РАДИАЦИОННАЯ БИОЛОГИЯ. РАДИОЭКОЛОГИЯ, 2014, том 54, № 6, с. 606–612

НЕИОНИЗИРУЮЩИЕ ИЗЛУЧЕНИЯ

УДК 612.014.426:599.323.4:576.385.34

ЭФФЕКТ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОСЕКУНДНОГО ИМПУЛЬСНО-ПЕРИОДИЧЕСКОГО МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ЭПИДИДИМАЛЬНУЮ ЖИРОВУЮ ТКАНЬ МЫШЕЙ

А. В. Керея[1, 3, *], М. А. Большаков[1, 3], Л. П. Жаркова[1, 3], В. В. Иванов[2], И. Р. Князева[2, 3], О. П. Кутенков[3], В. В. Ростов[3], Ю. Н. Сёменова[1]

[1]*Томский государственный университет, Томск*

[2]*Сибирский государственный медицинский университет, Томск*

[3]*Институт сильноточной электроники СО РАН, Томск*

Исследовали влияние наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения (ИПМИ) с частотами повторения 8–25 имп./с, пиковой плотностью потока мощности (пППМ) 1500 Вт/см^2 на эпидидимальную жировую ткань лабораторных мышей. Эффект воздействия оценивали по изменению массы облученной жировой ткани и размерам адипоцитов. Выявлено, что после облучения масса эпидидимальной жировой ткани и распределение по размерам адипоцитов изменяются. Эффект зависел от пППМ и частоты повторения импульсов.

Импульсно-периодическое микроволновое излучение, наносекундные импульсы, эпидидимальная жировая ткань, адипоциты, распределение клеток по размерам.

DOI: 10.7868/S0869803114060071

Влияние электромагнитного излучения (ЭМИ) на биологические объекты во многом определяется степенью проникновения энергии излучения внутрь организма. Решая задачу оценки степени поглощения энергии ЭМИ, Х.П. Шван [1] исходил из того, что поглощаемая часть излучения проходит последовательно через кожу, подкожный жировой слой с малым содержанием воды в более глубоко расположенные ткани с высоким содержанием воды. Существенно различающиеся по электрическим свойствам кожа, подкожная жировая ткань и мышцы формируют достаточно сложную картину проникновения ЭМИ в организм. При этом жировая ткань играет роль некоего пассивного элемента, позволяющего, в зависимости от частоты электромагнитного излучения и толщины жировой ткани, пропускать внутрь организма бóльшую или меньшую часть энергии. В частности, для частоты 10 ГГц глубина проникновения энергии ЭМИ в жировую ткань варьирует в пределах 2–4 см. По мнению Ю.Б. Кудряшова с соавт. [2] такая сравнительно большая глубина проникновения излучения через жировую клетчатку позволяет ЭМИ достигать более глубоко расположенных тканей и органов и влиять на их состояние. При этом в самой жировой ткани поглощается и преобразуется в тепло до 35% электромагнитной энергии [2].

В подобных обстоятельствах сама жировая ткань реально подвергается воздействию ЭМИ, и результаты этого могут оказаться для организма функционально значимыми. Жировая ткань является разновидностью соединительной ткани, имеет сложное строение и выполняет жизненно важные функции [3]. Ранее считалось, что клетки жировой ткани адипоциты формируют лишь пассивную ткань для запасания дополнительного источника энергии в виде жира. Однако в последнее время появились серьезные доказательства того, что адипоциты могут выполнять роль эндокринных секреторных клеток [3, 4]. По мнению этих авторов, жировая ткань находится в центре сети аутокринных, паракринных и эндокринных сигнальных систем, которые взаимодействуют с нейроэндокринными регуляторами. Пути передачи сигналов в жировой ткани, сформированные по иерархическому принципу, являются важным механизмом, который позволяет организму приспосабливаться к различным неблагоприятным условиям: голоду, стрессу, инфекциям, а также к периодам значительного избытка поступления энергии [3, 4].

