

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ПАРАМЕТРОВ НА КЛЕТОЧНО-МОЛЕКУЛЯРНОМ УРОВНЕ

Я. И. Медведев, Е. А. Никанорова, К. Ю. Иванов, В. И. Нагиба, И. А. Поленова

ФГУП «РФЯЦ-ВНИИЭФ», г. Саров

Введение

В настоящее время сформирована новая техногенная среда обитания, в которой на человека постоянно воздействует сложноорганизованное модулированное электромагнитное излучение (ЭМИ) широкого спектра частот. Развитие средств связи, телекоммуникаций, радиолокации влечет за собой освоение новых диапазонов частот ЭМИ, усложнение структуры сигналов, увеличение площади покрытия и продолжительности радиопередающих систем [1]. ЭМИ является биологически активным фактором, поэтому крайне важно оценить степень его влияния на живые системы. В мировом научном сообществе остро стоит проблема адаптации базового комплекса санитарных норм к условиям воздействия источников электромагнитного излучения и задача корректировки норм безопасности ВОЗ [2]. Влияние ЭМИ на организм обусловлено высокой чувствительностью к данному фактору центральной нервной системы, при этом отклики регистрируются на уровне функционирования отдельных клеток [3, 4]. В этой связи необходимы исследования по изучению биоэффектов действия электромагнитного поля с различными характеристиками на разных уровнях организации. Целью работы являлось изучение действия низкоинтенсивного нетеплового электромагнитного излучения *in vivo* на функциональное состояние клеточных систем у лабораторных животных.

Материалы и методы исследования

В эксперименте использовали белых беспородных крыс-самцов в количестве 89 особей, массой 200–220 граммов, разделенных на группы в зависимости от характера воздействия. Биоэффекты оценивали через 20 минут после окончания воздействия сложномодулированным электромагнитным излучением (ЭМИ) импульсно-амплитудной модуляции, круговой или линейной поляризации, с частотой несущей 920, 1000, и 2450 МГц; с пиковой величиной плотности потока энергии 85 мВт/см² [5]. Источником ЭМИ служила экспериментальная радиотехническая установка. Образцы крови забирали из подъязычной вены животных в микропробирки с гепаринатом лития в конечной концентрации 50 ЕД/мл крови через 15 минут после окончания воздействия. Для последующих работ выделяли ядерные клетки крови в градиенте фикола по методу [6], концентрацию выделенных клеток доводили до 5×10^5 на 1 мл.

Критериями оценки функционального состояния клеток крови служили показатели клеточной цитотоксичности (МТТ-метод) и программируемой клеточной гибели (апоптоза). МТТ-тест проводили в двух вариантах: спонтанном и нагрузочном, путем 20-часового культивирования в иммунологических планшетах при 37 °С; нагрузочный вариант проводили в присутствии слабого мутагена. В качестве цитотоксической нагрузки использовали нитрит натрия, ингибирующий метаболическую активность клеток, в концентрации 1 мг/мл.

Метаболическую активность оценивали спектрометрически по оптической плотности на ELISA-ридере «Immunochem» (США) при $\lambda = 492$ нм против $\lambda = 630$ нм. Подробное описание методики оценки метаболической активности клеток крови с помощью МТТ-теста представлено в [7], в эксперименте использовали адаптированную методику. Каждую пробу анализировали в двух повторностях.

Уровень апоптоза оценивали морфологически после 24-часового культивирования в иммунологических планшетах при 37°C в питательной среде без тестирующей нагрузки, по модифицированной методике [8]. Количественно определяли содержание клеток с признаками апоптоза (конденсация и фрагментация хроматина в ядре), с использованием флуоресцентного микроскопа «Axio» (Германия). Для каждого животного результаты анализировали в трех повторностях, учитывали не менее 200 клеток для каждой повторности.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента, а также критерия Уилкоксона – при распределении, отличном от нормаль-

ного. Значимыми считали различия при уровне $p \leq 0,05$ [9, 10]. Действие различных экспериментальных факторов на клеточно-молекулярные показатели оценивали по значению индекса эффекта (ИЭ), которое рассчитывали по формуле:

$$ИЭ = \frac{N_{\text{эксн}}}{N_{\text{исх}}}$$

где $N_{\text{эксн}}$ – величина исследуемого показателя после воздействия фактора;

$N_{\text{исх}}$ – исходная величина показателя.

