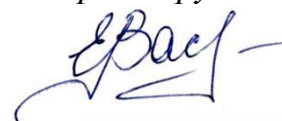


Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
профессионального образования
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Н. БУРДЕНКО»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи



Богачева Елена Васильевна

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ МЕТРОВОГО ДИАПАЗОНА
ДЛИН ВОЛН НА $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ОБМЕН В ИЗОЛИРОВАННОМ СЕРДЦЕ КРЫСЫ

03.01.02. Биофизика.

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор В.В. Алабовский

Воронеж – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

Перечень сокращений, условных обозначений и терминов.....	5
Введение.....	6
Глава 1 Влияние электромагнитных полей радиочастотного диапазона и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмен в сердце (обзор литературы)	12
1.1 Общая характеристика радиочастотных электромагнитных полей... 12	
1.2 Биофизические механизмы действия электромагнитных полей радиочастотного диапазона.....	14
1.3 Основные методы численной дозиметрии электромагнитных полей радиочастотного диапазона.....	23
1.4 Молекулярная организация, биологическая роль и регуляция Ca^{2+} в сердце.....	25
1.5 Особенности влияния радиочастотных электромагнитных полей на состояние и транспорт ионов Ca^{2+} в клетках.....	29
1.6 Влияние электромагнитных полей на процессы перекисного окисления липидов.....	31
Глава 2 Материалы и методы исследования	36
2.1 Объекты исследования.....	36
2.2 Методы измерения интенсивности электромагнитных полей и оценка величины поглощения электромагнитной энергии в исследуемых объектах.....	37
2.3 Методика перфузии изолированного сердца крысы и регистрации Na^+ -зависимых потоков Ca^{2+} в процессе $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена.....	41
2.4 Методика выделения культуры кардиомиоцитов крыс и методика определения концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в цитозоле клеток миокарда.....	45
2.5 Методика определения продуктов перекисного окисления липидов и общей антиоксидантной активности в периферической крови крыс	48
2.6. Методы статистической обработки данных	50
Глава 3 Влияние электромагнитных полей на процессы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в изолированном сердце крысы.....	52

3.1 Влияние повторения циклов активации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в изолированном сердце контрольной группы крыс на скорость и количество поглощаемого и высвобождаемого Ca^{2+}	52
3.2 Численное моделирование условий экспозиции и оценка поглощения электромагнитной энергии изолированным сердцем крысы.....	56
3.3 Динамика процесса $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в интактном изолированном сердце крысы в процессе облучения электромагнитным полем метрового диапазона.....	58
3.4 Динамика процесса $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в интактном изолированном сердце крысы после облучения электромагнитным полем метрового диапазона.....	62
Глава 4 Влияние электромагнитного поля на уровень свободного $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в изолированных кардиомиоцитах крысы в зависимости от состояния перекисного окисления липидов	68
4.1 Определение концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в интактных изолированных кардиомиоцитах крысы.....	70
4.2 Изменение уровня $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в изолированных кардиомиоцитах крысы при действии электромагнитного поля	71
4.3 Влияние ингибитора перекисного окисления липидов гистохрома на содержание $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в кардиомиоцитах крысы при действии электромагнитного поля	74
Глава 5 Оценка уровня перекисного окисления липидов в сыворотке крови крыс при действии электромагнитного поля	79
5.1 Моделирование и экспериментальная оценка условий экспозиции крыс и величины поглощенной ими энергии электромагнитного поля..	79
5.2 Содержание малонового диальдегида в сыворотке периферической крови крыс при воздействии электромагнитного поля в зависимости от интенсивности и времени экспозиции	87

5.3 Влияние продолжительности экспозиции электромагнитным полем на содержание диеновых конъюгатов и кетодиенов в сыворотке крови крыс	90
5.4 Исследования влияния электромагнитного поля на общую антиоксидантную активность лабораторных животных	94
Заключение	96
Выводы	99
Список использованных источников	100

**ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ,
УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И ТЕРМИНОВ**

АОА	– антиоксидантная активность
АФК	– активная форма кислорода
ГПО	– глутатионпероксидаза
ДК	– диеновые конъюгаты
КД	– кетодиены
МДА	– малоновый диальдегид
Метод КРВО	– метод конечных разностей во временной области
ПОЛ	– перекисное окисление липидов
ППЭ	– плотность потока энергии
СВЧ	– сверхвысокая частота
СОД	– супероксиддисмутаза
СР	– саркоплазматический ретикулум
УПМ	– удельная поглощенная мощность
ЭМП	– электромагнитное поле
ЭР	– эндоплазматический ретикулум
CUDA	– Compute Unified Device Architecture (программно-аппаратная архитектура параллельных вычислений)
E	– напряженность электрического поля
GSM	– глобальный стандарт цифровой мобильной сотовой связи (англ. аббр. Global System for Mobile Communications)
H	– напряженность магнитного поля
TETRA	– стандарт магистральной наземной радиосвязи (англ. аббр. TErrestrial Trunked RAdio)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В связи с быстрорастущим антропогенным уровнем электромагнитных полей (ЭМП), по сравнению с фоновым, активно изучается их действие на живые организмы в широком диапазоне частот от 3 Гц до 300 ГГц. Вместе с этим основное внимание уделяется микроволновой части электромагнитного спектра, тогда как метровый диапазон длин волн (от 30 до 300 МГц), несмотря на активное его использование, остается в стороне от основных направлений медико-биологических исследований. Современный уровень таких исследований складывается из нескольких направлений: изучение механизмов поглощения и распределения энергии ЭМП в биологическом объекте, а также количественная оценка и верификация механизмов биологических эффектов.

Следует отметить, что именно эта часть диапазона ЭМП в соответствии с действующими в настоящее время российскими гигиеническими нормативами и стандартами безопасности практически всех зарубежных стран считается наиболее неблагоприятной по сравнению с другими частотами [28].

Сложность оценки биологических эффектов и изучения биофизических механизмов действия ЭМП ниже порога теплового действия определяется многообразием и сложностью наблюдаемых эффектов на различных уровнях организации биологического объекта. В связи с отсутствием понимания характера действия ЭМП, в том числе и на функционирование регуляторных систем биологического объекта, до сих пор не сформулированы четкие закономерности возможных биологических эффектов ЭМП [34]. Таким образом, специфика взаимодействия ЭМП метрового диапазона с биологическими объектами, которая складывается из характера поглощения энергии поля и соответствующей биологической реакции, в условиях экспозиции, в настоящее время изучена недостаточно.

Устройства, работающие посредством энергии ЭМП, зачастую используются вблизи жизненно важных органов (например, головы, сердца), а также могут оказывать потенциально негативное влияние на функциональные системы (сердечно-сосудистую, иммунную и пр.) организма. Вместе с этим появились публикации, рассматривающие изменения функционирования сердечно-сосудистой системы при воздействии ЭМП радиочастотного диапазона, которые приводят к развитию различных нарушений [17, 19, 22, 31, 69, 106]. В настоящее время в структуре общей заболеваемости и смертности человека одно из первых мест занимают болезни сердечно-сосудистой системы [8]. Несмотря на достаточно большой объем исследований, отмечающих высокий уровень устойчивости физиологических функций сердечно-сосудистой системы к влиянию внешних факторов среды, литературных данных, посвященный оценке влияния ЭМП метрового диапазона на сердце не достаточно. В связи с этим особый интерес вызывает изучение влияния ЭМП на процесс электромеханического сопряжения в сердечной мышце.

Основной функцией сердечной мышцы является обеспечение тока крови по кровеносным сосудам посредством постоянного ритмичного сокращения. Важную роль в сократительной активности сердца играет процесс поступления и удаления свободных ионов Ca^{2+} в кардиомиоцитах [35]. Одним из важнейших регуляторов транспорта ионов Ca^{2+} является система $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена [134]. Обменные Na^+/K^+ и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ системы клеток в последнее время стали рассматриваться как универсальные и чувствительные мембранные индикаторы внешних электромагнитных воздействий [62]. Вместе с тем механизм регуляции концентрации ионов Ca^{2+} в клетках связан с усилением процесса образования продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), продуцирование которых увеличивается в условиях ишемии/реперфузии сердца приводя к функциональным нарушениям работы сердечной мышцы [36].

Таким образом, поддержание внутриклеточного гомеостаза Ca^{2+} посредством транспортной функции $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена является важным биофизическим механизмом в сократительной функции сердца, в том числе с учетом влияния ЭМП. Для изучения особенностей биологического действия ЭМП метрового диапазона целесообразно использование общепринятой модели изолированного сердца крысы, которая с минимальной погрешностью позволяет оценить систему Na^+ -зависимого транспорта ионов Ca^{2+} как в процессе облучения, так и после воздействия.

Цель и задачи исследования: исследовать влияние электромагнитных полей метрового диапазона длин волн на процессы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в миокарде изолированного сердца крысы.

Для реализации поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Оценить количество поглощенной электромагнитной энергии метрового диапазона в целой крысе и ее изолированном сердце методами математического моделирования.
2. Исследовать влияние электромагнитного поля метрового диапазона на характер транспорта ионов Ca^{2+} при активации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена изолированного сердца крысы.
3. Изучить динамику внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} в изолированных кардиомиоцитах крыс в условиях влияния электромагнитных полей метрового диапазона.
4. Исследовать процессы перекисного окисления липидов и общей антиоксидантной активности при различных условиях облучения крыс электромагнитным полем метрового диапазона.
5. Оценить влияние перекисного окисления липидов на процессы внутриклеточной регуляции Ca^{2+} в кардиомиоцитах при воздействии электромагнитного поля метрового диапазона.

Научная новизна результатов исследования.

1. Впервые изучено влияние электромагнитного поля метрового диапазона длин волн на процесс $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в изолированном сердце крысы. Установлено, что процесс облучения сопровождается ослаблением натрий – зависимой аккумуляции Ca^{2+} сердцем одновременно с возрастанием выхода Ca^{2+} с учетом данных о поглощении электромагнитной энергии в миокарде.
2. Впервые получены данные о возрастании концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в культуре кардиомиоцитов при действии электромагнитного поля метрового диапазона.
3. Установлена способность антиоксиданта гистохрома снижать внутриклеточный уровень Ca^{2+} кардиомиоцитов,
4. Впервые отмечено свойство антиоксиданта гистохрома понижать уровень внутриклеточного кальция в изолированных кардиомиоцитах в условиях воздействия электромагнитным полем метрового диапазона.
5. Показан рост концентрации продуктов перекисного окисления липидов при увеличении времени экспозиции животных электромагнитным полем метрового диапазона длин волн и удельной поглощенной мощности со снижением общей антиоксидантной активности.
6. Осуществлена оценка количества поглощенной электромагнитной энергии метрового диапазона целой крысой, а также изолированным сердцем методом математического моделирования.
7. Установлено, что активация процесса перекисного окисления липидов в целом организме преимущественно зависит от времени экспозиции. Уровни облучения и количество удельной поглощенной мощности имеют меньшее значение для прооксидантного действия ЭМП.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные в работе новые научные данные, касающиеся особенности влияния ЭМП на $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмен в сердце необходимы для понимания механизмов взаимодействия электромагнитного поля ниже порога теплового

действия с живыми объектами, с учетом поглощения электромагнитной энергии в условиях облучения *in vivo* и *in situ*. Предполагается использование результатов при разработке и экспериментальном обосновании гигиенических стандартов безопасности, а также для использования в физиотерапии.

Положения, выносимые на защиту:

1. Электромагнитное поле метрового диапазона нарушает баланс $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена, снижая натрий-зависимую скорость поглощения и увеличивая скорость выхода ионов Ca^{2+} из изолированного сердца крысы.
2. Электромагнитное поле метрового диапазона вызывает увеличение концентрации ионов Ca^{2+} внутри изолированных кардиомиоцитов.
3. Активирующее воздействие электромагнитного поля метрового диапазона на процессы перекисного окисления липидов вызывает снижение общей антиоксидантной защиты, что способствует выходу ионов Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума в цитоплазму.
4. Активация процесса перекисного окисления липидов в целом организме преимущественно зависит от времени экспозиции. Уровни облучения и количество удельной поглощенной мощности имеют меньшее значение для прооксидантного действия ЭМП.

Личный вклад соискателя. Соискателем самостоятельно обрабатывались литературные источники, проведена большая часть экспериментальной работы, выполнен анализ и обобщение результатов, проведена статистическая и математическая обработка данных. Совместно с научным руководителем подготавливались публикации по результатам исследований и выполнялось планирование эксперимента. Постановка эксперимента с использованием методик перфузии изолированного сердца по методу Лангендорфа проводилась совместно с ассистентами кафедры «Биохимия» ГБОУ ВПО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко А.А. Винокуровым и О.В. Масловым. Постановка эксперимента с использованием *in vitro* модели

колоний сокращающихся кардиомиоцитов проводилась совместно с руководителем группы цитоанализа ИЭФБ РАН к.б.н. Белостоцкой Г.Б.

Апробация результатов диссертации. Результаты диссертационной работы были доложены на 17-ой, 18-ой, 19-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», г. Пущино (2013, 2014, 2015 г.г.); Международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика», г. Пущино (2013, 2014 г.); V Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов с международным участием «Окружающая среда и здоровье. Здоровая среда - здоровое наследие», г. Москва (2014 г.); VII съезде по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность), г. Москва (2014 г.); The Second International Conference of Radiation and Dosimetry in Various Fields of Research, Niš, Serbia (2014 г.).

Публикации. По материалам исследований опубликованы 23 работы, в том числе 9 статей в рецензируемых научных изданиях, включенных в перечень ВАК Минобрнауки РФ, включая 4 работы в изданиях по профилю научной специальности и 5 работ в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования.

Структура и объем работы. Текст диссертации включает введение, 5 глав, выводы и список использованных источников. Текст диссертации изложен на 119 страницах машинописного текста и включает в себя 36 рисунков, 13 таблиц и 7 формул. Список литературы содержит 177 наименований.

Глава 1 Влияние электромагнитных полей радиочастотного диапазона и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмен в сердце (обзор литературы)

1.1 Общая характеристика радиочастотных электромагнитных полей.

Распространение ЭМП осуществляется в виде электромагнитных волн, основными параметрами которых являются частота f , длина волны λ и скорость распространения c , связанные соотношением 1.1:

$$f = \frac{c}{\lambda}, \quad (1.1)$$

которое справедливо для свободного пространства, где распространение волны происходит со скоростью света $c = 3 \times 10^8$ м/с [34]. Если скорость света выражена в м/с, частота ЭМП f в МГц, то длина волны λ в метрах будет равна:

$$\lambda = \frac{300}{f}. \quad (1.2)$$

Электромагнитная волна состоит из трех взаимно перпендикулярных (в вакууме) векторов: вектора напряженности электрического поля \vec{E} , вектора напряженности магнитного поля \vec{H} , и вектора Умова-Пойнтинга \vec{K} , в направлении которого происходит распространение волны.

Распространяющаяся в свободном пространстве электромагнитная волна, если ее векторы \vec{E} и \vec{H} лежат в плоскости, перпендикулярной направлению распространения, носит название поперечно-поляризованной волны, или плоской поперечной волны, или просто плоской волны и обозначается как ТЕМ-волна (по первым буквам английских слов Transverse, Electric, Magnetic).

Перенос энергии электромагнитной волной происходит в направлении распространения и определяется вектором Умова-Пойнтинга \vec{K} , который перпендикулярен векторам \vec{E} и \vec{H} . Величина вектора \vec{K} показывает, какое количество энергии излучения переносится за единицу времени через

площадку, равную единице площади, расположенной нормально к направлению распространения электромагнитной волны.

В соответствии с Международным регламентом радиосвязи классификация участка электромагнитного спектра ЭМП по диапазонам частот и длинам волн приведена в таблице 1.1. К диапазону радиочастот относятся ЭМП с частотой от 100 кГц до 300 ГГц. Различают два наиболее часто встречающихся типа электромагнитных колебаний:

- гармонические, где \vec{E} и \vec{H} составляющие изменяются по закону синуса или косинуса;
- модулированные, где амплитуда, частота или фаза дополнительно, медленно, по сравнению с периодом этих колебаний, изменяются по определенному закону.

Таблица 1.1

Классификация ЭМП по диапазонам частот и длинам волн в соответствии с Международным регламентом радиосвязи [51]

№ диа-пазона	Диапазоны частот	Обозначение длин волн	Длины волн	Наименование длин волн
I	3-30 Гц	крайне низкие частоты	10^5-10^4 км	Декаметровые
II	30-300 Гц	сверхнизкие частоты	10^4-10^3 км	Мегаметровые
III	0,3-3 кГц	инфранизкие частоты	10^3-10^2 км	Гектокилометровые
IV	3-30 кГц	очень низкие частоты	100-10 км	Мириаметровые
V	30-300 кГц	низкие частоты	10-1 км	Километровые
VI	0,3-3 МГц	средние частоты	1-0,1 км	Гектометровые
VII	3-30 МГц	высокие частоты	100-10 м	Декаметровые
VIII	30-300 МГц	очень высокие частоты	10-1 м	Метровые
IX	0,3-3 ГГц	ультравысокие частоты	1-0,1 м	Дециметровые
X	3-30 ГГц	сверхвысокие частоты	10-1 см	Сантиметровые
XI	30-300 ГГц	крайне высокие частоты	10-1 мм	Миллиметровые
XII	300-3000 ГГц	гипервысокие частоты	1-0,1 мм	Децимиллиметровые

Основные методы измерения уровней электромагнитных полей радиочастотного диапазона. Интенсивности ЭМП определяются путем регистрации таких характеристик электромагнитной волны как напряженность электрического (E) и магнитного (H) полей (единицы измерения В/м и А/м, соответственно) в ближней зоне источников излучения,

а также плотность потока энергии (ППЭ), имеющей размерность Вт/м^2 , в дальней зоне электромагнитной волны [68]. На практике, как правило, E и H оцениваются для ЭМП с частотой менее 300 МГц, а ППЭ - для частот выше 300 МГц [52]. Инструментальные методы измерения напряженности электрического поля основаны на применении дипольных антенн (диполей) в качестве первичных преобразователей, размеры которых малы по сравнению с длиной электромагнитной волны. Для измерения напряженности магнитного поля используются рамочные антенны, размеры которых также малы по сравнению с длиной волны.

1.2 Биофизические механизмы действия электромагнитных полей радиочастотного диапазона.

Взаимодействие ЭМП с биологическими объектами осуществляется путем наведения внутренних полей и электрических токов, величина и распределение которых в теле человека и животных зависит от целого ряда параметров. К таким параметрам относятся размер, форма, анатомическое строение тела, электрические и магнитные свойства тканей (электрическая/магнитная проницаемость и электрическая/магнитная проводимость), ориентация объекта относительно поляризации векторов ЭМП, а также от характеристик ЭМП (частота, интенсивность, модуляция и др.). Исходя из того, что биологический объект обладает диэлектрическими свойствами и характеризуется зависимостью от частоты ЭМП в определенных областях (то есть обладает диэлектрической дисперсией), в основе поглощения энергии главную роль играет электрическая составляющая. Поглощение энергии ЭМП в тканях определяется главным образом двумя процессами: колебанием свободных зарядов и колебанием дипольных моментов с частотой воздействующего поля, то есть их поворотом и релаксацией. Первый эффект приводит к возникновению токов проводимости и связанными с электрическим сопротивлением среды

потерями энергии (потери ионной проводимости), тогда как второй процесс приводит к потерям энергии за счет трения дипольных молекул в вязкой среде (диэлектрические потери). На низких частотах основной вклад в поглощение энергии ЭМП вносят потери, связанные с ионной проводимостью. Ионная проводимость возрастает с ростом частоты поля до $10^6 - 10^7$ Гц в связи с уменьшением емкостного сопротивления мембран и с все большим участием внутриклеточной среды в общей проводимости, что ведет к увеличению поглощения энергии. При дальнейшем увеличении частоты ионная проводимость среды остается практически постоянной, а поглощение энергии продолжает увеличиваться за счет потерь на вращение дипольных молекул среды, главным образом, молекул воды и белков [65].

Первичные механизмы действия поглощенной энергии на молекулярном, субклеточном, клеточном уровнях изучены слабо. И.Г. Акоевым с соавторами описаны имеющиеся данные по влиянию ЭМП на клеточные мембраны, структуру некоторых белков, электрическую активность нейронов [1, 2]. Электрические свойства электролитов, начиная с частоты от нескольких до десятков МГц, изменяются, также внося свою долю в поглощение энергии ЭМП клетками и тканями. Повышение проводимости и, как следствие, поглощение энергии излучения связано с процессом периодического образования и перемещения ионной атмосферы вокруг иона, движущейся под действием электрической составляющей ЭМП. Релаксационный (тормозящий) эффект электрической составляющей на движение иона в определенных частотах (эффект Дебая-Фалькенгагена) становится соизмеримым со временем релаксации ионной атмосферы, что и является причиной поглощения энергии ЭМП в этом диапазоне частот [23].

Электрические свойства тканей весьма важны для понимания механизма взаимодействия ЭМП с биологическими системами, включая биополимеры, мембраны и клетки. Такие свойства определяются двумя основными параметрами относительной диэлектрической проницаемостью ϵ и удельной проводимостью σ [88].

Существует зависимость диэлектрической проницаемости от частоты практически для всех тканей с большим содержанием воды, причем наблюдаются две основные особенности: необычно высокие значения для малых частот и три области релаксации α , β и γ для низких, средних и высоких частот соответственно. Каждая из трех областей релаксации в простейшем виде характеризуется уравнениями дебаевского типа:

$$\varepsilon = \varepsilon_{\infty} + \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_{\infty}}{1 + (\omega T)^2} \quad (1.3)$$

и

$$\sigma = \sigma_0 + (\sigma_{\infty} - \sigma_0) \frac{(\omega T)^2}{1 + (\omega T)^2}, \quad (1.4)$$

где ω - угловая частота, константы определяются по началу и концу изменений дисперсии, и T - постоянная времени. Если свойства изменяются с частотой по указанным законам, то такие свойства называются дисперсионными, а явление частотной зависимости называется дисперсионным законом. Механизм, который приводит к дисперсионному поведению, называется релаксационным механизмом.

Неоднородность структуры приводит к β -дисперсии, то есть поляризация возникает в результате заряжения мембраны: внутри- и внеклеточными жидкостями. Вращение молекул, обладающих постоянным дипольным моментом, а так же воды или белков, обуславливает γ -дисперсию. Небольшой хвост в области β -дисперсии вызывает соответствующую β_1 -дисперсию белков. Тканевые белки несколько поднимают высокочастотный участок β -дисперсии. Эффект β_1 -дисперсии вызываемый тканевыми белками мал по сравнению с эффектом Максвелла-Вагнера и проявляется на больших частотах. Субклеточные структуры такие как митохондрии, клеточные ядра и другие субклеточные органеллы также вносят вклад в β -дисперсию. Эти структуры по размерам меньше окружающих их клеток. Следовательно, их частоты релаксации выше, но суммарный диэлектрический вклад меньше. В результате они также вносят вклад в β -дисперсию (β_1) [55].

Область γ -дисперсии связана с водой и ее релаксационными свойствами на частотах около 20 ГГц. Небольшая дополнительная релаксация (δ) между областями β и γ связана, вероятно, с вращением аминокислот, частичным вращением заряженных боковых групп белков и релаксацией связанной с белками воды, которая наблюдается в области 300 - 2000 МГц [56].

В таблице 1.2 приведены характеристические частоты для разных механизмов релаксации при переходе от одного биологического объекта к другому. Отметим, что имеются существенные вариации, зависящие от размеров клеток и других факторов. Однако, область γ - дисперсии жестко связана с одной частотной областью.

Таблица 1.2.

Характеристические частоты, регистрируемые в биологическом материале, в случае эффектов α -, β - и γ -дисперсий (ориентировочно) по [149]

Дисперсия	Частотный диапазон, Гц
α	$1 - 10^4$
β	$10^4 - 10^8$
δ	$10^8 - 10^9$
γ	$2 \cdot 10^9$

В таблице 1.3 показано, какой уровень биологической организации связан с тем или иным механизмом релаксации [147]. Для электролитов характерно наличие только области γ -дисперсии, связанной с водой. Биологические макромолекулы в воде добавляют к γ -дисперсии область δ -дисперсии. Белки и нуклеиновые кислоты дополнительно добавляют области β - и α -области дисперсии, что обсуждалось выше. Суспензии клеток, свободные от белка и везикул, включают β -дисперсию Максвелла-Вагнера и γ -дисперсию воды.

Электрические релаксационные эффекты
различных биологических систем, по [149]

Биологические объекты и системы	Релаксационные эффекты (дисперсии)
вода и электролиты	γ
биологические макромолекулы:	
- аминокислоты	$\delta + \gamma$
- белки	$\beta + \delta + \gamma$
- нуклеиновые кислоты	$\alpha + \beta + \delta + \gamma$
клеточные системы:	
- везикулы без поверхностного заряда	$\beta + \gamma$
- с поверхностным зарядом	$\alpha + \beta + \gamma$
- клетки, свободные от белка	$\beta + \gamma$
- с белками	$\beta + \beta_1 + \gamma$
- с поверхностным зарядом	$\alpha + \beta + \gamma_1$
- с релаксирующими мембранами	$\alpha + \beta + \gamma$
- связанные с другими мембранами	$\alpha + \beta + \gamma_1$
- несвязанные	$\beta + \beta_1 + \gamma$

Мембраны ответственны за диэлектрические свойства тканей и клеток преимущественно на высоких частотах и исследования привели к пониманию их роли в поляризационных процессах [145]. Основным механизмом, обуславливающим диэлектрическую поляризацию, состоит в накоплении мембранами зарядов из внешней и внутриклеточной жидкостей [148].

Соответствующая математическая теория основана на обобщении уравнений, выведенных Дж. Максвеллом для сферических клеток и Дж.У. Рэлеем для цилиндрических клеток, ориентированных перпендикулярно направлению поля. Общее решение для суспензии сферических частиц, окруженных оболочкой, было найдено Максвеллом, и оно сводится к уравнениям, которые описывают случай, типичный для биологических клеток.

Диэлектрические свойства клеток и тканей были изучены и в области сверхвысоких частот (СВЧ). Диэлектрическое поведение тканей и суспензий клеток в области СВЧ преимущественно определяется дисперсионными свойствами воды. Из анализа свойств этих систем на высоких частотах

следует, что мембраны клеток не дают заметного вклада в ток через клеточное пространство на частотах 100-300 МГц [147].

Взаимодействие электромагнитных полей с биологическими объектами. Биологическое действие ЭМП радиочастотного диапазона складывается из взаимодействия электромагнитной энергии с системами, органами, тканями, клетками и молекулами организма объекта экспозиции, определяемое поглощением и распределением энергии поля, которые и дают характер и направленность ответных реакций [41, 43, 53, 115, 137, 146, 165].

Биологическое действие ЭМП метрового диапазона длин волн обладает определенной спецификой взаимодействия с объектом экспозиции и, как следствие, особенностями биологических эффектах облучения. Особого внимания заслуживает то факт, что наибольшая часть систематических исследований по изучению особенностей биологического действия ЭМП метрового диапазона длин волн была выполнена преимущественно в 1960-1970 гг. Вместе с этим, в настоящее время широко распространены устройства оперативной связи, которые работают в метровом диапазоне частот, например, работающие по цифровому мобильному радио-стандарту TETRA [45, 83, 84].

В более поздних отдельных исследованиях рассматривались лишь частные аспекты влияния ЭМП метрового диапазона, и не обращалось внимания на специфику поглощения и распределения энергии излучения в биологических объектах, которая проявляется в результате сопоставимости линейных размеров объектов и длины электромагнитной волны [118]. Последнее способствует селективному поглощению электромагнитной энергии возникновение биологических эффектов, механизм которых еще до конца не выявлен.

По имеющимся данным, приведенным в работах [6, 54, 86, 107, 121, 126, 142, 156], результаты изучения реакций со стороны системы крови на воздействие ЭМП весьма противоречивы. При облучении крыс по 2 часа в день в течение 2 месяцев ЭМП частотой 13 МГц при интенсивности 500 В/м

в непрерывном и модулированном режимах, в работе [29] установили более выраженный эффект со стороны крови при модулированном поле. В случае облучения немодулированного ЭМП в крови крыс отмечалось повышение ретикулоцитов, общего числа лейкоцитов за счет сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов, тогда как содержание эозинофилов было снижено. При анализе состава крови, облученных модулированным ЭМП, отмечали противоположный эффект: снижение содержания ретикулоцитов, общего числа лейкоцитов за счет сегментоядерных нейтрофилов и моноцитов, при одновременном повышении эозинофилов.

При экспериментальных исследованиях влияния ЭМП стандарта связи TETRA (380 МГц, удельная поглощенная мощность составляла 0,08 Вт/кг), на лейкоциты человека не были выявлены изменения в числе хромосомных aberrаций, наряду с отсутствием увеличения хроматидного обмена [61].

Однако, при ежедневном облучении кроликов по 1 - 2 часа в день на протяжении 4 месяцев в работе [24] были обнаружены обратимые изменения гематологических показателей, наблюдавшиеся при воздействии 90 В/м на частоте 150 МГц и 60 В/м - при 300 МГц. Хроническая экспозиция ЭМП частотой 100 МГц на крыс по 4 часа ежедневно в течение 97 дней при ППЭ 46 мВт/см^2 (удельная поглощенная мощность составляла $2,8 \pm 1,5 \text{ мВт/г}$) не привело к достоверным изменениям в периферической крови как у опытной, так и у ложнооблученной группы животных [155].

В последние годы также проведен ряд исследований, посвященных сравнительному анализу влияния на организм и, в первую очередь, нервную систему, непрерывных и модулированных ЭМП [114].

Данные о сравнительной эффективности модулированного и немодулированного излучения по показателям безусловно- и условнорефлекторной деятельности немногочисленны.

В литературе имеются данные, свидетельствующие о зависимости биоэффектов ЭМП как от интенсивности и длительности воздействия, так и от чувствительности оцениваемого показателя. Значение временного

параметра облучения еще более отчетливо проявляется в условиях хронического воздействия ЭМП, когда значительно более низкие по сравнению с указанными для острых облучений уровни излучения вызывают изменения безусловной- и условнорефлекторной деятельности животных [33].

Опрос профессиональных пользователей систем радиосвязи, работающих на основе стандарта TETRA (385,25 МГц, частота повторения импульсов 17,6 Гц, P=250 мВт, экспозиция 3 раза по 50 мин.) с повышенной и не страдающих повышенной индивидуальной чувствительностью, выявил отклонения со стороны центральной нервной системы в виде головных болей, повышенной усталости, снижения внимания [133].

Особенности влияния электромагнитных полей на сердечно-сосудистую систему. В последнее время проблема изучения влияния ЭМП на сердечно-сосудистую систему стала особенно актуальной в связи с особенностью эксплуатации сотовых телефонов и раций. Со стороны сердечно-сосудистой системы при действии ЭМП установлены такие изменения, как снижение артериального давления (гипотония), замедления ритма сокращения сердца (брадикардия) и замедление внутрижелудочковой проводимости [140, 163, 166].

Изучение механизмов влияния ЭМП носимых средств связи на сердечно-сосудистую систему рационально проводить на таком наиболее простом модельном объекте, как изолированное сердце. В качестве одного из таких исследований, которые, несомненно, пробудили интерес к модельным экспериментам можно считать опубликованные А.Н. Frey и Е. Seifert результаты по облучению изолированного сердца лягушки импульсами ЭМП частотой 1,425 ГГц при крайне малой величине плотности потока энергии импульсного ЭМП ($0,6 \text{ мкВт/см}^2$) [86]. При этом в опытах наблюдали достоверное увеличение частоты сердечных сокращений. Анализ литературных данных показывает, что эффекты влияния ЭМП на изолированное сердце холоднокровных и теплокровных животных

значительно отличаются в зависимости от частоты, интенсивности и режимов облучения.