В настоящее время известно, что ИПМИ с наносекундными импульсами эффективно влияет на целый ряд тканей и клеток. При этом иници-

* Адресат для корреспонденции: 634055 Томск, просп. Академический, 2/3, Институт сильноточной электроники СО РАН; тел.: (3822) 49-31-91, e-mail: kereya21@mail.ru.

руется: изменение функционального состояния митохондрий [5], электропроводности суспензии гепатоцитов и митохондрий гепатоцитов [6], изменение уровня активных форм кислорода (АФК) с последующей окислительной модификацией липидов и белков [7], изменение активности антиоксидантных ферментов митохондрий [8]. Было обнаружено, что ИПМИ при некоторых режимах воздействия стимулирует дыхание при уменьшении степени сопряжения окисления и фосфорилирования. В подобных случаях усиленно расходуются субстраты окисления без образования АТФ. Если реализация таких процессов окажется возможна в адипоцитах, то может возникнуть усиленное "сжигание жиров" с соответствующим уменьшением объема жировой ткани [5].

Исходя из того обстоятельства, что энергия ЭМИ эффективно поглощается жировой тканью, представлялось актуальным исследовать влияние на нее наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения. Априори не исключено, что жировая ткань реагирует на воздействие. Результат возможного влияния должен проявиться в широком спектре реакций всего организма. К сожалению, в доступной литературе не удалось обнаружить данных о влиянии ЭМИ на биологические характеристики жировой ткани. Это и определило необходимость исследования биологических эффектов, связанных с состоянием жировой ткани.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования было оценить влияние наносекундного ИПМИ на массу эпидидимальной жировой ткани мышей и морфометрические параметры облученных адипоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Эксперименты проведены на беспородных белых мышах-самцах массой 25–30 г. Животных содержали в стандартных условиях при постоянной температуре и влажности, в условиях светового режима 12 : 12, корм и питье были доступны в любое время суток. Исследование проводили в соответствии с этическими нормами работы с лабораторными животными и санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник [9]. Мыши были разделены на облученных и ложно облученных (ЛО, контроль), по шесть животных для каждого из использованных режимов воздействия. В ходе исследования контрольных мышей подвергали всем аналогичным манипуляциям, что и облученных, но без включения микроволнового генератора. Животных опытных групп подвергали воздействию 4000 импульсов ИПМИ с длительностью 4 нс и частотами повторения 8, 13, 16, 22, 25 имп./с ежедневно в течение 10 дней. Процедуру облучения проводили в одно и то же время суток (в утренние часы с 9.00 до 11.00). Мышей на время облучения в пластиковых контейнерах помещали на открытый конец волновода (сечением 10 × 33 мм) паховой областью, где сосредоточена вся масса эпидидимальной жировой ткани. Остальная часть тела животных покрывалась радиопоглощающим материалом для устранения возможности облучения всего организма. Продолжительность облучения варьировала от 3 до 9 мин в зависимости от частоты повторения импульсов. В качестве источника ИПМИ использовали лабораторный импульсный генератор на основе магнетрона МИ-505 (несущая частота 10 ГГц, длительность импульсов на половинном уровне мощности 100 нс, частота повторения 8–25 имп./с, пиковая плотность потока мощности составляла 1500 Вт/см^2). Оценку величины пППМ производили согласно методике, подробно описанной ранее [10]. Выбор интенсивности воздействия ИПМИ с пППМ 1500 Вт/см^2 и частот повторения 8–25 имп./с обусловлен достаточно высокой биологической эффективностью ИПМИ с этими параметрами, что было продемонстрировано ранее в исследованиях по изучению заживления ран [11], дыхания митохондрий [12] и изменения их объема [13], активности антиоксидантных ферментов митохондрий [8].

