

АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ КОМБИНАЦИИ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Никанорова Е.А., Варганова И.А., Медведев Я.И., Нагиба В.И.

Российский Федеральный ядерный центр – Всероссийский НИИ экспериментальной физики

пр. Мира, 37, Саров, Нижегородская обл., 606189, РФ; e-mail: gane@orb2.vniief.ru

Поступила в редакцию 21.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0524

Аннотация Представлены результаты сравнительного исследования биоэффектов 30-минутного сеанса воздействия электромагнитным излучением с частотой 1000 мГц и ППЭ 10 мВт/см², 30-минутного сеанса воздействия низкочастотным импульсным магнитным полем с магнитной индукцией 4 мТл, а также их комбинации, на уровень апоптоза лимфоцитов крыс *in vivo*. Уровень апоптоза оценивали морфологически на флуоресцентном микроскопе после 24-часового культивирования клеточных суспензий в иммунологических планшетах при 37 °С в питательной среде без нагрузки. Количественно определяли процентное содержание клеток с признаками апоптоза (маргинация, конденсация и фрагментация хроматина в ядре). Установлено, что электромагнитное излучение не оказало значимого влияния на уровень апоптоза, а действие магнитного поля привело к снижению уровня апоптотических клеток на 16 % ($p \leq 0,01$) в сравнении с контрольной группой. Комбинация электромагнитного излучения и низкоинтенсивного магнитного поля повышала количество апоптотических клеток на 28% ($p \leq 0,01$) по сравнению с контролем. Таким образом, опосредованное действие ЭМИ на геном клеток крови приводит к нарушению его нормального функционирования. Показано, что низкочастотное магнитное поле может разнонаправленно влиять на внутриклеточные процессы, в комбинации с электромагнитным излучением оно может усиливать патологические реакции, и, тем самым, запускать массовую программу апоптоза.

Ключевые слова: электромагнитное излучение, низкочастотное импульсное магнитное поле, лимфоциты, апоптоз.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день создана новая техногенная среда обитания, в которой на человека постоянно воздействует сложноорганизованное модулированное электромагнитное излучение (ЭМИ) широкого спектра частот. Развитие новых телекоммуникационных стандартов связи влечет за собой усложнение структуры сигналов, освоение новых диапазонов частот ЭМИ, увеличение площади покрытия и продолжительности радиопередающих систем. Неизбежность подвергнуться воздействию электромагнитного излучения с возможно неблагоприятными последствиями заставляет нас оценивать опасность различных типов этого физического фактора для здоровья человека [1]. Возможный механизм влияния ЭМИ на биосистемы состоит в их взаимодействии и интерференции с эндогенными полями и изменении информационной составляющей естественных сигналов из окружающей среды [2]. Степень влияния эффектов ЭМИ на биосистемы зависит от частоты волны (определяет затухание и глубину проникновения в ткани); от параметров экспозиции электромагнитного поля (импульсные поля более эффективны, чем непрерывные); от формы импульса (излучения с прямоугольной формой импульса более биоэффективны, чем с синусоидальной); от напряженности поля (наличие амплитудных окон с наибольшим физиологическим сдвигом) [3].

В то же время показано, что локальное действие импульсного магнитного поля вызывает изменение состояния неспецифических адаптационных механизмов; с модификацией реактивности организма на уровне клетки [4]. Комбинация двух физических факторов, влияющих на одинаковые системы, вызывает более выраженный биологический эффект, чем комбинация факторов, влияющих на разные системы [5].

Исследование воздействия физического фактора на организм подразумевает изучение последствий его влияния на систему крови, пролиферацию клеток, экспрессию генов, генотоксические и канцерогенные эффекты. Возникновение тяжелых патологических состояний связано с такими нарушениями программы клеточной гибели (апоптоза), при которых клетки либо перестают погибать, и тогда возможно возникновение опухолей; либо гибель захватывает избыточное число клеток, что, в свою очередь, приводит к патологической дегенерации тканей и органов. Вопросы исследования молекулярных механизмов апоптоза в последние годы стали одной из самых актуальных проблем биологических наук.

