

## ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В ХРУСТАЛИКЕ ГЛАЗА (экспериментальное исследование).

*Институт физиологии им. А.И.Караева НАН Азербайджана, г.Баку.*

В исследованиях биологического эффекта электромагнитного излучения (ЭМИ) важное место занимает проблема воздействия его на орган зрения, который функционально связан с ЭМИ в видимом диапазоне. Пожалуй, важнейшим моментом в данном аспекте является выяснение механизмов действия на живой организм ЭМИ микроволнового диапазона, хотя мотивы использования ЭМИ для гигиены, лечебных процедур, диагностики также являются движущей силой данной области. Реализация биологического действия ЭМИ микроволнового диапазона через влияние на свободнорадикальные процессы сегодня считается одним из вероятных механизмов [4, 6, 12]. Процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), участвующие в регуляции ПОЛ элементы антиоксидантной защиты в различных органах и тканях подвержены влиянию микроволнового облучения. В исследованиях с применением излучения 460 МГц [4, 8] также были получены данные указывающие на свободнорадикальную природу действия ЭМИ, причем в зависимости от интенсивности облучения проявлялось как про-, так и антиоксидантное его действие.

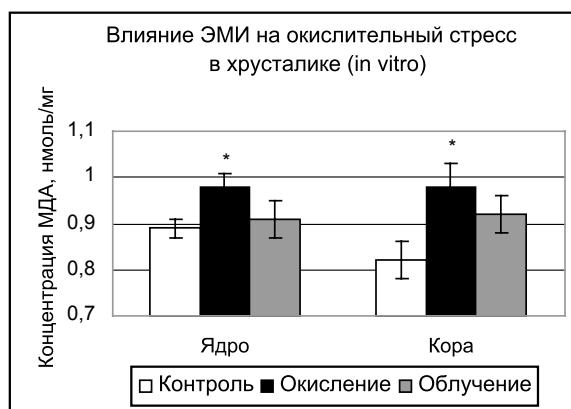
В настоящем исследовании объектом действия ЭМИ выбран хрусталик глаза. Известно, что развитие окислительного стресса вызывает окисление и дальнейшую агрегацию белков, что в конечном итоге приводит к потере прозрачности хрусталика [15]. Однако хрусталик имеет хорошо организованную антиоксидантную систему защиты и поэтому необходимый для нормальной функции окислительно-восстановительный баланс может сохраняться в течение активной здоровой жизни. В этой связи, с учетом полуавтономности жизнедеятельности (ткань хрусталика аваскулярна, не иннервирована, весь метаболизм осуществляется только через водянистую влагу), хрусталик можно рассматривать как хорошую модельную систему для изучения реализации действия ЭМИ по свободнорадикальному механизму. Важность проблемы профилактики такой распространенной глазной болезни, как катаракта, генез которой связывается с нарушениями в окислительной-антиоксидантной равновесии в ткани хрусталика, также диктует необходимость данного исследования.

Целью настоящей работы является выяснение возможности применения излучения в дециметровом диапазоне для предотвращения окислительного стресса в тканях хрусталика на основе *in vitro* исследований таких показателей, как уровень ПОЛ и содержание восстановленных тиолов.