Эвтаназию животных по завершении полного цикла облучения проводили путем дислокации шейных позвонков. Эпидидимальную жировую ткань взвешивали с точностью до 0.1 мг на аналитических весах AND HR-200 (Япония). Для морфометрического исследования кусочки жировой ткани фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине (Biovitrum, Россия), обезвоживали в изопропиловом спирте – раствор IsoPrep (Biovitrum, Россия) и заливали в парафин (Histomix, Россия) по методике Ю.А. Криволапова [14]. На микротоме МЗП-01 (Техном, Россия) изготавливали срезы толщиной 5–7 мкм, которые затем монтировали на предметные стекла и окрашивали гематоксилином и эозином. Полученные микропрепараты просматривали в проходящем свете на микроскопе Биомед-3М (Россия), совмещенном с компьютером. Изображения срезов оцифровывали для последующей оценки размеров адипоцитов. Оцифрованные фотографии с хорошо выявленными границами клеток подвергали морфометрической обработке с использованием компьютерной программы ImageJ 1.46 [15]. Размеры адипоцитов оценивали с помощью ме-

Таблица 1. Усредненные значения удельной массы эпидидимального жира мышей после воздействия ИПМИ с пППМ 1500 Вт/см^2

Показатель	Частота повторения импульсов, имп./с					
	контроль	8	13	16	22	25
Удельная масса жира, мг/г веса мыши	19.7 ± 2.4 (n = 6)	12.3 ± 0.9* (n = 6)	17.1 ± 4.9 (n = 6)	21.6 ± 4.3 (n = 6)	15.4 ± 1.5* (n = 6)	14 ± 1.6* (n = 6)

Примечание. Представлены среднеарифметические значения показателя ± ошибка среднего; n – число животных в группе.
* Различия статистически значимы по отношению к группе контроля, $p \le 0.05$.

тода точечного счета [16], который заключается в измерении минимального и максимального диаметра клеток и нахождения их полусуммы. Всего было проанализировано 108 фотографий (по 18 для каждой из шести групп мышей). Для каждого из использованных режимов воздействия определяли средний диаметр 400 жировых клеток.

Величину эффекта воздействия на жировую ткань оценивали по изменению удельной массы жира и изменению среднего диаметра адипоцитов и их распределения по размерам – у облученных животных по отношению к контролю. Полученные результаты подвергали статистической обработке, при которой рассчитывалась средняя арифметическая величина показателя и ее стандартная ошибка. Значимость различий между показателями облученных и ложно облученных животных определяли с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эпидидимальная жировая ткань является одним из часто используемых модельных объектов при изучении различных свойств жировой ткани так как составляет наибольшую часть от всей жировой ткани брюшной полости (45 ± 3%) [18]. Поверхностная локализация эпидидимального жира, благодаря прямой доступности для облучения и поглощения микроволновой энергии, обеспечивает очевидное преимущество при изучении реакций облученной ИПМИ жировой ткани.

Из проведенных экспериментов следует, что воздействие 4000 наносекундных импульсов ИПМИ в течение 10 дней оказывает влияние на массу эпидидимальной жировой ткани и размер адипоцитов. Эффект зависит от частоты повторения импульсов. Воздействие ИПМИ с пППМ 1500 Вт/см^2 снижало массу жировой ткани при частотах повторения 8, 22 и 25 имп./с (табл. 1). Воздействие при частотах повторения 13 и 16 имп./с не оказывало значимого влияния на массу жировой ткани.

Исходя из того, что изменение массы жировой ткани может быть обусловлено изменением количества и размеров адипоцитов после облучения [19], было проведено морфометрическое исследование, в ходе которого были оценены размеры облученных и ложно облученных клеток.