Целью настоящей работы являлось изучение биоэффектов действия электромагнитного излучения (ЭМИ), низкоинтенсивного импульсного магнитного поля (МП), а также их комбинации на уровень апоптоза клеток крови лабораторных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовали белых беспородных крыс – самцов в количестве 48 особей, массой 200-220 граммов, разделенных на четыре группы по 12 животных в каждой, в зависимости от характера воздействия.

Эксперименты проводили в соответствии с требованиями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Биологические эффекты оценивали через 10 минут после окончания 30-минутного сеанса воздействия на животных электромагнитным излучением частотой 1000 МГц и средней плотностью потока энергии 4,54 мВт/см²; а также после 30-минутного сеанса воздействия на животных импульсным низкоинтенсивным магнитным полем с максимальным значением модуля магнитной индукции в рабочей зоне индуктора 4 мТл и формой сигнала в виде затухающей синусоиды. Сочетанное воздействие двух факторов осуществляли последовательно с 2-минутным временным промежутком между воздействиями ЭМИ и НМП. Для реализации ЭМИ использовали экспериментальную радиотехническую систему, включающую генератор, усилитель и рупорную антенну. Контроль уровня плотности потока энергии осуществляли с помощью прибора ПЗ – 41 (Россия). Источником импульсного МП служил макетный образец разработанного во ФГУП «РФЯЦ-ВНИИЭФ» программно-аппаратного комплекса «Буфон» [6]. Магнитную индукцию измеряли миллителислетром Ш1-15У-01 (Россия). Животных контрольных групп экспонировали в рабочей зоне установки при отсутствии воздействующего фактора в течение 30 минут. Все воздействия проводили на животных, помещенных в пластиковом контейнере без фиксации.

Взятие образцов крови проводили из подязычной вены крыс в пластиковые моноветы с гепарином лития в конечной концентрации 50 Ед/мл. Лимфоциты крови сразу же выделяли в градиенте плотности Ficoll-Paque (Швеция) согласно [7]. Уровень апоптоза свежeweделенных лимфоцитов крови животных оценивали морфологически после 24-часового культивирования клеточных суспензий в иммунологических планшетах, помещенных в термошейкер PST-60HL «Biosan» (Латвия) при 37 °С в питательной среде с антибиотиками без тестирующей нагрузки по модифицированной методике [8]. Клеточные суспензии затем фиксировали в 2%-ном растворе параформальдегида и хранили при 4 °С. Количественно определяли содержание клеток с признаками апоптоза (маргинация, конденсация и фрагментация хроматина в ядре (рис. 1), с использованием ДНК-специфичного флуорохрома акридинового оранжевого, на флуоресцентном микроскопе «Axio» (Германия). Для акридинового оранжевого использовали фильтр с длиной волны возбуждения 450-490 нм и эмиссии 515 нм. У каждого животного анализировали не менее трех повторностей клеточных культур, учитывали не менее 200 клеток для каждой повторности [9]. Уровень апоптоза оценивали по апоптотическому индексу, рассчитанному как процентное отношение числа клеток с признаками апоптоза к общему числу просмотренных клеток.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами согласно [10]. Для каждого параметра был проведен расчёт основных статистических показателей: среднего значения, стандартного отклонения, дисперсии. Проверку статистической гипотезы о нормальности распределения проводили с использованием критерия Шапиро-Уилка. Оценку статистически значимых различий средних значений показателей, полученных в экспериментальных и контрольных группах, при нормальном распределении и равенстве дисперсий, проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента, а при распределении, отличным от нормального, использовали непараметрические критерии Манна-Уитни и двухвыборочный критерий Уилкоксона [11]. Различия между сравниваемыми величинами считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Степень отклонения параметра от контрольного уровня выражали в процентах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процентное содержание клеток с признаками апоптоза в культурах выделенных лимфоцитов в исследуемых группах животных представлено в таблице 1 и на рисунке 2.

