

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОСЕКУНДНОГО ИМПУЛЬСНО-ПЕРИОДИЧЕСКОГО РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

© 2013 г. И. Р. Князева^{1,2*}, В. В. Иванов¹, М. А. Большаков^{2,3}, Л. П. Жаркова^{2,3}, А. В. Керяж^{2,3}, О. П. Кутенков², В. В. Ростов²

¹ Сибирский государственный медицинский университет, Томск

² Институт сильноточной электроники СО РАН, Томск

³ Томский государственный университет

Исследовано влияние импульсно-периодического рентгеновского излучения (ИПРИ) (длительность импульса на полувывоте 4 нс, ускоряющее напряжение 300 кВ, ток электронного пучка 2.5 кА) на активность ферментов антиоксидантной системы митохондрий печени белых мышей. В ходе исследования суспензии митохондрий подвергали однократному воздействию 4 000 рентгеновских импульсов с частотами повторения в диапазоне 10–22 за 1 с, доза в импульсе $0.3–1.8 \times 10^{-6}$ Гр/имп. в суммарной поглощенной дозе за сеанс облучения до 7.2×10^{-3} Гр. Установлено, что воздействие ИПРИ изменяет активность и соотношение активностей ферментов антиоксидантной защиты. Наибольший эффект наблюдался в изменении активности металлосодействующих ферментов супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы. Эффект зависит от частоты повторения импульсов и дозы излучения.

Наносекундное импульсно-периодическое рентгеновское излучение, митохондрии, антиоксидантные ферменты.

DOI: 10.7868/S0869803113010050

Появление источников импульсного рентгеновского излучения, а именно импульсно-периодического рентгеновского излучения (ИПРИ), создает необходимость изучения действия данного фактора на живые системы с точки зрения определения характера влияния (стимулирующий или ингибирующий) и механизмов действия. Источники импульсного рентгеновского излучения, работающие в импульсно-периодическом режиме, способны генерировать импульсы с частотой повторения от единиц до сотни герц, длительностью единицы–десятки наносекунд и уровнем поглощенной дозы от 10 мкГр до единиц мГр за импульс [1, 2].

Биологическое действие этих видов излучений гораздо менее изучено в сравнении с непрерывными. Тем не менее к настоящему времени проведен широкий круг исследований, направленных на установление первичных механизмов и общих закономерностей влияния данного фактора на живые объекты. Установлено, что ИПРИ при воз-

действии в относительно низких суммарных дозах оказывает выраженный биологический эффект. Оно способно изменять продолжительность жизни и плодовитость дрозофил [3], инициировать у крыс и мышей изменение морфологических и биохимических показателей крови и печени [4–6], изменять пролиферативную активность клеток [7] и функциональное состояние митохондрий [8, 9]. Существенным оказалось то, что после облучения организма, в частности, организма мышей в печени животных изменяется уровень содержания активных форм кислорода (АФК) [10] и происходит окислительная модификация биополимеров [4, 6].

Одним из возможных источников АФК, в том числе и в гепатоцитах, могут быть митохондрии, в которых, наряду с нормальным четырехвалентным восстановлением кислорода до воды, возможно и одноэлектронное восстановление кислорода с образованием O_2^- [11, 12]. Последний может претерпевать дисмутацию с образованием H_2O_2 [13, 14], а также при высоких концентрациях способствует высвобождению железа из железосерных белков, которое при взаимодействии с

* Адресат для корреспонденции: 634050 Томск, Московский тракт, 2, Сибирский государственный медицинский университет; тел.: (3822) 52-93-64; e-mail: knyazeva_irekle@mail.ru.

H_2O_2 образует агрессивный гидроксил-радикал [15–18].

Для контроля над уровнем АФК митохондрии содержат эшелонированную систему антиоксидантных ферментов и механизмов [19]. В частности, в митохондриях печени эта система включает в себя супероксиддисмутазу (СОД), глутатионпероксидазу (ГП) и глутатионредуктазу (ГР). СОД дисмутирует O_2^- с образованием H_2O_2 , который восстанавливается в глутатионпероксидазной реакции до воды. В этой реакции как субстрат используется глутатион, который восстанавливается с помощью ГР. Активация антиоксидантных систем митохондрий может препятствовать избыточной генерации АФК дыхательной цепью и повреждению мембран, белков и других структурных компонентов биоорганелл [19].

