

БИОЛОГИЯ

УДК 577.3.043:537

*Л.П. Жаркова, К.В. Афанасьев, М.А. Большаков, И.Р. Князева, В.В. Ростов***ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ИМПУЛЬСНО-ПЕРИОДИЧЕСКОГО РЕНТГЕНОВСКОГО И МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЙ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ С ПОМОЩЬЮ ИЗМЕРЕНИЯ ИМПЕДАНСНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК**

Исследовалась возможность использования импедансных диаграмм для оценки биологического действия импульсно-периодического микроволнового (ИПМИ) и импульсно-периодического рентгеновского излучений (ИПРИ). Показано, что однократное пятиминутное воздействие ИПМИ и ИПРИ вызывает смещение импедансных диаграмм Коула – Коула и изменение коэффициента поляризации в крови и суспензии митохондрий гепатоцитов мышей. Эффект различен для крови и митохондрий, зависит от вида излучений и частоты повторений импульсов. Полученные результаты указывают на возможность использования метода измерения электропроводности как индикатора биологического действия импульсно-периодического микроволнового и рентгеновского излучений.

При исследовании биологического действия импульсно-периодического микроволнового и импульсно-периодического рентгеновского излучений было установлено, что эффекты воздействия зависят от частоты повторения импульсов, диапазон которых варьировал в пределах единицы – десятки импульсов за секунду (с^{-1}). Это оказалось справедливым применительно к различным биологическим процессам и показателям: индивидуальному развитию дрозофилы [1, 2], опухолевой ткани [3–5], биохимическим показателям крови крысы [6] и гепатоцитов мышей [7], уровню перекисного окисления липидов (ПОЛ) и уровню карбонилирования белков в сыворотке крови и гепатоцитах мышей [7, 8]. Уровни окислительной модификации липидов и белков демонстрировали сложную динамику изменения после воздействия импульсно-периодических излучений, что могло отображать сложную схему формирования этих изменений [8]. Было высказано предположение, что одной из критических клеточных структур, ответственных за формирование биологического эффекта, могут выступать мембраны.

Применительно к мембранным структурам следовало ожидать, что после облучения объектов ИПМИ и ИПРИ физико-химические свойства биомембран, обусловленные окислительной модификацией биополимеров, могут динамично меняться, что должно отразиться на функциональном состоянии клеток. Поэтому возникает задача оперативного и объективного оценивания физико-химического состояния мембран. Как представляется, одним из удобных методов для решения данной задачи является диэлектрометрия, основанная на измерении электропроводности клеток [9]. Методы диэлектрометрии широко использовались в практике биологических исследований в 50–60-х гг. XX в. Однако в последующие годы данные методы исследования выпали из исследовательской практики в связи с несовершенством техники измерения. Начиная с 90-х гг. методы диэлектрометрии вновь нашли своё применение сначала в геофизике [10] и медицине [11, 12], а затем стали использоваться в биологических исследованиях, в частности при оценке состояния биологических мембран [13, 14]. Результаты последних указанных исследований стимулировали интерес к использо-

ванию метода измерения электропроводности как индикатора состояния биомембран.

При прохождении переменного электрического тока через сложные структуры, в том числе и биологические, наблюдается дисперсия электропроводности (сопротивления), т.е. зависимость измеряемой электрической величины от частоты тока. Принято выделять три области дисперсии (α -, β - и γ -дисперсии), причём область α - и β -дисперсии во многом связана с физико-химическим состоянием биомембран. Одним из наиболее простых критериев оценки состояния биологического объекта является зависимость от частоты действительной ϵ' и мнимой ϵ'' частей комплексной диэлектрической проницаемости. Для описания зависимости ϵ' и ϵ'' используется эмпирическое уравнение К. Коула и Р. Коула [15–17]:

$$\epsilon^* = \epsilon' - i\epsilon'' = \epsilon_\infty + \epsilon_0 - \epsilon_\infty / (1 - (i\omega\tau)^{-1-\alpha})$$

На практике строятся импедансные диаграммы Коула – Коула, показывающие зависимость омического сопротивления от ёмкостного в некотором диапазоне частот переменного электрического тока. Кроме того, функциональное состояние клеток можно оценивать по величине коэффициента поляризации (жизнеспособности) $K_n = R(10^4)/R(10^6)$, т.е. отношения омического сопротивления на частоте 10^4 Гц к сопротивлению на частоте 10^6 Гц [14]. Чем ниже значение K_n , тем ниже уровень функционального состояния клеток (мембран), и наоборот. В норме коэффициент поляризации может варьировать в пределах 2–15. При необратимых повреждениях или гибели клеток величина K_n приближается к 1.

