

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ КОМБИНАЦИИ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И АКУСТИЧЕСКОГО СИГНАЛА НА АПОПТОЗ КЛЕТОК КРОВИ

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

ФГУП «РФЯЦ-ВНИИЭФ», г. Саров

Введение

В настоящее время биологические системы подвергаются воздействию большого числа факторов окружающей среды, многие из которых обладают потенциально цитотоксическими, генотоксическими и канцерогенными свойствами сами по себе или в комбинации.

Исследования стабильности изменений, индуцированных действием электромагнитного излучения нетепловой интенсивности во времени, наличия накопительного эффекта, роли модуляции имеют большое значение при разработке средств и методов защиты от неионизирующих излучений [1, 2]. Большинство исследований, посвящённых этим проблемам, выполнены на культурах клеток *in vitro*.

Для нормального функционирования клетки в условиях непрерывного действия техногенных факторов необходима достаточно надёжная система поддержания стабильности клеточного генома. Согласно современным представлениям, существует два механизма поддержания такой стабильности: репарация – восстановление повреждённых ДНК и апоптоз – генетически программируемая гибель клетки [3]. Большинство повреждений ДНК, возникающих вследствие действия различных факторов, успешно ликвидируются системой репарации, которая обеспечивает структурную целостность генома.

В связи с «электромагнитным загрязнением окружающей среды» актуальным является изучение основных процессов регуляции функциональной активности клеток

организма после действия сложномодулированного электромагнитного излучения (ЭМИ).

Целью данной работы являлось исследование биологического действия ЭМИ, акустического воздействия и комбинированного их действия на темпы клеточного обновления (апоптоза клеток крови).

Материалы и методы исследования

В данной работе исследовали влияние нетеплового (пиковая плотность потока энергии 85 мкВт/см^2) импульсно-модулированного электромагнитного излучения (ЭМИ), акустического воздействия (АС) звукового диапазона (до 90 дБ), и их комбинации (ЭМИ+АС) на показатели программируемой клеточной гибели (апоптоза) у лабораторных животных *in vivo*.

Источником ЭМИ служила экспериментальная радиотехническая система, воздействие оказывали ЭМИ частотой 2450 МГц. В эксперименте использовали белых беспородных крыс-самцов в количестве 48 особей, массой 200–220 граммов, разделённых на группы в зависимости от характера воздействия. Показатели апоптоза оценивали через 10 минут и на 4-е сутки после соответствующего воздействия.

Образцы крови забирали из подъязычной вены животных в микропробирки с гепаринатом лития в конечной концентрации 50 ЕД/мл крови. Для последующих работ выделяли ядерные клетки крови в градиенте фикола по методу [4], концентрацию вы-

деленных клеток доводили до 5×10^5 на 1 мл суспензии.

Уровень апоптоза оценивали морфологически после 24-часового культивирования в иммунологических планшетах при 37°C в питательной среде без тестирующей нагрузки, по модифицированной методике [5]. Количественно определяли содержание клеток с признаками апоптоза (маргинация, конденсация и фрагментация хроматина в ядре), с использованием ДНК-специфичного флуорохрома акридинового оранжевого и флуоресцентного микроскопа «Ахио» (Германия). Для каждого животного анализировали не менее трех повторностей, учитывали не менее 200 клеток для каждой повторности. Пример клетки с признаками апоптоза представлен на рис. 1.

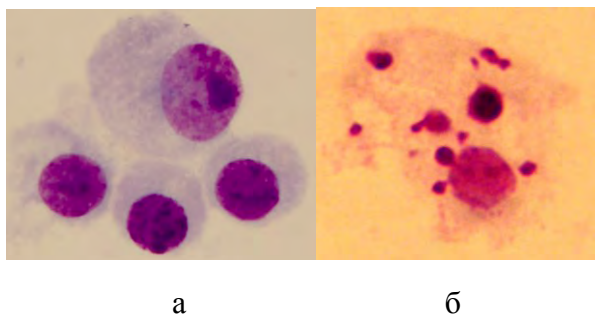


Рис. 1. Микрофотографии апоптоза лимфоцитов периферической крови человека.

