиме «перекрытие» – до $10,06 \pm 2,71\%$, в режиме «резка» – до $10,27 \pm 2,27\%$, а использование каутера увеличило количество Annexin V+ клеток до $11,66 \pm 2,55\%$ после 3-часовой инкубации на питательной среде (рис. 1).

Следующим этапом экспериментальных исследований было изучение влияния различных типов ЭТА на различные стадии и типы клеточной гибели. Использование предложенных методик в ходе исследований позволило дифференцировать как тип гибели, апоптоз или некроз, так и стадию развития апоптоза. Дифференцировали раннюю

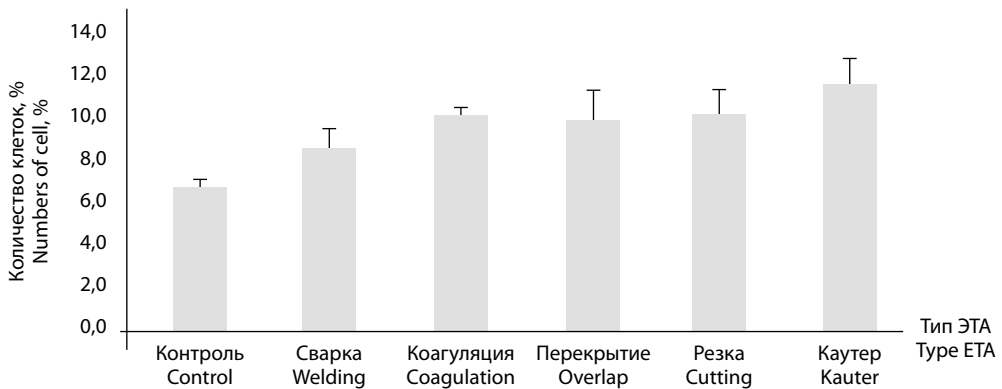


Рис. 1. Изменение количества Annexin V+ (апоптотических) клеток в зависимости от типа электротермоадгезии после 1 с. экспозиции

Fig. 1. Change of the number of Annexin V+ (apoptotic) cells depending on the type of electrothermal adhesion after 1 s exposure

стадию (Annexin V+/PI-) и позднюю (Annexin V+/PI+), откуда отнимали значение количества некротических клеток (PI+/Rhodamine 123-). Итак, результаты, полученные в ходе проведенных исследований, выявили, что наибольшее влияние на мембранные структуры клеток (Nanalwa) имели манипуляции ЭТА в режиме «коагуляция» и каутер $8,98 \pm 0,58\%$ и $10,02 \pm 2,65\%$ соответственно против $5,45 \pm 0,44\%$ контрольного значения количества Annexin V+/PI- клеток. Что касается других режимов, то ЭТА в режимах «сварка» и «перекрытие» приводила к почти идентичным изменениям количества Annexin V+/PI- клеток – $7,24 \pm 1,74\%$ и $7,34 \pm 2,38\%$ соответственно. Наименьшее количество Annexin V+/PI- клеток, меньше контрольного значения, было обнаружено в образцах, которые подвергались 1 с. экспозиции ЭТА в режиме «резка» (рис. 2).

Исследование влияния различных режимов ЭТА на количество Annexin V+/PI+ (поздняя стадия апоптоза) выявило, что использование ЭТА в режимах «сварка» и «коагуляция», а также 1 с. экспозиция при использовании каутера почти не влияло на количество Annexin V+/PI+ клеток Nanalwa ($1,44 \pm 0,20\%$; $1,26 \pm 0,17\%$ и $1,63 \pm 0,24\%$ соответственно), показатель в контрольных образцах – $1,27 \pm 0,19\%$. Однако использование ЭТА в режиме «перекрытие» приводило к статистически значимому ($p < 0,05$), более чем в два раза, увеличению Annexin V+/PI+ клеток ($2,72 \pm 0,78\%$), а использование ЭТА в режиме «резка» – к увеличению показателя более чем в четыре раза ($5,33 \pm 0,81\%$) (рис. 2).

