

Сочетанное действие питьевой минеральной воды и низкоинтенсивного электромагнитного излучения в условиях иммобилизационного стресса (экспериментальное исследование)

Ю.Н. КОРОЛЕВ, И.П. БОБРОВНИЦКИЙ, М.С. ГЕНИАТУЛИНА, Л.В. МИХАЙЛИК, Л.А. НИКУЛИНА, А.С. БОБКОВА, М.Ю. ЯКОВЛЕВ

ФГБУ «Российский научный центр медицинской реабилитации и курортологии» Минздрава России, Москва, Российская Федерация, 121099

The combined action of drinking mineral water and low-intensity electromagnetic radiation under the immobilization stress conditions (an experimental study)

YU.N. KOROLEV, I.P. BOBROVNITSKY, M.S. GENIATULINA, L.V. MIKHAILIK, L.A. NIKULINA, A.S. BOBKOVA, M.YU. YAKOVLEV

Federal state budgetary institution «Russian Research Centre of Medical Rehabilitation and Balneotherapy», Russian Ministry of Health, Moscow, Russian Federation, 121099

В экспериментах на белых крысах-самцах с помощью биохимических, радиоиммунологических и электронно-микроскопических методов исследования было установлено, что сочетанное применение питьевой минеральной воды (МВ) и низкоинтенсивного электромагнитного излучения (НИЭМИ) сверхвысокой частоты (плотность потока мощности — ППМ меньше 1 мкВт/см^2 , частота около 1000 МГц) способствовало активации метаболических и внутриклеточных регенеративных процессов в печени и семенниках. Преимущество сочетанного применения МВ и НИЭМИ перед монофакторами проявлялось в ослаблении стрессорных реакций, усилении ряда пластических процессов, более гармоничном развитии разных форм внутриклеточной регенерации. Результаты исследования расширяют представления о механизмах сочетанного действия МВ и НИЭМИ и обосновывают возможность их использования для защиты организма и его репродуктивной системы от стрессогенных нарушений.

Ключевые слова: сочетанное действие, питьевая минеральная вода, низкоинтенсивное электромагнитное излучение, иммобилизационный стресс, внутриклеточная регенерация, семенники, печень.

The present study carried out on white male rats in experiments with the use of biochemical, radioimmunological, and electron-microscopic methods. It was shown that the combined treatment with potable mineral water (MV) and low-intensity electromagnetic radiation (LIEMR) of ultrahigh frequency (power density less than $1 \text{ }\mu\text{W/cm}^2$, the frequency about 1000 MHz) facilitated the activation of metabolic and intracellular regenerative processes in the liver and testes. One of the advantages of the combined application of MV and LIEMR over the single-factor treatment manifested itself as the weakening of stress reactions, the increase in the frequency of the plastic processes, and the more harmonious development of different forms of intracellular regeneration. The results of the study provide a deeper insight into the mechanisms underlying the combined actions of drinking mineral water and low-intensity electromagnetic radiation; also, they justify the application of these factors for the protection of the reproductive system and the entire body from stress-induced disorders.

Keywords: combined action, drinking mineral water, low-intensity electromagnetic radiation, immobilization stress, intracellular regeneration, testicles, liver.

Для стимуляции регенерации и повышения способности организма приспосабливаться к негативным стрессогенным воздействиям целесообразно использовать лечебные физические факторы. В этом плане особый интерес представляет сочетанное применение природных и искусственных физических факторов, в частности питьевой минеральной воды (МВ) и низкоинтенсивного электромагнитного излучения (НИЭМИ) сверхвысокой частоты. Как показали наши предыдущие исследования, каждый

из этих факторов обладает стимулирующим влиянием на регенеративные процессы, однако по своей

Сведения об авторах:

Королев Юрий Николаевич — д.м.н., проф., зав. лаб. экспериментальных исследований РНЦ МРиК, тел.: +7(495)691-5764; Бобровницкий Игорь Петрович — д.м.н., проф.; Гениатулина Мариям Сабировна — к.б.н., с.н.с. лаб. экспериментальных исследований РНЦ МРиК; Михайлик Любовь Васильевна — н.с. лаб. экспериментальных исследований РНЦ МРиК; Никулина Людмила Анатольевна — к.б.н., с.н.с. лаб. экспериментальных исследований РНЦ МРиК; Бобкова Антонина Степановна — с.н.с. РНЦ МРиК; Яковлев Максим Юрьевич — к.м.н., зав. отд. медицинской кибернетики и информатики РНЦ МРиК

