

*Л.П. Жаркова, И.Р. Князева, В.И. Иванов, М.А. Большаков,  
О.П. Кутенков, В.В. Ростов*

## **ВЛИЯНИЕ ИМПУЛЬСНО-ПЕРИОДИЧЕСКОГО РЕНТГЕНОВСКОГО И МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЙ НА УРОВЕНЬ ПЕРЕКИСЕЙ В ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТАХ**

*Исследование выполнено при финансовой поддержке АВЦП (проект № 2.1.1/2777) и РФФИ (грант 09-02-99014-р\_офи).*

Исследовано влияние импульсно-периодического рентгеновского (частота повторения 8–25 имп./с, доза в импульсе от 0,003 до 0,02 мГр) и микроволнового (частота повторения 8–25 имп./с, пиковая плотность потока мощности от 120 до 1520 Вт/см<sup>2</sup>) излучений на уровень перекисей в изолированных гепатоцитах мышей с использованием флуоресцентного зонда 2,7-дихлорфлуоресцеиндиацетата. Характер и величина эффекта зависят от интенсивности/дозы воздействия и от частоты повторения импульсов. При использованных режимах воздействия импульсно-периодическое микроволновое излучение проявляет более выраженное влияние на изменение уровня перекисей по сравнению с импульсно-периодическим рентгеновским излучением.

**Ключевые слова:** рентгеновские и микроволновые импульсы; гепатоциты; перекиси.

В живых организмах в результате окислительно-восстановительных реакций постоянно происходит генерация активных форм кислорода (АФК), которые, обладая высокой реакционной способностью, могут вызывать окислительную модификацию биополимеров: белков, липидов и нуклеиновых кислот [1, 2]. Внутриклеточная продукция и элиминация АФК обеспечивает развитие деструктивных процессов и выполняет важную сигнальную функцию в организме [3, 4]. Ранее высказывалось предположение о том, что одним из механизмов реализации эффектов биологического действия импульсно-периодических микроволнового (ИПМИ) и рентгеновского (ИПРИ) излучений может быть модуляция уровня активных форм кислорода в тканях, о чем свидетельствовало изменение уровня супероксид-аниона кислорода в клетках в течение первого часа после воздействия [5, 6]. Известно, что в результате дисмутации супероксид-аниона образуется пероксид водорода, который является более стабильной активной формой кислорода [7–10]. Внутриклеточный уровень перекисей можно определять с использованием флуоресцентного зонда 2,7-дихлорфлуоресцеиндиацетата (ДХФДА), который способен проникать в клетки в виде ацетилового эфира. В цитоплазме зонд деэстерифицируется под действием внутриклеточных эстераз, и это исключает возможность его выхода из клеток. Дихлорфлуоресцеин (ДХФ) способен флуоресцировать при взаимодействии с АФК преимущественно с гидропероксидами и, главным образом, гидропероксидом водорода [11], что позволяет оценивать содержание этих АФК флуориметрически.

В настоящей работе с помощью флуоресцентного зонда ДХФДА исследовано модулирующее влияние импульсно-периодических микроволнового (ИПМИ) и рентгеновского (ИПРИ) излучений на уровень перекисей в изолированных гепатоцитах мышей.

### **Методика исследования**

Гепатоциты мышей выделялись общепринятым методом [12] с соблюдением всех правил и рекомендаций гуманного обращения с животными [13]. Клетки помещали в ДМЕМ/F-12 среду (без глутамин и фенолового красного) и промывали трехкратно с использованием низкоскоростного центрифугирования (60 г).

Жизнеспособность клеток, определенная с использованием теста с трипановым синим, составляла 85–95% во всех экспериментах.

Изолированные гепатоциты (0,2 мл суспензии, содержащей  $1 \times 10^6$  клеток/мл) нагружались 2,7-дихлорфлуоресцеиндиацетатом (ДХФДА, «Sigma-Aldrich») при инкубировании с 5 мкМ зонда в течение 30 мин в СО<sub>2</sub>-инкубаторе. После этого клетки трижды отмывались в ДМЕМ/F-12 среде, затем подвергались воздействию 4000 импульсов ИПМИ или ИПРИ с частотой повторения 8–25 имп./с.

В качестве источника ИПРИ использовался ускоритель Синус-150 (Россия, длительность импульса на полувисоте 4 нс, ускоряющее напряжение 300 кВ, ток электронного пучка 2,5 кА, спектр энергии фотонов с максимумом 100 кЭв). Источником ИПМИ служил лабораторный генератор на основе магнетрона МИ-505 (несущая частота 10 ГГц, длительность импульсов 100 нс, пиковая мощность генератора до 180 кВт). Рупорная антенна обеспечивала однородное распределение СВЧ-полей на объекте с регулируемым импульсным потоком мощности в диапазоне 120–1520 Вт/см<sup>2</sup>.

