

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

---

# ВЕСТНИК ТОМСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

## БИОЛОГИЯ

Tomsk State University Journal of Biology

---

---

*Научный журнал*

---

---

2012

№ 3 (19)

Свидетельство о регистрации: ПИ № ФС 77-29499  
от 27 сентября 2007 г.

Журнал «Вестник Томского государственного университета. Биология»  
входит в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов  
и изданий, в которых должны быть опубликованы  
основные научные результаты диссертаций  
на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук»  
Высшей аттестационной комиссии



ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

## НАУЧНО-РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ ТОМСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

**Майер Г.В.**, д-р физ.-мат. наук, проф. (председатель); **Дунаевский Г.Е.**, д-р техн. наук, проф. (зам. председателя); **Ревушкин А.С.**, д-р биол. наук, проф. (зам. председателя); **Катунин Д.А.**, канд. филол. наук, доц. (отв. секретарь); **Берцун В.Н.**, канд. физ.-мат. наук, доц.; **Воробьёв С.Н.**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр.; **Гага В.А.**, д-р экон. наук, проф.; **Галажинский Э.В.**, д-р психол. наук, проф.; **Глазунов А.А.**, д-р техн. наук, проф.; **Голиков В.И.**, канд. ист. наук, доц.; **Горцев А.М.**, д-р техн. наук, проф.; **Гураль С.К.**, д-р пед. наук, проф.; **Демешкина Т.А.**, д-р филол. наук, проф.; **Демин В.В.**, канд. физ.-мат. наук, доц.; **Ершов Ю.М.**, канд. филол. наук, доц.; **Зиновьев В.П.**, д-р ист. наук, проф.; **Канов В.И.**, д-р экон. наук, проф.; **Кузнецов В.М.**, канд. физ.-мат. наук, доц.; **Кулижский С.П.**, д-р биол. наук, проф.; **Парначёв В.П.**, д-р геол.-минер. наук, проф.; **Портнова Т.С.**, канд. физ.-мат. наук, доц., директор Издательства НТЛ; **Потекаев А.И.**, д-р физ.-мат. наук, проф.; **Прозументов Л.М.**, д-р юрид. наук, проф.; **Прозументова Г.Н.**, д-р пед. наук, проф.; **Пчелинцев О.А.**, зав. редакционно-издательским отделом ТГУ; **Рыкун А.Ю.**, д-р социол. наук, доц.; **Сахарова З.Е.**, канд. экон. наук, доц.; **Слизов Ю.Г.**, канд. хим. наук, доц.; **Сумарокова В.С.**, директор Издательства ТГУ; **Сущенко С.П.**, д-р техн. наук, проф.; **Тарасенко Ф.П.**, д-р техн. наук, проф.; **Татьянин Г.М.**, канд. геол.-минер. наук, доц.; **Унгер Ф.Г.**, д-р хим. наук, проф.; **Уткин В.А.**, д-р юрид. наук, проф.; **Черняк Э.И.**, д-р ист. наук, проф.; **Шилько В.Г.**, д-р пед. наук, проф.; **Шрагер Э.Р.**, д-р техн. наук, проф.

### РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ ЖУРНАЛА «ВЕСТНИК ТОМСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА. БИОЛОГИЯ»

**Кулижский С.П.**, д-р биол. наук, проф., зав. каф. почвоведения и экологии почв, директор Биологического института (председатель); **Астафурова Т.П.**, д-р биол. наук, проф., зав. каф. агрономии, директор Сибирского ботанического сада ТГУ (зам. председателя); **Гуреева И.И.**, д-р биол. наук, проф., зав. Гербарием П.Н. Крылова (зам. председателя); **Москвитина Н.С.**, д-р биол. наук, проф., зав. каф. зоологии позвоночных и экологии (зам. председателя); **Акимова Е.Е.**, канд. биол. наук, старший преподаватель кафедры экологической и сельскохозяйственной биотехнологии ТГУ (отв. секретарь); **Кривова Н.А.**, д-р биол. наук, проф.; **Бушов Ю.В.**, д-р биол. наук, проф., зав. каф. физиологии человека и животных; **Данченко А.М.**, д-р биол. наук, проф., зав. каф. лесоведения и зеленого строительства; **Пяк А.И.**, д-р биол. наук, проф. каф. ботаники; **Свиридова Т.П.**, канд. биол. наук, зам. директора Сибирского ботанического сада ТГУ; **Стегний В.Н.**, д-р биол. наук, проф., зав. каф. цитологии и генетики.

## ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

УДК 577.152.1, 57.043, 576.311.347

М.А. Большаков<sup>1,2</sup>, Л.П. Жаркова<sup>1,2</sup>, В.В. Иванов<sup>3</sup>, А.В. Керяя<sup>1,2</sup>,  
И.Р. Князева<sup>1,3</sup>, О.П. Кутенков<sup>2</sup>, В.В. Ростов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Биологический институт Томского государственного университета (г. Томск)

<sup>2</sup>Институт сильноточной электроники СО РАН (г. Томск)

<sup>3</sup>Сибирский государственный медицинский университет (г. Томск)

### ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОСЕКУНДНОГО ИМПУЛЬСНО- ПЕРИОДИЧЕСКОГО МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Работа выполнена в рамках АВЦП «Развитие научного потенциала  
высшей школы (2011)» (проект № 2.1.1/13778).

*Исследовано влияние однократного (4 000 имп.) действия наносекундного импульсно-периодического микроволнового (пиковые плотности потока мощности в пределах 70–1 500 Вт/см<sup>2</sup>) излучения с частотами повторения 10–22 имп./с на активность основных ферментов антиоксидантной системы митохондрий печени мышей (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза), образующих единую метаболическую цепь, которая превращает активные формы кислорода в нетоксичные для организма продукты. Показано, что воздействие может повышать или понижать активность ферментов, изменять соотношение активностей этих ферментов в зависимости от частоты повторения импульсов и интенсивности воздействия. Наибольший эффект наблюдается в изменении активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы, в отличие от глутатионредуктазы, в активный центр которой не входят ионы металлов переменной валентности. Рассматриваются возможные механизмы влияния ИПМИ на биологические процессы, в частности посредством изменения уровня активных форм кислорода.*

**Ключевые слова:** ферменты антиоксидантной защиты; митохондрии; наносекундное импульсно-периодическое микроволновое излучение.

