

## Оценка влияния наносекундных рентгеновских импульсов на функциональную активность митохондрий печени мышей

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

## The effects of nanosecond X-ray pulses on functional activity of the mouse liver mitochondria

*Knyazeva I.R., Medvedev M.A., Ivanov V.V., Zharkova L.P., Kutenkov O.P., Rostov V.V., Bolshakov M.A.*

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

<sup>3</sup> Институт сильноточной электроники СО РАН, г. Томск

© Князева И.Р., Медведев М.А., Иванов В.В. и др.

Исследовано влияние рентгеновских импульсов наносекундной длительности (частота повторения 8—22 импульса в секунду, доза в импульсе 0,3—1,8 мР) на функциональную активность изолированных митохондрий печени мышей. Исследуемое воздействие изменяет скорость потребления кислорода митохондриями в различных метаболических состояниях по Чансу и степень сопряжения процессов окисления и фосфорилирования. Данный эффект зависит от параметров воздействия.

**Ключевые слова:** импульсно-периодическое рентгеновское излучение, дыхание митохондрий печени.

The effect of nanosecond pulses of X-ray (pulse repetition rate of 8—22 pulses per second, dose 0.3—1.8 mR per pulse) on the functional activity of isolated mitochondria of mice liver. The effects of changing the rate of oxygen consumption by mitochondria in different metabolic states of Chance and the degree of coupling of oxidation and phosphorylation were investigated. That effect depends on the parameters of exposure.

**Key words:** pulsed periodic X-ray, respiration of liver mitochondria.

УДК 612.014.481.1-022.532:[612.35:576.311.347]:599.323.4

### Введение

Одним из механизмов биологического действия ионизирующей радиации, в том числе и рентгеновского излучения, является изменение уровня активных форм кислорода (АФК) в клетках [7, 8, 10]. АФК являются необходимым компонентом для нормального функционирования клеток при контроле основных жизненных процессов, поддерживая ряд физиологических функций, обеспечивая гомеостатическую функцию, генерацию энергии в митохондриях иммунологическую защиту, трансдукцию гормональных сигналов и изменение клеточных процессов через факторы роста, транскрипции и другие сигнальные системы [3, 9, 21].

В то же время, выступая в качестве радикалов-инициаторов, АФК в состоянии вызывать процессы

окислительной модификации клеточных биополимеров, прежде всего липидов, белков и нуклеиновых кислот [3, 9, 11]. При этом изменяются физико-химические свойства биологических мембран, что, в свою очередь, может приводить к ингибированию мембраносвязанных ферментов, повреждению мембран и нарушению ионного равновесия вследствие нарушения специфической и неспецифической проводимости мембран [14, 15].

Эффекты повышения уровня АФК относят в большей степени к воздействиям ионизирующего излучения, в том числе рентгеновского, генерируемого в импульсном режиме. В различных сферах человеческой деятельности, например в медицине, начинают использоваться источники рентгеновского излучения, генерирующие импульсы малой, в том числе наносекундной,

длительности. Изучение вопроса о биологическом действии таких импульсов обусловлено необходимостью оценки воздействия излучений с высокой дозой в импульсе при относительно низком среднем уровне доз, не превышающем гигиенических нормативов безопасного воздействия. При этом самое пристальное внимание уделяется установлению первичных механизмов и общих закономерностей влияния данного фактора на живые объекты.

Известно, что эффекты биологического действия импульсно-периодического рентгеновского излучения (ИПРИ) могут быть реализованы посредством модуляции уровня активных форм кислорода и последующей окислительной модификации биополимеров в тканях [6, 12]. Поскольку одним из основных источников АФК в клетке является дыхательная цепь митохондрий [1, 17, 22], именно эти субклеточные структуры можно рассматривать как потенциальные мишени биологического действия импульсно-периодического рентгеновского излучения.

Цель работы — изучение влияния импульсно-периодического рентгеновского излучения на изменение функционального состояния митохондрий, оцененное по скорости потребления кислорода митохондриями в различных метаболических состояниях.