Исходя из вышесказанного, цель настоящей работы заключалась в оценке возможности использования электрических характеристик крови и суспензии митохондрий из печени мышей как индикатора воздействия ИПМИ и ИПРИ на тест-объекты.

Материал и методы исследования. Эксперименты выполнены с использованием цельной крови и суспензии митохондрий из печени беспородных белых мышей-самцов массой 25–30 г. Ввод в эксперимент (эвтаназия) животных проводился путем декапитации. Забор крови производился в пробирки с раствором гепарина (1 000 ед./мл крови). Митохондрии выделялись из свежих образцов ткани печени в соот-

ветствии со стандартной методикой получения суспензии митохондрий [18].

Образцы крови и митохондрий печени каждого животного делились на опытные (подвергавшиеся облучению) и ложнооблученные пробы. Тест-образцы объемом 1 мл заливались в измерительные ячейки, электроды которых подключались к прибору для измерения электрических характеристик тканей «Измеритель иммитанса E7-20» (ОАО «МНИПИ», Республика Беларусь). Измерение сопротивления (омического и ёмкостного) проводилось на частотах электрического тока от 25 Гц до 1 МГц, по результатам которого строились диаграммы Коула – Коула и рассчитывались коэффициенты поляризации. Эффект воздействия оценивался по сдвигу усреднённых по 6 повторам импедансных диаграмм и по изменению усреднённых значений коэффициента поляризации.

Суспензии митохондрий и кровь подвергались однократному воздействию импульсно-периодического микроволнового и рентгеновского излучений с частотами повторения импульсов 10, 13, 16 и 25 с⁻¹. Выбор частот повторения импульсов основывался на ранее проведенных экспериментах по изучению действия ИПМИ и ИПРИ на биохимические показатели крови крысы [6] и гепатоцитов мышей [7], уровень ПОЛ и карбонилирования белков в сыворотке крови и гепатоцитах мышей [7, 8]. Количество облучающих импульсов во всех случаях составляло 4000 за сеанс.

Источником ИПМИ служил лабораторный импульсный генератор на основе магнетрона МИ-505 (Россия, частота генерации импульсов 10 ГГц, пиковая мощность 180 кВт, длительность импульсов на половинном уровне мощности 100 нс). Облучение проводилось из открытого конца волновода сечением 10×33 мм, что обеспечивало воздействие со средней величиной плотности потока мощности 1,7 мВт/см². Интенсивность воздействия оценивалась по величине удельной поглощённой мощности (УПМ), которая определялась на основе измерения на-

грева тканей волоконно-оптическим термометром МТ-4МО-1 (Россия). Величина средней УПМ составила 1,6 Вт/кг при частоте повторения импульсов 10 с⁻¹ и 4 Вт/кг при частоте 25 с⁻¹.

В качестве источника ИПРИ использовалось тормозное излучение ускорителя Синус-150 (Россия, ускоряющее напряжение 300 кВ, ток электронного пучка 2,5 кА, длительность импульса на полувысоте 4 нс). Во время облучения животные размещались на расстоянии 15 см от анода ускорителя. На данном расстоянии поглощенная доза тормозного рентгеновского излучения составляла 20 мкГр за импульс, суммарная поглощенная доза 80 мГр. Измерение поглощенной дозы производилось с помощью термолюминесцентных LiF-детекторов в комплекте поверенного дозиметра КДМ-02М и электростатического дозиметра с кварцевым волокном Agrow-Tech 138 (Agrow-Tech, Inc. США).

Результаты и обсуждение. Влияние ИПРИ и ИПМИ на электрические характеристики суспензий митохондрий. Митохондрии являются важнейшими клеточными органеллами, в которых свободная химическая энергия пищевых субстратов переводится в энергию макроэргических связей АТФ и в дальнейшем расходуется на метаболические потребности клетки. В тех случаях, когда ИПМИ и ИПРИ могут оказывать влияние на функционирование митохондрий, возможны изменения внутриклеточных процессов и клеточных реакций, регистрируемые как эффект воздействия.