По имеющимся литературным данным, импульсное (непрерывное) ионизирующее излучение в малых дозах оказывает влияние на активность ферментов антиоксидантной защиты [20, 21]. В то же время влияние импульсно-периодического рентгеновского излучения на состояние систем антиоксидантной защиты митохондрий не изучено. Исходя из этого, цель работы – сравнительное исследование активности антиоксидантных ферментов в изолированных митохондриях печени мышей после воздействия ИПРИ в различных дозах и при разной частоте повторения импульсов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Характеристика экспериментального объекта. Эксперименты проведены на изолированных митохондриях из печени 144 беспородных белых мышей-самцов массой 25–30 г разводки питомника НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН (г. Томск). Животных содержали в стандартных условиях при постоянной температуре и влажности, в условиях светового режима 12 ч : 12 ч, не более чем по 10 мышей в клетке. Доступ к стандартному гранулированному корму и воде у животных был неограниченным. Перед проведением каждого эксперимента животные находились под наблюдением (в карантине) в течение не менее 14 сут. После окончания карантина мышей распределяли на группы методом случайного отбора, больных и ослабленных животных в эксперимент не брали. Опыты проводили в одно и то же время суток (в утренние часы). При проведении исследований выполнялись требования нормативно-правовых актов о порядке экспериментальной работы с использованием животных, в том числе по гуманному обращению с ними: “Этический кодекс” (1985), включающий раздел “Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием жи-

вотных”, а также основываясь на положениях Хельсинской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации от 1964 г., дополненной в 1975, 1983 и 1989 гг.

Выделение митохондрий из печени мышей. Для получения изолированных митохондрий из гепатоцитов мышей использовали модифицированную методику [22]. Каждую экспериментальную пробу суспензии митохондрий выделяли из целой печени. Все манипуляции, связанные с забором материала и выделением субклеточных фракций, проводились при температуре от 0 до +4°C. Печень освобождали от крови путем перфузии *in situ*, охлажденной до 0°C, средой выделения, содержащей 0.3 моль/л раствор сахарозы, 1 ммоль/л раствор ЭДТА, 10 ммоль/л Трис-буфер, рН 7.4. Ткань гомогенизировали в 15 мл среды выделения в течение 30–40 с и гомогенат центрифугировали на рефрижераторной центрифуге “ЦРЛ-1” 5 мин при 5 000 g при 0...+2°C. Надосадочную жидкость использовали для выделения митохондриальной фракции путем центрифугирования 5 мин при 10 000 g. Осадок митохондрий тщательно ресуспендировали в среде, содержащей 0.3 моль/л раствора сахарозы и 20 ммоль/л Трис-буфера (рН 7.4). Готовая суспензия митохондрий на протяжении всего эксперимента находилась на льду.

Облучение суспензии митохондрий ИПРИ. Полученные суспензии митохондрий были разделены на 24 группы (по 12 в контроле и опыте). Для каждого из режимов воздействия объем выборки составлял не менее 6 проб. Опытные группы суспензий митохондрий подвергали однократному воздействию 4 000 рентгеновских импульсов с разными параметрами: в дозах 0.3, 1.1 и 1.8×10^{-6} Гр/имп. и с частотами повторения 10, 13, 16 и 22 имп./с. Для каждой облученной группы в качестве контроля использовали ложнооблученные (ЛО) суспензии митохондрий, которые подвергали аналогичным манипуляциям, что и облученные, но без включения источников излучения. Длительность воздействия варьировала от 3 до 7 мин в зависимости от частоты повторения импульсов.

В качестве источника ИПРИ использовали тормозное излучение ускорителя “Синус-150” (Россия, длительность импульса на полувысоте 4 нс, ускоряющее напряжение 300 кВ, ток электронного пучка 2.5 кА, энергия фотонов с максимумом 100 кэВ, частота повторения до 100 имп./с) [1]. При использованных частотах повторения импульсов и импульсных дозах суммарная поглощенная доза за сеанс облучения (4 000 импульсов) составляла $1.2\text{--}7.2 \times 10^{-3}$ Гр. Измерение поглощенной дозы производили с помощью термоминесцентных LiF-детекторов в комплекте метрологически поверенного дозиметра “КДМ-02М”, а оперативный контроль осуществляли с помо-

щью электростатических дозиметров с кварцевым волокном “Arrow-Tech 138” (“Arrow-Tech, Inc”, США) и постоянной регистрацией импульсов ускоряющего напряжения.

Для выделения исследуемых ферментов облученные митохондрии разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора клеток “Ultrasonic Cell disruptor – модель XL 205” (“Heat Systems”, USA) трижды по 10 с. Гомогенат митохондрий центрифугировали с ускорением 20000 g 30 мин при 4°C. В надосадочной жидкости определяли концентрацию белка по методу [23] и активность антиоксидантных ферментов.

Определение активности антиоксидантных ферментов в изолированных митохондриях мышей. Активность супероксиддисмутазы (СОД) (КФ 1.15.1.1) определяли по методу [24]. В качестве положительного контроля использовали коммерческий препарат СОД (“Sigma”), с помощью которого была построена калибровочная кривая. Активность фермента выражали в Ед/мг белка митохондрий.

Определение активности глутатионпероксидазы (ГП) (КФ 1.11.1.9) в изолированных митохондриях печени мышей проводили по методу [25]. Активность фермента выражали в нмоль НАДФН-окисленного в минуту на 1 мг белка митохондрий [26].