## Материал и методы

Эксперименты проведены на изолированных методом дифференциального центрифугирования митохондриях из печени беспородных белых мышей-самцов массой 25—30 г. Мыши содержались в стандартных условиях вивария при постоянной температуре и влажности в условиях светового режима 12 : 12, корм и вода были доступны в любое время суток. Содержание животных и все манипуляции, связанные с забором материала и выделением субклеточных фракций, осуществлялись в соответствии с санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник, а также основывались на положениях Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации 1964 г., дополненной в 1975, 1983 и 1989 гг. [18].

Забор ткани печени и выделение субклеточных фракций проводились при температуре от 0 до 4 °С. Необходимые реактивы готовились на бидистиллированной воде. Для получения изолированных митохондрий из печени мышей использовалась методика

D. Jonson и H. Lardy [20] с небольшими модификациями. Печень освобождалась от крови путем перфузии *in situ* охлажденной до 1 °С средой выделения, содержащей раствор сахарозы в концентрации 0,3 моль, раствор ЭДТА концентрацией 1 ммоль, трис-буфер концентрацией 10 ммоль (рН 7,4). Навеска печени 1,5 г измельчалась в гомогенизаторе Поттера. Для удаления не полностью разрушенных клеток и ядер гомогенат центрифугировали 5 мин при 5 000g (0...2 °С) на рефрижераторной центрифуге ЦРЛ-1 (Россия). Надосадок центрифугировали при 10 000g 5 мин (0...2 °С), осадок митохондрий тщательно ресуспендировали в среде, содержащей сахарозу (0,3 моль) и трис-буфер (20 ммоль) (рН 7,4). Полученная суспензия митохондрий хранилась на тающем льду на протяжении всего эксперимента.

Функциональное состояние митохондрий определялось по скорости потребления кислорода. Для этого использовался совместимый с персональным компьютером измеритель кислорода АКПИМ-02Л (Россия), снабженный амперометрическим сенсором АСрО<sub>2</sub>-01 (Россия) и полярографическая ячейка объемом 1,3 мл. Ячейка заполнялась средой инкубации, насыщенной кислородом и содержащей сахарозу (250 ммоль), MgCl<sub>2</sub> (2,5 ммоль) и КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> (5 ммоль) (рН 7,4). После установки электрода в ячейку вносилась суспензия митохондрий, содержащая 0,7—1,0 мг белка. Скорость дыхания выражалась в наномолях O<sub>2</sub> в минуту на 1 мг белка. Содержание белка в пробах суспензии митохондрий определялось по методу Бредфорда [13].

Измерение скорости потребления кислорода изолированными митохондриями проводилось в различных состояниях по Чансу [16]: V<sub>0</sub> — эндогенное дыхание в состоянии 1 по Чансу (скорость потребления кислорода клетками на эндогенных субстратах); V<sub>2</sub> (V<sub>4S</sub>) — скорость дыхания в состоянии 2 и 4 по Чансу (при содержании в среде инкубации сукцината в концентрации 5 ммоль (субстрат комплекса II) при отсутствии аденозиндифосфата (АДФ)); V<sub>3</sub> — скорость дыхания в состоянии 3 по Чансу (условия те же, что и при определении V<sub>4</sub>, но в присутствии АДФ концентрации 200 мкмоль; при этом фактором, лимитирующим скорость реакции, является сама дыхательная цепь).

Для оценки эффективности работы дыхательной цепи рассчитывалось отношение скорости фосфорилирующего дыхания к скорости нефосфорилирующего дыхания, по величине которого можно судить о

степени сопряженности окисления и фосфорилирования, а также о степени интактности митохондриальных препаратов [16].

Суспензии митохондрий подвергались однократному воздействию 4 000 рентгеновских импульсов с частотами повторения в диапазоне 10–22 за секунду. Опыты проводились в одно и то же время (в утренние часы). Источником ИПРИ служил ускоритель Sinus-150, разработанный в Институте сильноточной электроники СО РАН [2], который генерировал фотоны рентгеновского излучения с энергией 90–120 кэВ, длительностью импульса 4 нс, дозой 0,3–1,8 мР/имп и суммарной поглощенной дозой до 80 мГр. Измерение поглощенной дозы производилось с помощью термолюминесцентных LiF-детекторов в комплекте дозиметра КДМ-02М (Россия) и электростатического дозиметра с кварцевым волокном Argow-Tech-138 (Argow-Tech Inc., США). Выбор параметров воздействия основывался на результатах ранее проведенных экспериментов, посвященных изучению эффектов действия импульсно-периодического рентгеновского излучения на окислительные процессы в крови и печени мышей и крыс [6, 12].