#### Введение

Одной из наиболее характерных особенностей реагирования биологических объектов на воздействие наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения (ИПМИ) является нелинейная зависимость эффектов от частоты повторения импульсов и интенсивности [1–3]. Это позволяет полагать, что в основе реализации влияния лежат нетепловые механизмы действия и/или локальные перегревы, связанные с неоднородностями биологических тканей [3].

Среди прочих одним из эффектов воздействия ИПМИ на организмы является изменение уровня активных форм кислорода (АФК) и последующая окислительная модификация биополимеров [1, 2]. При этом важную роль в развитии окислительных процессов на уровне целого организма играет печень, подтверждением чего являются результаты об изменении уровня перекиси водорода непосредственно в гепатоцитах мышей после воздействия на них ИПМИ [2]. Одним из возможных источников АФК, обеспечивающих окислительную модификацию липидов и белков в клетках, в том числе и в гепатоцитах, могут быть митохондрии, в которых, наряду с нормальным четырехэлектронным восстановлением кислорода до воды, возможно и одноэлектронное восстановление кислорода с образованием супероксид аниона [4, 5]. Эта активная форма кислорода может дисмутировать до перекиси водорода, которая, в свою очередь, способна превращаться в гидроксил-радикал по схеме реакции Фентона. Согласно существующим представлениям [6–8], супероксид анион может образовываться в первом и третьем дыхательных комплексах и дисмутировать под действием супероксиддисмутазы (СОД) с образованием перекиси водорода. Перекись водорода может: а) восстанавливаться глутатионпероксидазой и каталазой до воды, б) выходить в цитоплазму клетки, запуская процессы окислительной модификации, в) супероксид-анион кислорода при высоких концентрациях способствует высвобождению железа из железосерных белков, которое взаимодействует с перекисью водорода в реакции Фентона с образованием агрессивного гидроксил радикала [9–11]. Гидроксил радикал имеет высокую реакционную способность и запускает свободнорадикальное окисление липидов, белков и нуклеиновых кислот.

Для того чтобы осуществлять контроль за уровнем АФК, митохондрии содержат эшелонированную систему антиоксидантных ферментов и механизмов [12]. Эта система включает в себя супероксиддисмутазу, глутатионпероксидазу (ГПО) и глутатионредуктазу (ГР). Супероксиддисмутаз дисмутирует супероксид-анион кислорода с образованием перекиси водорода, которая восстанавливается в глутатионпероксидазной реакции до воды. В этой реакции в качестве субстрата используется глутатион, который восстанавливается глутатионредуктазой. Активация антиоксидантных систем митохондрий может препятствовать избыточной генерации АФК дыхательной цепью и повреждению липидов, белков и других компонентов органелл. Для полной характеристики ферментативной антиоксидантной системы в этих органеллах достаточно иметь представление об активности СОД, ГПО и ГР.

В результате ранее проведенных исследований [2, 13, 14] было показано, что воздействие ИПМИ сопровождается изменением уровня активных форм кислорода, в частности пероксида водорода, изменением объема митохондрий, изменением клеточного дыхания и степени разобщения окисления и фосфорилирования в этих органеллах. Поэтому изучение состояния анти-

оксидантной системы митохондрий позволит получить дополнительную информацию об особенностях влияния ИПМИ на энергетический метаболизм в клетках в результате нарушения окислительно-восстановительного гомеостаза.

Таким образом, целью данного этапа работы было сравнительное исследование активности антиоксидантных ферментов в митохондриях, изолированных из печени мышей, после однократного кратковременного воздействия импульсно-периодического микроволнового излучения с различными частотами повторения импульсов и интенсивностями воздействия.

### **Материалы и методики исследования**

Эксперименты проведены на 96 беспородных белых мышах-самцах массой 25–30 г. Мыши содержались в стандартных условиях при постоянной температуре и влажности, в условиях светового режима 12:12, корм и питье были доступны в любое время суток. Опыты проводились в одно и то же время (в утренние часы) в соответствии с санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник, а также основывались на положениях Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации от 1964 г., дополненной в 1975, 1983 и 1989 гг. [15]. Операции выполнялись с соблюдением требований асептики и антисептики, под общей анестезией [16]. Эксперименты выполнены на суспензии митохондрий, выделенных из печени белых мышей методом дифференциального центрифугирования. Для получения изолированных митохондрий из гепатоцитов мышей использовалась методика Джонсона и Лэрди [17] с небольшими модификациями. Полученная суспензия митохондрий переносилась в пробирку и хранилась на льду. Образцы суспензии митохондрий подвергались однократному воздействию 4000 микроволновых импульсов с частотами повторения в диапазоне 10–22 имп./с. Для сравнения в работе использовались ложнооблученные суспензии митохондрий, которые подвергались аналогичным манипуляциям, что и облученные, но без включения источников излучения. Для каждого из режимов воздействия было выполнено одинаковое количество экспериментов (по 6 повторностей). Длительность воздействия варьировала от 3 до 7 мин в зависимости от частоты повторения импульсов.

