

УДК 591.1: 615.849.11

**МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ГИПОКИНЕТИЧЕСКОГО СТРЕССА
НА ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЯ СИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ
НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭМИ КВЧ**

Чуян Е.Н., Махонина М.М., Заячникова Т.В.

В последние десятилетия обнаружены многочисленные факты, свидетельствующие о высокой чувствительности биологических систем к низкоинтенсивным электромагнитным излучениям (ЭМИ) крайне высокой частоты (КВЧ), выявлена зависимость биологической эффективности ЭМИ КВЧ как от частоты и интенсивности воздействующего фактора, так и от исходного состояния организма [1 – 4]. В реальных условиях низкоинтенсивные ЭМИ КВЧ, как и другие факторы окружающей среды, действуют, не изолировано, а в комбинации с другими раздражителями, в том числе и с высокоинтенсивными. В наших предыдущих исследованиях превентивного и комбинированного со стресс-фактором действия ЭМИ КВЧ доказана способность этого физического фактора корригировать развитие стресс-реакции как «иммунной» (введение антигена), так и «не иммунной» (ограничение подвижности) природы [5]. Кроме того, показана возможность гипокинезии (ГК) модифицировать адаптационные реакции организма, развивающиеся при ее одновременном с ЭМИ КВЧ действии [6]. Однако модифицирующее влияние стресс-фактора на изменение адаптационных реакций организма, развивающихся при последовательном КВЧ-воздействии изучено не было.

Ранее нами было доказано, что в качестве критерия определения биологической эффективности низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ может использоваться показатель синтетической активности лимфоцитов периферической крови крыс [7].

В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение модифицирующего действия гипокинетического стресса на изменение показателя синтетической активности лимфоцитов крови крыс при последующем воздействии низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены на 60 беспородных белых крысах-самцах массой 120–150 г., полученных из опытно-экспериментального питомника Института гигиены и медицинской экологии, фирма «Феникс» (г. Киев). Для эксперимента отбирали животных одинакового возраста, характеризующихся средним уровнем

двигательной активности и низкой эмоциональностью в тесте "открытого поля". Подобный отбор позволил сформировать однородные группы животных, однотипно реагирующих на действие различных факторов.

Наблюдения за животными проводились в течение 18 суток. Было сформировано 3 группы животных по 20 особей в каждой (рис. 1). Первая группа крыс служила контролем. Вторую группу (ГК-КВЧ) составляли крысы, подвергавшиеся предварительному девятисуточному воздействию ГК и последующему девятикратному действию ЭМИ КВЧ по 30 минут ежедневно на затылочно-воротниковую область. К третьей группе (КВЧ) относились животные, подвергавшиеся девятикратному воздействию ЭМИ КВЧ одновременно с крысами второй группы. Первые девять суток эксперимента они оставались интактными.

№ группы																			
3 КВЧ										КВЧ									
2 ГК-КВЧ	ГК									КВЧ									
1 К	Контроль																		
сутки	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Забор крови	■					■				■			■			■			■

Рис. 1. Схема проведения экспериментальных исследований.

ГК моделировалась помещением крыс в специальные кассеты из оргстекла (140 × 60 × 60 мм для каждой крысы), в которых они находились в течение девяти суток по 20 часов (рис. 2). В течение четырех остальных часов проводили экспериментальные исследования, кормление и уход за животными. Известно, что ограничение подвижности крыс в клетках-пеналах вызывает стрессовую реакцию, интенсивность которой зависит от степени «жесткости» ГК [8]. Полученная экспериментальная модель позволила создать одинаковую степень «жесткости» ГК для всех животных, что является необходимым условием для получения сопоставимых результатов.

Воздействие ЭМИ КВЧ осуществлялось в течение девяти суток с помощью генератора "Луч. КВЧ-071" ($\lambda=7,1$ мм, плотность потока мощности 0,1 мВт/см²) на затылочно-воротниковую область по 30 мин ежедневно (рис. 2).

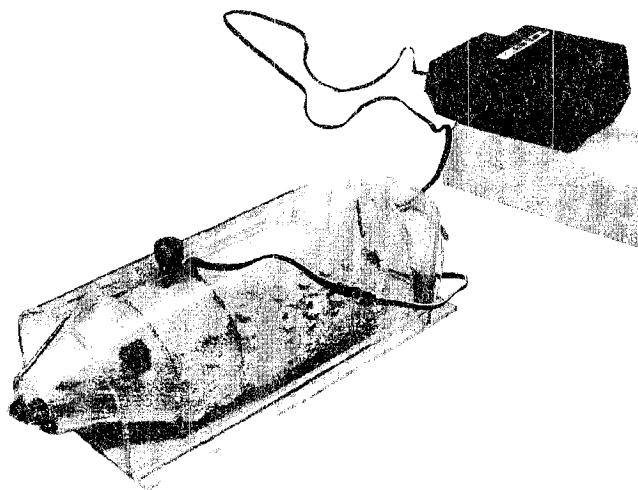


Рис. 2. Экспериментальное воздействие гипокинезии и ЭМИ КВЧ.