В работе использовались облученные и ложнооблученные суспензии митохондрий. Последние подвергались аналогичным манипуляциям, что и облученные, но без включения источников излучения. Для каждого из режимов воздействия было выполнено одинаковое количество экспериментов (по пять-шесть повторностей).

Полученные данные подвергались статистической обработке, при которой рассчитывалась средняя арифметическая величина показателя и ее стандартная ошибка. Статистическая обработка результатов производилась с использованием пакета программ Statistica 6.0 for Windows. Статистическая значимость различий между показателями облученных и ложнооблученных выборок определялась с помощью непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни [4].

## Результаты

В результате проведенных экспериментов было показано, что скорость потребления кислорода митохондриями на эндогенных субстратах (в метаболическом состоянии 1 по Чансу) не изменялась после воздействия импульсно-периодического рентгеновского излучения всех используемых интенсивностей и частот повторения импульсов (рис. 1).

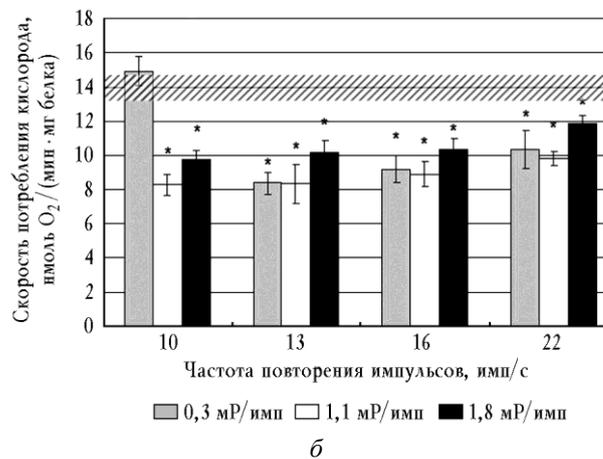
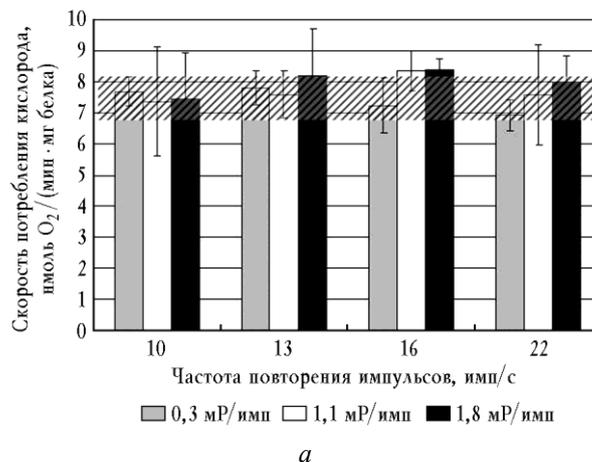


Рис. 1. Влияние импульсно-периодического рентгеновского излучения с дозой от 0,3 до 1,8 мР/имп и частотами повторения 10–22 имп/с на скорость потребления кислорода митохондриями в присутствии эндогенного субстрата (в метаболическом состоянии 1 по Чансу) (а) и после добавления сукцината (5 ммоль) (в метаболическом состоянии 2 по Чансу) (б). Здесь и на рис. 2, 3 штриховой полосой обозначен 95%-й доверительный интервал значений для группы ложного облучения; \* —  $p \leq 0,05$  между показателями облученной и ложнооблученной выборок

Добавление к суспензии облученных митохондрий субстрата дыхания (сукцинат в концентрации 5 ммоль) переводило митохондрии в состояние 2 и характеризовалось снижением скорости потребления кислорода по отношению к группе ложного облучения практически при всех режимах воздействия (рис. 1, б). При этом эффект воздействия уменьшался с увеличением частоты повторения импульсов. Облучение митохондрий ИПРИ с дозой 0,3 мР/имп при частоте повторения 10 за секунду оказалось неэффективным в отношении изменения скорости потребления кислорода

в состоянии 2 в присутствии экзогенного субстрата сукцината и в отсутствии синтеза аденозинтрифосфата (АТФ).

