

На правах рукописи



Богачева Елена Васильевна

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

Специальность 03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Воронеж – 2018

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Алабовский Владимир Владимирович

Официальные оппоненты: **Гудков Сергей Владимирович**
доктор биологических наук, Научный центр волновых исследований ФГБУН Института общей физики им. А.М.Прохорова РАН, лаборатория акустики и физики жидкостей отдела волновых явлений, ведущий научный сотрудник

Раваева Марина Юрьевна
кандидат биологических наук, ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», кафедра физиологии человека и животных и биофизики, доцент

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биофизики клетки Российской академии наук

Защита диссертации состоится «19» июня 2018 года в 13:30 на заседании диссертационного совета Д.212.038.03 на базе Воронежского государственном университете по адресу: 394036 Воронеж, Университетская пл., 1, ауд. 59.

С диссертацией можно ознакомиться в зональной научной библиотеке Воронежского государственного университете и на сайте <http://www.science.vsu.ru>

Автореферат разослан

«26» апреля 2018 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Грабович Маргарита Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. 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. Однако 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.

До сих пор остаются не достаточно изученными механизмы биологического действия ЭМП, в частности на уровне клетки, в том числе на функционирование регуляторных систем живых объектов (Ю.Б. Кудряшов, Ю.Ф.Перов, А.Б. Рубин, 2008).

Устройства, работающие посредством энергии ЭМП, в процессе эксплуатации зачастую находятся вблизи жизненно важных органов, и тем самым, могут оказывать на негативное влияние на функциональные системы организма (сердечно-сосудистую, иммунную и пр.). Согласно литературным данным, ЭМП радиочастотного диапазона способно вызывать изменения в функционировании сердечно-сосудистой системы (D.R. Black, L.N. Heupic, 2003; J.R. Jauchem, 2008). Несмотря на достаточно большой объем исследований, литературных данных, посвященных оценке влияния ЭМП метрового диапазона на сердце не достаточно, а их результаты для понимания биологических механизмов действия этого физического фактора неоднозначны.

Известно, что основным регулятором сократительной активности сердца являются ионы Ca^{2+} (С.А. Куценко, 2002). Среди нескольких ионообменных механизмов транспорта Ca^{2+} особое место принадлежит $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмену (M. Ottolia и др., 2013). Этот транспортный механизм обеспечивает оптимальную концентрацию ионов Ca^{2+} в миоплазме кардиомиоцитов. В связи с этим представляло особый интерес изучение влияния ЭМП на трансмембранные потоки кальция, сопряженные с механизмом $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в сердечной мышце. Учитывая, что ионообменник, осуществляющий $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмен, находится в сарколемме кардиомиоцитов, а также в прямой зависимости от биофизических свойств мембран, особый интерес представляло изучение состояния пероксидного окисления липидов (ПОЛ) в клетках сердца при экспозиции ЭМП.

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

Задачи исследования:

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.

Впервые изучено влияние электромагнитного поля метрового диапазона длин волн частотой 171 МГц с напряженностью электрического поля 180 В/м на процесс $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в изолированном сердце крысы. Установлено, что ЭМП снижает натрий-зависимый процесс поглощения и увеличивает скорость выхода ионов Ca^{2+} из изолированного сердца крысы. Впервые получены данные о возрастании концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в культуре кардиомиоцитов при действии ЭМП метрового диапазона. Установлено влияние антиоксиданта гистохрома на регуляцию $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в кардиомиоцитах при действии ЭМП через процесс ПОЛ.

Осуществлена оценка количества поглощенной электромагнитной энергии метрового диапазона целой крысой, а также изолированным сердцем методом математического моделирования. Отмечено увеличение концентрации продуктов ПОЛ и снижение общей антиоксидантной активности при увеличении времени экспозиции животных ЭМП. 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.

Апробация работы. 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, г. Ниш, Сербия (2014 г.).

Публикации. По материалам исследований опубликованы 23 работы, в том числе 9 статей в рецензируемых научных изданиях, включенных в перечень ВАК Минобрнауки Российской Федерации.

На защиту выносятся следующие положения:

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 ретикула 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 электромагнитного поля.

Структура и объем работы. Текст диссертации включает введение, 5 глав, выводы и список использованных источников. Текст диссертации изложен на 118 страницах машинописного текста и включает в себя 36 рисунков, 13 таблиц и 7 формул. Список литературы содержит 177 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе рассмотрены основные характеристики ЭМП радиочастотного диапазона, дано описание возможных источников ЭМП метрового диапазона и основные методы их оценки. Представлены и проанализированы результаты современных отечественных и зарубежных данных по изучению влияния ЭМП на сердечно-сосудистую систему и на процессы ПОЛ. Изложены общие представления о механизмах действия ЭМП метрового диапазона на организм.

Глава 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования были белые беспородные лабораторные крысы-самцы массой 200-250 г, изолированные сердца крыс и свежевыделенные кардиомиоциты новорожденных крыс. Источником ЭМП служила носимая радиостанция «Радий-301» («Ижевский радиозавод», Россия), работающая в метровом диапазоне длин волн на частоте 171 МГц с максимальной выходной мощностью 5 Вт.

Определение среднеквадратичной величины напряженности электрической составляющей ЭМП было выполнено с помощью измерителей Narda NBM-550 («Narda Safety Test Solutions GmbH», Германия), и системы автоматизированного сканирования DASY 52 NEO (SPEAG AG, Швейцария). Контроль частоты осуществлялся с помощью анализатора спектра АКС-1201 («Актаком», Корея).

