ТЕОДОРА ИВАНОВА АПОСТОЛОВА

ВЛИЯНИЕ НА МИКРОВЪЛНОВО ЕЛЕКТРОМАГНИТНО ПОЛЕ ВЪРХУ ЕЛЕКТРИЧЕСКАТА, МЕХАНИЧЕСКАТА И ЕНЗИМНА АКТИВНОСТ И КОНФОРМАЦИЯ НА БЕЛТЪЦИТЕ В СКЕЛЕТЕН МУСКУЛ НА ЖАБА

ΑΒΤΟΡΕΦΕΡΑΤ

На дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен "ДОКТОР"

Научен консултант доц. д-р НИКОЛИНА РАДИЧЕВА д.м.

София 2012

ЗАЩИТАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА ЩЕ СЕ СЪСТОИ НА ОТ ОТ ЧАСА В ЗАСЕДАТЕЛНАТА ЗАЛА НА ИНСТИТУТ ПО ФИЗИОЛОГИЯ НА РАСТЕНИЯТА И ГЕНЕТИКА ПРИ БАН НА ОТКРИТО ЗАСЕДАНИЕ НА ИЗБРАНОТО НАУЧНО ЖУРИ

МАТЕРИАЛИТЕ ПО ЗАЩИТАТА СА ПУБЛИКУВАНИ НА ИНТЕРНЕТ СТРАНИЦАТА НА ИНСТИТУТ ПО БИОФИЗИКА И БИОМЕДИЦИНСКО ИНЖЕНЕРСТВО (HTTP://BIOMED.BAS.BG) И СА НА РАЗПОЛОЖЕНИЕ НА ИНТЕРЕСУВАЩИТЕ СЕ В КАНЦЕЛАРИЯТА НА ИНСТИТУТА ПО БИОФИЗИКА И БИОМЕДИЦИНСКО ИНЖЕНЕРСТВО, УЛ. АКАД. Г. БОНЧЕВ, БЛ. 105

ДИСЕРТАЦИЯТА СЪДЪРЖА **211** СТРАНИЦИ, **11** ТАБЛИЦИ И **18** ФИГУРИ. БИБЛИОГРАФИЯТА ОБХВАЩА **389** ЗАГЛАВИЯ.

ТЕОДОРА ИВАНОВА АПОСТОЛОВА

ВЛИЯНИЕ НА МИКРОВЪЛНОВО ЕЛЕКТРОМАГНИТНО ПОЛЕ ВЪРХУ ЕЛЕКТРИЧЕСКАТА, МЕХАНИЧЕСКАТА И ЕНЗИМНА АКТИВНОСТ И КОНФОРМАЦИЯ НА БЕЛТЪЦИТЕ В СКЕЛЕТЕН МУСКУЛ НА ЖАБА

ΑΒΤΟΡΕΦΕΡΑΤ

На дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен "ДОКТОР"

Научен консултант доц. д-р николина радичева д.м.

София 2012

СПИСЪК НА НАЙ-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

Съкращения на латиница

А – амплитуда на ВАП/ИАП;

АСҺЕ – ацетилхолинестераза;

DWT – discrete wavelet transform, дискретно уейвлет преобразувание;

ET – endurance time, период на непрекъсната активност на мускулните влакна;

FFT – Fast Fourier Transform, бърза Фурие трансформация;

FMF – бързоуморяемо мускулно влакно;

FTIRS – инфрачервена спектроскопия на Фурие трансформация;

HRT – half relaxation time, половината от времето за релаксация, времевият интервал между пика на съкращението и низходящата му фаза на ниво 50% от TwF;

MDF – median frequency, медианна честота на спектъра;

PV – propagation velocity of excitation, скорост на разпространение на акционния потенциал по дължината на влакното;

RMS – root mean squire analysis, средноквадратичен анализ;

Rt – време на нарастване, времевият интервал между възходящата фаза на ВАП на ниво 10% от A и пика на деполяризационната фаза;

SAR – specific absorption rate, погълната мощност;

SMF – бавноуморяемо мускулно влакно;

Т₀ – времевият интервал между пресечните точки на възходящия и низходящия фронт на негативната фаза на ИАП с базовата линия;

Т₁ – времевият интервал между позитивния и негативния максимум на ИАП;

ТР – total power, обща мощност на спектъра на ВАП/ИАП;

Тw – механограма (twitch) на единично съкращение на мускулното влакно;

ТwF – амплитуда на съкращението или сила;

Съкращения на кирилица

АП – акционен потенциал, потенциал на действие;

ВАП – вътреклетъчен акционен потенциал;

ЕМВ – електромагнитни вълни;

- ЕМГ електромиограма;
- **ЕМП** електромагнитно поле;
- ИАП извънклетъчен акционен потенциал;

МВП – микровълново електромагнитно поле;

увод

Едно от следствията на цивилизацията е стремителното навлизане на електромагнитни полета с различни честоти, амплитуди и мощности в човешкото обкръжение. Взривоподобното развитие на радиокомуникационната техника и технологии допринесоха за нарастването на значението на т. нар. високочестотни електромагнитни полета. В последно време те вече се третират като екологичен фактор. Това повдига въпроса относно тяхното биомедицинско значение и потенциалните рискове от облъчване. Досега са доказани ефекти на тези полета, свързани с покачване на температурата в облъчвания обект и те не подлежат на съмнение. Все още остава открит въпросът по отношение на т. нар. "специфични" или нетемпературни ефекти. Има редица експериментални и моделни проучвания, както и няколко хипотези, касаещи механизма на взаимодействие на високочестотните електромагнитни полета с живата тъкан на различни нива. Електромагнитни полета с честота 2.45 GHz имат широко приложение в бита (вулканизация на каучук, хранително-вкусова промишленост) и медицината, като тази честота е забранена за използване в комуникациите с цел избягване на зашумяване.

Предмет на настоящия дисертационен труд е изследване на влиянието на електромагнитно поле с честота 2.45 GHz върху процеса на развитие на умора в изолирано мускулно влакно, влиянието на същото поле върху активността на ацетилхолинестеразата, както и на конформацията на общото белтъчно съдържимо в скелетен мускул от жаба (*Rana ridibunda*). С тези изследвания е направен опит за изясняване на т. нар. "**нетемпературни**" ефекти на високочестотните електромагнитни полета с нисък и висок интензитет.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата работа е да се изследва **специфичния (нетемпературен)** ефект (ако има такъв) на високочестотно електромагнитно поле (2,45 GHz) върху електрическата, механическа, ензимна активност и конформацията на белтъците в скелетен мускул от жаба.

За реализиране на тази цел си поставихме следните задачи:

1. Създаване на екпериментален модел и изготвяне на протокол за развитие на умора на необлъчени и облъчени изолирани мускулни влакна и определяне на параметрите на регистрираните потенциали, чиито промени ще служат като критерии за оценка на умората •

2. Проверяване на влиянието на микровълново поле (2,45 GHz) върху изолирани мускулни влакна в условия на продължителна активност:

a) Изследване на амплитудните и времевите характеристики на вътре- и извънклетъчните потенциали при настъпване и развитие на умора в изолирани облъчени и необлъчени бавно- и бързоуморяеми мускулни влакна от жаба в резултат на продължителна стимулация.

6) Изследване времевите характеристики на мускулното съкращение при същите условия;

в) Изследване честотните характеристики на потенциалите чрез три различни метода за анализ при настъпване на умора.

3. Съчетаване на електрофизиологичните изследвания с допълнителни методи за изясняване на евентуалния механизъм на специфичното (нетемпературно) действие на електромагнитно поле с честота 2.45 GHz и мощности 10 и 20 mW/cm² върху жабешки скелетен мускул като:

a) Изследване активността на езима Ацетилхолинестераза при облъчени и необлъчени фракции с различни стойности на погълната мощност (specific absorbtion rate, SAR) на скелетни мускули.

б) Проследяване активността на анзима Ацетилхолинестераза на 24^{-ия} и 48^{-ия} час след облъчването, с оглед определяне наличието на продължителен ефект на електромагнитно поле с честота 2.45 GHz и мощности 10 и 20 mW/cm².

в) Изследване на белтъчната конформация в лиофилизат от фракциите с двете различни стойности на SAR на общ белтък от скелетни мускули (облъчени и необлъчени) чрез инфрачервена спектроскопия.

Изброените задачи изискваха усвояването и прилагането на значителен брой методи за вътре- (микроелектродна техника) и извънклетъчна регистрация на електрическата активност, механическа активност, различни подходи за изследване на честотните характеристики на потенциалите (бърза Фурие трансформация (Fast Fourier Transform, FFT), медианна честота (MDF), спектрални индекси и Уейвлет анализ), създаване на модел за пресмятане на погълнатата мощност от електромагнитно поле (SAR), модифицирания метод на Elman и сътр. (1961) за изследване на Ацетилхолинестеразната (AChE) активност на различни фракции от хомогенат на скелетен мускул, инфрачервена спектроскопия (FTIRS) за определяне конформациата на общия белтък на изследвания субстрат и редица най-съвременни статистически методи за анализ на резултатите. Изборът за изследване ефектите на МВП върху скелетен мускул от жаба не бе случаен, а произтича от факта, че от години с него се експериментира в различни аспекти в нашата секция. Това ни дава обоснована база за сравнение на новите резултати с вече доказани знания за този обект.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

I. Електрофизиологични изследвания.

1 Обект на изследване – изолирани скелетномускулни влакна от жаба.

Под бинокулярна лупа се отпрепарираше снопче (ламбо) от мускулни влакна от *m. gastrocnemius* на *Rana ridibunda* със средно тегло около 25 гр.

2. Експериментална процедура.

2.1. Извънклетъчна стимулация за предизвикване на активност на мускулните влакна.

Препаратът се преместваше в камера с двойни стени, между които циркулира течност с температура, позволяваща да се подържа 18° – 20° С на Рингеровия разтвор в камерата. Препаратът се поставяше в камерата хоризонтално. За предизвикване на активност на мускулните влакна беше прилагана извънклетъчна електрическа стимулация С правоъгълен електрически импулс с продължителност 0.5 – 1 ms и надпрагов интензитет, предизвикващ активиране на едно влакно. Стимулът се подаваше чрез биполярен електрод, състоящ се от два сребърни проводника. Стимулацията беше извършвана с функционален генератор (Anapulse stimulator, 302-T, WP Instrument Inc.) СЪС стимулационна изолираща приставка (модел 305-1, WP Instrument Inc.). След определяне надпраговия интензитет, предизвикващ активността само на едно влакно и максимално съкращение при предварително определена дължина на препарата, се пристъпваше към прилагане на различните протоколи за предизвикване на умора чрез продължителна стимулация на облъчени и необлъчени влакна.

