ISSN 0206-5657. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2014. Випуск 64. С. 82–89
Visnyk of the Lviv University. Series BIology. 2014. Issue 64. P. 82–89

УДК 591.3:597.551.2.043:537-962

ПРОЦЕСИ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ ЗАРОДКІВ В'ЮНА ЗА ВПЛИВУ МІКРОХВИЛЬОВОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ

М. Яремчук, М. Дика, Д. Санагурський

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: m.yaremchuk@i.ua

Досліджено вплив електромагнітного випромінювання радіочастотного діапазону (900 МГц) на інтенсивність процесів ліпопероксидації, зокрема, утворення ТБК-позитивних продуктів пероксидного окиснення ліпідів зародків в'юна (*Misgurnus fossilis* L.). Встановлено, що використане випромінювання зумовлює достовірні зміни вмісту малонового діальдегіду залежно від часу опромінення та стадій розвитку зародків. За дії мікрохвильового випромінювання низької інтенсивності, на частотах мобільного зв'язку тривалістю 1, 5, 10 і 20 хв, спостерігається значна інтенсифікація процесів пероксидного окиснення ліпідів на ранніх етапах розвитку зародків.

Ключові слова: мікрохвильове випромінювання, зародки в'юна, пероксидне окиснення ліпідів, ТБК-позитивні продукти.

Актуальним на сьогодні є вивчення впливу електромагнітного випромінювання радіочастотного (ЕМВ РЧ) діапазону на живі організми [4, 9, 22, 25, 32, 35]. Дослідження молекулярних механізмів дії мікрохвильового випромінювання (900 МГц) на клітину та розвиток організму в цілому є важливим завданням для розуміння аспектів дії електромагнітного випромінювання (ЕМВ) на живі системи.

Мікрохвильове випромінювання низької інтенсивності на частотах мобільного зв'язку спричиняє генетичні дефекти [16], викликає хромосомну нестабільність, що призводить до підвищення ризику захворювання на рак [32].

При вивченні впливу ЕМВ на живі системи виділяють [13] два ефекти: тепловий та інформаційний (нетепловий). Вплив мікрохвильового випромінювання на біологічні системи переважно здійснюється за рахунок збільшення температури (тепловий ефект) [25], а також – нетеплових ефектів [21, 23]. На сьогодні відомо, що навіть малі, так звані нетеплові інтенсивності мікрохвильового випромінювання можуть викликати метаболічні зміни у живих клітинах [14]. До досліджуваних показників впливу низькоінтенсивного ЕМВ належать: збільшення продукції активних форм кисню (АФК) [31], експресія білків теплового шоку [20], ушкодження ДНК [33], індукція апоптозу після опромінення [19]. Відомо, що електромагнітні поля (ЕМП) змінюють потенціал плазматичної мембрани [28]. Це може впливати на вільнорадикальні процеси у клітині та на систему антиоксидантного захисту організму.

Відомо, що плазматична мембрана може бути мішенню дії ЕМВ РЧ діапазону, а інші зміни біологічних показників виступають вторинними щодо впливу на плазматичну мембрану [18, 21, 26, 34]. У 1992 р. дослідники встановили, що ЕМП збільшує кількість вільних радикалів у клітинах [22]. Показано, що у відповідь на мікрохвильове випромінювання розвивається окисний стрес [17, 27], збільшується кількість АФК та знижується активність антиоксидантних ферментів [29, 30].

Встановлено, що ЕМП впливає на ембріональний розвиток тварин, а саме спостерігаються аномалії розвитку, порушення функцій центральної нервової системи, зсув темпів постнатального розвитку [5].

© Яремчук М., Дика М., Санагурський Д., 2014

Механізм впливу ЕМВ РЧ діапазону не до кінця вивчений, хоча відомі дослідження про зміни пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) і утворення вільних радикалів [36] та про індукцію окиснювального стресу за дії ЕМВ. Саме тому вивчення процесів ліпопероксидації зародків в'юна за умов впливу мікрохвильового випромінювання низької інтенсивності (900 МГц) на сучасному етапі розвитку біології є актуальним.