Результаты исследования

Исследование действия электромагнитного излучения с различным видом поляризации на метаболическую активность клеток крови

Исходная оптическая плотность клеточных культур крови и оптическая плотность после тестирующей нагрузки, а также показатель метаболической активности в контрольных и экспериментальных группах животных приведены в табл. 1 и на рис. 1.

Таблица 1

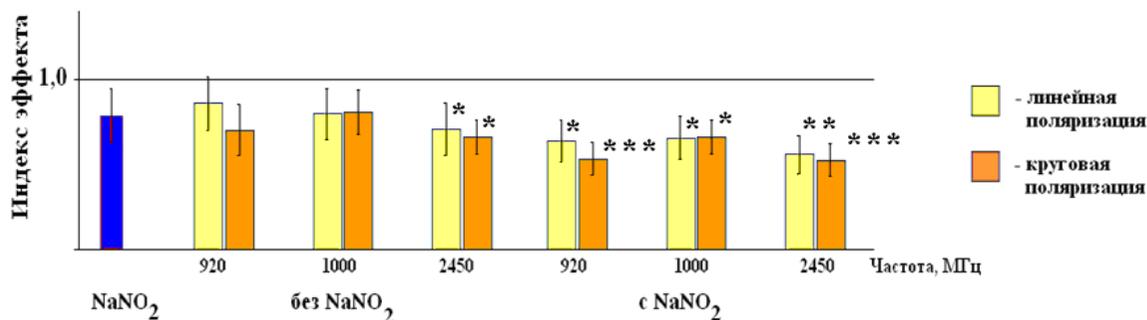
Оптическая плотность клеточных культур и коэффициент восстановления в контрольных и экспериментальных группах животных

Тип воздействия (группа животных)		Количество животных	Оптическая плотность, у.е., $M \pm m$		Коэффициент восстановления, $M \pm m$
Характер поляризации	Частота, МГц		исходная	после добавления NaNO_2	
Мнимое воздействие (контроль)		19	$14,10 \pm 1,36$	$11,03 \pm 1,14$	$0,79 \pm 0,07$
Линейная	920	12	$12,07 \pm 1,90$	$8,95 \pm 1,45^*$	$0,75 \pm 0,13$
	1000	12	$11,19 \pm 1,79$	$9,21 \pm 1,58^*$	$0,81 \pm 0,18$
	2450	12	$9,94 \pm 1,93^*$	$7,84 \pm 1,41^{**}$	$0,80 \pm 0,19$
Круговая	920	12	$9,88 \pm 1,86$	$7,49 \pm 1,10^{***}$	$0,77 \pm 0,15$
	1000	10	$11,38 \pm 1,50$	$9,29 \pm 1,13^*$	$0,85 \pm 0,12$
	2450	10	$9,29 \pm 1,31^*$	$7,34 \pm 1,16^{***}$	$0,79 \pm 0,17$

* – значимое отличие от исходной оптической плотности в контроле, $p \leq 0,05$,

** – значимое отличие от исходной оптической плотности в контроле, $p \leq 0,01$,

*** – значимое отличие от исходной оптической плотности в контроле, $p \leq 0,001$.



- * – значимое отличие от исходной оптической плотности в контроле, $p \leq 0,05$
- ** – значимое отличие от исходной оптической плотности в контроле, $p \leq 0,01$
- *** – значимое отличие от исходной оптической плотности в контроле, $p \leq 0,001$

Рис. 1. Изменение (индекс эффекта) исходной оптической плотности клеточных культур до и после инкубации с мутагеном

Анализ результатов показал, что исходная оптическая плотность клеточных культур, характеризующая уровень клеточного метаболизма, в контрольной группе животных составила $14,10 \pm 1,36$ у.е. После 20-часовой инкубации клеток *in vitro* в присутствии нитрита натрия – слабого мутагена, снижающего активность ферментов дыхательной цепи митохондрий, метаболическая активность клеток была снижена и составила в среднем 79% от исходного уровня.

За 1,0 принят индекс эффекта исходной оптической плотности в контроле.