**Материалы и методы.** Объектами опытов были беспородные крысы 3-х месячного возраста. Эксперименты проводились на свежeweделенных изолированных хрусталиках глаз. После декапитации животных, хрусталики препарировались и помещались в физиологический раствор. Окислительный стресс в хрусталике индуцировался с добавлением в среду перекиси водорода ( $H_2O_2$ ); после проверки различных концентраций и времени инкубации остановились на оптимальных для проведения *in vitro* опытов значениях - 1 мМ конечной концентрации  $H_2O_2$  в растворе и 1 час инкубации, соответственно. Дециметровое (ДМВ) облучение хрусталика проводилось на установке «Волна-2» излучением 460 МГц при выходной мощности прибора 20 Вт: хрусталик в 1 мл среды, едва скрывающей верхнюю его часть, помещался на расстоянии 10 см от передней плоскости цилиндрического излучателя. Плотность потока энергии оценивалась ранее в [4] и составляла около 10 мкВт/см<sup>2</sup>. Время облучения составляло 20 мин. Контрольными образцами служили хрусталики: 1) которые находились на время эксперимента в физиологическом растворе; 2) и которые были инкубированы с  $H_2O_2$ . Сразу после облучения опытные хрусталики и оба контрольных препарировались, отделялись плотные центральные части (ядро) и мягкие наружные части (кора). Окислительное влияние оценивали по уровню продукта ПОЛ малонового диальдегида (МДА) и содержанию тиолов в тканях хрусталика. Два показателя для тиолов – общее количество всех восстановленных тиолов и количество легкодоступных SH-групп определялись по методике, описанной в [14]. Последние содержат низкомолекулярные тиолы (глутатион и другие) в цитоплазме и поверхностно-расположенные белковые SH-группы. Количество скрытых в структуре белков SH-групп находили по разнице общих и легкодоступных тиолов. Концентрация МДА определялась по тесту с 2-тиобарбитуровой кислотой [11]. Статистический анализ данных проводился на основе t-критерия Стьюдента.

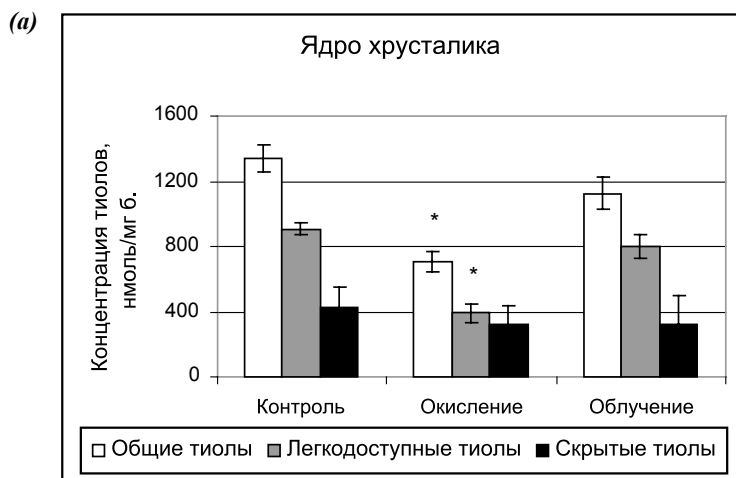
**Результаты исследований.** После инкубации свежeweделенных хрусталиков в физиологическом растворе с 1 мМ  $H_2O_2$  в течение 2 часов было установлено значительное усиление ПОЛ в них. Повышение концентрации МДА, измеренной в гомогенате всего хрусталика, составило 82.8% по отношению к контрольному образцу, который находился в аналогичных условиях без добавления  $H_2O_2$  ( $0.64 \pm 0.03$  и  $1.17 \pm 0.05$  нмоль/мг<sub>белка</sub>, соответственно). Исходя из соображений формирования неглубокого окислительного стресса и подбора оптимального для *in vitro*

исследований живой ткани времени инкубации, в дальнейших опытах с отдельными частями хрусталика мы остановились на времени инкубации 1 час. Результаты измерений показателя ПОЛ (концентрации МДА) (рис.1) и содержания восстановленных тиолов (рис.2а,б) в ядерной и корковой частях хрусталика в условиях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индукции окислительного стресса и ДМВ-облучения представлены ниже.