Активность глутатионредуктазы (ГР) (КФ 1.6.4.2) определяли высокочувствительным спектрофотометрическим методом [27]. Активность фермента выражали в нмоль/мин/мг белка митохондрий, принимая коэффициент молярной экстинкции для 5-тио(2 нитро) бензойной кислоты равным 14.15 ммоль⁻¹ · см⁻¹. В качестве положительного контроля использовали препарат ГР дрожжей (“Sigma”).

Статистическую обработку результатов производили с использованием пакета программ Statistica 6.0. Статистическую значимость различий между показателями облученных и ложнооблученных выборок определяли с помощью непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни. Вероятность ошибки *p* < 0.05 считалась достаточной для вывода о статистической значимости различий полученных данных. Полученные результаты представлены в виде средней арифметической величины показателя и ошибки среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенные эксперименты показали, что однократное воздействие 4000 импульсов ИПРИ на изолированные митохондрии печени мышей может изменять активность ферментов антиоксидантной защиты.

Влияние ИПРИ на активность СОД в митохондриях. Установлено, что воздействие рентгенов-

Таблица 1. Активность супероксиддисмутазы (*M ± m*) в митохондриях печени мышей после воздействия ИПРИ с разными дозами и частотами повторения импульсов

Частота повторения импульсов, имп./с	Доза, ×10 ⁻⁶ Гр/имп.		
	0.3	1.1	1.8
	ед./мг белка	ед./мг белка	ед./мг белка
ЛО	62 ± 5.8	61 ± 6.2	62 ± 5.2
10	70 ± 2.3*	66 ± 3.2	62 ± 3.1
13	64 ± 5.9	75 ± 1.1*	55 ± 1.9
16	65 ± 4.6	72 ± 5.4*	63 ± 7.2
22	69 ± 7	62 ± 2.2	64 ± 4.5

* Различия статистически значимы по отношению к группе ЛО при *p* < 0.05.

Таблица 2. Активность глутатионпероксидазы (*M ± m*) в митохондриях печени мышей после воздействия ИПРИ с разными дозами и частотами повторения импульсов

Частота повторения импульсов, имп./с	Доза, ×10 ⁻⁶ Гр/имп.		
	0.3	1.1	1.8
	нмоль/мин/мг белка	нмоль/мин/мг белка	нмоль/мин/мг белка
ЛО	413 ± 22	392 ± 25	394 ± 6
10	379 ± 5	443 ± 9*	372 ± 13
13	385 ± 20	432 ± 9	337 ± 17*
16	389 ± 13	445 ± 12*	394 ± 11
22	399 ± 21	396 ± 26	370 ± 14

* Различия статистически значимы по отношению к группе ЛО при *p* < 0.05.

ских импульсов наносекундной длительности на изолированные митохондрии мышей оказывает влияние на супероксиддисмутазную активность в этих органеллах (табл. 1). После воздействия ИПРИ в меньшей из использованных доз 0.3 × 10⁻⁶ Гр/имп. активность СОД увеличивалась только при частоте 10 имп./с (на 12.6%, *p* < 0.05). Воздействие ИПРИ в средней дозе 1.1 × 10⁻⁶ Гр/имп. более эффективно повышало активность СОД при частоте повторения 13 и 16 имп./с на 22.8% (*p* < 0.05) и 18.3% (*p* < 0.05) соответственно.

Воздействие ИПРИ в самой высокой из используемых доз 1.8 × 10⁻⁶ Гр/имп. не приводило к достоверному изменению супероксиддисмутазной активности при всех исследуемых частотах.

Влияние ИПРИ на активность ГП в митохондриях. Воздействие в дозе 0.3 мкГр/имп. на митохондрии не изменяло активность ГП при всех ис-

Таблица 3. Активность глутатионредуктазы ($M \pm m$) в митохондриях печени мышей после воздействия ИПРИ с разными дозами и частотами повторения импульсов

Частота повторения импульсов, имп./с	Доза, $\times 10^{-6}$ Гр/имп.		
	0.3	1.1	1.8
	нмоль/мин/ мг белка	нмоль/мин/ мг белка	нмоль/мин/ мг белка
ЛО	99.0 \pm 0.5	100.7 \pm 2.5	98.7 \pm 0.9
10	100.1 \pm 2.4	97.4 \pm 1.5	103.5 \pm 2.1
13	93.3 \pm 1.0	97.5 \pm 1.2	93.0 \pm 2.2
16	107.7 \pm 5.1	105.8 \pm 0.9	105.9 \pm 3.8
22	95.6 \pm 1.1	100.9 \pm 1.3	93.1 \pm 4.3

* Различия статистически значимы по отношению к группе ЛО при $p < 0.05$.

следуемых частотах повторения импульсов (табл. 2). Повышение дозы до 1.1×10^{-6} Гр/имп. сопровождалось активацией фермента при частотах повторения 10 и 16 имп/с на 13.5% ($p < 0.05$) и 13.6% ($p < 0.05$) соответственно. При максимальной из использованных доз 1.8×10^{-6} Гр/имп. глутатионпероксидазная активность снижалась при частоте повторения 13 импульсов за 1 с на 14.6% ($p < 0.05$) относительно данного показателя в группе ЛО.