Источником ИПМИ служил лабораторный импульсный генератор на основе магнетрона МИ-505 (Россия, несущая частота 10 ГГц, выходная пиковая мощность 180 кВт, длительность импульсов 100 нс). Облучение проводилось из открытого конца волновода сечением  $10 \times 33$  мм. Для оценки интенсивности воздействия измерялась пиковая плотность потока мощности (пППМ) с помощью антенны и детектора по методике, описанной в работе Klimov A.I. et al. [18]. В проведенной работе использовалась интенсивность в диапазоне пППМ от 70 до 1 500 Вт/см<sup>2</sup>. Визуальный контроль характери-

стик микроволновых импульсов (форма и длительность, пиковая мощность) осуществлялся с помощью осциллографа Tektronix TDS 644A (USA).

После облучения митохондрии подвергались разрушению с помощью ультразвукового дезинтегратора Ultrasonic Cell disruptor – модель XL 205 (Heat Systems, USA) трижды по 10 с. Гомогенат митохондрий центрифугировался 30 мин (20 000 g при 4°C), и далее в надосадочной жидкости определялись активность антиоксидантных ферментов и концентрация белка по методу Бредфорда [19]. Определение активности ферментов антиоксидантной защиты проводилось спектрофотометрически с использованием спектрофотометра СФ – 2000 («Спектр», Россия). Активность супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1) определялась по методу, предложенному в [20]; активность глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) – по методу [21]; активность глутатионредуктазы (КФ 1.6.4.2) – по [22].

Полученные результаты подвергались статистической обработке с использованием пакета программ StstSoft STATISTICA 6.0, с помощью которого рассчитывались средняя арифметическая величина показателей и ошибка среднего. Эффект воздействия рассчитывался в процентах по отношению к показателям ложнооблученных образцов. Значимость различий между показателями облученных и ложнооблученных выборок определялась с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни.

## Результаты исследования и обсуждение

**Влияние ИПМИ на активность антиоксидантных ферментов в митохондриях.** На основе проведенных экспериментов установлено, что микроволновые импульсы наносекундной длительности оказывают влияние на активность СОД в изолированных митохондриях печени мышей. Эффект зависит от частоты и интенсивности ИПМИ (табл. 1). После воздействия микроволновыми импульсами минимальной из использованных пППМ – 70 Вт/см<sup>2</sup> (величина средней ППМ 0,07 мВт/см<sup>2</sup>) активность СОД увеличивалась только при частоте 16 имп./с. Воздействие ИПМИ с интенсивностью 700 Вт/см<sup>2</sup> (средняя ППМ 0,7 мВт/см<sup>2</sup>) эффективно снижало активность СОД при частоте повторения 10 имп./с. Воздействие ИПМИ с самой высокой из используемых интенсивностей 1 500 Вт/см<sup>2</sup> (средняя ППМ 1,5 мВт/см<sup>2</sup>) приводило к повышению супероксиддисмутазной активности при частотах 13 и 16 имп./с. Облучение митохондрий ИПМИ с другими исследуемыми параметрами воздействия оказалось неэффективным в отношении изменения активности супероксиддисмутазы.

Воздействие наносекундных микроволновых импульсов на митохондрии оказывает более выраженный эффект на глутатионпероксидазную активность по сравнению с активностью СОД (табл. 2). Облучение ИПМИ с пППМ 70 Вт/см<sup>2</sup> митохондрий приводило к ингибированию на 18,1% активности фермента при частоте 10 имп./с относительно данного показате-

ля в группе ложного облучения. Повышение интенсивности излучения до 700 Вт/см<sup>2</sup> приводило к существенному ингибированию активности на частотах 10, 13 и 16 имп./с на 18,3, 19,8 и 18,5% соответственно. Напротив, при максимальной из использованных интенсивностей 1500 Вт/см<sup>2</sup> глутатионпероксидазная активность повышалась при частотах повторения 13 и 16 имп./с на 11 и 19,1% соответственно.

Таблица 1

**Активность супероксиддисмутазы митохондрий после воздействия ИПМИ**

Частота повторения импульсов, имп./с	пППМ, Вт/см <sup>2</sup>					
	70		700		1 500	
	Ед./мг белка	Эффект, %	Ед./мг белка	Эффект, %	Ед./мг белка	Эффект, %
ЛО	63±3,3		61±4,7		59±5,1	
10	71±3,6	+11,6	46±5,6*	-24,7	56±9,7	-6,5
13	70±4,5	+11	59±8,4	-3,1	72±12,6*	+21,9
16	74±7,8*	+16,6	56±5,9	-8,2	70±5,2*	+18,3
22	70±5,1	+10,3	59±2,2	-2,3	61±5,6	+1,9

*Примечание.* Здесь и далее в таблицах представлены среднеарифметические значения показателя ± ошибка среднего; \* Различия статистически значимы по отношению к группе ложного облучения (ЛО) ( $p \leq 0,05$ ).

Таблица 2

**Активность глутатионпероксидазы митохондрий после воздействия ИПМИ**

Частота повторения импульсов, имп./с	пППМ, Вт/см <sup>2</sup>					
	70		700		1 500	
	нмоль/мин/мг белка	Эффект, %	нмоль/мин/мг белка	Эффект, %	нмоль/мин/мг белка	Эффект, %
ЛО	393 ±24		410 ±7		408 ±4	
10	322 ±18*	-18,1	335 ±31*	-18,3	397 ±11	-2,8
13	376 ±37	-4,2	329 ±14*	-19,8	453 ±8*	+11
16	359 ±27	-8,5	334 ±33*	-18,5	486 ±14*	+19,1
22	356 ±35	-9,4	373 ±25	-9	423 ±8	+3,7

Низкая активность глутатионпероксидазы при интенсивности ИПМИ 700 Вт/см<sup>2</sup> может быть одной из причин обнаруженного ранее увеличения уровня пероксида водорода в митохондриях при этом режиме облучения. Увеличение активности фермента после облучения митохондрий ИПМИ с пППМ 1500 Вт/см<sup>2</sup> также согласуется с обнаруженным ранее снижением уровня пероксида водорода в этих органеллах [2].