Матеріали та методи

Дослідження проводили на зародках прісноводної риби в'юна *Misgurnus fossilis* L., через 60, 150, 210, 270 і 330 хв після запліднення яйцеклітин. Використовували зародки під час стадій, які відповідають першому дробленню зиготи (2 бластомери), четвертому (16 бластомерів), шостому (64 бластомери), восьмому (256 бластомерів) і десятому (1024 бластомери). Овуляцію стимулювали внутрішньом'язовим введенням самкам хоріонічного гонадотропіну (500 од). Ікру, отриману через 36 год після стимуляції овуляції, запліднювали у чашках Петрі суспензією сперміїв [8]. Сім'яники одержували з декапітованих самців шляхом розтину черевної порожнини. Через 5–10 хв після запліднення зиготи відмивали й інкубували у фізіологічному розчині Гольтфретера при температурі 20–22°С [1].

Отримані зиготи піддавали опроміненню на частотах мобільного зв'язку. Як джерело мікрохвильового випромінювання використовували мобільний телефон, що перебував у режимі розмови. Частота випромінювання становила 900 МГц. Для оцінки рівня випромінювання використовувався питомий коефіцієнт поглинання (Specific Absorption Rate – SAR), який є показником шкідливого впливу ЕМВ мобільних телефонів. Згідно з паспортом телефону, значення SAR становить 1,1 Вт/кг.

Отримані зиготи опромінювали одноразово відразу після запліднення протягом 1, 5, 10 та 20 хв з відбором зародків на досліджуваних стадіях. Мобільний телефон у режимі розмови містився над чашками Петрі на відстані 3 см. Стадії розвитку зародків контролювали візуально бінокулярним мікроскопом МБС-9.

Зародки в'юна на різних стадіях розвитку гомогенізували за допомогою гомогенізатора Поттера–Ельвенгейма у розчині Гольтфретера. По 1 мл гомогенату кожної проби заморожували у морозильній камері при –20°С, які в подальшому використовували для дослідження. Кількість білка у кожній пробі визначали за методом Лоурі [24].

Інтенсивність процесів ПОЛ аналізували за зміною кількості малонового діальдегіду (МДА), визначали за методом Тимирбулатова [12]. Принцип методу базується на активації ПОЛ іонами двовалентного заліза до рівня, який реєструється спектрофотометрично. При високій температурі у кислому середовищі МДА реагує з тіобарбітуровою кислотою, утворюючи забарвлений триметиновий комплекс з λ_{max}=532 нм [12]. Достовірність змін між середніми арифметичними значеннями встановлювали за t-критерієм Стьюдента [3].

Результати і їхнє обговорення

Вільнорадикальні процеси, зокрема ПОЛ, є одним із універсальних механізмів пошкодження біологічних мембран як у нормі, так і за умов будь-якої патології [6, 15]. Ці процеси виступають фактором, що змінює структурну модифікацію і функції ліпідів, їхні властивості та транспорт речовин [2].

Інтенсивність процесів ПОЛ зародків в'юна є невисокою. Відомо, що через 1,5 год після запліднення яйцеклітин в'юна зростають вільнорадикальні процеси. Імовірно, це пов'язано з інтенсивним поділом бластомерів і мембраногенезом [1, 7]. За нормальних умов інтенсивність процесів вільнорадикального окиснення зародків *Misqurnus fossilis* L. досягає мінімального значення на стадії 8 поділу бластомерів. На стадії 10 поділу (1024 бластомери) інтенсивність процесів ПОЛ зростає [1, 7, 11].

Відомо, що електромагнітне випромінювання на частотах мобільного зв'язку сприяє утворенню вільних радикалів у тканинах печінки, нирок, мозку, рогівки ока [17, 29, 35, 36]. Унаслідок цього спостерігалося збільшення рівня МДА за умов впливу ЕМВ РЧ діапазону у тканинах щурів [17, 29, 35, 36].