Добавление АДФ к суспензии облученных митохондрий в присутствии экзогенного субстрата переводило митохондрии в фосфорилирующее состояние (состояние 3 по Чансу), при этом скорость потребления кислорода при всех режимах воздействия была существенно ниже, чем у ложнооблученных органелл (рис. 2). Эффект воздействия ИПРИ на митохондрии в этом метаболическом состоянии зависел от частоты повторения импульсов и импульсной дозы. С ростом дозы рентгеновских импульсов от 0,3 до 1,8 мР/имп и частоты повторения импульсов от 10 до 22 в секунду скорость потребления кислорода митохондриями уменьшалась. Эти результаты свидетельствуют об ингибировании транспорта электронов в дыхательной цепи изолированных митохондрий в фосфорилирующем состоянии под влиянием ИПРИ.

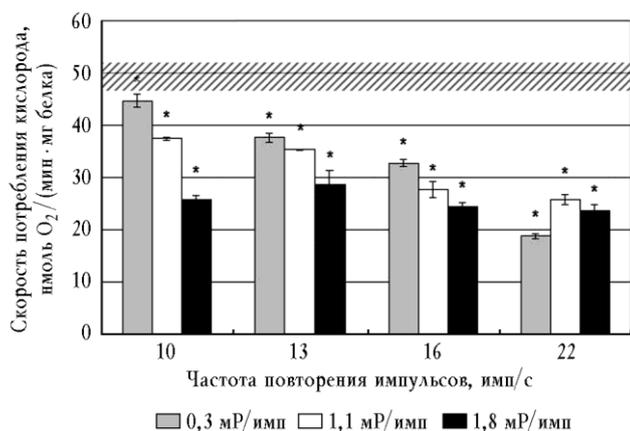


Рис. 2. Изменение скорости потребления кислорода митохондриями в присутствии экзогенного субстрата дыхания сукцината и АДФ (состояние 3 по Чансу) после воздействия импульсно-периодического рентгеновского излучения с импульсной дозой от 0,3 до 1,8 мР/имп и частотами повторения 10–22 имп/с

Влияние ИПРИ на эффективность работы дыхательной цепи было оценено по изменению коэффициента дыхательного контроля, рассчитанного как отношение скоростей фосфорилирующего и нефосфорилирующего дыхания изолированных митохондрий. Проведенные эксперименты показали (рис. 2), что коэффициент дыхательного контроля, отображающий степень сопряжения процессов окисления и фосфорилирования, уменьшался после воздействия рентгеновских импульсов большинства из использованных режимов воздействия. ИПРИ с минимальной из исполь-

зованных доз 0,3 мР/имп приводило к уменьшению уровня дыхательного коэффициента в большей степени при крайних частотах (10 и 22 имп/с). Воздействие ИПРИ со средней из использованных доз 1,1 мР/имп эффективно (более чем в 2 раза) снижало степень сопряжения окисления и фосфорилирования только при частоте повторения 22 имп/с. Облучение рентгеновскими импульсами с максимальной из использованных доз приводило к снижению уровня дыхательного коэффициента при всех частотах повторения импульсов. При режимах воздействия ИПРИ со средней дозой 1,1 мР/имп с частотами 10, 13 и 16 имп/с и минимальной из использованных доз 0,3 мР/имп и частотой 13 имп/с дыхательный коэффициент существенно не изменялся (рис. 3). Полученные результаты свидетельствуют о разобщающем действии ИПРИ на фоне угнетения дыхания в нефосфорилирующем и фосфорилирующем состояниях (состояние 2 и 3).