Воздействие наносекундных микроволновых импульсов на митохондрии не оказывает существенного влияния на глутатионредуктазную активность (табл. 3) в сравнении с активностью СОД и глутатионпероксидазы. Только после облучения митохондрий ИПМИ с пППМ 700 мВт/см<sup>2</sup> и частотой повторения 13 имп./с происходит статистически значимое ингибирование активности фермента (на 14,9% относительно данного показателя в ложно облу-

ченной группе). Использование ИПМИ с интенсивностями 70 и 1 500 Вт/см<sup>2</sup> оказалось неэффективным в отношении изменения активности глутатионредуктазы в митохондриях при всех использованных частотах повторения импульсов (табл. 3).

Существуют определенные соотношения активности отдельных ферментов антиоксидантной системы, обеспечивающие нужную стационарную концентрацию активных форм кислорода, необходимую для нормального функционирования клеток и одновременно безопасную для мембран и других клеточных структур [23]. Ранее [2, 24] было показано, что в качестве возмущающего агента, способного изменить концентрацию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и O<sup>•-</sup><sub>2</sub>, могут выступать ИПМИ интенсивностью в интервале от 70 до 1 500 Вт/см<sup>2</sup> в импульсе и частотами повторения импульсов 10–22 за секунду. Исходя из этого, можно было ожидать нарушения в сбалансированности антиоксидантных ферментативных систем.

Таблица 3

**Активность глутатионредуктазы в митохондриях после воздействия ИПМИ**

Частота повторения импульсов, имп./с	пППМ, Вт/см <sup>2</sup>					
	70		700		1 500	
	нмоль/мин/ мг белка	Эффект, %	нмоль/мин/ мг белка	Эффект, %	нмоль/мин/ мг белка	Эффект, %
ЛО	99,1 ± 1,6		96,6 ± 6,6		100 ± 1,0	
10	100,1 ± 0,5	+1	108,6 ± 8,3	+12,3	97,3 ± 2,4	-2,8
13	91,1 ± 1,8	-8,1	82,2 ± 1,9*	-14,9	93,7 ± 2,8	-6,3
16	95,3 ± 1,3	-3,8	83,7 ± 3,6	-13,3	99,0 ± 3,0	-1
22	100,9 ± 3,8	+1,8	96,3 ± 5,7	-0,4	93,6 ± 2,6	-6,4

Действительно, в проведенных экспериментах настоящей работы было установлено, что соотношение активности ферментов антиоксидантной защиты изменяется после воздействия ИПМИ. Эти изменения имеют определенную зависимость от интенсивности микроволновых импульсов (см. табл. 1–3). Наибольший эффект наблюдается в изменении активности металлсодержащих ферментов СОД и глутатионпероксидазы, в отличие от глутатионредуктазы, активный центр которых не содержит ионы металлов переменной валентности.

Полученные данные свидетельствуют о том, что влияние ИПМИ на активность ферментов носит разнонаправленный характер. Возможны несколько вариантов изменения соотношения металлсодержащих ферментов (активность глутатионредуктазы после воздействия микроволновых импульсов при всех частотах повторения и интенсивностях значительно не отличалась от показателей в группе ложного облучения):

а) повышение активности СОД и ингибирование глутатионпероксидазы (см. табл. 2), что наблюдается после воздействия ИПМИ интенсивностью 70 Вт/см<sup>2</sup> при всех частотах повторения импульсов. Данный эффект может приводить к накоплению гидропероксида водорода в митохондриях. В этом



случае процесс его образования в реакциях дисмутации супероксида преобладает над восстановлением гидропероксида водорода глутатионпероксидазой. Дополнительная активация СОД и снижение активности глутатионпероксидазы могут привести к повышению концентрации  $H_2O_2$ . Увеличение соотношения активностей СОД/глутатионпероксидаза рассматривают как одну из биохимических характеристик процесса старения, а также некоторых патологий, в основе которых лежит активация свободно-радикального окисления [4, 25, 26]. Увеличение активности глутатионпероксидазы при ингибировании глутатионредуктазы сопровождается снижением уровня основного антиоксиданта в клетках и в митохондриях – восстановленного глутатиона.

б) ингибирование активности обоих исследуемых металлсодержащих ферментов (табл. 1–3), что наблюдается после облучения микроволновыми импульсами со средней из использованных интенсивностей  $700 \text{ Вт/см}^2$ . Это можно объяснить тем, что митохондриальная изоформа фермента Мп-СОД весьма чувствительна к окислительной модификации, обусловленной активными формами кислорода [27, 28]. Обращает на себя внимание тот факт, что при этом ингибирована и глутатионредуктаза. Данное обстоятельство может привести к снижению уровня восстановленного глутатиона с последующей активацией свободнорадикального окисления.

в) повышение активности обоих исследуемых металлсодержащих ферментов, что наблюдается после облучения микроволновыми импульсами со средней из использованных интенсивностей  $1500 \text{ Вт/см}^2$  при 13 и 16 имп./с. Это свидетельствует об активации антиоксидантных систем повышенным уровнем АФК после воздействия ИПМИ высокой интенсивности. Одновременное увеличение активности СОД и глутатионпероксидазы может являться адаптивной реакцией, приводящей к снижению уровня  $H_2O_2$  [2].

Активация СОД в результате действия ИПМИ может быть обусловлена изменением проницаемости митохондриальной мембраны и поступлением ионов кальция в матрикс митохондрий [2]. В аэробных условиях избыточное содержание  $Ca^{2+}$  активирует митохондриальную изоформу фермента СОД 2 (Мп-СОД) в митохондриях печени и миокарда [29, 30]. Поскольку в настоящей работе измерялась общая активность СОД, то её увеличение можно объяснить увеличением активности другой изоформы этого фермента, которая также наличествует в митохондриях печени. В частности, исследования субклеточного распределения СОД показали, что в печени цитозольная форма фермента СОД 1 (Cu, Zn-СОД) локализована наряду с цитозолем и в межмембранном пространстве митохондрий [31, 32]. Супероксиддисмутаза межмембранного пространства СОД 1 (Cu, Zn-СОД) в интактных изолированных митохондриях не активна и активируется вследствие окислительной модификации ее определенных тиоловых групп.  $H_2O_2$  в концентрации  $5 \text{ мкМ}$  или ксантин/ксантиноксидазная система, генерирующая супероксид и  $H_2O_2$ , активируют фермент [33].