Кровь для исследования брали из хвостовой вены перед экспериментальными воздействиями, на 5-е, 9-е, 12-е, 15-е и 18-е сутки эксперимента (см. рис. 1).

Обработка мазков крови и окраска их акридиновым оранжевым (АО) проводилась в соответствии с методикой В.Н. Карнаухова и Н.А. Карнауховой [9, 10]. Окрашенные мазки исследовали методом микроспектрального флуоресцентного анализа с использованием люминесцентного микроскопа МЛ-4 с фотометрической насадкой ФМЭЛ-ИК. В данной работе исследованы лимфоциты без видимых повреждений в структуре (рис. 3). Спектры люминесценции регистрировались с помощью микрофлуориметра на длинах волн 530 и 640 нм. Флуоресценция возбуждалась излучением ртутной дуговой лампы ДРШ 250-2 на длине волны 436 нм, выделяемой при помощи светофильтров. Размер фотометрируемого участка соответствовал размерам клетки (7-10 мкм).

Функциональное состояние синтетического аппарата клетки описывается безразмерным параметром α , представляющим собой отношение флуоресценции в красной (I_{640}) и зеленой (I_{530}) областях спектра лимфоцитов, окрашенных АО. Флуоресценция в красной области спектра обусловлена димерами АО, связанными с односпиральными нуклеиновыми кислотами (преимущественно функционально активной рибосомальной РНК в зрелых дифференцированных клетках), в то время как в зеленой – мономерами АО, интеркалированными в двуспиральные нуклеиновые кислоты (преимущественно ДНК):

$$\alpha = \frac{I_{640}}{I_{530}} = \frac{k_1 \text{НК}_1}{k_2 \text{НК}_2} = \frac{K(\text{АРНК})}{\text{ДНК}}$$

где АРНК – активная компонента РНК одиночной клетки; k_1 , k_2 , K – коэффициенты связывания АО с нуклеиновыми кислотами (НК) [10].

Причем ранее показано, что изменение параметра α при различных функциональных состояниях клетки главным образом связано с окрашиванием односпиральных областей РНК [10, 11].

Для изучения модифицирующего эффекта гипокинетического стресса для ЭМИ КВЧ использовался коэффициент модификации (КМ; усл. ед.), отражающий влияние одного фактора на действие другого:

$$КМ_{ГК} = ((ГК - КВЧ) - КВЧ) / КВЧ,$$

где КВЧ, ГК-КВЧ – значения параметра α при воздействии ЭМИ КВЧ и последовательном действии ГК и ЭМИ КВЧ соответственно. Коэффициент модификации равен нулю, если отсутствует модифицирующее влияние изучаемого фактора.

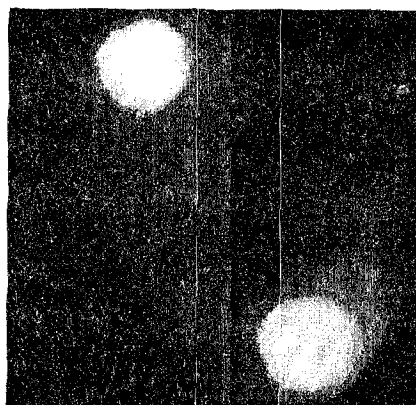


Рис. 3. Свечение окрашенных акридиновым оранжевым ядер лимфоцитов при возбуждении люминесценции на длине волны 436 нм.

Для определения достоверности различий между выборками использовался t-критерий Стьюдента.

Крысы содержали в условиях вивария при температуре 18 – 22°C на стандартном пищевом рационе и в стандартных условиях освещения (12 часов темнота: 12 часов свет). Световая фаза начиналась в 7.00 утра. Опыты с животными проводились в соответствии с Международной декларацией «О работе с опытными экспериментальными животными» и «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». При проведении экспериментов с животными соблюдались морально-этические нормы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты проведенных исследований, средние значения параметра α у животных контрольной группы лежали в диапазоне от 0,6 до 0,8, что согласуется с данными авторов методики [10] и нашими предыдущими исследованиями [6, 11].