3. Методи за регистрация на предизвиканата активност

3.1. Регистриране на механична активност.

Механичната активност на изолираните мускулни влакна – механограма на единично съкращение (туич, Tw) беше регистрирана чрез силов преобразувател и тензомост (5 kHz носеща честота на усилвател KWS 3082A, Hottinger Baldwin Messtechnik) при търсене на максимален Tw чрез промяна на дължината на изследваното влакно. Бяха изследвани

промените в параметрите на механограмите в непрекъснат запис по време на продължителна стимулация на влакното с честота 5 Hz.

3.2. Микроелектродна техника за регистрация на вътреклетъчни акционни потенциали (ВАПи).

Регистрацията на ВАП беше осъществявана под котрол с бинокулярна лупа чрез микроелектроди от пирексово стъкло с диаметър на върха 1 μ m и съпротивление 15 – 20 М Ω , запълнени с 3М KCl и свързани със записваща система (705 Microprobe system, USA) чрез Ag/AgCl₂ електрод.

3.3. Регистрация на извънклетъчни акционни потенциали (ИАПи).

ИАПи бяха регистрирани чрез чифтен електрод, състоящ се от два монополярни волфрамови електрода, със стъклена изолация и с общ референтен (сребърен или агарагаров) електрод, потопен в разтвора в камерата. При регистрацията на ИАП електродите бяха ориентирани успоредно на оста на мускулното влакно на достатъчно голямо отстояние от края на влакното и от стимулиращия електрод, при което ИАПи бяха предимно двуфазни (позитивен и негативен максимуми) със слабо изразена втора позитивна фаза предвид температурата в камерата по време на експериментите (18°С). Анализираните в настоящата работа ИАПи бяха регистрирани от електроди позиционирани на близко до мембраната отстояние (50 µm), което е от съществено значение при интерпретацията на формата на потенциалите. Преди започване на записа задължително условие беше да се постигне стимулация само на едно влакно от цялото ламбо.

4. Умора след облъчване с високоинтензивно (20 mW/cm²) непрекъснато електромагнитно поле.

Беше прилагана продължителна електрическа стимулация с честота 5 Hz (200 ms междуимпулсен интервал) с надпрагов интензитет.

Отпрепарираха се две ламба с тегло около 25 mg и се поставяха в Петриеви панички с 28 мм диаметър, изпълнени с 4 – 5 ml Рингеров разтвор до покриване на влакната. Тези количествени стойности се ползваха при изчисляване на специфичната абсорбционна стойност (SAR) на обекта след прилагане на полето. Едното от ламбата се облъчваше в продължение на 60 min с МВП с честота 2.45 GHz и мощност 20 mW/cm², докато второто престояваше също 60 min, без да бъде облъчвано (контрола) като и двете бяха на стайна температура. Източникът на полето е апарат Луч 2 (СССР). Мощността на МВП се измерваше с RAHAM-495/GMWC (USA). След процедурата на престояване без облъчване в една част от експериментите, които педставляваха контроли съответното ламбо се преместваше в камера, където Рингеровият разствор беше с температура 18°С и се прилагаше стимулация и регистрация на потенциалите до отказ на отговор, а в друга серия експерименти тази процедура се повтаряше с вече облъчените ламба.

5. Анализ на амплитудни и времеви параметри на регистрираните сигнали.

Праметрите на всички регистрирани сигнали се анализираха само в периода на непрекъсната активност, наречен Endurance Time (ET).

5.1. Анализирани параметри на механограмата.

Съкращението (туича) на мускулните влакна оценявахме със следните параметри: промяна на амплитудата (силата) на съкращение- туич форс (ΔTwF); промяна на времето на контракция (ΔCT) - интервала между началото на възходящата фаза и пика на съкращението; промяна на половината от времето на релаксация (ΔHRT) – времевия интервал между пика на съкращението и низходящата му фаза на ниво 50% от TwF.

5.2. Анализирани амплитудни и времеви параметри на ВАП.

Измерваните параметри на регистрираните ВАПи бяха: амплитуда (A) – разстоянието от пика на деполяризационната фаза на потенциала до базовата линия, както и нормализираната промяна на амплитудата; времевия интервал между възходящата фаза на потенциала, измерена на ниво 10% от A и пика на деполяризационната фаза (Rt), както и нормализирната промяна на Rt; амплитуда на отрицателния следови потенциал (NAP) – амплитуда между първия минимум на реполяризационната фаза и базовата фаза, като времето от този момент до началото на фронта на деполяризационната фаза, измерен на ниво 10 % от A на потенциала беше взето за времеви прозорец (w), в който се измерваше амплитудата на NAP на следващите потенциали.

5.3. Анализирани амплитудни и времеви параметри на ИАП.

Измерваните параметри са: амплитуда (А) от пик до пик на ИАП и времеви интервали: между позитивния и негативния максимум на потенциала (T₁), и между пресечените точки на възходящия и низходящия фронтове на негативната фаза с базовата линия (T₀), както и нормализираната промяна на тези параметри.

5.4. Анализ на скоростта на провеждане на възбуждението (PV) по мускулните влакна.

Скоростта на разпространение на възбуждането (propagation velocity, PV) беше изчислявана, като фиксираното междуелектродното разстояние (d) на регистриращите извънклетъчни електроди се разделяше на времевия интервал (t) между максимумите на негативните фази на двата ИАП или между пресечните точки на възходящите фази на двата потенциала с базовата линия. Чрез клъстер анализ на базата на нормализирната промяна на PV по мускулните влакна, те бяха разделени на бавноуморяеми и бързоуморяеми влакна.

6. Анализ на честотни характеристики на ВАП и ИАП.

6.1. Анализ на промяната на спектралната плътност, предизвикана от микровълново електромагнитно поле (МВП).

Беше приложен честотен анализ на спектъра на записаните ВАПи и ИАПи по време на продължителната активност от изолираните мускулни влакна, чрез бърза Фурие трансформация (Fast Fourier Transform, FFT).

6.2. Анализ на промяната на медианната честота (MDF), предизвикана от MB електромагнитно поле.

На база на пресметнатата чрез FFT спектрална плътност беше изчислена медианната честота (MDF) на ИАПи. Периодът на непрекъсната активност (ET) на всяко влакно беше приет за 100%, а той от своя страна разделен на 4 равни интервала (25%, 50%, 75% и 100 % от ET).

6.3. Уейвлет анализ.

Беше избрана Daubechies 5 уейвлет функция поради това, че най-добре се припокриваше с формата на изследваните от нас потенциали. Беше направено сравнение на този вид уейвлет с други уейвлет функции с подобна асиметрична форма, като Dubechies 5 уейвлет функцията даде най-добър корелационен коефициент (R²=0.851), с изследваните от нас параметри на ВАП и ИАПи.

Беше направена декомпозиция до пето ниво на декомпозиционното дърво, тъй като следващото шесто ниво (честотна лента между 12.22 и 23.94 Нz за ВАП и 30.9 и 61.28 Hz за ИАП) обхваща пренебрежимо малка част от честотното съдържание на тези потенциали.

Направихме средноквадратичен (root mean squire, RMS) анализ на уейвлет коефициентите във всяка скала за количествено представяне на данните при развитието на процеса на умора. Тук представяме две от изчислените пет скали, а именно скала 1 – с най-високочестотно съдържание (988.5 – 1977 Нz), и скала 5 – с най-нискочестотно

съдържание (61.78125 – 122.562 Hz) като най-показателни за наблюдаваните промени. Обхвата на честотните ленти в различните скали на декомпозиция беше изчислен спрямо централната честота на приложените уейвлет функции и спрямо честотното съдържание на изследваните потенциали. Беше направен корелационен анализ между Δ Rt и Δ RMS коефициентите в скала 1 за ВАПи, както и между Δ T₁ и Δ RMS коефициентите в скала 1 за ИАПи.

6.4. Спектрални индекси.

За анализ на честотните характеристики на ИАПи бяха приложени четири спектрални индекса, изчислени на базата на целия спектър на потенциала на принципа на FFT. Отделните индекси се различават по техния нормализиращ спектрален момент от k-ти ред. Изчисляват се по следния начин:

$$FI_{nmsk} = \frac{\int_{f_1}^{f_2} f^{-1} \cdot PS(f) \cdot df}{\int_{f_1}^{f_2} f^k \cdot PS(f) \cdot df}$$

където PS(f) е спектралната мощност за текущата честота f. Порядъкът на спектралния момент k е 2, 3, 4, и 5; f₁ и f₂ са граничните честоти (най-ниската и най-високата) за спектралната мощност. За да се проследи развитието на процеса на умора, промените на спектралните индекси са нормализирани към началната стойност на непрекъснатата активност.

7. Класификация на изследваните мускулни влакна.

Двата типа мускулни влакна при регистриране на ИАПи бяха разграничени на базата на скоростта на намаляване на PV в края на периода на непрекъснатата активност. За идентифициране на мускулните влакна беше приложен клъстерен анализ, базиран на йерархичен алгоритъм като мултивариативна процедура за определяне на естествено групиране на данни. Класификацията чрез клъстерен анализ се базира на разполагането на обекти в хомогенни групи, така че се изявяват взаимоотношенията между групите. Хомогенните и различими групи се очертават чрез определяне на разстоянията между тях. Чрез такъв клъстерен анализ изследваните мускулни влакна бяха класифицирани условно на две групи: бавноуморяеми (SMF) – с по-бавна скорост на намаляване на PV и бързоуморяеми (FMF) – с по-голяма скорост на намаляване на PV.

Класификацията на влакната, от които бяха регистрирани ВАПи беше направена на базата на продължителността на ЕТ, поради невъзможността за изчисляване на РV от един потенциал – къс ЕТ при FMF (средно 60 s) и по-продължителен ЕТ при SMF.

8. Статистически анализ на получените данни.

Статистическият анализ на получените данни беше направен с пакетите Statistica 6.0, SPSS 13.0, Origin 6.5., Matlab 6.5. Данните бяха представени като средна стойност ± стандартна грешка (SEM) или средна стойност ± стандартно отклонение (SD).