а) нормальная клетка; б) клетка с апоптотическим ядром. Окраска азур-эозином по Романовскому, увеличение 10×100 , масляная иммерсия. Приводится по [6].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента, а также критерия Уилкоксона – при распределении, отличном от нормального. Значимыми считали различия при уровне $p \leq 0,05$ [7, 8]. Действие различных экспериментальных факторов на клеточно-молекулярные показатели оценивали по значению индекса эффекта (ИЭ), которое рассчитывали по формуле:

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

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

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

Результаты исследования

Процентное содержание лимфоцитов с морфологическими признаками апоптоза в группах животных, подвергавшихся действию ЭМИ, АС и комбинации ЭМИ+АС, а также в контрольной группе, представлено в табл. 1 и на рис. 2. В ходе оценки программируемой клеточной гибели во всех исследуемых группах было проанализировано 37033 клеток.

После 24-часовой инкубации в питательной среде в контрольной группе животных доля лимфоцитов с морфологическими признаками апоптоза составила около 15,5 %, что является физиологической нормой и соответствует литературным данным [9,10]. Сразу после воздействия модифицирующий эффект ЭМИ проявлялся незначимо. В отсроченный период после воздействия во всех экспериментальных группах показаны однонаправленные значимые изменения картины апоптоза: на 4-е сутки после действия ЭМИ, акустического сигнала и их комбинация (ЭМИ + АС) установлено повышение уровня апоптоза по сравнению с контролем: в 1,6 ($p \leq 0,01$); 1,4 ($p \leq 0,01$) и 1,8 ($p \leq 0,001$) раза соответственно. Таким образом, наиболее выраженные различия отмечены при использовании комбинации двух факторов (ЭМИ + АС), а при сравнении биоэффектов от моно воздействий использование ЭМИ оказалось более эффективным (рис. 2).

Влияние низкоинтенсивного ЭМИ на регуляцию клеточного цикла и апоптоз в различных тканях организма вызывает широкий научный и практический интерес [11, 12]. Большинство авторов подтверждают повышение числа клеток с признаками апоптоза при длительном многократном действии нетеплового ЭМИ радиочастотного диапазона.

Процент апоптоза в клетках крови лабораторных животных контрольной и экспериментальных групп

Группа животных	Количество животных	Количество просмотренных клеток	Уровень апоптоза, % M ± m
Мнимое воздействие	21	10296	15,47±0,81
ЭМИ (через 10 минут)	12	7240	16,13±1,12
ЭМИ (на 4-е сутки)	12	6033	25,1±2,52**
АС (на 4-е сутки)	12	6815	21,3±1,57**
ЭМИ+АС (на 4-е сутки)	12	6649	27,2±2,03***

** – значимое отличие от среднего значения в контроле, $p \leq 0,05$
 *** – значимое отличие от среднего значения в контроле, $p \leq 0,001$

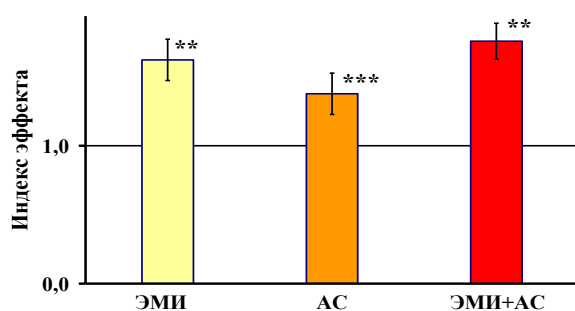


Рис. 2. Изменение уровня апоптоза в клетках крови животных (по индексу эффекта). За 1,0 принят уровень апоптоза в контроле