В контроле у мышей средний размер адипоцитов эпидидимальной жировой ткани варьировал в интервале от 21 до 80 мкм (рис. 1) со средней ве-

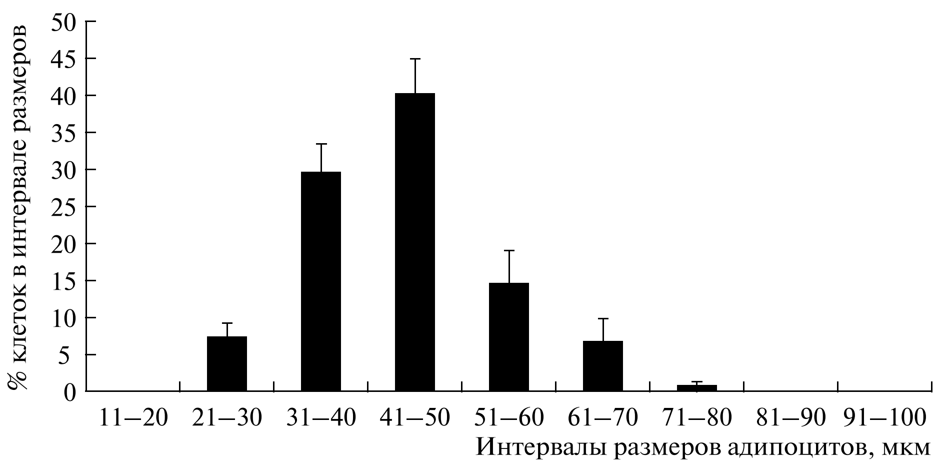

Рис. 1. Гистограмма распределения по размерам адипоцитов в жировой ткани ложно облученных животных.

Таблица 2. Влияние ИПМИ с пППМ 1500 Вт/см^2 на размер жировых клеток

Показатель	Частота повторения импульсов, имп./с					
	контроль	8	13	16	22	25
Средние значения диаметров адипоцитов, мкм	47.6 ± 1.6 (n = 400)	49 ± 1.6 (n = 400)	54 ± 3.3* (n = 400)	51 ± 1.6* (n = 400)	41.2 ± 1.9* (n = 400)	45.1 ± 1.6 (n = 400)

Примечание. Представлены среднеарифметические значения показателя ± ошибка среднего; n – число клеток в группе.
* Различия статистически значимы по отношению к группе контроля, $p \le 0.05$.

личиной 47.6 ± 1.6 мкм и выраженной модой в интервале от 41 до 50 мкм, что соответствует литературным данным [20].

Облучение жировой ткани сопровождалось изменением среднего диаметра адипоцитов и распределения их по размеру. Результат зависел от частоты повторения импульсов. Воздействие ИПМИ с частотой повторения 22 имп./с вызывало значимое уменьшение средних размеров, в то время как воздействие с частотами 13 и 16 имп./с приводило к увеличению средних размеров (табл. 2). После облучения с частотами 8 и 25 имп./с значимых изменений в размерах адипоцитов не выявлено.

Таким образом, изменение средних диаметров клеток произошло из-за перераспределения их по размерам. При этом наблюдали соответствующее увеличение или уменьшение процента клеток как большего, так и меньшего размеров по сравнению с модой их распределения. Это явление определенным образом зависело от частоты повторения импульсов (рис. 2).

В большей степени распределение клеток по размерам изменилось после воздействия с частотами повторения 13 и 16 имп./с, в меньшей степени – 8, 22 и 25 имп./с.

Для более детального анализа зависимости эффекта от частоты повторения импульсов были рассчитаны разницы между долей клеток облученных и ложно облученных животных, попадающих в определенный интервал размеров, которые представлены на рис. 3.

Эти рассчитанные величины показывают, что после воздействия при всех частотах повторения импульсов, кроме 8 имп./с, произошло уменьшение доли клеток, соответствующих размеру моды (рис. 3). Максимальное уменьшение наблюдалось после воздействия с частотой 13 имп./с (22%), минимальное – с частотой 25 имп./с (7%). Параллельно произошло увеличение количества клеток меньшего размера (после воздействия с частотами 13, 22 и 25 имп./с) и увеличение количества клеток большего размера (после воздействия с частотами 13 и 16 имп./с).