Показано, що вміст ТБК-позитивних продуктів зародків в'юна одразу після запліднення (*in vivo*) за умов впливу ЕМВ РЧ діапазону протягом 1 та 20 хв, зростає зі збільшенням тривалості експозиції на стадіях розвитку 2, 16, 64 і 256 бластомерів (рис. 1, 2). Проте на стадії 10 поділу бластомерів зародків в'юна вплив мікрохвильового випромінювання низької інтенсивності на частотах мобільного зв'язку протягом 1 і 20 хв спричиняє достовірне зниження вмісту МДА.

Збільшення експозиції ЕМВ РЧ зародків до 20 хв веде до інтенсифікації процесів ліпопероксидації на стадіях 2, 16, 64 та 256 бластомерів, порівняно з контролем. Однак на стадії 10 поділу (1024 бластомери) спостерігалося достовірне зниження вмісту МДА, що становив 0,630±0,02 мкмоль/мг білка, тоді як у контролі – 0,880±0,02 мкмоль/мг білка. Подібну динаміку змін інтенсивності процесів ПОЛ відмічено за умов впливу мікрохвильового випромінювання тривалістю 1 хв на усіх досліджуваних стадіях (рис. 1, 2).

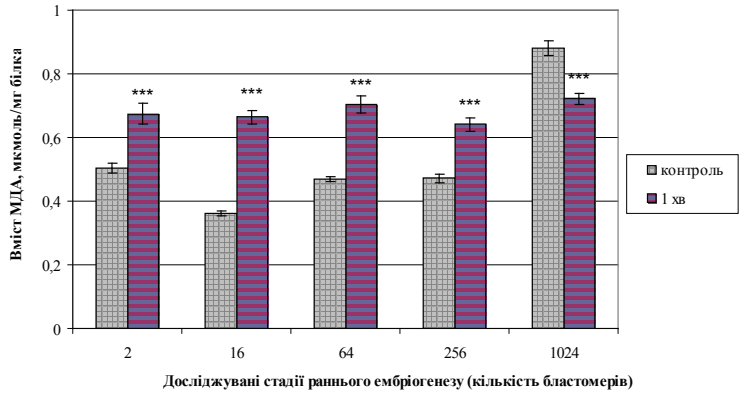

Рис. 1. Інтенсивність процесів ПОЛ (за вмістом МДА) у зародків в'юна за умов впливу мікрохвильового випромінювання тривалістю 1 хв упродовж раннього ембріогенезу. Тут і далі вірогідні зміни порівняно з контролем: * – p>0,95;** – p>0,99; *** – p>0,999.

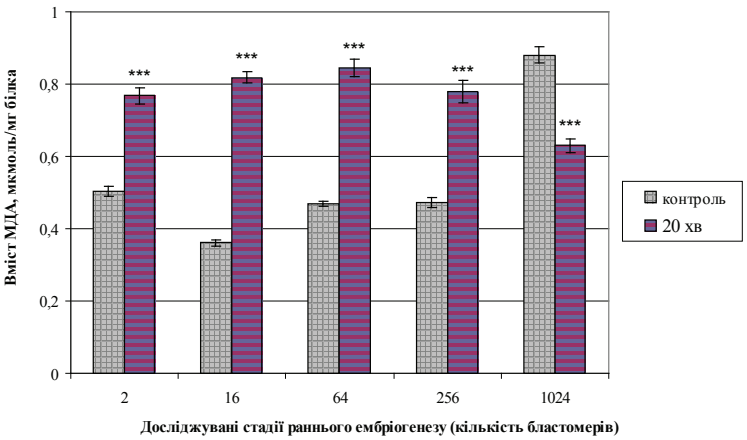

Рис. 2. Інтенсивність процесів ПОЛ (за вмістом МДА) у зародків в'юна за умов впливу мікрохвильового випромінювання тривалістю 20 хв упродовж раннього ембріогенезу.