Активация СОД из межмембранного пространства в условиях окислительного стресса препятствует снижению трансмембранного потенциала митохондрий, индуцированному ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , уменьшает выход цитохрома С в межмембранное пространство и ингибирование дыхания митохондрий в третьем дыхательном состоянии [25]. Активация фермента играет важную роль в обеспечении нормального функционирования клеток, поскольку в условиях окислительного стресса чрезмерная продукция АФК в дыхательной цепи митохондрий может нарушать трансдукцию гормональных сигналов [25].

Активность глутатионпероксидазы зависит от уровня восстановленного глутатиона (субстрата реакции), который восстанавливается из окисленной формы ферментом глутатионредуктазой. Поэтому снижение активности глутатионредуктазы и, соответственно, восстановленной формы трипептида глутатиона может вызывать накопление в митохондриях  $\text{H}_2\text{O}_2$ , инициирующего открытие поры неспецифической проницаемости и вследствие этого гибель клеток [34].

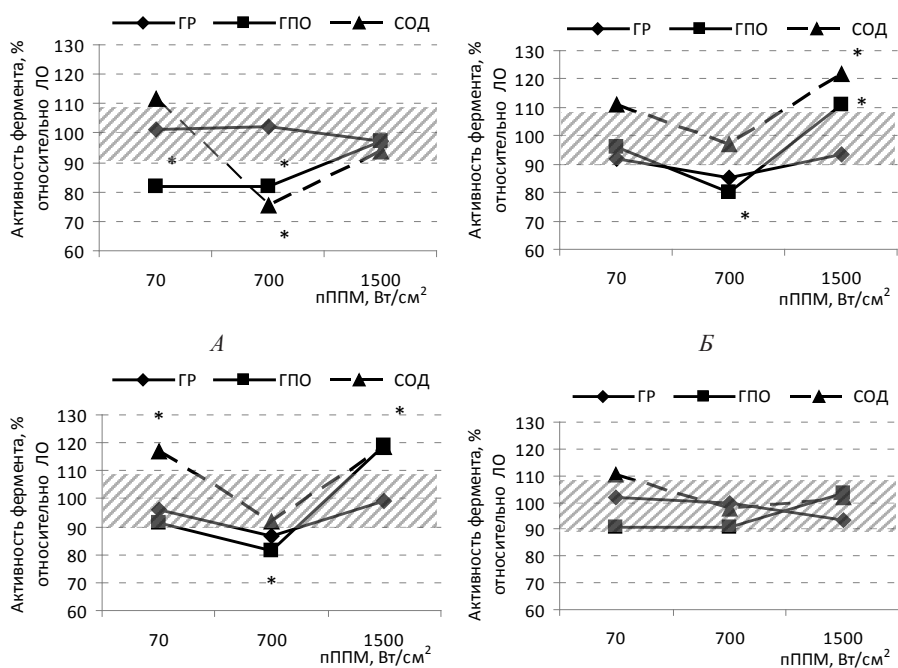


Рис. 1. Соотношение активностей антиоксидантных ферментов в митохондриях после воздействия ИПМИ с частотами повторения импульсов: А – 10 имп./с; В – 13 имп./с; С – 22 имп./с при разных пППМ. Заштрихованное пространство – 95%-ный доверительный интервал среднего значения показателя в ложнооблученных образцах. \* Различия по отношению к показателям ЛО статистически значимы ( $p \leq 0,05$ )

Изменение активности ферментов и их соотношение зависят не только от интенсивности, но и от частоты повторения импульсов (см. рис. 1). В частности, после воздействия ИПМИ с частотой повторения 22 имп./с не наблюдалось изменения активности антиоксидантных ферментов при всех использованных мощностях. Облучение с остальными частотами соотношения активностей исследуемых ферментов изменялись схожим образом при разных интенсивностях воздействия. Разнонаправленность влияния ИПМИ указывает на то, что после воздействия в митохондриях может происходить активация разных компонентов, инициирующих различные механизмы защиты от окислительной модификации биополимеров. Это, в свою очередь, будет являться частью общего физиологического механизма действия ИПМИ на организм.

Физиологические механизмы микроволнового влияния могут быть: а) тепловыми, когда эффект формируется за счет повышения температуры в объекте; б) нетепловыми, когда в результате облучения измеряемый нагрев отсутствует. В случае реализации теплового механизма помимо общего нагрева возможна ситуация, при которой энергия микроволнового импульса трансформируется в быстрый локальный нагрев, что приводит к мгновенному расширению ткани и формированию акустической волны. Акустическая волна механически действует на объект, и это может быть причиной биологического эффекта, как это было установлено применительно к «радиозвуку» [35]. Кроме того, повышение температуры само по себе способно быть причиной биологического действия за счет изменения скоростей биохимических реакций. Однако достаточно широкий класс эффектов не может быть объяснен локальным или общим повышением температуры в облучаемом объекте. В частности, такое возможно при низких уровнях ППМ (единицы – сотни мкВт/см<sup>2</sup>), и при малых длительностях импульсов (десятки нс, аналогичным использованным в настоящей работе). В таких случаях энергия электромагнитного импульса, обеспечивая возбуждение молекул, не успевает трансформироваться в увеличение кинетической энергии ансамбля молекул (нагрев). Реализация эффекта происходит по нетепловой схеме, и при этом весьма существенными являются частота повторения импульсов и их энергия.