В ходе исследований установлено, что в контрольной группе животных после 24-часовой инкубации в питательной среде доля лимфоцитов с морфологическими признаками апоптоза составила 15%, что соответствует опубликованным данным [12]. Морфологически апоптоз проявлялся в конденсации цитоплазмы, сморщивании клетки, ярком свечении и агрегации хроматина вблизи ядерной оболочки; в образовании апоптотических телец (изолированные ядерные фрагменты вместе с содержимым цитоплазмы, включающие

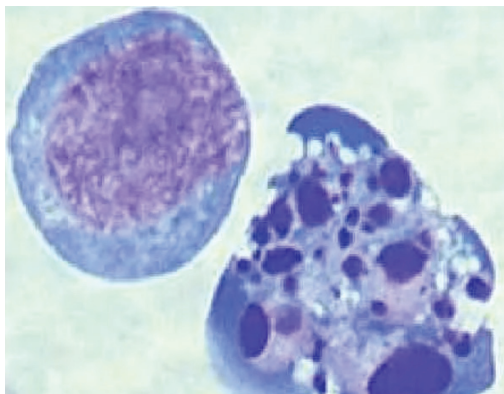


Рисунок 1. Пример клетки крови с признаками апоптоза, рядом нормальный лимфоцит (приводится по [7])

Таблица 1. Апоптоз в клеточных культурах различных групп животных

Группа животных	Проанализировано клеток	Содержание клеток с признаками апоптоза, % от общего количества, $M \pm m$
Контроль	7253	$15,0 \pm 0,42$
МП	7255	$12,7 \pm 0,39^{***}$
ЭМИ	6618	$16,3 \pm 0,5$
ЭМИ+МП	7216	$19,2 \pm 0,46^{***}$

Примечание:*** - статистически значимое отличие от среднего значения в контроле, $p \leq 0,001$

интактные органеллы и окруженные фрагментами плазматической мембраны), фагоцитируемых соседними клетками или макрофагами [13].

Количество апоптотических клеток в группе животных, подвергнутых действию магнитного поля (НМП), оказалось значимо ниже на 16% ($p \leq 0,01$) по сравнению с контрольным уровнем, однако находилось в пределах нормы. Полученные данные согласуются с результатами исследователей, показавших, что действие МП может приводить к потере устойчивости клеток к антиапоптотическим сигналам посредством повышения экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 [14]. Механизм этого явления обусловлен тем, что клетка не в состоянии выполнять свои функции в организме до тех пор, пока не восстановит существующие в ней повреждения ДНК. В работе [15] показано, что слабое низкочастотное комбинированное магнитное поле может как стимулировать, так и замедлять развитие физиологического процесса. Направленность и величина биоэффектов слабых МП, настроенных в режиме параметрического резонанса, зависят от ферментативной активности живой системы [15]. С другой стороны, ослабление апоптотической гибели клеток является одним из важнейших факторов канцерогенеза [16]. В целом, выявленные функциональные изменения после воздействия ЭМИ как отдельно, так и в комбинации с низкочастотными МП, можно рассматривать как неблагоприятные, поскольку как подавление, так и усиление апоптоза ведет к патологическим изменениям в органах и тканях [17].

В группе животных, подвергнутых действию ЭМИ-излучения, установлена тенденция к повышению числа клеток с апоптозом относительно контрольных значений. Данные литературы указывают на то, что влияние ЭМИ на апоптоз лимфоцитов *in vitro* может быть различным и зависит от времени воздействия, а также от частотных и амплитудных характеристик поля [18,19].

Показатель апоптоза клеток крови в группе животных, подвергнутых сочетанному воздействию «ЭМИ+МП», оказался на 28% значимо выше контроля ($p \leq 0,01$), а также на 51% значимо отличался от показателя в группе «МП» ($p \leq 0,01$). Это может указывать на массивный выброс активных форм кислорода, которые в высоких концентрациях способны ингибировать синтез ДНК и деление клеток, тем самым активируя апоптоз [20].