ОБСУЖДЕНИЕ

Из полученных результатов следует, что наносекундное ИПМИ оказывает влияние на массу эпидидимальной жировой ткани и распределение адипоцитов по размерам. Это означает, что жировая ткань, поглощая часть микроволновой энергии, реагирует на такое воздействие. Изменение массы жировой ткани обусловлено изменением размеров адипоцитов после облучения в меньшую или большую сторону. Это может означать, что ИПМИ оказывает влияние как минимум на два разных физиологических процесса, один из которых обеспечивает уменьшение размеров клеток, другой – увеличение. При этом, после воздействия с частотой 8 имп./с, эти процессы могут активироваться приблизительно одинаково, компенсируя друг друга, поэтому конечный эффект явно не выражен.

После облучения эпидидимальной ткани с частотой 22 имп./с происходит уменьшение среднего диаметра адипоцитов (табл. 2) за счет увеличения количества клеток меньшего диаметра (рис. 2), в результате чего масса жировой ткани уменьшается (табл. 1). После облучения с частотой 16 имп./с в жировой ткани происходит перераспределение адипоцитов в сторону увеличения процента клеток большего размера относительно контроля. По-видимому, этим может быть объяснена тенденция к увеличению массы эпидидимальной жировой ткани (табл. 1).

Труднее объяснить феномен уменьшения массы жировой ткани на фоне роста количества адипоцитов большего размера относительно контроля, как это наблюдалось при частоте 25 имп./с. Не исключено, что это возможно благодаря запуску апоптоза части адипоцитов после микроволнового облучения, аналогично тому, как наблюдалось в работе [19] после воздействия ионизирующим излучением. В подтверждение этого имеются данные, что после наносекундного микроволнового излучения запускается перекисное окисление липидов и карбонилирование белков [7], что, на фоне понижения активности антиоксидантных ферментов [8], в совокупности может