На важную роль модуляции в формировании эффектов биологического действия импульсно-периодического радиочастотного излучения, вероятно, впервые обратил внимание Аллан Фрай при исследовании так называемого «радарного» эффекта, или «радиозвука» [35]. Феномен заключался в том, что при действии импульсно-модулированного ЭМИ с несущей частотой около 1 ГГц и средней ППМ в десятки мкВт/см<sup>2</sup> на голову человека последний воспринимает это воздействие в виде звукового сигнала. В качестве объяснения «радиозвука» широкое распространение получила «термоэластическая» модель Джеймса Лина, в соответствии с которой под влиянием микроволновых импульсов с вполне определенными амплитудно-частотными характеристиками имеет место резонансное преобразование электромагнитной энергии

в механические колебания черепа, которые передаются во внутреннее ухо и формируют там ощущение звука, по тональности соответствующего частоте следования микроволновых импульсов [36]. Помимо этого, к настоящему времени установлен достаточно широкий круг эффектов биологического действия импульсно-периодических микроволновых излучений. Показано, что ИПМИ влияют на электрическую активность нервных клеток [37, 38], процессы развития у насекомых [3, 39, 40], частоту сокращения сердца лягушки [41] и изолированной полоски миокарда [42]. Все перечисленные эффекты были зависимы от частоты повторения импульсов и от ПППМ подобно эффектам влияния ИПМИ на ферменты антиоксидантной защиты, представленным в настоящей работе. Такое совпадение может указывать на существование общего механизма формирования биологических реакций на электромагнитное воздействие, предложенного Эйди [43]. Этим американским нейрофизиологом было показано наличие так называемых частотных и энергетических «окон», воздействие в пределах которых характеризуется высокой биологической активностью. Считающиеся ныне классические эксперименты были проведены на изолированном головном мозге цыпленка и кошки. В работах исследовалось связывание  $\text{Ca}^{2+}$  мембраной клеток мозга после воздействия модулированных низкими частотами электрических и электромагнитных полей. Эффект определялся по выходу ионов кальция в межклеточное пространство путём сравнения радиоактивности опытного и контрольного образцов. После облучения мозга цыплят радиочастотным излучением 147 МГц, модулированным низкими частотами (6–25 Гц), наблюдался эффект увеличения выхода ионов кальция из клеток, чего не наблюдалось после немодулированного облучения. Наибольший эффект был достигнут после воздействия излучением, модулированным частотами в диапазоне 9–16 Гц и ПППМ в пределах 0,1–1,0 мВт/см<sup>2</sup>, в то время как при меньшем (0,05 мВт/см<sup>2</sup>) и большем значениях ПППМ значимый эффект отсутствовал [43]. Не исключено, что применительно и к случаю активирующего или ингибирующего действия наносекундного ИПМИ на ферменты антиоксидантной защиты митохондрий механизм имеет общий (аналогичный) характер с механизмом влияния, предложенным Эйди, поскольку параметры ИПМИ, которым облучались ферменты, по частоте повторения (8–22 имп./с) и средней ПППМ (0,5–1,5 мВт/см<sup>2</sup>) были близки к таковым в экспериментах американского исследователя.

Понимание нетеплового механизма (или механизмов) биологического действия импульсно-периодических микроволн чрезвычайно важно с точки зрения фундаментального знания. Одной из посылок для рассмотрения варианта предполагаемого механизма влияния ИПМИ на биообъекты, как нетеплового, является качественная (отчасти и количественная) сопоставимость эффектов влияния импульсно-периодических микроволнового и рентгеновского излучений на одни и те же биологические объекты или процессы. Наличие схожих зависимостей эффектов от частоты повторения импульсов

наблюдалось в экспериментах с дрожжами, с опухолевыми тканями, в опытах на крысах и белых мышах [3, 13, 14, 24, 44], что определённо позволяет предполагать существование общих схем реагирования посредством одинаковых нетепловых механизмов реализации. Скорее всего, при формировании нетепловых эффектов, инициируемых модулированными или импульсно-периодическими воздействиями, необходим механизм клеточного усиления энергетически слабых воздействий в полноценную физиологическую реакцию. Важную роль в реализации такого влияния могут, как предполагал Эйди [43], играть биологические мембраны и ионы кальция. Биологические мембраны как мишень действия ионизирующих излучений рассматривались достаточно давно [45]. Что может объединять механизмы действия импульсного рентгеновского излучения и импульсных микроволн? Не исключено, что в результате воздействия как импульсно-периодического микроволнового, так и рентгеновского излучений генерируется некоторое количество заряженных частиц (ионов, электронов). Эти заряженные частицы в состоянии эффективно влиять на протекание клеточных процессов, нарушая или изменяя их нормальные траектории. В частности, весьма вероятно нарушение клеточного дыхания митохондриями с нарушением переноса электронов в дыхательной цепи, что будет сопровождаться генерацией активных форм кислорода – АФК [46, 47], обеспечивающих окислительную модификацию биополимеров и изменение их функциональной активности.

### **Заключение**

Полученные результаты свидетельствуют об изменении активности и соотношения активности антиоксидантных ферментов в митохондриях после воздействия ИПМИ. Это согласуется с данными об изменении уровня АФК и функционального состояния дыхательной цепи митохондрий из печени мышей [1, 2, 13, 14, 24]. С одной стороны, уровень АФК, изменяющийся после воздействия наносекундных микроволновых импульсов, определяется активностью дыхательной цепи и соотношением ферментов антиоксидантной защиты. С другой стороны, на активность антиоксидантных ферментов может оказывать влияние состояние дыхательной цепи митохондрий. В условиях длительной дисфункции митохондриальной цепи, обусловленной импульсно-периодическими воздействиями, накопленные АФК приводят к окислительной модификации белков, в числе которых могут быть и антиоксидантные ферменты [34, 46, 47].