Kolmogorov-Smirnov тест беше използван за определяне на разпределението на резултатите. Тестът показа, че данните при изследваните влакна за амплитудни и времеви параметри са нормално разпределени, докато при тези, изследвани в честотната област нямат нормално разпределение. По тази причина за първата група използвахме непараметричен тест за две независими извадки – Mann-Whitney U тест, а за втората изполозвахме Kruskal-Wallis анализ на вариантите за k-независими проби, за да установим значимостта на разликите в наблюдаваните параметри (контрола и облъчени влакна, както и SMF и FMF).

II. Изследване на активността на мускулната ацетилхолинестераза (AChE).

1. Обект и метод на изследване.

Напречно набраздени мускули от зимни или летни жаби Rana ridibunda бяха хомогенизирани в 0.5 M Na/P буфер с pH 7.6 за около 1 – 1.5 min и хомогенатът беше центрофугиран за 15 min на 900 g (3600 об/мин) на 4° С и след това на 9600 g (12000 об/мин) за 30 min. Бяха използвани и двете фракции в две отделни серии експерименти. Тези фракции разпределяхме на равни количества от по 15 ml, поставени в две Петриеви панички. На стайна температура, в различните серии експерименти, едното от петритата беше облъчвано в продължение на 30 мин с ниско - (10 mW/cm²) или високоинтензивно (20 mW/cm²) МВП (2.45 GHz), а другото за същото това време престояваше също 30 мин. достатъчно отдалечено от микровълновия излъчвател и представляваше контролната проба. И двете панички през това време бяха поставени върху лед, за да се контролира разликата в температурата на облъчена и необлъчена проба. Тя беше от порядъка на 0.02° по-висока при облъчените. Активността на AChE се определяше чрез модифициран метод на Elman и сътр. (1961). Беше използван L-цистеин за получаване на стандартната белтъчна крива. Екстинцията беше измервана от спектрофотометър при дължина на вълната λ=412 nm. Средното количество белтък се определяше чрез класически фосфомолибденов спектрофотометричен метод на SPECOL (Lowry, 1951). Ензимната активност беше определяна, използвайки моларен екстинционен коефициент за 5,5'дитио-бис-2-нитробензоена киселина (ДТНБ). Ацетил-тио-холин-йодид (Acetyl-tio-cholinejodide, ATChJ) беше използван вместо ацетилхолина като субстрат на AChE. Реакцията беше спирана с езерин. Активността на AChE се изразява като µmol хидролизиран ATChJ/mg протеин/min.

Активността на AChE беше измервана веднага след облъчването, а за изследване остатъчния ефект на облъчването активността на AChE в същите проби (съхранявани в хладилник) се измерваше на следващите два дни, т.е. 24 часа след облъчването и 48 часа след облъчването.

2. Статистически анализ.

Kolmogorov-Smirnov тест беше използван за определяне на разпределението на резултатите. Данните показаха нормално разпределение. Те бяха представени като средна стойност ± стандартно отклонение (SD). Беше приложена one-way ANOVA за установяване на статистическата значимост на различията в активността на ензима при облъчените и необлъчените проби, проследени непосредствено след облъчването, на 24^{-ия} и 48^{-ия} час от него.

III. Изследване на промяната на вторичната белтъчна структура в "груба" мембранна фракция (с и без митохондрии).

1. Обект и метод на изследване.

По 10 ml от "грубите" мембранни фракции с митохондрии и с отделени такива след облъчване, както и от контролните им проби, бяха лиофилизирани на USIFROID SMH50 за 42 - 44 часа при температура 45° С и налягане 180 µBar. Получените лиофилизати бяха подложени на анализ чрез Фурие трансформационна инфрачервена спектроскопия (FTIRS) за измерване на конформационните промени в белтъците в резултат на облъчването.

FTIRS беше направена в три повторения на проба от всичките проби в KBr таблетки в интервал на поглъщане $1800 - 1400 \text{ cm}^{-1} \text{ с}$ точност $0.1 - 0.2 \text{ cm}^{-1} \text{ с}$ апарат Bruker IFS 113 v.

2. Обработка и статистически анализ на получените данни.

Структурна информация и количествен анализ на съдържащите се в белтъците вторични структури се получава чрез разлагане на Амид I и Амид II ивиците, в интервала 1800 сm⁻¹ – 1400 cm⁻¹, по метода на Arrondo и сътр. (1993, 1999). Процедурата се базира на приближение на кривата на инфрачервения спектър и декомпозирането на нейните съставки в рамките на ивиците Амид I и Амид II. Първата стъпка е оценяване на броя и позицията на характеристичните рамена и пикове, както и груба оценка на тяхната форма (ширина и височина). Тази операция е необходима за стартиране на итерационната процедура с Гаусови функции. След това се определя площта им. Итеративната процедура за изчисляване на площта под характеристичните рамена и пикове беше направена с код на МАТLAB. Данните за изменението на вторичните белтъчни структури бяха представени като средна стойност ± стандартно отклонение (SD). Беше приложена опе-way ANOVA за установяване на статистическата значимост на различията между облъчени с ниско- и високо-интензивното поле и необлъчени проби и при двете фракции.

IV. Изчисляване на погълнатата мощност (specific absorption rate, SAR).

Моделът за изчисляване на SAR в нашите обекти се основава на оценката на енергията на конусовидния поток от магнитна енергия, чиито връх се намира в амплитудния център през плоска равнина. Хомогенно електрично поле представя потока в конуса. Средният SAR се изчислява като отношение между общата абсорбирана енергия в облъчвания обект (E_L) и неговата маса (m_L) по следната формула:

$$SAR = \frac{E_L}{m_L}$$

Енергията се определя от плътностите на електричните компоненти на генерираното електромагнитно поле и от характеристиките на параметрите на обекта, подложен на облъчване: тегло, цилиндричен пръстен – стените на Петриевата паничка; диск – основата на петрито; правоъгълник – мускулното ламбо. При изследване на фракциите от хомогената се включва плътността на съответната фракция. При електрофизиологичните експерименти мускулното ламбо се приема като "дефект", който нарушава хомогенността на системата пръстен - диск, заради дифракционните си свойства и малкия си размер. Приема се, че системата е съставена от елементи, които могат да се приемат за елементи на диполна приемаща антена, която е неселективна и променя хомогенността на енергийния поток.

Стойностите на погълнатите мощнности в различните препарати бяха различни както следва: за препаратите от мускулно ламбо и облъчване с ЕМП с мощност 20 mW/cm² – SAR = 0.06 mW/mg; за фракцията без отстранени митохондрии – при полето с мощност 10 mW/cm² беше 4.92 mW/mg, при полето с мощност 20 mW/cm² – 9.83 mW/mg, а; за фракцията с отстранени митохондрии тези стойности бяха съответно 5.08 и 10.2 mW/mg.

РЕЗУЛТАТИ

Резултатите от промените в амплитудните, времевите и честотни параметри на потенциалите от мускулни влакна сравнявахме между облъчени с необлъчени такива.

I. Електрофизиологични изследвания.

1. Влияние на микровълновото поле върху механичната активност на мускулните влакна.

Влиянието на стимулацията, предизвикваща умора, и на облъчването с МВП беше оценявано чрез сравняване на промените на амплитудата на мускулното съкращение, както и чрез сравняване на времето на съкращение и на релаксация за периода на непрекъснатата активност на едно влакно (фиг. 1). След бързото и по-голямо намаляване на нормализираната амплитуда на съкращение при облъчените влакна в първите 5 s на експеримента в следващите 15 s наблюдавахме нарастване и последващо постепенно намаляване до 80-тата s от активността, но по-забавено в тази група влакна в сравнение с необлъчените, след което промените се уеднаквяваха за двете групи влакна. Времето на мускулна контракция (contraction time, CT) след облъчване е значително по-кратко още в началото (11%) в сравнение с контролната група и оставаше такова до края на ET. Наблюдавахме значително по-кратко релаксационно време (HRT) при облъчените влакна.



Фиг.1. Пример за механична активност на изолирано мускулно влакно необлъчено и след облъчване с МВП при стимулиране с интервал между стимулите (inter-stimulus interval, ISI) 200 ms – лява колона; механични съкращения изведени на всеки 5 s – средна колона; скорост на промяна на времевите параметри на механичните съкращения, n=20.

2. Влияние на микровълновото поле върху амплитудни и времеви параметри на електричната активност на изолирано влакно от жабешки мускул.

2.1. Влияние на МВП върху изследваните амплитудни и времеви параметри на вътреклетъчните акционни потенциали (ВАПи).

Параметрите на ВАП бяха анализирани в рамките на 60 s период на непрекъсната активност (ЕТ) който беше значително скъсен в сравнение на този при регистрация на извънклетъчните потенциали, поради нарушаването на интактността на влакната и поради наличието на 270 mM захароза в разтвора за блокиране на съкращението.

Моделът на непрекъсната активност след облъчване с МВП се характеризира с по-високи начални амплитуди и по-слабо намаляване на амплитуда на вътреклетъчния потенциал за периода на анализ (фиг. 2, ляво). Бяха изчислени измененията на амлитудния (А) и времеви (Rt) параметри на ВАП, както и промяната на мембранния потенциал (фиг. 2, дясно). При облъчените влакна наблюдавахме по-слаби промени на тези параметри, но без наличие на статистически значима разлика между тях и необлъчените такива.



Фиг.2. Пример за непрекъснат запис на ВАПи на изолирано мускулно влакно необлъчено и след облъчване с МВП при стимулиране с ISI 200 ms – лява колона; ВАПи изведени на всеки 10 s – средна колона; скорост на промяна на времевите параметри на ВАПи, n=8

2.2. Влияние на МВП върху изследваните амплитудни и времеви параметри на извънклетъчните акционни потенциали (ИАПи)

Типът на изследваните влакна беше разграничен чрез клъстерен анализ на скоростта на провеждане на възбуждението. Поради значително по-дългият период на непрекъсната активност на бавните влакна, позволяващ по-пълно проследяване ефекта на облъчването, представяме извадка от непрекъснатия запис само за бавно уморяемите влакна (Фиг.3, ляво). Средната амплитуда при ИАПи след облъчване е по-висока с 44% в първата половина от времето на активност в сравнение с необлъчените влакна. Времевият интервал между положителния и отрицателния максимум на ИАПи (T_1) и продължителността на отрицателната фаза (T_0) са по-кратки при

облъчените влакна, но със статистически значима разлика само за T₁ в първата половина на активността на влакното (фиг. 3).