Интенсивность флуоресценции внутриклеточного зонда измерялась с помощью Rotor Gene 6000 фирмы «Corbett Research» (Австралия) при длинах волн возбуждения 470 нм и эмиссии 510 нм через 30 мин после облучения ИПМИ или ИПРИ. Для проверки состояния антиоксидантной системы в облученные образцы добавлялся прооксидант (0,5 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), затем проводилось повторное измерение интенсивности флуоресценции. При обработке данных интенсивности флуоресценции облученных образцов выражались в относительных единицах по отношению к флуоресценции ложнооблученных образцов (ЛО), принимавшихся за единицу. Полученные данные усреднялись по 6 повторностям рассчитанного показателя для каждого из исследованных режимов воздействия. Значимость различий между сравниваемыми выборками оценивалась с помощью критерия Манна–Уитни.

### **Результаты исследования**

*Влияние ИПРИ на содержание пероксида водорода в гепатоцитах.* Полученные результаты показывают, что однократное воздействие 4000 импульсов ИПРИ на

изолированные гепатоциты мышей изменяет уровень внутриклеточных перекисей, о чем свидетельствует

изменение интенсивности флуоресценции ДХФ (рис. 1, а).

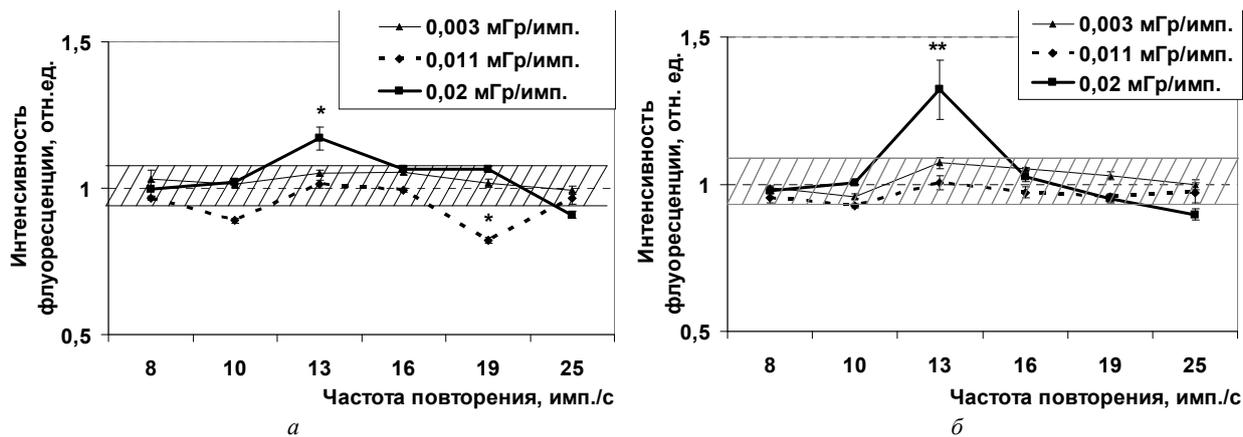


Рис. 1. Влияние разных доз ИПРИ: а – на интенсивность флуоресценции ДХФ в изолированных гепатоцитах мышей в зависимости от частоты повторения импульсов; б – на интенсивность стимулируемой  $H_2O_2$  (0,5 мМ) флуоресценции гепатоцитов, нагруженных ДХФА. \* Различия по отношению к ЛО образцам статистически значимы,  $p \leq 0,05$

Влияние ИПРИ с разными частотами повторения импульсов имеет разный характер и зависит от дозы. Из всех использованных режимов облучения ИПРИ наиболее эффективными оказались воздействия с дозами 0,011 и 0,02 мГр/имп. При сравнительном анализе полученных результатов выяснилось, что облучение в дозе менее 0,011 мГр/имп. при всех использованных частотах повторения импульсов значимо не отличается от интенсивности флуоресценции внутриклеточного зонда ЛО образцов. Увеличение дозы ИПРИ до 0,011 мГр/имп. снижает уровень перекисей в гепатоцитах после воздействия с частотами повторения 10 и 19 имп./с. Воздействие ИПРИ с дозой 0,02 мГр/имп. увеличивает уровень перекисей в клетках при частоте 13 имп./с и снижает этот показатель при более высокой частоте повторения 25 имп./с.