После действия ЭМИ *in vivo* практически во всех экспериментальных группах угнетение метаболической активности было соизмеримо по величине эффекта с инкубацией клеток в присутствии мутагена, о чем свидетельствуют значения исходной оптической плотности. При использовании частоты 2450 МГц статистически значимое снижение исходной метаболической активности относительно контроля ($p \leq 0,05$) было наиболее выражено, использование круговой поляризации усиливало биоэффект. Угнетение метаболической активности клеток (снижение цитотоксического потенциала) после действия электромагнитного излучения связано с накоплением свободных радикалов и окислительным стрессом [4].

После тестирующей нагрузки (культивирования с мутагеном) действие электромагнитного излучения снижало метаболическую активность ещё на 15–25 %, о чем свидетельствует индекс эффекта в этих экспериментальных группах, различия с контролем были значимы. При этом снижение метаболической активности при инкубации клеток в присутствии мутагена в экспериментальных и контрольной группах носило пропорционально одинаковый характер. При использовании тестирующей нагрузки при частоте несущей 920 и 2450 МГц зависимость биоэффектов от характера поляризации ЭМИ проявлялась более отчетливо, но была по-прежнему незначима.

Способность клетки к восстановлению нормального структурно-функционального состояния после внешнего воздействия во многом определяется уровнем клеточного метаболизма [11]. Снижение интенсивности клеточного дыхания отражает дефицит энергетического обеспечения внутриклеточных процессов, в том числе процессов репарации повреждений, индуцированных внешним воздействием [12]. Накопление таких повреждений, в том числе повреждений структуры ДНК, является фактором, запускающим процессы апоптоза (программируемую гибель клетки).

Таким образом, ЭМИ с частотой 2450 МГц независимо от вида поляризации приводило к значимому снижению функциональных клеточных показателей, сравнимых с действием мутагена. Использование круговой поляризации ЭМИ, а также дополнительная тестирующая нагрузка усиливали биоэффекты практически при всех частотах.

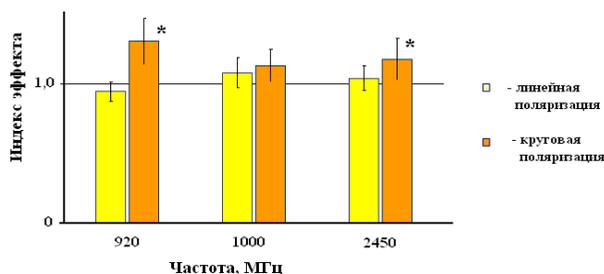
Исследование действия электромагнитного излучения с различным видом поляризации на показатель апоптоза клеток крови

Процентное содержание лимфоцитов с морфологическими признаками апоптоза в группах животных, подвергавшихся действию сложномодулированного ЭМИ с линейной и круговой поляризацией, и в контрольной группе животных, представлено в табл. 2 и на рис. 2. В ходе эксперимента всего проанализировано 39194 клеток.

В контрольной группе животных после 24-часовой инкубации в питательной среде доля лимфоцитов с морфологическими признаками апоптоза составила 15,5 %, что соответствует опубликованным данным и является физиологической нормой.

Изменение процентного содержания клеток с признаками апоптоза после действия ЭМИ с линейной поляризацией при всех исследуемых частотах было в пределах

95 %-ого доверительного интервала для среднего значения в контроле ($p > 0,05$). Действие электромагнитного излучения с круговой поляризацией при всех используемых частотах приводило к увеличению уровня апоптоза (индекс эффекта был $> 1,0$). При частотах 920 и 2450 МГц наблюдали значимое увеличение содержания клеток с признаками апоптоза в 1,3 и 1,2 раза относительно контроля ($p \leq 0,05$).



* – значимое отличие от процента апоптоза в контроле, $p \leq 0,05$

Рис. 2. Изменение уровня апоптоза (по индексу эффекта) в клетках крови животных

Эффекты действия ЭМИ, по-видимому, вызваны активацией транскрипции генов, ответственных за поддержание стабильности функциональной активности клеток [13]. Истощение резерва репаративных систем клетки, а также накопление ошибок репарации в результате избыточной актива-

Таблица 2

Процент апоптоза в клетках крови лабораторных животных контрольной и экспериментальных групп

Тип воздействия (группа животных)		Количество животных	Количество проанализированных клеток	% содержания клеток с признаками апоптоза
Характер поляризации	Частота, МГц			
Мнимое воздействие (контроль)		21	10296	15,47 ± 0,81
Линейная	920	12	7191	14,62 ± 0,74
	1000	12	7322	16,71 ± 1,43
	2450	12	7240	16,13 ± 1,12
10	4935	12	6814	20,29 ± 2,29*
	1000	10	4663	17,55 ± 1,55
	2450			18,27 ± 2,11*

* – значимое отличие от процента апоптоза в контроле, $p \leq 0,05$.