В рамках комплексных экспериментальных исследований, направленных на сравнительное изучение влияния ЭМП в модулированном и немодулированном режимах на некоторые функциональные системы организма животных и модельные системы при величине удельной поглощенной мощности в пределах от 0,006 Вт/кг до 0,1 Вт/кг и времени облучения от 30 минут до круглосуточного в течение месяца исследовались реакции со стороны центральной нервной системы (поведение), сердечно-сосудистой системы (ЭКГ *in vivo*, гемодинамика изолированного по Лангендорфу сердца теплокровного), крови (цитоморфологический анализ периферической крови и костного мозга, состояние эритронов), неспецифического иммунитета (комплементарная активность сыворотки крови) и эндокринной системы (функции коры надпочечников и щитовидной железы). В условиях *in vitro* изучение проводилось на сыворотке крови (активность комплемента) и суспензии эритроцитов (резистентность) [149].

В оценке влияния ЭМП на центральную нервную систему определенный интерес представляют исследования показателей ее состояния, характеризующих процессы в нервной ткани на уровне мембран нервных клеток. Изменения этих процессов чаще рассматриваются на примере транспорта ионов Ca^{2+} через мембраны нервных клеток. Как известно, ионы Ca^{2+} обеспечивают сохранение параметров возбудимости нервной ткани [3, 11]. В литературе имеются данные, свидетельствующие о том, что ЭМП сверхнизкого диапазона частот и амплитудно-модулированные ЭМП ультравысокого диапазона частот вызывают изменения выведения из мозговой ткани ионов Ca^{2+} , которые обладают "оконным" эффектом на частотах 6-20 Гц (с максимумом на 16 Гц) при интенсивности 0,1-1 мВт/см² [47, 58, 131].

1.3 Основные методы численной дозиметрии электромагнитных полей радиочастотного диапазона.

В ходе оценки возможных биологических эффектов ЭМП возникает необходимость понимания механизмов взаимодействия энергии излучения с биологическими тканями и органами, а также с объектом в целом [159]. Значительные сложности обусловлены отсутствием корректных методов оценки в условиях *in vivo* и *in vitro*. Взаимодействие ЭМП с биологическими объектами зависит не только от его характеристик. Оно приводит к поглощению биообъектом части энергии излучения, вследствие чего существует потенциальная возможность возникновения различных эффектов облучения. Определение общего количества поглощенной биологическим объектом энергии и ее пространственное распределение входит в понятие дозиметрии ЭМП. В оценке биологического эффекта и последующих проявлений важную роль занимает его количественные характеристики, основанные на выявлении зависимостей поглощения единицей объема или массы тканей энергии излучения. Такой характеристикой количества энергии ЭМП является величина удельной поглощенной мощности (УПМ - англ. аббревиатура SAR - Specific Absorption Rate), выраженная в ваттах на килограмм (Вт/кг).

В задачи теоретической дозиметрии ЭМП являются расчетные (численные) методы определения величины УПМ в имитационных моделях, как всего биологического объекта, так и его отдельных частей (голова, торс, конечности, органы). Изначально в вычислениях использовались упрощенные модели, которые представляли исследуемый объект в виде простейших геометрических тел (сфера, эллипсоид, шар, цилиндр и др.) [157]. Однако, с развитием компьютерных технологий, которые позволили ускорить процесс расчета, были разработаны числовые модели с высоким разрешением, основанные на реальных анатомических данных, полученных с

помощью магнитно-резонансной и компьютерной томографии [60, 72, 89, 104].

Общий принцип теоретической дозиметрии состоит в численном решении уравнений Максвелла для определения величины электрической составляющей ЭМП в облучаемом объекте и вычисления УПМ. В тоже время, ограничения, накладываемые на применимость той или иной модели или метода, связанные со сложностью корректного решения уравнений, приводит к необходимости их использования в своей ограниченной области частот и условий облучения ЭМП.

В последнее время большую популярность приобрел метод конечных разностей во временной области (КРВО), предложенный в 1966 г Yee [173]. Метод КРВО является непосредственным решением уравнений Максвелла во временном интервале, где компоненты электрического и магнитного поля распределены ступенчато в пространстве сетки декартовой системы координат. Электрическая и магнитная составляющая ЭМП изменяются по конечно-разностной схеме и зависят от положения в пространстве векторного поля, который окружает компонент. Уравнения дискретизированы с помощью аппроксимации конечно-разностных уравнений второго порядка, как в пространстве, так и во времени.

Основная проблема применения метода КРВО заключается в необходимости использования мощных числовых ресурсов. Однако в настоящее время эта проблема решена при использовании специальных вычислительных систем на базе графических процессоров с архитектурой параллельных вычислений (Compute Unified Device Architecture - CUDA) [152].

Высокую эффективность этот метод имеет в тех задачах, где необходим анализа нестационарных процессов в неоднородном, анизотропном пространстве для объектов с произвольной формой границ, который и является биологический объект [158]. С помощью программ для численного моделирования решается ряд предварительных задач, связанных

с оценкой поглощения энергии на определенных моделях, имитирующих различные биологические объекты, в том числе и человека [119, 120, 160, 167].

1.4 Молекулярная организация, биологическая роль и регуляция Ca^{2+} в сердце

Роль Ca^{2+} , как регулятора физиологических процессов, протекающих в клетке, хорошо известна, как вторичного посредника, регулирующего ряд важных клеточных функций [66]. Предполагается, что нарушение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , сопровождающееся существенным повышением его концентрации в цитоплазме клетки, лежит в основе механизма клеточной гибели при целом ряде патологических состояний, таких как ишемия, аутоиммунные процессы и так далее [35]. Проникновение ионов Ca^{2+} в клетку происходит через кальциевый канал (либо потенциал-зависимый, либо рецептор-управляемый) не требует энергии, в отличие от кальциевого насоса, который транспортирует ионы Ca^{2+} из клеток и является АТФ-зависимым. Часть внутриклеточного Ca^{2+} движется к эндоплазматическому ретикулуму через кальциевый насос сарко/эндоплазматического ретикулума и высвобождается из этого «депо» посредством рецепторов [4]. Обычно поступление ионов Ca^{2+} в клетку по градиенту концентрации уравнивается его активным выведением, осуществляемым, в том числе, при участии $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в возбудимых тканях. Нарушение механизмов поддержания гомеостаза внутриклеточного Ca^{2+} , как это видно из представленной на рисунке 1.1 [35] схемы обмена иона, может стать следствием:

- нарушения биологических мембран и изменение их проницаемости для ионов;
- нарушения энергетики клетки, приводящего к истощению запасов макроэргических веществ;

- изменения функционального состояния белковых комплексов, образующих каналы для ионов Ca^{2+} .

Все эти механизмы могут приводить к усилению прохождения ионов Ca^{2+} из внеклеточной жидкости и его высвобождению из саркоплазматического ретикулаума в цитоплазму клетки.

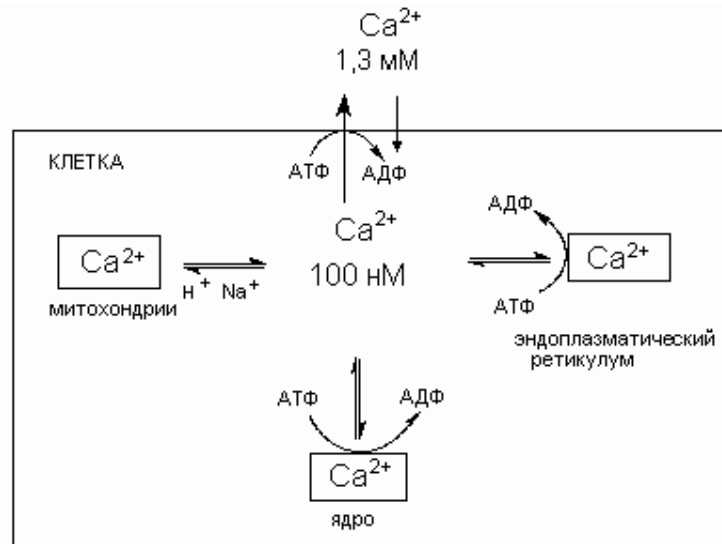


Рисунок 1.1. Схема регуляции содержания ионов кальция в цитоплазме, по [35].

Кальций взаимодействует с рядом других систем и проводящих путей, среди которых можно отметить активные формы кислорода (АФК), такие как супероксид-анион ($\text{O}_2^{\cdot-}$), перекись водорода (H_2O_2) и гидроксильные радикалы (OH^{\cdot}). АФК при умеренных уровнях представляют собой значимые сигнальные молекулы, которые широко участвуют в физиологических процессах, посредством окисленных белков, липидов и полинуклеотидов [82, 101]. Источниками АФК могут выступать как побочные продукты деятельности митохондриальной дыхательной цепи, так и немитохондриальные ферментные системы, например, НАДФН-оксидаза, ксантинооксидаза, несвязанная синтаза окисла азота, миелопероксидаза, цитохром P-450, циклооксигеназа и липоксигеназа [101, 144]. Стоит отметить, что большинство перечисленных систем могут быть модулированы кальцием.

В отличие от сигнальной системы АФК, ион Ca^{2+} существует только в одной биологически значимой форме, которая не подвергается ни катаболическому разрушению, ни анаболическому синтезу. Его способность биологического действия определяется возможностью связывания и разрушения связи с белками-мишенями, а также способностью потока ионов Ca^{2+} изменять мембранный потенциал (деполяризацию) [174].

Взаимодействие АФК и сигнальной системы ионов Ca^{2+} можно рассматривать как двунаправленное, в котором АФК могут регулировать клеточную кальциевую сигнализацию, тогда как кальциевая сигнальная система необходима для образования АФК [95]. Таким образом, увеличение концентрации ионов Ca^{2+} возбуждает АФК-генерирующие ферменты и приводит к образованию свободных радикалов. Тем не менее, общее взаимодействие и связь АФК с кальцием зависит от типов клеток и тканей. До сих пор это взаимодействие было изучено главным образом в сердечно-сосудистой системе, где сигнальные системы АФК и ионов Ca^{2+} сходятся в структурные и функциональные единицы электромеханического сопряжения миокарда [174].

Эндоплазматический ретикулум (ЭР), который образует мембранную сеть внутри клеток и служит для правильной сборки и спонтанного фолдинга образующихся белков. Для выполнения этих функций просвет ЭР обладает уникальной средой с наличием молекулярных шаперонов и ферментов фолдинга, высокой концентрацией АТФ и Ca^{2+} и, в то же время, здесь представлена окисляющая среда для формирования внутри- и межмолекулярного дисульфидного мостика. Нарушения функции ЭР инициируют процесс под названием «стресс ЭР», что представляет собой тесно скоординированный набор реакций передачи межклеточных сигналов [93, 143]. Повышение уровня АФК и резкое повышение концентрации ионов Ca^{2+} в просвете ЭР являются обычными характеристиками клеточного стресса. Что касается ранних сигналов, ведущих к стрессу ЭР, кальций является оптимальным кандидатом для быстрых и обширных изменений в

клетке. ЭР является основным внутриклеточным кальциевым «депо», содержащим приблизительно 2 ммоль общего кальция, что соответствует содержанию свободного кальция 500 мкмоль, то есть намного более высокому содержанию, чем в цитозоле [153]. Таким образом, ЭР может выступать в качестве основной буферной системы, которая действует как емкость хранения ионов кальция. Потеря ионов Ca^{2+} во время стресса ЭР опосредована активацией/экспрессией белков, участвующих в кальциевом обмене и локализованных в ЭР, а также выходом кальция в цитозоль посредством рецепторов IP_3R или RyR [77]. Таким образом, выход кальция, индуцированный АФК, может вызывать распространение кальциевых волн [71].

Основными каналами выведения кальция из саркоплазматического/эндоплазматического ретикулума (СР/ЭР) являются рецепторы рианодина (RyR) в возбудимых клетках.

Рецепторы рианодина присутствуют в скелетных и сердечных мышечных клетках, где они вызывают мышечные сокращения. Эти крупные белки образуют тетрамеры в мембранах СР и ЭР, и содержат большой объем цистеина, что делает их хорошей мишенью для регуляции окислительно-восстановительных процессов [123]. АФК могут непосредственно модулировать активность этих рецепторов окислением редокс-чувствительных тиоловых групп [110, 176]. Окисление усиливает активность каналов, повышает отток ионов Ca^{2+} СР [161].

В изолированном сердце крысы, перфузируемом по методу Лангендорфа, небольшой окислительный стресс вызывал повышение ответа ионов кальция Ca^{2+} в каналах сердечных мышечных клеток, и данный процесс был опосредован белком NOX2 [80]. В кардиомиоцитах удлинение вызывало NOX2-индуцированную выработку АФК в сакролеммальных и t-тубулярных мембранах, что сенсibiliзировало соседние рецепторы RyR_2 в СР с последующим запуском серии кальциевых всплесков, что, в свою очередь, индуцировало появление аритмогенных волн ионов Ca^{2+} . В

исследованиях мышечной дистрофии Дюшенна на мышцах было продемонстрировано повышение сигнала АФК из-за изменений кальция Ca^{2+} полученного из саркоплазматического ретикулума, ассоциированных с кардиомиопатией [139].

Посттрансляционные модификации рецепторов RyRs с участием АФК, которые дестабилизируют межмономерные взаимодействия внутри рецепторов рианодина [127], были вовлечены в изменения гомостаза Ca^{2+} в условиях, сопровождаемых окислительным стрессом, например, сердечная недостаточность или инфаркт миокарда [64, 99, 161]. Повышение уровня выработки АФК митохондриями, ассоциированное с возрастом, ведет к тиоловому окислению рецепторов рианодина, что вызывает их гиперактивность, укорачивая, таким образом, рефрактерность выхода ионов кальция в кардиомиоцитах стареющего сердца [96].

Взаимодействие между модулированием АФК ионами Ca^{2+} и модулированием кальциевой сигнализации АФК лежит в основе концепции о перекрестных реакциях между АФК и ионами Ca^{2+} . Таким образом, в дополнение к регуляции образования АФК кальцием, окислительно-восстановительным реакциям и АФК была показана модуляция активности различных Ca^{2+} -каналов, насосов и ионообменников.

1.5 Особенности влияния радиочастотных электромагнитных полей на состояние и транспорт ионов Ca^{2+} в клетках

В научной литературе существует большое число данных, свидетельствующих о наличии биологических ответных реакций на воздействие низко-интенсивных неионизирующих ЭМП [4, 5, 14, 34, 98, 134]. При постановке экспериментов необходимо учитывать множество нюансов, включающих в себя такие параметры, как: диапазон частот, мощность, тип поляризации, длительность экспозиции, тип модуляции, разнообразие

объектов и вариантов исследований, а также отсутствие специфических метаболических изменений в организме на воздействие ЭМП [102, 103].

Поскольку в сократительной активности сердца первостепенное значение имеет механизм регуляции ионов Ca^{2+} , особый интерес представляет изучение влияния ЭМП на транспортные системы, обеспечивающие этот процесс. В настоящее время этой проблеме уделяется самое пристальное внимание. Например, обнаружено, что после непродолжительного воздействия низкочастотного электромагнитного поля (20 Гц, 8 мТ) возникают осцилляторные колебания внутриклеточного уровня кальция в диплоидных фибробластах кожи человека [116].

Однако, Green A.C. и др. [94] проводили оценку внутриклеточной концентрации ионов $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при воздействии ЭМП стандарта TETRA (380 МГц, импульсная модуляция с частотой импульса 17,6 Гц, УПМ=5 и 400 мВт/кг). В экспериментах *in vitro* экспонирование тучных клеток мозжечка и миоцитов сердца лабораторных крыс не привело к постоянному или биологически значимому отклонению во внутриклеточных уровнях ионов $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

При длительном воздействии импульсного ЭМП с частотой 1 Гц, сочетаемой с магнитной индукцией 6-24 мТл повышается скорость накопления Ca^{2+} в сердце крыс с инфарктом миокарда [38].

Происходит ослабление транспорта Ca^{2+} саркоплазматическим ретикуломом при длительном воздействии (100 мин) импульсным электромагнитным излучением [39]. Кроме того, существует предположение, что ЭМП радиочастотного диапазона изменяет работу Са-насоса клеточных мембран, увеличивает активность транспортного белка, участвующего в транспорте Ca^{2+} мембраны саркоплазматического ретикулума, что приводит к повышению скорости поглощения ионов кальция [14].

Следует заметить, что одним из важнейших регуляторов транспорта ионов Ca^{2+} , обеспечивающего поступление и выход его в кардиомиоцитах является система $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена.

Механизмы ионного обмена, встроенные в наружную мембрану кардиомиоцитов, обеспечивают поддержание оптимальной концентрации внутриклеточного кальция. После сокращения мышцы ионообменник выводит из клеток кальций в обмен на ионы натрия. В то же время предполагают, что часть внеклеточного кальция, входящего в клетки при электрическом возбуждении миокарда, поступает в обмен на внутриклеточный натрий посредством $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена [134].

Особый интерес для исследований представляют эксперименты, в которых активирование процессов ПОЛ в сердце путем добавления в перфузионные растворы H_2O_2 в разных концентрациях статистически достоверно и значительно снижает активность $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в изолированном сердце крысы [4, 5]. Впервые установленное влияние ПОЛ на функционирование $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в работающем миокарде, а также защитный эффект антиоксиданта эмоксипина приводит к необходимости учитывать роль этого механизма при изучении влияния ЭМП метрового диапазона на процесс $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в изолированном сердце крысы.

1.6 Влияние электромагнитных полей на процессы перекисного окисления липидов

Согласно заключению Всемирной организации здравоохранения, большинство биологических эффектов от интенсивного воздействия неионизирующих излучений связано с реакциями вынужденного нагрева, который приводит либо к увеличению температуры ткани или тела примерно на 1°C , либо к реакциям по уменьшению общей тепловой нагрузки [170]. Однако, во время низко-интенсивной экспозиции - при уровнях ЭМП ниже порога теплового действия (4 Вт/кг для всего организма), тепловой гомеостаз организма остается стабильным за счет наличия достаточно мощной системы терморегуляции [168]. Поэтому, в таких случаях, влияние ЭМП может быть обусловлено его прямым воздействием на межатомные и межмолекулярные

химические связи. Например, на наиболее чувствительные к физическим факторам внешней среды свободнорадикальные цепные реакции.

Известно, что состояние ПОЛ является интегральным показателем окислительно-восстановительных биохимических процессов, определяющих функциональное состояние организма в целом. Низкая интенсивность реакций образования АФК и продуктов ПОЛ соответствует нормальным метаболическим процессам, таким как клеточное деление, обновление ядерных мембран и так далее [75, 76, 85, 150].

Конечными продуктами процесса ПОЛ являются альдегиды. Из них, в качестве биомаркеров окислительного стресса, служат диеновые конъюгаты (ДК), кетодиены (КД) и малоновый диальдегид (МДА) [76]. Помимо липидов, очень чувствительными к воздействию свободных радикалов являются также белки и нуклеиновые кислоты [75]. Наиболее известными продуктами окисления белков являются белковые карбонилы [75, 150]. Малейшее изменения в их структурах приводят к нарушению функционированию клеток, тканей и состоящих из них органов [85].

Увеличение концентрации АФК при патологических воздействиях приводит к повреждению клеток, включая мембраны, липиды, белки и ДНК. Некоторые заболевания связаны с неблагоприятными последствиями реакций с участием АФК, например, сахарный диабет, атеросклероз, хронические воспаления, злокачественные и нейродегенеративные заболевания и многие другие [164]. Помимо этого, активизация перекисных свободнорадикальных процессов и синдром пероксидации лежат в основе патогенеза практически всех заболеваний и проявляются при любых неблагоприятных воздействиях на ткани организма [15, 18, 37].

В норме повреждающее свободнорадикальное окисление сдерживается многокомпонентной системой АОА, которая, превращает радикалы в малоактивные соединения, прерывая цепные реакции. Антиоксидантная защита включает в себя ферменты, такие как супероксиддисмутаза (СОД), глутатионпероксидаза (ГПО), каталаза и др. Помимо ферментов существуют

неэнзимные антиоксиданты, такие как глутатион, токоферол, витамин С, каротиноиды, флавоноиды, и многие другие [15, 164].

Большое число исследований направлено на изучение состояния оксидативного статуса у различных биологических объектов при воздействии ЭПМ низкой интенсивности. При этом отмечаются существенные изменения концентрации продуктов ПОЛ и АОА. Подавляющее число экспериментальных исследований, описанных в научной литературе, посвящено выявлению изменений в характере ПОЛ биологических объектов, подверженных ЭМП РЧ в диапазоне работы мобильных телефонов (900/1800 МГц) [57, 70, 122]. Следует отметить, что при этом биологические эффекты других частотных диапазонов ЭМП, в особенности метрового диапазона длин волн, изучены мало, несмотря на их высокую биологическую активность, и как следствие более низкие предельно допустимые уровни [48, 59, 79].

Группой ученых из Египта были проведены исследования, целью которых было выявление результата окислительного стресса после острого воздействия ЭМП стандарта GSM (900/1800 МГц) на добровольцах. При этом в сыворотке крови наблюдалось увеличение продуктов ПОЛ и снижение активности антиоксидантной защиты (СОД, ГПО, каталаза) [130].

М. Kerman и N. Senol были проведены исследование окислительного стресса у крыс, облученных 900 МГц с плотностью потока энергии $1,04 \text{ мкВт/см}^2$ [109]. Две группы животных облучались в течение 10 дней ежедневно по 30 минут. При этом одной из групп ежедневно до экспозиции делали инъекцию мелатонина (100 мкг/кг в смеси физраствора и этанола). Окислительный стресс оценивался по показателям уровня МДА и активности антиоксидантов - СОД, каталазы ГПО в нервных тканях гиппокампа. Было обнаружено увеличение МДА и снижение уровней антиоксидантов у экспонированной группы по сравнению с контрольной. Так же авторами был отмечен положительный эффект действия мелатонина.

М. Çenesiz с соавторами изучали параметры окислительного стресса у морских свинок, подверженных облучению по 4 часа в течение 20 дней ЭМП с частотами 900 и 1800 МГц [70]. Авторы отметили значительное увеличение концентрации в плазме крови пероксида водорода, хотя суммарное содержание антиоксидантов (витамина Е) оставалось стабильным.

Подобный результат действия ЭМП от источника, работающего на частоте 900 и 1800 МГц, был получен при облучении крыс по 2 часа в день в течении 30 дней, что приводило к окислительному стрессу. При этом наблюдали повышение уровней МДА и продуктов перекисного окисления белков (карбонилов), но ЭМП не влияло на концентрацию глутатиона [122].

Показано, что при воздействии мобильным телефоном с частотой 900 МГц на сердце крыс интенсивность свободнорадикальных процессов также значительно возрастает. При этом наблюдается повышение уровня МДА, снижение СОД, каталазы и ГПО [135].

Облучая животных по 12 ч в сутки в течение 30 дней (890 - 915 МГц) наряду с увеличением концентрация МДА, I. Meral соавт. наблюдали снижение уровня глутатиона и активность каталазы в тканях мозга. При этом в плазме крови содержание МДА, каталазы, витаминов А, D₃ и Е увеличивалось, а концентрация глутатиона снижалась [125].

Оценивались различные параметры сердечно-сосудистой системы крыс, в том числе и уровни МДА в тканях сердца при облучении ЭМП экспериментальных животных, которых располагали на расстоянии 0,5 см от мобильного телефона, работающего в диапазоне 900/1800 МГц [128]. Экспозиция осуществлялась 4 и 8 недель по 1, 2 и 3 часа для каждой исследуемой группы. При этом наблюдали снижение антиоксидантной активности во всех исследуемых группах. Однако статистически достоверное увеличение уровней МДА по сравнению с контролем наблюдалось только при максимальном времени экспозиции (8 недель по 3 часа).

При более высоких частотах ЭМП (более 3 ГГц), отмечено увеличение концентрации МДА, а также изменение окислительно-восстановительного

потенциала глутатиона и никотинамиддинуклеотида при облучении крыс в течение 1 и 2 месяцев [129].

Несколько иные результаты были получены при подостром воздействии ЭМП на крыс. Непрерывное и ежедневное воздействие базовой станцией стандарта GSM в течение 24 часов на протяжении 40 и 60 дней приводило к достоверному снижению концентрации продуктов ПОЛ, а также ферментативных и химических антиоксидантов [1].

Помимо анализа биологических эффектов воздействия ЭМП стандарта GSM в литературе встречаются отдельные данные по оценке влияния ЭМП на ПОЛ и состояние антиоксидантной защиты при других диапазонах частот. Однако работ, связанных с оценкой биологического действия ЭМП в диапазоне метровых длин волн на процессы ПОЛ пока недостаточно. Известно лишь, что ежедневное облучение крыс рацией, работающей в диапазоне 140-160 МГц, в течение 4 часов на протяжении 1 и 3 месяцев приводит к изменению сигнальных белков лимфоцитов [73, 74].

Кальций может увеличить формирование АФК. С другой стороны, АФК могут существенно влиять на приток кальция в клетку и во внутриклеточные кальциевые "депо". Более глубокое понимание механизма, тонкой настройки концентрации АФК и ионов кальция в пределах различных клеточных органелл может привести к инновационным терапевтическим стратегиям для лечения различных заболеваний, вызванных дисфункцией баланса АФК - кальций.

Таким образом, в результате проведенного анализа литературы, определена роль процессов ПОЛ в реализации влияния ЭМП на функционирование различных систем организма, в том числе и сердечно-сосудистую систему, что является приоритетным фактом в дальнейших исследованиях влияния этого физического фактора на процесс $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в изолированном сердце крысы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Глава 2 Материалы и методы исследования

2.1 Объекты исследования

В исследованиях использовались белые беспородные лабораторные крысы массой 200-250 г, их изолированные сердца и свежевыделенные кардиомиоциты новорожденных крысят. Всего в работе было использовано 360 лабораторных крыс.

Эксперименты проводили на лабораторных животных в соответствии с современными требованиями правил лабораторной практики по экспериментальному (доклиническому) исследованию в РФ (ГОСТ 351000.3-96 и 51000.4-96).

При проведении экспериментов учитывались требования Комиссии по проблеме этики отношения к животным, Российского национального Комитета по биоэтике при Российской академии наук и этические нормы, признанные мировым сообществом и изложенные в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных», опубликованных в 1985г. Советом международных медицинских организаций. Содержание и кормление животных проводилось в соответствии с «Санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) №1045-73 от 6.04.73г. (ГОСТ Р 50258-92), а также с Приказом №1179 от 10.10.83г. Минздрава СССР «Об утверждении нормативов затрат кормов для лабораторных животных в учреждениях здравоохранения». При проведении биологических экспериментов были соблюдены все этические правила и нормы по отношению к животным.

2.2 Методы измерения интенсивности электромагнитных полей и оценка величины поглощения электромагнитной энергии в исследуемых объектах

В соответствии с целью и задачами настоящей работы осуществлялась оценка среднеквадратичной величины напряженности электрической составляющей ЭМП. Источниками ЭМП метрового диапазона служили рекомендованные к использованию на российском железнодорожном транспорте носимые радиостанции «Радий-301» («Ижевский радиозавод», Россия) [20, 46].

Определения величины напряженности электрической составляющей ЭМП были выполнены с помощью измерителей Narda NBM-550 («Narda Safety Test Solutions GmbH», Германия), включенного в Государственный реестр измерительных средств оценки уровней электромагнитных полей на территории Российской Федерации и системы автоматизированного сканирования DASY 52 NEO (SPEAG AG, Швейцария). Контроль частоты осуществлялся с помощью анализатора спектра АКС-1201 («Актаком», Корея).

Основные технические характеристики измерителя Narda NBM-550 (зав. № АС-061) представлены в таблице 2.1. В исследованиях использовался широкополосный зонд EF0391 («Narda Safety Test Solutions GmbH», Германия), предназначенный для измерений в диапазоне частот 100 кГц – 3 ГГц.

Рассматривались два режима работы радиостанции: «ожидание» и «передача». В режим «передача» радиостанции выводились с помощью разработанного держателя из радиопрозрачных материалов.

Основные технические характеристики измерителя «Narda NBM-550» с изотропным измерительным зондом EF0391.

Параметры измерения	Эксплуатационные данные
Частота, МГц	0,1 – 3 000
Пределы измерения, В/м	0,01 – $1 \cdot 10^5$
Тип измерительной части	Трехкоординатный изотропный
Частота дискретизации, с	2
Габаритные размеры без зонда, мм	45×98×280
Вес с зондом, г	550

Для проведения измерений уровней ЭМП с помощью Narda NBM-550 исследуемые радиостанции крепились в вертикальном положении на специальном штативе, изготовленном из радиопрозрачного материала. Измерения производились на расстояниях от 20 до 150 см от корпуса радиостанции с шагом 10 см, точки измерения были фиксированными для всех источников ЭМП, как представлено на рисунке 2.1. Измерения проводились с фронтальной стороны на трех уровнях радиостанций: на уровне верха антенны, у динамика (основание антенны) и у нижней части корпуса устройств. В каждой точке исследования регистрировалось по 30 измерений среднеквадратичной величины напряженности электрической составляющей ЭМП в течение 30 секунд. За результат принималось среднее значение напряженности ЭМП в каждой точке измерений.

Для измерений напряженности электрической составляющей ЭМП в непосредственной близости от источника излучения (рации) была использована система автоматизированного сканирования ближней зоны ЭМП DASY 52 NEO (SPEAG AG, Швейцария) с измерительным зондом ER3DV6 (SPEAG AG, Швейцария), основные характеристики которого представлены в таблице 2.2.

Основные технические характеристики DASY 52 NEO с изотропным измерительным зондом ER3DV6

Параметры измерения	Эксплуатационные данные
Шаг измерения, мм	40×40×100
Диапазон частот	40 МГц > 6 ГГц
Пределы чувствительности	2 В/м > 1000 В/м;
Общая длина:	337 мм
измерительной части:	16 мм
Диаметр измерительной части	8 мм
Диаметр корпуса	12 мм
Расстояние от измерительной части зонда до центра диполей	2,5 мм

В ходе оценки величины напряженности электрической составляющей ЭМП в ближней зоне измерительный зонд ER3DV6 помещался на расстояниях от 0 до 30 см от корпуса радиостанций. Для проведения измерений радиостанции крепились в вертикальном положении на специальном штативе, изготовленном из радиопрозрачного материала (рисунок 2.1). Измерения проводились с фронтальной стороны, сканирование осуществлялось во всем объеме заданного параллелепипеда с размерами $56 \times 30 \times 44$ см³ с шагом $4 \times 10 \times 4$ см³. В процессе измерений измерительный зонд перемещался в пространстве с помощью высокоточного роботоманипулятора. В каждой точке исследования регистрировалась среднеквадратичная величина напряженности электрической составляющей ЭМП. Измеренные данные непрерывно передавались в компьютер для обработки и визуализации.

Для создания, расчета и обработки результатов компьютерного моделирования использовался программный продукт SEMCAD X v. 18.6 (SPEAG AG, Швейцария) [87]. Расчеты математических моделей осуществлялись с использованием метода конечных разностей во временной области при вычислительной поддержке графического процессора с архитектурой параллельных вычислений CUDA [152].