Таким образом, низкоинтенсивное магнитное поле оказалось способным оказывать разнонаправленные биоэффекты, зависящие от наличия другого, энергетически более ёмкого физического фактора. Возрастание апоптоза в группе «ЭМИ+МП» может быть обусловлено формированием неспецифической реакции клеток на комбинацию внешних воздействий, в результате которой расходуется определённое количество энергии, накопленной в виде макроэргических связей АТФ, а также способностью ЭМИ к активации сигнальных путей апоптотической гибели клеток [21]. Результаты сравнительного анализа биоэффектов, развивающихся в

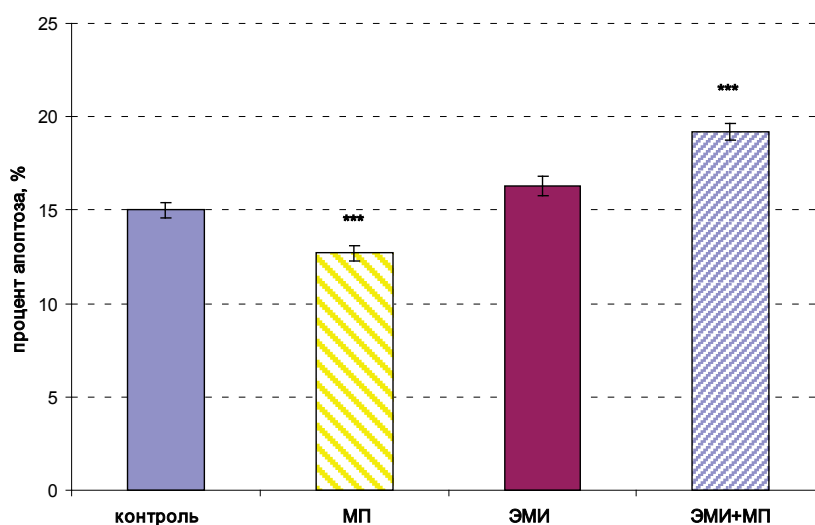


Рисунок 2. Процентное содержание клеток с морфологическими признаками апоптоза в исследуемых группах животных

Примечание: ***- статистически значимое отличие от среднего значения в контроле, $p \leq 0,001$

организме при действии физических факторов по отдельности и в сочетании, можно рассматривать как методологическую основу для понимания некоторых физиологических механизмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Действие импульсного магнитного поля, генерируемого установкой «Бутон», статистически значимо снижало количества клеток с признаками апоптоза. Длительность воздействия ЭМИ выбранных параметров оказалась недостаточна для значимого влияния на апоптоз лимфоцитов. Сочетанное действие «ЭМИ+МП» привело к статистически значимому увеличению количества апоптозных клеток по сравнению с контролем. Установленные нами статистически значимые различия в уровне апоптоза лимфоцитов после облучения МП и сочетанного (ЭМИ+МП) воздействия согласуются с данными литературы. Биологический эффект действия импульсного магнитного поля, электромагнитного излучения и их комбинации в целом зависит от времени воздействия и частотных и амплитудных характеристик воздействия.