эффективности и особенностям развития они имеют существенные различия [1–3]. В частности, было показано, что действие НИЭМИ оказывает более выраженное влияние на развитие процессов внутриклеточной регенерации, чем действие МВ, особенно проявлявшееся в повышении активности биоэнергетических и белоксинтезирующих ультраструктур. С другой стороны, питьевые МВ также способны усиливать гиперплазию внутриклеточных органелл, активизировать синтез РНК и белка, вызывать адаптационные сдвиги в нейрогуморальном статусе организма [4, 5]. Поэтому постановка вопроса о сочетанном действии двух различных по своей природе факторов — МВ и НИЭМИ — представляется актуальной как в плане изучения и уточнения механизмов их сочетанного действия, так и с целью дальнейшей разработки способов их практического применения для санаторно-курортного лечения.

Цель настоящего исследования — выявить особенности сочетанного действия питьевой МВ и НИЭМИ на развитие метаболических и внутриклеточных регенеративных процессов на модели иммобилизационного стресса.

Эксперименты выполнены на 28 белых беспородных крысах-самцах массой 180–220 г. Работу с животными проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных целей (Страсбург, 1968). Животные содержались в обычных условиях вивария и свободного доступа к воде и пище. Все крысы были разделены на 5 групп:

— 1-я группа — сочетанное применение питьевой сульфатной магниевой-кальциевой МВ с концентрацией сульфат-ионов 2,35 г/л и минерализацией 4,3 г/л и процедур НИЭМИ с последующим действием иммобилизационного стресса;

— 2-я группа — применение той же питьевой МВ с последующим действием иммобилизационного стресса (группа сравнения);

— 3-я группа — применение процедур НИЭМИ с последующим действием иммобилизационного стресса (группа сравнения);

— 4-я группа (контроль) — применение водопроводной воды и мнимых процедур НИЭМИ с последующим действием иммобилизационного стресса;

— 5-я группа (интактная) — животные никаким воздействиям не подвергались.

МВ и водопроводную воду крысам вводили внутривентрикулярно 1 раз в день по 3 мл через иглу с оливой на конце, всего 12 процедур. Курс воздействий НИЭМИ (10 процедур) проводили от аппарата Акватон-2 (ООО «Телемак», Саратов), плотность потока мощности меньше 1 мВт/см², частота около 1000 МГц. Всего на курс 8 процедур, время воздействия 2 мин. Животные облучались с расстояния 2–3 см от поверхности кожи поясничной области.

Иммобилизационный стресс осуществляли по методике Г. Селье однократным привязыванием крыс в течение 6 ч в положении на спине. Забой животных проводили через 1 день после действия стресса. Объектом исследования являлись органы репродуктивной системы (семенники), печень и кровь.

Для исследования антиокислительной активности (АОА) в семенниках и печени использовали модельную систему в виде суспензии липопротеинов желтка куриного яйца [6]. Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по конечному продукту ПОЛ — малоновому диальдегиду [7]. Содержание белка определяли биуретовым методом [8], содержание нуклеиновых кислот (РНК и ДНК) — двухволновым спектрофотометрическим методом в модификации [9]. В плазме крови радиоиммуннологическим методом определяли кортикостерон (фирма «ИБОХ», Беларусь).

Для электронно-микроскопических исследований семенники фиксировали в 4% параформальдегиде, приготовленном на фосфатном буфере (рН 7,4), постфиксировали в 1% OsO₄. После обезвоживания образцы заключали в смесь эпон-аралдит. Исследование образцов проводили на электронном микроскопе Libra 120 (Германия) с программой Carl Zeiss STM Nano Technology system Division, которая включает в себя как режим трансмиссионного исследования, так и математическую обработку внутриклеточных структур. Проводили морфометрический анализ митохондрий (Мх) в клетках Сертоли (количество, средняя и суммарная площади), а также подсчитывали число этих клеток с различным уровнем содержания белоксинтезирующих органелл — гранулярной эндоплазматической сети, рибосом, полисом, а также секреторного аппарата Гольджи. Статистическую значимость различий оценивали с помощью критерия Стьюдента для независимых выборок, межгрупповые различия качественных признаков проводили с использованием критерия χ^2 . Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