Рисунок 2.1. Измерения напряженности электрической составляющей ЭМП с помощью измерителя DASY 52 NEO.

В данном диссертационном исследовании использовались коммерческие численные модели лабораторных беспородных крыс самцов массой 192 г., разработанные Фондом по исследованию информационных технологий в обществе при Федеральном Политехническом Институте Цюриха (IT'IS Foundation, Швейцария) [72]. Данные модели крыс включают в себя 44 биологические ткани. Для вычисления значений УПМ диэлектрические свойства всех тканей были получены с использованием базы данных Gabriel [88]. Диэлектрические характеристики основных используемых тканей представлены в таблице 2.3. Разрешение исходной модели (размер ячейки) составлял 1 мм^3 .

Таблица 2.3.

Диэлектрические параметры основных тканей крысы численного моделирования

Наименование ткани	Относительная диэлектрическая проницаемость	Диэлектрическая проводимость, См/м	Плотность, г/см ³
Надпочечники	65,00	0,82	1028
Мочевой пузырь	21,13	0,30	1035
Мозг	71,00	0,88	1046
Хрящевая ткань	50,40	0,51	1100

Мозжечок	71,00	0,88	1045
Ликвор	79,10	2,17	1007
Соединительная ткань	50,10	0,51	1525
Диафрагма	61,30	0,73	1090
Хрусталик	40,90	0,32	1076
Жировая ткань	12,10	0,07	911
Сердце	78,14	0,81	1080
Гипофиз	65,00	0,82	1053
Почка	81,80	0,90	1066
Печень	59,80	0,54	1079
Мышечная ткань	61,30	0,73	1090
Нервная ткань	41,10	0,37	1075
Кожа	58,80	0,56	1109
Селезенка	76,00	0,88	1089

2.3 Методика перфузии изолированного сердца крысы и регистрации Na^+ -зависимых потоков Ca^{2+} в процессе $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена

В работе была использована перфузионная установка, разработанная на кафедре биохимии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации [49]. Под эфирным наркозом осуществляли декапитацию животного. Сердце быстро извлекали и помещали в охлажденный перфузионный раствор. Перфузию сердца осуществляли по методу Лангендорфа [113]. Канюлировали аорту, в которую подавали раствор следующего состава: NaCl – 140 ммоль/л, NaHCO_3 – 2 ммоль/л, KCl – 3 ммоль/л, трис-ОН – 2 ммоль/л, (pH 7,4), CaCl_2 – 0,7 ммоль/л, глюкоза – 11 ммоль/л. Таким образом, суммарная концентрация веществ, содержащих ионы натрия в растворе составляла 142 ммоль/л. Раствор насыщали кислородом. Электрическую активность сердца сохраняли в естественном состоянии.

Перфузионная установка позволяла непрерывно регистрировать изменения концентрации ионов Ca^{2+} в оттекающем от сердца перфузионном растворе. Принципиальная схема установки представлена на рисунке 2.2.

Перфузию сердца осуществляли с постоянной скоростью при помощи перистальтического насоса под контролем давления в аорте, которое колебалось в пределах 60-70 мм рт. ст. Скорость коронарного протока составляла от 8 до 10 мл/мин, в зависимости от массы желудочков сердца.

Опыты начинали после 15 минут адаптации сердца и стабилизации обменных процессов и сократительной функции сердца.

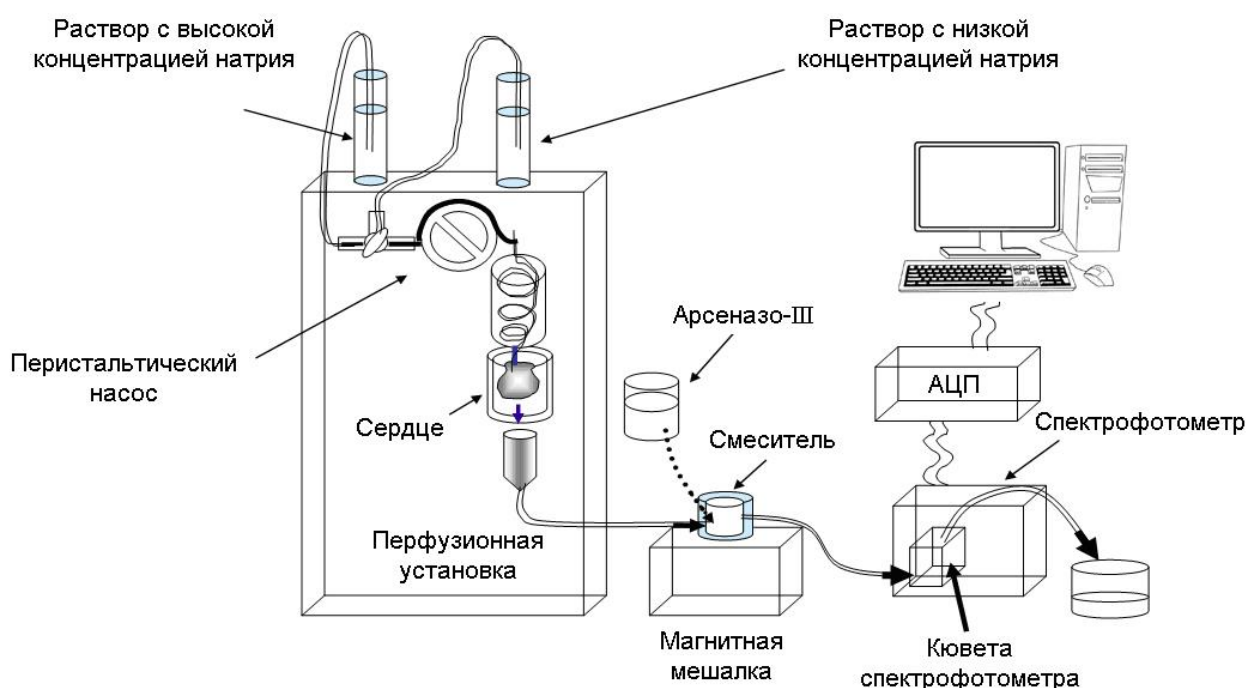


Рисунок 2.2. Схема установки для перфузии сердца крысы и измерения концентрации Ca^{2+} в оттекающем перфузионном растворе.

Инициацию Na^+ -зависимого поглощения ионов Ca^{2+} изолированным сердцем крысы осуществляли путем снижения уровня ионов натрия в перфузионном растворе [5, 124]. Гипонатриевый перфузионный раствор имел в своем составе: NH_4Cl - 140 ммоль/л, NaHCO_3 - 2 ммоль/л, KCl - 3 ммоль/л, трис-ОН - 2 ммоль/л, (рН 7,4), CaCl_2 - 0,7 ммоль/л, глюкоза - 11 ммоль/л. Данный раствор отличался от исходного низким количеством ионов натрия

[Na⁺] - 2 ммоль/л. Осмотическое давление сохраняли путем замещения 140 ммоль/л хлорида натрия на 140 ммоль/л хлорида аммония.

По окончании перфузии гипонатриевой средой в течение 3 минут через сердце пропускали исходный перфузионный раствор, с содержанием ионов натрия 142 мМ. Регистрацию выброса Ca²⁺ из сердца осуществляли спустя 30 секунд – время, необходимое для полной смены раствора на новый в перфузионной системе.

Переключение с исходного раствора, содержащего физиологическую концентрацию натрия на раствор без хлорида натрия, а затем вновь на раствор с содержанием ионов натрия 142 ммоль/л осуществляли на одном сердце три раза с перерывом 5 минут. После каждого опыта сердца высушивали фильтровальной бумагой и взвешивали.

Концентрацию кальция в оттекающем от сердца перфузионном растворе непрерывно измеряли в течение всего периода опыта. С помощью перистальтического насоса перфузионный раствор смешивали с металлоиндикатором – арсеназо-III.

Арсеназо III (2,7-бис-[(2-арсонофенил)азо]-1,8-диокси 3,6 нафталин-дисульфокислота) является реагентом для фотометрического определения ионов кальция. Максимум поглощения света комплексом арсеназо-III-Ca²⁺ регистрировали при длине волны 660 нм [30].

При этом учитывали, что индикатор обладает значительной селективностью и чувствительностью к ионам кальция, колебания концентрации которых чрезвычайно малы и составляют от 10⁻⁶ до 10⁻⁸ моль/л [81].

Образовавшийся окрашенный продукт реакции между Ca²⁺ и металлоиндикатором пропускали через проточную кварцевую микрокювету объемом 1 мл, помещенную в регистрационный блок спектрофотометра СФ-46 (ЗАО «ОКБ СПЕКТР», Россия). Показания спектрофотометра при длине волны 660 нм непрерывно регистрировали с помощью внешнего модуля аналого-цифрового преобразователя ZET 220 и программного обеспечения

ZETLAB BASE (Предприятие «Электронные технологии и метрологические системы», Россия).

Калибровку системы осуществляли путем добавок хлорида кальция в перфузионные растворы, повышающие концентрацию кальция на 20 мкмоль/л.

В рамках экспериментального исследования влияния ЭМП метрового диапазона на процессы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в изолированном сердце крысы производился расчет следующих параметров:

- 1) Скорость поглощения ионов Ca^{2+} в минуту в расчете на 1 грамм сырого веса сердца (нмоль/мин·г) каждые 20 секунд в течение 3-х минут.
- 2) Скорость выброса ионов Ca^{2+} в минуту (нмоль/мин·г) каждые 20 секунд в течение 3-х минут.
- 3) Изменение количества поглощаемого сердцем Ca^{2+} в расчете на 1 г сырого веса сердца (нмоль/г) в течение каждых 20 секунд в пределах 3-х минут.
- 4) Изменение количества выбрасываемого сердцем Ca^{2+} в течение каждых 20 секунд в пределах 3-х минут.

Экспозицию изолированного сердца осуществляли источником ЭМП метрового диапазона. Перфузионная установка полностью экранировалась слоем металлизированной экранирующей ткани SILVER-TWIN HF+LF («YSHIELD GmbH & Co.», Германия), что позволяло обеспечить электромагнитную совместимость всех регистрирующих приборов, применяемых во время исследований, а также обеспечивало равномерную экспозицию объекта исследований.

2.4 Методика выделения культуры кардиомиоцитов крыс и методика определения концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в цитозоле клеток миокарда

В работе использовали новорожденных (1-3 дня) крыс линии Wistar, усыпленных ингаляцией CO_2 , согласно международным правилам работы с животными. При ферментативном разрушении сердечной мышцы

использовали метод Лэма с соавт. [112] в модификации [12]. Выделенные сердца промывали в растворе Рингера (ммоль/л: 146 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 11 глюкозы, 10 HEPES, pH 7,4), измельчали и инкубировали в этом же растворе с добавлением коллагеназы IA типа (1 мг/мл, Sigma) и трипсина (0,12%, Биолот, Россия) в течение 20-30 мин при температуре 37°C. Полученную суспензию отстаивали в течение 1-2 мин для осаждения неразрушенных кусочков ткани. Супернатант осаждали на центрифуге при 1500 об/мин в течение 10 мин. Клетки переносили в теплую питательную среду (ПС) DMEM с 10% сыворотки эмбрионов коров (Биолот, Россия) с добавлением 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (Биолот, Россия). Для очистки популяции клеток от примеси немышечных клеток полученную суспензию преинкубировали в стеклянных чашках Петри в течение 30-40 мин. Клетки выращивали в 40 мм чашках Петри (Медполимер, Россия) на двух полосках покровного стекла (12x24 мм), предварительно покрытых слоем поли-Д-лизина в концентрации 0,1 мг/мл (Эпидбиомед, Россия). Рассев производили в концентрации $1 \cdot 10^5$ кл/мл. Культивирование осуществляли в среде DMEM того же состава. Инкубацию проводили в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂, влажности 95% и температуре 37°C.

С целью получения культуры свежесыведенных кардиомиоцитов применяли свойство избирательной адгезии крупных зрелых кардиомиоцитов к поли-Д-лизину [40]. Для этого после ферментативного разрушения сердечной мышцы и центрифугирования осадок с клетками миокарда ресуспензировали в растворе Рингера и наносили на 5 мин на полоски покровных стекол (12x24 мм), предварительно покрытых поли-Д-лизином (0,1 мг/мл, Эпидбиомед, Россия) или 0,1% желатином (Биолот, Россия). Неприкрепившиеся мелкие кардиомиоциты и примесные немышечные клетки удаляли, а оставшиеся на стеклах кардиомиоциты инкубировали в растворе Рингера при комнатной температуре в течение 1 ч.

Использование флуоресцентного красителя Фура-2, который изменяет характер своего свечения при связывании с ионами Ca²⁺ внутри клетки,

позволяет определить как именно изменяется внутриклеточная концентрация Ca^{2+} при изменении функционального состояния клетки и различных воздействиях [97]. Изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ происходит за счет саркоплазматического ретикулума, который является главным источником ионов Ca^{2+} в цитозоле.

Регистрацию $[\text{Ca}^{2+}]_i$ осуществляли с помощью компьютерной системы анализа внутриклеточного содержания ионов (Intracellular Imaging & Photometry System, США), состоящей из инвертированного микроскопа Nikon TMS (x30) с монохромной цифровой видеокамерой RS-170 CCD (Cohu), компьютера и программного обеспечения. Возбуждение образца проводили при 340 и 380 нм. Фура (10 мкг/мл), связанная с ионами Ca^{2+} , имеет максимум флуоресценции при 340 нм, а свободная Фура – при 360-380 нм (рисунок 2.3). Программа InCytIm2™ рассчитывала концентрацию ионов кальция по методу Grynkiewicz et al. [97] как соотношение интенсивностей флуоресценции (F_{340}/F_{380}) с учетом калибровочной кривой. В опытах по измерению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ применяли раствор Рингера (мМ): 146 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 11 глюкозы, 10 HEPES, pH 7,4, а также бескальциевый раствор Рингера – тот же раствор, но без ионов кальция с добавлением хелатора Ca^{2+} - ЭГТА в концентрации 1 мМ. В качестве раствора с высокой концентрацией K^+ применяли раствор Рингера с содержанием 120 мМ KCl и 26 мМ NaCl.

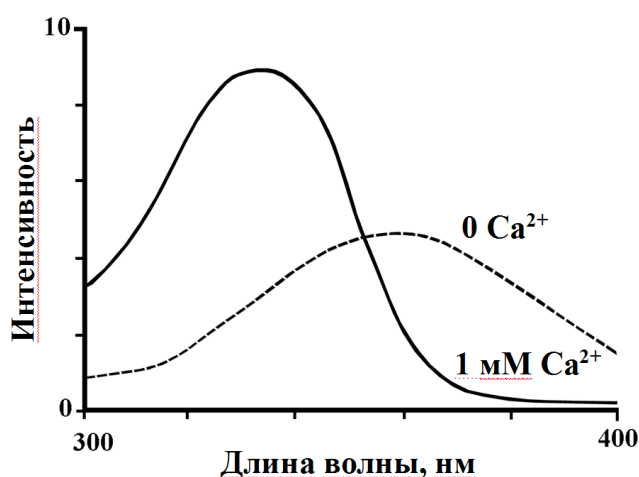


Рисунок 2.3. Спектры возбуждения Фуры-2 (0,5 мкМ) в отсутствие свободного Ca^{2+} и при концентрации Ca^{2+} 1мМ [97].

Использование Ca^{2+} -чувствительного флуоресцентного зонда Фура-2АМ позволяет измерять внутриклеточную концентрацию ионов Ca^{2+} [97]. Для измерения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ стекла с клетками инкубировали в растворе Рингера с флуоресцентным красителем Фура-2АМ (Sigma) в концентрации 10 мкмоль/л в течение 1 ч при 26 °С. Затем клетки ополаскивали в растворе Рингера и хранили в свежем буфере до измерения. Эксперименты проводили при комнатной температуре на покровных стеклах, размещенных непосредственно над объективом инвертированного микроскопа в установке по анализу ионов. Для предотвращения высыхания клеток на поверхность покровного стекла наносился раствор Рингера, образующий мениск. При проведении эксперимента раствор Рингера удалялся с помощью перистальтического насоса, и на его место вводился раствор с соответствующим агентом в объеме 250 мкл, который затем отмывался с помощью свежего раствора Рингера.

Эксперименты по изучению действия ЭМП на окислительный стресс проводили на свежeweделенных кардиомиоцитах. В качестве антиоксиданта применяли антиоксидант гистохром (эхинохром-2,3,5,7,8-пентагидрокси-б-этил-1,4-нафтахинон, 2 %, ТИБХ, Россия).

2.5 Методика определения продуктов перекисного окисления липидов и общей антиоксидантной активности в периферической крови крыс

Для оценки интенсивности образования продуктов ПОЛ использовался метод количественного определения малонового диальдегида (МДА), который реагирует с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), образуя комплекс активных продуктов (ТБК-АП) [162]. Накопление ТБК-АП в тканях является

одним из показателей нарушения окислительно-восстановительного состояния и является методом раннего выявления метаболических нарушений в организме [50]. Для изучения процессов перекисного окисления липидов использовалось определение содержания МДА ($C_{\text{мда}}$) в плазме крови [7].

Кровь собирали в пробирки с добавлением 1,5 мл цитрата натрия на 5 мл крови, охлаждали и центрифугировали 15 минут со скоростью 1500 об/мин. К 3 мл 1,4 % ортофосфорной кислоты добавляли 0,25 мл сыворотки крови, затем приливали 1 мл 0,5 % раствора ТБК и на 45 минут помещали в кипящую водяную баню. Пробы охлаждали, добавляли 4 мл бутанола и встряхивали в течение 1 минуты до образования суспензии. После центрифугирования супернатант фотометрировали на спектрофотометре Cary-50 (Varian, США) при двух длинах волн 535 нм и 570 нм против холостой пробы в кювете с длиной оптического пути 1 см. Расчет содержания ТБК-АП производили по формуле 2.1:

$$C_{\text{мда}} = \frac{D_{535} - D_{570}}{0,156} \times 16, \quad (2.1)$$

где: $C_{\text{мда}}$ – содержание ТБК-АП в опытной пробе (мкмоль/л); D_{535} – оптическая плотность опытной пробы при 535 нм; D_{570} – оптическая плотность опытной пробы при 570 нм; 0,156 – коэффициент молярной экстинкции комплекса МДА-ТБК в л/мкмоль/см; 16 – коэффициент разведения сыворотки крови.

Перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот сопровождается образованием диеновых структур, которые поглощают ультрафиолетовый (УФ) свет в диапазоне длин волн 230-270 нм [138].

Определение концентрации диеновых конъюгатов ($C_{\text{дк}}$) и кетодиенов ($C_{\text{кд}}$) проводили в сыворотке крови методом З.Я. Плацера [44]. Экстракцию липидов проводили по методу М.А. Креховой и М.К. Чехрановой следующим образом: кровь собирали в пробирки и центрифугировали 15 минут со скоростью 1500 об/мин, затем к сыворотке крови добавляли смесь

этанол-гексана 1:2, тщательно встряхивали и центрифугировали [32]. В полученном гексановом экстракте проводили определение концентрации катаболитов на спектрофотометре Cary-50 (Varian, США) по их коэффициентам экстинкции (для ДК при 233 нм $\epsilon M = 23200 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$, для КД при 268 нм $\epsilon M = 23120 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$) в максимумах поглощения против холостой пробы [16].

Концентрацию рассчитывали по формуле 2.2:

$$C = \frac{D\lambda}{\epsilon M} \times L \times 10^{-6} \quad (2.2)$$

где C – концентрация исследуемого вещества, мкмоль/л; $D\lambda$ – значение оптической плотности при данной длине волны; ϵM – коэффициент молярной экстинкции, $\text{M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$; L – длина оптического пути, см (1 см).

В основе метода определения общей антиоксидантной активности плазмы крови лежит реакция восстановления антиоксидантами свободного радикала - дифенилпикрилгидразила (ДФПГ) [16, 91].

Для экспериментальных исследований использовалась плазма крови тех же животных, у которых производилось определение $C_{\text{ДК}}$ и $C_{\text{КД}}$. Исходный раствор готовится путем растворения несколько миллиграммов ДФПГ в хлороформе, таким образом, чтобы раствор имел подходящую оптическую плотность (около 0,5-0,6 см^{-1}) при длине волны 517 нм. Также готовится хлороформный экстракт плазмы путем центрифугирования в течение 5 минут смеси 0,35 мл сыворотки крови с 3,5 мл хлороформа.

Контрольный раствор готовился путем смешивания 3 мл хлороформа с 1 мл ДФПГ. При добавлении в контрольный раствор 40 мкл антиоксиданта (гидрохинон) происходило снижение оптической плотности, а разница между этими показателями характеризовала количество антиоксидантов в контрольной пробе (G_s). Количество антиоксидантов в исследуемой пробе осуществляли таким же образом: 1 мл ДФПГ смешивали с 3 мл хлороформного экстракта сыворотки, затем добавляли в раствор 40 мкл антиоксиданта и оценивали изменение в оптической плотности до и после добавления

антиоксиданта (G_r). Разница между показателями G_r и G_s характеризовала изменение количества антиоксидантов.

Оценка изменения количества антиоксидантов в пробе осуществлялась с помощью стандартных кривых оптической плотности используемого антиоксиданта. При этом 0,1 микроэквивалент любого вещества приводит к снижению оптической плотности на 0,22 нм. Стехиометрическое соотношение: 2 микроэквивалента антиоксиданта в 1 мл раствора соответствует 1 мкМоль антиоксиданта.

Таким образом, расчет количества антиоксиданта в пробе осуществлялся по формуле 2.3:

$$X = \frac{G_s - G_r}{2,2}, \quad (2.3)$$

где X – количество антиоксиданта в пробе, мэкв; 2,2 - стехиометрический коэффициент, (нм/мэкв); G_s – разница в оптической плотности при данной длине волны для контрольных проб; G_r – разница в оптической плотности при данной длине волны для исследуемых проб.

2.6. Методы статистической обработки данных

Полученные данные проверялись на распределение вероятностей, и в случае, когда выборка соответствовала нормальному распределению, осуществлялась статистическая обработка данных с использованием t -критерия Стьюдента. В противном случае использовался непараметрический U -критерий Манна-Уитни-Уилкоксона. В работе были приняты 2 уровня достоверности: $p < 0,05$ и $p < 0,01$. Все расчеты проводились в вычислительной среде табличного процессора Statistica (StatSoft.Inc, США).

Глава 3 Влияние электромагнитных полей на процессы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в изолированном сердце крысы

3.1 Влияние повторения циклов активации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в изолированном сердце контрольной группы крыс на скорость и количество поглощаемого и высвобождаемого Ca^{2+}

Из анализа литературных данных следует, что экспозиция ЭМП оказывает влияние на сократительную активность сердца и, в том числе, на процессы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена [3]. Поскольку в сократительной активности сердца первостепенное значение имеет механизм регуляции ионов Ca^{2+} , особый интерес представляет изучение влияния ЭМП на обеспечивающие этот процесс транспортные системы.

Учитывая важную роль механизма $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в поддержании внутриклеточного гомеостаза ионов Ca^{2+} и обеспечении процесса электромеханического сопряжения в сердце для изучения дозозависимых механизмов возможного влияния ЭМП на сердечно-сосудистую систему был проведен ряд исследований, включающих теоретическую дозиметрию и биологический эксперимент на модели изолированного сердца крысы.

Используемая модель изолированного сердца позволяла следить за процессом поглощения ионов Ca^{2+} сердцем при снижении внеклеточного уровня ионов Na^+ (реверсивное направление транспорта ионов Ca^{2+}) или выведения ионов Ca^{2+} из сердца при восстановлении прежней концентрации ионов Na^+ в перфузионном растворе (прямое направление транспорта Ca^{2+}).

Проведенные предварительные исследования показали, что при снижении внеклеточной концентрации хлорида натрия от 142 до 2 ммоль/л (осмотическое давление сохраняли заменой хлорида натрия хлоридом аммония в концентрации 140 ммоль/л) происходит быстрое поглощение ионов Ca^{2+} изолированным сердцем крысы. Об этом свидетельствует интенсивное снижение концентрации ионов Ca^{2+} в оттекающем от сердца перфузионном растворе.

Максимальная скорость аккумуляции ионов Ca^{2+} сердцем наблюдалась к 60 секунде опыта и достигала $140,2 \pm 7,0$ нмоль/мин·г сырого веса ткани. Перевод перфузии сердца на раствор, содержащий прежнюю концентрацию хлорида натрия (142 ммоль/л) сопровождался повышением концентрации ионов Ca^{2+} в оттекающем от сердца растворе. Через минуту интенсивность потери ионов Ca^{2+} сердцем составляла $90,57 \pm 1,70$ нмоль/мин·г сырого веса ткани. Динамика скорости транспорта ионов Ca^{2+} посредством $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена представлена на рисунке 3.1.

Суммарное количество ионов Ca^{2+} , поглощаемых сердцем к трем минутам опыта достигало $129,25 \pm 6,97$ нмоль/г, а количество высвобождаемых ионов Ca^{2+} составило $115,41 \pm 1,78$ нмоль/г сырой ткани. Изменение концентрации поступающих ионов Ca^{2+} и их высвобождения представлена на рисунке 3.2.

Система $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в сердце млекопитающих непрерывно аккумулирует и выбрасывает ионы Ca^{2+} из кардиомиоцитов при каждом акте сокращения и расслабления. Однако этот процесс протекает в условиях физиологических концентраций Ca^{2+} во внутречеточном пространстве.

В исследуемой модели процесс аккумуляции ионов Ca^{2+} сопровождался значительным накоплением ионов Ca^{2+} в цитоплазме сердечных клеток. Такой методический прием являлся вынужденным, поскольку более слабые потоки ионов Ca^{2+} внутрь и вне клетки используемыми методами регистрации оказались бы невозможными.

С другой стороны, при патологических состояниях, в условиях ишемии или гипоксии, повышенное содержание ионов Ca^{2+} в цитозоле становится вполне соизмеримым с концентрациями ионов Ca^{2+} в данной модели. Об этом свидетельствует возникновение фибрилляции желудочков сердца при снижении уровня натрия во внеклеточной среде [3].

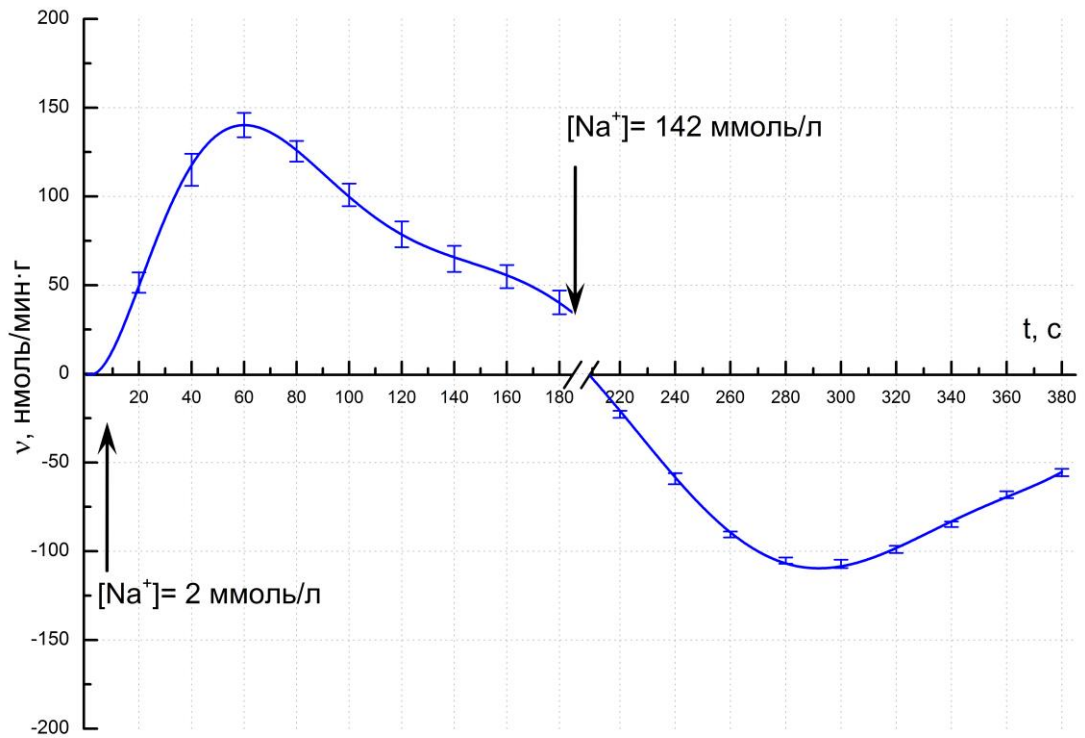


Рисунок 3.1. Динамика изменения скорости поглощения ($\text{Na}^+ = 2$ ммоль/л) и высвобождения ($\text{Na}^+ = 142$ ммоль/л) ионов Ca^{2+} в изолированном сердце крысы при активации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена.

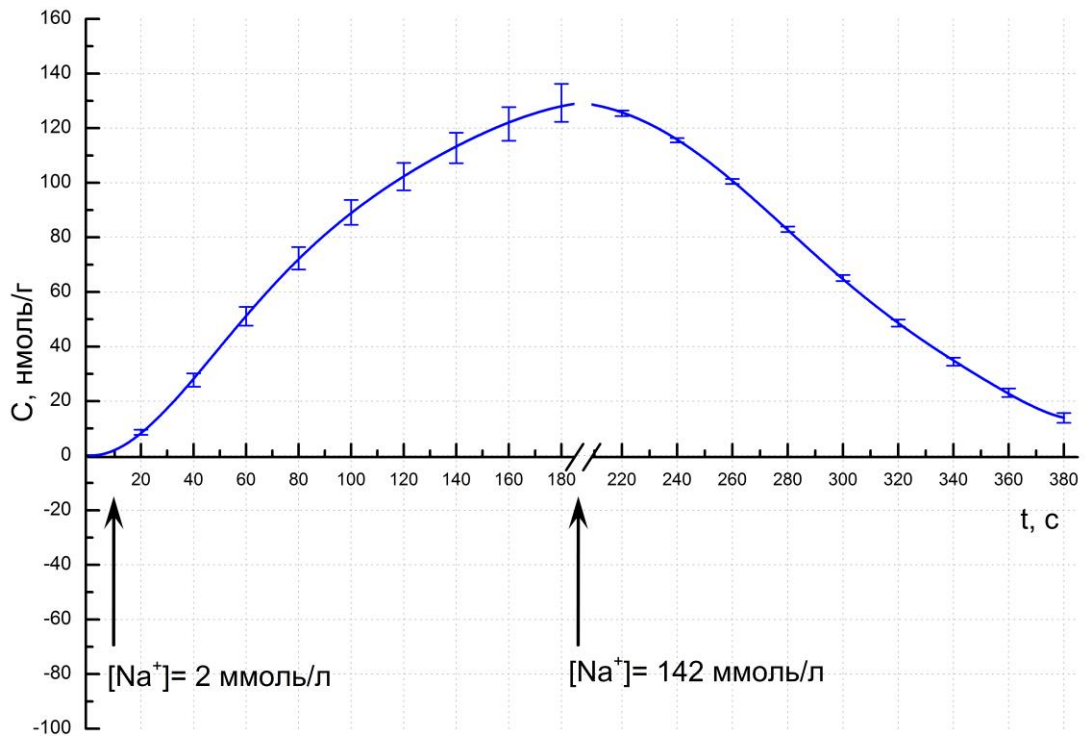


Рисунок 3.2. Динамика изменения концентрации накопленных ($\text{Na}^+ = 2$ ммоль/л) и высвобожденных ($\text{Na}^+ = 142$ ммоль/л) ионов Ca^{2+} в изолированном сердце крысы при инициации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена.