Інтенсивність процесів ліпопероксидації у зародків в'юна на усіх досліджуваних стадіях розвитку, за дії мікрохвильового випромінювання тривалістю 10 хв, достовірно зростає порівняно з контролем (рис. 3). Максимального рівня кількість МДА досягає на стадіях восьмого та десятого поділів бластомерів, за дії ЕМВ РЧ діапазону тривалістю 10 хв і становить, відповідно, 1,52±0,04 та 1,51±0,03 мкмоль/мг білка.

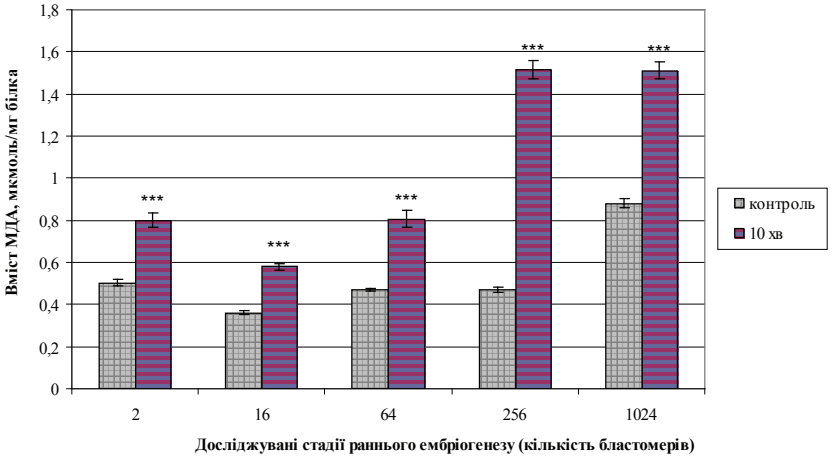

Рис. 3. Інтенсивність процесів ПОЛ (за вмістом МДА) у зародків в'юна за умов впливу мікрохвильового випромінювання тривалістю 10 хв упродовж раннього ембріогенезу.

За дії мікрохвильового випромінювання тривалістю 5 хв на стадії 2 бластомерів вміст МДА достовірно знизився порівняно з контролем і становив 0,426±0,01 мкмоль/мг білка (рис. 4). Вплив ЕМВ РЧ діапазону веде до недостовірної активації процесів ліпопероксидації у зародків в'юна на стадії розвитку 16 бластомерів порівняно з відповідним показником у контролі. На стадіях 64, 256 та 1024 бластомерів зародків в'юна 5 хв дії ЕМВ призводить до достовірного зростання кількості ТБК-позитивних продуктів. Максимальний рівень ПОЛ (2-кратне збільшення вмісту МДА, порівняно з контролем) відзначено на стадії 64 бластомерів.

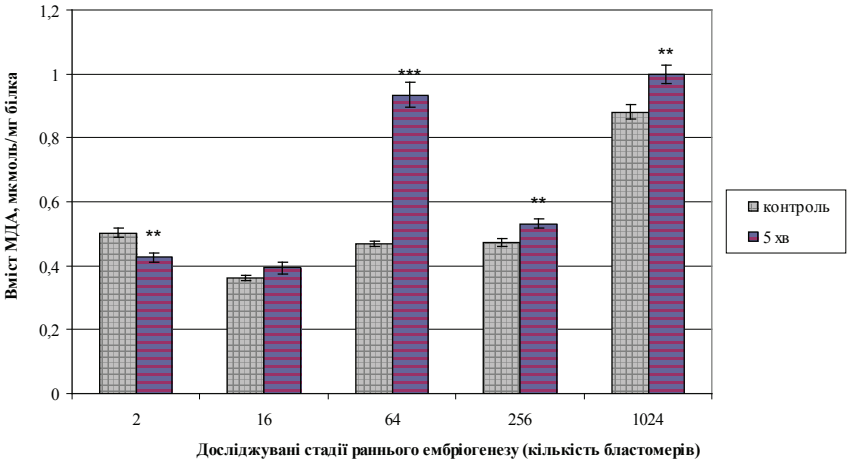

Рис. 4. Інтенсивність процесів ПОЛ (за вмістом МДА) у зародків в'юна за умов впливу мікрохвильового випромінювання тривалістю 5 хв упродовж раннього ембріогенезу.