При девятисуточном ограничении подвижности, соответствующем стадии тревоги ГК стресса [12, 13], у животных второй группы наблюдалось снижение показателя синтетической активности лимфоцитов крови крыс на 17,6% ($p < 0,001$) относительно значений этого показателя у животных контрольной группы (рис. 4.), что согласуется с данными наших предыдущих исследований [6], и, вероятно,

МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ГИПОКИНЕТИЧЕСКОГО СТРЕССА

является результатом неспецифической депрессии синтетических процессов в клетках и связано с нарушениями метаболизма и энергетики лимфоцитов, происходящими в результате развития стресс-реакции. Эти изменения свидетельствуют о резком напряжении, дезорганизации в функционировании лимфоцитов при ГК стрессе. Наблюдения у людей и эксперименты на животных убедительно свидетельствуют о влиянии тяжелой и (или) длительной стресс-реакции (дистресса) на иммунологическую реактивность. Еще Г. Селье [14], впервые описавший развитие общего адаптационного синдрома, подчеркивал, что иммунная система остается безразличной к стрессу. Значительное угнетение иммунного ответа, вплоть до развития иммунодефицитного состояния обнаружено при различных стрессорных воздействиях [15 – 17].

Поскольку известно, что модифицирующий эффект любого фактора можно обнаружить только после действия на организм стимула другой природы, то после прекращения девятисуточного ГК стресса было произведено девятикратное воздействие низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ на животных той же экспериментальной группы (ГК-КВЧ).

Уже после первых трех сеансов ЭМИ КВЧ (12 сутки) произошло увеличение коэффициента α относительно уровня, достигнутого после ГК на 19,6%, при этом он достиг значений этого показателя в контрольной группе крыс ($p > 0,05$). После девяти сеансов КВЧ-воздействия (18 сутки) наблюдения было зарегистрировано достоверное увеличение показателя α относительно значений в контрольной группе крыс на 17,5% ($p < 0,01$) (см. рис. 4).

Таким образом, ЭМИ КВЧ, действующее после ГК стресса вызывает достоверное повышение показателя синтетической активности α относительно его значений у интактных животных.

Ранее нами была изучена способность ЭМИ КВЧ лимитировать развитие стресс-реакции у крыс при его превентивном и комбинированном с ограничением подвижности действии, причем эффективность антистрессорного действия ЭМИ КВЧ при предварительном воздействии оказалась несколько выше, чем при одновременном с ГК [4]. Однако далеко не во всех случаях возможно применение ЭМИ КВЧ в качестве профилактического средства, поэтому важное значение имеет тот факт, что ЭМИ КВЧ оказывает антистрессорное действие и при использовании его после действия стресс-фактора. Эти данные убедительно доказывают, что воздействие ЭМИ КВЧ на организм способно уменьшить проявление негативных изменений, возникающих у животных при предварительном действии стресс-фактора.

Полученные результаты позволяют расширить возможности применения КВЧ-терапии не только для профилактики, но и для лечения последствий многих заболеваний, развитие которых сопровождается комплексом неспецифических симптомов, обусловленных развитием общего адаптационного синдрома, или стресс-реакции.

Вместе с тем, у животных группы ГК-КВЧ повышение функциональной активности лимфоцитов происходило в меньшей степени, чем у животных группы КВЧ, которые до КВЧ – воздействия оставались интактными. Так, на 12-е и 15-е сутки эксперимента была зафиксирована тенденция к снижению значений показателя

синтетической активности на 7,5% и 16,9% соответственно ($p>0,05$), а к 18-м суткам различия стали достоверными, и разница составила 31,1% ($p<0,01$).

