

ВИЗНАЧЕННЯ ОПТИМАЛЬНОГО ЧАСУ ЕКСПОЗИЦІЇ ПРИ ОПРОМІНЕННІ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ЩУРІВ ЕЛЕКТРОМАГНІТНИМ ВИПРОМІНЮВАННЯМ МІЛІМЕТРОВОГО ДІАПАЗОНУ НИЗЬКОЇ ІНТЕНСИВНОСТІ

© В.Є. Добрава, О.В. Должикова, Л.М. Малоштан, К.О. Степанова

Національний фармацевтичний університет, Харків

Резюме: за допомогою нової розробленої методики досліджено вплив широкосмугового сигналу електромагнітного випромінювання міліметрового діапазону (ЕМВ ММД) низької інтенсивності на життєздатність клітин при різних експозиціях. Досліди проводились в умовах *in vitro* на культурі клітин кісткового мозку щурів. Обробку результатів вимірювань виконували за запропонованою нами статистичною методикою. Експериментально встановлено позитивний вплив ЕМВ ММД на життєздатність клітин кісткового мозку щурів, а також квадратичну тенденцію зменшення частки мертвих клітин при збільшенні часу експозиції. Визначено теоретичну залежність цитопротекторного впливу опромінення від часу експозиції, а також встановлено оптимальний час, при якому спостерігається найбільший позитивний ефект.

Ключові слова: електромагнітне випромінювання міліметрового діапазону, скринінгова модель *in vitro*, час експозиції.

Вступ. Дія електромагнітного випромінювання на живі об'єкти відома досить давно та широко використовується у біології, фармації та медицині. На певному етапі розвитку техніки було відкрито електромагнітне випромінювання міліметрового діапазону. Низька потужність потоку опромінення та його специфічний позитивний вплив дозволили використовувати міліметрові хвилі для вирішення широкого кола клінічних завдань. З метою визначення біофізичного механізму впливу ЕМВ ММД проведено велику кількість експериментальних робіт, де як об'єкти досліджень використовували різні біологічні структури: культури мікроорганізмів, клітини рослин, нервові клітини молюсків, формені клітини крові тощо [1, 2, 6 – 8].

Незважаючи на сенсаційні результати, отримані під час досліджень, та досить широке застосування цього випромінювання у медичній практиці, досі механізм взаємодії ЕМВ ММД з біологічними об'єктами залишається не конкретизованим та існує лише в описових гіпотетичних припущеннях.

Вивчення біологічних ефектів впливу опромінення досить зручно досліджувати на модельних системах ізольованих клітин, оскільки вони зберігають фізіологічні функції, легко доступні для різних біохімічних маніпуляцій і допускають можливість достатньо точного виміру біологічних показників. Тому на базі Проблемної лабораторії морфофункціональних досліджень Національного фармацевтичного університету постійно розробляють, використовують та

вдосконалюють методики з вивчення цитопротекторного/цитотоксичного впливу зовнішніх чинників (хімічних, фітохімічних, фізичних, механічних тощо) на характеристики життєздатності клітин в умовах *in vitro* [4]. Так, за допомогою однієї з таких методик було встановлено мембраностабілізуючу дію ЕМВ ММД на клітини кісткового мозку щурів при порушенні умов біологічної цілісності, а також досліджено ефекти впливу ЕМВ ММД на життєздатність клітини кісткового мозку щурів при наявності цитотоксичного агента [3, 5].

Враховуючи позитивний результат дії ЕМВ ММД на модельну систему ізольованих клітин кісткового мозку щурів, отриманий при проведенні попередніх експериментів [3], вирішено дослідити чи існує залежність між часом опромінення та ефектом, що виникає при взаємодії міліметрових хвиль з суспензією клітин кісткового мозку та з'ясувати оптимальний час експозиції.

Методи дослідження. Досліди проводили в умовах *in vitro*. Об'єкт дослідження, культуру клітин кісткового мозку одержували шляхом вимивання з трубчастих кісток нелінійних щурів-самок масою 180-200 г фізіологічним розчином. Отриману суспензію поділяли на сім проб: 1 проба – контрольна, залишалась без змін; 2 – 7 проби – опромінювали протягом 10, 20, 30, 40, 50 та 60 хв, відповідно, за допомогою приладу «ІХТ-Поріг», який генерує шумові сигнали електромагнітного випромінювання діапазону частот 60 – 400 ГГц із густиною потоку 10^{-19} - 10^{-21} Вт/Гц см² [7]. Опромінення проводили на відстані 1,5 см від суспензії

клітин. Кількість мертвих клітин визначали після додавання трипанового синього за допомогою розробленої нами методики [4] через 60 та 90 хв після початку експерименту.