У животных контрольной группы действие иммобилизационного стресса вызывало в печени и семенниках выраженное снижение содержания РНК, ДНК и уровня АОА, которые развивались на фоне усиления процессов дистрофии и деструкции. Уровень кортикостерона в крови возрастал в 3 раза по сравнению с интактными животными. В клетках Сертоли обнаруживались явления отека, гранулярная эндоплазматическая сеть часто выглядела фрагментированной и дегранулированной, содержание свободнолежащих рибосом и полисом значительно снижалось. Мх становились мелкими, их средняя и суммарная площадь уменьшалась практически в 2 раза, что свидетельствовало о выраженном ослаблении клеточной биоэнергетики. Местами обнаруживались деструктивно измененные Мх в виде миели-

ноподобных структур, что может быть связано с усилением ПОЛ в их мембранах. Нарушения структуры органелл местами сопровождались признаками внутриклеточной регенерации, однако она была обычно выражена в слабой форме.

При действии лечебных физических факторов в условиях иммобилизационного стресса было установлено, что уровень кортикостерона в крови при применении МВ, как и в контроле, оставался повышенным, а при действии НИЭМИ его содержание еще больше возрастало. При этом отмечалась тенденция к увеличению индекса массы надпочечников, что в целом указывало на стрессорный характер развивавшихся сдвигов. Снижение содержания кортикостерона происходило только при сочетанном применении МВ и НИЭМИ ($p < 0,01$), что коррелировало с достоверным уменьшением индекса массы надпочечников ($p < 0,01$) (рис. 1). Эти изменения, в

отличие от действия монофакторов, свидетельствовали об ослаблении стрессорных реакций в организме. Метаболические сдвиги в печени и семенниках под влиянием использованных факторов проявляли адаптационную направленность, при этом все исследованные показатели превышали уровень контроля. Среди монофакторов более эффективным оказалось действие НИЭМИ, причем в большей мере это проявлялось в семенниках: АОА возрастала на 34,7% ($p < 0,01$), РНК — на 47,5% ($p < 0,01$). Эти сдвиги развивались на фоне повышения уровня ПОЛ (на 35,9%, $p < 0,01$). При сочетанном действии факторов наиболее характерным являлось выраженное увеличение уровня РНК в печени: на 99,8% ($p < 0,01$) по сравнению с контролем и на 77,2% ($p < 0,01$) по сравнению с действием НИЭМИ (рис. 2). Отмечалась также тенденция к повышению содержания общего белка, а также высокая АОА.

В семенниках эффект сочетанного действия факторов проявлялся несколько слабее, но при этом происходило увеличение содержания ДНК: на 30,6% ($p < 0,01$) по сравнению с контролем и на 18,6% ($p < 0,01$) по сравнению с НИЭМИ, а также повышение синтеза РНК (рис. 3). Отмеченные сдвиги свидетельствовали об активизации биосинтетических процессов, клеточной и тканевой регенерации в печени и семенниках.

Адаптационный характер метаболических сдвигов имел свое подтверждение на ультраструктурном уровне в клетках Сертоли семенников. Наблюдалось ослабление явлений деструктивного характера и стимуляция биосинтетических субклеточных реакций, особенно со стороны Мх и белоксинтезирующих структур. Результаты количественного анализа Мх представлены в таблице, из которой следует, что при всех использованных факторах отмечалось увеличение суммарной площади Мх по сравнению с контролем: в большей степени это происходило при действии НИЭМИ и явно слабее — при действии МВ. При сочетанном применении факторов суммарная площадь Мх возрастала по сравнению с контролем ($p < 0,01$), и этот показатель занимал промежуточное положение между действием МВ и НИЭМИ. Количество и размеры Мх (соответственно органоидный и внутриорганноидный уровни регенерации), из которых складывалась их суммарная площадь, значительно различались в зависимости от действующего фактора. Если для НИЭМИ характерным являлось отчетливое увеличение размеров Мх и снижение их числа до уровня контроля, то особенностью сочетанного применения МВ и НИЭМИ являлось увеличение как количества Мх, так и их размеров, причем численность этих органелл становилась наиболее высокой среди исследованных групп. Следовательно, действие НИЭМИ в используемом режиме фактически стимулирует только один уровень регенера-