Ці дані не суперечать результатам, отриманим у дослідженні на тканинах щурів і морських свинок, за умов впливу ЕМВ РЧ, на процеси ліпопероксидації (достовірні зміни вмісту МДА після впливу ЕМВ на частотах мобільного зв'язку) [17, 27, 35].

Аналіз отриманих результатів дає змогу зробити висновок про те, що на ранніх стадіях розвитку зародків в'юна активуються процеси ПОЛ за дії ЕМВ РЧ діапазону тривалістю 1, 10 і 20 хв. Відомо, що через 1,5 год починається інтенсивний поділ бластомерів зародків, тому зростання вільнорадикального ПОЛ може бути пов'язане з ефективним мембраногенезом [7]. Це свідчить про підвищення функціональної активності клітин зародка з кожним наступним етапом розвитку. До шести годин розвитку (10–й поділ, 1024 бластомери) повністю формується гаструла, і в бластодермі встановлюється іонний гомеостаз, близький до гомеостазу диференційованих клітин. Нами показано, що на стадії 10-го поділу бластомерів відбувається зростання вмісту ТБК-позитивних продуктів, за дії мікрохвильового випромінювання тривалістю 5 і 10 хв, що свідчить про значну інтенсифікацію процесів ліпопероксидації. Однак експозиція ЕМВ упродовж 1 і 20 хв веде до достовірного зниження кількості МДА, порівняно з контролем. На стадії 10 поділу бластомерів (6-та година розвитку) зародків в'юна падає мітотичний індекс і зростає морфогенетична активність ядер. На цій стадії розвитку відбувається десинхронізація поділу зародкових клітин, що може призвести до автономізації метаболічних процесів у диференційованих клітинах [10]. Це і може впливати на інтенсивність процесів ПОЛ.

Отже, нами встановлено, що вплив мікрохвильового випромінювання низької інтенсивності на частотах мобільного зв'язку (900 МГц) різної тривалості призводить до порушення процесів ліпопероксидації, про що свідчить зміна вмісту ТБК-позитивних продуктів на ранніх етапах розвитку зародків в'юна.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Гойда Е. А.* Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных. К.: Наук. думка, 1993. 224 с.
2. *Голубій Є. М., Коцюмбас І. Я., Коцюмбас Г. І.* Окисна модифікація білків як критерій глибини оксидативного стресу // Наук.-техн. бюл. 2006. Вип. 7. № 8. С. 308–323.
3. *Гумецький Р. Я., Паляниця Б. М., Чабан М. Е.* Математичні методи в біології: теоретичні відомості, програмований практикум, комп'ютерні тести. Львів: Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка, 2004. 111 с.
4. *Зотов С. В.* Поведінкові реакції тварин при дії ЕМП, які створюються засобами стільникового мобільного зв'язку стандарту GSM-900 // Матеріали XIV з'їзду гігієністів України. Дніпр.: АРТ-Пресс, 2004. Т. І. С. 260–264.
5. *Кувшинов Г. І.* Метод зменшення екологічного забруднення радіоефіру при побудові інформаційно-вимірювальних систем // Наук. праці ДонНТУ. Сер. обчисл. техніка та автоматизація. 2004. С. 46–54.
6. *Кукоба Т. В., Шиш А. М., Мойбенко О. О.* Вплив ω-3 поліненасичених жирних кислот на перекисне окиснення ліпідів // Фізіол. журнал. 2005. Т. 51. № 1. С. 26–31.
7. *Мукалов И. О., Гойда Е. А., Кусень С. И.* Перекисное окисление липидов на ранних этапах развития вьюна // Укр. биохим. журнал. 1980. Т. 52. № 4. С. 473–477.
8. *Нейфах А. А., Тимофеева М. Я.* Проблемы регуляции в молекулярной биологии развития. М.: Наука, 1978. 336 с.
9. *Побаченко С. В., Пономарев А. В.* Влияние активации мобильных телефонов стандарта GSM на биоритмическую структуру электрогенеза головного мозга человека // Биомедицинская радиоэлектроника. 2009. № 3. С. 50–55.