В проведенных экспериментах было обнаружено изменение импедансных характеристик в облучённых суспензиях митохондрий и крови. Эффект ИПРИ наблюдался после воздействия при всех частотах повторения импульсов (рис. 1). После воздействия ИПМИ с частотами повторения 10, 13 и 19 с⁻¹ также происходит значимое снижение активной и реактивной компонент сопротивления (рис. 2), в то время как после воздействия с частотой повторения 25 с⁻¹ эффекта не наблюдается (рис. 3).

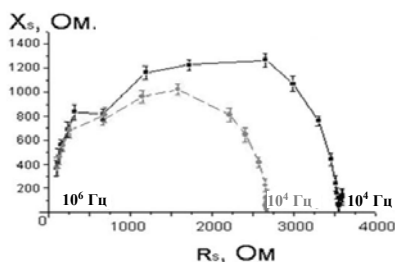


Рис. 1. Диаграмма Коула – Коула, отображающая импедансные характеристики суспензий митохондрий облученных и ложнооблученных образцов после воздействия ИПРИ с частотой 19 с⁻¹. По оси абсцисс – омическое сопротивление (R_s), по оси ординат – емкостное сопротивление (X_s). Сплошная линия соответствует данным до воздействия, пунктирная – после воздействия. Диаграмма показывает изменения импеданса от 10⁶ Гц. Представлены средние арифметические значения величин ± ошибки средних значений с уровнем значимости $p \leq 0,05$

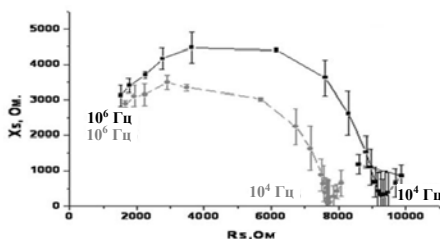


Рис. 2. Диаграмма Коула – Коула, отображающая импедансные характеристики суспензий митохондрий облученных и ложнооблученных образцов после воздействия ИПМИ с частотой 13 с⁻¹. Обозначения те же, что и на рис. 1

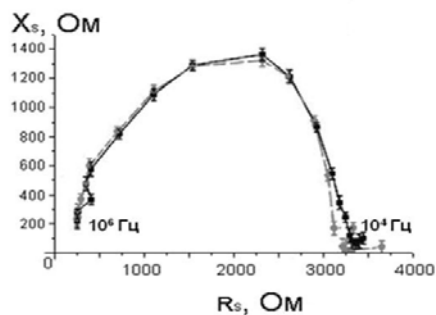


Рис. 3. Диаграмма Коула – Коула, отображающая импедансные характеристики суспензий митохондрий облученных и ложнооблученных образцов после воздействия ИПМИ с частотой 25 с^{-1} . Обозначения те же, что и на рис. 1

Сдвиг импедансных диаграмм суспензий митохондрий свидетельствует о снижении омического и ёмкостного сопротивления. Попытки объяснения эффектов импульсно-периодических излучений, вероятно, следует связывать с возможным воздействием на мембраны и мембранные комплексы. Изменения в этих системах могут быть взаимосвязаны между собой, влияя друг на друга и на итоговый результат, в зависимости от параметров воздействия. Например, в случае ионизирующего излучения необходимо учитывать, что импульс воздействия создает в клетке ряд ионизированных пар, электронов и возбужденных молекул. Образовавшиеся повреждающие агенты способны инициировать окислительные процессы, приводящие к повреждению многих структур клетки. Влияние ионизирующего излучения на мембраны можно объяснить исходя из значительной

доли липидов, что важно с точки зрения теории мишеней, а также развитой поверхностью мембран, прежде всего внутренних мембран митохондрий. Всё это должно повышать вероятность развития процессов окислительной модификации в этих мембранах с последующими нарушениями структур и функций. Нарушение барьерных функций мембран в связи с их повреждением приводит и к изменению функциональных характеристик митохондрий, на что прямо указывает уменьшение значений коэффициента поляризации (таблица). В последующем это может отразиться на изменении клеточного метаболизма либо дефицитом АТФ, либо, если нарушается работа дыхательной цепи, генерацией избыточного количества активных форм кислорода (АФК), что в соответствии с гипотезой Скулачёва [19] может запустить митоптоз и/или апоптоз.