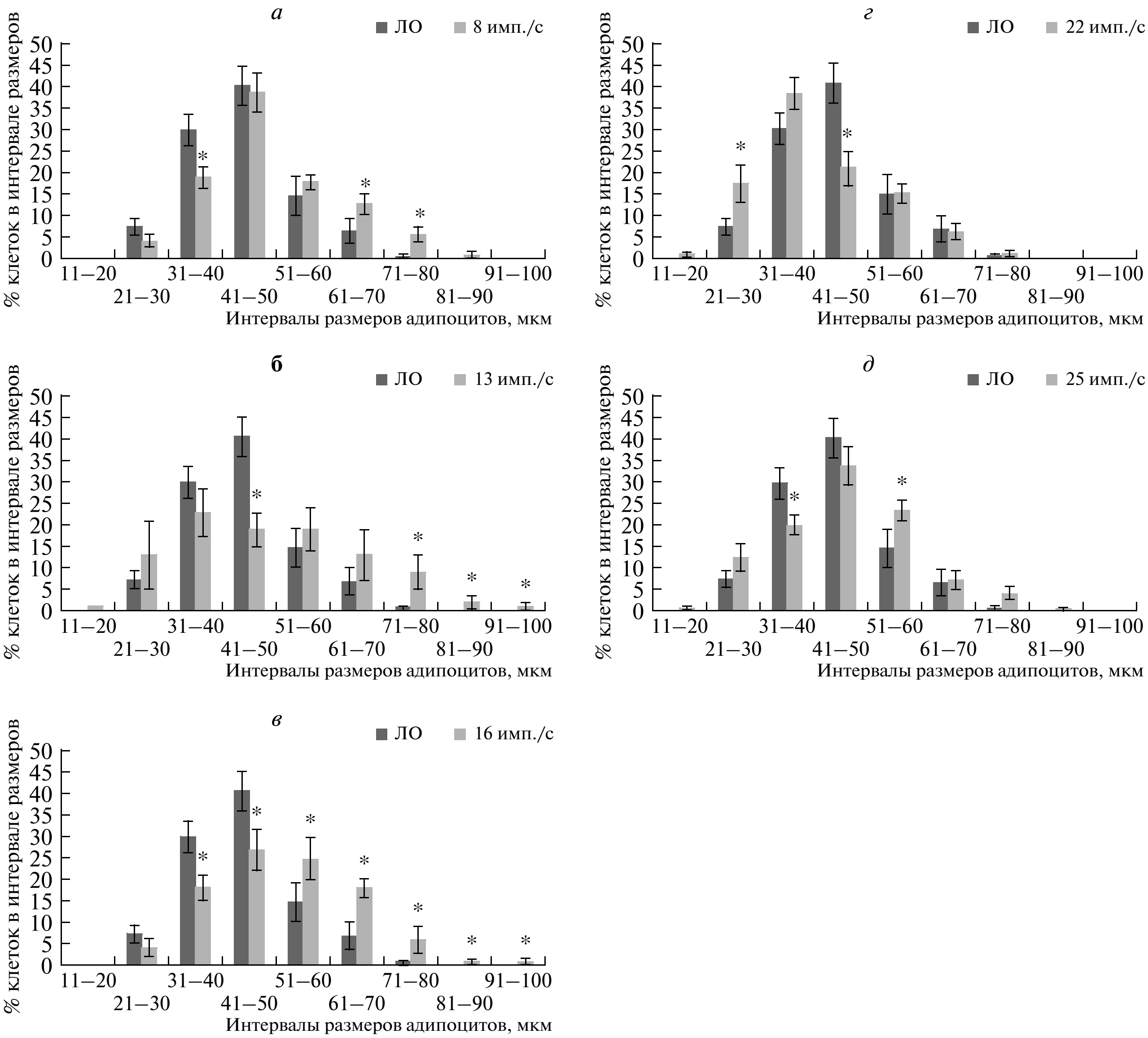

Рис. 2. Гистограммы распределений адипоцитов по размерам по отношению к размерам клеток ложно облученной жировой ткани после воздействия ИПМИ с пППМ 1500 Вт/см^2 и частотами повторения 8 имп./с (*а*), 13 (*б*), 16 (*в*), 22 (*г*), 25 имп./с (*д*).

*Различия статистически значимы по отношению к группе ложного облучения, $p \leq 0.05$.

быть причиной окислительного стресса и, соответственно, запуска апоптоза с уменьшением количества жировых клеток. Такая реакция жировой ткани на воздействие наносекундного ИПМИ может обеспечивать соответствующее изменение состояния всего организма. Другими словами, воздействие на клетки жировой ткани будет опосредованно проявлять себя в тех или иных откликах других тканей и органов, в том числе головного мозга. По-видимому, изменение размеров клеток жировой ткани может оказать влияние на секрецию гормона лептина, который, связываясь с рецепторами гипоталамуса и лимбической системы, подавляет аппетит и потребление пищи. Наряду с этим лептин повышает чувствительность мышц и жировой ткани к инсулину и ограничивает накопление жира [4]. К тому же, играя сигнальную роль, лептин постоянно информирует центральную нервную систему о состоянии энергетического статуса в организме и может оказывать на него модулирующее влияние, в том числе способствующее снижению количества жировой ткани.