Компьютерное моделирование производилось в программной среде SEMCAD X v. 18.6 (SPEAG AG, Швейцария) (P. Futter и др., 2008). Расчеты математических моделей осуществлялись по методу (R. Shams, R.A. Kennedy, 2007; K.S. Yee, 1966). В качестве объекта облучения в компьютерном моделировании использовались численные модели лабораторных самцов крыс массой 190 г. (IT'IS Foundation, Швейцария) (A. Christ и др., 2010). Дозиметрическая оценка взаимодействия ЭМП с биологическими объектами заключалась в математическом расчете величины удельной поглощенной мощности (УПМ). Для вычисления значений УПМ диэлектрические свойства всех тканей были получены с использованием базы данных Gabriel (C. Gabriel, 1996).

Процессы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в изолированном сердце крысы изучали на перфузионной установке.

Экспериментальные исследования проводились на 2-х группах изолированных сердец (контроль и опыт). Всего было использовано 18 животных. Под эфирным наркозом

осуществляли декапитацию животного, быстро извлекали сердце с сосудами, проводили канюлирование сердца через аорту и начинали перфузию оксигенированным раствором следующего состава (в ммоль/л): NaCl - 140, NaHCO₃ - 2, KCl - 3, трис-ОН - 2, (pH 7,4), CaCl₂ - 0,7, глюкоза – 11. Перфузию сердца проводили с одинаковой скоростью в пределах от 8 до 10 мл/мин, в зависимости от массы сердца. (В.В. Алабовский и др., 2010).

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 (2,7-бис-[(2-арсонофенил)азо]-1,8-диокси 3,6 нафталин-дисульфокислота), который является селективным реагентом на Ca²⁺. Продукт реакции между Ca²⁺ и металлоиндикатором пропускали через проточную кювету 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 аналого-цифрового преобразователя и программного обеспечения внешнего модуля «ZetLab» и программного обеспечения ZETLAB BASE (Предприятие «Электронные технологии и метрологические системы», Россия).

Инициацию натрий-зависимого поглощения ионов Ca²⁺ изолированным сердцем крысы осуществляли путем снижения суммарного уровня ионов Na⁺ в перфузионном растворе до концентрации 2 ммоль/л. Для сохранения осмотического давления вместо хлорида натрия в перфузионный раствор добавляли хлорид аммония с концентрацией 140 ммоль/л. Затем сердце перфузировали раствором, содержащим прежнюю суммарную концентрацию натрия – 142 ммоль/л. На одном и том же сердце трижды вызывали снижение, а затем возвращение прежней концентрации хлорида натрия.

В контрольной группе изолированных сердец производили три повтора уменьшения концентрации ионов Na⁺ (до 2-х ммоль/л), а затем возврата концентрации ионов Na⁺ к исходному состоянию (до 142 ммоль/л) (рис. 1 а). В опытной группе изолированных сердец первый повтор снижения и возврата прежней концентрации натрия осуществляли без воздействия ЭМП. Второй повтор 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 повторе снижение и возврат прежнего уровня натрия в растворе осуществляли без экспозиции ЭМП (рис. 1 б).



Рис. 1. Схема проведения экспериментальных исследований перфузии изолированного сердца в контрольной (а) и опытной (б) группе сердец.

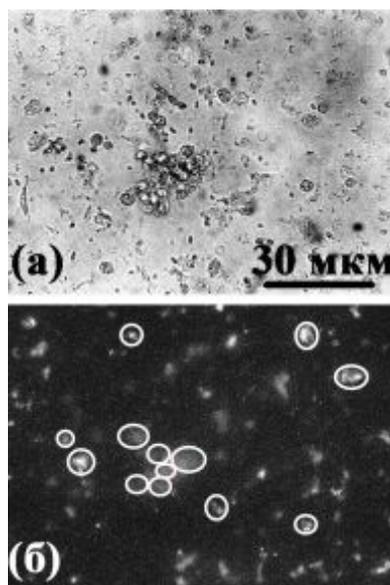


Рис. 2. Общий вид образца культуры клеток кардиомиоцитов (а) и выделенные области для анализа внутриклеточной концентрации $[Ca^{2+}]_i$ (б).

Получение изолированных кардиомиоцитов и оценка в цитоплазме концентрации $[Ca^{2+}]_i$ осуществляли по методу M.L. Lam (M.L. Lam, M. Bartoli, W.C. Claycomb, 2002) в модификации (Г.Б. Белостоцкая, Е.А. Захаров, Т.А. Голованова, 2006).

При этом использовалась компьютерная система анализа внутриклеточного содержания ионов (Intracellular Imaging & Photometry System, США), с инвертированным микроскопом Nikon TMS (x30) и монохромной цифровой видеокамерой RS-170 CCD (Cohu). Возбуждение образца проводили при 340 и 380 нм с использованием флуоресцентного красителя Фура-2. Программа InCytIm2TM рассчитывала концентрацию ионов кальция по методу G. Grynkiewicz (G. Grynkiewicz, M. Poenie, R.Y. Tsien, 1985). Фотография клеток после окрашивания флуоресцентным красителем представлена на Рис. 2.