Фиг. 3. Пример за непрекъсната активност (ИАПи) на изолирано мускулно влакно необлъчено и след облъчване с МВП, след стимулиране с ISI 200 ms – лява колона; ИАПи изведени на всеки 30 s – средна колона; Времеви параметри на ВАП, изчислени на всеки 30 s, n=23

Непрекъснатата стимулация, предизвика преходни промени в генерирането и провеждането на АП, като тези промени бяха по-слаби при влакната, облъчени предварително с ЕМП с мощност 20 mW/cm² и честота 2.45 GHz. Критерии за оценка на промененото функционално състояние на мускулните влакна, бяха измененията на амплитудните и времеви параметри на ВАПи, ИАПи и Тwu, както и допълнително честотните характеристики, оценени чрез различни методи на промяната на честотното съдържание на ВАПи и ИАПи.

Познаването на факторите, повлияващи параметрите на ИАП на единичните влакна, прави възможна по-прецизната интерпретация на измененията на функционалното състояние на двигателната единица при патологични състояния с нарушение в йонната проводимост на мембраната. При нашите експериметни, в резултат от облъчването с ЕМП, параметрите на ИАПи се повлияха в посока на намаляване и забавяне на умората, като това би могло да е свързано с влиянието на това поле върху мембранни йонни канали и транспортни белтъци. Може да се предполага, че повлияването на полето върху тези мембранни белтъчни структури е в посока към стабилизиране на активните им центрове, като се имат пред вид и резултатите от влиянието на полето върху активността на AChEта и белтъчната конформация от жабешки скелетен мускул.

Опитите с ИАПи, регистрирани в нормотоничен разтвор и отразяващи промените на ВАПи, представляваха по-голяма част от изследването. Получените резултати за ВАП и Тw са с потвърдителен характер и допринасят за по-обоснована интерпретация на настъпилите мембранни промени при умора и тези, свързани с облъчване с МВП преди стимулация.

3 Изследване на промените в честотните характеристики на ВАП и ИАП по време на продължителна активност посредством различни методи за анализ.

3.1. Изменения на спектралната плътност на ВАПи и ИАПи, регистрирани от облъчени и необлъчени мускулни влакна, изчислена чрез бърза Фурие трансформация (FFT).

Измененията на спектралната плътност на ВАПи и ИАПи от облъчени и необлъчени влакна са регистрирани чрез FFT за първи и последен АП от непрекъснатата активност на влакната. Наблюдава се характерно намаляване на високите честоти, и увеличаване на съдържанието на ниските такива при последния потенциал (фиг. 4), като това изместване е по-изразено при необлъчените влакна за ВАПи, както и за ИАПи.



Фиг. 4. Сравняване на спектралната плътност на ВАПи (ляв панел), необлъчени и облъчени влакна (първи и последен потенциал). Десен панел – сравняване на спектралната плътност при ИАПи.

3.2. Промени в медианната честота (MDF) на ИАПи, регистрирани от облъчени и необлъчени мускулни влакна, изчислени на базата на FFT.

Приехме ЕТ на всички влакна за 100% и разделихме на 4 равни периода от общата активност на влакното (25%, 50%, 75% и 100%). Степента на промяна на MDF и на нормализираната MDF (ΔMDF) беше по-висока при необлъчените влакна, както при бързотака и при бавно-уморяемите мускулни влакна в сравнение с тези при облъчените с МВП (фиг. 5).

Разликата между тях е статистически значима на 75% и 100% от ЕТ на мускулните влакна. MDF е показателна за изместване на спектралната мощност на потенциалите към нискочестотния спектър с развитието на процеса на умора.







Фиг. 5. Промени в средната MDF (горен панел) и нормализираните промени в MDF за анализираните потенциали (долен панел) (ЕТ е нормализиран към 100% и е разделен на четири равни интервала). Необлъчените и облъчени SMF n=15 и n=12 за FMF – необлъчени и облъчени. Звездичките показват статистически значима разлика между групите (необлъчени и облъчени влакна). *p<0.05.

Промените в изследваните спектрални параметри и за двата типа влакна се различават в малък диапазон (7.5 – 10%). И за двата типа влакна статистически значима разлика между необлъчените и облъчените такива в промените на MDF и MDF при ИАП се появява на 75% и на 100% от ET.

3.3. Промени в честотните характеристики на ИАПи, регистрирани от облъчени и необлъчени мускулни влакна установени чрез използуването на спектрални индекси.

Стойностите на нормализираните изменения в спектъра на потенциалите, изчислени със спектрални индекси се увеличават по време на непрекъснатата активност и за двата типа мускулни влакна при необлъчени и облъчени влакна (фиг. 6). Нарастването става все поголямо с развитието на процеса на умора (до края на ET), което прави зависимостите нелинейни. Отклонението към нелинейност е по-изразено за необлъчените влакна в сравнение с облъчените такива (фиг. 6). Колкото степента на знаменателя на индекса е по-висока (момент на – k от 2 до 5), толкова по-рано се наблюдават статистически значими разлики, което зависи и от типа на влакната (по-рано при бързоуморяемите – от 50% до 100% ЕТ за индекси 4 и 5 и от 75% до 100% ЕТ - за бавноуморяемите).



Фиг. 6. Промени в спектралните индекси за k=2, 3, 4 и 5, изчислени за ИАПи, за които е изчислена и MDF. Обозначенията са същите, като на фиг. 7, като кръстчетата означават статистически значима разлика между стойностите за FMF и SMF. *, +p<0.005; **, ++p<0.01; ***, +++p<0.0001.

3.4. Приложение на уейвлет анализ върху честотните характеристики на ИАПи, регистрирани при нормални условия и след облъчване с МВП по време на продължителна активност.

Изчислените уейвлет коефициенти (фиг. 7) илюстрираха намаляване на високочестотните компоненти, които корелират с увеличаване на времевите параметри на ИАП (главно в T_1 фазата, фиг. 7). Най-долу (скала 5) на фигурата се наблюдава увеличаване на ниските честоти при всичките 4 условия на експериментите. Уейвлет коефициентите са усреднени за всички анализирани потенциали (n=15 за бавноуморяемите влакна в двата варианта на експеримента – облъчени и необлъчени влакна и по n=12 за бързоуморяемите съответно). Промените са по-изразени при изследваните ИАПи от бързоуморяемите влакна в сравнение с тези от бавноуморяемите, както и за необлъчените в сравнение с облъчените с МВП.

Стойностите на RMS анализа на уейвлет коефициентите са представени на фиг. 8. Наблюдаваше се статистически значимо намаляване на тези коефициенти във високочестотната скала (скала 1), както и увеличението им в нискочестотната скала (скала 5). В скала 1 процентното намаляване на RMS коефициентите и при двата вида влакна беше по-изразено при необлъчените влакна в сравнение с облъчените (81.25% спрямо 29.7% за бавно-уморяемите и 99.56% спрямо 33.08% за бързо-уморяемите). Тези промени зависят и от типа на влакната – по-изразени за бързоуморяемите влакна в сравнение с бавноуморяемите. Наблюдавахме статистически значима разлика между спектрите при необлъчните и облъчени влакна за бързоуморяемите по-рано (на 25% от ET), и за бавноуморяемите по-късно (на 50% от ET). Стойностите на RMS коефициенти в нискочестотната скала (скала 5) нарастват при контролата и за двата типа мускулни влакна (за бързоуморяемите по-рязко с 545.46% спрямо 327.28% за бавноуморяемите) с поява на статистически значима разлика между облъчени и контрола на 25% и 50% от ЕТ съответно. Статистически значима разлика се наблюдава между контролата на бавно- и бързоуморяемите влакна на 100% от времето на активност, като промените при бързоуморяемите влакна са по-изразени, което е и очаквано. Сравнявайки промените на тези коефициенти при облъчените влакна показват изключение – при бавноуморяемите промяната RMS коефициентите е по-голяма (236.37%) в края на ЕТ от тази при бързоуморяемите (145.46%). Тези разлики са статистически значими и са обозначени с +

на фиг. 8, скала 5. Най-вероятно това се дължи на значително по-продължителния ЕТ при бавноуморяемите влакна.



Фиг. 7. Горни трасета – първи и последен ИАП по време на непрекъснатата активност и при двата експериментални протокола (без облъчване и облъчване с МВП) на SMF и FMF. Средните и долните трасета са съответно уейвлет коефициентите от скала 1 (високочестотна) и скала 5 (нискочестотна).



Фиг. 8. Промени в усреднените и нормализирани коефициенти, изчислени чрез RMS анализ на уейвлет коефициентите на ИАПи по време на непрекъснатата активност (ЕТ е разделен на 4 равни времеви интервали). n = 15 за SMF, n= 12 за FMF. Звездичките показват статистически значима разлика между стойностите на коефициентите на необлъчените и съответните облъчени влакна в скали 1 и 5; символът + показва статистически значими разлики между стойностите на коефициентите при SMF и FMF потенциалите в нискочестотната скала (скала 5). +*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Поради наблюдаваната връзка между намаляването и времевото разположение на високочестотните компонента (фиг. 7) и времевия параметър на ИАП Т₁ с развитие на умората, ние потърсихме връзка между промените на ΔRMS коефициентите в скала 1 и ΔT_1 . В края на ЕТ $\Delta T1$ нараства както следва: за бавноуморяемите влакна – при необлъчените с 44%, при облъчените с 33%; за бързоуморяемите – необлъчени – 52%, облъчени – 41%. Използувайки локална линейна регресия за корелационния анализ беше установено, че стойностите на ΔRMS коефициентите показват близка корелация с тези на ΔT_1 (фиг. 9). Степента на промяна е по-голяма при бързоуморяемите влакна и за двете групи (контрола и облъчени влакна) в сравнение с бавноуморяемите такива. Същото важи сравнавайки резултатите от потенциалите на необлъчени и облъчени с MBП влакна.

SMF

FMF



Фиг. 9. Корелация между средните нормализирани стойности на RMS уейвлет коефициентите в честотна скала 1 и тези на времевия интервал между отрицателния и положителния максимум на ИАП (Δ T1) на необлъчени и облъчени SMF и FMF мускулни влакна. у описва линейното уравнение на апроксимиращите прави. Сf е коефициента на корелация, който дава степента на корелиране между двата параметъра.

Съществуват редица индекси, създадени с цел определянето на развитието на умора, както във времевия, така и в честотния домен. Досега, обаче няма универсален индекс за умора, който да се прилага с еднакъв успех в различните ситуации. Недостатъкът на горепосочените честотни показатели е, че информацията във времевия диапазон практически изчезва, т.е. извлича се честотната информация в целия изследван времеви диапазон. Уейвлет анализът декомпозира сигнала на неговите компонентни скали, които съдържат съответни честотни ленти, като във всяка скала може да се наблюдава промяната на това честотно съдържание във времето. Тази особеност дава едновременен достъп до честотния и времевия диапазон на сигнала.