Для відтворюваності дослідження впливу часу експозиції на показники життєздатності культури клітин вимірювання повторювали на 10 зразках в кожній з шести експериментальних проб, а також у контрольній. Життєздатність культури клітин оцінювали в кожній пробі за середньою часткою мертвих клітин. Крім того, визначали середнє квадратичне відхилення та довірчий інтервал для кожної експериментальної та контрольної проби. Перевірку статистичної значущості відмінностей між величинами середніх

часток мертвих клітин у кожній з шести експериментальних проб порівняно з контролем здійснювали за допомогою Z-критерію при рівні значущості $p=0,05$. Статистичну оцінку отриманих даних проводили за допомогою програмного пакета «StatSoft».

Результати й обговорення. Отримані дані свідчать, що через 60 та 90 хв від початку експерименту в усіх шести зразках клітин кісткового мозку щурів, кожен з яких підлягав під вплив опромінення протягом 10, 20, 30, 40, 50 та 60 хв, відповідно, середня частка мертвих (забарвлених) клітин була достовірно менша порівняно з неопроміненим контрольним зразком (табл.1).

Таблиця 1. Оцінка загибелі клітин кісткового мозку щурів при зміні часу опромінення ЕМВ ММД

Показник	Неопромінений контроль	Час опромінення, хв					
		10	20	30	40	50	60
Час вимірювання 60 хв							
Частка мертвих клітин	10,5±1,0	7,9±0,8	5,9±0,7	4,1±0,6	4,9±0,7	5,6±0,8	7,9±0,9
p – level	–	0,025	0,001	0,001	0,001	0,001	0,01
Час вимірювання 90 хв							
Частка мертвих клітин	12,8±1,0	9,7±1,0	7,1±0,8	5,2±0,7	6,3±0,8	7,9±0,9	9,6±1,0
p – level	–	0,03	0,001	0,001	0,001	0,001	0,01

(p – level < p=0,05) – достовірна різниця між показником середньої частки мертвих клітин для контрольної та експериментальної проб.

Залежність середньої частки мертвих клітин кісткового мозку щурів від часу опромінення показано на рисунку 1. При збільшенні часу впливу опромінення на клітини від 10 до 30 хв спостерігається тенденція зменшення середньої частки мертвих клітин кісткового мозку щурів. Максимальне зниження середньої частки мерт-

вих клітин у пробі спостерігається при часі опромінення 30 хв. При зростанні часу експозиції від 40 до 60 хв цей показник починає збільшуватися. Таким чином, експериментально встановлено експозицію опромінення з максимальним позитивним ефектом впливу клітини кісткового мозку щурів, яка складає 30 хв.

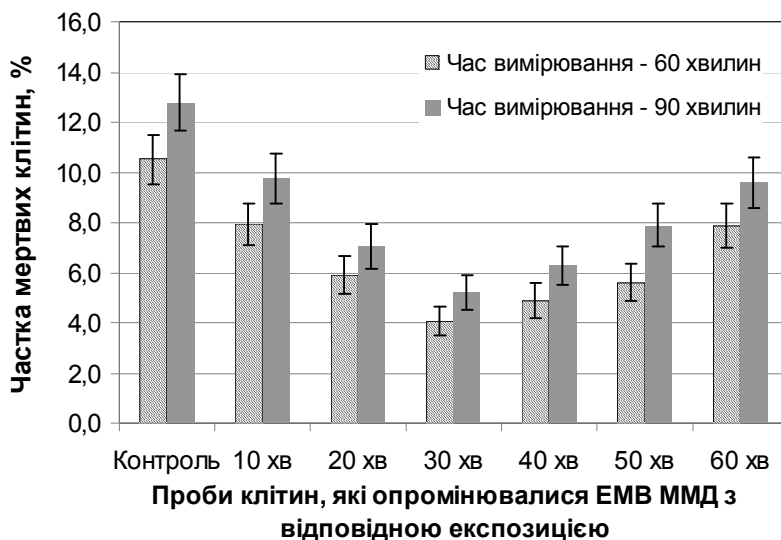


Рис. 1. Залежність вибіркової середньої частки мертвих клітин кісткового мозку щурів від часу експозиції.