Для изучения влияния ЭМП на состояние ПОЛ в изолированных кардиомиоцитах в качестве антиоксиданта применяли препарат гистохром (эхинохром-2,3,5,7,8-пентагидрокси-б-этил-1,4-нафтахинон, 2 %, ТИБХ, Россия) в концентрации 0,0002 %.

Оценка состояния процесса окислительной активности осуществлялась по конечным продуктам пероксидного окисления липидов в сыворотке крови. Количественное содержание малонового диальдегида (C_{MDA}) определялось методом M. Uchiyama (M. Uchiyama, M. Mihara, 1978), в модификации А.В. Арутюнян с соавт. (Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н., 2000).

Содержание диеновых конъюгатов и кетодиенов в сыворотке крови определяли по методу З.Я. Плацера (1970). Определение общей антиоксидантной активности сыворотки крови осуществляли методом Glavind J. (1963). Для каждой группы животных соответствовал свой контроль.

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 ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ПРОЦЕСС Na^+/Ca^{2+} ОБМЕНА В ИЗОЛИРОВАННОМ СЕРДЦЕ КРЫСЫ

Для изучения влияния ЭМП на процесс Na^+/Ca^{2+} обмена в миокарде на начальном этапе исследований необходимо было оценить количество поглощенной электромагнитной энергии биологическим объектом при рассматриваемых условиях экспозиции, т.е. оценить

характер распределения и значения удельной поглощенной мощности в органах и тканях биологического объекта экспозиции.

В целях анализа количества поглощенной энергии изолированным сердцем крысы была разработана компьютерная модель перфузируемого изолированного сердца. Анализ полученных данных показал, что максимальные значения удельной поглощенной мощности облучаемого изолированного сердца крысы в установке для перфузии составляет $0,46 \pm 0,03$ мВт/кг. Исследования количества поглощаемой энергии в результате воздействия ЭМП были проведены также и на различных тканях крыс с помощью численных фантомов (SPEAG AG, Швейцария). Эти модели позволили оценить распределение энергии в теле животного, облученного ЭМП, а также установить уровни удельной поглощенной мощности, приходящейся как на весь объем крысы, так и на отдельные органы и ткани.

Получив предварительные результаты этих исследований была поставлена серия экспериментов, посвященных изучению $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в условиях воздействия ЭМП метрового диапазона.

В результате проведенных экспериментальных исследований в первом повторе опытов достоверных различий показателей $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена между группами контроль-1 и опыт-1 не установлено (табл. 1). Вместе с тем отмечено, что в контрольной серии с каждым повтором инициации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена сердце более активно поглощало Ca^{2+} (Табл. 1, 2, 3). Этот факт можно объяснить постепенным повышением уровня натрия в миоплазме сердца, который более активно обменивался на внеклеточный Ca^{2+} .

Таблица 1.

Сравнение скоростей поглощения и количеств накапливаемого Ca^{2+} сердцем при $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмене в контрольной и опытной группах до начала воздействия ЭМП.

контроль -1 1-я запись параметров $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена без экспозиции ЭМП			опыт -1 1-я запись параметров $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена до экспозиции ЭМП		
интервал времени (сек)			интервал времени (сек)		
60	120	180	60	120	180
максимальная скорость поглощения Ca^{2+} (нмоль/мин·г)					
140,2±7,3	78,67,8	46,3±7,1	140,9±6,5 p>0,5	77,1±8,9 p>0,5	48,3±8,1 p>0,5
количество накапливаемого Ca^{2+} (нмоль/г)					
51,1±3,9	102,2±5,5	129,2±7,3	54,0±3,1 p>0,5	104,3±6,7 p>0,5	132,2±10,0 p>0,5

Экспозиция ЭМП в период второго повтора $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена, в первые 60 секунд регистрации показателей вызывала значительное снижение скорости поглощения и уменьшение количества накапливаемого Ca^{2+} сердечной мышцей (Табл. 2). К третьей минуте экспозиции эффект ослаблялся. Следует отметить, что воздействие ЭМП на изолированное сердце при втором повторе инициации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена привело к статистически достоверным изменениям и в третьем повторе инициации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена (Табл. 3). Причем, ослабление скорости поглощения Ca^{2+} сердцем, как и в предыдущем случае наблюдалось в момент наивысшей активности аккумуляции Ca^{2+} , т.е. в первые 60 секунд эксперимента. Следствием этого явилось снижение количества поглощенного кальция сердцем в первую минуту опытов.

Таблица 2.

Влияние электромагнитного поля на скорость поглощения и количество накапливаемого Ca^{2+} сердцем в период второго повтора инициации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена.

контроль -2 2-й повтор $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена, без экспозиции ЭМП			опыт -2 2-й повтор $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена, в процессе экспозиции ЭМП		
интервал времени (сек)			интервал времени (сек)		
60	120	180	60	120	180
максимальная скорость поглощения Ca^{2+} (нмоль/мин·г)					
153,2±5,1	48,6±7,9	14,7±4,5	122,5±4,7 p<0,01	51,0±7,4 p>0,5	27,8±5,5 p>0,5
количество накапливаемого Ca^{2+} (нмоль/г)					
65,3±2,2	105,9±4,3	117,1±6,3	50,0±2,4 p<0,01	86,5±4,9 p<0,01	103,1±7,5 p>0,5

Таблица 3.

Сравнение скорости поглощения и количества накапливаемого Ca^{2+} между опытной и контрольной группами сердец в период третьего повтора инициации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена.