Влияние ИПРИ на активность ГР в митохондриях. В отличие от результатов влияния ИПРИ на активность СОД и ГП, в экспериментах с ГР не было обнаружено статистически значимого влияния на активность последней при всех использованных частотах повторения импульсов и дозах воздействия (табл. 3).

Анализ эффекта воздействия ИПРИ на ферменты. Известно, что в митохондриях печени отсутствует каталаза, поэтому ведущее значение в восстановлении H_2O_2 принадлежит ГП [28, 29] и для характеристики ферментной антиоксидантной системы в этих органеллах достаточно иметь представление об активности СОД, ГП и ГР.

В ранее проведенных исследованиях было показано [10], что в качестве возмущающего агента, способного изменить концентрацию O_2^- и H_2O_2 , могут выступать ИПРИ в дозе $0.3-1.8 \times 10^{-6}$ Гр/имп. с частотами повторения импульсов 10–22 за 1 с. Данный факт позволил предположить изменение активности ферментативных антиоксидантных систем после воздействия ИПРИ с указанными параметрами. Это было подтверждено полученными в данной работе результатами, из которых следует, что наибольший эффект наблюдается в изменении активности металлсодержащих ферментов СОД и ГП, в отличие от ГР, в активный

центр которой не входят ионы металлов переменной валентности. Изменение активности антиоксидантных ферментов сложным образом зависит от дозы излучения и частоты повторения импульсов (рис. 1).

После воздействия ИПРИ в меньшей дозе (0.3×10^{-6} Гр/имп.) происходит активация только СОД (рис. 1), что может приводить к накоплению H_2O_2 в митохондриях, поскольку процесс его образования в реакциях дисмутации O_2^- преобладает над восстановлением H_2O_2 с помощью ГП. Облучение рентгеновскими импульсами в средней из использованных доз (1.1×10^{-6} Гр/имп.) сопровождается активацией и СОД и ГП (рис. 1). Увеличение дозы ИПРИ до 1.8×10^{-6} Гр/имп. приводит к ингибированию активности ГП при отсутствии значимого влияния на активность СОД (рис. 1). Активность ГР достоверно не изменялась при всех исследуемых режимах воздействия ИПРИ. Таким образом, изменение активности разных компонентов системы ферментной антиоксидантной защиты под действием ИПРИ зависит от параметров ИПРИ.

Соотношение активностей ферментов после воздействия ИПРИ. Существуют определенные соотношения активности отдельных ферментов антиоксидантной системы, обеспечивающие необходимую стационарную концентрацию низкомолекулярных метаболитов, в том числе кислородных радикалов, и одновременную защиту мембран и других клеточных структур от повреждающего действия АФК. Поэтому для системы антиоксидантной защиты важной особенностью является не только изменение активности самих ферментов, но и соотношение их активности, в первую очередь СОД и ГП [30].

Повышение активности СОД и снижение активности ГП может привести к повышению концентрации H_2O_2 . Увеличение соотношения активностей СОД/ГП рассматривают как одну из биохимических характеристик процесса старения, а также некоторых патологий, в основе которых лежит активация свободнорадикального окисления [11, 16, 31]. Увеличение активности ГП при ингибировании ГР сопровождается снижением уровня основного антиоксиданта в клетках и митохондриях – восстановленного глутатиона. На рис. 2 представлено соотношение активности ферментов антиоксидантной защиты после воздействия ИПРИ с разными режимами воздействия.

Повышение соотношения активностей СОД/ГП после воздействия в самой малой из использованных доз ИПРИ (0.3×10^{-6} Гр/имп.) при всех частотах повторения импульсов может быть причиной обнаруженного ранее увеличения концентрации H_2O_2 при указанном режиме воздей-