Согласно приведенной на рисунке 3.3 схеме, в контрольной группе изолированных сердец производили три цикла уменьшения концентрации ионов Na^+ (до 2-х ммоль/л), а затем возврата концентрации ионов Na^+ к исходному состоянию (до 142 ммоль/л) на одном и том же сердце.

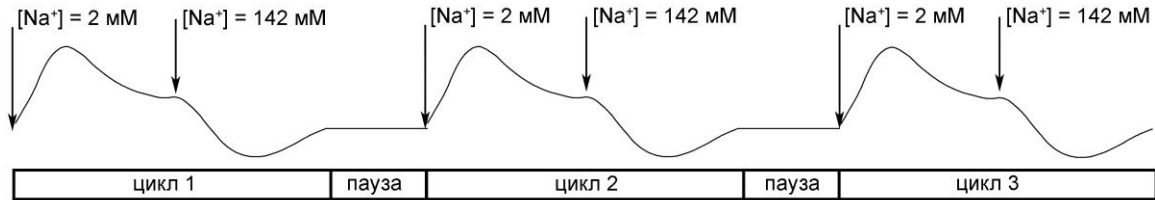


Рисунок 3.3. Схема проведения экспериментальных исследований перфузии изолированного сердца в контрольной группе изолированных сердец.

В результате проведенных экспериментов было показано, что повторные циклы снижения и возвращения к исходным значениям концентрации ионов Na^+ вызывали аккумуляцию и высвобождение накопленных ионов Ca^{2+} изолированным сердцем (см. рисунок 3.4).

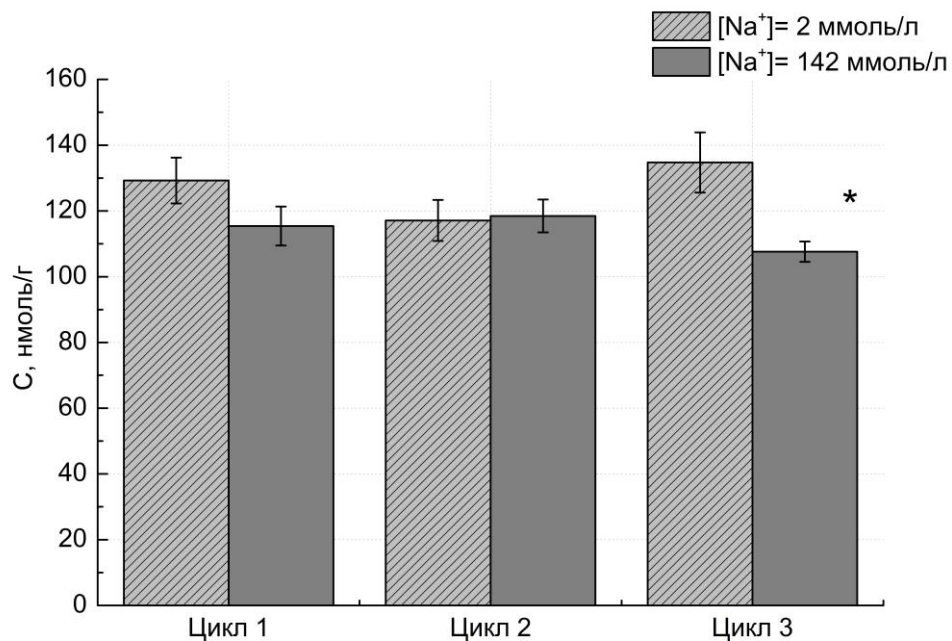


Рисунок 3.4. Сопоставление концентрации накопленных ($[\text{Na}^+] = 2 \text{ ммоль/л}$) и высвобожденных ($[\text{Na}^+] = 142 \text{ ммоль/л}$) ионов Ca^{2+} к концу каждого цикла инициации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена (* $p < 0,01$).

В результате проведенных экспериментов было установлено, что достоверные различия между накоплением и выбросом ионов Ca^{2+} наблюдались только после третьей смены концентрации ионов Na^+ в перфузионном растворе. Дальнейшие исследования показали, что часть поступивших ионов Ca^{2+} задерживалась внутриклеточными структурами кардиомиоцитов.

Этот факт можно объяснить постепенным повышением уровня натрия в миоплазме сердца, который более активно обменивался на внеклеточный Ca^{2+} . Избыток поступивших в кардиомиоциты ионов Ca^{2+} , по-видимому, захватывался саркоплазматическим ретикулумом и митохондриями.

3.2 Численное моделирование условий экспозиции и оценка поглощения электромагнитной энергии изолированным сердцем крысы

В целях анализа количества поглощенной энергии изолированным сердцем крысы в условиях перфузирования была разработана упрощенная компьютерная модель установки перфузии изолированного сердца (рисунок 3.5 а) по методу Лангендорфа.

Величина и характер распределения УПМ в модели сердца крысы, полученные в результате теоретического моделирования в случае расположения фантома изолированного сердца на расстоянии 10 мм от источника ЭМП, представлены на рисунке 3.5. б.

В результате компьютерного моделирования установлено, что поглощение энергии ЭМП происходит не только в сердце, но и во всех жидкостях, используемых в стенде (перфузат и жидкость термостата). Анализ полученных данных показывает, что максимальные значения УПМ облучаемого изолированного сердца крысы в установке перфузии составляет $0,46 \pm 0,03 \text{ мВт/кг}$.

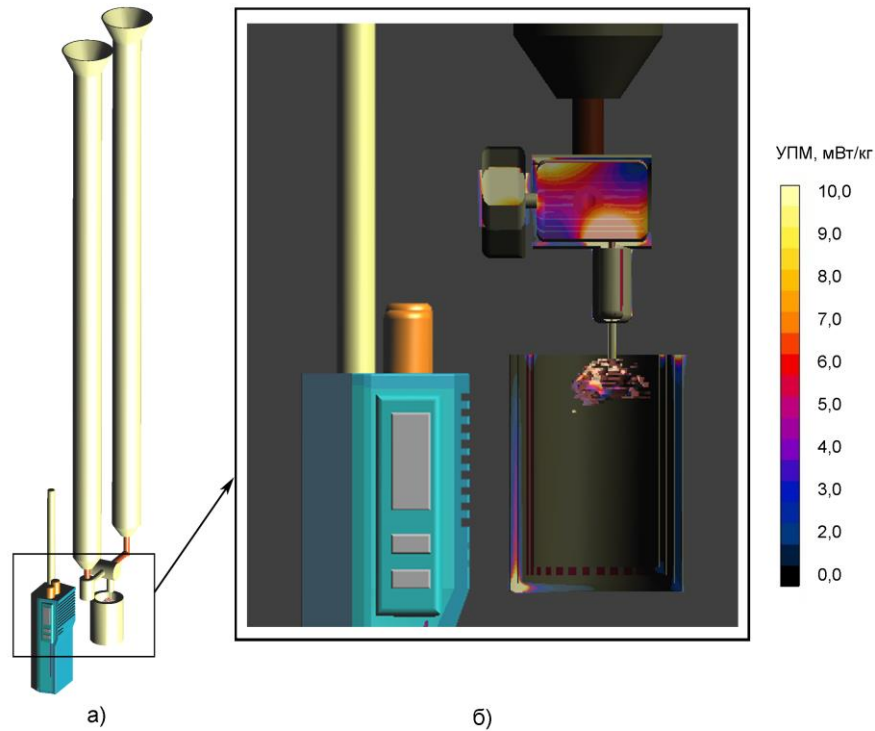


Рисунок 3.5. Модель установки перфузии изолированного сердца (а) и распределение УПМ при облучении модели изолированного сердца крысы (б).

Для оценки влияния перфузионной установки на количество УПМ в изолированном сердце, была создана модель изолированного сердца без установки. Сопоставление результатов моделирования сердца с установкой перфузии и без нее представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1.

Результаты моделирования изолированного сердца крысы

	С установкой перфузии	Без установки
УПМ _{макс} , мВт/кг	0,49±0,03	0,43±0,02
УПМ _{ср} , мВт/кг	0,25±0,01	0,24±0,01

Расхождение уровней УПМ с термостатируемой кюветой и без нее было отмечено в точках максимума (не более 12 %), при этом локализация максимальных значений в обеих моделях совпала. Расхождение величин УПМ, усредненных на весь объем сердца, не превышало 4 %.

Согласно полученным данным можно полагать, что кювета ослабляет ЭМП, имитируя тело биологического объекта, тем самым, приближаясь к

условиям *in vivo*, но, позволяя в реальных условиях получать данные о взаимодействии ЭМП с изолированным органом без влияния на него других биохимических и биофизических реакций. С другой стороны, наличие поглощающих объектов (термостатируемая кювета и префузат) не вносит значительных искажений как в структуру ЭМП и распределение УПМ в исследуемом органе.

3.3 Динамика процесса $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в интактном изолированном сердце крысы в процессе облучения электромагнитным полем метрового диапазона

Диссертационное исследование было посвящено также изучению влияния ЭМП метрового диапазона на изолированные сердца крыс в процессе перфузии растворами с различной концентрацией хлорида натрия.

В группе изолированных сердец, подверженных экспозиции ЭМП метрового диапазона первый цикл снижения и возврата прежней концентрации натрия осуществляли без воздействия ЭМП. Второй цикл исследований проводился в условиях воздействия на сердце ЭМП в течение 3-х минут во время снижения и 3-х минут при восстановлении прежнего уровня хлорида натрия в перфузионном растворе. В третьем цикле снижение и возврат прежнего уровня натрия в растворе осуществляли без экспозиции ЭМП (рисунок 3.6).

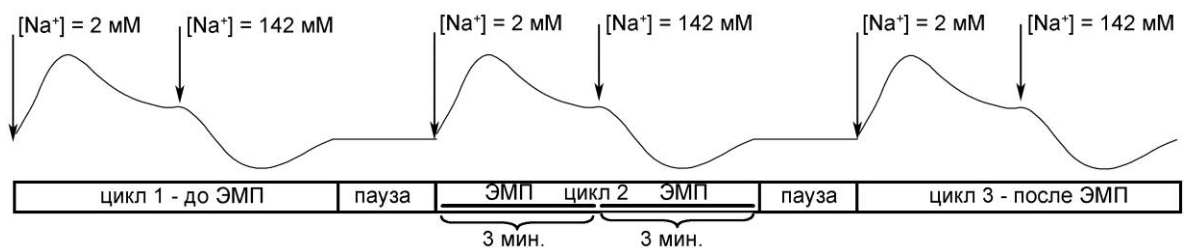


Рисунок 3.6. Схема проведения экспериментальных исследований перфузии изолированного сердца в группе изолированных сердец, подверженных экспозиции ЭМП

Таким образом, после первоначальной инициации процесса $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена (цикл 1) осуществлялось двухкратное повторение процесса накопления и выхода Ca^{2+} , в одном и том же изолированном сердце крысы, обозначив эти повторные манипуляции как цикл 2 и цикл 3.

При этом облучение проводили только во время второго цикла $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена. Такой прием позволял контролировать и сопоставлять исходные параметры $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в изолированных сердцах в первом цикле, т. е. до начала воздействия ЭМП, влияние ЭМП на $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмен во втором цикле, а также показатели $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в третьем цикле, при котором воздействие ЭМП на сердце прекращалось.

В результате проведенных экспериментальных исследований в первом цикле регистрации как скоростей поглощения и выхода ионов Ca^{2+} , так и концентраций накопленных и высвобожденных ионов Ca^{2+} при $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмене достоверных различий показателей между группами контроля и опыта не установлено (рисунок 3.7 и рисунок 3.8, соответственно).

Отсутствие достоверных различий показателей динамики $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в группах контроля (то есть без облучения) и опыта (то есть до облучения ЭМП) свидетельствовало об одинаковом исходном состоянии транспортных систем интактных изолированных сердец.

Во втором цикле экспериментальных исследований сердца опытной группы облучали ЭМП в течение 3-х минут как при снижении, так и при восстановлении прежней концентрации внеклеточного уровня натрия. При этом были получены результаты, которые демонстрируют графики скоростей (рисунок 3.9) и концентраций (рисунок 3.10) накопления и высвобождения ионов Ca^{2+} сердцем при иницировании $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена.

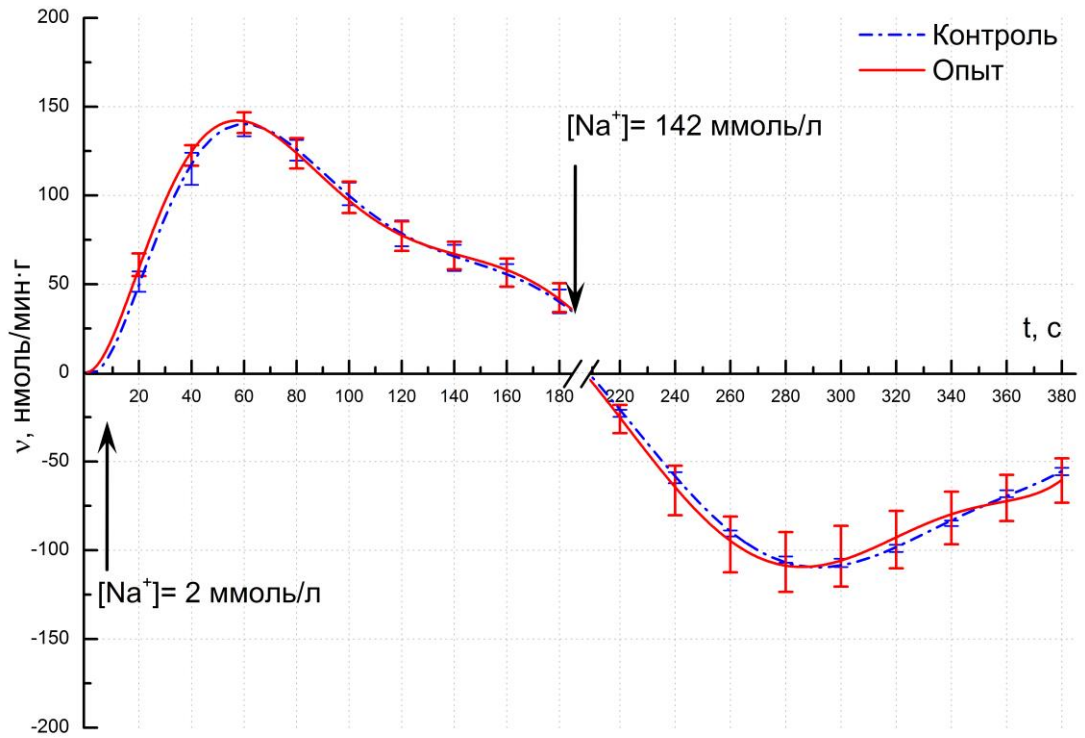


Рисунок 3.7. Динамика изменения скорости поглощения ($Na^+ = 2$ ммоль/л) и высвобождения ($Na^+ = 142$ ммоль/л) ионов Ca^{2+} в первом цикле экспериментальных исследований.

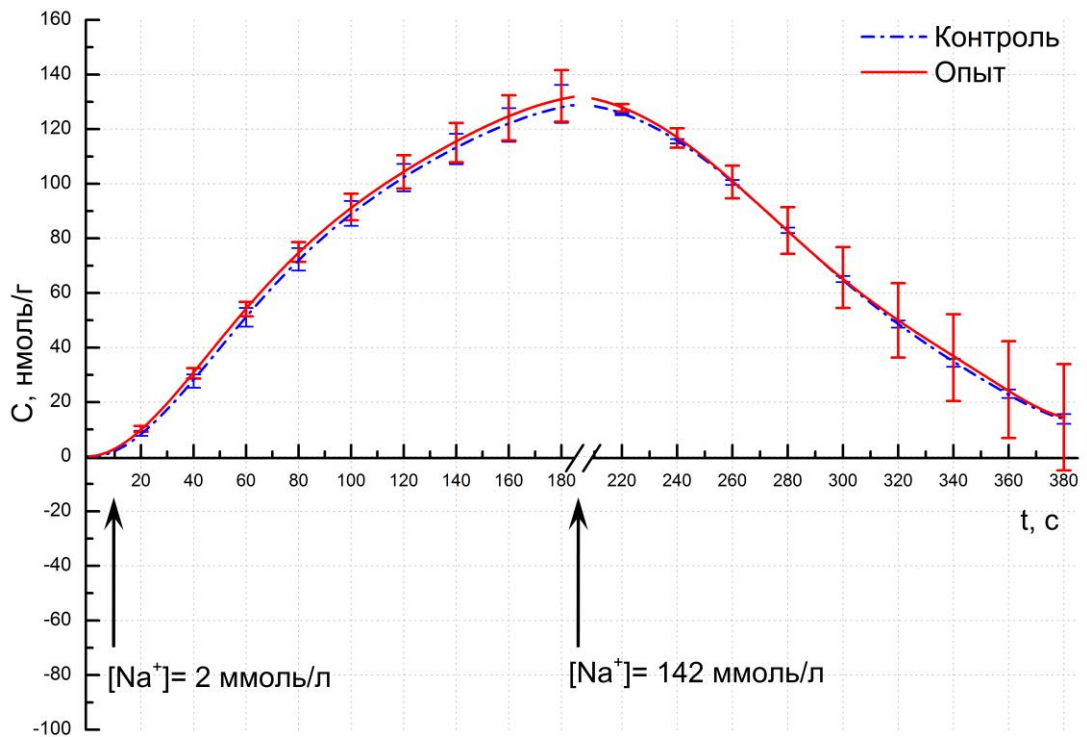


Рисунок 3.8. Динамика изменения концентрации накопленных ($Na^+ = 2$ ммоль/л) и высвобожденных ($Na^+ = 142$ ммоль/л) ионов Ca^{2+} в первом цикле экспериментальных исследований.

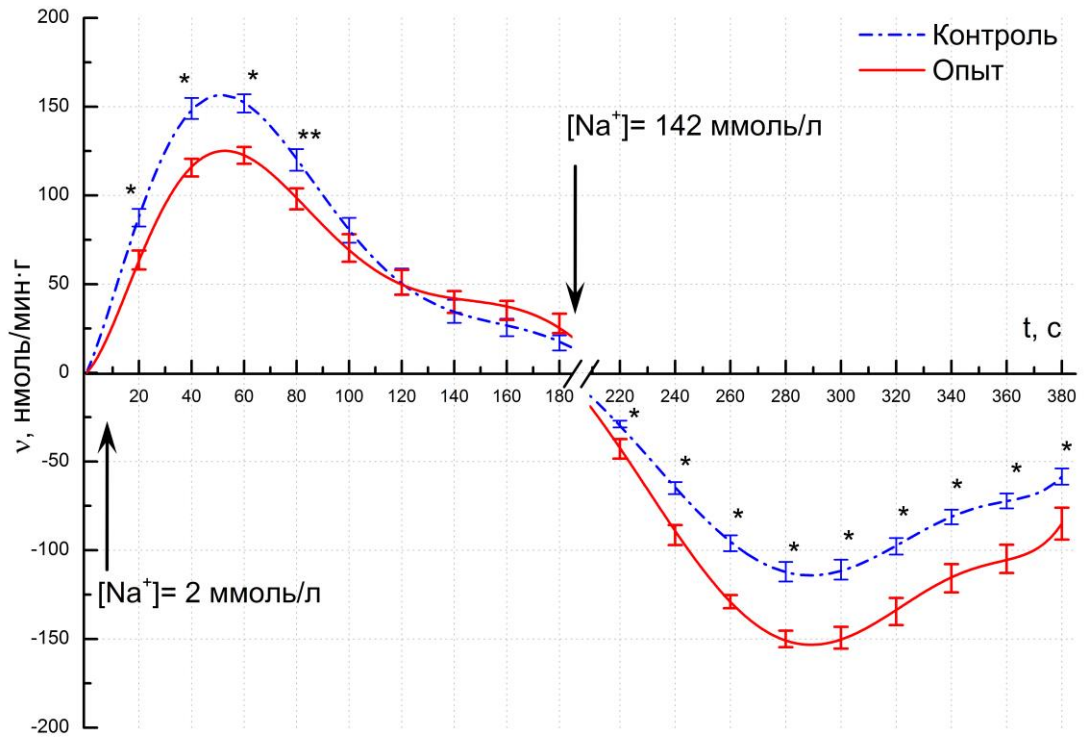


Рисунок 3.9. Динамика изменения скорости поглощения ($\text{Na}^+ = 2$ ммоль/л) и выхода ($\text{Na}^+ = 142$ ммоль/л) ионов Ca^{2+} во втором цикле экспериментальных исследований (* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$).

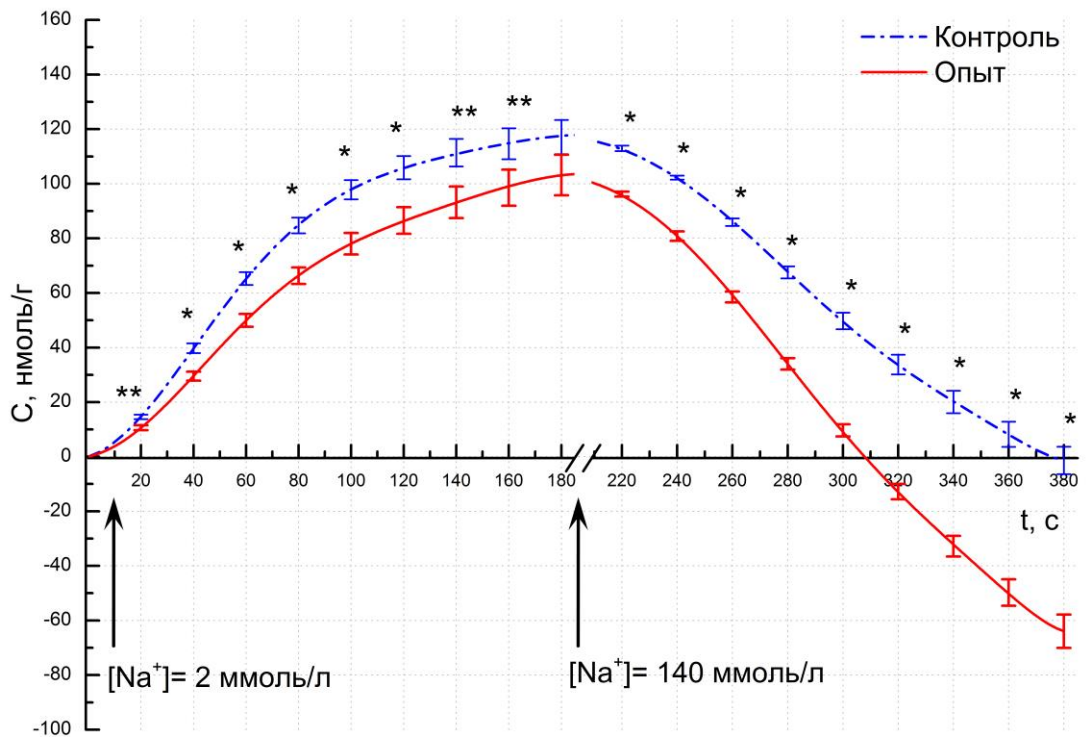


Рисунок 3.10. Динамика изменения концентрации накопленных ($\text{Na}^+ = 2$ ммоль/л) и высвобожденных ($\text{Na}^+ = 142$ ммоль/л) ионов Ca^{2+} во втором цикле экспериментальных исследований (* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$).

Во втором цикле регистрации скоростей поглощения и выхода Ca^{2+} при $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ экспозиция сердечной мышцы ЭМП приводила к достоверно значимому ($p < 0,01$) снижению скорости поглощения Ca^{2+} у опытной группы по сравнению с группой контроля. При этом концентрация накапливаемого Ca^{2+} во время облучения снижалась незначительно. Однако перевод процесса $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в сторону выведения Ca^{2+} из сердца сопровождался достоверным ($p < 0,01$) увеличением на 27 % концентрации выводимого Ca^{2+} из сердца у группы действительного облучения по сравнению с группой мнимого облучения.

3.4 Динамика процесса $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в интактном изолированном сердце крысы после облучения электромагнитным полем метрового диапазона

Во третьем цикле экспериментальных исследований регистрировались параметры $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в группах контроля и опыта (то есть после облучения электромагнитным полем метрового диапазона) как при снижении, так и при восстановлении прежней концентрации внеклеточного уровня натрия.

В третьем цикле инициации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена после экспозиции сердечной мышцы в опытной группе наблюдалось достоверное ($p < 0,01$) угнетение скорости аккумуляции ионов Ca^{2+} в процессе $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена по сравнению с группой контроля (рисунок 3.11). Концентрация поглощенного Ca^{2+} в процессе $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена после экспозиции ЭМП уменьшалась незначительно. Однако наблюдалось достоверное ($p < 0,01$) увеличение концентрации выводимого Ca^{2+} во время обмена внеклеточного Na^+ на внутриклеточный Ca^{2+} после экспозиции ЭМП сердечной мышцы у опытной группы на более чем 60% по сравнению с группой контроля (рисунок 3.12).

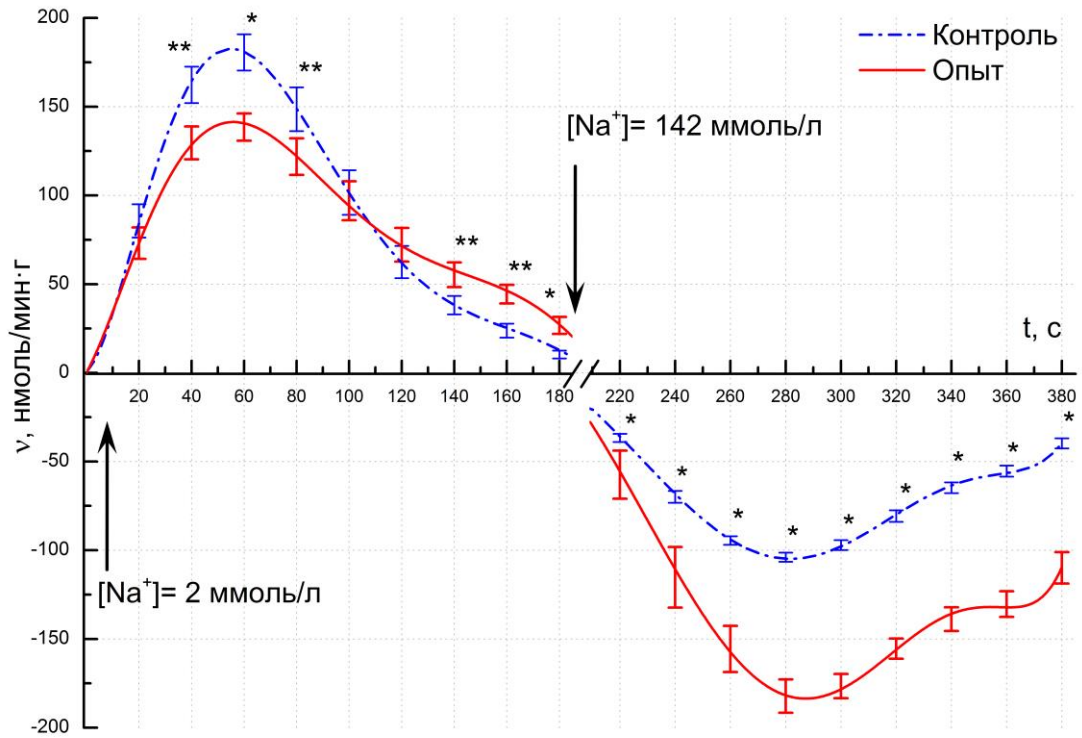


Рисунок 3.11. Динамика изменения скорости поглощения ($\text{Na}^+ = 2$ ммоль/л) и выхода ($\text{Na}^+ = 142$ ммоль/л) ионов Ca^{2+} в третьем цикле экспериментальных исследований (* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$).

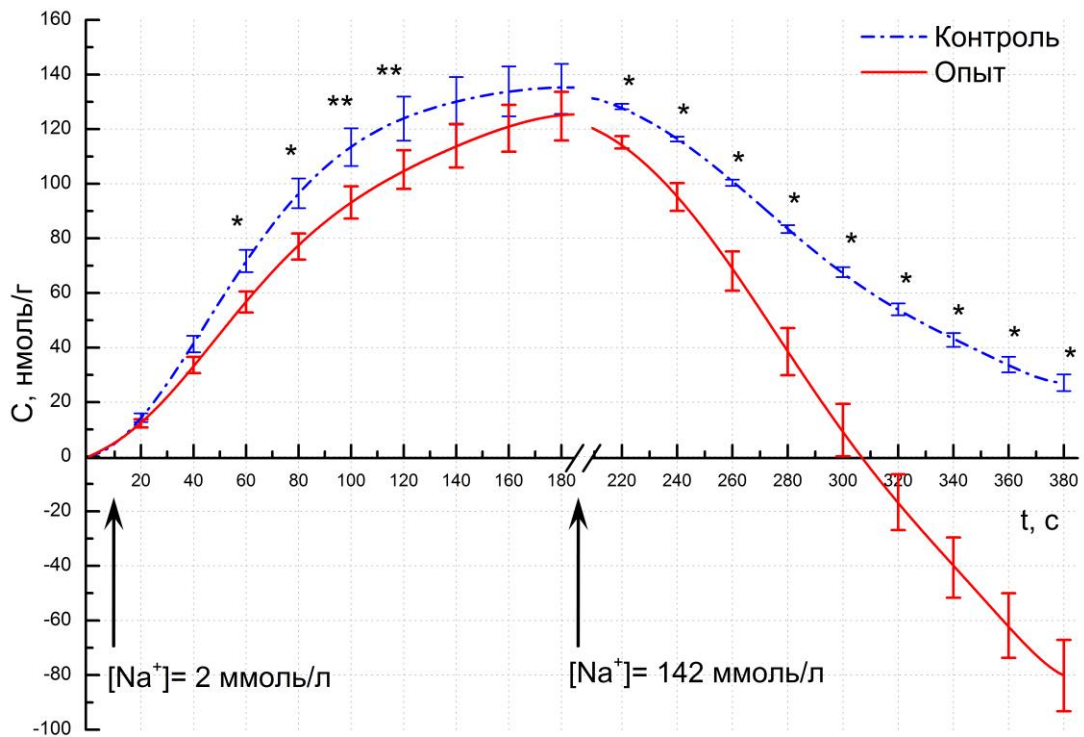


Рисунок 3.12. Динамика изменения концентрации накопленных ($\text{Na}^+ = 2$ ммоль/л) и высвобожденных ($\text{Na}^+ = 142$ ммоль/л) ионов Ca^{2+} в третьем цикле экспериментальных исследований (* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$).

Отметим, что в каждом цикле смен концентрации хлорида натрия как в процессе поглощения, так и в процессе выхода ионов Ca^{2+} момент максимальной скорости процесса $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена наблюдался к 60 секунде регистрации параметров. Таким образом, представлялось целесообразным проанализировать уровни концентрации накопленных и высвобожденных ионов Ca^{2+} в первом, втором и третьем циклах экспериментальных исследований через 1 минуту регистрации параметров.