В нашето проучване приложихме трите различни честотни метода (определяне на MDF, уейвлет анализ (Daubeshies 5 уейвлет) и спектрални индекси (k= 2, 3, 4, 5)) за оценка на периферна умора от изолирани бързо- и бавноуморяеми мускулни влакна от *m. gastrocnemius* от *Rana ridibunda.*

При наблюдението на уейвлет скалите при нашата уейвлет декомпозиция се вижда, че честотите от най-високочестотната скала се намират във фазата на деполяризация при ВАП и ИАП и съдържанието им намалява с настъпването и развитието на умора, като в същото време се наблюдава увеличаване на честотното съдържание при нискочестотните скали.

Наблюдаваното изместване на честотното съдържание на потенциали към по-ниските честоти при продължителна активност беше зависимо от типа на влакната и от протокола на експеримента. Началото на промяна на честотите към по-ниски е по-ранно при необлъчените влакна отколкото при облъчените такива при всички приложени честотни методи и най-вече при уейвлет анализа, Освен това промяната на честотното съдържание, показващо умора е по-силно изразено при необлъчените влакна, отколкото при предварително облъчените такива, което ясно може да се види при прилагане на.Daubechies 5 дискретен уейвлет анализ. (DWT) и честотните индекси, като при тях чувствителността е най-висока при индекс със степен на знаменателя 5. Предимството на уейвлет анализът е възможността да се наблюдава времето в развитието на АП, при което са налични съответните честоти, както и тяхната промяна с развитието на умора.

II. Изследване на ефекта на МВП върху активността на ензима Ацетилхолинестераза (AChE) във фракции от скелетно мускулен хомогенат

За изпълнение на третата задача изледвахме активността на мускулната AChE след облъчване с ЕМП за 30 min в две различни мембранни фракции (с митохондрии и с отстранени такива), като проследихме и активността на 24^{-ия} и 48^{-ия} час след облъчването.

1. Изледване на AChEната активност в т.н. "груба мембранна фракция", получена след центрофугиране с 900 g

В деня на облъчване наблюдавахме статистически значимо намаляване на активността на AChE при облъчените проби с ниско- и високоинтензивно (10 mW/cm², 20 mW/cm²). поле, с 13.6% и 8.4% съответно (таблица 1).

Таблица 1 AChE активност (в µmol хидролизиран ATChJ /mg белтък/min) в деня на облъчване; A – 10 mW/cm²; B – 20 mW/cm².

Α		В	
Sham-	Exposed	Sham-	Exposed
exposed	-	exposed	-
9.4±0.0245	8.28±0.24***	7.78±0.03	7.13±0.038*

Стойностите са средноаритметични величини ± SEM, n=24; *означава статистически значими разлики при сравняване на активността на необлъчени и облъчени фракции; p*<0.05, p***<0.001.

Ензимната активност беше изследвана веднага след облъчване с МВП и проследена за остатъчно влияние на полето на 24^{ия} и 48^{ия} час след облъчване (таблица 2). Активностите на 24^{-ия} и 48^{-ия} час са измерени от същите центрофугати в друга серия експерименти, чиято ензимна активност е измерена и в деня на облъчване.

Таблица 2 AChE активност (в µmol хидролизиран ATChJ /mg белтък/min) в деня на облъчване, на 24^{ng} и на 48^{ng} час след облъчването; А – 10 mW/cm²; В – 20 mW/cm².

	Α		В	
	Sham	Exposed	Sham	Exposed
On the day of exposure	13.4±0.09	12.48±0.054**	4.52±0.013	4.22±0.015*
At 24 hours	13.51±0.067	13.64±0.027	4.75±0.013	4.59±0.014
At 48 hours	11.53±0.027	11.93±0.026**	3.55±0.019	3.61±0.013

Стойностите са средноаритметични величини ± SEM, n=8; *означава статистически значими разлики при сравняване на активността на необлъчени и облъчени фракции; p*<0.05, p**<0.01

Значителната разлика в активността на ензима при контролите в началния етап на измерване и последвалите измервания при двата експеримента (облъчени с ниско и високоинтензивно поле) в серията опити с високо интензивно поле вероятно се дължи на вида на използваните жаби (зимни или летни в отделните експерименти), притежаващи различно метаболитно ниво. Летните жаби имат по-високо ниво на метаболизъм и съответно по-висока начална ензимна активност (таблица 2А), в сравнение със зимните такива (таблица 5В). На 24-ия час се наблюдава леко увеличаване (с 0.82% и 5.09%) на AChEта при необлъчените проби и в двата експеримента (таблица 2А, В). Въпреки тяхната различна първоначална активност тенденцията за промяна на активността в сравнение с

предишния ден е почти идентична. Наблюдава се намаляване на ензимната активност при облъчените с ниско и високоинтензивно поле проби с 6.87% и 6.64% съответно в сравнение с необлъчените такива (табл. 2А,В, горе). На 24-ия час този ефект се обръща. Ензимната активност при облъчените проби е по-висока с 9.29% при ниско- и с 8.77% при високоинтензивното МВП в сравнение с активността на предишния ден (табл. 2А, Б, среден ред). На 48^{ия} час ензимната активност в контролите намалява с 13.96% и с 21.46% спрямо активността в деня на облъчване, докато намалението в облъчените проби е доста по-слабо – с 4.41% и 14.46% съответно за ниско- и високоинтензивното поле.

2. Изледване на AChEната активност в "груба мембранна фракция" след отстраняване на митохондриите, т.е. при центофугиране с 9600 g

В деня на облъчване се наблюдаваше статистически значимо нарастване на активността на AChEта при облъчване с поле с мощност 10mW/cm² (таблица 3A) в сравнение с активността на необлъчената група. Обратен резултат се наблюдаваше при облъчване с МВП с мощност от 20 mW/cm² (таблица 3B).

Таблица 3 AChE активност (в µmol хидролизиран ATChJ /mg белтък/min) в деня на облъчване; A – 10 mW/cm²; B – 20 mW/cm².

Α		В	
Sham- exposed	Exposed	Sham- exposed	Exposed
8.9±0.12	9.88±0.15***	5.99±0.03	4.84±0.02***

Стойностите са средноаритметични величини ± SEM, n=12; * означава статистически значими разлики при сравняване на активността на необлъчени и облъчени фракции; p*<0.05, p***<0.001.

В друга серия експерименти беше проследена активността на ензима 24 и 48 часа след облъчване с МВП с двете мощности. При облъчване с поле с ниска мощност (10 mW/cm²) на 24^{ия} час наблюдавахме намаляване на ензимната активност с 10.81% при необлъчените влакна, а при облъчените такива това намаляване е с 10.25% (таблица 4А). На 48^{ия} час тези проценти бяха 21.18% и 25.71% съответно, което доведе до изрявняване на ензимните активности на 48^{ия} час след облъчването при ниския интензитет на облъчване.

Таблица 4 AChE активност (в µmol хидролизиран ATChJ /mg белтък/min) в деня на облъчване, на 24-ия и 48-ия час; А – 10 mW/cm²; В – 20 mW/cm².

	Α		В	
	Sham exposed	Exposed	Sham exposed	Exposed
On the day of exposure	13.996±0.16	14.52±0.26	10.26±0.07	9.28±0.02**
At 24 hours	12.63±0.09	13.17±0.19	10.4±0.2	10.94±0.14
At 48 hours	11.55±0.9	11.55±0.53	9.23±0.03	10.296±0.06*

Стойностите са средноаритметични величини ± SEM, n=8 в деня на облъчване и на 24^{тия} час, и n=4 на 48^{ия} за серия A; * означава статистически значими разлики при сравняване на активността на необлъчени и облъчени фракции; p*<0.05, p***<0.001.

При фракциите, облъчени с МВП с мощност 20 mW/cm² на 24^{ия} час след облъчването се наблюдаваше слабо покачване на активността на AChE при контролата (с 1.34%), без статистически значима разлика и по-сериозно покачване (с 15.17%) при облъчените препарати (таблица 4В). На 48^{-ия} час активността на ензима в контролата беше намаляла с 11.16% в сравнение с тази в деня на облъчване, докато тази при облъчените препарати

все още беше по-висока в сравнение с тази в деня на облъчване (с 9.87%), въпреки лекото понижение в сравнение с тази на 24^{ия} час.

Изследването на две различни фракции бе направено с оглед различния SAR на двата центрофугата, а от там и различното абсорбиране на енергията на съответното ЕМП. Наблюдаваше се промяна в активността на AChEта, което зависеше от мощността на полето, както и от облъчваната фракция и от базовия метаболизъм на изследваните жаби (летни или зимни). При трасирането на активността на ензима в същите препарати на 24^{ия} и на 48^{ия} час също се наблюдаваше специфична промяна в активностите в зависимост от изброените параметри на полето, както и от базовия метаболизъм на изследваните жаби. Наблюдаваните промени в активността на AChEта биха могли да бъдат свързани с промяната в Ca²⁺ обмяна при съкращението на мускулното влакно. Това наше наблюдение е в съгласие с електрофизиологичните екперименти, при които се вижда промяна в амплитудата на мускулното съкращение след облъчване, в сравнение с тази при необлъчените жабешки мускулни влакна.

Интересно наблюдение е, че в деня на облъчване, измервайки активността на AChE веднага след облъчването във всички случаи активността на ензима се понижава, с изключение на грубата мембранна фракция с отстранени митохондрии, където наблюдаваме статистически значимо увеличаване на активността на ензима. Този ефект на облъчването би могъл да се дължи и на стабилизиране на ензимния активен и алостеричен център след облъчване. Тенденцията към 48^{ия} час е постепенно намаляване на активността на AChEta, което най - вероятно се дължи на стареене на ензима, но при всички облъчени фракции тази тенденция е по-слаба, като в последния ден активността му остава по-висока от тази в необлъчените центрофугати. Имайки предвид твърденията, че ЕМПта с различни честоти и мощности достатъчно ниски, че да не причиняват съществено затопляне в облъчваните обекти вероятно повлияват чрез резонансно взаимодействие с вибрационните режими на макромолекулите, можем да предполагаме, че таргета на въздействие на поле с честота 2.45 GHz би могъл да се търси в периферния анионен сайт на ензима, който отговаря за свързването му със субстрата, както и повлиява конформационно активната ароматна цепка на ензима. Повлияването веднага след момента на облъчване е разнопосочно в нашия случай, което най - вероятно се дължи на различните SAR стойности, както и на наличието на т. нар. "интензитетни прозорци". Предположенията за включване на Нур-белтъци, както и за образуване на свободни радикали, които биха могли да повлияят върху активността на ензима според случая не са състоятелни, тъй като не се работеше в интактна клетъчна среда.