контроль -3 3-й повтор $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена, без экспозиции ЭМП			опыт -3 3-й повтор $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена, после экспозиции ЭМП		
интервал времени (сек)			интервал времени (сек)		
60	120	180	60	120	180
максимальная скорость поглощения Ca^{2+} (нмоль/мин·г)					
182,5±11,2	62,4±10,4	5,4±1,9	138,4±8,7 p<0,01	72,2±10,2 p>0,5	26,7±5,4 p<0,001
количество накапливаемого Ca^{2+} (нмоль/г)					
71,7±4,4	123,8±9,1	134,7±10,5	56,7±4,2 p<0,05	105,2±7,9 p>0,5	124,7±10,0 p>0,5

На следующем этапе исследований осуществлялась оценка количества вышедшего Ca^{2+} из сердца. Выведение Ca^{2+} из сердца происходило при переводе перфузии сердца с раствора, имеющего низкую концентрацию натрия (2 мМ), на раствор, содержащий исходную концентрацию натрия (142 мМ). При этом, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник выводил Ca^{2+} из сердца в обмен на увеличивающуюся концентрацию натрия во внеклеточной среде. В результате проведенных экспериментальных исследований в первом повторе опытов достоверных различий показателей выхода ионов Ca^{2+} из сердца между группами контроль-1 и опыт-1 не установлено. Это свидетельствовало об одинаковом исходном состоянии транспортных систем, осуществляющих $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмен в обеих группах интактных изолированных сердец.

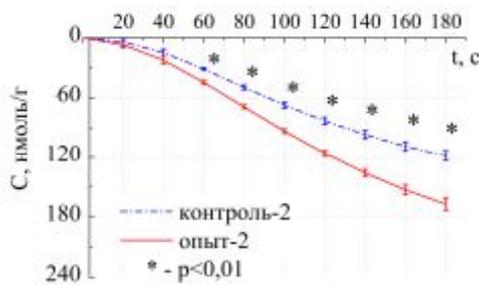


Рис. 3. Количество выводимого из сердца Ca^{2+} во втором повторе инициации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в контрольной и в опытной серии при экспозиции ЭМП.

Во втором повторе, в опытной-2 группе изолированных сердец в процессе экспозиции ЭМП количество накапливаемого Ca^{2+} в группе опытных-2 сердец статистически достоверно ($p<0,01$) снижалось на 27 % по сравнению с группой контроля-2 (рис. 3).

В третьем повторе, несмотря на отсутствие экспозиции ЭМП, количество выводимого Ca^{2+} в группе опытных-3 сердец сопровождался достоверно значимым ($p < 0,01$) снижением на 60% по сравнению с группой контроля-3 (рис. 4).

На основании полученных данных можно предположить, что ослабление процесса транспорта Ca^{2+} в кардиомиоцитах в ходе $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена и более интенсивный процесс выведения иона из сердечной мышцы могло быть обусловлено увеличением уровня цитоплазматического Ca^{2+} . Возрастание концентрации свободного Ca^{2+} в цитоплазме кардиомиоцитов могло уменьшать скорость поглощения и стимулировать интенсивность его выведение из миокардиальных клеток.

Возможным источником повышения концентрации цитоплазматического Ca^{2+} может явиться саркоплазматический ретикулум, поскольку в литературе имеются сведения о способности ЭМП ослаблять транспорт ионов Ca^{2+} в фрагментах саркоплазматического ретикулума, выделенного из сердец крыс (Ginsburg K.S., 1998; Логинов, 1991).

Глава 4. ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ НА УРОВЕНЬ СВОБОДНОГО $[\text{Ca}^{2+}]_i$ В ИЗОЛИРОВАННЫХ КАРДИОМИОЦИТАХ КРЫСЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТОЯНИЯ ПЕРОКСИДНОГОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

В первой серии экспериментов осуществлялась оценка внутриклеточная концентрация $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в исходном состоянии кардиомиоцитов (контроль). Она составляла около 73 нмоль/л, что соответствовало литературным данным (Г.Б. Белостоцкая и др 2006). Результаты экспериментов представлены на рисунке 5.

Во второй серии экспериментов осуществлялась экспозиция ЭМП кардиомиоцитов в течение 3 мин. вблизи источника излучения. После экспозиции производилась 10-минутная регистрация показателей.

Результаты опытов показали, что 3-х минутное экспозиция кардиомиоцитов ЭМП приводила к достоверному увеличению внутриклеточной концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_i$ по сравнению с контролем (Рис 5). Поскольку флуоресцентные сигналы от $[\text{Ca}^{2+}]_i$ регистрировались в цитоплазматическом отсеке кардиомиоцитов, предполагалось, что повышение его уровня было обусловлено за счет выхода кальция из саркоплазматического ретикулума. Причиной высвобождения ионов могло служить повреждение мембран ретикулума пероксидными реакциями в липидах, инициируемых ЭМП.