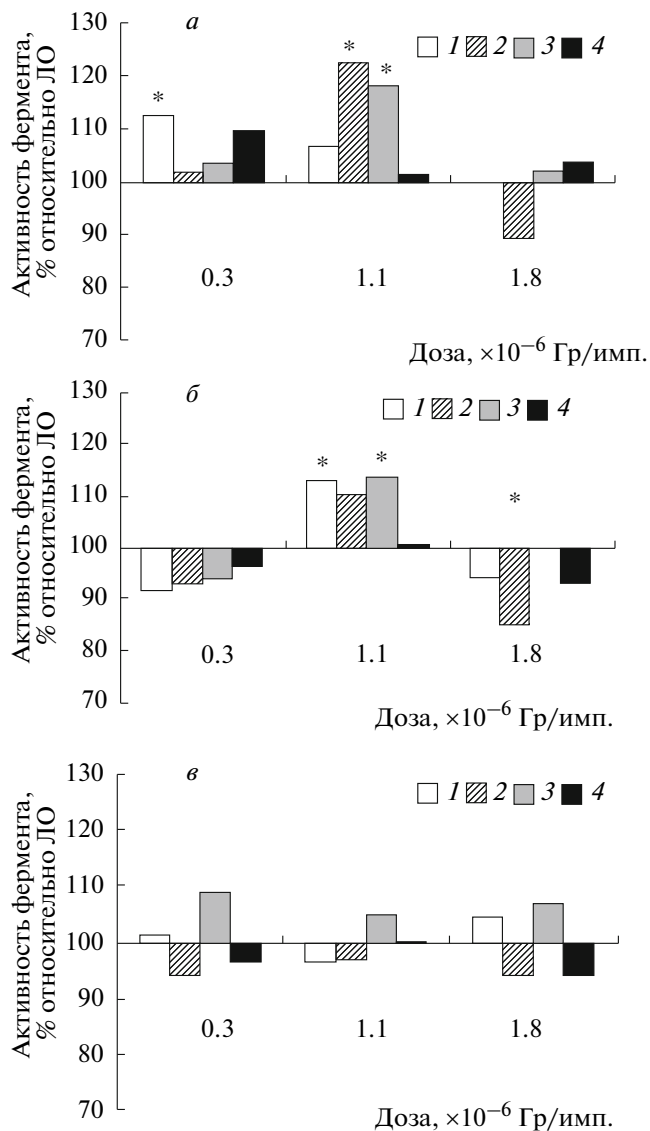


Рис. 1. Зависимость изменения активности антиоксидантных ферментов (*a* – активность СОД; *б* – активность ГП; *в* – активность ГР) в митохондриях печени мышей от дозы ИПРИ при действии *in vitro* (в % относительно к значениям активности ферментов в группе ложного облучения).

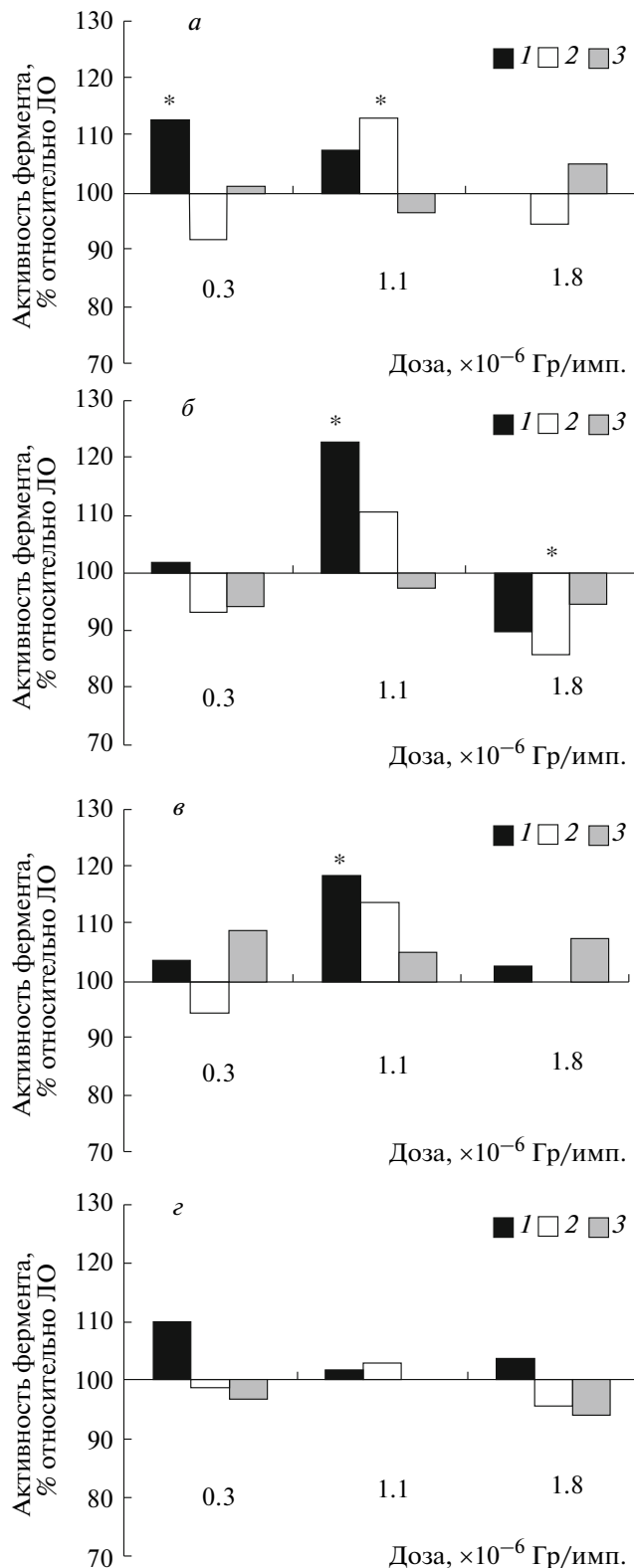
1 – 10 имп./с, 2 – 13 имп./с, 3 – 16 имп./с, 4 – 22 имп./с.