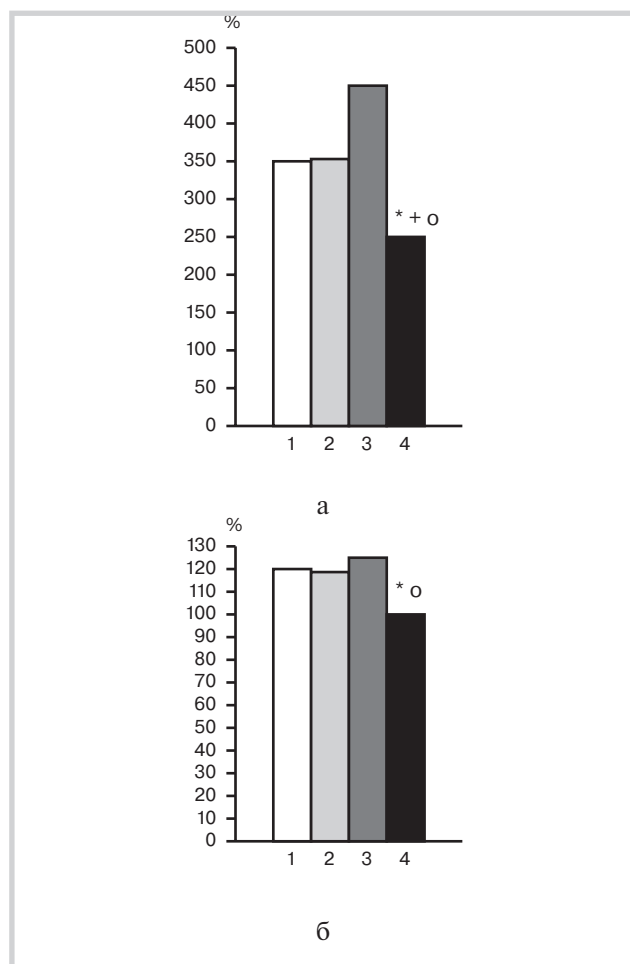


Рис. 1. Содержание кортикостерона в крови (а) и относительная масса надпочечников (б) при иммобилизационном стрессе (1), действии МВ (2), НИЭМИ (3), сочетанном применении МВ + НИЭМИ (4).

* — $p < 0,05$ по сравнению с контролем по критерию χ^2 ; + — $p < 0,05$ по сравнению с МВ по критерию χ^2 ; о — $p < 0,05$ по сравнению с НИЭМИ по критерию χ^2 .

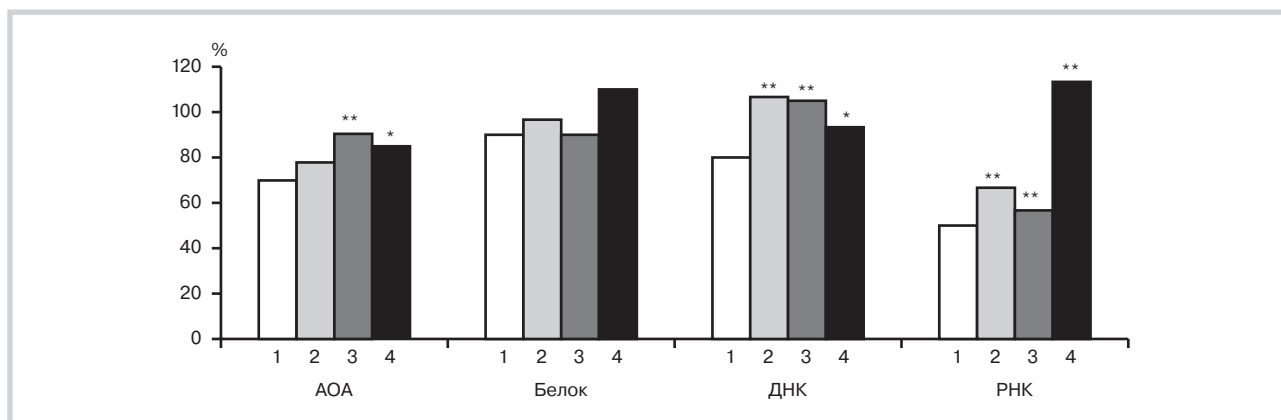


Рис. 2. Метаболические процессы в печени крыс при иммобилизационном стрессе (1), действии МВ (2), НИЭМИ (3) и сочетанном применении МВ + НИЭМИ (4).

* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

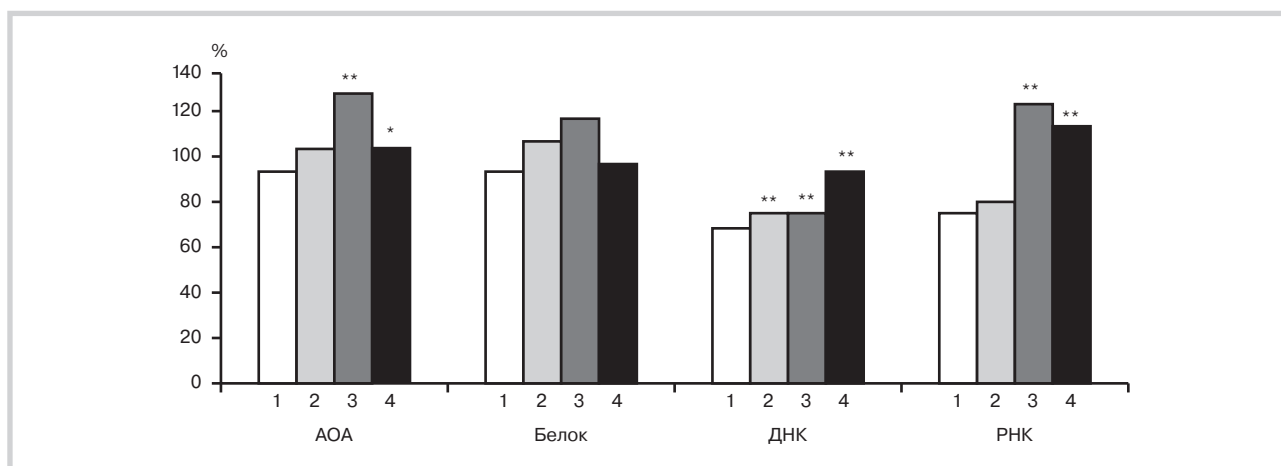


Рис. 3. Метаболические процессы в семенниках крыс при иммобилизационном стрессе (1), действии МВ (2), НИЭМИ (3) и сочетанном применении МВ + НИЭМИ (4).

* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

Морфометрическая характеристика митохондрий клеток Сертоли при применении МВ, НИЭМИ, МВ + НИЭМИ в условиях иммобилизационного стресса

Группа животных	Число измерений	Число Мх (n) на стандартную площадь клетки	Средняя площадь Мх, $\mu\text{м}^2$	Суммарная площадь Мх, $\mu\text{км}^2$
Интактная	80	$5,41 \pm 0,31$	$0,40 \pm 0,016$	$2,13 \pm 0,16$
Контроль	83	$4,98 \pm 0,41$	$0,29 \pm 0,017^+$	$1,51 \pm 0,12^+$
МВ	80	$6,14 \pm 0,50^*$	$0,33 \pm 0,018$	$2,1 \pm 0,11^*$
НИЭМИ	82	$5,04 \pm 0,23$	$0,72 \pm 0,040^*$	$3,60 \pm 0,25^*$
МВ + НИЭМИ	81	$6,88 \pm 0,46^{**}$	$0,39 \pm 0,022^{**}$	$2,77 \pm 0,19^{**}$

Примечание. + — $p < 0,01$ при сравнении с интактной группой, * — $p < 0,01$ при сравнении с контрольной группой, ** — $p < 0,01$ при сравнении с НИЭМИ по критерию Стьюдента.

ции (органойдный), тогда как при сочетанном применении факторов активизировались оба уровня (внутриорганойдный и органойдный). Возмож-

но, что выраженное усиление одного уровня регенерации в ущерб другому связано с напряженностью внутриклеточных обменных процессов, кото-

рые возникали в рамках существующих Мх под влиянием НИЭМИ. Сочетанное применение МВ и НИЭМИ в определенной мере предупреждало развитие этого дисбаланса в процессах регенерации.