Добавление прооксидантов к клеткам позволяет выявить состояние их антиоксидантного потенциала. В качестве прооксиданта в настоящей работе использовалась перекись водорода, экзогенно добавляемая к облученным и ложнооблученным образцам. Добавление  $H_2O_2$  к гепатоцитам, облученным ИПРИ с частотой повторения 13 имп./с и дозой 0,02 мГр/имп., сопровождается резким увеличением интенсивности флуоресценции ДХФ. Это свидетельствует о снижении антиоксидантного потенциала клеток, обусловленного воздействием ИПРИ (рис. 1, б). Снижение уровня перекисей в гепатоцитах может быть опосредовано усилением антиоксидантных возможностей клеток после воздействия ИПРИ в дозе 0,011 мГр/имп. и с частотами 10 и 19 имп./с (рис. 1, а). В пользу этого предположения свидетельствует то, что добавление прооксиданта в эти образцы значимо не увеличивает интенсивность флуоресценции ДХФ в сравнении с ложнооблученными гепатоцитами (рис. 1, б). Умеренное увеличение стимулированной прооксидантом флуоресценции образцов, предварительно облученных ИПРИ в дозе 0,02 мГр/имп. с частотой повторения 13 имп./с (рис. 1, б), а также увеличение флуоресценции облученных образцов до добавления перекиси (рис. 1, а) могут указывать на снижение антиперекис-

ной защиты после действия ИПРИ с таким режимом генерации.

*Влияние ИПМИ на содержание пероксида водорода в гепатоцитах.* Однократное воздействие ИПМИ с некоторыми режимами на изолированные гепатоциты сопровождается существенным изменением интенсивности флуоресценции ДХФ, что свидетельствует о влиянии этого фактора на продукцию перекисей в клетках. При этом эффект зависит как от интенсивности (пиковой ППМ) ИПМИ, так и от частоты повторения импульсов (рис. 2, а).

После облучения клеток ИПМИ с пППМ 120 Вт/см<sup>2</sup> интенсивность флуоресценции зонда на АФК значимо не отличается от таковой в ложнооблученных образцах. Увеличение ППМ до 960 мкВт/см<sup>2</sup> с частотами повторения 10, 13 и 16 имп./с повышает уровень перекисей в гепатоцитах. Дальнейшее повышение пППМ до 1520 Вт/см<sup>2</sup>, наоборот, снижает интенсивность флуоресценции, и этот эффект более выражен после воздействия с частотой повторения 13 имп./с. Такое снижение уровня перекисей может быть обусловлено либо ингибированием активности прооксидантных ферментов, в частности ксантинооксидазы, генерирующей супероксид анион кислорода и пероксид водорода, либо активацией антиоксидантного фермента каталазы, восстанавливающей  $H_2O_2$ . По-видимому, баланс скорости генерации АФК и скорости их утилизации будет определять разнонаправленное действие некоторых режимов облучения. Эти процессы могут быть в разной степени чувствительны к определенным уровням интенсивности/доза и частотам повторения импульсов. Возможно, способность генерировать перекиси в водных растворах является общим свойством микроволнового излучения.

В экспериментах с прооксидантом добавление  $H_2O_2$  к клеткам, облученным ИПМИ с ППМ 120 Вт/см<sup>2</sup>, интенсивность флуоресценции зонда не отличается от таковой у ложнооблученных образцов. Однако в клетках, облученных с пППМ 960 и 1520 Вт/см<sup>2</sup> с частотами повторения в диапазоне 10–19 имп./с, наблюдается увеличение стимулированной флуоресценции ДХФ

(рис. 2, б). Особенно ярко этот эффект проявляется после воздействия с пППМ 1520 Вт/см<sup>2</sup> и частотой повторения 13 имп./с. Это может быть обусловлено сни-

жением мощности антиперекисных систем (истощение анитакперекисного пула) в гепатоцитах, вызванным предшествующим воздействием.