* Различия статистически значимы по отношению к группе ЛО при $p < 0.05$.

Рис. 2. Соотношение активностей антиоксидантных ферментов в митохондриях печени мышей при действии на митохондрии *in vitro* ИПРИ разной частоты повторения импульсов (*a* – 10 имп./с, *б* – 13 имп./с, *в* – 16 имп./с, *г* – 22 имп./с) в зависимости от дозы (в % относительно к значениям активности ферментов в группе ложного облучения).

1 – активность СОД, 2 – активность ГП, 3 – активность ГР.

* Различия статистически значимы по отношению к группе ЛО при $p < 0.05$.



ствия [10]. Увеличение супероксиддисмутазной активности в митохондриях на фоне активации ГП после воздействия рентгеновских импульсов в более высокой дозе 1.1×10^{-6} Гр/имп. может быть

адаптивной реакцией, приводящей к снижению уровня H_2O_2 , что также соответствует ранее полученным данным о снижении уровня H_2O_2 при таком режиме облучения [10]. Ингибирование ГП при исходном неизменяющемся уровне активности СОД после воздействия в большей из использованных доз ИПРИ (1.8×10^{-6} Гр/имп.) может быть обусловлено значительной активацией свободнорадикального окисления, поскольку ГП чувствительна к продуктам пероксидации [32].

Следует отметить и то, что изменение соотношения активности ферментов зависит не только от дозы, но и от частоты повторения импульсов. При всех частотах повторения импульсов, изменение соотношения активности исследуемых ферментов имеет схожую зависимость от дозы излучения. Воздействие на активность СОД в самой малой из использованных доз 0.3×10^{-6} Гр/имп. было эффективно лишь при частоте повторения импульсов 10 за 1 с, Активность ГП увеличивалась лишь после воздействия ИПРИ в средней из использованных доз 1.1×10^{-6} Гр/имп. лишь при частотах 10 и 16 имп./с. Ингибирование ГП обнаружено только после воздействия ИПРИ в самой большой из использованных доз и частотой повторения 13 имп./с. Следует отметить, что после воздействия ИПРИ с частотой повторения 22 имп./с практически при всех использованных дозах не наблюдалось изменения активности антиоксидантных ферментов. При всех частотах воздействия ИПРИ, за исключением частоты 10 имп./с при дозе 1.1×10^{-6} Гр/имп., изменение активности СОД более выражено, чем изменение активности ГП.

ОБСУЖДЕНИЕ

Из полученных результатов следует, что воздействие ИПРИ изменяет активность СОД и ГП. Повышение активности СОД после воздействия ИПРИ может быть обусловлено несколькими механизмами. Во-первых, как было обнаружено ранее [33], ИПРИ может изменять проницаемость митохондриальной мембраны с последующим поступлением ионов Ca^{2+} в матрикс митохондрий. Как известно, в аэробных условиях высокие концентрации ионов Ca^{2+} активируют митохондриальную изоформу СОД (Mn-СОД) в митохондриях печени и миокарда [34, 35]. Наряду с этим, в печени цитозольная форма СОД (Cu,Zn-СОД) может находиться и в межмембранном пространстве митохондрий [35, 36]. СОД межмембранного пространства в интактных изолированных митохондриях неактивна и активируется вследствие окислительной модификации ее определенных тиоловых групп [37]. Можно предположить, что обнаруженное ранее увеличение продукции H_2O_2 в изолированных

митохондриях при действии ИПРИ [10] вызывает окисление критических сульфгидрильных групп супероксиддисмутазы в межмембранном пространстве и активирует фермент. Поскольку в настоящей работе измерялась общая супероксиддисмутазная активность, то ее увеличение можно объяснить увеличением активности обеих изоформ фермента.

Активация СОД и ГП может быть связана не только с повышенным уровнем содержания АФК и высокими концентрациями ионов Ca^{2+} , но и с активностью ГР. Поскольку активность ГП зависит от уровня глутатиона (субстрата реакции), восстановленного из окисленной формы ферментом ГР, снижение активности ГР и соответственно содержания восстановленной формы трипептида глутатиона может вызывать накопление в митохондриях H_2O_2 , инициирующего открытие поры неспецифической проницаемости с последующим набуханием митохондрий [29], что в свою очередь отражается на активности СОД и ГП.

Обращает на себя внимание тот факт, что воздействие в самой большой из использованных доз ИПРИ 1.8×10^{-6} Гр/имп. в большинстве случаев не оказывает влияния или реализует ингибирующий эффект на активность антиоксидантных ферментов, а воздействие в средней из доз ИПРИ 1.1×10^{-6} Гр/имп., напротив, оказалось наиболее эффективным в отношении усиления активности антиоксидантной системы, что проявляется в активации СОД и ГП повышенным уровнем АФК. Это согласуется с гипотезой повреждающего действия низкоинтенсивных факторов различной природы [38] (в том числе неимпульсного ионизирующего излучения), согласно которой эффект реализуется при облучении в низких дозах и малых интенсивностях действующего фактора, поскольку не срабатывают менее чувствительные системы репарации.