Помимо этого, есть еще один вариант уменьшения массы жира. Как уже отмечалось, воздействие ИПМИ с определенными параметрами раз-

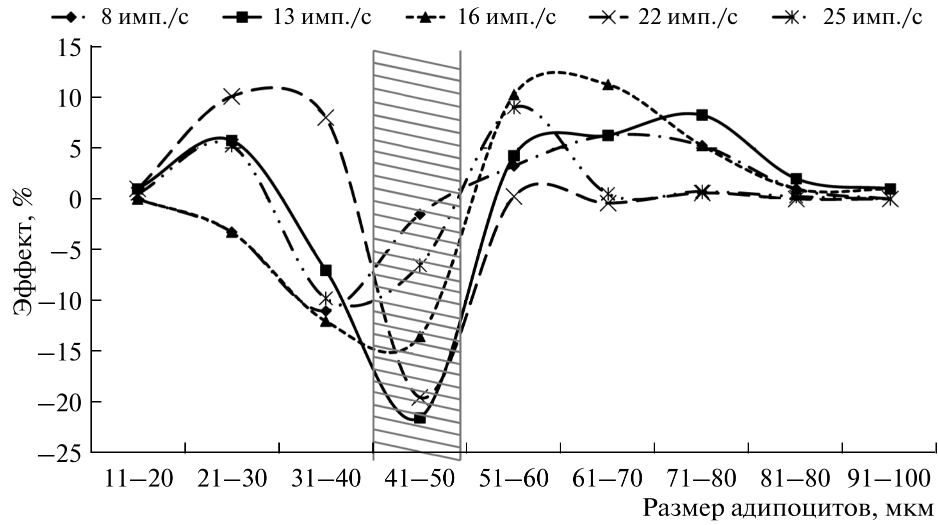

Рис. 3. Эффект воздействия ИПМИ с пППМ 1500 Вт/см^2 на распределение адипоцитов по размерам.
По оси ординат – эффект воздействия, рассчитанный как разность между облученными и ложно облученными клетками (%), попадающими в конкретный интервал. Штриховкой выделена мода размеров ложно облученных адипоцитов.

общает процессы окисления и фосфорилирования в митохондриях. В этом случае происходит усиление дыхания, без образования АТФ, и энергия преобразуется в тепло. Применительно к жировой ткани это означает, что митохондрии адипоцитов будут усиленно поглощать кислород и утилизировать триглицериды, за счет чего будет снижаться масса жировой ткани. Влияние ИПМИ сопровождается усилением дыхания митохондрий, с повышенной продукцией АФК [12]. На фоне снижения антиоксидантной активности митохондрий [8] данные обстоятельства могут быть причиной окислительного стресса и, как следствие, запуска апоптоза, о чем уже говорилось ранее.

Таким образом, изучение механизмов и общих закономерностей влияния наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения представляется важным в фундаментальном аспекте. Полученные результаты по влиянию наносекундного ИПМИ на состояние жировой ткани могут иметь важное практическое значение как в аспекте гигиенического нормирования, так и с точки зрения использования ИПМИ в коррекции содержания жировой ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта АВЦП “Развитие научного потенциала высшей школы” № 2.1.1/13778.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Schwan H.P., Foster K.R.* Microwave dielectric properties of tissue. Some comments on the rotational mobility of tissue water // Biophysics. 1977. V. 17. P. 193–197.
2. *Кудряшов Ю.Б., Перов Ю.Ф., Рубин А.Б.* Радиационная биофизика. Радиочастотные и микроволновые электромагнитные излучения. М.: Физматлит, 2008. 184 с.
3. *Чубриева С.Ю., Глухов Н.В.* Зайчик А.М. Жировая ткань как эндокринный регулятор // Вестн. Санкт-Петербургского ун-та. 2008. Сер. 11. Вып. 1. С. 31–43
4. *Шварц В.* Жировая ткань как эндокринный орган // Пробл. эндокринологии. 2009. Т. 55, № 1. С. 38–44
5. *Knyazeva I.R., Bolshakov M.A., Ivanov V.V. et al.* Response of mice liver mitochondria to repetitive pulsed microwaves and X-rays // Rus. Phys. J. 2012. V. 10. № 3. P. 194–199
6. *Жаркова Л.П., Афанасьев К.В., Большаков М.А. и др.* Оценка влияния импульсно-периодического рентгеновского и микроволнового излучений на биологические структуры с помощью измерения импедансных характеристик // Вестн. ТГУ. 2008. № 312. С. 180–183.
7. *Bolshakov M.A., Knyazeva I.R., Rostov V.V. et al.* Initiation of free-radical oxidation in albino mice by exposure to pulse periodic microwaves and X-rays // Biophysics. 2005. V. 50. Suppl. 1. P. 104–109.
8. *Большаков М.А., Жаркова Л.П., Иванов В.В. и др.* Оценка активности ферментов антиоксидантной защиты митохондрий печени мышей после воздействия наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения // Вестн. ТГУ. 2012. № 3. (19). С. 122–136.
9. Euroguide on the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes. (Based on the revised Appendix A of the European Convention ETS 123) FELASA: Federation of European Laboratory Animal Science Associations, London, UK. 2007. 17 p. www.felasa.eu.