В контрольной группе сердец к первой минуте с каждым повтором цикла инициации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена концентрация поглощенных ионов Ca^{2+} увеличивалась. Этот эффект объясняется постепенным повышением уровня ионов Na^+ в миоплазме сердца, которые более активно обменивались на внеклеточный Ca^{2+} . В группе опытных сердец к первой минуте во втором и третьем циклах исследований (в процессе и после экспозиции ЭМП соответственно) наблюдалось достоверное снижение ($p < 0,01$) концентрации поглощенных ионов Ca^{2+} по сравнению с группой контроля (рисунок 3.13.).

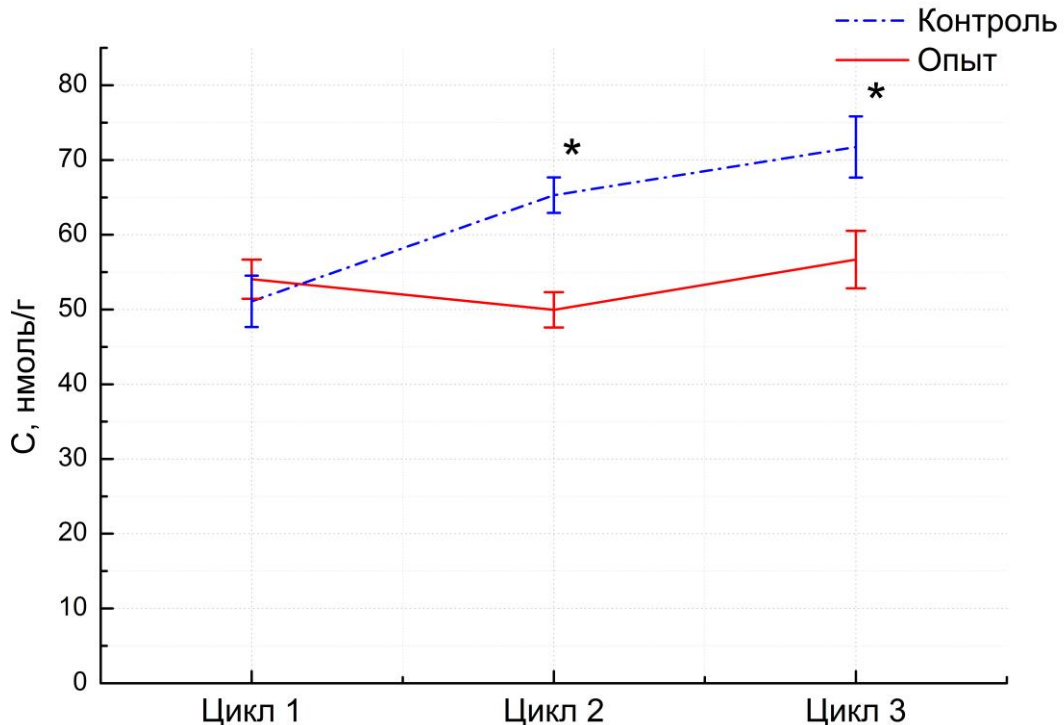


Рисунок. 3.13. Концентрация накопленных ($\text{Na}^+ = 2$ ммоль/л) ионов Ca^{2+} в первую минуту опытов при первом, втором и третьем циклах инициации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена (* $p < 0,01$).

Обратная картина наблюдалась в процессе выхода ионов Ca^{2+} . В контрольной группе сердец к первой минуте с каждым повтором цикла инициации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена концентрация высвобожденных ионов Ca^{2+} оставалась стабильной. Однако в группе опытных сердец к первой минуте во втором и третьем циклах исследований (в процессе и после экспозиции ЭМП соответственно) наблюдалось достоверное увеличение ($p < 0,01$) концентрации высвобожденных ионов Ca^{2+} по сравнению с группой контроля (рисунок 3.14).

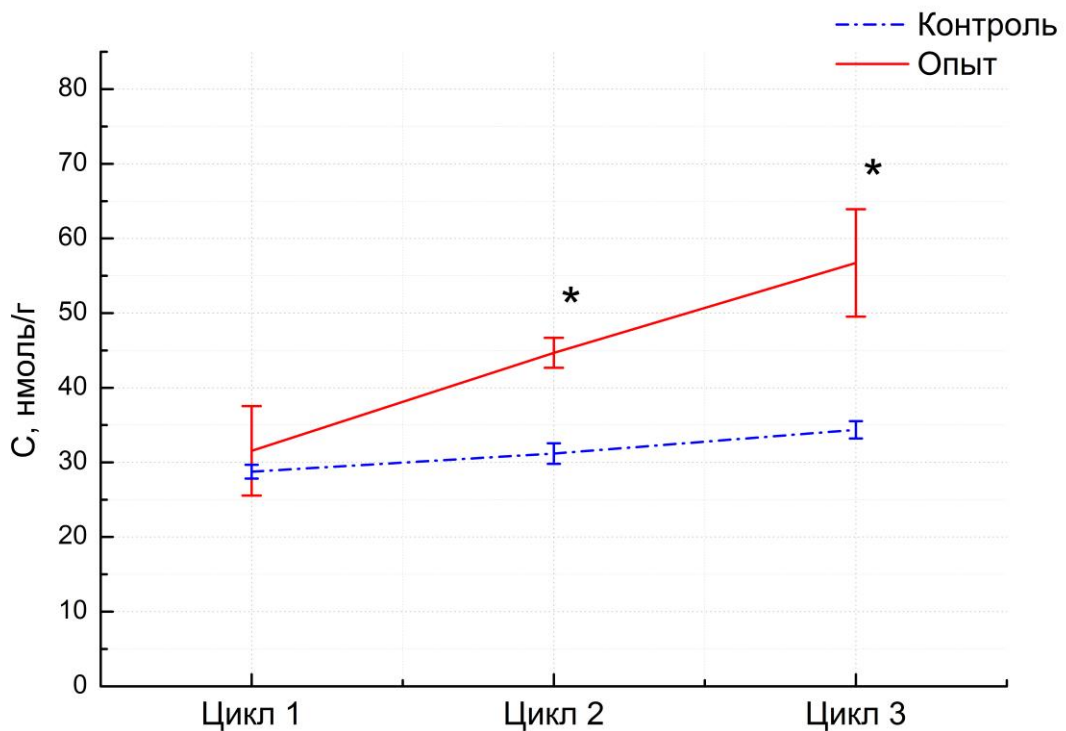


Рисунок. 3.14. Концентрация вышедшего Ca^{2+} в первую минуту опытов при первом, втором и третьем циклах инициации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в контроле и опыте. * $p < 0,01$

Исходя из полученных данных, в диссертационном исследовании было сделано предположение, что обнаруженные изменения процесса $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена под влиянием ЭМП метрового диапазона отражают, скорее всего, нарушения регуляции содержания внутриклеточного Ca^{2+} .

Обращает на себя внимание продолжение изменений $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена после прекращения влияния ЭМП на сердце. Отметим, что концентрация

высвобожденных ионов Ca^{2+} из сердца в третьем цикле экспериментов к концу регистрации параметров $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена увеличивалась на 18 % по сравнению с концентрацией высвобожденных ионов Ca^{2+} из сердца во втором цикле экспериментов, т.е. во время экспозиции ЭМП (таблица 3.3.). Несмотря на отсутствие облучения в третьем цикле экспериментов, наблюдаемые эффекты второго цикла не только не исчезают, а напротив, еще больше усиливаются. Все это говорит о сложных внутриклеточных изменениях гомеостаза ионов Ca^{2+} во время и после действия ЭМП на сердце в условиях эксперимента.

Таблица 3.3.

Сопоставление показателей $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в сердце во время и после воздействия ЭМП (* $p < 0,05$).

Время эксперимента	Количество поглощенного Ca^{2+} (нмоль/г)		Количество удаляемого Ca^{2+} (нмоль/г)	
	2 цикл (n = 9)	3 цикл (n = 9)	2-й цикл (n = 8)	3-й цикл (n = 9)
60 с	50,00±2,36	56,70±3,85	44,70±2,00	56,72±7,19
120 с	86,53±4,88	105,19±7,07*	116,02±2,83	141,43±10,21*
180 с	103,20±7,41	124,75±8,90*	167,15±6,09	204,94±13,07*

Активация выхода Ca^{2+} из кардиомиоцитов посредством $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена обычно происходит в условиях повышенного уровня Ca^{2+} в миоплазме кардиомиоцитов. Избыток внутриклеточного Ca^{2+} способствует ослаблению скорости их поступления в кардиомиоциты и стимулирует выведение его ионов из сердца в обмен на внеклеточный Na^+ . Источником повышения концентрации цитоплазматического Ca^{2+} чаще всего является саркоплазматический ретикулум [90].

Данный вывод соответствует известным данным о способности ЭМП ослаблять транспорт Ca^{2+} саркоплазматическим ретикулумом, полученного из сердец крыс [39].

В исследовании [136] выдвинуто предположение, что увеличение выхода Ca^{2+} происходит за счет активации потенциалуправляемых кальциевых каналов мембраны L-типа в результате действия ЭМП. Однако,

состояние транспортного $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменника при этом сохраняется, по-видимому, интактным, поскольку скорость транспорта Ca^{2+} во время $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена снижается только при поглощении ионов Ca^{2+} и значительно усиливается в сторону выведения Ca^{2+} из клеток.

Вместе с тем, нельзя не принимать во внимание возможность инициирования свободнорадикальных процессов в миокарде при действии ЭМП, которые могут оказывать значительное влияние на саркоплазматический ретикулум сердца крысы [63, 169]. Таким образом, повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} за счет высвобождения их из саркоплазматического ретикулума при инициировании ЭМП перекисного окисления может служить причиной усиления выхода Ca^{2+} из сердца через механизм $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена.

Глава 4 Влияние электромагнитного поля на уровень свободного $[Ca^{2+}]_i$ в изолированных кардиомиоцитах крысы в зависимости от состояния перекисного окисления липидов

Исходя из данных, полученных в предыдущей главе, возникла необходимость количественной оценки внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} и характера ее изменения в условиях экспозиции ЭМП метрового диапазона длин волн, в том числе оценка эффекта последействия. Однако оценка действия ЭМП на транспортную функцию Na^+/Ca^{2+} обмена сопряжена с проблемой комплексного влияния электромагнитной энергии на протекающие процессы, в том числе в миокарде. Повреждение мембран клеток миокарда сопровождается, как правило, потерей ими ионов K^+ и Mg^{2+} , увеличением внутриклеточного содержания ионов Na^+ и Ca^{2+} , а также гипергидратацией кардиомиоцитов.

При электрическом возбуждении кардиомиоцитов открываются потенциалчувствительные Na^+ -каналы, а вслед за ними - потенциалуправляемые K^+ -каналы и Ca^{2+} -каналы. Концентрация ионов Ca^{2+} в цитоплазме достигает 830 нмоль/мл, причем увеличение концентрации ионов Ca^{2+} на 20% определяется его входом через «медленные» потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы, а 80% - за счет выхода ионов Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума [175]. Высвобождение ионов Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума (СР) обеспечивают два механизма: обратный захват ионов Ca^{2+} в СР с помощью Са-АТФазы, локализованной в мембране СР, и Na^+/Ca^{2+} обменного механизма [78].

При нормальной оксигенации кардиомиоцитов диастолическая концентрация свободных ионов Ca^{2+} в цитоплазме поддерживается на уровне 125 нмоль/л - 145 нмоль/л, и в основном это определяется работой Na^+/Ca^{2+} -ионообменника, локализованного в сарколемме. В состоянии покоя небольшое количество ионов Ca^{2+} поступает в клетку через K^+ -каналы, а выброс ионов Ca^{2+} из саркоплазмы обеспечивается Na^+/Ca^{2+} -антипортером;

тогда как потенциалзависимые $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -каналы закрыты. Внутриклеточная концентрация свободных ионов Na^+ поддерживается в диапазоне значений 6,9 - 8,7 ммоль/л [154].

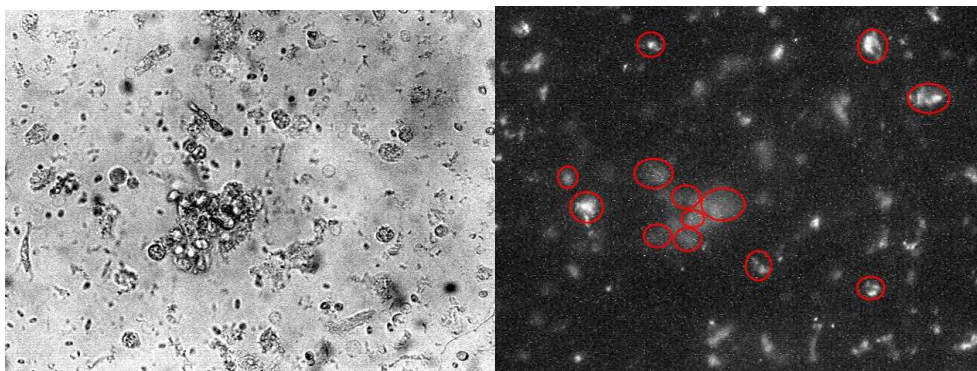
Увеличение уровня внутриклеточного Ca^{2+} происходит, главным образом, благодаря действию двух механизмов: притоку катиона из межклеточной жидкости (где его концентрация значительно выше, чем в кардиомиоцитах) и перераспределением ионов Ca^{2+} между различными участками клетки, в частности, в результате выхода катионов в цитоплазму из саркоплазматического ретикулума [27].

В условиях недостатка кислорода в 1,5 - 2 раза увеличивается уровень Na^+ в клетке. Повышение концентрации внутриклеточного Na^+ даже на 10% вызывает активацию $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена, при котором транспорт ионов изменяет направление: из кардиомиоцита наружу выходит 3 иона Na^+ , а в клетку поступает один ион Ca^{2+} и, как следствие, наблюдается увеличение цитоплазматической концентрации ионов Ca^{2+} , что обуславливает нарушение сердечного ритма и запускает каскад сложных биохимических процессов, приводящих к структурным повреждениям и гибели кардиомиоцитов [100]. Таким образом, важным звеном в изучении механизма действия ЭМП на $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмен, является оценка концентрации ионов $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в условиях *in vitro* с минимальным влиянием на процессы жизнедеятельности клетки, и в особенности, без повреждений плазматических мембран. Использование зонда Fura-2, обеспечивающего связывание зонда со свободным Ca^{2+} , сопровождается сдвигом спектра возбуждения Fura-2 и позволяет с большой точностью оценить уровень внутриклеточного $[\text{Ca}^{2+}]_i$ независимо от концентрации зонда в клетке. Такой подход позволяет оценить влияния ЭМП на $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмен как в чистой культуре, так и при добавлении определенных агентов для снижения возможных эффектов облучения в целях понимания механизмов действия на несвязанный кальций в клетках.

4.1 Определение концентрации $[Ca^{2+}]_i$ в интактных изолированных кардиомиоцитах крысы

В соответствии с поставленными задачами, была проведена серия экспериментов по оценке уровня $[Ca^{2+}]_i$ в исходном состоянии, а также после облучения культуры клеток кардиомиоцитов с добавлением антиоксиданата и в его отсутствии.

В исходном состоянии, после проверки жизнеспособности культуры клеток кардиомиоцитов на питательных подложках, в условиях постоянного смачивания, первый образец размещался на предметном столе инвертированного микроскопа Nikon TMS (x30) с монохромной цифровой видеокамерой RS-170 CCD (Cohu) (рисунок 4.1. а) и с использованием программного обеспечения InCytIm2 выбирались несколько областей размещения клеток кардиомиоцитов для дальнейшего анализа (рисунок 4.1. б). Для каждой серии использовались разные образцы культуры кардиомиоцитов, полученных из одного центрифугированного осадка с клетками миокарда. Для обеспечения достоверности результатов каждой серии эксперимента выбиралось не менее 12 областей культуры клеток, регистрация внутриклеточной концентрации осуществлялась параллельно на протяжении всего эксперимента.



а)

б)

Рисунок 4.1. Общий вид образца культуры клеток кардиомиоцитов (а) и выделенные области для анализа внутриклеточной концентрации $[Ca^{2+}]_i$ использованием программного обеспечения InCytIm2

4.2 Изменение уровня $[Ca^{2+}]_i$ в изолированных кардиомиоцитах крысы при действии электромагнитного поля

В первой серии экспериментов с помощью компьютерной системы анализа внутриклеточного содержания ионов были выбраны 13 отдельных свежевыведенных клеток кардиомиоцитов. Затем осуществляли регистрацию уровня $[Ca^{2+}]_i$, который непрерывно измеряли в течение 10 минут каждые 5 секунд. Первые 10 минут регистрации показателей служили контролем. Затем осуществлялась экспозиция кардиомиоцитов в течение 3 мин. вблизи источника излучения на частоте 171 МГц с напряженностью электрического поля 180 В/м. После облучения производилась повторная 10-минутная регистрация показателей (рисунок 4.2).

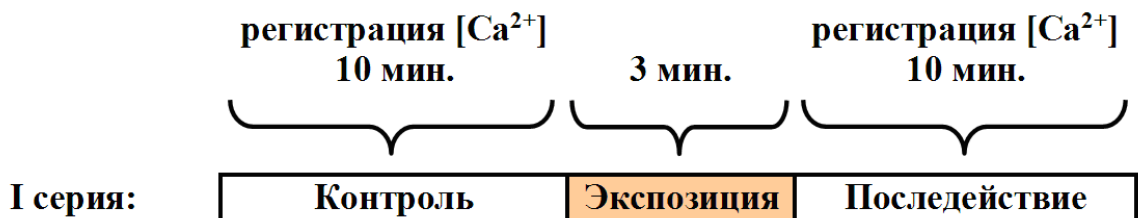


Рисунок 4.2. Схема проведения эксперимента.

После регистрации исходных концентраций для каждой группы клеток осуществлялась экспозиция образца на предметном столе инвертированного микроскопа в течении 3 минут при напряженности ЭМП 180 В/м на частоте 171 МГц. Регистрация концентрации внутриклеточного в процессе экспозиции не осуществлялась в связи с наводкой излучающего оборудования на регистрирующее. По окончанию облучения осуществлялась регистрация изменений концентрации внутриклеточного кальция на тех же областях клеток что и в контроле в течение 10 минут. Полученные данные в первой серии представлены в таблице 5.1. Анализируя данные можно обратить внимание, что достоверные различия отмечаются на протяжении всего времени регистрации, причем в группе контроля среднеквадратичное отклонение составило в среднем 8,3%, тогда как при экспозиции отклонение

от средних значений уменьшилось более чем в 2 раза. Подобная динамика уменьшения среднеквадратичного отклонения наблюдается и для максимальных мгновенных концентраций для группы опыта по сравнению с группой контроля (контроль - 16,6%, опыт - 10,2%).

Таблица 4.1.

Средние значения концентрации $[Ca^{2+}]_i$ для группы контроля и опыта за каждые 30 сек в течение 10 минут

Время, сек	Концентрация $[Ca^{2+}]$ в контрольной группе, нмоль/л	Концентрация $[Ca^{2+}]$ в облученной группе, нмоль/л
0	61,29±10,16	102,57±10,49*
30	57,29±7,51	108,29±4,22*
60	68,86±7,97	99,29±3,97*
90	75±9,46	92,57±3,1
120	61,43±4,43	100,71±2,17*
150	72,14±6,86	102,57±4,45*
180	67,14±3,7	101,14±2,91*
210	72,14±7,03	107,14±4,32*
240	79,14±7,02	110,29±3,77*
270	83,57±7,05	98,43±2,66*
300	61,71±2,63	108±6,07*
330	78,57±7,69	103,86±1,87*
360	78,43±6,26	110,14±4,9*
390	81,57±4,42	114,43±5,78*
420	77,86±7,74	99,29±4,07*
450	73,29±2,66	106,57±4,53*
480	86,57±5,59	103,57±4,59*
510	76,14±3,03	110±4,31*
540	73,86±2,18	97,71±4,42*
570	75,14±3,44	109,86±4,11*
600	61,29±10,16	102,57±10,49*

* - $p < 0,05$

Усредненные результаты по всем группам кардиомиоцитов первой серии эксперимента в течение 10 минут представлены на рисунке 4.3.

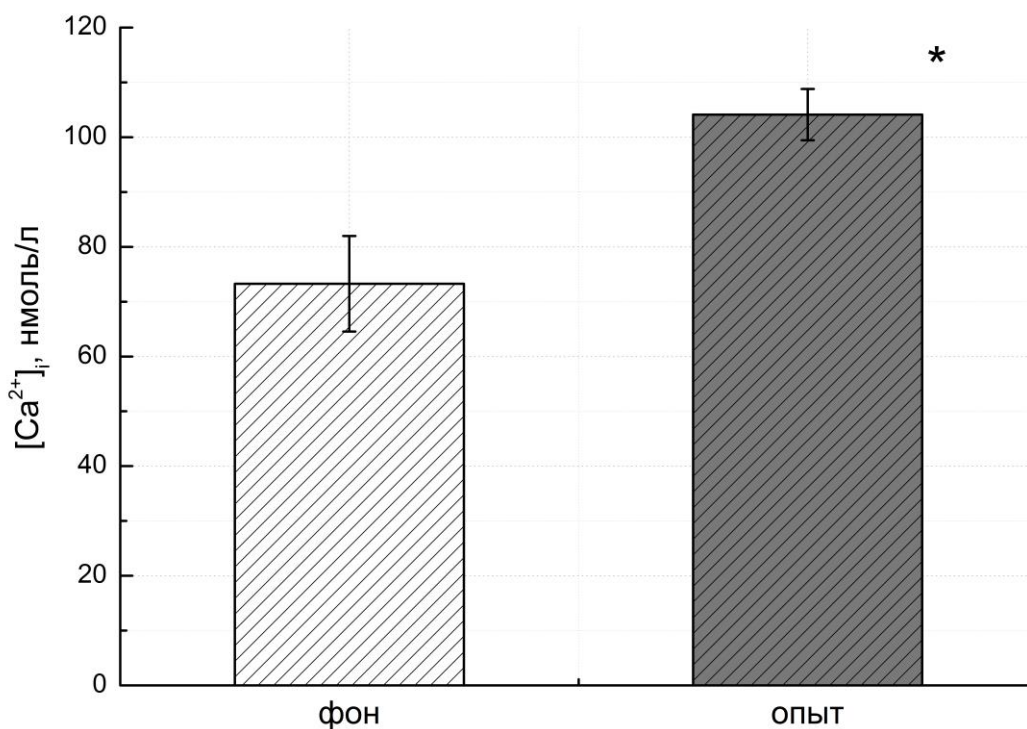


Рисунок 4.3. Содержание $[Ca^{2+}]_i$ в кардиомиоцитах до (исходные величины) и после облучения ЭМП частотой 171 МГц. * $p < 0,05$

Результаты первой серии экспериментов показывают, что 3-х минутное облучение кардиомиоцитов ЭМП частотой 171 МГц с напряженностью 180 В/м приводит к достоверному повышению $[Ca^{2+}]_i$ по сравнению с исходным уровнем.

Анализ литературных источников показал, что воздействие ЭМП нарушает баланс между процессами окисления и восстановления в клетках, который сдвигается в сторону окисления. В основе регуляции внутриклеточного кальция, в том числе как частный случай процесс Na^+/Ca^{2+} обмена, важную роль играют активные формы кислорода, что подтверждается данными, полученными рядом исследователей [21, 25, 26].

Исходя из этого, было выдвинуто предположение о влиянии инициируемого в результате воздействия ЭМП перекисного окисления липидов на уровень внутриклеточного Ca^{2+} . В соответствии с этим, в следующей экспериментальной серии, изучалось влияние антиоксиданта на

уровень $[Ca^{2+}]_i$ по сравнению с исходным содержанием в условиях отсутствия экспозиции ЭМП.

4.3 Влияние ингибитора перекисного окисления липидов гистохрома на содержание $[Ca^{2+}]_i$ в кардиомиоцитах крысы при действии электромагнитного поля

Одним сопутствующих факторов повреждения миокарда являются свободнорадикальные процессы [26, 42]. Для клеток, в частности сердечной мышцы, наибольшую опасность представляет окисление полиненасыщенных жирных кислот. В этих реакциях образуется большое количество липидных гидроперекисей, которые обладают высокой реакционной способностью и оказывают мощное повреждающее действие на клетку. При возобновлении кровотока в ишемизированном участке миокарда наблюдается резкое повышение продуктов O^{2-} , H_2O_2 , OH^- и липидных радикалов. Наряду с этим, происходит снижение антиоксидантной активности клетки (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы) [13]. Это ограничивает способность клеток купировать АФК. В качестве объектов, подверженных воздействию АФК, выступают липиды и аминокислоты [141]. АФК нарушают связывание ионов Ca^{2+} с тропонином [108] и взаимодействуют с другими сократительными белками кардиомиоцитов, приводят к накоплению внутриклеточного Ca^{2+} [21, 25.] и вызывают нарушение сократительной способности миокарда [117].

Для ослабления негативных последствий ишемии и реперфузии одной из наиболее эффективных способов лечения является введение веществ, подавляющих АФК. Исходя из того, что наибольшее образование АФК происходит в первые минуты реперфузии, наибольший эффект антиоксидантной терапия будет наблюдаться при проведении ее в ишемический или ранний реперфузионный период [13].

В соответствии с предложенной выше гипотезой о влиянии ПОЛ на внутриклеточную концентрацию кальция и саркоплазматический ретикулум, в следующей экспериментальной серии данного диссертационного исследования изучалось влияние антиоксиданта гистохром на уровень $[Ca^{2+}]_i$ по сравнению с исходным содержанием в условиях отсутствия экспозиции ЭМП [9], причем максимальный протекторный эффект гистохрома может проявляться в первые минуты окислительного стресса [11].

Во второй серии экспериментов количество исследуемых клеток, условия облучения и регистрации показателей концентрации ионов $[Ca^{2+}]_i$ были идентичны первой, однако для оценки влияния ЭМП на процессы Na^+/Ca^{2+} обмена в кардиомиоцитах с учетом действия антиоксиданта, был использован антиоксидант гистохром (эхинохром-2,3,5,7,8-пентагидрокси-б-этил-1,4-нафтахинон, 2 %, ТИБОРХ, Россия), являющийся «перехватчиком» свободных радикалов в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ % (рисунок 2.9).

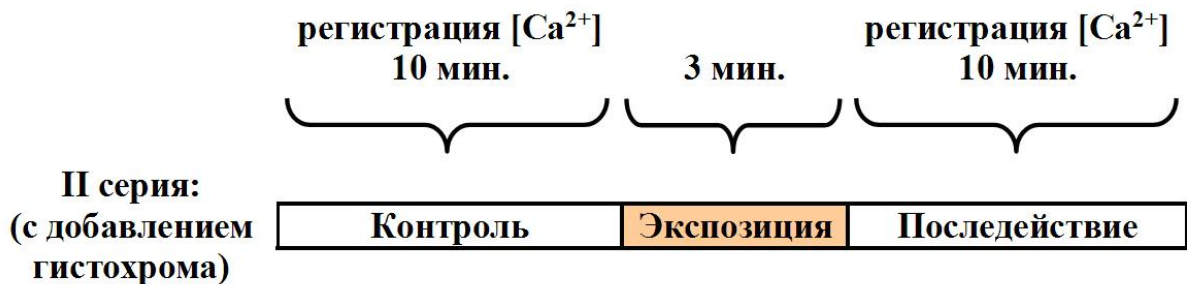


Рисунок 4.4. Схема проведения эксперимента.

Полученные результаты показывают достоверное снижение $[Ca^{2+}]_i$ в присутствии гистохрома по сравнению с исходным содержанием (рисунок 4.5).

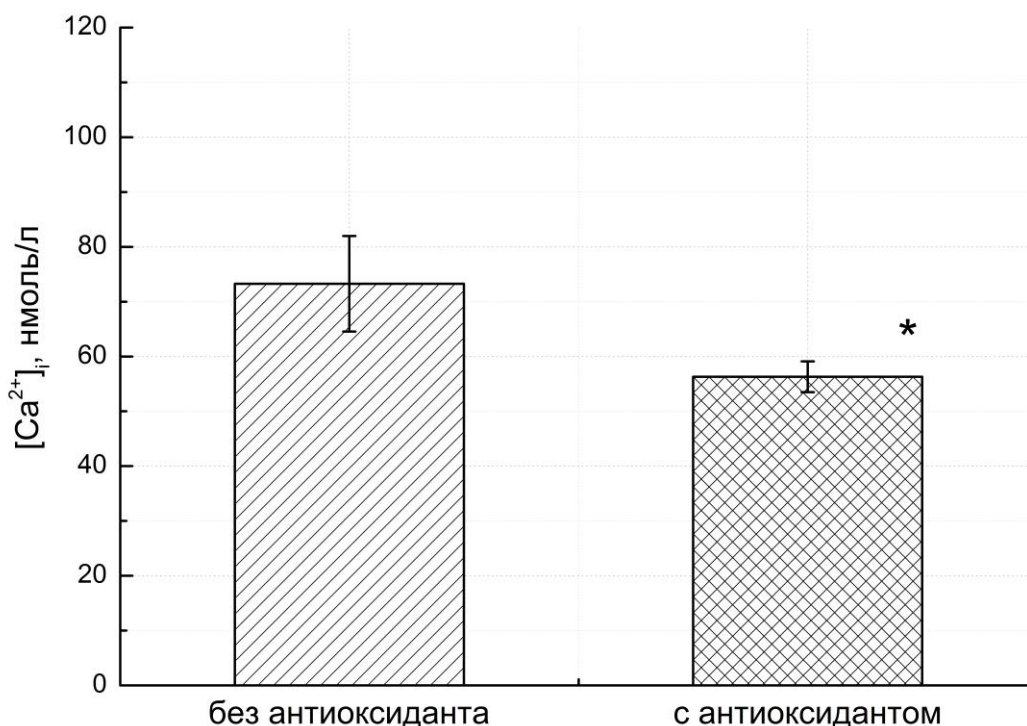


Рисунок 4.5. Влияние присутствия гистохрома на уровень $[Ca^{2+}]_i$ по сравнению с исходным в условиях отсутствия воздействия ЭМП. * $p < 0,05$

Полученные результаты хорошо согласуются с данными других авторов об использовании оксирадикалов в процессах регуляции внутриклеточного кальция, а также Na^+/Ca^{2+} обмена в клетке [35, 92]. Можно предполагать, что антиоксидант замедляет выход $[Ca^{2+}]_i$ из саркоплазматического ретикулума, но не приводит к значимым необратимым нарушениям Na^+/Ca^{2+} обмена и обеспечивает снижение активных форм кислорода при отсутствии воздействия внешнего фактора.

В следующей серии экспериментов изучалось действие ЭМП метрового диапазона длин на уровень $[Ca^{2+}]_i$ в кардиомиоцитах с использованием антиоксиданта (гистохрома). Результаты показывают, что экспозиция ЭМП также достоверно увеличивает внутриклеточную концентрацию кальция по сравнению с исходным уровнем концентрации. Полученные данные второй серии представлены в таблице 4.2. Достоверные отличия отмечаются на протяжении всего времени регистрации, причем внутригрупповое различие среднеквадратичных отклонений как в

контрольной, так и в опытной группе между собой снижается и не превышает 7,2%, что может свидетельствовать о стабилизации внутриклеточной концентрации свободного кальция даже в условиях экспозиции.

Таблица 4.2.