Список литературы / References

1. Григорьев Ю.Г. Мобильная связь и электромагнитный хаос в оценке опасности для здоровья населения. Кто несет ответственность? *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2018, т. 58, № 6, с. 633-645. [Grigoriev Yu.G. Mobile communications and electromagnetic chaos in assessing the danger to public health. Who is responsible? *Radiation biology. Radioecology*, 2018, vol. 58, no. 6, pp. 633-645. (In Russ.)]
2. Ахиезер А.И., Ахиезер И.А. *Электромагнетизм и электромагнитные волны*. Учебное пособие для вузов. М.: Высшая школа, 1985, 504 с. [Akhiezer A.I., Akhiezer I.A. *Electromagnetism and electromagnetic waves*. Textbook for universities. M.: Higher school, 1985, 504 p. (In Russ.)]
3. Кудряшов Ю.Б., Перов С.Ю., Рубин А.Б. *Радиационная биофизика: радиочастотные и микроволновые электромагнитные излучения*. Учебник. М.: Физматлит, 2008, 184 с. [Kudryashov Yu.B., Perov S.Yu., Rubin A.B. *Radiation biophysics: radiofrequency and microwave electromagnetic radiation*. Textbook. M.: publishing house Phismatlit, 2008, 184 p. (In Russ.)]
4. Куликов А.Г., Воронина Д.Д. Возможности общей магнитотерапии в лечении и реабилитации (обзор). *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*, 2016, т. 93, № 2, с. 48-52. [Kulikov A.G., Voronina D.D. Possibilities of general magnetic therapy in treatment and rehabilitation (review). *Issues of balneology, physiotherapy and exercise therapy*, 2016, vol. 93, no. 2, pp. 48-52. (In Russ.)]
5. Ушаков И.Б. *Комбинированные воздействия в экологии человека и экстремальной медицины*. М.: Издатцентр, 2003, 442 с. [Ushakov I.B. *Combined impacts in human ecology and extreme medicine*. M.: Izdattsentr, 2003, 442 p. (In Russ.)]
6. *Макетный образец программно-аппаратного комплекса «Бутон»*. Свидетельство на товарный знак № 386501 от 03.12.2007. Патент RU 2290970 C2 от 28.03.2005. Патент RU 159809 U1 от 16.06.2015. [Model sample of the hardware-software complex "Buton". Trademark certificate No. 386501 dated 03.12.2007. Patent RU 2290970 C2 dated March 28, 2005. Patent RU 159809 U1 dated 06.16.2015. (In Russ.)]
7. Скибо Ю.В., Абрамова З.И. *Методы исследования программируемой клеточной гибели*. Учебно-методическое пособие для магистров по курсу «Теория апоптоза». Казань: ФГАОУ ВПО КФУ, 2011, 61 с. [Skibo Yu.V., Abramova Z.I. *Methods for the study of programmed cell death*. Educational and methodological manual for masters in the course "Theory of apoptosis". Kazan: FGAOU VPO KFU, 2011, 61 p. (In Russ.)]
8. Карпищенко А.И. *Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике*. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013, 792 с. [Karpishchenko A.I. *Medical laboratory technologies: a guide to clinical laboratory diagnostics*. M.: GEOTAR-Media, 2013, 792 p. (In Russ.)]
9. Свирновский А.И., Шелег С.В. и др. *Методы оценки структурно-функционального состояния лимфоцитов периферической крови*. Методические рекомендации. Минздрав Респ. Беларусь, 2000, рег. № 173-0012. [Svirnovsky A.I., Sheleg S.V. *Methods for assessing the structural and functional state of peripheral blood lymphocytes*. Guidelines. Ministry of Health Rep. Belarus, 2000, reg. no. 173-0012. (In Russ.)]
10. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. *Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel*. Киев: Морион, 2000, 319 с. [Lapach S.N., Chubenko A.V., Babich P.N. *Statistical methods in biomedical research using Excel*. Kiev: Morion, 2000, 319 p. (In Russ.)]
11. Гланц С.М. *Медико-биологическая статистика: практика*. М.: Наука, 1999, 459 с. [Glantz S.M. *Medico-biological statistics: practice*. M.: Nauka, 1999, 459 p. (In Russ.)]
12. Graziano M.J. Induction of apoptosis in rat peripheral blood lymphocytes by the anticancer drug CI-994 (acetyldinaline). *J. Biomed. Biotechnol.*, 2001, no. 1, pp. 52-61.
13. Gorman A., McCarthy J., Finucane D. et al. Morphological assessment of apoptosis. In: *Techniques in apoptosis. A user's guide*. Cotter T.G. and Martin S.J. *Portland Press*, 1994, pp. 1-20.
14. Белкин А.Д. Содержание белков-регуляторов апоптоза bcl-2 и bad в регионарных лимфатических узлах печени при воздействии магнитного поля 50 Гц. *Гигиена и санитария*, 2015, № 1, с. 112-114. [Belkin A.D. The content of proteins-regulators of apoptosis bcl-2 and bad in the regional lymph nodes of the liver under the influence of a magnetic field of 50 Hz. *Hygiene and Sanitation*, 2015, no. 1, pp. 112-114. (In Russ.)]
15. Тирас Х.П., Скавуляк А.Н., Асландини К.Б., Иваницкий Г.Р. Почему эффекты от воздействия слабых комбинированных магнитных полей на биосистемы не всегда воспроизводимы? *ДАН*, 2012, т. 443, № 6, с. 1-3.

[Tiras Kh.P., Skavulyak A.N., Aslandini K.B., Ivanitsky G.R. Why are the effects of weak combined magnetic fields on biosystems not always reproducible? *DAN*, 2012, vol. 443, no. 6, pp. 1-3. (In Russ.)]