10. *Санагурський Д. І.* Об'єкти біофізики: монографія. Львів: Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка, 2008. 522 с.
11. *Тарновська А. В., Дика М. В., Санагурський Д. І.* Перекисне окиснення ліпідів та антиоксидантний статус у зародків в'юна за умов впливу фторхінолонів // Наук. вісн. Львів. акад. вет. медицини ім. С.З. Гжицького. 2004. Т. 6. № 1. С. 260–266.
12. *Тимирбулатов Р. А., Селезнев Е. И.* Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидосодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лаб. дело. 1981. № 4. С. 209–211.
13. *Харламов А. В.* Возможный механизм резонансного воздействия электромагнитных волн на биологические объекты // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. 2007. № 5. С. 10–14.
14. *Якименко І. Л., Сидорик Є. П., Цибулін О. С., Чехун В. Ф.* Потенційні ризики мікрохвильового випромінювання мобільних телефонів для здоров'я молоді // Довкілля та здоров'я. 2011. № 1. С. 48–51.
15. *Agarwal A., Gupta S., Sharma R.* Role of oxidative stress in female reproduction // Reprod. Biol. Endocrinol. 2005. Vol. 3. P. 28.
16. *Aitken R., Bennetts L., Sawyer D.* et al. Impact of radiofrequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline // Int. J. Androl. 2005. Vol. 28. P. 171–179.
17. *Balci M., Devrim E., Durak I.* Effects of mobile phones on oxidant/antioxidant balance in cornea and lens of rats // Curr Eye Res. 2007. Vol. 32. N 1. P. 21–25.
18. *Capri M., Scarcella E., Fumelli C., Bianchi E. In vitro* exposure of human lymphocytes to 900 MHz CW and GSM modulated radiofrequency: studies of proliferation, apoptosis and mitochondrial membrane potential // Radiat Res. 2004. Vol. 162. N 2. P. 211–218.
19. *Caraglia M., Marra M., Mancinelli F.* et al. Electromagnetic fields at mobile phone frequency induce apoptosis and inactivation of the multi-chaperone complex in human epidermoid cancer cells // J. Cell. Physiol. 2005. Vol. 204. N 2. P. 539–548.
20. *De Pomerai D.*, Daniells C., David H. et al. Non-thermal heat-shock response to microwaves // Nature. 2000. Vol. 405 (6785). P. 417–418.
21. *Friedman J., Kraus S., Hauptman Y.* et al. Mechanism of short-term ERK activation by electromagnetic fields at mobile phone frequencies // Biochem. J. 2007. Vol. 405. N 3. P. 559–568.
22. *Grundler W., Kaiser F., Keilmann F., Walleczek J.* Mechanisms of electromagnetic interaction with cellular systems // Naturwissenschaften. 1992. Vol. 79. N 12. P. 551–559.
23. *Leszczynski D., Joenvaara S., Reivinen J., Kuokka R.* Non-thermal activation of the hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: molecular mechanism for cancer- and blood-brain barrier-related effects // Differentiation. 2002. Vol. 70. N 2–3. P. 120–129.
24. *Lowry O. H., Rosenbrough N. G., Farr A. L., Randall R. C.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 265–275.
25. *Makker K., Varghese A., Desai N. R., Mouradi R.* Cell phones: modern man's nemesis? // Reprod Biomed Online. 2009. Vol. 18. N 1. P. 148–157.
26. *Markkanen A., Penttinen P., Naarala J., Pelkonen J.* Apoptosis induced by ultraviolet radiation is enhanced by amplitude modulated radiofrequency radiation in mutant yeast cells // Bioelectromagnetics. 2004. Vol. 25. N 2. P. 127–133.
27. *Meral I., Mert H., Mert N., Deger Y.* Effects of 900-MHz electromagnetic field emitted from cellular phone on brain oxidative stress and some vitamin levels of guinea pigs // Brain Res. 2007. Vol. 1169. P. 120–124.