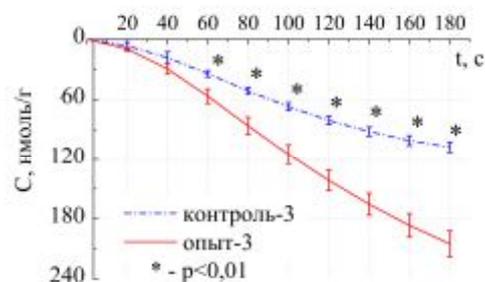


Рис.4. Количество выводимого из сердца Ca^{2+} в третьем повторе инициации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в контроле и в опытной серии после экспозиции ЭМП

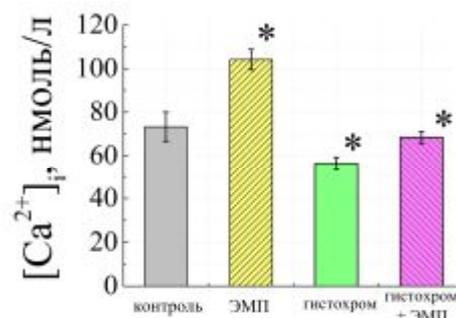


Рис.5. Внутриклеточная концентрация $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в кардиомиоцитах в контроле, после облучении ЭМП, при обработке кардиомиоцитов гистохромом и сочетанном воздействии на сердечные клетки гистохромом и экспозицией ЭМП в течение 3 минут.

В связи с этим была предпринята попытка ослабить процесс ПОЛ с помощью водорастворимого антиоксиданта гистохрома. На первом этапе изучалось влияние гистохрома на уровень $[Ca^{2+}]_i$ до экспозиции ЭМП. Результаты опытов показали, что гистохром достоверно снижал цитоплазматическую фракцию кальция

В четвертой серии опытов оценивалась концентрация $[Ca^{2+}]_i$ при сочетанном влиянии на кардиомиоциты гистохрома и экспозиции ЭМП с частотой 171 МГц и напряженностью электрического поля 180 В/м. Был отмечен рост уровня $[Ca^{2+}]_i$ в цитоплазме кардиомиоцитов. Однако это небольшое увеличение было значительно слабее, чем в опытах при воздействии ЭМП без применения гистохрома. Таким образом было показано, что экспозиция в течении 3-х минут оказывает существенное влияние на распределение $[Ca^{2+}]_i$ между его внутриклеточным запасом и цитоплазмой. Нарушение этого соотношения вызывается, возможно, прямым воздействием ЭМП на мембраны клеток путем активации процессов пероксидного окисления липидов.

Однако для этого вывода были необходимо научное подтверждение способности ЭМП оказывать регуляторное действие на процессы ПОЛ, участвующих во внутриклеточной регуляции $[Ca^{2+}]_i$.

Глава 5. ОЦЕНКА УРОВНЯ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ

Изучение процессов окислительного стресса у лабораторных животных включало определение концентрации продуктов ПОЛ, а так же оценку общей антиокислительной активности в сыворотке крови. Изучение влияния ЭМП на процессы ПОЛ у крыс проводили на 4-х группах животных, которые подвергались облучению частотой 171 МГц с напряженностью 10, 30, 60 и 90 В/м в течение 1 и 3 часов. Во время облучения животные размещались в специальных радиопрозрачных контейнерах параллельно к источнику ЭМП.

Установлено, что экспозиция животного в течение 1-го часа ЭМП с интенсивностью 90 В/м (УПМ = 0,45 мВт/кг) привела к достоверному увеличению концентрации малонового диальдегида, а при увеличении времени экспозиции до 3-х часов зарегистрировано повышение продукта ПОЛ уже на 30 В/м (УПМ = 0,12 мВт/кг) (рис. 6).

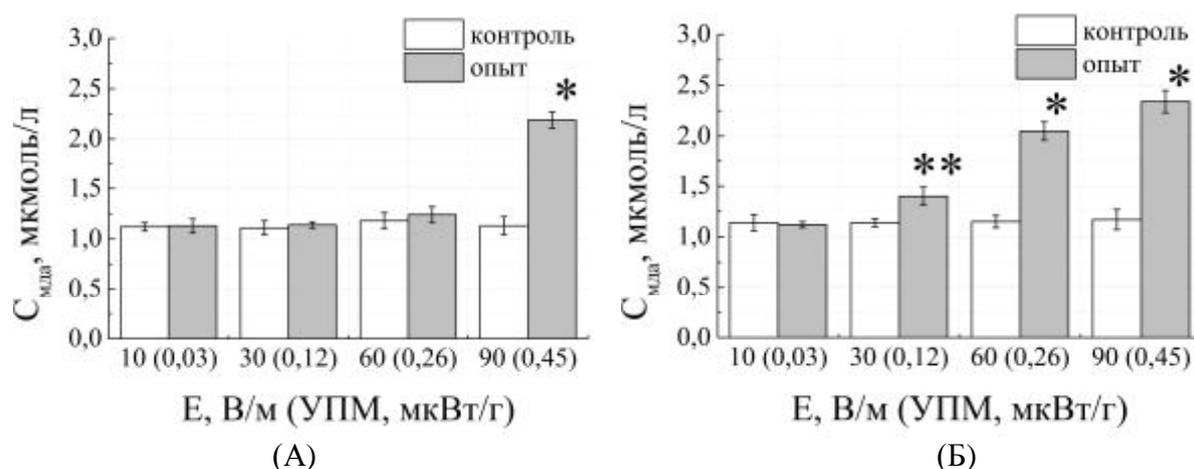


Рис. 6. Изменения концентраций малонового диальдегида при экспозиции животных в течение 1 часа (А) и в течении 3-х часов (Б) (** $p < 0,05$; * $p < 0,01$)

Не менее значимым в изучении действия ЭМП на состояние процесса ПОЛ в целостном организме явилось решение вопроса о действии поглощенной электромагнитной энергией при однократной экспозиции (серия I), при воздействии в течении 5 дней, каждая экспозиция продолжалась 9 минут (серия II), а также в течении 5 дней, но при увеличении длительности экспозиции до 30 минут (серия III).