АФК могут быть радикалами-инициаторами перекисного окисления липидов [47], а также окислительно модифицировать белки и повреждать нуклеиновые кислоты [7, 46]. Все эти процессы контролируются ферментами антиоксидантной защиты, которые, будучи сами подверженными влиянию ИПМИ, способны обеспечивать сложный характер окислительно-восстановительного гомеостаза в клетках и, соответственно, сложную картину реа-

лизации эффектов влияния. При этом эффекты наносекундного импульсно-периодического микроволнового воздействия, сформированные на нижних уровнях организации организма (мембранном, клеточном), выступают в роли физиологических механизмов влияния на более высоких уровнях. Совокупные изменения на мембранном и клеточном уровнях приводят к тому, что на уровне организма функциональные сдвиги могут выходить за границы его адаптивных возможностей, что будет сопровождаться серьезными неблагоприятными последствиями.

### Литература

1. *Bol'shakov 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.
2. *Жаркова Л.П., Князева И.Р., Иванов В.В. и др.* Влияние импульсно-периодического рентгеновского и микроволнового излучений на уровень перекисей в изолированных гепатоцитах // *Вестник Томского государственного университета*. 2010. № 333. С. 161–163.
3. *Большаков М.А., Бугаев С.П., Гончарик А.О. и др.* Воздействие мощного микроволнового излучения наносекундной длительности на некоторые биологические объекты // *Доклады Академии наук*. 2000. Т. 371, № 5. С. 691–695.
4. *Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К.* Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М. : Слово, 2006. 556 с.
5. *Андреев А.Ю., Кушнарева Е.Ю., Старков А.А.* Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях // *Биохимия*. 2005. Т. 70, № 2. С. 246–264.
6. *Szewczyk A., Wojtczak L.* Mitochondria as a pharmacological target // *Pharmacology review*, 2002. Vol. 54. P. 101–127.
7. *Болдырев А.А.* Роль активных форм кислорода в жизнедеятельности нейрона // *Успехи физиологических наук*. 2003. Т. 34, № 3. С. 21–34.
8. *Brookes P.S., Yoon Y., Robotham J.L. et al.* Calcium, ATP, and ROS; a mitochondrial love-hate triangle // *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 2004. Vol. 287. P. 817–833.
9. *Beyer R.E.* An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant // *Biochemistry and Cell Biology*. 1992. Vol. 70. P. 390–403.
10. *Cadenas E., Davies K.J.* Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging // *Free Radic. Biol. Med*. 2000. Vol. 29. P. 222–230.
11. *Raha S., Robinson B.H.* Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing // *Trends of Biochemistry Science*. 2000. Vol. 25. P. 502–508.
12. *Кулинский В.И., Колесниченко Л.С.* Глутатион митохондрий // *Биохимия*. 2007. Т. 72. № 7. С. 856–859.
13. *Жаркова Л.П., Иванов В.В., Князева И.Р. и др.* Изменение объема митохондрий печени мышей после воздействия наносекундных импульсно-периодических микроволнового и рентгеновского излучений // *Вестник Томского государственного университета. Биология*. 2011. № 3 (15). С. 161–171.
14. *Князева И.Р., Иванов В.В., Жаркова Л.П. и др.* Влияние импульсно-периодического микроволнового излучения на функциональную активность изолированных митохондрий печени мышей // *Вестник Томского государственного университета. Биология*. 2011. № 4 (16). С. 125–135.
15. *Euroguide on the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes.* FELASA, 2007. 17 с.

16. Каркищенко Н.Н. Лабораторные животные. М., 2003. 220 с.
17. Jonson D., Lardy H. Isolation of liver or kidney mitochondria // *Methods in Enzymology*. 1969. Vol. 10. P. 94–96.
18. Klimov A.I., Kovalchuk O.V., Rostov V.V. et al. Measurement of Parameters of X-Band High-Power Microwave Superradiative Pulses // *IEEE Transactions on Plasma Science*. 2008. Vol. 36, № 6. P. 1–4.
19. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analyt. Biochemistry*. 1976. Vol. 7, № 1, 2. P. 248–254.
20. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // *Anal. Biochemistry*. 1971. Vol. 44. P. 276–287.
21. Little C., O'Brien P.J. An intracellular GSH-peroxidase with a lipid peroxide substrate // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1968. Vol. 31. P. 145–150.
22. Smith I.K., Vierheller T.L., Thorne C.A. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) // *Anal. Biochemistry*. 1988. Vol. 175, № 2. P. 408–413.
23. Вартамян Л.С., Гуревич С.М., Козаченко А.И. и др. Системный ответ антиоксидантных ферментов на окислительный стресс, вызванный облучением в малых дозах // *Радиационная биология, радиоэкология*. 2000. Т. 40, № 3. С. 285–291.
24. Князева И.П., Большаков М.А., Жаркова Л.П. и др. Исследование окислительных процессов в тканях белых мышей после кратковременного воздействия импульсно-периодических микроволновых и рентгеновских излучений // *Материалы Научной конференции с международным участием «Нейро-гуморальные механизмы регуляции органов пищеварительной системы в норме и при патологии»*, посвящ. 100-летию со дня рождения проф. Е.Ф. Ларина. Томск, 2007. С. 89–94.
25. Cadenas E. Mitochondrial free radical production and cell signaling // *Molecular Aspects of medicine*. 2004. Vol. 25, № 1–2. P. 17–26.
26. Cadenas E., Packer L. *Handbook of Antioxidants (Oxidative Stress and Disease)*. 2nd ed. 2007. P. 602.
27. MacMillan-Crow L.A., Crow J.P., Thompson J.A. Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues // *Biochemistry*. 1998. Vol. 37 (6). P. 1613–1622.
28. MacMillan-Crow L.A., Crow J.P. Does more MnSOD mean more hydrogen peroxide? // *Anticancer Agents Med. Chemistry*. 2011. Vol. 11 (2). P. 178–180.
29. Pérez-Vázquez V., Ramírez J., Aguilera-Aguirre L. et al. Effect of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> on the Mn-superoxide dismutase from rat liver and heart mitochondria // *Amino Acids*. 2002. Vol. 22, № 4. P. 405–416.
30. Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation // *Journal of Experimental Biology*. 1998. Vol. 201. P. 1203–1209.
31. Okado-Matsumoto A., Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria // *Journal of Biological Chemistry*. 2001. Vol. 276, № 42. P. 38388–38393.
32. Iñarrae P., Moini H., Han D. et al. Mitochondrial respiratory chain and thioredoxin reductase regulate intermembrane Cu,Zn-superoxide dismutase activity: implications for mitochondrial energy metabolism and apoptosis // *Biochemical Journal*. 2007. Vol. 405, № 1. P. 173–179.
33. Fernandez-Checa J.C., Kaplowitz N. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005. Vol. 204. (3). P. 263–273.
34. Chiarugi A. “Simple but not simpler”: toward a unified picture of energy requirements in cell death // *FASEB Journal*. 2005. Vol. 19 (13). P. 1783–1788.