Таким образом, полученные результаты об изменении активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы и соотношения активностей ферментов в митохондриях после воздействия ИПРИ согласуются с ранее полученными данными об изменении уровня содержания АФК [10] и функционального состояния дыхательной цепи митохондрий [8]. При этом повышение количественного уровня АФК в митохондриях может быть результатом воздействия рентгеновского излучения на молекулы воды, а также влияния излучения на дыхательную цепь митохондрий. С другой стороны, изменение активности ферментов системы антиоксидантной защиты может повлиять на уровень содержания АФК, контролируемый этой системой. Изменение активности ферментов антиоксидантной защиты может играть существенную роль в формировании биологиче-

ски значимого эффекта воздействия ИПРИ. В соответствии с этой схемой митохондрии могут быть важным звеном в реализации механизмов биологического действия ИПРИ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Артемов К.П., Ельчанинов А.А., Кутенков О.П. и др. Импульсно-периодический источник рентгеновского излучения // Приборы и техника эксперимента. 2004. № 5. С. 166–167.
2. Elyats S.L., Katinovskaya N.I., Zaichkina S.I. Comparison Between Super-High Dose Rate X-Ray Radiation and Static Gamma Irradiation Effects on Human Lymphocytes in Vitro // Pros. 13th Int. Simp. on High Current Electronics. Tomsk: Publ. House of the IAO SB RAS, 2004. P. 440–441.
3. Большаков М.А., Либрихт О.К., Князева И.Р. и др. Продолжительность жизни и фертильность дрозды после импульсно-периодического рентгеновского облучения на постэмбриональных стадиях развития // Радиационная биология. Радиоэкология. 2007. Т. 47. № 1. С. 22–27.
4. 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 // Biophys. 2005. V. 50. Suppl. 1. P. S104–S109.
5. Большаков М.А., Иванова Л.А., Климов А.И. и др. Изменение морфологических и биохимических показателей печени мышей после кратковременного воздействия импульсно-периодического микроволнового излучения // Сб. науч. докл. VI Междунар. симп. по электромагнитной совместимости и электромагнитной экологии, СПб.: СПбГТУ–ЛЭТИ, 2005. С. 304–307.
6. Большаков М.А., Князева И.Р., Неверова Л.П. и др. Динамика процессов перекисной модификации липидов и белков после облучения мышей импульсно-периодическим рентгеновским излучением // Вестн. Томского гос. ун-та. 2006. № 21. С. 62–63.
7. Булдаков М.А., Литвяков Н.В., Астапенко А.Н. и др. Импульсно-периодические СВЧ и рентгеновское излучения: влияние на клетки костного мозга и селезенки // Вестн. Томского гос. ун-та. Приложение: Мат. Конф. “Механизмы индивидуальной адаптации”. 2006. № 21. С. 23–24.
8. Князева И.Р., Иванов В.В., Жаркова Л.П. и др. Влияние импульсно-периодического рентгеновского излучения на функциональную активность изолированных митохондрий печени мышей // Мат. всерос. конф. “Физика окружающей среды” с междунар. участием. Томск, 2011. С. 280–284.
9. Князева И.Р., Иванов В.В., Жаркова Л.П. и др. Функциональное состояние митохондрий после воздействия наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения // Сб. науч. докл. IX Междунар. симп. по электромагнитной совместимости и электромагнитной экологии, СПб.: СПбГТУ–ЛЭТИ, 2011. С. 549–552.
10. Жаркова Л.П., Князева И.Р., Иванов В.В. и др. Влияние импульсно-периодического рентгеновского и микроволнового излучений на уровень перекисей в изолированных гепатоцитах // Вестн. ТГУ. Биология. 2010. № 333. С. 161–163.
11. Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Ред. Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков. М.: Слово, 2006. 556 с.
12. Андреев А.Ю., Кушнарёва Е.Ю., Старков А.А. Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях // Биохимия. 2005. Т. 70. № 2. С. 246–264.
13. Szewczyk A., Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target // Pharmacol. Rev. 2002. V. 54. P. 101–127.
14. Болдырев А.А. Роль активных форм кислорода в жизнедеятельности нейрона // Успехи физиол. наук. 2003. Т. 34. № 3. С. 21–34.
15. Beyer R.E. An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant // Biochem. Cell Biol. 1992. V. 70. P. 390–403.
16. Cadenas E., Davies K.J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging // Free Radic. Biol. Med. 2000. V. 29. P. 222–230.
17. Raha S., Robinson B.H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing // Trends Biochem. Sci. 2000. V. 25. P. 502–508.
18. Augustin W., Wiswedel I., Noack H. et al. Role of endogenous and exogenous antioxidants in the defence against functional damage and lipid peroxidation in rat liver mitochondria // Mol. Cell Biochem. 1997. V. 174. P. 199–205.
19. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Глутатион митохондрий // Биохимия. 2007. Т. 72. № 7. С. 856–859.
20. Miura Y. Oxidative Stress, Radiation-Adaptive Responses, and Aging // J. Radiat. Res. 2004. V. 45. P. 357–372.
21. McCord J.M. Superoxide Dismutase, Lipid Peroxidation, and Bell-Shaped Dose Response Curves // J. Radiat. Res. 2008. V. 6. P. 223–238.
22. Jonson D., Lardy H. Isolation of liver or kidney mitochondria. In: Methods in Enzymology. N. Y.: Acad. Press, 1969. V. 10. P. 94–96.
23. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [text] / M.M. Bradford // Analyt. Biochem. 1976. V. 7. № 1–2. P. 248–254.
24. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Analyt. Biochem. 1971. V. 44. P. 276–287.
25. Little C., O'Brien P.J. An intracellular GSH-peroxidase with a lipid peroxide substrate // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1968. V. 31. P. 145–150.
26. Ланкин В.З., Тухазе А.К., Беленков Ю.Н. Свободнорадикальные процессы при заболеваниях сердечно-сосудистой системы // Кардиология. 2000. № 40. № 7. С. 48–61.
27. Smith I.K., Vierheller T.L., Thorne C.A. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) // Analyt. Biochem. 1988. V. 175. № 2. P. 408–413.