III. Изследване на промяна на белтъчна конформация в изследваните за ензимна активност две фракции (при 900 g и 9600 g) на мускулни хомогенати след облъчване с МВП с два интензитета 10 и 20 mW/cm².

За да проверим дали повлияването на облъчването с ЕМП към намаляване на умората в мускулните влакна, както и специфичната промяна на активността на AChEта би могло да се дължи на промяна на белтъчната конформация, използвахме инфрачервена спектроскопия за изследване на вторичната белтъчна структура в общ белтък от жабешки скелетен мускул.

1. Изследване на промяна на белтъчна конформация в "груба мембранна фракция" при 900 g.

Данните от инфрачервената спектроскопия (ИЧС) показват основен абсорбционен максимум за контролата в Амид I лентата при всички проби на 1653 cm⁻¹ (фиг. 10 и 11, долни криви). Наблюдават се допълнителни абсорбционни пикове при 1695 cm⁻¹, 1683 cm⁻¹

¹, 1645 cm⁻¹ и 1635 cm⁻¹, както и слаби рамена 1657 cm⁻¹ и 1617 cm⁻¹. Максималният пик в Амид II лентата е локализиран при 1559 cm⁻¹, с допълнителни силни абсорбционни пикове при 1576 cm⁻¹, 1559 cm⁻¹, 1719 cm⁻¹, и 1507 cm⁻¹ и рамо при – 1521 cm⁻¹ (фиг. 10 и 11, долни криви). Наблюдава се и абсорбционен пик при 1733 cm⁻¹ (извън характеристичните Амид I и Амид II ленти), който характеризира слаби липид-белтъчни взаимодействия.



Фиг. 10. Пример на инфрачервени спектри от необлъчени (долна крива) лиофилизирани хомогенати от жабешки мускул, центрогугирани на 900 g и от облъчени с поле с мощност 10 mW/cm². При препаратите, облъчени с МВП с интензитет 20 mW/cm² (фиг, 11, горна крива), абсорбционните пикове в Амид I лентата се наблюдават при 1695 cm⁻¹, 1685 cm⁻¹, 1643 cm⁻¹, 1635 cm⁻¹, 1617 cm⁻¹ и 1602 cm⁻¹ с максимум при 1653 cm⁻¹. В Амид II лентата максимумът е при 1559 cm⁻¹ и 1540 cm⁻¹, с допълнителни абсорбционни рамена при 1576 cm⁻¹, 1571 cm⁻¹, 1554 cm⁻¹, 1547 cm⁻¹, 1521 cm⁻¹, и 1508 cm⁻¹.



Фиг. 11. Пример на инфрачервени спектри от необлъчени (долна крива) лиофилизирани хомогенати от жабешки мускул, центрогугирани на 900 g и от облъчени с поле с мощност 20 mW/cm².

На базата на така наблюдаваните абсорбционни пикове и рамена бяха изчислени промените в основните вторични структури след облъчване с ниско (таблица 5) и високоинтензивното (таблица 6) поле в сравнение с необлъчваните препарати. При облъчване с полетата и с двата интензитета наблюдавахме статистически значимо намаляване на α-спиралните структури (таблица 5 и 6). При препаратите облъчени с нискоинтензивно поле се наблюдаваше и статистически значимо увеличаване на неподредени структури (обръщания, извивки и намотки) (таблица 5). При препарати, облъчени с високоинтензивно поле се наблюдаваше статистически значимо намаляване на паралелните β-структури, както и статистически значимо увеличаване на неподредените структури, както и статистически значимо намаляване на паралелните β-структури, както и статистически значимо увеличаване на неподредените структури (таблица 6).

Таблица 5. Количествена оценка на вторичната белтъчна структура на базата на рамената и пиковете в
ИЧС спектрограма от необлъчени и облъчени с МВП с мощност 10 mW/cm ² хомогенати от жабешки скелетен
мускул центрофугирани при 900 д (колона 1). Колона 2 – процентно съдържание на съответните пикове и
рамена.

Sham expo	sed	Exposed	
(1)	(2)	(1)	(2)
α-helices	(-/	α-helices	(-)
1653 cm ⁻¹	Total	1653 cm ⁻¹	Total
1557 cm ⁻¹	38%±3.9%	1557 cm ⁻¹	29%±3.6%*
-		-	
β-sheets		β-sheets	
1695 cm ⁻¹		1695 cm ⁻¹	
1683 cm ⁻¹	Total 22	1683 cm ⁻¹	Total
1617 cm ⁻¹	% ±1.8%	1617 cm ⁻¹	23%±2.54%
1576 cm ⁻¹		1576 cm ⁻¹	
parallel β-structures		parallel β-	
16421		structures	
1643 cm ⁻¹	Total 10%±1.13%	1643 cm ⁻¹ 1635 cm ⁻¹	Total 9%±1.73%
Turns, bends, random		Turns, bends,	
coils		random coils	
1626 cm ⁻¹ 1521 cm ⁻¹	Total 30%±3.5%	1626 cm ⁻¹ 1521 cm ⁻¹ 1505 cm ⁻¹	Total 39%±2.28%*

Таблица 6. Количествена оценка на вторичната белтъчна структура на базата на рамената и пиковете в ИЧС спектрограмата от необлъчени и облъчени с МВП с мощност 20mW/cm² хомогенати от жабешки скелетен мускул, центрофугирани при 900 g (колона 1). Колона 2 – процентни съдържания на съответните пикове и рамена.

Sham exposed		Exposed	
(1)	(2)	(1)	(2)
α-helices		α-helices	
1653 cm ⁻¹	Total 38%±2%	1653 cm ⁻¹	Total
1559 cm ⁻¹		1559 cm ⁻¹	30%±2.91%*
β-sheets		β-sheets	
1695 cm ⁻¹		1695 cm ⁻¹	
1683 cm ⁻¹	Total 22	1683 →1685cm ⁻¹	Total 21
1617 cm ⁻¹	%±2.33%	1617 cm ⁻¹	%±2.07%
1507 cm ⁻¹		1507→1508 cm ⁻¹	
parallel β-		parallel β-structures	
structures		1643 cm^{-1}	
1643 cm ⁻¹ 1635 cm ⁻¹	Total 10%±1.6%	1635 cm ⁻¹	Total 35%±3.76%***
Turns, bends, random coils		Turns, bends, random coils	
1626 cm ⁻¹ 1521 cm ⁻¹	Total 30%±2.56%	1602 cm ⁻¹ 1521 cm ⁻¹	Total 14%±1.03%***

2. Изследване на промяна на белтъчна конформация във фракция с отстранени митохондрии (центрофугиране с 9600 g).

На фиг. 12 и фиг. 13, се наблюдават поглъщанията на облъчени с ниско и високо интензивно поле мембранни фракции с отстранени митохондрии в сравнение с техните контроли (необлъчени проби от същите фракции). Данните от необлъчените препарати показаха основен абсорбционен максимум при 1653 сm⁻¹ Амид I лентата. Наблюдават се допълнителни абсорбционни пикове при 1695 сm⁻¹, 1684 сm⁻¹, 1635 сm⁻¹, както и слаби рамена при 1626 сm⁻¹ и 1617 сm⁻¹ (фиг. 14 и 15, долните криви). За Амид II лентата максимумът е локализиран при 1558 сm⁻¹ и се наблюдават допълнителни абсорбционни пикове при 1576 сm⁻¹, 1533 сm⁻¹, 1516 сm⁻¹ и 1507 сm⁻¹ и абсорбционно рамо при 1521 сm⁻¹ (фигури 12 и 13, долни криви).



Фиг. 12. Пример на инфрачервени спектри от необлъчени (долна крива) лиофилизирани хомогенати от жабешки мускул, центрогугирани на 9600 g и от облъчени с поле с мощност 10 mW/cm2 (горна крива).

При облъчване с МВП и с двата интензитета максимумът в Амид I лентата от 1653 cm⁻¹ се отмества при 1657 cm⁻¹ и се наблюдават допълнителните пикове при 1680 cm⁻¹ и 1692 cm⁻¹. Облъчването с нискоинтензивното поле предизвиква появата на допълнителни рамена при 1645 cm⁻¹ и 1620 cm⁻¹. Допълнителните рамена приоблъчването с високоинтензивното поле се наблюдаваха при 1650 cm⁻¹, 1639 cm⁻¹, 1631 cm⁻¹ и 1613 cm⁻¹(фиг. 12 и 13). При облъчване с МВП с 20 mW/cm² се наблюдава допълнително рамо извън границите на Амид I и II ивиците при 1715 cm⁻¹(фиг. 13., долна крива).

В ивицата Амид II при максимума, наблюдаван при контролите 1558 cm⁻¹, се измества при 1563 cm⁻¹ и при набора от пробите, облъчени и с двата вида МВП. Полето с нисък интензитет предизвиква появата на допълнителни рамена при 1552 cm⁻¹, 1547 cm⁻¹, 1536 cm⁻¹ и 1504 cm⁻¹ (фиг. 13, горна крива). Допълнителните рамена при препаратите, облъчени с МВП с висок интензитет се наблюдаваха допълнителни рамена при 1547 cm⁻¹ и 1540 cm⁻¹ (фиг. 13, горна крива).



Фиг. 13. Пример на инфрачервени спектри от необлъчени (долна крива) лиофилизирани хомогенати от жабешки мускул, центрофугирани на 9600 g и от облъчени с поле с мощност 20 mW/cm².

На базата на промяната на позицията на различните пикове и промяната на тяхната площ бяха изчислени промените на различните вторични структури след облъчване (таблица 7 и 8). След облъчване с нискоинтензивното поле се наблюдаваше статистически значимо намаление на α-спиралните структури и намаляване на неподредените такива (таблица 7). След облъчване с високоинтензивното поле наблюдавахме значимо намаляване на α-спиралните структури и антипаралелните β-листове, както и повишаване на процентното съдържание на неподредените структури (таблица 8).