Усиление регенерации проявлялось также и со стороны белоксинтезирующих органелл — рибосом, полисом и гранулярной эндоплазматической сети в клетках Сертоли. В отдельных клетках обнаруживались зоны активной регенерации, в которых скопления этих органелл в тесном контакте с Мх проявлялись особенно заметно. Чаше такие зоны определялись при действии НИЭМИ и сочетанном применении факторов. Характерной особенностью сочетанного действия являлась гиперплазия секреторного аппарата Гольджи, который чаще имел небольшие размеры и содержал цистерны с умеренно расширенными просветами. Число клеток с этой органеллой достигало 59,0%. При действии монофакторов аппарат Гольджи обнаруживался значительно реже (до 15,5%, контроль — 7,9%).

Таким образом, при действии всех использованных факторов выявлено повышение интенсивности адаптационных метаболических и регенеративных процессов при иммобилизационном стрессе. Среди монофакторов наибольшую эффективность на развитие этих процессов оказывало НИЭМИ, однако при этом в организме повышался уровень стрессорных реакций, что являлось негативным моментом в их действии. Сочетанное применение МВ и НИЭМИ имело определенное преимущество перед действи-

ем монофакторов, что проявлялось главным образом в ослаблении стрессорных реакций, в выраженной стимуляции ряда пластических процессов, в более гармоничном (сбалансированном) развитии обоих структурных уровней (форм) внутриклеточной регенерации, в расширении внутриклеточных связей. В механизмах сочетанного действия существенную роль сыграла МВ, которая препятствовала усилению стрессорных реакций, проявившихся при действии НИЭМИ. На основании полученных данных можно предположить, что при сочетанном действии факторов осуществляется более тонкое регуляторное воздействие на различные механизмы адаптации, что приводит к развитию в организме более адекватных физиологических реакций. Результаты исследования расширяют представления о механизмах сочетанного использования МВ и НИЭМИ и раскрывают перспективы для практического их использования с целью профилактики и лечения стрессогенных нарушений в организме и его репродуктивной системе.

Конфликт интересов отсутствует.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования: Ю.К., И.Б.
Сбор и обработка материала: Ю.К., Л.Н., М.Г., Л.М., А.Б.

Статистическая обработка данных: Ю.Я., Л.Н., М.Г., А.Б., Л.М.

Написание текста, редактирование: Ю.К.

ЛИТЕРАТУРА

1. Королев Ю.Н., Бобровницкий И.П., Никулина Л.А., Михайлик Л.В., Гениатулина М.С., Бобкова А.С. Применение низкоинтенсивного электромагнитного излучения в условиях иммобилизационного стресса (экспериментальное исследование). *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. 2014;4:47-52.
2. Королев Ю.Н., Бобровницкий И.П., Гениатулина М.С., Никулина Л.А. Регенеративные процессы в клетках Сертоли и Лейдига у крыс при сочетанном применении питьевой минеральной воды и магнитного поля в условиях стресса. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. 2014;3:40-44.
3. Королев Ю.Н., Гениатулина М.С., Никулина Л.А., Михайлик Л.В. Влияние питьевой минеральной воды и магнитного поля на развитие компенсаторно-приспособительных реакций в семенниках крыс при иммобилизационном стрессе. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. 2013;5:6-9.
4. Королев Ю.Н., Курило Л.Ф., Гениатулина М.С., Никулина Л.А., Шилейко Л.В. Пострадиационные нарушения в семенниках крыс и их профилактика при применении питьевой сульфатной минеральной воды. *Проблемы репродукции*. 2003;6:16-19.
5. Королев Ю.Н., Гениатулина М.С., Никулина Л.А. Ультраструктурные изменения клеток Сертоли семенников крыс при применении питьевой минеральной воды в сочетании с микроэлементами цинком и кремнием в условиях стресса. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. 2012;5:49-53.
6. Клебанов Г.И., Бабенков И.В., Теселкин Ю.О. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопротеинов. *Лабораторное дело*. 1977;5:59-62.
7. Тимирбулатов Р.А., Селезнев Б.И. Метод повышения интенсивности свободно-радикального окисления липидосодержащих компонентов крови и его диагностическое значение. *Лабораторное дело*. 1981;4:209-211.
8. Панков Ю.А., Усватова И.Я. *Флуорометрический метод определения 11-оксикортикостероидов в плазме периферической крови*. В кн.: Меньшиков В.В. Методы клинической биохимии гормонов и медиаторов: учебное пособие. М.; 1973:66-70.
9. Трудолобова М.Г. Количественное определение РНК и ДНК в субклеточных фракциях клеток животных. *Современные методы в биохимии*. М.; 1977:313-316.

Поступила 03.06.2015