Средние значения концентрации $[Ca^{2+}]_i$ для группы контроля и опыта за каждые 30 сек в течение 10 минут

Время, сек	Концентрация $[Ca^{2+}]_i$ в контрольной группе, нмоль/л	Концентрация $[Ca^{2+}]_i$ в облученной группе, нмоль/л
0	54,86±2,78	65,86±3,28*
30	57,71±3,79	70,71±3,58*
60	50,43±2,68	67,43±2,87*
90	57,14±4,83	69,43±5,95
120	55,43±2,5	65,86±4,57*
150	57±4,18	66,14±5,18
180	55±4,19	72,71±5,64*
210	55,14±4,45	71±3,46*
240	58,43±2,75	67,29±5,53
270	55,71±4,24	63,43±3,42
300	58,29±5,87	67,57±6,35
330	54,86±5,91	70,14±3,86*
360	56,43±3	63,71±3,04
390	59,71±6,07	66,43±6,56
420	59,86±5,68	69,29±3,73
450	58±4,03	65±4,09
480	58,86±4,85	72±5,78
510	58,71±4,97	73,86±4,73*
540	59,71±4,51	67,43±5,28
570	57,14±2,6	71,71±5,65*
600	54,86±2,78	65,86±3,28*

* - $p < 0,05$

Однако, по сравнению с уровнем концентрации $[Ca^{2+}]_i$ в кардиомиоцитах без антиоксиданта после облучения, уровень внутриклеточного кальция с гистохромом после действия ЭМП достоверно ниже, но не достигает исходного состояния 2 серии эксперимента (рисунок 4.6).

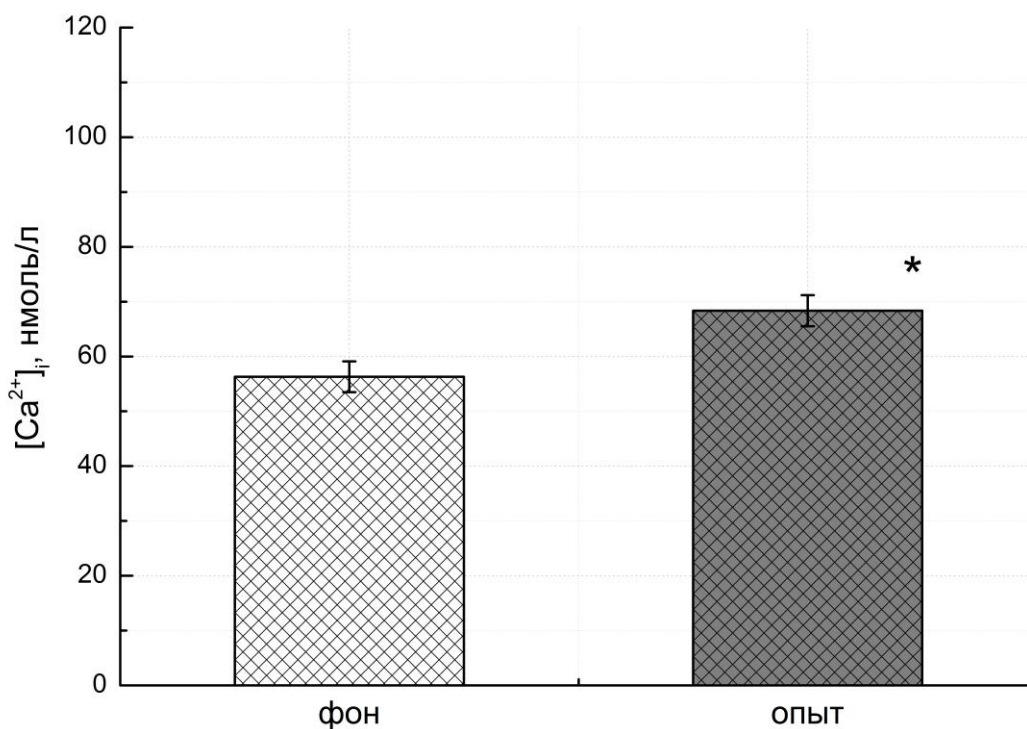


Рис. 4.6. Уровень внутриклеточного $[Ca^{2+}]_i$ в кардиомиоцитах после облучения без антиоксиданта (без гистохрома) и в его присутствии (с гистохромом); * $p < 0,05$

Установлено, что у гистохрома реализуется действие «перехватчика» свободных радикалов, который стабилизирует клеточные мембраны, взаимодействует с активными формами кислорода, свободными радикалами, снижает количество продуктов перекисного окисления липидов и, в результате, способствует устранению повреждения его кальций-транспортирующей системы. Данные наших экспериментов на модели зрелых кардиомиоцитов крыс в условиях экспериментального окислительного стресса, вызванного облучением ЭМП, позволяют утверждать, что гистохром в концентрации 2×10^{-4} % снижает повреждающее действие H_2O_2 . При этом гистохром снижает уровень $[Ca^{2+}]_i$ у облученных кардиомиоцитов, во время действия пероксида водорода.

Глава 5 Оценка уровня перекисного окисления липидов в сыворотке крови крыс при действии электромагнитного поля

5.1 Моделирование и экспериментальная оценка условий экспозиции крыс и величины поглощенной ими энергии электромагнитного поля

Состояние перекисного окисления липидов является интегральным показателем главнейших окислительно-восстановительных биохимических процессов, определяющих функциональное состояние организма в целом. Низкая интенсивность реакций образования АФК и продуктов ПОЛ соответствует нормальным метаболическим процессам, таким как клеточное деление, обновление ядерных мембран и так далее. Конечными продуктами процесса ПОЛ являются альдегиды. Из них, в качестве биомаркеров окислительного стресса, служат ДК и МДА [76]. Помимо липидов, очень чувствительными к воздействию свободных радикалов являются также белки и нуклеиновые кислоты. Наиболее известными продуктами окисления белков являются белковые карбонилы [75, 151]. Малейшее изменения в их структурах приводят к нарушению функционированию клеток, тканей и состоящих из них органов [85].

Важной особенностью при постановке эксперимента является определение оптимального размещения биологических объектов в области источников экспозиции ЭМП. Для этого в рамках исследования было проведено математическое моделирование условий экспозиции для обоснования требуемых напряженностей ЭМП, причем верификация модели условий облучения осуществлялась на основании данных экспериментальных измерений уровней напряженности поля от типового источника ЭМП метрового диапазона длин волн.

Результаты проведенных измерений показали, что уровни электрической составляющей ЭМП в зависимости от удаления от источника

изменяются в пределах от 180 В/м до 10 В/м. Сравнение полученных величин показало удовлетворительное согласование с имеющимися в литературе данными аналогичных измерений. Величина электрической составляющей ЭМП у раций, работающих в диапазоне 150-162,45 МГц по некоторым данным находилась в пределах от 5 В/м до 95 В/м, а у рации с выходной мощностью 5,0 Вт с частотой 144 МГц на расстоянии 15 см от антенны эта величина была 25 В/м [67, 105]. Высокие уровни ЭМП – вплоть до 180 В/м – были получены вблизи антенн нескольких радиостанций [10]. На расстояниях от 10 до 100 см от антенн раций работающих в диапазоне частот 147-174 МГц величина электрической составляющей ЭМП находилась в пределах от $2,0 \pm 0,5$ В/м до 136 ± 18 В/м [98, 177].

Сравнительный анализ полученных экспериментальных путем и в результате численного моделирования данных по величине электрической составляющей ЭМП позволяет предполагать удовлетворительное их соответствие. Из рисунка 5.1 следует, что на расстоянии более 10 см различия в уровнях напряженности электрического поля становятся не значимыми, что свидетельствует об однородности ЭМП. Распределение электрической составляющей ЭМП можно оценить визуально на рисунке 5.1 с помощью градуированной цветной шкалы. Уровни напряженности ЭМП в плоскости параллельной корпусу источника и на расстояниях 10 см, 15 см, 20 см и 30 см (рисунок 5.2) характеризуется незначительными искажениями, значения которых уменьшаются при увеличении расстояния. При этом средние значения уровней электрического поля на расстоянии 10 см (рисунок 5.2. а) составляли 90 В/м, на расстоянии 15 см (рисунок 5.2. б) - 60 В/м, на расстоянии 20 см (рисунок 5.2. в) - 30 В/м, а на расстоянии 30 см (рисунок 5.2. г) - 10 В/м. Для обеспечения однородности поля при размещении биологических объектов для облучения были выбраны указанные расстояния.

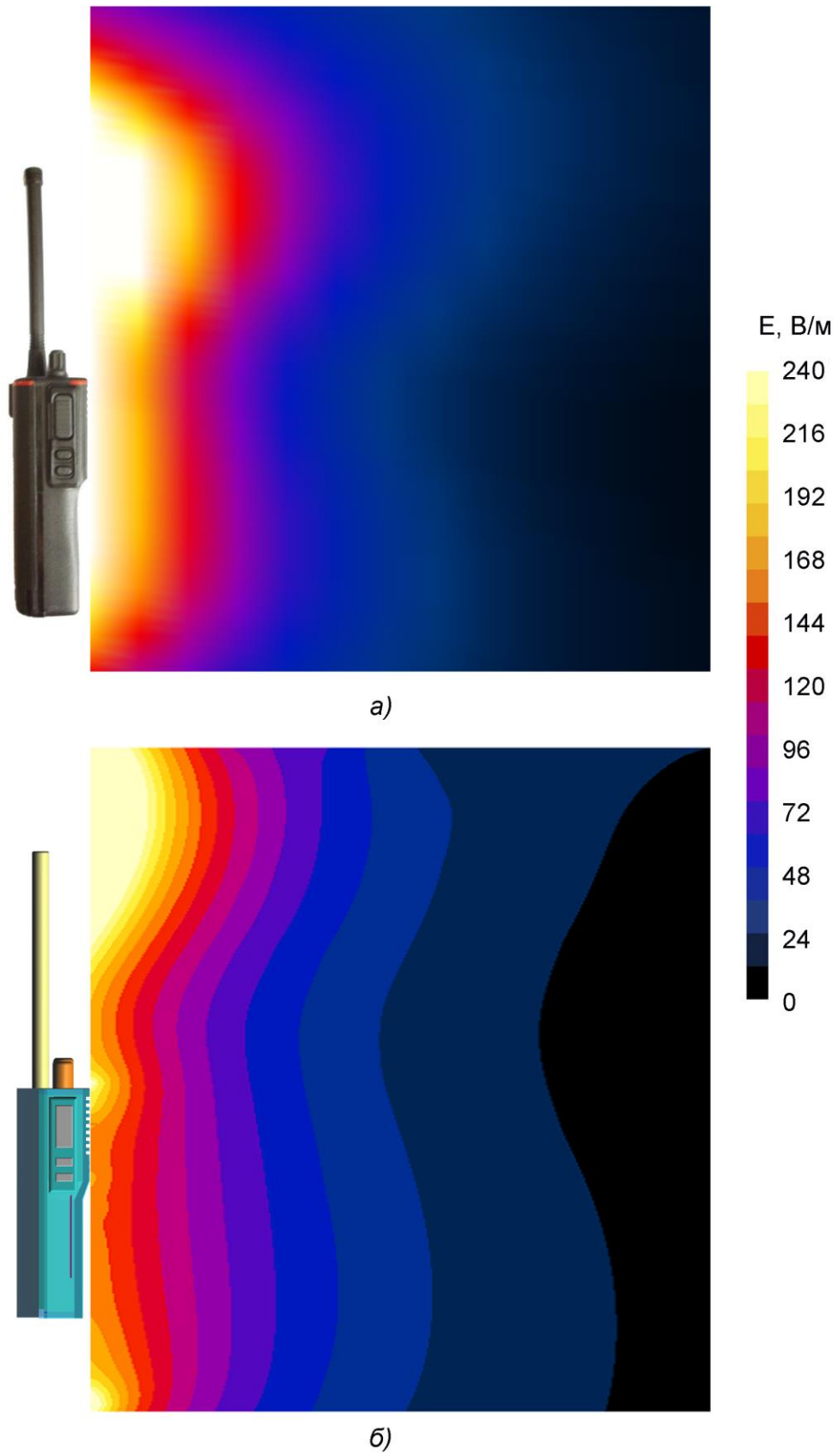


Рисунок 5.1. Распределение напряженности электрического поля по результатам измерений (а) и моделирования (б)

Распространенные в настоящее время носимые средства связи как источники ЭМП характеризуются той особенностью, что в процессе эксплуатации находятся в непосредственной близости от человека. Во время работы этих устройств и в зависимости их от расположения происходит облучение головного мозга, зрительного анализатора, щитовидной железы, сердца и других органов пользователя. Таким образом, в рамках исследований представляло интерес размещение животных головой к источнику ЭМП. По результатам оценки уровней ЭМП максимальные уровни напряженности электрического поля в данной области составляли 180 В/м (рисунок 5.2 д). В этом случае в среднем на тело крысы приходится 60 В/м.

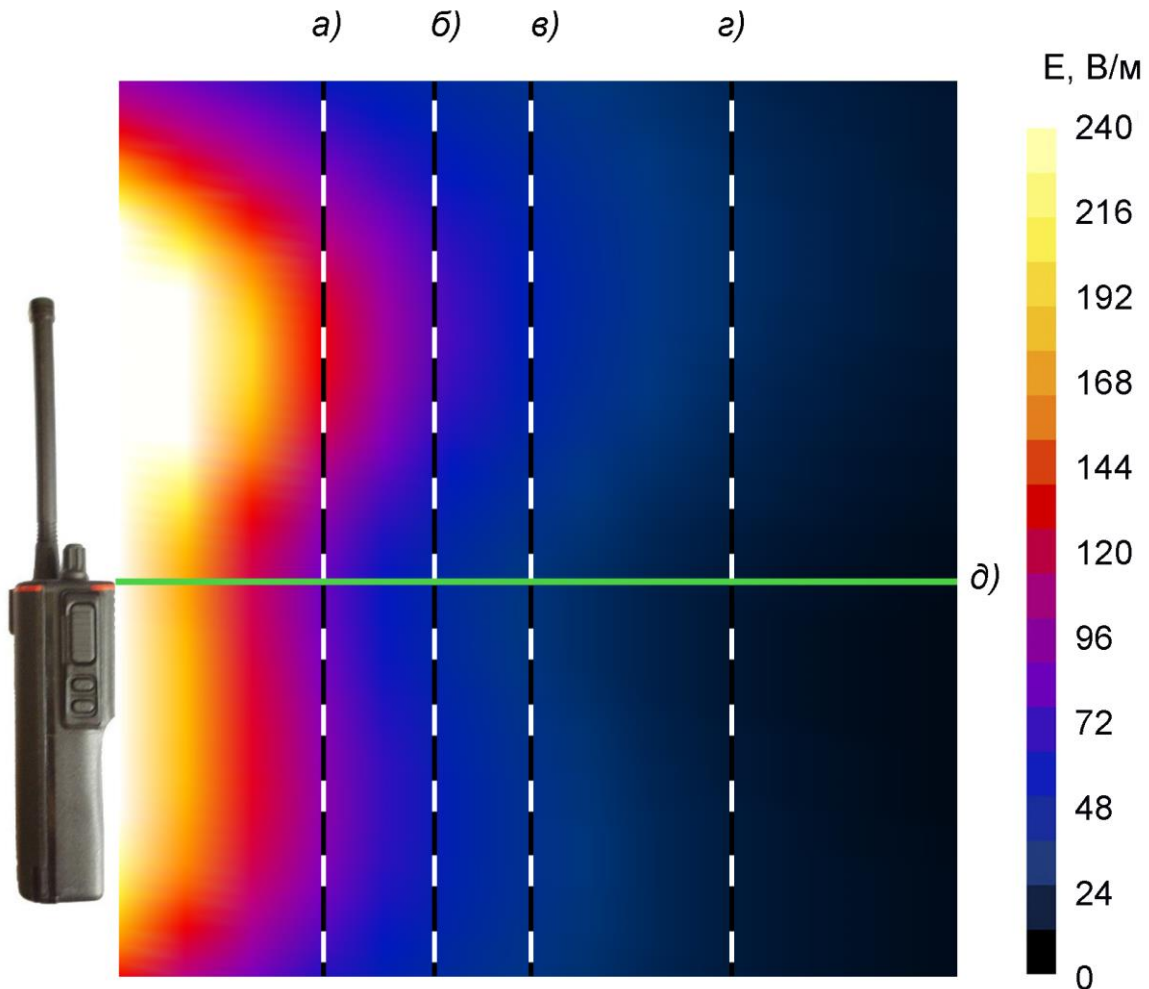


Рисунок 5.2. Варианты размещения крыс на расстояниях 10 см (а), 15 см (б), 20 см (в), 30 см (г) и головой к источнику (д).

После определения структуры и уровней экспозиции в соответствии с задачами исследования для оценки количества поглощенной энергии были использованы численные фантомы крыс (SPEAG AG, Швейцария) с более чем 40 тканями (рисунок 5.3). Такие модели позволяют предварительно оценить распределение энергии в теле животного, облученного ЭМП а так же установить уровни УПМ, приходящейся как на весь объем крысы, так и на отдельные органы и ткани [111].



Рисунок 5.3. Численная модель крысы (различные варианты визуализации органов и тканей одного фантома).

Величины и характер распределения УПМ в модели крысы, полученные в результате теоретического моделирования в случае расположения фантомов животных в областях, где среднее значение напряженности электрической составляющей ЭМП, приходящееся на все тело составило 90 В/м, 60 В/м, 30 В/м и 10 В/м, представлены на рисунке 5.4.

Численные результаты расчетов УПМ для рассматриваемых органов и тканей представлены в таблице 5.1.

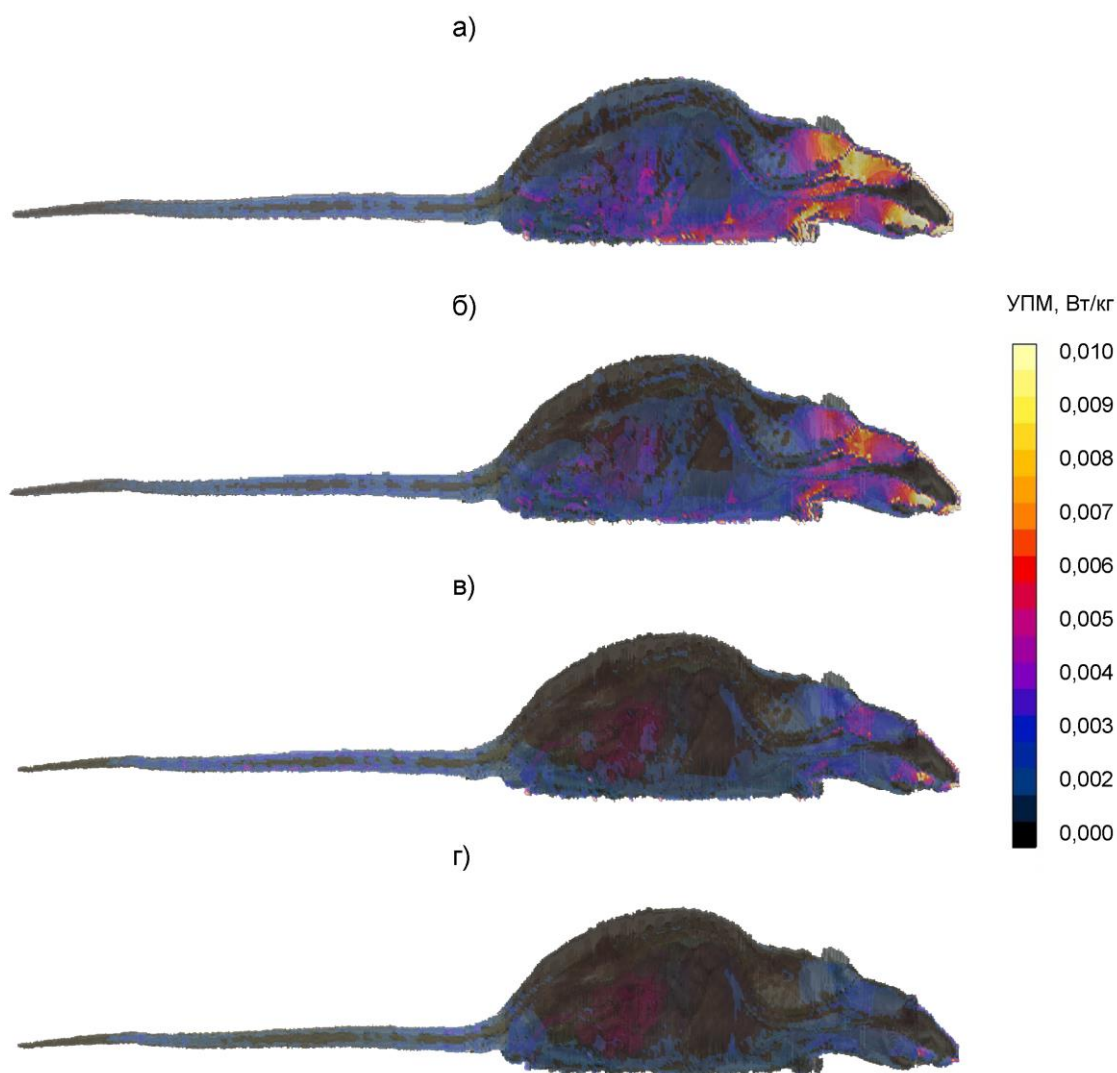


Рисунок. 5.4. Распределение УПМ при облучении модели крысы со стороны живота при уровнях ЭП 90 В/м (а), 60 В/м (б), 30 В/м (в) и 10 В/м (г).

Таблица 5.1.

Значения максимальных и средних значений УПМ в различных органах экспонированных животных

Исследуемые ткани и органы	УМП _{макс} , мВт/кг				УМП _{ср} , мВт/кг			
	90 В/м	60 В/м	30 В/м	10 В/м	90 В/м	60 В/м	30 В/м	10 В/м
Вся крыса	92,81	47,16	16,54	2,64	0,45	0,26	0,12	0,03
Мозг	6,38	4,35	2,35	0,50	0,61	0,41	0,22	0,05
Сердце	0,49	0,28	0,13	0,05	0,20	0,13	0,07	0,02
Печень	1,68	0,92	0,37	0,07	0,13	0,08	0,04	0,01
Кровь, сосуды	22,54	9,99	3,46	1,63	0,32	0,20	0,11	0,03

Величины и характер распределения УПМ в сагиттальной и поперечной плоскостях модели крысы, полученные в результате теоретического моделирования в случае расположения источника на расстоянии 6 мм от головы животного представлены на рисунке 5.5. Уровни напряженности электрической составляющей ЭМП соответствовали 180 В/м, и были подтверждены измерениями в ближней зоне источника излучения.

Максимальное значение УПМ для всего тела численного фантома крысы составило 183,71 мВт/кг. Усредненные на все тело крысы значения УПМ составили 0,25 мВт/кг.

По результатам моделирования численного фантома крысы, максимальные значения УПМ находилась в тканях кровеносных сосудов (7,79 мВт/кг), мозга (2,83 мВт/кг), сердца (0,48 мВт/кг) и печени (0,45 мВт/кг). Следует отметить, что, несмотря на максимальные значения УПМ, наибольшие средние значения УПМ распределились таким образом: в мозге (0,83 мВт/кг), кровеносных сосудах (0,35 мВт/кг), в сердце (0,22 мВт/кг) и печени (0,09 мВт/кг).

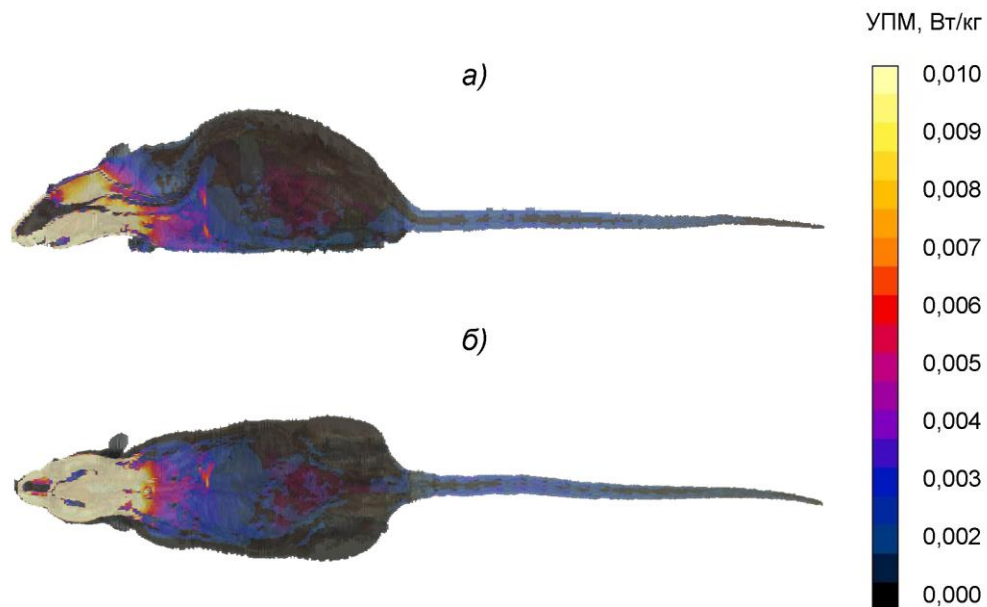


Рисунок 5.5. Распределение УПМ в сагиттальной (а) и поперечной (б) плоскостях модели крысы при облучении фантома со стороны головы

В исследованиях помимо целой крысы также оценивалось поглощение энергии в головном мозге, сердце, печени, а также в сосудах и крови животного. Численные результаты расчетов УПМ для основных органов и тканей представлены в таблице 5.2.

Таблица 5.2

Значения максимальных и средних значений УПМ в различных органах фантома крысы

Исследуемые ткани и органы	УМП _{макс} , мВт/кг	УМП _{сред} , мВт/кг
Вся крыса	183,71	0,25
Мозг	2,83	0,83
Сердце	0,48	0,22
Печень	0,45	0,09
Кровь, сосуды	7,79	0,35

Анализ структуры распределения УПМ в области сердца показал, что максимум поглощения наблюдался в нижней части сердца, что способствовало значимому расхождению между максимальным и средним значениями УПМ и показывало достаточно неоднородное распределение поглощения энергии ЭМП в сердечной мышце. Такая неоднородность была вызвана не только сложной геометрией исследуемого органа, но и влиянием окружающих тканей и органов, которые вносили искажение в структуру ЭМП.

В связи с существующими сложностями проведения оценки поглощенной электромагнитной энергии биологическими объектами, а также изучения механизмов действия ЭМП на протекающие биофизические и биохимические процессы в живом организме возможным путем оценки взаимодействия ЭМП с биологическими структурами является математическое моделирование [132]. Полученные данные о структурах распределения энергии в числовой модели крысы показывают не только сложный характер распределения, но позволяют ориентировочно оценить количество энергии для отдельных органов и тканей в условиях облучения всего животного. Безусловно, большие расхождения между максимальными

и средними значениями УПМ в представленных данных таблиц 5.1. и 5.2. при разных условиях экспозиции указывают на сложный характер распределения поглощаемой электромагнитной энергии. Анализ данных моделирования строится в первую очередь на средних значениях поглощения энергии ЭМП тканью или органом исходя из макроскопического анализа (на уровне всего органа или ткани). Максимальные значения УПМ показывают локальные максимумы поглощения или так называемые "горячие точки", которые могут оказывать сильное влияние на регистрируемые показатели в условиях "острого" биологического эксперимента. Исходя из полученных данных, а также данных ряда исследований других авторов, можно предполагать, что одним из критических органов в текущих условиях экспозиции выступает сердечно-сосудистая система, в частности, сердце [170, 171, 172].

5.2 Содержание малонового диальдегида в сыворотке периферической крови крыс при воздействии электромагнитного поля в зависимости от интенсивности и времени экспозиции

Изучение процессов окислительного стресса у лабораторных животных включало определение концентрации продуктов ПОЛ, а так же оценку общей антиокислительной активности в сыворотке крови при облучении ЭМП метрового диапазона.

Помимо ПОЛ, в различных исследованиях установлены изменения функций сердечно-сосудистой системы при действии ЭМП – снижение артериального давления (гипотония), замедления ритма сокращения сердца (брадикардия) и замедление внутрижелудочковой проводимости [140,163, 166]. В последнее время проблема изучения влияния ЭМП на сердечно-сосудистую систему стала особенно актуальной. Поскольку в сократительной активности сердца первостепенное значение имеет механизм регуляции Ca^{2+} , представляет особый интерес изучение влияния ЭМП на транспортные системы, обеспечивающие этот процесс.

Известно, что для изучения интенсивности ПОЛ широко применяется метод оценки уровня МДА, как конечного продукта ПОЛ [1, 37, 74]. Отметим, что этот показатель в интегральном виде отражает процесс окиссации липидных мембран клеток в условиях воздействия ЭМП.

В данной диссертационной работе для экспериментального исследования влияния ЭМП метрового диапазона на количество МДА животные случайным образом были распределены на 16 групп по 12 крыс в каждой группе. Исследования включали 4 серии экспериментов, в которых крысы подвергались облучению ЭМП частотой 170 МГц с напряженностью 10, 30, 60 и 90 В/м в течении 1 и 3 часов, для каждой группы животных соответствовал свой контроль. Во время облучения животные размещались в специальных радиопрозрачных контейнерах строго параллельно к источнику ЭМП (рисунок 5.6.).

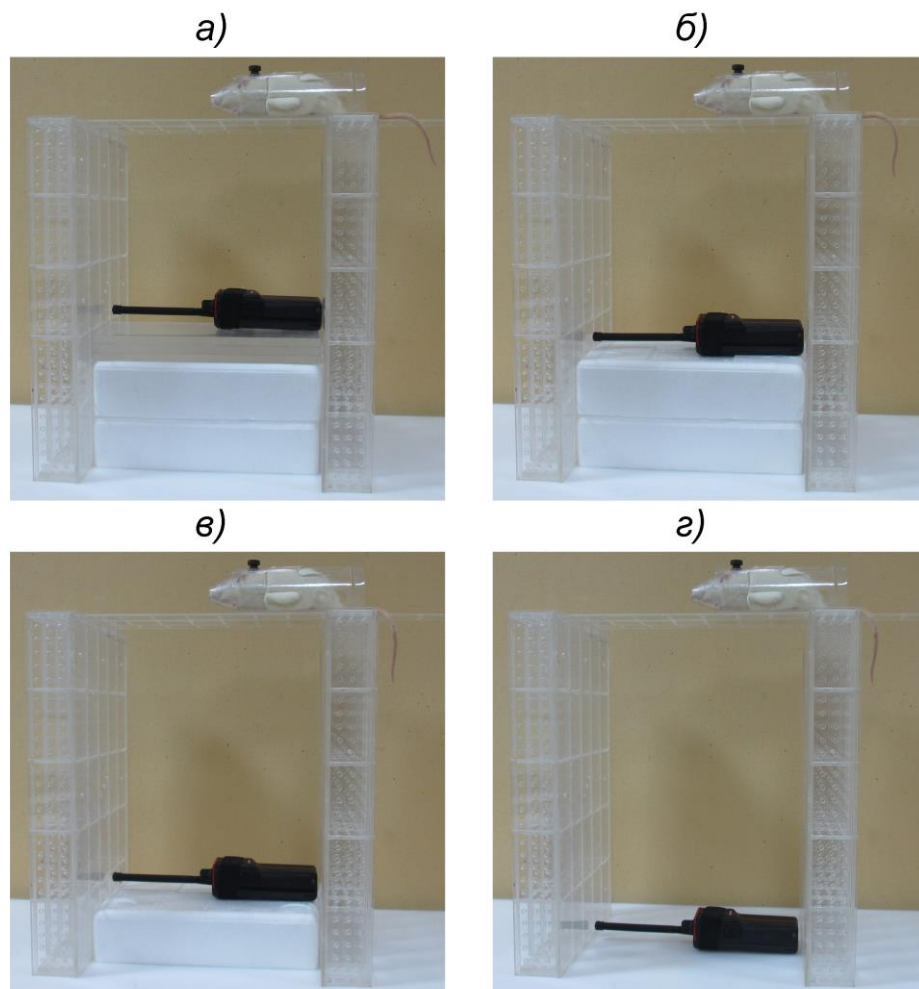


Рисунок 5.6. Размещение биологического объекта над источником

Опыты показали, что облучение ЭМП животных уровнями напряженности электрического поля в пределах от 10 до 60 В/м в течение 1 часа не сопровождается статистически достоверными изменениями концентраций малонового диальдегида. При облучении животных в течение 1 часа ЭМП с уровнями напряженности электрического поля 90 В/м наблюдались статистически значимые различия ($p < 0,01$) по сравнению с контролем, которые характеризовались увеличением уровня малонового диальдегида в сыворотке крови облученных животных (рисунок 5.7).