Таблица 7. Количествена оценка на вторичната белтъчна структура на базата на рамената и пиковете в ИЧС спектрограмата от необлъчени и облъчени с МВП с мощност 10 mW/cm² хомогенати от жабешки скелетен мускул центрофугирани при 9600 g (колона 1). Колона 2 – процентно съдържание на съответните пикове и рамена.

Sham exposed		Exposed		
(1)	(2)	(1)	(2)	
α-helices		α-helices		
1653 cm⁻¹	Total	$1653 \rightarrow 1557 \text{ cm}^{-1}$	Total	
1558 cm⁻¹	31%±3.5%	1558→1563 cm ⁻¹	16.14%±2.4%*	
β- sheets		β- sheets		
1695 cm ⁻¹		$1695 \rightarrow 1692 \text{ cm}^{-1}$		
1684 cm⁻¹		1684→1680 cm ⁻¹		
1617 cm⁻¹	Total	$1617 \rightarrow 1620 \text{ cm}^{-1}$	Total	
1516 cm⁻¹	11.65%±2.4%	1516 cm ⁻¹	41.21%±1.52%	
1507 cm⁻¹		1507→1504 cm ⁻¹		
parallel β- structures		parallel β- structures		
Structures	Total	Schuctures	Total	
1646 cm ⁻¹ 1635 cm ⁻¹	23.22%±1.4%	1645 cm ⁻¹ 1635 cm ⁻¹	14.1%±3.4%	
turns, bends, random coils,		turns, bends, random coils,		
1626 cm ⁻¹ 1521 cm ⁻¹	Total 14.6%±1.7%	1626 cm ⁻¹ 1521 cm ⁻¹ 1504 cm ⁻¹	Total 48.1%±1.6%*	

Таблица 8. Количествена оценка на вторичната белтъчна структура на базата на рамената и пиковете в ИЧС спектрограмата от необлъчени и облъчени с МВП с мощност 20mW/cm² хомогенати от жабешки скелетен мускул, центрофугирани при 9600 g (колона 1). Колона 2 – процентно съдържание на съответните пикове и рамена.

Sham exposed		Exposed	
(1)	(2)	(1)	(2)
α -helices		α-helices	
1653 cm⁻¹	Total	$1653 \rightarrow 1557 \text{ cm}^{-1}$	Total
1558 cm⁻¹	33.3%±2.6%	1558→1563 cm ⁻¹	15.26%±2.2%**
β -sheets 1695 cm ⁻¹ 1684 cm ⁻¹		β-sheets 1695→1692 cm ⁻¹ 1684 →1680cm ⁻¹	
1617 cm ⁻¹	Total	$1617 \rightarrow 1613 \text{ cm}^{-1}$	Total
1516 cm ⁻¹	8.43%±1.73%	1516 cm ⁻¹	10.33%±1.69%*
1507 cm ⁻¹		1507 cm ⁻¹	
parallel β-		parallel β-	
structures	Tatal	structures	Total 20 60/ 1 20/
1646 cm ⁻¹ 1635 cm ⁻¹	17.9%±1.3%	1646→1650 cm ⁻¹ 1635→1639 cm ⁻¹	10tal 20.0%±2%
turns, bends , random coils		turns, bends, random coils	
1626 cm ⁻¹	Total 40.37%±1.8%	$1626 \rightarrow 1631 \text{ cm}^{-1}$ 1521 cm ⁻¹	Total 53.81%±1.75%**
1521 cm ⁻¹			

Повлияването на белтъчната конформация от облъчване с ЕМП предполага повлияване на функцията на мембранни йонни канали, рецептори, ензими (мембранно свързани или свободни).

В нашите изследвания, информацията, която извлякохме от характеристичните Амид I и Амид II ивици (Vukova и сътр., 2005; напубликувани данни) показа намаляване на количеството на -спиралите и при двете фракции, както и при облъчване с ЕМП и с двете мощности. Това намаляване беше по-изразено в "грубата мембранна фракция". Този факт вероятно може да се дължи на по-голямата стойност на SAR в тази фракция, т.е. това потвърждава наличието на "интензитетни прозорци", което наблюдават редица други изследователи. Интересно е, че при пробите, облъчени с по-нискоинтензивното поле се наблюдават сравнително по-изразени промени във вторичната белъчна структура. Предполагаме, че повлияването е специфично (нетемпературно) поради контролираните температурни експериментални условия. Това е в съответствие с предположенията на Bohr и Bohr (2002а, 20026), че при подлагане на дадена белтъчна молекула на облъчване, вибрационните режими на малките подвижни части на молекулата намаляват честотата си на вибрация, както и с хипотезата на Fröhlich (1980, 1988), която постулира, че енергията, постъпила в клетките не преминава в топлинна, а се складира във вибрационните режими на молекулите, макромолекулите и молекулните комплекси. Може да се предполага, че в нашия случай енергията на ЕМПта с мощности 10 и 20 mW/cm² е била достатъчна за възбуждане на общите вибрационни режими на белтъчната си на визорационни вибрационни на молекулите на Емпта с мощности 10 и 20 mW/cm² е била достатъчна за възбуждане на общите вибрационни режими на

Тези резултати биха могли да бъдат обвързани и със специфичната промяна на активността на AChEтa, както и повлияването на електрофизиологичните параметри на жабешкото мускулно влакно в посока към намаляване на умората, наблюдавани при нашите експерименти.

ИЗВОДИ

1. Резултатите от електрофизиологичните изследвания показаха, че след едночасово облъчване с 2.45 GHz електромагнитно поле при интензитет 20 mW/cm² амплитудните параметри на вътреклетъчните акционни потенциали, извънклетъчните акционни потенциали и на мускулните съкращения бяха с по-високи стойности, както в началото, така и в края на експеримента, докато времевите параметри бяха скъсени в сравнение с тези на необлъчените изолирани влакна в период на непрекъсната активност, предизвикана от стимулация с 5 Hz (200 ms интервал между стимулите).

2. Измененията на изследваните параметри, предизвикани от умората в процеса на продължителна стимулация се развиваха по-бавно и в по-слаба степен в облъчените бавни- и бързоуморяеми влакна в сравнение с необлъчените такива.

3. Използвани бяха три метода (дискретен уейвлет анализ, изчисляване на медианната честота чрез бърза Фурие трансформация и четири спектрални индекса, изчислени на базата на бърза Фурие трансформация) за анализ на честотните характеристики на потенциалите. Те показаха изместването на честотното съдържание на потенциалите към ниските честоти по време на продължителната активност в зависимост от типа на влакната и протокола за умора, като чрез дискретния уейвлет метод те се долавяха най-рано със съответната степен на достоверност в сравнение с другите два метода при необлъчени и облъчени бързо- и бавноуморяемите мускулни влакна.

4. И трите метода за анализ на честотните характеристики са приложими за целта на експериментите, но дискретният уейвлет анализ е най-чувствителен към настъпилите промени, поради което той би бил подходящ за анализ на миографски потенциали, регистрирани с инвазивни електроди, които са позиционирани на близко разстояние до влакната, подобно на изследваните от нас.

5. Времево-честотният метод – уейвлет анализ, ни даде допълнителна информация с доказване на корелационна зависимост между времевите параметри ΔRt и ΔT_1 с ΔRMS на уейвлет коефициентите във високочестотната скала.

6. Предвид използуваната методика на облъчване и последващата регистрация на потенциалите, при която се отстранява ефектът на затопляне от облъчването, смятаме, че забавената и в по-слаба степен изразена промяна в амплитудните, времеви и честотни характеристики на регистрираните сигнали от облъчените мускулни влакна в сравнение с тези от необлъчените се дължи на специфичен, нетемпературен ефект на използваното микровълново поле върху мембранните процеси на скелетните мускули. В случая той може да се определи като създаване на известна устойчивост към умора.

7. Микровълновото поле повлиява активността на ацетилхолинестеразата в изследваните фракции от скелетни мускули на жаба в зависимост от мощността на полето и има продължителен ефект, който може да се смята, че е в посока към "стабилизиране" на активния център на ензима, чиято активност проследихме до 48^{-ия} час.

8. Изследваното микровълново електромагнитно поле повлиява вторичната белтъчна конформация на общия белтък в жабешки скелетен мускул в посока към увеличаване на β-листовете, антипаралелни структури и на неподредените структури, както и към намаляване на α-спиралните участъци.

ПРИНОСИ

1. Дискретен уейвлет анализ беше приложен за първи път за изследване на появата и развитието на процеса на умора, върху записи на вътре- и извънклетъчни акционни потенциали от изолирани мускулни влакна, като сравнението на резултатите с промените в честотни индекси за умора, получени чрез използуваните от нас три други метода (изчисляване на медианната честота на базата на бърза Фурие трансформация, изчисляване на общата мощност на вътре- и извънклетъчните потенциали, изчисляване

на 4 индекса на базата на бърза Фурите трансформация), показа редица негови предимства, което го прави предпочитан метод за подобни изследвания.

2. Чрез използвания експериментален модел за предизвикване на високочестотна умора на изолирано мускулно влакно, беше наблюдавано повлияване в посока към намаляване на уморяемостта на влакната под влияние на предварителното въздействие на електромагнитно поле с честота 2.45 GHz, в сравнение с резултатите при необлъчените влакна.

3. Установено беше, че активността на AChEта се повлиява в зависимост от мощността на изследваното поле, както и от поглънатата мощност (SAR) на изследваната мускулна фракция, което е в съответствие с други експериментални и теоретични изследвания.

4. Наблюдавахме промяна на вторичната белтъчна структура на общия белтък от скелетен жабешки мускул в посока към увеличаване на неподреденинте структури и на

-листовете за сметка на намаляване на -спиралите и при двете изследвани фракции ("груба" мембранна фракция с и без митохондрии) при облъчване както с ниско- така и с високоинтензивно електромагнитно поле с честота 2.45 GHz..

5. При облъчване с изследваното микровълново електромагнитно поле (честота 2.45 GHz) и интензитет 10 mW/cm2 беше наблюдаван допълнителен пик при 1733 cm⁻¹, който показва въздействие върху липид-белтъчните взаимодействия и при двете фракции ("груба" мембранна фракция с и без митохондрии).

6. Беше приложен комплексен методологичен подход към изледване наличието на "**специфични"** (нетемпературни) ефекти на електромагнитно поле с честота 2.45 GHz и две мощности (10 и 20 mW/cm²) върху субстрати от скелетен мускул на жаба (мускулно ламбо; груби мембранни фракции с и без митохондрии).