Наступним кроком роботи став розрахунок статистичної моделі впливу часу експозиції на життєздатність клітин кісткового мозку. За допомогою методу найменших квадратів за результатами вимірювань розраховано рівняння функціональної залежності середньої частки мертвих клітин в пробах культури клітин кісткового мозку щурів від часу експозиції, яке має вигляд:

$$y = 0,006t^2 - 0,4t + b, \quad (1)$$

де b – коефіцієнт, на величину якого впливає час проведення вимірювань.

Математичний аналіз екстремумів цієї функції дозволив встановити чіткий мінімум отриманої квадратичної функції, який відповідає часу опромінення 34 хв.

На рисунку 2 показана квадратична регресійна залежність середньої частки мертвих клітин від часу експозиції та продемонстрована її відповідність результатам експериментальних досліджень. Статистична оцінка відповідності теоретичної моделі експериментальним результатам здійснена за допомогою коефіцієнта детермінованості R^2 . Величина цього коефіцієнта

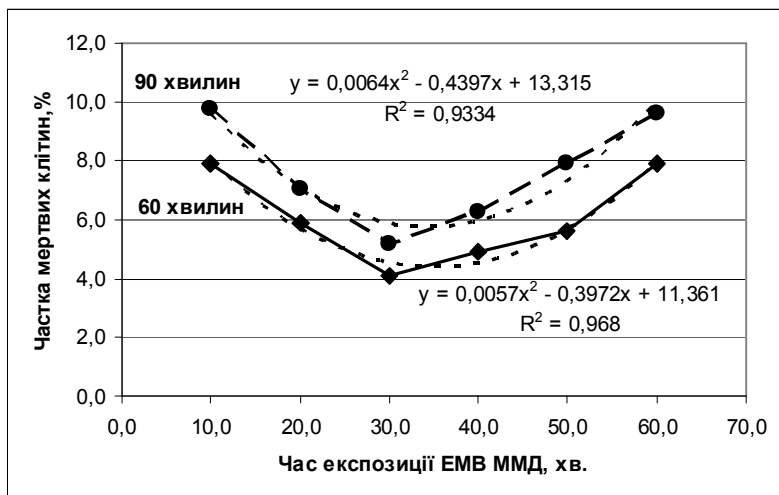


Рис. 2. Теоретична модель залежності частки мертвих клітин від часу експозиції.

склала $R^2=0,93$ для вимірювань, які проводилися через $t_{\text{вимір}}=60$ хв від початку експерименту, та $R^2=0,96$ при $t_{\text{вимір}}=90$ хв, що демонструє дуже добру кореляцію між фактичними та розрахованими за теоретичним рівнянням значеннями частки мертвих клітин.

Висновки. 1. За розробленою методикою з оцінки цитотоксичного/ цитопротекторного впливу було досліджено тенденцію зміни середньої частки мертвих клітин у пробах кісткового мозку щурів, як показника їх життєздатності, при збільшенні часу експозиції від 10 до 60 хв.

2. Експериментально встановлено, що при збільшенні часу впливу опромінення на клітини від 10 до 30 хв спостерігається зменшення середньої частки мертвих клітин кісткового мозку щурів, а при збільшенні часу опромінення від 40 до 60 хв цей показник зростає.

3. Методом статистичного моделювання роз-

рахована функціональна залежність середньої частки мертвих клітин від часу опромінення. За теоретичною залежністю розраховано оптимальний час опромінення з максимальним позитивним ефектом впливу на клітини кісткового мозку щурів, який складає 34 хв. Проведені теоретичні розрахунки підтверджені результатами експериментальних досліджень.

4. Вивчення впливу тривалості часу експозиції ЕМВ ММД на суспензію клітин кісткового мозку щурів дозволило обрати оптимальний режим опромінення.

5. Подальше теоретичне та експериментальне дослідження впливу ЕМВ ММД на різних клітинних тестах в умовах *in vitro* дозволить більш докладно визначити механізми дії опромінення, а також встановити оптимальні умови його використання у комплексі з біологічно активними речовинами.

Література

1. Бецкий О.В. Миллиметровые волны и живые системы / О.В. Бецкий, В.В. Кислов, И.Н. Лебедева. – М.: Сайнс-Пресс, 2004. – 168 с.