Рис. 3. Изменение величины коэффициента дыхательного контроля после воздействия импульсно-периодического рентгеновского излучения с импульсной дозой от 0,3 до 1,8 мР/имп и частотами повторения 10–22 имп/с

## Обсуждение

Как показали эксперименты, воздействие импульсно-периодического рентгеновского излучения с импульсной дозой от 0,3 до 1,8 мР/имп и частотами повторения 10–22 имп/с может изменять скорость дыхания митохондрий на экзогенном субстрате (сукцинат в концентрации 5 ммоль) и в фосфорилирующем состоянии. Изменение функционального состояния митохондрий после воздействия ИПРИ зависело от частоты повторения импульсов и интенсивности излучения. Скорость дыхания митохондрий на сукци-

нате снижалась при всех режимах воздействия ИПРИ. При этом увеличение дозы рентгеновских импульсов и частоты их повторения сопровождалось снижением ингибирующего эффекта ИПРИ на скорость потребления кислорода митохондриями в нефосфорилирующем состоянии на экзогенном субстрате, а в фосфорилирующем состоянии при стимуляции дыхания добавлением АДФ ингибирующее влияние этого фактора увеличивалось. В то же время коэффициент дыхательного контроля, отражающий степень сопряжения процессов окисления и фосфорилирования, уменьшался при большинстве из использованных доз и частот. Это указывает на ухудшение функционального состояния митохондрий, разобщение окисления и фосфорилирования и снижение возможности продукции АТФ.

В ранее проведенных экспериментах *in vitro* с использованием флюоресцентного зонда дихлорфлюоресцеиндиацетата было показано, что ИПРИ модулирует уровень наиболее стабильной АФК — гидропероксида водорода в изолированных митохондриях печени [5]. Эффект воздействия ИПРИ на дыхание митохондрий также имеет сложную зависимость от интенсивности и частоты повторения импульсов, поскольку митохондрии при окислительном стрессе являются как источником АФК, так и мишенью для их повреждающего действия. С одной стороны,  $O_2^{\cdot -}$  образуется в процессе переноса электронов в дыхательной цепи и синтезе АТФ, с другой стороны, его высокий уровень в митохондриях может ускорить или замедлить через различные механизмы перенос электронов и окислительное фосфорилирование. Функциональные исследования поры в изолированных митохондриях показали, что индукторами ее открытия служат ионы  $Ca^{2+}$ , вещества, снижающие мембранный потенциал, и различные прооксиданты. Снижение дыхания митохондрий после действия ИПРИ может быть обусловлено тем, что высокие концентрации АФК открывают во внутренней мембране митохондрий поры неспецифической проницаемости, что приводит к удалению адениновых нуклеотидов, снижению продукции АТФ и поглощения кислорода [19]. Кроме того, активность сукцинатдегидрогеназы и  $F_0F_1$ -АТФазы ингибируется высокими концентрациями  $O_2^{\cdot -}$  и гидроперекисями [23]. Окислительная модификация фосфолипидов внутренней мембраны митохондрий приводит к повышению ее ионной прово-

димости, разобщению дыхания и окислительного фосфорилирования, снижению мембранного потенциала. Снижение мембранного потенциала, в свою очередь, сопровождается увеличением продукции АФК в дыхательной цепи.

## Заключение

Таким образом, ИПРИ в экспериментах *in vitro* оказывало существенное влияние на функциональное состояние митохондрий. Это выражалось в уменьшении скорости потребления кислорода митохондриями в фосфорилирующем и нефосфорилирующем состоянии и снижении уровня дыхательного контроля, отображающего степень сопряжения процессов окисления и фосфорилирования. Полученные результаты позволяют рассматривать митохондрии как одну из первичных мишеней воздействия импульсно-периодического рентгеновского излучения.

*Работа выполнена в рамках аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы (2011)»; проект № 2.1.1/13778.*

## Литература

1. Андреев А.Ю., Кушнарёва Е.Ю., Старков А.А. Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях // Биохимия. 2005. Т. 70, № 2. С. 246—264.
2. Артёмов К.П., Ельчанинов А.А., Кутенков О.П. и др. Импульсно-периодический источник рентгеновского излучения // Приборы и техника эксперимента. 2004. № 5. С. 67—68.
3. Болдырев А.А. Роль активных форм кислорода в жизнедеятельности нейрона // Успехи физиол. наук. 2003. Т. 34, № 3. С. 21—34.
4. Ефимов В.М., Ковалёва В.Ю. Многомерный анализ биологических данных: 2-е изд., исправл. и доп. СПб., 2008. 86 с.
5. 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. 2010. № 333. С. 161—163.
6. Князева И.Р., Большаков М.А., Жаркова Л.П. и др. Исследование окислительных процессов в тканях белых мышей после кратковременного воздействия импульсно-периодических микроволнового и рентгеновского излучений // Нейрогуморальные механизмы регуляции органов пищеварительной системы в норме и при патологии. Томск: СибГМУ, 2007. С. 89—94.
7. Кудряшов Ю.Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения) / под ред. В.К. Мазурика, М.Ф. Ломанова. М.: Физматлит, 2004. 448 с.
8. Кузин А.М., Каушанский Д.А. Прикладная радиобиология. М.: Энергоатомиздат, 1981. 223 с.
9. Кулинский В.И. Активные формы кислорода и оксида-