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Ivanov R., P. Naumova, M. Radeva, **T. Vukova**, N. Radicheva. Effect of millimetre wave electromagnetic field on acetylcholinesterase activity of frog skeletal muscle. Compt Ren Acad Bulg Sci, 54: 11:91-94, 2001.

2. Radicheva N, K Mileva, **T Vukova**, I Kristev. Microwave (2.45 GHz)- induced changes in characteristic parameters of muscle fibre electrical activity during fatigue. Proceedings of Eastern European Regional EMF Meeting and Workshop Criteria for EMF Standards Harmonization, (eds. M. Israel, M. Rapacholi) Varna, Bulgaria, 28 April - 3 May, 2001. VM-OFSET, Sofia, Bulgaria, pp:173-178, 2002.

3. Radicheva N., K. Mileva, **T. Vukova**, B. Georgieva, I. Kristev. Effect of microwave electromagnetoc field on skeletal muscle fibre activity. Arch Physiol Biochem 110 (3): 203-214, 2002. **IF = 0,476**

4. Ivanov, R., A. Atanassov, P. Naumova, **T. Vukova**, N. Radicheva. High frequency electromagnetic field effects on frog skeletal acetylcholinesterase activity. . Compt Ren Acad Bulg Sci, 56, No9: 57-62, 2003.

5. Vukova, T., Atanassov, A., Ivanov, R., Radicheva, N. Intensity–dependent effects of microwave electromagnetic fields on acetylcholinesterase activity and protein conformation in frog skeletal muscles. Med. Sci. Mon. 11, BR50-BR56, 2005.

6. Vukova T., M. Vydevska-Chichova, N. Radicheva. Fatigue-induced changes in muscle fiber action potentials estimated by wavelet analysis, J Electromyogr Kinesiol 18:397-409, 2008. **IF = 1,884**

7. Vukova T., V. Dimitrov, N. Radicheva. Three methods for estimation of changes in frequency characteristics of potentials elicited by long-lasting (fatiguing) activity of isolated muscle fibres. Gen Physiol Biophis 29: 243-253, 2010. **IF** = 1,146

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ МЕРОПРИЯТИЯ СЪС СЪОБЩЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Vukova T., Ivanov R., Naumova P., Atanassov A., Radeva M., Radicheva N. High frequency electromagnetic field effects on frog skeletal muscle acetylcholinesterase activity. III-ти конгрес на FEPS – 2003 г. Ница, Франция, (постер).

2. Vukova T., Atanassov A., Ivanov R., Radicheva N. Changes of protein conformation in frog skeletal muscle fractions influenced by 2.45 GHz electromagnetic field. VIII-и национален конгрес на българското дружество по физиологични науки 2003 г. София, (устно предстаряне). (Промени в белтъчната конформация от фракции на скелетен мускул от жаба, облъчвани с 2.45 GHz електромагнитно поле).

3. Vukova T.I., Videvska-Chichova M.T., Mileva K.N., Georgieva B.G., Radicheva N.I. Role of muscle muscle fibre fatigue in the muscle activity control. Х-ти международен конгрес по "Регулация на движенията" 2004 г. София, (постер).

4. Vukova T., Ivanov R., Atanassov A., Radeva M., Radicheva N. Effect of 2.45 GHz electromagnetic field on acetylcholinesterase activity in frog skeletal muscle. East European symposium "Central and peripheral synaptic transmission", 2005 г. Варна, (постер).

5. Vukova T. Estimation of single muscle fibre fatigue by discrete wavelet analysis Workoshop August, 2005 – Hannover (Alexander von Humboldt-Stiftung, Institute partnership program), (устно представяне).

6. Vukova T., Atanassov A., Ivanov R., Radicheva N. Changes of protein conformation in frog skeletal muscle fractions influenced by 2.45 GHz electromagnetic field IX-ти Национален конгерс на Българското дружество по физиолиогични науки 2007 г. Благоевград, (устно представяне).

7. 7. Н. Радичева, А. Гидиков, Л. Гериловски, К. Милева, М. Видевска-Чичова, Б. Георгиева, Т. Вукова. Изследвания на изолирани възбудими клетки, Юбилейна сесия по случай 40 години от създаването на института по биофизика, 2007 г. София, (устно представяне).

8. Т. Вукова. Уейвлет анализ. Пример за приложение. І-и учебен семинар по проект BG051RO001 – 3.3.04/42 на оперативна програма "Развитие на човешките ресурси", 2010 г. София, (устно представяне).

8. Т. Вукова. Промени в белтъчнат6а конформация в "груба" мембранна фракция от скелетен мускул на жаба при облъчване с електромагнитно поле с честота 2.45 GHz. V-ти учебен семинар по проект BG051RO001 – 3.3.04/42 на оперативна програма "Развитие на човешките ресурси", 2011 г. София (устно представяне).

9. Vukova T. Protein conformation changes in frog skeletal muscle caused by electromagnetic field (2.45 GHz) irradiation. Х-ти Национален конгрес по физиологични науки 2011 г, Варна.

ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТИРАНИЯ ОТ ЧУЖДИ АВТОРИ

Vukova T., Atanassov A., Ivanov R., Radicheva N. (2005) Intensity–dependent effects of microwave electromagnetic fields on acetylcholinesterase activity and protein conformation in frog skeletal muscles. Med. Sci. Mon. 11, BR50-BR56.

1. Wang A., Liu M., Wang H., Zhou C., Du Z., Zhu C., Shen S., Ouyang P. (2008) Improving enzyme immobilization in mesocellular siliceous foams by microwave irradiation. Journal of Bioscience and Bioengineering 106(3): 286-291.

2. Homenko A., Kapilevich B., Kornstein R., Firer MA. (2009) Effects of 100 GHz radiation on alkaline phosphatase activity and antigen–antibody interaction. Bioelectromagnetics 30(3): 167-175.

3. Du Z., Wang A., Zhou C., Zhu S., Shen S. (2009) Microwave-Assisted Lipase Covalent Immobilization and Improved Its Thermal Stability Using Alcohols to Quench Excessive Activated Groups on Support Surface. Journal of chemical engineering of Japan 42(6): 441-446.

4. Yongmei X, Shiyu S., Yun F., Rui M., Hongping W., Yue Z. (2007) Microwave Irradiation-Enzyme Coupling Catalysis. Progress in chemistry 19(2/3): 250-255, (in Chinese).

5. Jing G., Xiao L., Zhendong G., Xiaona G., Hong F., Liyan Z., Jingli Z., Xiaolin L., Jintia T. (2009) Effects of Intermediate Frequency Alternating Magnetic Field on Blood Analysis and Histopathological Analysis for Important Organs in Mice. Chinese journal of minimally invasive surgery 9(6): 498-501, (in chinise).

6. Wang A., Wang M., Wang O., Chen F., Zhang F., Li H., Zeng Z., Xie T. (2011) Stable and efficient immobilization technique of aldolase under consecutive microwave irradiation at low temperature. Bioresource Technology 102(2): 469-474.

7. Zhang X., Qin W., Tian X., Huang M. (2011) Effect of microwave irradiation on secondary structure of a-amylase by circular dichroism. Journal of Central South University of Technology 18(4): 1029-1033.

8. Chen F., Zhang F., Du F., Wang A., Gao W., Wang Q, Yin X., Xie T. (2011) A novel and efficient method for the immobilization of thermolysin using sodium chloride salting-in and consecutive microwave irradiation. Bioresource Technology, Available online 25 November 2011 (In Press)

9. Miladinović Z. (2006) Kinetics of destruction of potato polyphenol oxidase (PPO) during vacuum microwave blanching. Thesis for the master of science, The University of British Columbia.

10. Chao W., Qin XU, Liyan Z. (2009) Effect of microwave irradiation on detergent enzymes. Detergent and Cosmetics 32(5): 25-28, (in Chinese).

11. Jing G., Xiao L., Zhendong G., Xiaona G., Hong F., Liyan Z., Jingli Z., Xiaolin L., Jintian T. (2010) Experimental Evaluation of Systemic Toxicity and Safety of Exposure to Intermediate Frequency Alternating Magnetic Radiation. Science and Technology review 28(19): 86-92, (in Chinese).

Radicheva N., K. Mileva, <u>**Vukova T.**</u>, B. Georgieva, I. Kristev. (2002) Effect of microwave electromagnetoc field on skeletal muscle fibre activity. Arch Physiol Biochem 110 (3): 203-214.

1. Yu Z., Xiao-yun Z. (2006) Acute toxicity effects of 4T superconductive static magnetic field in rats. Chinese Journal of clinical rehabilitation 10(1): 112-115, (in Chinese).

2. Lambrecht, M.R., Chatterjee, I., McPherson D., Quinn J., Hagan T., Craviso G.L. (2006) Design, Characterization, and Optimization of a Waveguide-Based RF/MW Exposure System for Studying Nonthermal Effects on Skeletal Muscle Contraction. IEE transactions on Plasma science 34(4): 1470-1479.

3. Baharara J., Parivar K., Shahrar B., Ashraf A. (2004) The effects of long term exposure with simulating cell phone waves on gonads of female BALB/C mouse. Journal of reproduction and infertility 5(3(19)): 217-226.

Vukova T., M. Vydevska-Chichova, N. Radicheva. (2008) Fatigue-induced changes in muscle fiber action potentials estimated by wavelet analysis, J of Electromiogfraph and Kinseiol 18 :397-409.

1. Rafieea J., Rafieea MA, Yavaria F., Schoenb MP (2011) Feature extraction of forearm EMG signals for prosthetics. Expert Systems with Applications 38(4): 4058-4067.

2. Yochum M., Binczak S., Bakir T., Jacquir S., Lepers R. (2011) A mixed FES/EMG system for real time analysis of muscular fatigue. Engineering in Medicine and Biology Society, EMBC, 2011 Annual International Conference of the IEEE Aug. 31 2010-Sept. 4 2010: 4882-4885.

БЛАГОДАРНОСТИ

• Благодаря на научния си консултант доц. д-р Николина Радичева за всичко, на което ме научи през времето на общата ни работа, за това, че през цялтото време ми оказваше доверие, за насоките, напътствията и разбирането.

• Благодаря на чл. кор. Андон Косев, който ме подкрепяше с идеи за обработката на резултатите и в трудни за мен моменти.

• Благодаря на доц. Мишел Израел и колегите му от лаборатория "Медицинска физика" към Националния център за обществено здраве, за помощтта и за предоставената апаратура.

• Благодаря на всички колеги и приятели, които бяха с мен и до мен през тези години.

• И не напоследно място благодаря на моето семейство за обичта и търпението.