2. Бокарев А.А. Изучение функциональной активности Т- и В- лимфоцитов у больных с Н. Рulogi – ассоциированной гастродуоденальной патологией в ди-

наміке захворювань на фоні КВЧ – терапії / А.А. Бокарев, Е.И. Ефимов, Е.А. Аистова [и др.] // Вестник Нижегородского университета им. Лобачевского: Сер. Биология. – 2003. – №1 (16). – С.172 – 175

3. Доброва В.Е. Влияние широкополосного сигнала электромагнитного излучения миллиметрового диапазона низкой интенсивности на клетки костного мозга крыс / В.Е. Доброва, Е.В. Должикова, Л.М. Малоштан, Е.А. Степанова // XVI Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: тезисы докл. – М., 2009. – С. 650.

4. Доброва В.Е. Разработка альтернативной методики изучения влияния дестабилизирующих факторов на биологические объекты на модели *in vitro* / В.Е. Доброва, Е.В. Должикова, Л.М. Малоштан, Е.А. Степанова // Фармация Казахстана: интеграция науки, образования и производства: междунар. науч.-практ. конф., 15-16 мая 2009 г.: тезисы докл. – К., 2009. – С. 45-49.

5. Доброва В.Е. Вивчення ефективності застосування електромагнітного випромінювання міліметрового

діапазону в терапії виразкової хвороби / В.Е. Доброва, О.Т. Куценко, К.О. Степанова, А.Ю. Позднякова // Фармакогнозія XXI століття. Досягнення та перспективи: ювіл. наук.-практ. конф. з міжнародною участю, 26 березня 2009 р.: тези доп. – Х., 2009. – С. 59-60.

6. Шевелёва Е.Н. Эффекты локального воздействия излучения миллиметрового диапазона на покровные биологические ткани / Е.Н. Шевелёва, А.В. Козарь, А.Ф. Королёв, Ю.Г. Ярёмченко // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2007. – № 12. – С. 54 – 58.

7. Bagatskaya E.V. Connection between analgesia caused by microwave irradiation of acupuncture point and brain serotonergic system / E.V. Bagatskaya, E.V. Gura, Yu.P. Limansky, N.D. Kolbun // Abstrs of Commun. 10th World Congress of Pain. – San-Diego, 2002. – P. 263.

8. Homenko A. Effects of 100 GHz radiation on alkaline phosphatase activity and antigen-antibody interaction / A. Homenko, B. Kapilevich, R. Kornstein, M.A. Firer // Bioelectromagnetics. – 2008. – Vol. 30. – PP. 167-175.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ЭКСПОЗИЦИИ ПРИ ОБЛУЧЕНИИ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРЫС ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ МИЛЛИМЕТРОВОГО ДИАПАЗОНА НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ

В.Е. Доброва, Е.В. Должикова, Л.Н. Малоштан, Е.А. Степанова

Национальный фармацевтический университет, Харьков

Резюме: с помощью новой разработанной методики изучено влияние широкополосного сигнала электромагнитного излучения миллиметрового диапазона (ЭМИ ММД) низкой интенсивности на жизнеспособность клеток при разных экспозициях. Исследования проводились в условиях *in vitro* на культуре клеток костного мозга крыс. Обработка результатов измерений осуществлялась по предложенной нами статистической методике. Экспериментально установлено положительное влияние ЭМИ ММД на жизнеспособность клеток костного мозга крыс, а так же квадратичную тенденцию уменьшения доли мертвых клеток при увеличении времени экспозиции. Определена теоретическая зависимость цитопротекторного влияния ЭМИ ММД от времени экспозиции, а так же установлено оптимальное время, при котором наблюдается максимальный положительный эффект.

Ключевые слова: электромагнитное облучение миллиметрового диапазона, скрининговая модель *in vitro*, время экспозиции.

DETERMINATION OF EXPOSITION OPTIMUM TIME AT RATS MARROW BONE CELLS IRRADIATION BY MILLIMETRIC RANGE LOW INTENSITY ELECTROMAGNETIC RADIATION

V. Dobrova, E.I. Dolzhikova, L. Maloshtan, Ek. Stepanova

National Pharmaceutical University, Kharkiv

Summary: by our new developed method the influence of wideband signal of electromagnetic radiation of millimetric range (EMR MMR) of low intensity is studied on cells viability at different expositions. The experiments were held in the conditions *in vitro* on marrow bone cell culture.

Analysis of experiment results was conducted by our statistical method. Positive influence of EMR MMR is experimentally proved by rats marrow bone cells viability. The similarly quadratic tendency of dead cells portion decrease at the increase of exposition time was determined. Theoretical dependence of cytoprotecting influence of radiation on exposition time was determined along with optimum time for maximum positive effects.

Key words: electromagnetic irradiation of millimetric range, *in vitro* screening model, exposition time.