16. Ivashkin V.T., Lapina T.L., Bondarenko O.Yu., Bueverov A.O., Osadchuk A.M., Kogan E.A. et al. Processes apoptoza I proliferation pathology gastrointestinal and live. *Rossiyskiy Zhurnal Gastroenterologii, Gepatologii, Koloproktologii*, 2002, no. 6, pp. 38-43.

17. Аруин Л.И. Апоптоз при патологических процессах в органах пищеварения. *Клиническая медицина*, 2000, т. 1, с. 5-10. [Aruin L.I. Apoptosis in pathological processes in the digestive organs. *Clinical medicine*, 2000, vol. 1, pp. 5-10. (In Russ.)]

18. Rajendra P., Sujatha H.N., Sashidhar R.B., Subramanyam C., Devondranath D., Aradhya R.S. Viability of unstimulated lymphocytes exposed to extremely low frequency electromagnetic fields is dependent on intensity. *BioDiscovery*, 2012, vol. 2, p. e8925, doi: 10.7750/BioDiscovery.2012.2.2.

19. Плеханов Г.Б. *Основные закономерности низкочастотной электромагнитобиологии*. Томск: изд-во Томского ун-та, 1990, 188 с. [Plekhanov G.B. *Basic regularities of low-frequency electromagnetobiology*. Tomsk: publishing house of Tomsk University, 1990, 188 p. (In Russ.)]

20. Рыбаков Ю.Л. Противоопухолевое и радиомодифицирующее действие слабого низкочастотного вихревого магнитного поля. *Радиационная экология. Радиоэкология*, 2016, т. 56, № 2, с. 177-189. [Rybakov Yu.L. Antitumor and radiomodifying effect of a weak low-frequency vortex magnetic field. *Radiation ecology. Radioecology*, 2016, vol. 56, no. 2, pp. 177-189. (In Russ.)]

21. Коломиец И.А. *Адаптивные реакции клеток крови млекопитающих на воздействие электромагнитных полей радиочастотного диапазона*. Дисс. канд. биол. наук, Челябинск, 2009, 23 с. [Kolomiets I.A. *Adaptive responses of mammalian blood cells to the impact of electromagnetic fields of the radio frequency range*. Diss. cand. biol. Sciences, Chelyabinsk, 2009, 23 p. (In Russ.)]

LYMPHOCYTES APOPTOSIS UNDER THE ACTION OF PHYSICAL FACTORS COMBINATION

Nikanorova E.A., Varganova I.A., Medvedev Ya.I., Nagiba V.I.

Russian Federal Nuclear Center - All-Russian Scientific Research Institute
of Experimental Physics

pr. Mira, 37, Sarov, Nizhny Novgorod region, 607189, Russia; e-mail: gane@orb2.vniief.ru

Received 21.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0524

Abstract. The article presents the comparative study results of the bioeffects of 30-minute exposure session to electromagnetic radiation with 1000 MHz frequency and 10 mW/cm² EFD; of 30-minute exposure session to low-frequency pulsed magnetic field with 4 mT magnetic induction, as well as their combination, on rat's lymphocytes apoptosis level *in vivo*. The apoptosis level was assessed morphologically with fluorescent microscope after 24-hours of cell suspension cultivation at immunological plates at 37 °C in nutrient medium without loading. The percentage of cells with morphological signs of apoptosis (margination, condensation and fragmentation of chromatin in nucleus) was quantitatively determined. It was found that electromagnetic irradiation had no significant impact on apoptosis level, but magnetic field action resulted in reducing the apoptosis cells number by 16% ($p \leq 0,01$) compared to the control group. The combination of electromagnetic radiation and low intensity magnetic field increased the apoptotic cells number by 28% ($p \leq 0,01$) compared to the control. Thus, the mediated effect of electromagnetic radiation on blood cells genome leads to disruption of its normal functioning. It has been shown that low-frequency magnetic field can influence on intracellular processes in different directions; in combination with electromagnetic radiation it can intensify pathological reactions, and thus launching the apoptosis massive program.

Key words: electromagnetic radiation, pulsed magnetic field, lymphocytes, apoptosis.