Важным показателем «стабильности» клеточной системы является активность митохондрий клеток. Снижение митохондриального мембранного потенциала отражает развитие митохондрий-зависимого апоптоза, однако, исходя из того, что апоптоз является энергозависимым процессом и зависит от активного синтеза АТФ, функционирование митохондрий является крайне важным фактором развития клеточной гибели. Итак, определение изменений митохондриального мембранного потенциала при исследовании клеточной гибели является крайне важным, поскольку отражает не только количество клеток, погибших

путем апоптоза (PI-/Rhodamine 123-), но и нарушение целостности цитоплазматической мембраны (PI+/Rhodamine 123+) и количество клеток, погибших путем некроза (PI+/Rhodamine 123-). Было показано, что ЭТА и каутер, кроме режима «коагуляция» ($4,03 \pm 0,28\%$), не влияют на мембранный потенциал митохондрий, что отражалось в отсутствии статистически значимых отличий от значений контрольных образцов ($4,87 \pm 0,35\%$). Однако изучение нарушения проницаемости цитоплазматической мембраны клетки после воздействия различных режимов ЭТА и каутера выявило статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение количества клеток с повышенной проницаемостью цитоплазматической мембраны в образцах после 1 с. экспозиции ЭТА в режимах «коагуляция» ($2,99 \pm 2,34\%$), «перекрытие» ($3,68 \pm 0,59\%$), «резка» ($5,40 \pm 0,72\%$) и каутер ($2,65 \pm 0,78\%$) относительно контрольного значения $1,76 \pm 0,11\%$.

По количеству клеток, погибших вследствие некроза, выявлено некоторое снижение количества PI+/Rhodamine 123- (некроз) клеток в образцах после 1 с. экспозиции ЭТА в режиме «коагуляция» ($0,11 \pm 0,01\%$), экспозиция ЭТА в других режимах приводила к статистически значимому ($p < 0,05$) увеличению количества PI+/Rhodamine 123- клеток до $0,24 \pm 0,05\%$ в режиме «перекрытие», $0,36 \pm 0,05\%$ в режиме «резка» и $0,20 \pm 0,09\%$ при использовании каутера (рис. 2).

Таким образом, исследование влияния различных режимов ЭТА и гальванокаутера на показатели клеточной гибели показало, что даже непродолжительная экспозиция ЭТА и гальванокаутера приводит к значительным изменениям в показателях гибели клеток. Так, наблюдался рост количества Annexin V+/PI- клеток в образцах, которые подвергались ЭТА в режимах «сварка», «перекрытие» и «коагуляция», а также после использования гальванокаутера, на основании чего можно сделать вывод о мембранно-ориентированном влиянии указанных манипуляций. Изменения количества Annexin V+/PI+ указывают на отсутствие деструктивного влияния режимов ЭТА «сварка», «коагуляция» и гальванокаутера на цитоплазматическую мембрану клеток культуры

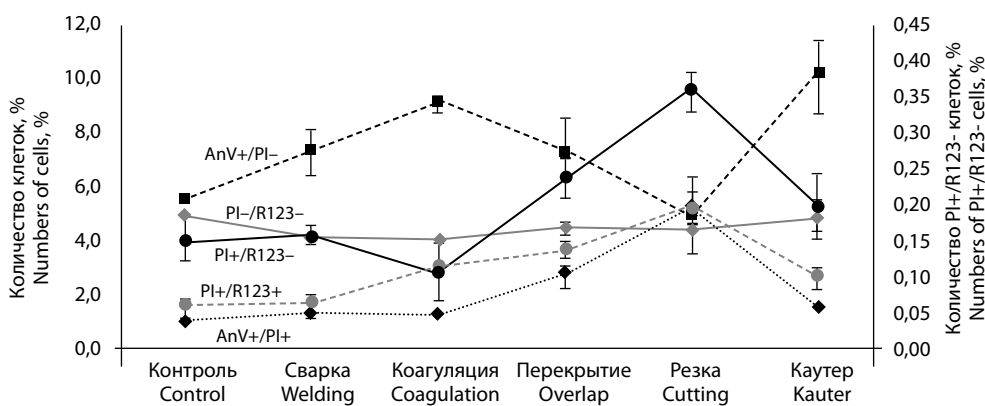


Рис. 2. Влияние различных типов электротермоадгезии на количество клеток на разных стадиях и типах клеточной гибели