Полученные результаты показали, что однократная экспозиция (серия I), приводила к увеличению уровня диеновых конъюгатов в сыворотке крови (рис. 7, А). Экспозиция ЭМП в течение 5 дней и длительностью 9 минут при каждом сеансе вызывало снижение концентрации диеновых конъюгатов и падение уровня общей антиоксидантной активности (рис 7 А, В). Увеличение длительности воздействия до 30 минут в каждом сеансе усиливало изменения, наблюдаемые в предыдущей серии, в этих опытах дополнительно наблюдалось достоверное повышение концентрации кетодиенов (рис. 7).

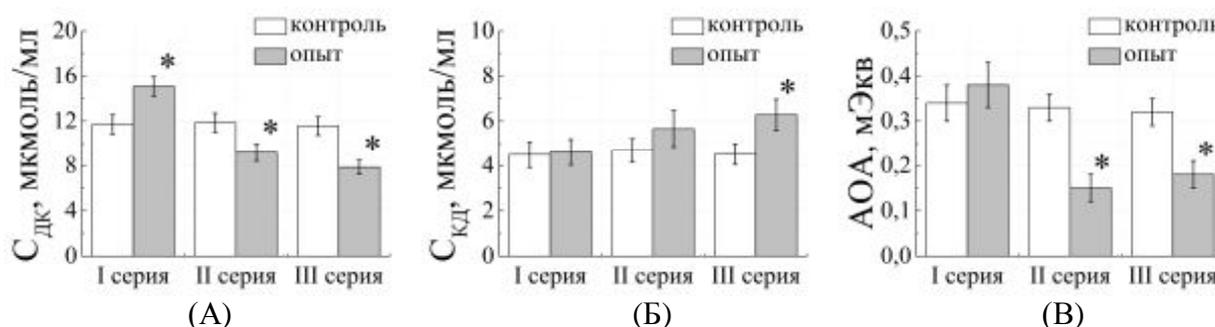


Рис. 7. Изменение концентрации диеновых конъюгатов (А), кетодиенов (Б) и общей антиоксидантной активности (В) при различной длительности экспозиции животных.
* $p < 0,05$

Таким образом, полученные результаты экспериментов доказывают возможность ЭМП метрового диапазона частотой 171 МГц с напряженностью 180 В/м влиять на процессы ПОЛ в организме животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполненные эксперименты по изучению влияния ЭМП метрового диапазона длин волн, с использованием биологических объектов различного уровня организации (от клеточного до изолированного сердца крысы), в которых исследовалось состояние Na^+/Ca^{2+} обмена, дают возможность сформулировать некоторые положения об определяющих их механизмах.

Результаты проведенных исследований показали, что воздействие на изолированное сердце крысы ЭМП частотой 171 МГц с напряженностью 180 В/м и средним значением поглощенной энергии $0,46 \pm 0,03$ мВт/кг приводит к изменениям Na^+/Ca^{2+} обмена в миокарде – ослаблению скорости поглощения и усилению выхода внутриклеточных ионов Ca^{2+} из кардиомиоцитов. Обнаруженные изменения в процессе Na^+/Ca^{2+} обмена под влиянием ЭМП метрового диапазона, вероятнее всего, связаны с нарушением регуляции содержания внутриклеточного Ca^{2+} . Смещение направленности Na^+/Ca^{2+} обмена в сторону выведения

внутриклеточных ионов Ca^{2+} из кардиомиоцитов происходит за счет выхода его из саркоплазматического ретикулума в миоплазму кардиомиоцитов.

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 внутриклеточных структур его хранения в кардиомиоцитах, в результате уровень его в цитозоле увеличивается на 42 % по сравнению с контрольными клетками. Несомненно, что основным источником увеличения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , является саркоплазматический ретикулум. Антиоксидант гистохром, являющийся перехватчиком активных форм кислорода и подавляющий, таким образом, процессы ПОЛ, существенно ослабляет потерю Ca^{2+} из внутриклеточных структур его хранения в кардиомиоцитах.

На основании литературных данных и полученных в диссертационном исследовании результатов предложена гипотетическая схема влияния ЭМП метрового диапазона длин волн на процессы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в клетках миокарда (рис. 8).

Экспозиция ЭМП приводит к активации процессов ПОЛ, которые в свою очередь сопровождаются изменением свойства мембран саркоплазматического ретикулума поддерживать высокий трансмембранный градиента ионов Ca^{2+} . Повышенная проницаемость кальция в ретикулуме сопровождается увеличением его концентрации в миоплазме кардиомиоцитов. Все эти последствия, в итоге, отражаются и на процессе $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена. Возрастание внутриклеточной фракции Ca^{2+} ослабляет скорость проникновения ионов Ca^{2+} внутрь кардиомиоцитов. Количество поглощаемого Ca^{2+} миокардом достоверно уменьшается. Однако, в условиях выведения Ca^{2+} из клеток, удаление иона из сердца с помощью $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена существенно облегчается.