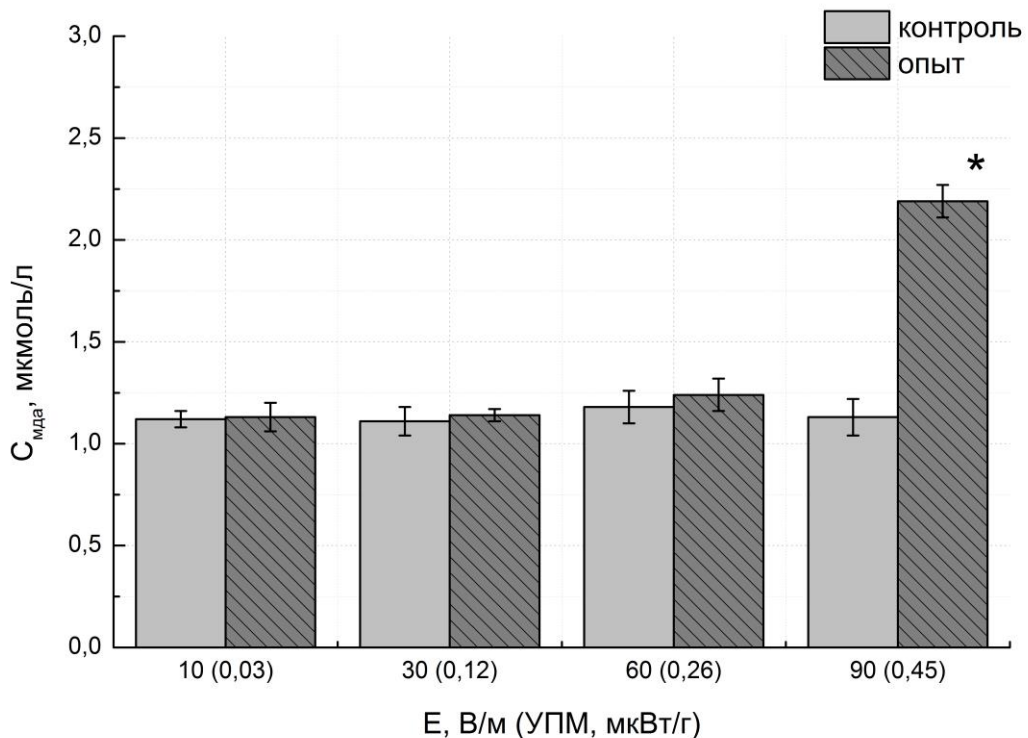


Рисунок 5.7. Изменение концентрации малонового диальдегида при облучении животных различными уровнями напряженности электрического поля в течение 1 часа. * - $p < 0,01$

В следующих сериях опытов длительность облучения ЭМП повышали до 3-х часов.

Облучение ЭМП животных с уровнем напряженности электрического поля 10 В/м в течение 3-х часов не сопровождалось статистически достоверным различием. Однако при увеличении напряженности электрического поля до 30 В/м наблюдалось возрастание концентрации

малонового диальдегида в сыворотке ($p < 0,05$), а при напряженностях 60 и 90 В/м уровень малонового диальдегида увеличивался еще более значительно (рисунок 5.8).

Таким образом, полученные результаты демонстрируют накопление конечного продукта ПОЛ под влиянием ЭМП. Причем это возрастание хорошо коррелирует с уровнями напряженности электрического поля и длительностью воздействия ЭМП на организм животного.

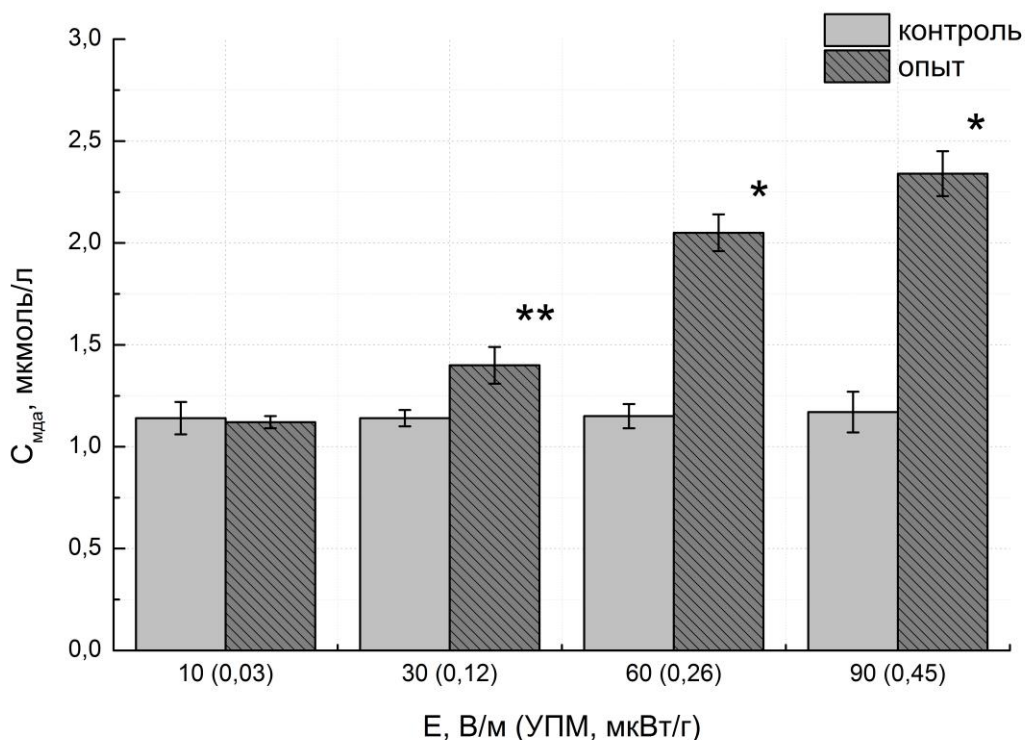


Рисунок 5.8. Изменение концентрации малонового диальдегида при облучении животных различными уровнями напряженности электрического поля в течение 3-х часов. * - $p < 0,01$; ** - $p < 0,05$

5.3 Влияние продолжительности экспозиции электромагнитным полем на содержание диеновых конъюгатов и кетодиенов в сыворотке крови крыс

Обнаружив способность ЭМП повышать содержание конечного продукта ПОЛ - МДА, стало актуальным выяснение возможности влияния электромагнитного излучения на концентрацию продуктов ПОЛ при

меньшей длительности экспозиции - от 9 до 30 минут, а также при однодневном и пятидневном сроках воздействия.

В последующих сериях опытов влияние ЭМП оценивалось с помощью других показателей интенсивности ПОЛ – диеновых конъюгатов и кетодиенов. Состояние антиоксидантной системы определялось путем измерения общей антиоксидантной активности плазмы крови [16].

Животные размещались в индивидуальных радиопрозрачных контейнерах головой к источнику излучения (рисунок 5.9). В зависимости от длительности воздействия ЭМП в экспериментальных исследованиях были выделены следующие серии:

I. Однократная экспозиция длительностью 9 минут, с 30 секундным интервалом каждые 3 минуты.

II. Ежедневная экспозиция животных в одно и тоже время в течение пяти дней длительностью 9 минут, с 30 секундным интервалом каждые 3 минуты.

III. Ежедневная экспозиция животных в одно и тоже время в течение пяти дней длительностью 30 минут, с 30 секундным интервалом каждые 3 минуты.



Рисунок 5.9. Размещение биологического объекта перед источником ЭМП.

Поскольку для каждой серии облучения соответствовал свой контроль, а также контроль вивария, было изучено влияние на животных контейнера, в

которых они находились во время опыта, с животными, взятых непосредственно из вивария. Однако, в проведенных исследованиях не было обнаружено значимых, достоверных различий в концентрации диеновых конъюгатов сыворотки крови у двух групп животных.

Проведенные опыты с использованием однократной экспозицией ЭМП длительностью 9 минут, с 30 секундным интервалом каждые 3 минуты показали на достоверное увеличение (на 32%) концентрации диеновых конъюгатов в сыворотке крови ($p < 0,05$), (рисунок 5.10).

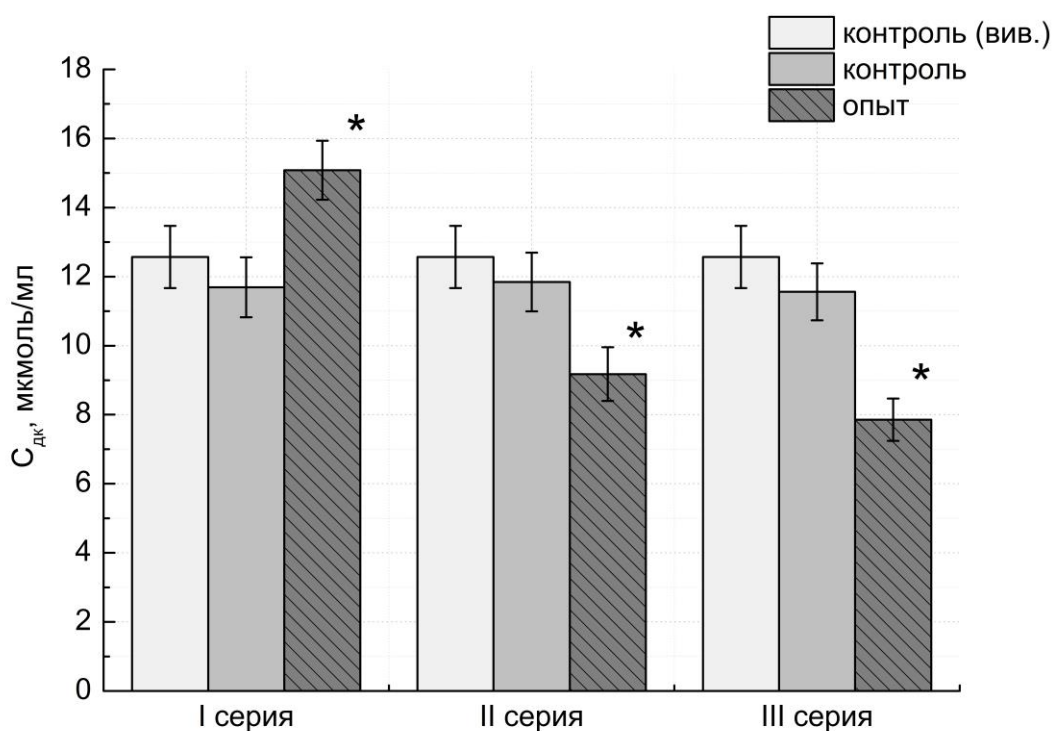


Рисунок 5.10. Влияние продолжительности экспозиции ЭМП на содержание в сыворотки крови животных диеновых конъюгатов. * $p < 0,05$

Установлено, что, в отличие от первой серии воздействие, экспозиция ЭМП в течение пяти дней снижает концентрацию диеновых конъюгатов на 22%, ($p < 0,05$). Увеличение ежедневной экспозиции животных ЭМП с 9 до 30 минут в течение пяти дней, в третьей серии экспериментов, сопровождалось еще более значительным снижением концентрация диеновых конъюгатов - на 35% ($p < 0,05$).

Таким образом, полученные результаты свидетельствует о влиянии ЭМП на процесс образования диеновых конъюгатов у животных, который, в определенной мере, отражает интенсивность протекания ПОЛ мембран клеток. Полученные данные, также, свидетельствуют о том, что интенсивность этого процесса зависит от длительности и периодичности воздействия ЭМП на организм животных.

Дальнейшие исследования показали, что однократная экспозиция ЭМП длительностью 9 минут, с 30 секундным интервалом каждые 3 минуты не влияла на уровень кетодиенов в сыворотке крови (рисунок 4.11).

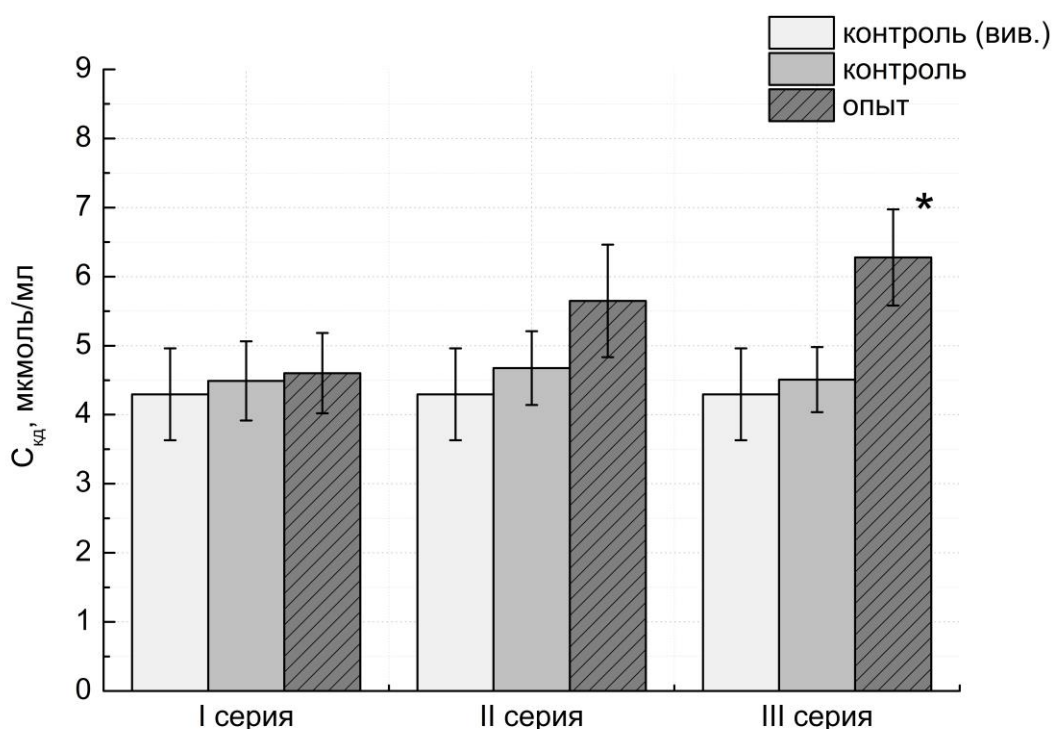


Рисунок 5.11. Изменение концентрации кетодиенов при различной длительности экспозиции животных. * $p < 0,05$

Экспозиция животных ЭМП течение пяти дней повышала уровень кетодиенов по сравнению с животными, находившихся в виварии ($p < 0,05$). В третьей серии экспериментов, когда в течение пяти дней экспозицию ЭМП осуществляли более длительно - 30 минут, концентрация кетодиенов достоверно возрастала на 35% ($p < 0,05$) по сравнению с обеими группами контроля. Исходя из полученных результатов, можно сделать заключение, о

способности ЭМП усиливать образование одного из продуктов ПОЛ – кетодиенов.

Представленные данные, также как и в предыдущие серии опытов, свидетельствуют о том, что интенсивность ПОЛ зависит от длительности и периодичности воздействия ЭМП на организм животных.

5.4 Исследования влияния электромагнитного поля на общую антиоксидантную активность лабораторных животных

Одним из способов оценки антиоксидантной системы в исследуемых тканях, (в наших опытах исследовалась плазма крови крыс), является метод измерения восстановления антиоксидантами свободного радикала – дифенилпикрилгидразила [16]. При этом оценивают, так называемую, общую антиоксидантную активность плазмы крови.

Опыты, проведенные с двумя контрольными группами животных, также не показали достоверных различий в показателях общей антиоксидантной активности в плазме крови (рисунок 5.12).

Однократная экспозиция с помощью ЭМП длительностью 9 минут, с 30 секундным интервалом каждые 3 минуты не вызывала заметных изменений в общей антиоксидантной активности в плазме крови крыс. Воздействие ЭМП в течение пяти дней длительностью 9 минут сопровождалась заметным снижением общей антиоксидантной активности в плазме крови крыс. Увеличение длительности воздействия до 30 минут в течение пяти дней сопровождалось таким же по величине снижением общей антиоксидантной активности.

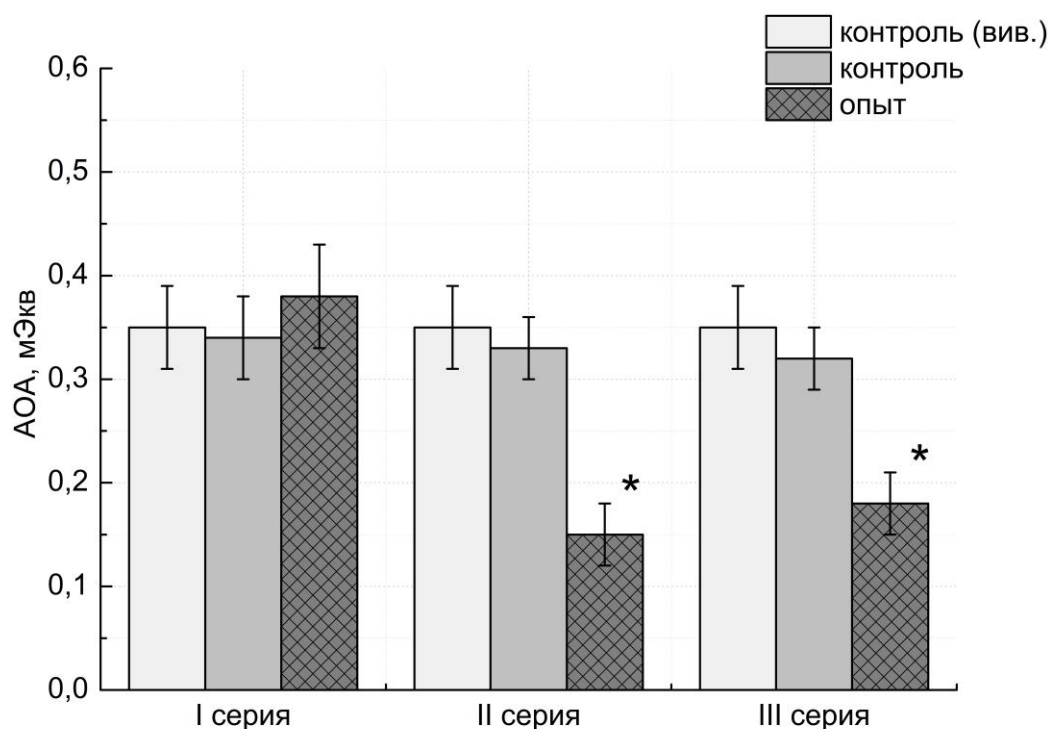


Рисунок 5.12. Изменение общей антиоксидантной активности сыворотки крови при различной длительности экспозиции животных.

* $p < 0,05$

Таким образом, наряду с повышением уровня продуктов ПОЛ происходит ослабление систем, противодействующих этому процессу. Следовательно, на воздействие ЭМП организм животных отвечает в виде окислительного стресса.

Стоит отметить, что полученные данные в данном диссертационном исследовании по изменению продуктов ПОЛ и общей антиоксидантной активности в организме облучаемых животных по сравнению с контролем показывают большее влияние длительности облучения животных, чем увеличением уровней напряженности ЭМП.

Заключение

Выполненные эксперименты по изучению влияния ЭМП метрового диапазона длин волн с использованием биологических объектов различного уровня организации (от организменного до клеточного), в которых исследовалось состояние $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в сердечной мышце, дают возможность сформулировать некоторые предположения об определяющих их механизмах. Анализ полученных экспериментальных данных позволил объединить результаты выполненных исследований действия ЭМП метрового диапазона длин волн на $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмен в миокарде на уровне целого организма, изолированного сердца крысы и кардиомиоцитов в условиях *in vitro*. Многократная повторяемость и высокая статистическая достоверность основных результатов исследований и их взаимное подтверждение при использовании различных методов и объектов позволила выполнить предварительную оценку воздействия ЭМП метрового диапазона длин волн на $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмен в сердечной мышце.

Результаты проведенных исследований показали, что воздействие на изолированное сердце крысы ЭМП частотой 171 МГц с напряженностью 180 В/м и средним значением поглощенной энергии 0,04 мВт/кг приводит к изменениям $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в миокарде – ослаблению скорости поглощения и усилению выхода внутриклеточных ионов Ca^{2+} из кардиомиоцитов. Функциональное состояние транспортного переносчика, осуществляющего $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмен, при этом остается интактным, поскольку процесс транспорта ионов Ca^{2+} снижается только при поглощении ионов Ca^{2+} и значительно усиливается в сторону выведения ионов Ca^{2+} из клеток.

Обнаруженные изменения в процессе $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена под влиянием ЭМП метрового диапазона, вероятнее всего, связаны с нарушением регуляции содержания внутриклеточного Ca^{2+} . Смещение направленности $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в сторону выведения внутриклеточных ионов Ca^{2+} из кардиомиоцитов происходит за счет выхода его из саркоплазматического ретикулума в миоплазму кардиомиоцитов, а также возможности активации в

результате действия ЭМП потенциалуправляемых кальциевых каналов клеточной мембраны L-типа.

В экспериментах, выполненных на изолированных кардиомиоцитах в условиях *in vitro* такой механизм развития изменений направленности $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена был подтвержден, при облучении культуры клеток ЭМП частотой 171 МГц при напряженности 180 В/м. Показано, что воздействие ЭМП метрового диапазона вызывает увеличение выхода ионов Ca^{2+} из изолированных кардиомиоцитов в результате достоверного повышения (на 42 % выше, по сравнению с контрольными клетками) внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , который поступает из саркоплазматического ретикулума.

Присутствие антиоксиданта гистохрома в среде, являющимся перехватчиком активных форм кислорода и подавляющим таким образом процессы ПОЛ, достоверно увеличивает внутриклеточную концентрацию ионов Ca^{2+} (на 21 % по сравнению с контрольными клетками). Подавление процесса ПОЛ с помощью антиоксиданта гистохрома, которое использовалось в качестве положительного контроля, привело к достоверному (на 23 % выше по сравнению с необлученными клетками) снижению выхода ионов Ca^{2+} в миоплазму необлученных кардиомиоцитов.

Роль процессов ПОЛ, опосредующих влияние воздействия ЭМП метрового диапазона, полученные в экспериментах *in vitro*, подтвердилась при изучении состояния состояния ПОЛ и антиоксидантной системы крыс при облучении животных ЭМП метрового диапазона длин волн.

Было установлено, что ЭМП частотой 171 МГц оказывало значимое влияние на процессы ПОЛ на уровне целого организма, которое выражалось, в частности в изменении МДА, диеновых конъюгатов и кектодиенов, а также в снижении активности антиоксидантной системы.

Установлено, что экспозиция животного в течение 1-го часа ЭМП с интенсивностью 90 В/м (УПМ = 0,45 мВт/кг) привела к увеличению концентрации малонового диальдегида, а при увеличении времени облучения до 3-х часов зарегистрировано повышение продукта ПОЛ уже на 30 В/м

(УПМ = 0,12 мВт/кг). Полученные данные свидетельствуют о значимости времени экспозиции на процессы ПОЛ. При увеличении уровня экспозиции до 180 В/м (УПМ = 0,25 мВт/кг) однодневное облучение экспериментальных животных ЭМП метрового диапазона приводит к увеличению образования продуктов ПОЛ (увеличение концентрации диеновых конъюгатов). Пятидневное воздействие ЭМП, при тех же уровнях и поглощения энергии, на крыс приводило к нарушению равновесия в системе прооксиданты–антиоксиданты (увеличение концентрации диеновых конъюгатов, кетодиенов и подавление общей антиоксидантной активности).

Результаты проведенных исследований напрямую относятся к проблеме электромагнитной безопасности ЭМП метрового диапазона длин волн, которые, обладая наибольшей биологической активностью, являются на настоящее время наименее изученным диапазоном из всего электромагнитного спектра. Можно полагать, что полученные в результате этих исследований результаты окажутся полезными при экспериментальном обосновании и разработке нормативных документов, определяющих электромагнитную безопасность в этом диапазоне частот.

ВЫВОДЫ

1. Результаты математического моделирования различных вариантов облучения электромагнитным полем метрового диапазона численного фантома крысы, а так же численной модели изолированного сердца позволили установить максимальные и усредненные значения поглощения электромагнитной энергии в теле животного и его органах.
2. Электромагнитное поле метрового диапазона снижает скорость и накопление ионов Ca^{2+} в миокарде при $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмене и ускоряет выход ионов Ca^{2+} , причем эффекты воздействия сохраняются и усиливаются после прекращения облучения.
3. Воздействие электромагнитным полем метрового диапазона в течение 3-х минут с напряженностью 180 В/м повышает внутриклеточную концентрацию ионов Ca^{2+} в изолированных кардиомиоцитах крыс, обусловленную выходом ионов Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума.
4. Электромагнитное поле усиливает процесс пероксидного окисления липидов в целом организме и в изолированных кардиомиоцитах.
5. Активация процесса перекисного окисления липидов в целом организме преимущественно зависит от времени экспозиции. Уровни облучения и количество удельной поглощенной мощности имеют меньшее значение для прооксидантного действия ЭМП.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Акоев И. Г. и др. Ферментная активность некоторых тканей и сыворотки крови животных и человека при воздействии микроволн и гипотеза о возможной роли свободнорадикальных процессов в нелинейных эффектах и модификации эмоционального поведения животных // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2002. – Т. 42. – № 3. – С. 322-330.
2. Акоев И.Г., Алексеев С.И., Григорьев П.А. Исследование механизма действия микроволн на модельные мембранные системы // Bulletin de l'Academie des Sciences de l'USSR.: Série biologique. – 1985. – С. 41.
3. Алабовский В.В. Винокуров А.А., Маслов О.В. Особенности физиолого-биохимического состояния сердца при увеличении внутриклеточного уровня ионов кальция, вызванного Na-Ca обменом // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. - 2013. - № 1. - С. 77-85.
4. Алабовский В.В., Винокуров А.А., Маслов О.В. Натрий-зависимое поглощение ионов кальция в изолированном сердце крысы при гипоксии и ишемии и связь этого процесса с возникновением аритмий сердца // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. – 2009. – № 2-С. – С. 83-88.
5. Алабовский В.В., Винокуров А.А., Маслов О.В., Башарина О.В. Зависимость скорости Na-Ca обмена в сердце от внеклеточной концентрации ионов натрия и кальция в изолированном сердце крысы // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – Т. 18 – № 2. – С. 14-17.
6. Антипов В.В., Давыдов Б.И., Тихончук В.С. Биологическое действие электромагнитных излучений микроволнового диапазона // Проблемы космической биологии. – 1980. – М.: Наука. – 212 с.
7. Арутюнян А. В., Дубинина Е. Е., Зыбина Н. Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма // СПб.: ИКФ «Фолиант». – 2000. – С. 93-94.

8. Асташкин Е.И., Глезер М.Г. Кардиопротекция при повреждениях сердца, вызываемых ишемией и реперфузией // Сердечная недостаточность. - 2016. - Т.17. - № 3(96). - с.189-200.
9. Афанасьев С.А. и др. Кардиопротекторный эффект антиоксиданта гистохрома в кардиологической и кардиохирургической клинике // Томск: STT Publishing, 2012. – 120 с.
10. Башкуев Ю.В. и др. Паспортизация радиопередающих объектов железнодорожного транспорта по электромагнитному фактору // Материалы 4-го Международного симпозиума по электромагнитной совместимости и электромагнитной экологии «ЭМС-2001». – СПб., 2001. – С.261-265.
11. Белостоцкая Г.Б. и др. Оценка функционального состояния свежeweделенных и культивируемых кардиомиоцитов крыс в условиях окислительного стресса // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2008. – Т. 26. – № 2. - С. 85-92.
12. Белостоцкая Г.Б., Захаров Е.А., Голованова Т.А. Пролиферация и дифференцировка кардиомиоцитов крысы в культуре // Цитология. 2006. Т. 48, №9. С. 743-744.
13. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов: молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения. // М: «Медицина». - 1989. - 368 с.
14. Боркович В.М., Курло Н.Б., Баришпольц В.Л. Воздействие ЭМИ миллиметрового диапазона на Са-насос саркоплазматического ретикулума мышц // Радиобиология.- 1991.-Т. 31, вып. 2.- С.268-271.
15. Бурлакова Е.Б., Храпова Н. Г. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты // Успехи химии. – 1985. – Т. 54. – № 9. – С. 1540-1558.
16. Величковский Б.Т. Экологическая пульмонология (роль свободнорадикальных процессов). – Екатеринбург: ЕМНЦ. – 2003.
17. Вермель А.Е., Садчикова М.Н. Заболевания, вызываемые воздействием

электромагнитных излучений диапазона радиочастот // Руководство по профессиональным заболеваниям /под ред. Н. Ф. Измерова. – М.: Медицина, 1983. - Т. 2. – С. 203-216.

18. Воскресенский О.Н. и др. Антиоксидантная система, онтогенез и старение // Вопросы медицинской химии. – 1982. – Т. 28. – № 1. – С. 14-27.
19. Гембицкий Е.В. Некоторые особенности системы крови и функции внутренних органов у лиц, подвергавшихся длительному воздействию СВЧ- поля // Влияние СВЧ-излучений на организм человека и животных. – Л.: Медицина. – 1966. – С.121-129.
20. ГОСТ 12252-86 "Радиостанции с угловой модуляцией сухопутной подвижной службы. Типы, основные параметры, технические требования и методы измерений".
21. Долгих В.Т. Патогенетическая значимость перегрузки кардиомиоцитов Ca^{2+} в развитии постреанимационной недостаточности сердца // Бюллетень сибирского отделения российской академии медицинских наук. – 2005. – Т. 117. - № 3. - с. 7-13.
22. Дрогичина Э.А., Садчикова М.Н. Клинические синдромы при воздействии различных диапазонов радиочастот // О биологическом воздействии электромагнитных полей радиочастот / Труды НИИ ГТ и ПЗ АМН СССР – М. - 1964 – вып. 2. – С.105-109.
23. Ермаков В.И. Диэлектрическая радиоспектроскопия // Экспериментальные методы химии растворов: спектроскопия и калориметрия. – М.: Наука, 1995. – С.154-207.
24. Ермолаев Е.А., Суббота А.Г., Чухловин Б.А. Воздействие на организм ВЧ и УВЧ электромагнитных излучений и принципы их нормирования // Военно-медицинский журнал. – 1980. – № 4. – С. 65-68.
25. Ескунов П.Н. Возможности коррекции постишемических реперфузионных изменений миокарда крыс с помощью финоптина // Бюллетень сибирского отделения российской академии медицинских

наук. – 2005. – Т. 117. - № 3. - С. 87-90.

26. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е. Б. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспекты //М.: Маик «Наука/Интерпериодика. – 2001. – 343 С.
27. Золотов А.Н., Долгих В.Т., Таран Н.И. Повреждение и защита сердца при острой смертельной кровопотере // Омский научный вестник. – 2002. – № S18. – С. 28-31.
28. Измеров Н.Ф. и др. Неионизирующие электромагнитные излучения и поля // Физические факторы производственной и природной среды. Гигиеническая оценка и контроль. – М.: Медицина, 2003. – С.12-66.
29. Каляда Т.В., Никитина В.Н. Медико-биологические аспекты воздействия модулированных высокочастотных излучений // Гигиена и санитария. – 1989. – № 10. – С. 39-41.
30. Кнунянц И.Л. Химия // Большой энциклопедический словарь. – М.: Большая Российская энциклопедия. – 1998. – С. 56.
31. Козярин И.П., Швайко И.И. Возрастная чувствительность организма животного к электромагнитным полям сверхвысоких частот // Гигиена и санитария 1983. – № 3. – С. 86-89.
32. Крехова М. А., Чехранова М. К. Фракционное определение эфиров холестерина в крови и тканях с помощью хроматографии в тонком слое // Вопросы медицинской химии. – 1971. – Т. 17. – № 1. – С. 93-98.
33. Кудряшов Ю.Б., Перов Ю.Ф. Сравнительная биологическая эффективность непрерывных и импульсных электромагнитных полей радиочастотного диапазона // Электромагнитные поля. Биологическое действие и гигиеническое нормирование: сборник материалов Международного совещания (Москва, 18–22 мая 1998 г.). – 1998. – С. 355-362.
34. Кудряшов Ю.Б., Перов Ю.Ф., Рубин А.Б. Радиационная биофизика: радиочастотные и микроволновые электромагнитные излучения. Учебник: для вузов. – М: ФИЗМАТЛИТ, 2008.

35. Куценко С.А. Основы токсикологии. – Санкт-Петербург, 2002 г.
36. Литвицкий П.Ф., Сандриков В.А., Демуров Е.А. Адаптивные и патогенные эффекты реперфузии и реоксигенации миокарда. М.: Медицина, 1994. с.320., Зенков Н.К. Окислительный стресс. / ред. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Мещникова У.Б. // МАИК "Наука-Интерпериодика", 2001. с. 343.
37. Логинов А. С., Матюшин Б. Н. Цитотоксическое действие активных форм кислорода и механизмы развития хронического процесса в печени при ее патологии // Пат. физиол. и exper. терапия. – 1996. – Т. 4. – С. 3-6.
38. Логинов В.А. Аккумуляция ионов кальция саркоплазматическим ретикулом сердечной мышцы крысы в условиях ограниченной подвижности и при воздействии импульсного электромагнитного поля // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 1992. – № 2. – С. 121.
39. Логинов В.А., Горбатенкова Н.В., Климовицкий В.Я. Действие импульсного электромагнитного поля на аккумуляцию ионов кальция саркоплазматическим ретикулом сердечной мышцы крысы // Космическая биология и авиакосмическая медицина. – 1991. – Т. 25. – № 5. – С. 51–51.
40. Маленьких Ю.В., Левина Г.Е., Николаенко Н.С., Пинаев Г.П. Выделение фракции клеток с наиболее выраженной способностью к кардиомиоцитарной дифференцировке путем их избирательной адгезии к подложке // Цитология. 2006. – Т. 48. – № 9. – С. 779.
41. Малышев В.М., Колесник Ф.А. Электромагнитные волны сверхвысокой частоты и их воздействие на человека. – М.: Медицина. – 1968. – С.1-88.
42. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Сафина А.Ф. Окислительный стресс при ишемическом и реперфузионном повреждении миокарда //Успехи соврем. биол. – 2006. – Т. 117. – № 3. – С. 362-373.
43. Никитина В.Н. Отдаленные последствия воздействия электромагнитных полей радиочастотного диапазона // Электромагнитные поля.

Биологическое действие и гигиеническое нормирование: сборник материалов Международного совещания (Москва, 18–22 мая 1998 г.). – 1998. – С.363-366.

44. Плацер З.Я. Чехословацкий медицинский обзор. – Прага, 1970. – № 1, Т. 16. – С. 30–41.
45. Приказ Министерства информационных технологий и связи РФ от 22 августа 2006 г. N 107 "Об утверждении правил применения абонентских радиостанций сетей подвижной радиосвязи стандарта TETRA".
46. Реестр оборудования радиосвязи ОАО «РЖД». – М.: ОАО «РЖД», ГУП ВНИИАС, 2006.
47. Савин Б. М., Рубцова Н. Б. Влияние радиоволновых излучений на центральную нервную систему // Итоги науки и техники. Физиология человека и животных. – 1978. – Т. 22. – С. 68-111.
48. СанПиН 2.1.8/2.2.4.1383 - 03 Гигиенические требования к размещению и эксплуатации передающих радиотехнических объектов – М.: ФЦ ГСЭН Минздрава России, 2003. – 22 с.
49. Способ одновременной регистрации Na^+ -зависимых потоков Ca^{2+} и функционального состояния целого изолированного сердца в эксперименте: пат.2400825 Рос. Федерация: МПК G09B 23/28 A61B 5/04 / В.В. Алабовский, А.А. Винокуров, О.В. Маслов; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО "Воронежская гос. медицинская академия им. Н.Н. Бурденко Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию". - № 2009122349/14; заявл. 10.06.2009; опубл. 27.09.2010, Бюл. № 27 – 10 с.: 1 табл., 2 ил.
50. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина. – 1977. – С. 66-68.
51. Суворов Г.А. и др. Неионизирующие электромагнитные излучения и поля (экологические и гигиенические аспекты) // под ред. Н.Ф. Измерова. – М., "Вооружение. Политика. Конверсия. – 1998.

52. Тищенко В. А. и др. Электромагнитное поле // Контроль физических факторов окружающей среды, опасных для человека. М., Издательство стандартов. – 2003. – С. 10-62.
53. Толгская М.С., Гордон З.В. Морфофизиологические изменения при действии электромагнитных волн радиочастот // М. – Медицина. – 1971. – 136 с.
54. Тягин Н. В. Клинические аспекты облучений СВЧ-диапазона // Л.: Медицина. – 1971. – 174 с.
55. Шван Г. Спектроскопия биологических веществ в поле переменного тока // Электроника и кибернетика в биологии и медицине. – М.: Изд-во Иностранной литературы, 1963. – С.71-108.
56. Шван Х.Р., Фостер К.Р. Воздействие высокочастотных полей на биологические системы. Электрические свойства и биофизические механизмы // ТИИЭР. – 1980. – Т.68 – №1. – С.121-132.
57. Achudume A. et al. Induction of oxidative stress in male rats subchronically exposed to electromagnetic fields at non-thermal intensities // Journal of Electromagnetic Analysis and Applications. – 2010. – V. 2 – P. 482-487.
58. Adey W. R., Bawin S. M., Lin Lu S. Increased calcium efflux from cerebral tissue exposed to weak modulated microwave fields // Journal of Physiology (Cambridge). – 1980. – V. 308. – P. P16-17.
59. Ahlbom A. et al. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz). International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection // Health Phys. – 1998. – V. 74. – № 4. – P. 494-522.
60. Akimoto S. et al. SAR Calculation Using Numerical Human Model Exposed to EM Wave from Commercial Wireless Terminal at 150 MHz // Proceedings of EMC'09, Kyoto. - 2009. - P. 385-388.
61. Antonopoulos A., Eisenbrandt H., Obe G. Effects of high-frequency electromagnetic fields on human lymphocytes in vitro // Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. – 1997. – V.

395. – № 2. – P. 209-214.
62. Ayrapetyan S.N. Na^+/K^+ pump α_3 isoform is a universal membrane sensor for weak environmental signals // *J. Bioequiv. Availab.* – 2013. – V. 5. – № 1. – P. 031-040.
63. Barcal J., Stopka P., Křížová J. et al. High-frequency electromagnetic radiation and the production of free radicals in four mouse organs // *Act. Nerv. Super. Rediviva.* – 2014. – V. 56. – № 1-2. – P. 9-14.
64. Belevych A. E. et al. Shortened Ca^{2+} signaling refractoriness underlies cellular arrhythmogenesis in a postinfarction model of sudden cardiac death novelty and significance // *Circulation research.* – 2012. – V. 110. – № 4. – P.569-577.
65. Bernhardt J. The direct influence of electromagnetic fields on nerve-and muscle cells of man within the frequency range of 1 Hz to 30 MHz // *Radiation and environmental biophysics.* – 1979. – V. 16. – № 4. – P.309-323.
66. Berridge M.J. Calcium signal lingre model lingand disease // *Biochemical Society Transactions.* – 2012. - № 40. - P.297–309.
67. Bieńkowski P. Pole elektromagnetyczne radiotelefonów doręcznych // *Przegląd Elektrotechniczny.* – 2004. – V.80. – P.1231-1233.
68. Bienkowski P., Trzaska H. Electromagnetic measurements in the near field. – The Institution of Engineering and Technology, 2012.
69. Black D.R., Heynick L.N. Radiofrequency (RF) effects on blood cells, cardiac, endocrine, and immunological functions // *Bioelectromagnetics.* – 2003. – Suppl. 6. – P.S187-S195.
70. Çenesiz M. et al. Effects of 900 and 1800 MHz electromagnetic field application on electrocardiogram, nitric oxide, total antioxidant capacity, total oxidant capacity, total protein, albumin and globulin levels in guinea pigs // *J. Veterinary Med. Fac. Kafkas Univ.* – 2011. – V. 17. – № 3. – P. 357-362.
71. Chaudhari N. et al. A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress // *Frontiers in cellular neuroscience.* – 2014. – V. 8. – P. 213.

72. Christ A. et al. The Virtual Family – development of surface-based anatomical models of two adults and two children for dosimetric simulations // *Physics in medicine and biology*. – 2010. – V. 55. – № 2. – P. 23-38.
73. Dabala D. et al. Cellular response in experimental exposure to electromagnetic fields // *Revue Roumaine Des Sciences Techniques-Serie Electrotechnique Et Energetique*. – 2008. – V. 53. – № 2 – P. 21-29.
74. Dabala D. et al. Oxidative and immune response in experimental exposure to electromagnetic fields // *Electromagnetic Field, Health and Environment: Proceedings of EHE'07*. – 2008. – V. 29. – P. 105-109.
75. Dalle-Donne I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress // *Clinica Chimica Acta*. – 2003. – V. 329. – № 1. – P. 23-38.
76. Del Rio D., Stewart A. J., Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress // *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. – 2005. – V. 15. – № 4. – P. 316-328.
77. Deniaud A. et al. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis // *Oncogene*. – 2008. – V. 27. – № 3. – P.285-299.
78. Denton R., McCormack J. Ca^{2+} as a second messenger within mitochondria of the heart and other tissues // *Ann. Rev. Physiol.* - 1990. – P.451-466.
79. Directive E. U. Directive 2004/40/EC of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the minimum health and safety requirements regarding the exposure of workers to the risks arising from physical agents (electromagnetic fields). Eighteenth individual Directive within the meaning of Article 16 (1) of Directive 89/391/EEC // *Off J Eur Union*. – 2004. – V. 159. – P.1-26.
80. Donoso P. et al. Stimulation of NOX2 in isolated hearts reversibly sensitizes RyR2 channels to activation by cytoplasmic calcium // *Journal of molecular and cellular cardiology*. – 2014. – V. 68. – P.38-46.

81. Dorogi P. L., Rabl C. R., Neumann E. Kinetic scheme for Ca²⁺-arsenazo III interactions // Biochemical and biophysical research communications. – 1983. – V. 111. – № 3. – P.1027-1033.
82. Ermak G., Davies K.J.A. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death // Molecular immunology. – 2002. – T. 38. – № 10. – C. 713-721.
83. ETSI EN 300 392-2 V2.3.2 (2001-03) - Terrestrial Trunked Radio (TETRA); Voice plus Data (V+D); Part 2: Air Interface (AI).
84. ETSI TS 100 392-15 V1.3.1 (2004-06) - Terrestrial Trunked Radio (TETRA); Voice plus Data (V+D); Part 15: TETRA frequency bands, duplex spacings and channel numbering.
85. Fagan J. M., Slecicka B. G., Sohar I. Quantitation of oxidative damage to tissue proteins // The international journal of biochemistry & cell biology. – 1999. – V. 31. – № 7. – P. 751-757.
86. Frey A. H., Feld S. R. Avoidance by rats of illumination with low power nonionizing electromagnetic energy // Journal of Comparative and Physiological Psychology. – 1975. – V. 89. – № 2. – P. 183.
87. Futter P. et al. Reliable prediction of mobile phone performance for realistic in-use conditions using the FDTD method //IEEE Antennas and Propagation Magazine. – 2008. – V. 50. – № 1. - P.87-96.
88. Gabriel, C. Compilation of the dielectric properties of body tissues at RF and microwave frequencies // Report N.AL/OE-TR-1996-0037. Occupational and environmental health directorate, Radiofrequency Radiation Division, Brooks Air Force Base, Texas (USA). 1996.
89. Gandhi O.P. Numerical dosimetry – modeling from low-to-high frequencies (0-3 GHz) // Radio Frequency Radiation Dosimetry Handbook (Fifth Edition) / W. P. Roach ed. Air Force Research Laboratory, 711 Human Performance Wing, Human Effectiveness Directorate Directed Energy Bioeffects Division Radio Frequency Radiation Branch, Brooks City-Base, TX, 2009. – P. 1-46.

90. Ginsburg K.S., Weber C.R., Bers D.M. Control of maximum sarcoplasmic reticulum Ca load in intact ferret ventricular myocytes. Effects of thapsigargin and isoproterenol // *J. Gen. Physiol.* 1998. V. 111. № 4. P. 491-504.
91. Glavind J. Antioxidants in animal tissue // *Acta Chem Scand.* – 1963. – V. 17. – № 13. – P. 1635-1640.
92. Görlach A. et al. Calcium and ROS: a mutual interplay // *Redox biology.* – 2015. – V. 6. – P.260-271.
93. Görlach A., Klappa P., Kietzmann D. T. The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control // *Antioxidants & redox signaling.* – 2006. – V. 8. – № 9-10. – P.1391-1418.
94. Green A.C. et al. Thermal imaging and modeling of microelectrodes in a radiofrequency field // *Bioelectromagnetics Symposium, Dublin.* – 2005. – PA-130.
95. Grek C.L., Tew K.D. Redox metabolism and malignancy // *Current opinion in pharmacology.* – 2010. – V. 10. – № 4. – P.362-368.
96. Grivennikova V. G., Kareyeva A. V., Vinogradov A. D. What are the sources of hydrogen peroxide production by heart mitochondria? // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics.* – 2010. – V. 1797. – № 6. – P.939-944.
97. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties // *J. Biol. Chem.* – 1985. – Vol. 260. – P. 3440-3450.
98. Gryz K. et al. Pomiary i ocena pola elektromagnetycznego przy radiotelefonach przenośnych w kontekście wymagań Dyrektywy Europejskiej 2013/35/UE i polskiego prawa pracy // *Medycyna Pracy.* – 2013. – V. 64. – № 5. – P.671-680.
99. Györke S., Carnes C. Dysregulated sarcoplasmic reticulum calcium release: potential pharmacological target in cardiac disease // *Pharmacology & therapeutics.* – 2008. – V. 119. – № 3. – P.340-354.
100. Hassenfuss G., Pieske B., Prestle J. Interchange between Na⁺-Ca²⁺ ex change

and SR Ca²⁺-ATPase in failing human myocardium // J. Physiol. Proc 1999.- P. 68-78.

101. Holmström K.M., Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2014. – V. 15. – № 6. – P.411-421.
102. International Agency for Research on Cancer, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. v.102 «Non-Ionizing Radiation, Part 2: Radiofrequency Electromagnetic Fields»– IARC, 2013, 462 p.
103. International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection et al. Exposure to high frequency electromagnetic fields, biological effects and health consequences (100 kHz-300 GHz): 2009 // Available from: URL: http://www.icnirp.de/documents/RF_Review.pdf. – 2009.
104. Ito K. et al. Evaluation of the local SAR in a simple abdomen model of pregnant women at 150 MHz // BEMS 2005 /Bioelectromagnetics Society, Dublin. – 2005.
105. Janes Jr D.E. Radiation surveys--measurement of leakage emissions and potential exposure fields //Bulletin of the New York Academy of Medicine. – 1979. – V. 55. – № 11. – P.1021-1041.
106. Jauchem J.R. Effects of low-level radio-frequency (3kHz to 300GHz) energy on human cardiovascular, reproductive, immune, and other systems: a review of the recent literature // Int. J. Hyg. Environ. Health. 2008. – V. 211. – № 1-2. – P. 1-29.
107. Johansen C. et al. Cellular telephones and cancer - a nationwide cohort study in Denmark // Journal of the National Cancer Institute. – 2001. – V. 93. – № 3. – P. 203-207.
108. Kaneko M. et al. Effects of oxygen free radicals on Ca²⁺ binding to cardiac troponin //Japanese circulation journal. – 1992. – V. 56. – P. 1288 -1290.

109. Kerman M., Senol N. Oxidative stress in hippocampus induced by 900 MHz electromagnetic field emitting mobile phone: Protection by melatonin // *Biomedical Research*. – 2012. – V. 23. – № 1. – P. 147-151.
110. Kourie J. I. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 1998. – V. 275. – № 1. – P.1-24.
111. Kuster N. et al. Methodology of detailed dosimetry and treatment of uncertainty and variations for in vivo studies // *Bioelectromagnetics*. – 2006. – V. 27. – № 5. – P. 378-391.
112. Lam M.L., Bartoli M., Claycomb W.C. The 21-day postnatal rat ventricular cardiac muscle cell in culture as an experimental model to study adult cardiomyocyte gene expression // *Mol. Cell. Biochem*. 2002. V. 229, № 1-2. P.51–62.
113. Langendorff O. Untersuchungen am uberlebenden Säugetierherzen // *Pflügers. Arch*. – 1895. – V. 61. – P. 291–332.
114. Lin J. C., Lin M. F. Microwave hyperthermia-induced blood-brain barrier alterations // *Radiation research*. – 1982. – V. 89. – № 1. – P. 77-87.
115. Lin J.C. Coupling of electromagnetic fields into biological systems // *Electromagnetic Fields into Biological Systems / J.C. Lin ed.* – CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, New York, 2012. – P.1-69.
116. Löschinger M. et al. Induction of intracellular calcium oscillations in human skin fibroblast populations by sinusoidal extremely low-frequency magnetic fields (20 Hz, 8 mT) is dependent on the differentiation state of the single cell // *Radiation research*. – 1999. – V. 151. – № 2. – P. 195-200.
117. Löwe H. et al. Oxygen radicals attenuate the contractility of skinned muscle fibres from the pig myocardium // *Die Pharmazie*. – 1994. – T. 49. – № 11. – C. 845-849.
118. Ludvig D. et al. The Royal Society of Canada. A review of the potential risks of radiofrequency fields from wireless telecommunication devices // *Report 1999 — RSC.EPR 9-1.* - march 1999.

119. Martens L., Vermeeren G. Dosimetric Evaluation for Walkie-talkies Used by Children (invited Abstract) // Abstract Book of the FGF-Workshop “Do Children Represent a Special Sensitive Group for EMF-Exposure?” - 2006. - P. 30.
120. Martens L., Vermeeren G. Electromagnetic dosimetry of the SAR for a walkie-talkie set-up // XXVIIIth General Assembly of International Union of Radio Science (URSI): Programme Oral Presentations. – Vigyan Bhavan, New Delhi, India. – 2005.
121. Medici R. Behavioral measures of electromagnetic field effects // Modern Bioelectricity, Marcel Dekker, New York, NY. – 1988. – P. 557-585.
122. Megha K. et al. Microwave radiation induced oxidative stress, cognitive impairment and inflammation in brain of Fischer rats // Indian Journal of Experimental Biology. – 2012. – V. 50. – P. 889-896.
123. Meissner G. Regulation of ryanodine receptor ion channels through posttranslational modifications // Current topics in membranes. – 2010. – V. 66. – P.91-113.
124. Mème W., O'Neill S. C., Eisner D. A. Low sodium inotropy is accompanied by diastolic Ca²⁺ gain and systolic loss in isolated guinea - pig ventricular myocytes // The Journal of physiology. – 2001. – V. 530. – № 3. – P. 487-495.
125. Meral I. et al. Effects of 900-MHz electromagnetic field emitted from cellular phone on brain oxidative stress and some vitamin levels of guinea pigs // Brain research. – 2007. – V. 1169. – P. 120-124.
126. Michaelson S. M., Elson E. C. Interaction of nonmodulated radiofrequency fields with living matter: experimental results // CRC handbook of biological effects of electromagnetic fields. – 1986. – P. 340-423.
127. Mochizuki M. et al. Scavenging free radicals by low-dose carvedilol prevents redox-dependent Ca²⁺ leak via stabilization of ryanodine receptor in heart failure // Journal of the American College of Cardiology. – 2007. – V. 49. – № 16. – P.1722-1732.

128. Mohamed F. A. et al. Study of the cardiovascular effects of exposure to electromagnetic field // *Life Science Journal*. – 2011. – V. 8. – № 1. – P. 260-274.
129. Moussa S. A. Oxidative stress in rats exposed to microwave radiation // *Rom J Biophys*. – 2009. – V. 19. – P. 149-158.
130. Moustafa Y. M. et al. Effects of acute exposure to the radiofrequency fields of cellular phones on plasma lipid peroxide and antioxidase activities in human erythrocytes // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. – 2001. – T. 26. – № 4. – C. 605-608.
131. Myers R. D., Ross D. H. Radiation and brain calcium: a review and critique // *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. – 1982. – V. 5. – № 4. – P. 503-543.
132. Nagasawa K. et al. Experimental evaluation of the EM exposure in the simple abdomen solid phantom // *Proceedings of ISAP 2005*. – 2005. – P. 881-884.
133. Nieto-Hernandez R. et al. Can exposure to a terrestrial trunked radio (TETRA)-like signal cause symptoms? A randomised double-blind provocation study // *Occupational and environmental medicine*. – 2011. – V. 68. – № 5. – P. 339-344.
134. Ottolia M. et al. Na/Ca exchange and contraction of the heart // *Journal of molecular and cellular cardiology*. – 2013. – V. 61. – P. 28-33.
135. Ozguner F. et al. Mobile phone-induced myocardial oxidative stress: protection by a novel antioxidant agent caffeic acid phenethyl ester // *Toxicology and Industrial Health*. – 2005. – V. 21. – № 7-8. – P. 223-230.
136. Pall M.L. Electromagnetic fields act via activation of voltage-gated calcium channels to produce beneficial or adverse effects // *J. Cell Mol. Med*. – 2013. – V.17. – № 8. – P. 958-965.
137. Panagopoulos D. J. Electromagnetic interaction between environmental fields and living systems determines health and well-being // *International Journal of Condensed Matter, Advanced Materials, and Superconductivity Research*. – 2014. – V. 13. – № 2/3. – P.99.

138. Pompella A. et al. Measurement of lipid peroxidation in vivo: a comparison of different procedures // *Lipids*. – 1987. – V. 22. – № 3. – P. 206-211.
139. Prosser B.L., Ward C. W., Lederer W. J. X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart // *Science*. – 2011. – V. 333. – № 6048. – P. 1440-1445.
140. Repacholi M. H. An Overview of WHO's EMF project and the Health Effects of EMF exposure // *Proceedings of the International Conference on Non-Ionizing Radiation at UNITEN (ICNIR 2003) Electromagnetic Fields and Our Health 20th–22nd October 2003*. – 2003.
141. Richard V.J., Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. Oxygen derived free radicals and postischemic myocardial reperfusion: therapeutic implication // *Fundam. Clin. Pharmacol.* - 1990. - Vol. 4. - P.85-103.
142. Roberts Jr N. J. Radiofrequency and microwave effects on immunological and hematopoietic systems // *Biological Effects and Dosimetry of Nonionizing Radiation*. – Springer US, 1983. – P. 429-459.
143. Sano R., Reed J. C. ER stress-induced cell death mechanisms // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. – 2013. – T. 1833. – № 12. – C. 3460-3470.
144. Sauer H., Wartenberg M., Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2001. – T. 11. – № 4. – C.173-186.
145. Schwan H. P. Microwave radiation: Biophysical considerations and standards criteria // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. – 1972. – № 4. – P. 146-152.
146. Schwan H.P. Biological effects of non-ionizing radiation: cellular properties and interactions // *Ann. Biomed. Eng.* – 1988. – V.16. – P.245-263.
147. Schwan H.P. Dielectric properties of biological tissue and cells at RF- and MW-frequencies // *Biological Effects and Dosimetry of Nonionizing Radiation. Radiofrequency and Microwave Energy / NATO ASI ser. Ser. A*. – Plenum Press, New York, London, 1983. – V.49. – P.195-211.

148. Schwan H.P., Takashima S. Dielectric behavior of biological cells and membranes // Bull. Inst. Chem. Res. – 1991. – V.69. – № 4. – P.459-475.
149. Semm P. Neuronal responses to high frequency weak electromagnetic fields // Biomedical effects relevant to amplitude modulated RF fields, Kuopio. – Sept.1995. – P.7.
150. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples 1* // Drug metabolism reviews. – 2000. – V. 32. – № 3-4. – P. 307-326.
151. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples // Drug metabolism reviews. – 2000. – V. 32. – № 3-4. – P.307-326.
152. Shams R., Kennedy R. A. Efficient histogram algorithms for NVIDIA CUDA compatible devices // Proc. Int. Conf. on Signal Processing and Communications Systems (ICSPCS). – 2007. – P. 418-422.
153. Sienaert I. et al. Regulation of Ca^{2+} -release channels by luminal Ca^{2+} // Integrative Aspects of Calcium Signalling. – Springer US, 1998. – P. 131-161.
154. Smart S.C., Sagar K.B., Warltier D.C. Differential roles of myocardial Ca^{2+} channels and Na^+/Ca^{2+} exchange in myocardial reperfusion injury in open chest dogs: Relative roles during ischemia and reperfusion // Cardio. Res. - 1997. – P. 337-346.
155. Smialowicz R. J. et al. Chronic exposure of rats to 100-MHz (CW) radiofrequency radiation: assessment of biological effects // Radiation research. – 1981. – V. 86. – № 3. – P. 488-535.
156. Smialowicz R. J. Hematologic and immunologic effects of nonionizing electromagnetic radiation // Bulletin of the New York Academy of Medicine. – 1979. – V. 55. – № 11. – P. 1094-1118.
157. Stuchly M. A. Dosimetry of radio frequency and microwave radiation: theoretical analyses // Biological Effects and Dosimetry of Nonionizing Radiation. – Springer US, 1983. – P. 163-177.
158. Sullivan D.M., Gandhi O. P., Taflove A. Use of the finite-difference time-domain method for calculating EM absorption in man models // IEEE

- Transactions on Biomedical Engineering. – 1988. – V. 35. – № 3. – P. 179-186.
159. Sullivan D. Three-dimensional computer simulation in deep regional hyperthermia using the finite-difference time-domain method // IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques. – 1990. – V. 38. – № 2. – P. 204-211.
160. Taflove A., Brodwin M. E. Computation of the electromagnetic fields and induced temperatures within a model of the microwave-irradiated human eye // IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques. – 1975. – V. 23. – № 11. – P. 888-896.
161. Terentyev D. et al. Redox modification of ryanodine receptors contributes to sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in chronic heart failure // Circulation research. – 2008. – V. 103. – № 12. – P. 1466-1472.
162. Uchiyama M., Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test // Analytical biochemistry. – 1978. – V. 86. – № 1. – P. 271-278.
163. Valberg P. A. Modulated RF energy: mechanistic viewpoint on the health implications // Base Stations and Wireless Networks: Exposures and Health Consequences. – 2006. – P. 33-46.
164. Valko M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // The International Journal of Biochemistry and Cell Biology. – 2007. – V. 39. – № 1. – P. 44-84.
165. Vander Vorst A., Rosen A., Kotsuka Y. RF/Microwave Interaction with Biological Tissues. – John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2006. – 330 p.
166. Vecchia P. et al. Exposure to high frequency electromagnetic fields, biological effects and health consequences (100 kHz-300 GHz) // International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. – 2009.
167. Vermeeren G., Martens L. Assessment of the SAR for a walkie-talkie setup // Bioelectromagnetics 2005: A joint meeting of the Bioelectromagnetics

- Society and the European BioElectromagnetics Association. – 2005. – P. 487-488.
168. World Health Organization et al. Electromagnetic fields (300 Hz to 300 GHz) // Environmental Health Criteria 137. – Geneva: WHO. – 1993.
169. Yan Y., Wei C.L., Zhang W.R. et al. Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling // Acta Pharmacol. Sin. – 2006. – V. 27. – № 7. – P. 821-826.
170. Yee K. C., Chou C. K., Guy A. W. Effect of microwave radiation on the beating rate of isolated frog hearts // Bioelectromagnetics. – 1984. – V. 5. – № 2. – P. 263-270.
171. Yee K. C., Chou C. K., Guy A. W. Effects of pulsed microwave radiation on the contractile rate of isolated frog hearts // J Microw Power Electromagn Energy. – 1986. – V. 21. – P. 159-65.
172. Yee K. C., Chou C. K., Guy A. W. Influence of microwaves on the beating rate of isolated rat hearts // Bioelectromagnetics. – 1988. – V. 9. – № 2. – P. 175-181.,
173. Yee K. S. et al. Numerical solution of initial boundary value problems involving Maxwell's equations in isotropic media // IEEE Trans. Antennas Propag. – 1966. – V. 14. – № 3. – P. 302-307.
174. Zhang L. et al. Oxidative modifications of mitochondria complex II // Heart Proteomics: Methods and Protocols. – 2013. – P. 143-156.
175. Zhongguo xiongxinxueguan waike linchuang zazhi / Sui Dong-hu. // Clin. J. Clin. Thorac and Cardiov. Surg. - 2000. – P. 183-186.
176. Zima A. V., Blatter L. A. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters // Cardiovascular research. – 2006. – V. 71. – № 2. – P. 310-321.
177. Ziriak J. M. et al. Assessment of Potential Radiation Hazard from the COMWIN Vest Antenna. – Naval Health Research Center Detachment. – 2003. – № NHRC-DET-DEBL-TR-2003-01.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю д.м.н., проф. Алабовскому Владимиру Владимировичу, за помощь, оказанную при работе над диссертационным исследованием. Автор благодарит ассистентов кафедры Биохимия ГБОУ ВПО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко к.м.н. Винокурова Алексея Анатольевича и к.б.н. Маслова Олега Владимировича, а также руководителя группы цитоанализа ИЭФБ РАН к.б.н. Белостоцкую Галину Борисовну за помощь в проведении экспериментальных исследований. Автор также благодарит ведущего научного сотрудника ФГБНУ "НИИ МТ" к.б.н. Перова Сергея Юрьевича за участие в обсуждении полученных результатов и помощь при оформлении диссертации.

Отдельная благодарность моим родителям Калиничеву Василию Александровичу и Калиничевой Татьяне Валерьевне, а также моему мужу - Богачеву Александру Александровичу за понимание, неоценимую помощь, поддержку на всех этапах работы над диссертацией.