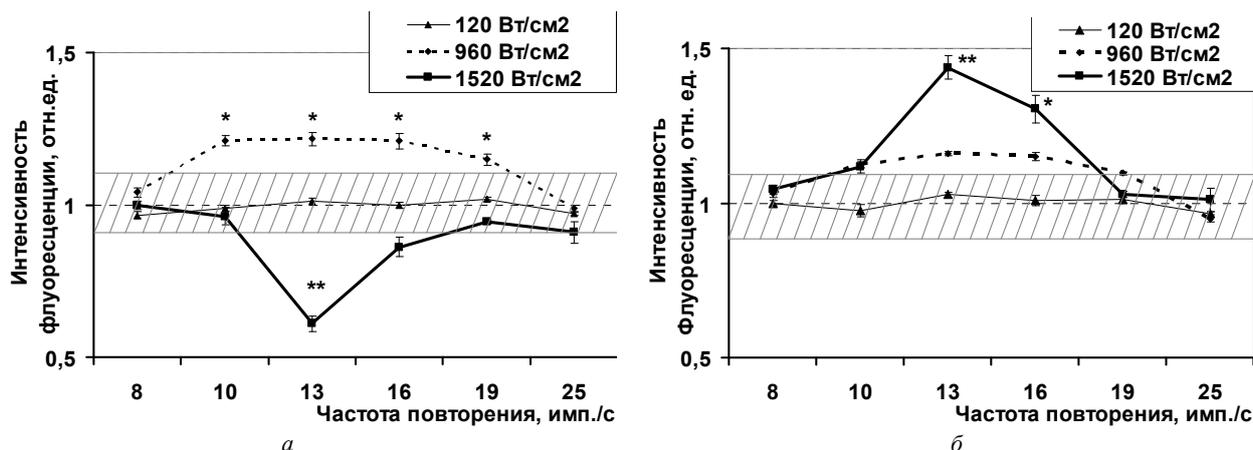


Рис. 2. Влияние ИПМИ с разными ППМ на: а – интенсивность флуоресценции ДХФ в изолированных гепатоцитах мышей в зависимости от частоты повторения импульсов; б – интенсивность стимулируемой H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 мМ) флуоресценции гепатоцитов, нагруженных ДХФА. \* Различия по отношению к ЛО образцам статистически значимы, p ≤ 0,05

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что однократное воздействие ИПМИ и ИПРИ на изолированные гепатоциты сопровождается изменением уровня пероксидов непосредственно в клетках, а не только в воде под влиянием непрерывных КВЧ и СВЧ [9, 14]. Направленность и выраженность эффекта зависит от интенсивности/дозы воздействия и частоты повторения импульсов. Наиболее эффективным оказалось воздействие ИПРИ с дозами 0,011 и 0,02 мГр/имп. и ИПМИ с ин-

тенсивностями 960 и 1520 Вт/см<sup>2</sup> и частотами повторения в диапазоне 10–19 имп./с. При использованных режимах воздействия ИПМИ более выражено изменяет уровень перекисей в изолированных гепатоцитах по сравнению с ИПРИ. В случае повышения уровня перекисей в гепатоцитах после действия ИПМИ и ИПРИ могут запускаться процессы окислительной модификации липидов и белков, которые могут быть причиной некоторых биологических эффектов ИПРИ и ИПМИ [3, 4].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Хавинсон В.Х., Баринов В.А., Арутюнян А.В., Малинин В.В. Свободнорадикальное окисление и старение. СПб.: Наука, 2003. 327 с.
2. Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation // Journal of Experimental Biology. 1998. Vol. 201. P. 1203–1209.
3. Михайлов В.Ф., Мазурик В.К., Бурлакова Е.Б. Сигнальная функция активных форм кислорода в регуляторных сетях ответа клеток на повреждающие воздействия: участие в реализации радиочувствительности и нестабильности генома // Радиационная биология. Радиоэкология. 2003. Т. 43, № 1. С. 5–18.
4. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function // Physiol. Rev. 2002. Vol. 82. P. 47–95.
5. Bolshakov M.A., Knyazeva I.R., Rostov V.V. et al. Initiation of Free Radical Oxidation in Albino Mice by Exposure to Pulse Periodic Microwaves and X-rays // Biophysics. 2005. Vol. 50. Suppl. 1. P. 104–109.
6. Князева И.Р., Большаков М.А., Жаркова Л.П. и др. Исследование окислительных процессов в тканях белых мышей после кратковременного воздействия импульсно-периодических микроволнового и рентгеновского излучений // Нейрогуморальные механизмы регуляции органов пищеварительной системы в норме и при патологии. Томск: СибГМУ, 2007. С. 89–94.
7. Болдырев А.А. Роль активных форм кислорода в жизнедеятельности нейрона // Успехи физиологических наук. 2003. Т. 34, № 3. С. 21–34.
8. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах // Соросовский образовательный журнал. 2000. № 12. С. 13–19.
9. Gudkova O.Yu., Gudkov S.V., Gapeyev A.B. et al. Study of mechanisms of formation of reactive oxygen species in aqueous solution exposed to high-peak-power pulsed electromagnetic radiation of extremely high frequencies // Biophysics. 2005. Vol. 50, № 5. P. 679–684.
10. Halliwell B., Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? // British Journal of Pharmacology. 2004. Vol. 142. P. 231–255.
11. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? // Neurochemistry journal. 2006. Vol. 97. P. 1634–1658.
12. Шахов В.П., Хлусов И.А., Дамбаев Г.Ц. и др. Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей / Под ред. В.В. Новицкого, В.П. Шахова, И.А. Хлусова, Г.Ц. Дамбаева. Томск: STT, 2004. 386 с.
13. Euroguide on the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes. (Based on the revised Appendix A of the European Convention ETS 123) FELASA: Federation of European Laboratory Animal Science Associations, London, UK. 2007. 17 с. URL: www.felasa.eu
14. Вакс В.Л., Домрачев Г.А., Родыгин Ю.Л. и др. Диссоциация воды под действием СВЧ-излучения // Известия ВУЗов. Радиофизика. 1994. Т. 37, № 1. С. 149–154.

Статья представлена научной редакцией «Биология» 26 января 2010 г.