28. *Naziroglu M., Karaoglu A., Aksoy A.* Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats // Toxicology, 195. 2004. P. 221–230.
29. *Oktem F., Ozguner F., Mollaoglu H., Koyu A*. Oxidative damage in the kidney induced by 900-MHz-emitted mobile phone: protection by melatonin // Arch. Med. Res. 2005. Vol. 36. N 4. P. 350–355.
30. *Oral B., Guney M., Ozguner F., Karahan N.* Endometrial apoptosis induced by a 900-MHz mobile phone: preventive effects of vitamins E and C // Adv. Ther. 2006. Vol. 23. N 6. P. 957–973.
31. *Ozguner F., Altinbas A., Ozaydin M.* et al. Mobile phone-induced myocardial oxidative stress: protection by a novel antioxidant agent caffeic acid phenethyl ester // Toxicol. Ind. Health. 2005. Vol. 21. N 9. P. 223–230.
32. *Pacini S., Ruggiero M., Sardi I., Aterini S.* Exposure to global system for mobile communication (GSM) cellular phone radiofrequency alters gene expression, proliferation, and morphology of human skin fibroblasts // Oncol. Res. 2002. Vol. 13. P. 19–24.
33. *Phillips J. L., Singh N. P., Lai H.* Electromagnetic fields and DNA damage // Pathophysiology. 2009. Vol. 16. N 2–3. P. 79–88.
34. *Rao V. S., Titushkin I. A., Moros E. G.* Nonthermal effects of radiofrequency-field exposure on calcium dynamics in stem cell-derived neuronal cells: elucidation of calcium pathways // Radiat. Res. 2008. Vol. 169. N 3. P. 319–329.
35. *Sokolovic D., Djindjic B., Nikolic J.* Melatonin reduces oxidative stress induced by chronic exposure of microwave radiation from mobile phones in rat brain // J. Radiatю Res. (Tokyo). 2008. Vol. 49. N 6. P. 579–586.
36. *Watanabe Y., Nakagawa M., Miyakoshi Y.* Enhancement of lipid peroxidation in the liver of mice exposed to magnetic fields // Ind. Health. 1997. Vol. 35. P. 285–290.

Стаття: надійшла до редакції 01.06.13

доопрацьована 26.11.13

прийнята до друку 02.12.13

LIPID PEROXIDATION PROCESSES IN LOACH EMBRYOS UNDER THE EFFECT OF MICROWAVE RADIATION

M. Yaremchuk, M. Dyka, D. Sanagursky

Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: m.yaremchuk@i.ua

The article contains data on the effect of electromagnetic radiation of mobile phone (900 MHz) on the lipid peroxidation processes and in particular on malondialdehyde levels at early stages of embryogenesis in loach embryos. It was observed that radiofrequency electromagnetic waves cause statistically meaningful effect depending on the exposure time and the stage of loach embryos development. The effect of microwave radiation at 1, 5, 10 to 20 minutes duration causes intense processes of lipid peroxidation at early stages of embryos development.

Keywords: microwave radiation, loach embryos, lipid peroxidation, malondialdehyde.

ВЛИЯНИЕ МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ПРОЦЕССЫ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ ЗАРОДЫШЕЙ ВЬЮНА

М. Яремчук, М. Дыка, Д. Санагурский

Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: m.yaremchuk@i.ua

Исследовано влияние электромагнитного излучения радиочастотного диапазона (900 МГц) на интенсивность процессов липопероксидации, в частности, образование ТБК-положительных продуктов перекисного окисления липидов зародышей вьюна (*Misgurnus fossilis* L.). Установлено, что излучение вызывает достоверные изменения процессов свободнорадикального окисления (содержания малонового диальдегида) в зависимости от времени облучения и стадий развития зародышей. Обнаружен статистически значимый эффект микроволнового излучения низкой интенсивности продолжительностью 1, 5, 10 и 20 мин на интенсификацию процессов перекисного окисления липидов у зародышей вьюна.

Ключевые слова: микроволновое излучение, зародыши вьюна, перекисное окисление липидов, ТБК-положительные продукты.