Значения коэффициента поляризации (Кп) суспензии митохондрий гепатоцитов после воздействия ИПРИ и ИПМИ

Частота, с^{-1}	ИПРИ		ИПМИ	
	Кп ложнооблученной пробы	Кп облученной пробы	Кп ложнооблученной пробы	Кп облученной пробы
10	$6,5 \pm 0,07$	$3,7 \pm 0,04$	$15,3 \pm 0,07$	$3,9 \pm 0,05$
13	$5,3 \pm 0,02$	$3,5 \pm 0,00$	$4,4 \pm 0,06$	$4,6 \pm 0,02$
19	$10,5 \pm 0,18$	$6,2 \pm 0,08$	$6,0 \pm 0,47$	$4,6 \pm 0,21$
25	$5,9 \pm 0,22$	$6,1 \pm 0,29$	$5,9 \pm 0,45$	$4,9 \pm 0,30$

Влияние ИПРИ и ИПМИ на электрические характеристики крови. Воздействие ИПРИ на кровь при всех частотах повторения импульсов, в отличие от результатов воздействия на суспензии митохондрий, не оказывало значимого влияния на электропроводность. Это проявилось в отсутствии различия между импедансными диаграммами и коэффициентами поляризации облученных и ложнооблученных образцов. После воздействия ИПМИ, в отличие от результатов действия ИПРИ, при всех частотах повторения импульсов обнаружилось ста-

тистически значимое смещение импедансных диаграмм (рис. 4). Сдвиг диаграмм Коула – Коула указывает на увеличение как активного, так и реактивного компонента импеданса крови. Это может быть следствием физико-химических изменений в мембранах всех клеточных элементов крови, равно как и в белках плазмы. Полученные данные подтверждают эффективность воздействия ИПМИ на систему крови, ранее показанную в экспериментах с определением уровней окислительной модификации липидов и белков [6–8].

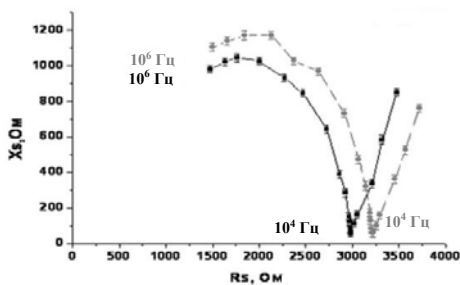


Рис. 4. Диаграмма Коула – Коула отображающая импедансные характеристики цельной крови облученных и ложнооблученных образцов после воздействия ИПМИ с частотой 13 с^{-1} . Обозначения те же, что и на рис. 1

В доступной литературе не удалось обнаружить сведений об использовании метода диэлектротметрии для оценки эффектов воздействия ИПРИ и ИПМИ. Проведенные эксперименты подтвердили возможность использования метода измерения электропроводности как индикатора биологического действия импульсно-периодического микроволнового и рентгеновского излучений.

Удалось показать, что однократное кратковременное воздействие указанными факторами способно инициировать изменение функционального состояния митохондрий гепатоцитов мышей. При этом эффект воздействия ИПМИ может зависеть от частоты повторения импульсов, но природа этой зависимости остается пока не ясной.