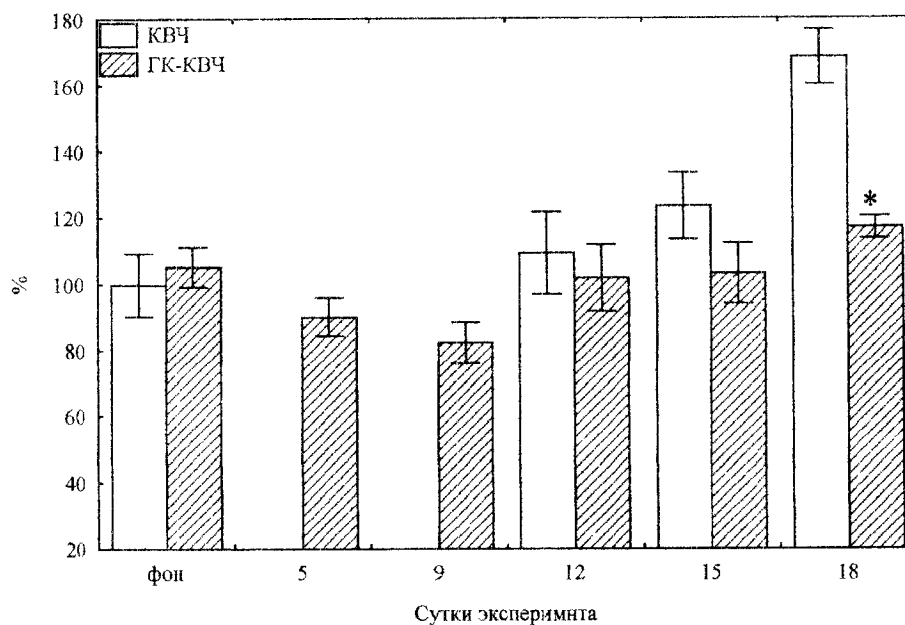


Рис. 4. Изменение показателя синтетической активности лимфоцитов периферической крови крыс при воздействии электромагнитного излучения крайне высокой частоты (КВЧ) и последовательном действии гипокинезии и электромагнитного излучения крайне высокой частоты (ГК-КВЧ) (в % относительно значений этого показателя в контрольной группе).

Примечание: * - достоверность различий исследуемого показателя между группами КВЧ и ГК-КВЧ.

Поскольку в настоящем исследовании воздействие ЭМИ КВЧ было одинаковым для всех экспериментальных групп животных, то можно утверждать, что различные изменения показателя синтетической активности лимфоцитов при действии ЭМИ КВЧ обусловлены неодинаковым исходным функциональным состоянием этих клеток. Следовательно, важным фактором, определяющим изменения показателя синтетической активности лимфоцитов при КВЧ-воздействии, является исходное функциональное состояние этих клеток, что согласуется с законом начальных значений Вильдера-Лейтеса [18].

Таким образом, предварительное ограничение подвижности крыс модифицирует изменение функциональной активности лимфоцитов крови крыс при последующем воздействии ЭМИ КВЧ, что выражается в снижении этого показателя относительно значений у животных, которые до воздействия ЭМИ КВЧ оставались интактными.

Модифицирующее влияние ГК на изменение функциональной активности лимфоцитов крови крыс при последовательном действии ГК и ЭМИ КВЧ

МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ГИПОКИНЕТИЧЕСКОГО СТРЕССА

подтверждается и изменением $KM_{ГК}$ от $-0,07$ усл. ед. после трех сеансов КВЧ-воздействия (12 сутки) до $-0,31$ усл. ед. после девятого КВЧ-воздействия (18 сутки), что дополнительно свидетельствует о снижении показателя синтетической активности лимфоцитов у крыс группы ГК-КВЧ относительно значений этого показателя у животных, подвергнутых изолированному действию ЭМИ КВЧ (рис. 5).

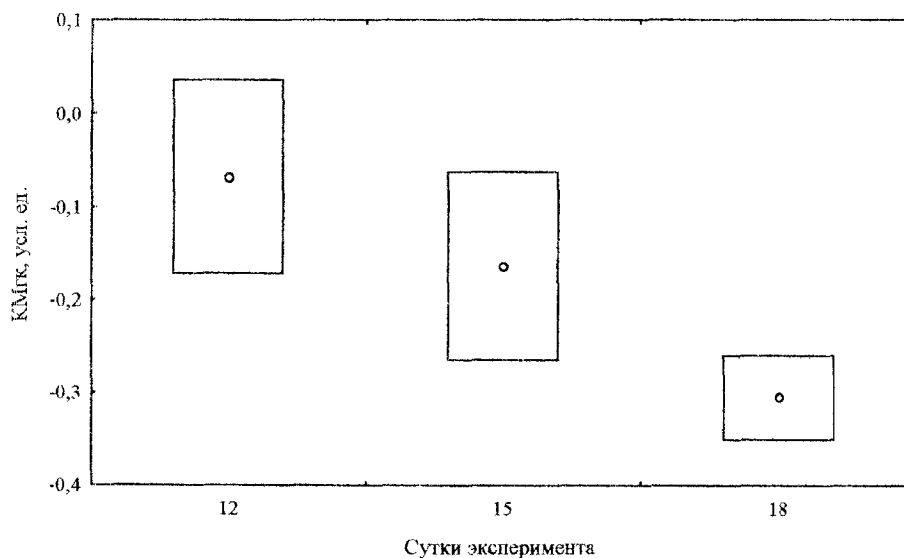


Рис. 5. Изменение коэффициента модификации ($KM_{ГК}$, усл. ед.) гипокинезии.
Примечание: \circ – среднее арифметическое; \square – ошибка среднего арифметического.