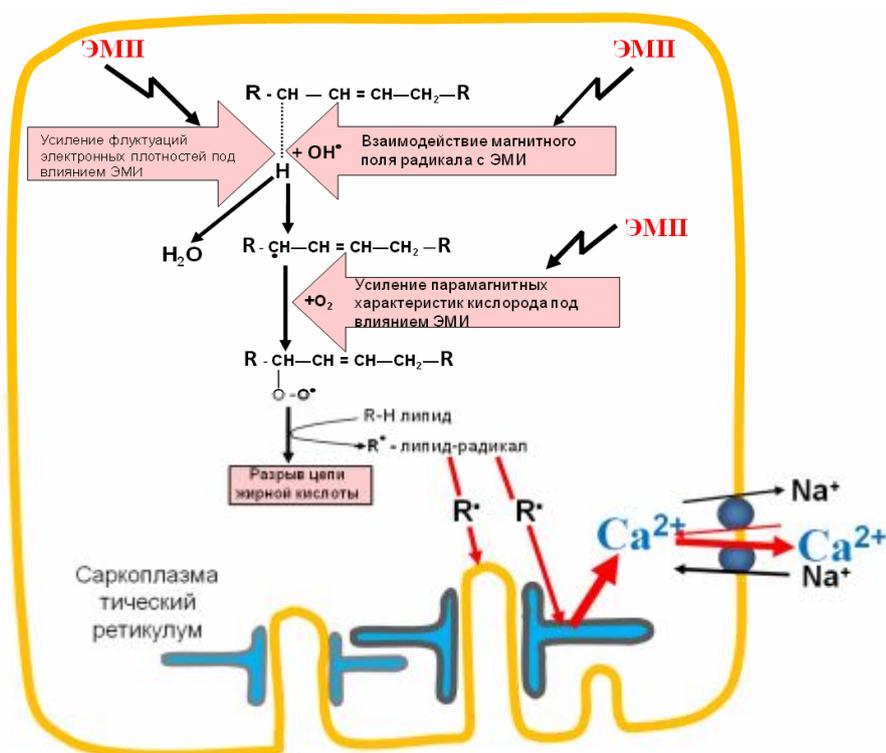


Рис. 8 Гипотетическая схема влияния ЭМП метрового диапазона длин волн на процессы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в клетках миокарда.

Следует отметить, что сохранение способности сердечной мышцы быстро выводить избыток Ca^{2+} из кардиомиоцитов свидетельствует об интактности самого $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменника. Регулирующие свойства его, по-видимому, сохраняются полностью. Это свидетельствует о том, что наибольшее влияние ЭМП оказывает на более разветвленную сеть внутриклеточных мембранных структур – саркоплазматический ретикулум. Сарколема, в которой находится белковая часть $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменника менее подвержена воздействию ЭМП, поскольку она защищена слоем гликокаликса.

Рассчитанные значения максимальных и средних значений УПМ в различных органах модели крысы при разных вариантах экспозиции ЭМП метрового диапазона, полученные с помощью математического моделирования, позволили установить максимальные и усредненные значения поглощения электромагнитной энергии в теле животного и его органах. Эти данные показывают высокую вероятность воздействия ЭМП на органы и ткани человека.

Результаты проведенных исследований напрямую относятся к проблеме электромагнитной безопасности ЭМП метрового диапазона длин волн, которые, как показали результаты настоящей работы, обладают высокой биологической активностью. 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Богачева Е.В.**, Алабовский В.В., Перов С.Ю. Определение концентрации малонового диальдегида в сыворотке крыс облученных электромагнитным полем метрового диапазона // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. - 2016. - Т. 16, № 1. - С. 70-73.
2. Алабовский В.В., Кудряшов Ю.Б., Винокуров А.А., **Богачева Е.В.**, Маслов О.В., Перов С.Ю. Влияние электромагнитного поля радиочастотного диапазона на состояние $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в изолированном сердце крысы // Радиационная биология. Радиоэкология. - 2016. - Т. 56, № 2. - С. 171-176.
3. Алабовский В.В., Перов С.Ю., Винокуров А.А., Маслов О.В., **Богачева Е.В.** Эффекты действия электромагнитных полей метрового диапазона на $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ионнообменную систему мышечных клеток изолированного сердца крысы // Техногенные системы и экологические риски: Тезисы докладов XIII Региональной конференции / Под общ. ред. А.А. Удаловой. - Обнинск: ИАТЭ НИЯУ МИФИ, 2016. - 178 с., с 126-168.
4. Алабовский В.В., **Богачева Е.В.**, Маслов О.В. Состояние $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в изолированном сердце крысы в условия экспозиции электромагнитным полем // Проблемы современной физико-химической биологии. Сборник тезисов. – Пущино: типография Fix-print, 2015. – с. 115-116.
5. **Богачева Е.В.**, Алабовский В.В., Перов С.Ю. Процессы пероксидного окисления липидов крыс в условиях экспозиции электромагнитным полем метрового диапазона // Научные труды VII Международного конгресса "Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине" 07-11 сентября 2015 г., Санкт-Петербург, 126 с.
6. **Богачева Е.В.**, Алабовский В.В., Маслов О.В., Винокуров А.О., Перов С.Ю. Процесс $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена в изолированном сердце крысы в условиях экспозиции электромагнитным полем метрового диапазона// Научные труды VII Международного конгресса "Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине" 07-11 сентября 2015 г., Санкт-Петербург, 290 с., 125 с.
7. Маслов О.В., Винокуров А.А., **Богачева Е.В.** Исследование механизмов действия электромагнитных полей низкой интенсивности на состояние натрий-кальциевой обменной системы изолированного сердца крысы // Биология – наука XXI века: 19-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 20 - 24 апреля 2015 г.). Сборник тезисов, с.100–101.
8. Перов С.Ю., **Богачева Е.В.**, Лазарашвили Н.А., Безрукавникова Л.М. Экспериментальное исследование влияния электромагнитных полей метрового диапазона на некоторые показатели окислительного стресса // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. - 2015. - Т. 15. - № 3. - С. 44-47.
9. Перов С.Ю., **Богачева Е.В.** Теоретическая и экспериментальная дозиметрия в оценке биологического действия электромагнитных полей носимых радиостанций. Сообщение 2. Гомогенные фантомы головы // Радиационная биология. Радиоэкология, 2015, том 55, № 4, с. 431–435.
10. Алабовский В.В., Перов С.Ю., Маслов О.В., **Богачева Е.В.** Состояние $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменной системы изолированного сердца крысы в оценке биологического действия электромагнитных полей радиочастотного диапазона // Экспериментальная и теоретическая биофизика'14. Сборник тезисов. – Пущино: типография Fix-Print, 2014. - 232 с., 148 с.
11. **Богачева Е.В.**, Маслов О.В., Перов С.Ю. Изучение биологического действия электромагнитных полей радиочастотного диапазона носимых средств связи на модели изолированного сердца крысы // Материалы V Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов с международным участием "Окружающая среда и здоровье. Здоровая среда - здоровое наследие" Под редакцией академика РАН Ю.А. Рахманина. - 25 – 26 сентября 2014 г. Москва. - с. 63- 67.