Воздействие на цельную кровь мышей ИПРИ и ИПМИ с аналогичными характеристиками выявило иной характер реагирования. Было обнаружено увеличение сопротивления крови после воздействия ИПМИ при всех частотах повторения импульсов и отсутствие значимого влияния после воздействия ИПРИ. Полученные результаты дают возможность констатировать, что использование метода измерения электропроводности биологических сред и тканей может быть удобным и полезным инструментом для обнаружения эффектов ИПРИ и ИПМИ в разных вариантах их реализации при решении широкого круга задач. Знание особенностей реагирования различных типов клеток и тканей позволит глубже понять механизмы биологического действия импульсно-периодических факторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Большаков М.А.* Воздействие мощного микроволнового излучения наносекундной длительности на некоторые биологические объекты / М.А. Большаков, С.П. Бугаев, С.Д. Коровин и др. // Доклады РАН. – 2000. – Т. 371, № 5. – С. 691–695.
2. *Большаков М.А.* Продолжительность жизни и фертильность дрозофилы после импульсно-периодического рентгеновского облучения на постэмбриональных стадиях развития / М.А. Большаков, О.К. Либрихт, И.П. Князева и др. // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2007. – Т. 47, № 1. – С. 22–27.
3. *Литвяков Н.В.* Влияние импульсно-периодического СВЧ-излучения на синтез нуклеиновых кислот в опухолевых клетках / Н.В. Литвяков, М.А. Булдаков, Н.В. Чердынцева и др. // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2005. – Т. 45, вып. 4. – С. 460–463.
4. *Литвяков Н.В.* Ингибирование пролиферации опухолевых клеток импульсно-периодическим рентгеновским излучением / Н.В. Литвяков, В.В. Ростов, М.А. Булдаков и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2006. – № 1 (17). – С. 24–31.
5. *Litvyakov N.V.* Apoptosis-Inducing Effect of Pulse Periodic X-rays on Tumor Cells / N.V. Litvyakov, V.V. Rostov, M.A. Buldakov etc. // Biophysics. – 2005. – Vol. 50, suppl. 1. – P. 51–58.
6. *Большаков М.А.* Оценка некоторых показателей метаболической функции печени крыс после воздействия импульсно-периодического рентгеновского или микроволнового излучений / М.А. Большаков, М.С. Коровин, В.И. Гриднева и др. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2005. – № 3. – С. 70–74.
7. *Князева И.П.* Исследование окислительных процессов в тканях белых мышей после кратковременного воздействия импульсно-периодических микроволнового и рентгеновского излучений / И.П. Князева, М.А. Большаков, Л.П. Жаркова // Нейрогуморальные механизмы регуляции органов пищеварительной системы в норме и при патологии. – Томск: СибГМУ, 2007. – С. 89–94.
8. *Bolshakov M.A.* Initiation of Free Radical Oxidation in Albino Mice by Exposure to Pulse Periodic Microwaves and X-rays / M.A. Bolshakov, I.R. Knyazeva, V.V. Rostov etc. // Biophysics. – 2005. – Vol. 50, suppl. 1. – P. 104–109.
9. *Седунов Б.И.* Диэлектрическая проницаемость биологических объектов / Б.И. Седунов, Д.А. Франк-Каменецкий // Успехи физических наук. – 1963. – Т. LXXIX, вып. 4. – С. 617–639.
10. *Triantis D.* Dielectric spectroscopy in crustal rocks: preliminary results from northeastern sicily (Italy) and the gulf of corinth (Greece) / D. Triantis, I. Stavarakas, C. Anastasiadis etc. // Bulletin of the Geological Society of Greece. – 2004. – Vol. 36. – P. 1925–1931.
11. *Estrella da Silva J.* Classification of breast tissue by electrical impedance spectroscopy / J. Estrella da Silva, J.P. Marques de Sa, J. Jossinet // Medical & Biological Engineering & Computing. – 2000. – Vol. 38. – P. 6–30.
12. *Мартиросов Э.Г.* Технологии и методы определения состава тела человека / Э.Г. Мартиросов, Д.В. Николаев, С.Г. Руднев. – М.: Наука, 2006. – С. 102–126.
13. *Озерова Е.С.* Электрические свойства клеток водоросли *Chlorella pyrenoidosa* / Е.С. Озерова, С.В. Константиновская, Ю.Ф. Перов и др. // Вестн. РУДН. Сер. Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2005. № 1 (11). – С. 13–18.
14. *Озерова Е.С.* Анализ электрических свойств суспензии клеток водоросли *Chlorella pyrenoidosa* S-39 с помощью импедансных диаграмм / Е.С. Озерова, С.В. Константиновская, Ю.Ф. Перов и др. // Вестн. РУДН. Сер. Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2006. – № 1 (13). – С. 20–28.
15. *Cole K.S.* Electrical impedance of suspensions of spheres / K.S. Cole // The Journal of General Physiology. – 1928. – Vol. 12. – P. 29–36.
16. *Cole K.S.* Dispersion and absorption in dielectrics. II. Direct current characteristics / K.S. Cole, R.H. Cole // J. Chem. Phys. – 1942. – Vol. 10. – P. 98–105.
17. *Шван Х.П.* Воздействие высокочастотных полей на биологические системы: Электрические свойства и биологические механизмы / Х.П. Шван, К.Р. Фостер // ТИИЭР. – 1980. – Т. 68, № 1. – С. 121–132.
18. *Pallotti F.* Isolation and subfractionation of mitochondria from animal cells and tissue culture lines / F. Pallotti, G. Lenaz // Methods Cell Biology. – 2001. – Vol. 65. – P. 1–35.
19. *Скулачѐв В.П.* Явление запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода / В.П. Скулачѐв // Соросовский образовательный журнал. – 2007. – Т. 7, № 2. – С. 4–10.

Статья представлена научной редакцией «Биология» 6 мая 2008 г.