Одним из биохимических проявлений, характеризующих апоптоз клеток в отличие от других форм клеточной гибели, является фрагментация ядерной ДНК и конденсация хроматина. Время, требуемое апоптотической клетке для формирования фрагментов ДНК, зависит от состояния организма, типа клетки, а также от вида индуцирующего воздействия. В нашем случае повышенный уровень апоптоза в отсроченный период можно рассматривать как следствие постепенного накопления повреждений ДНК, индуцированных физическими факторами разной природы, и сниженной способности клеток к репарации возникающих повреждений. С другой стороны, повышенный уровень апоптоза отражает нарушение регуляции генетических программ пролифе-

рации и дифференцировки клеток, что может вызвать развитие в организме дегенеративных процессов и является неблагоприятным признаком [13].

Таким образом, в ходе данного эксперимента показано, что комбинация ЭМИ и акустического сигнала вызывает более выраженное угнетение репарации ДНК и запуск процессов апоптоза по сравнению с действием ЭМИ и акустики по отдельности.

Выводы

Установлено, что действие сложно-модулированного нетеплового ЭМИ, акустического сигнала и их комбинации приводило к сдвигам в функциональном состоянии организма на клеточно-молекулярном уровне. Отмечен значимый рост числа клеток крови с признаками апоптоза при комбинации факторов электромагнитной и акустической природы. Показано, что биотропность комбинированного воздействия ЭМИ и звука превышает таковую при моно воздействии данных факторов.

Список литературы

1. Леднев В. В. Биоэффекты слабых комбинированных, постоянных и переменных магнитных полей // Биофизика. 1996. Т. 41. Вып.1. С. 224–232.

2. Григорьев Ю. Г. Электромагнитные поля сотовых телефонов и здоровые под-ростки // Радиационная Биология. Радиозэкология. 2005. Т.45, № 4. С.442-450.
3. Копнин Б. П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза (обзор) // Биохимия, 2000, т.65, № 1, с. 5-34.
4. Хейфец Л. Б., Абалакин Л. Б. Разделение форменных элементов крови человека в градиенте плотности верографина-фиколла. // Лабораторное дело, 1973. – № 10. – С. 579–581.
5. 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.
6. Ингель Ф. И., Хусаинова Ш. Н., Косдаулетова Г. А., Кривцова Е. К. Радиочувствительность и адаптивный ответ лимфоцитов крови детей, постоянно проживающих на территории экологического бедствия в регионе Аральского моря // VII съезд по радиационным исследованиям, тезисы докладов. // Москва: изд-во РУДН, 2014. С. 74.
7. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. // Киев, Морион. – 2000. – 319с.
8. Гланц С. Медико-биологическая статистика // – М.: Практика, 1999. – 459 с.
9. Boreham D. R., Gale K. L., Maves S. R., Walker J-A. and Morrison D. P. Radiation-induced apoptosis in human lymphocytes: potential as a biological dosimeter // Health Physics Society. – Nov.1996. – V.71. – N5. – P. 685–691.
10. Boreham D. R., Gale K. L., Maves S. R., Walker J-A. and Morrison D. P. Radiation-induced apoptosis in human lymphocytes: potential as a biological dosimeter // Health Physics Society. –Nov.1996. – V.71. – N5. – P.685-691.
11. Santini M. T., Ferrante A., Rainaldi G., Indovina P. L. Extremely low frequency (ELF) magnetic fields and apoptosis: a review // Int.J. Radiat.Biol., 2005. – V.81.-N1.– P. 1–11
12. Tian-Yong Zhao, Shi-Ping Zou, and Pamela E. Knapp Exposure to Cell Phone Radiation Up-Regulates Apoptosis Genes in Primary Cultures of Neurons and Astrocytes // Neurosci Lett. – 2007. – Jan 22. – 412 (1). – P. 34–38
13. Ярилин А. А. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии. // В кн: Актуал. проблемы патофизиологии – М., 2001. – С. 13–56.