12. Алабовский В.В., Перов С.Ю., Маслов О.В., **Богачева Е.В.** Исследование состояния пероксидного окисления липидов в сыворотке крови крыс в результате облучения электромагнитным полем метрового диапазона // VII Съезд по радиационным исследованиям (радиобиология, радиозэкология, радиационная безопасность): тезисы докладов, Москва, 21-24 октября 2014 г. - М.: 2014. - 456 с., с. 201.
13. **Bogacheva E.**, Perov S., Balzano Q., Kuster N., Alabovskiy V. VHF portable radio transmitters: theoretical and experimental dosimetry. // Book of Abstracts / The Second International Conference on Radiation and Dosimetry in Various Fields of Research, RAD 2014, May 27-30, 2014, Niš, Serbia, p. 209.
14. Перов С.Ю., **Богачева Е.В.** Теоретическая и экспериментальная дозиметрия в оценке биологического действия электромагнитных полей носимых радиостанций. Сообщение 1. Плоские фантомы // Радиационная биология. Радиозэкология, 2014, том 54, № 1, с. 57–61.
15. Перов С.Ю., Маслов О.В., **Богачева Е.В.** Исследование влияния радиочастотного электромагнитного излучения на биологические модели в условиях ближней зоны // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук, №12(59), декабрь 2013, Ч.III, с. 59-60.
16. Перов С.Ю., Маслов О.В., **Богачева Е.В.** Исследование влияния радиочастотного электромагнитного излучения на биологические модели в условиях ближней зоны // Экспериментальная и теоретическая биофизика '13. Сборник тезисов. – Пушкино: типография Fix-Print, 2013. - 176 с., 121 с.
17. Перов С.Ю., **Богачева Е.В.**, Белая О.В. Моделирование электромагнитных полей в диапазоне очень высоких частот применительно к задачам медико-биологических исследований // Биомедицинская радиоэлектроника - 2013 - № 12 - с. 61-65.
18. Перов С.Ю., **Богачева Е.В.** Дозо-временные зависимости при оценке биологического действия электромагнитных полей нетепловых уровней экспозиции // Биология – наука XXI века: 17-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 21 - 26 апреля 2013 года). Сборник тезисов, с.167-168.
19. Рубцова Н.Б., Перов С.Ю., **Богачева Е.В.** Кюстер Н. К разработке гармонизированных с международными методов оценки производственных воздействий электромагнитных полей носимых радиостанций // Ж. «Медицина труда и промышленная экология», 2013, №2, с. 9-13.
20. **Богачева Е.В.** Численная дозиметрия неионизирующих излучений, создаваемых носимыми радиостанциями // Экспериментальная и теоретическая биофизика '12. Сборник тезисов. – Изд-во. ИП Воронова, 2012. – с. 99.
21. **Богачева Е.В.** Дозиметрия электромагнитных полей в медико-биологических исследованиях// Биология – наука XXI века: 16-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 16 - 21 апреля 2012 года). Сборник тезисов, с. 299-300.
22. Перов С.Ю., **Богачева Е.В.** Сравнение методов оценки носимых средств связи: российский и международный подходы // Медицина труда и промышленная экология – 2012 - №3 – с. 36-40.
23. Рубцова Н.Б., Перов С.Ю., **Калиничева Е.В.** Гигиеническая оценка электромагнитных полей носимых радиостанций// Вестник новых медицинских технологий – 2011 – т. XVIII - № 2 – с. 284-285.

Статьи № 1, 8, 17 и 23 опубликованы в научных изданиях, включенных в перечень ВАК Минобрнауки РФ, по профилю научной специальности. Статьи № 2, 9, 14, 19, и 22 опубликованы в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования (PubMed, Scopus, WoS).