- тивная модификация макромолекул: польза, вред и защита // Сорос. образоват. журн. 1999. № 1. С. 2—7.
10. Мазурик В.К., Михайлов В.Ф. О некоторых молекулярных механизмах основных радиобиологических последствий действия ионизирующих излучений на организм млекопитающих // Радиационная биология. Радиоэкология. 1999. Т. 39, № 1. С. 89—96.
11. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. 556 с.
12. 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.
13. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry. 1976. V. 7, № 1. P. 248—254.
14. Brinkkoetter P-T., Song H., Loser R. et al. Hypothermic injury: the mitochondrial calcium, ATP and ROS love-hate triangle out of balance // Cellular physiology and biochemistry. 2008. V. 22. P. 195—204.
15. Brookes P.S., Yoon Y., Robotham J.L. et al. Calcium, ATP, and ROS; a mitochondrial love-hate triangle // Amer. J. of Physiology. Cell Physiology. 2004. V. 287. P. 817—833.
16. Chance B., Williams G.R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization // J. of Biological Chemistry. 1955. V. 217. P. 383—393.
17. Cortassa S., Aon M.A., Winslow R.L., O'Rourke B. A mitochondrial oscillator dependent on reactive oxygen species // Biophysical J. V. 87. 2004. P. 2060—2073.
18. Euroguide on the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes. (Based on the revised Appendix A of the European Convention ETS 123) FELASA: Federation of European Laboratory Animal Science Associations, London, UK. 2007. 17 с.
19. Halestrap A.P., Brenner C. The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death // Current Medicinal Chemistry. 2003. V. 10 (16). P. 1507—1525.
20. Jonson D., Lardy H. Isolation of liver or kidney mitochondria // Methods in Enzymology. New York: Acad. Press. 1969. P. 94—96.
21. Poli G., Leonarduzzi G., Biasi F., Chiarotto E. Oxidative stress and cell signaling // Current medicinal chemistry. 2004. V. 11. P. 1163—1182.
22. Szewczyk A., Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target // Pharmacology review. 2002. V. 54. P. 101—127.
23. Zhang Y., Marcillat O., Giulivi C. et al. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport components and ATPase // J. of Biological Chemistry. 1990. V. 265. P. 16330—16336.

Поступила в редакцию 31.08.2011 г.

Утверждена к печати 22.12.2011 г.

#### Сведения об авторах

**И.Р. Князева** — канд. биол. наук, доцент кафедры нормальной физиологии СибГМУ (г. Томск), ведущий инженер отдела физической электроники ИСЭ СО РАН (г. Томск).

**М.А. Медведев** — заслуженный деятель науки РФ, д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, зав. кафедрой нормальной физиологии СибГМУ (г. Томск).

**В.В. Иванов** — канд. биол. наук, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии СибГМУ (г. Томск).

**Л.П. Жаркова** — ассистент кафедры физиологии человека и животных Биологического института ТГУ (г. Томск), инженер отдела физической электроники ИСЭ СО РАН (г. Томск).

**О.П. Кутенков** — ведущий инженер отдела физической электроники ИСЭ СО РАН (г. Томск).

**В.В. Ростов** — д-р физ.-мат. наук, профессор, зав. отделом физической электроники ИСЭ СО РАН (г. Томск).

**М.А. Большаков** — д-р биол. наук, профессор кафедры физиологии человека и животных Биологического института ТГУ (г. Томск), ст. науч. сотрудник отдела физической электроники ИСЭ СО РАН (г. Томск).

#### Для корреспонденции

**Князева Ирекле Рашидовна**, тел. (3822) 52-93-64, 8-913-809-1449; факс (3822) 52-98-61; e-mail knyazeva\_irekle@mail.ru