35. Frey A.H. Human auditory system response to modulated electromagnetic energy // Journal Appl. physiol. 1962. Vol. 17. P. 689–692.
36. Lin J.C. The microwave auditory phenomenon // Proc. IEEE. 1980. Vol. 68(1). P. 67–73.
37. Seaman R.L., Wachtel H. Slow and rapid responses to CW and pulsed microwave radiation by individual *Aplysia* pacemakers // J. Microwave Power. 1978. Vol. 13. P. 77–86.
38. Bolshakov M.A., Alekseev S.I. Bursting responses of *Lymnaea* neurons to microwave radiation // Bioelectromagnetics. 1992. Vol. 13(2). P. 119–129.
39. Буренков М.С., Буренкова Л.А., Коротков Ю.С. и др. Влияние микроволн 1–4 ГГц на развитие клеща *Hyalomma asiaticum* // Радиационная биология. Радиоэкология. 1996. Т. 36(5). С. 681–685.
40. Большаков М.А., Князева И.П., Линдт Т.А., Евдокимов Е.В. Воздействие импульсно-модулированного низкими частотами ЭМИ 460 МГц на эмбрионы дрозофил // Радиационная биология. Радиоэкология. 2001. Т. 41(4). С. 399–402.
41. Grigoriev Yu.G. The roul of modulation in the development of EMF somatic effects. In: Electromagnetic fields: biological effects and hygienic standartisation / Eds. by M.H. Rappacholi, N.B. Rubtsova, A.M. Muc. Geneva : World Health Organization, 1999. P. 31–43.
42. Pakhomov A.G., Mathur S.P., Doile J. et al. Comparative effects of extremely high power microwave pulses and a brief CW irradiation on pacemaker function in isolated frog heart slices // Bioelectromagnetics. 2000. Vol. 21(4). P. 245–254.
43. Adey W.R. Tissue interaction with nonionising electromagnetic fields // Phys. Rev. 1981. Vol. 61(2). P. 435–514.
44. Rostov V.V., Bolshakov M.A., Buldakov M.A. et al. Suppression of division of tumor cells exposed to nanosecond powerful microwave or X-ray pulse trains // Published in Proc. Of 2-nd European Pulsed Power Simposium, DESY. Hamburg, Germany, 2004. P. 62–66.
45. Кудряшов Ю.Б. Радиационная биофизика. Ионизирующие излучения. М. : Физматлит, 2004. 442 с.
46. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода // Соросовский образовательный журнал. 2001. Т. 7, № 6. С. 4–10.
47. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах // Соросовский образовательный журнал. 2000. № 12. С. 13–19.

Поступила в редакцию 03.04.2012 г.

*Tomsk State University Journal of Biology. 2012. № 3 (19). P. 122–136*

Michail A. Bolshakov<sup>1,2</sup>, Lubov P. Zharkova<sup>1,2</sup>, Vladimir V. Ivanov<sup>3</sup>,  
Irekle R. Knyazeva<sup>1,3</sup>, Anna V. Kereya<sup>1</sup>, Oleg P. Kutenkov<sup>2</sup>, Vladislav V. Rostov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Biological Institute of Tomsk State University, Tomsk, Russia*

<sup>2</sup>*Institute of High-Current Electronics of Siberian Division  
of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia*

<sup>3</sup>*Siberian State Medical University, Tomsk, Russia*

#### THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES OF LIVER MITOCHONDRIA OF MICE AFTER EXPOSURE TO NANOSECOND REPETITIVE PULSED MICROWAVE

*The effect of nanosecond pulse-periodic microwave and X-rays on the liver mitochondria of mice was investigated. As impact indicators used an optical density*



*of the suspension of mitochondria, showing the volumetric characteristics of these organelles. It was revealed that after irradiation a volume of mitochondria in suspension may vary. Effect depended on the pulse repetition frequency, the intensity or dose of exposure, the nature of the factor, as well as the absence or presence of calcium ions in the incubation medium. It could be seen as reducing the volume of mitochondria (in most cases) so their swelling after the exposure. The reasons for the decline of volume of mitochondria could be breaks in the inner membrane of mitochondria. That breaks provided not compensated exit of ions from the matrix, which initiated the water outflow from the mitochondria. Swelling may be due to input cations (primarily ions  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ) through nonspecific pores in conformity with the electric field gradient. Cations accumulate in the matrix with the simultaneous accumulation of phosphate anion. As a result of this ions accumulation the osmotic pressure within mitochondria increases and it leads to the entrance of water into the mitochondria and swelling. This may be caused by the modulating influence of pulse-periodic microwave and X-rays on the sensitivity of nonspecific permeability of mitochondria inner membrane to calcium ions.*

**Key words:** *antioxidant enzymes; mitochondria; nanosecond repetitive pulsed microwave.*

*Received April 3, 2012*