ции и перенапряжения ферментативных систем может приводить у части клеточного пула критического уровня повреждений ДНК, запускающего процессы апоптоза. Повышенный уровень апоптоза указывает на развитие в организме дегенеративных процессов [14].

Таким образом, установлена зависимость реакции организма на клеточно-молекулярном уровне от параметров электромагнитного излучения радиочастотного диапазона. При этом ЭМИ с частотами 920 и 2450 МГц и круговой поляризацией вызывает наиболее выраженные биоэффекты.

Заключение

Исследование действия электромагнитного излучения импульсно-амплитудной модуляции с несущей частотой 920, 1000 и 2450 МГц и различным характером поляризации на структурно-функциональную активность клеток крови животных показало, что эффекты действия ЭМИ круговой поляризации по большинству параметров носили более выраженный характер по сравнению с эффектами действия ЭМИ линейной поляризации. Биоэффекты были наиболее выражены при использовании несущей частоты 920 и 2450 МГц.

Список литературы

1. Гапеев А. Б., Лукьянова Н. А. Импульсно-модулированное электромагнитное излучение крайне высоких частот защищает ДНК клеток от повреждающего действия физико-химических факторов // Биофизика. – 2015. – Т. 60. – В.5. – С. 889–897.
2. ARC classifies radiofrequency electromagnetic fields as possibly carcinogenic to humans. WHO press release №208. URL: www.iarc.fr/en/mediacentre/pr/2011/pdfs/pr208_E.pdf
3. Huber R. Radio frequency electromagnetic field exposure in humans: Estimation of SAR distribution in the brain, effects on sleep and heart rate

/ R. Huber // Bioelectromagnetics, 2003. – 24(4). – P. 262-276.

4. Achudume, A. Induction of oxidative stress in male rats subchronically exposed to electromagnetic fields at non-thermal intensities / J. Electromagnetic Analysis and Applications - 2010. - 2(8) - P. 482-487.

5. Баркин В. В., Лабынцева О. М., Ананьева Ю. Е., и др. Влияние модуляции на биологические эффекты низкоинтенсивного электромагнитного излучения различной частоты // Человек и электромагнитные поля. Сб. докладов IV международной конференции. – Саров: РФЯЦ-ВНИИЭФ, 2014. – С. 128–139.

6. Хейфец Л. Б., Абалакин Л. Б. Разделение форменных элементов крови человека в градиенте плотности верографина-фиколлы. // Лабораторное дело, 1973. – № 10. - С. 579–581.

7. Шпакова А. П., Павлова К. С., Бульчева Т. И. МТТ-колориметрический метод определения цитотоксической активности естественных киллерных клеток // Клиническая лабораторная диагностика – 2000. – № 2. – С. 20–23.

8. Свирновский А. И., Шелег С. В. и др. Методы оценки структурно-функционального состояния лимфоцитов периферической крови. Методические рекомендации. Минздрав республики Беларусь, 2000, рег. № 173-0012

9. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. // Киев, Морион. – 2000. – 319 с.

10. Гланц С. Медико-биологическая статистика // – М.: Практика, 1999. – 459 с.

11. Haigis M. C., Yankner B. A. The aging stress response. //Mol.Cell. – 2010. – V. 40, № 2. – P. 333–344.

12. Альбертс Б. Молекулярная биология клетки. – М.: Ин-т комп. исследований, 2013. – Т. 1.

13. Nikolova T., Czyz J., e.a. Electromagnetic fields affect transcript levels of apoptosis-related genes in embryonic stem cell-derived neural progenitor cells // FASEB J.- 2005. – V.19.- P.1686–1688.

14. Ярилин А. А. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии // В кн: Актуальные проблемы патофизиологии. – М., 2001. – С.13–56.