28. *Labbe G., Pessayre D., Fromenty B.* Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies // *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2008. V. 22. № 4. P. 335–353.
29. *Fernandez-Checa J.C., Kaplowitz N.* Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005. V. 204. № 3. P. 263–273.
30. *Вартанян 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.
31. *Cadenas E., Packer L.* (Eds.) *Handbook of Antioxidants, (Oxidative Stress and Disease).* 2nd ed. 2007. P. 602.
32. *Vessey D.A., Lee K.H.* Inactivation of enzymes of the glutathione antioxidant system by treatment of cultured human keratinocytes with peroxides. // *J. Invest. Dermatol.* 1993. V. 100. № 6. P. 829–833.
33. *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 // *Вестн. ТГУ. Биология.* 2011. № 3 (15). С. 161–170.
34. *Pérez-Vázquez V., Ramírez J., Aguilera-Aguirre L. et al.* Effect of Ca²⁺ and Mg²⁺ on the Mn-superoxide dismutase from rat liver and heart mitochondria // *Amino Acids.* 2002. V. 22. № 4. P. 405–416.
35. *Fridovich I.* Oxygen toxicity: a radical explanation // *J. Experim. Biol.* 1998. V. 201. P. 1203–1209.
36. *Okado-Matsumoto A., Fridovich I.* Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 42. P. 38388–38393.
37. *Iñarrea 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 // *Biochem. J.* 2007. V. 405. № 1. P. 173–179.
38. *Бурлакова Е.Б., Голощанов А.Н., Жижина Г.П., Конрадов А.А.* Новые аспекты закономерностей действия низкоинтенсивного облучения в малых дозах // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 1999. Т. 39. № 1. С. 26–34.
39. *Chiarugi A.* “Simple but not simpler”: toward a unified picture of energy requirements in cell death // *FASEB J.* 2005. V. 19. № 13. P. 1783–1788.
40. *Мазурик В.К.* Роль регуляторных систем ответа клеток на повреждения в формировании радиационных эффектов // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2005. Т. 45 № 1. С. 26–45.

Поступила в редакцию
3.04.2012

The Antioxidant Enzyme Activity in Mouse Liver Mitochondria after Nanosecond Pulsed Periodic X-Ray Exposure

I. R. Knyazeva^{1,3}, V. V. Ivanov¹, M. A. Bolshakov^{2,3}, L. P. Zharkova^{2,3}, A. V. Kereya^{2,3},
O. P. Kutenkov², V. V. Rostov^{1,2}

¹ Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia, e-mail: knyazeva_irekle@mail.ru

² Institute of High-Current Electronics, Siberian Division of Russian Academy of Sciences, Tomsk

³ Tomsk State University, Tomsk

The effect of repetitive pulsed X-ray (4 ns pulse duration, 300 kV accelerating voltage; 2.5 kA electron beam current) on the antioxidant enzyme activity in mouse liver mitochondria has been investigated. The mitochondrial suspension was exposed to single 4000 pulse X-ray radiation with repetition rates ranging between 10 and 22 pps (pulsed dose was $0.3\text{--}1.8 \times 10^{-6}$ Gy/pulse, the total absorbed dose following a single exposure was 7.2×10^{-3} Gy). It was shown that a short-time exposure to X-ray radiation changes the antioxidant enzyme activity in mouse liver mitochondria. The greatest effect was observed in the changes of the activity of the metal-containing enzymes: superoxide dismutase and glutathione peroxidase. The effect depends on the pulse repetition frequency and radiation dose.