Таким образом, результаты данного исследования позволили выявить возможность ГК модифицировать адаптационные реакции организма, развивающиеся при последующем действии ЭМИ КВЧ.

ВЫВОДЫ

1. Предварительное действие гипокинетического стресса модифицирует изменения показателя синтетической активности лимфоцитов крови крыс, происходящее при последующем воздействии низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты.
2. В результате развития гипокинетического стресса происходит уменьшение показателя синтетической активности лимфоцитов, являющееся результатом снижения функциональной активности этих клеток.
3. Изменение показателя синтетической активности лимфоцитов крови крыс зависит от исходного состояния организма. Действие электромагнитного излучения крайне высокой частоты на животных, предварительно находящихся в условиях гипокинетического стресса, приводит к менее выраженному повышению показателя синтетической активности лимфоцитов крови, чем у животных, которые до КВЧ-воздействия оставались интактными.

Список литературы

1. Гапеев А.Б., Чемерис П.К. Действие непрерывного и модулированного ЭМИ КВЧ на клетки животных. Обзор Часть I. Особенности и основные гипотезы о механизмах биологического действия ЭМИ КВЧ // Вестник новых медицинских технологий. – 1999. – Т. 6, №1. – С. 15-22.
2. Петросян В.И., Сеницын Н.И., Уткин В.А. и др. Проблемы косвенного и прямого наблюдения резонансной прозрачности водных сред в миллиметровом диапазоне // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2000. – № 1. – С. 34-40.
3. Девятков Н.Д., Голант М.Б., Бецкий О.В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности. – М.: Радио и связь, 1991. – 168 с.
4. Чуян Е.Н., Темурьянц Н.А., Московчук О.Б. и др. Физиологические механизмы биологических эффектов низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ. – Симферополь: ЧП «Эльвино», 2003. – 448 с.
5. Чуян Е.Н. Нейроиммуноэндокринные механизмы адаптации к действию низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты: Автореф. дисс. ... доктора биол. наук: 03.00.13 / КНУ. – Киев, 2004. – 40 с.
6. Чуян Е.Н., Махонина М.М. Синтетическая активность лимфоцитов крови: влияние излучения миллиметрового диапазона // Миллиметровые волны в биологии и медицине. – 2005. – № 1 (37). – С. 32-40.
7. Декларацийний патент України на корисну модель № 7864, МПК 7 А 61 N2/00 "Спосіб визначення біологічної ефективності застосування низькоінтенсивного електромагнітного випромінювання надвисокої частоти", Опубл. 15.07.2005. Бюл. № 7, Чуян О.М., Темур'янц Н.А., Махоніна М.М.
8. Коваленко Е.А., Гуровский Н.Н. Гипокинезия. – М.: Медицина, 1980. – 307с.
9. Карнаухова В.Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки. – М.: Наука, 1978. – 209 с.
10. Карнаухова Н.А., Сергиевич Л.А., Аксенова Г.Е. Изменение флуоресцентных характеристик окрашенных акридиновым оранжевым лимфоцитов крови крыс после острого γ -облучения. // Биофизика. – 1994. – Т. 39, № 1. – С. 123-128.
11. Чуян Е.Н., Темурьянц Н.А., Махонина М.М. Изменение синтетического аппарата лимфоцитов крови крыс при действии низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты // Physics of the alive. – 2005. – Vol. 13, № 1. – С. 63-70.
12. Михайлов А.В. Функциональная морфология нейтрофилов крови крыс в процессе адаптации к гипокинезии: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук: СГУ. – Симферополь, 1985. – 25 с.
13. Верко Н.П. Функціональна нейтрофілів крові шурів при розвитку адаптаційних реакцій різного типу. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук: СГУ. – 03.00.13 / ТНУ. – Симферополь, 2003. – 24 с.
14. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. – М.: Медицина, 1960. – 254 с.
15. Сухих Г.Т. Механизм стрессорных нарушений функции клеток естественной резистентности и пути их коррекции: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. – М., 1985. – 28 с.
16. Кузнецов С.И., Семенова И.В. Клетки иммунной системы как посредники в реакции других систем организма на стрессорное воздействие // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1997. – №2. – С. 27-29.
17. Крыжановский Г.Н., Магаева С.В., Макаров С.В. Нейроиммунопатология. – М., 1997. – 189 с.
18. Плетанов Г.Ф., Васильева Н.В., Козлова Т.И. Зависимость реакции биосистемы на раздражитель от её исходного значения // Бюл. Сиб. Отд. АМН СССР. – 1989. – № 2. – С. 83-86.

Поступила в редакцию 07.04.2006 г.