Fig. 2. The effect of various types of electrothermal adhesion on the number of cells at different stages and types of cell death

Namalwa, поскольку не наблюдалось увеличения количества клеток с инкорпорированным PI, который является суправитальным красителем. Важным является тот факт, что ЭТА и гальванокаутер не оказывали влияния на митохондрии клеток, что отражалось в отсутствии изменений количества клеток с пониженным митохондриальным мембранным потенциалом (PI-/R123-). Наиболее деструктивным оказался режим ЭТА «резка», что подтверждается статистически значимо ($p < 0,05$) большими значениями количества Annexin V+/PI+ (поздняя стадия апоптоза) и PI+/R123- (некроз) клеток при снижении концентрации Annexin V+/PI-.

Проведенные исследования выявили зависимость количества клеток, имеющих признаки гибели по различным типам, от режима ЭТА. Было показано, что наибольшее влияние суспензия клеток претерпела при использовании ЭТА в режиме «резка», а самое маленькое – в режиме «сварка».

Полученные результаты указывают на то, что ЭТА влияет не только на молекулы коллагена или эластина, но и на структурные элементы цитоплазматической мембраны клеток. Интересен тот факт, что проведенные исследования не выявили влияния ЭТА на внутриклеточные структуры клеток.

■ ВЫВОДЫ

1. Количество клеток, имеющих признаки гибели по различным типам, зависит от режима электротермоадгезии. Наибольшее деструктивное влияние суспензия клеток претерпевает при использовании электротермоадгезии в режиме «резка», а наименьшее – в режиме «сварка».
2. Под воздействием высокочастотного тока (66 кГц) с экспозицией 1 с. в культуральной среде наблюдаются изменения цитоплазматической мембраны клеток, а внутриклеточные структуры сохраняются неповрежденными.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. (2009) *Tkanesohranjajuschaja vysokochastotnaja elektrovarohnaja hirurgija* [Tissue-saving high-frequency electrowelding surgery]. Atlas. K.: Naukova dumka, 200 p. (in Russian)
2. Paton Bye (2004). Elektrycheskaja svarka m'jagkih tkanei v hirurgii [Electric welding of soft tissues in surgery]. *Avtomatičeskaja svarka*, vol. 9, pp. 7–11.
3. Novitsky Y.W., Rosen M.J., Harrell A.G. (2005). Evaluation of the efficacy of the electrosurgical bipolar vessel sealer (LigaSure) devices in sealing lymphatic vessels. *Surg Innov.*, vol. 2, pp. 155–160.
4. Shen W.T., Baumbusch M.A., Kebebew E., Duh Q.Y. (2005) Use of the electrothermal vessel sealing system versus standard vessel ligation in thyroidectomy. *Asian J. Surg. Apr.*, vol. 28(2), pp. 86–9.
5. Bortner C.D., Gomez-Angelats M., Cidlowski J.A. (2001). Plasma Membrane Depolarization without Repolarization Is an Early Molecular Event in Anti-Fas-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.*, vol. 276, pp. 4304–4314. doi:10.1074/jbc.M005171200
6. Dübmann H., Rehm M., Kögel D., Prehn J.H.M. (2003). Outer mitochondrial membrane permeabilization during apoptosis triggers caspase-independent mitochondrial and caspase-dependent plasma membrane potential depolarization: a single-cell analysis. *J. Cell Sci.* vol. 116, pp. 525–536. doi:10.1242/jcs.00236

Поступила/Received: 22.03.2020

Контакты/Contacts: alkoss@ukr.net