10. *Князева И.Р., Иванов В.В., Жаркова Л.П. и др.* Функциональное состояние митохондрий после воздействия наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения // 9-й междунар. симп. по электромагнитной совместимости и электромагнитной экологии. СПб., 2011. С. 549–553.
11. *Князева И.Р., Медведев М.А., Жаркова Л.П. и др.* Действие наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения на процессы регенерации // Бюл. сиб. медицины. 2011. № 6. С. 109–113.
12. *Князева И.Р., Иванов В.В., Жаркова Л.П. и др.* Влияние импульсно-периодического микроволнового излучения на функциональную активность изолированных митохондрий печени мышей // Вестн. ТГУ. 2011. № 4 (16). С. 113–123.
14. *Криволапов Ю.А., Леенман Е.Е.* Морфологическая диагностика лимфом / Ред. Ю.А. Криволапов, Е.Е. Леенман. СПб.: "КОСТА", 2006. 208 с.
15. *Collins T.J.* ImageJ for microscopy // Biotechniques. 2007 Jul. V. 43. Suppl 1. P. 25–30.
16. *Автандилов Г.Г.* Медицинская морфометрия. М.: Медицина, 1990. 384 с.
17. *Ефимов В.М., Ковалева В.Ю.* Многомерный анализ биологических данных. СПб., 2008. 86 с.
18. *Komarek V.* Gross Anatomy // Hedrich H.J., Bullock G. The laboratory mouse. Amsterdan: Elsevier, 2004.
19. *Poglio S., Galvani S., Bour S. et al.* Adipose tissue sensitivity to radiation exposure // Am. J. Pathol. 2009. V. 174. № 1. P. 44–53.
20. *Hara-Chikuma M., Sohara E., Rai T. et al.* Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7-deficient mice: adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 15493–15496.

Поступила в редакцию
25.09.2013

The Epididymal Adipose Tissue of Mice after Nanosecond Pulse-Periodic Microwave Irradiation

A. V. Kereya[1,*], M. A. Bolshakov[1,3], L. P. Zharkova [1,3], V. V. Ivanov [2], I. R. Knyazeva[1,3], O. P. Kutenkov[3], V. V. Rostov[3], Yu. N. Semjonova[1],

[1]Tomsk State University, Tomsk, 634055 Russia;
**e-mail: kereya21@mail.ru*
[2]Siberian State Medical University, Tomsk
[3]Institute of High-Current Electronics, Siberian Division of Russian Academy of Sciences, Tomsk

The effect of pulse-periodic microwave radiation (PPMR) of the pulse repetition frequency of 8–25 pulse per second, the peak power density of 1500 W/cm^2 on the epididymal adipose tissue of mice was investigated. The effect was assessed by the changes in the fat mass and size of the irradiated adipocytes. It was found that the fat mass and size distribution of adipocytes are affected by irradiation. The effects depend on the pulse repetition frequency and intensity of exposure.