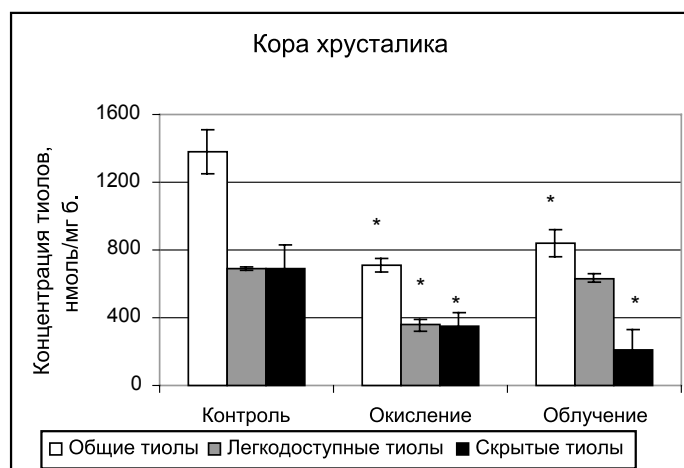


**Рис.1. Изменение концентрации МДА в субструктурах хрусталика после индуцированного H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> окислительного стресса (1мМ, 1 час) и последующего низкоинтенсивного облучения ЭМИ 460 МГц (10 мкВт/см<sup>2</sup>, 20 мин)**

Для начала посмотрим, как изменяются скорость ПОЛ и содержание тиолов в коре и ядре хрусталика при модельном окислении. Инкубация хрусталика с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 мМ) в течение часа приводит к увеличению концентрации МДА в ядре хрусталика на 10%, а в коре – на 19%. Общепринято, что уровень ПОЛ тесно связан с содержанием эндогенных тиолов в тканях. SH-содержащие соединения в первую очередь подвергаются окислению под действием продуктов ПОЛ, тем самым предохраняя от окисления другие функциональные группы и молекулы. Следовательно, для оценки интенсивности пероксидативных процессов необходимо и привлечение данных о расходах восстановительных агентов. Значительное уменьшение восстановленных тиолов (суммарных и легкодоступных) в субструктурах хрусталика говорит в пользу усиления свободнорадикальных процессов при инкубации с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



(б)



**Рис.2. Изменение концентрации восстановленных тиолов (общих, легкодоступных и скрытых) в субструктурах хрусталика после индуцированного  $H_2O_2$  окислительного стресса (1мМ, 1 час) и последующего низкоинтенсивного облучения ЭМИ 460 МГц (10 мкВт/см<sup>2</sup>, 20 мин); а – ядерная часть хрусталика; б – корковая часть хрусталика.**

Общее количество всех восстановленных тиолов и в ядре, и в коре падает почти вдвое; при этом, как показывают данные, расход легкодоступных тиолов на восстановление перекисных продуктов в ядре превышает расход в коре (57% против 48%). Отметим, что если в коре окисление одинаковым образом затрагивает легкодоступные и скрытые тиолы, то в ядре имеется различие; ядерные скрытые тиолы в меньшей степени реагируют на окисляющий фактор (снижение скрытых тиолов в ядре составляет 26%, а в коре - 48%).

ДМВ-облучение хрусталика, инкубированного в среде с 1мМ  $H_2O_2$ , в течение 20 мин привело к следующим результатам по показателям ПОЛ и восстановленных тиолов (см. рис.1 и 2). При сравнении данных надо иметь в виду, что и облученный, и не облученный хрусталики инкубировались в одинаковых условиях и оба были переведены в чистый физиологический раствор на время облучения опытного хрусталика. Как видно из таблиц, концентрация МДА в ядре хрусталика после облучения стала ниже и практически сравнялась со значением в исходном хрусталике. В коре также наблюдается снижение уровня ПОЛ в результате облучения: разница в концентрации МДА между исходным и «окисленным» хрусталиками до облучения составляла 19% ( $p < 0,05$ ), после облучения она снизилась до 12% (отличие не достоверно,  $p > 0,05$ ).

Изменения содержания восстановленных тиолов в субструктурах хрусталика, облученного после инкубации с  $H_2O_2$ , свидетельствуют в пользу ослабления свободнорадикальных процессов, в частности, ПОЛ. Общее количество восстановленных тиолов в ядре после облучения становится близким к их уровню в исходном хрусталике; разница в 57% в инкубированном в  $H_2O_2$  хрусталике до облучения снижается до 15% после облучения. В коре также происходит восстановление уровня общих тиолов, однако здесь разница с исходным уровнем доходит лишь до 39% против 48%, имеющего место до облучения. И ядерные и корковые легкодоступные тиолы практически полностью восстанавливаются до уровня нормы после облучения (отличия составляют 12 и 8%, соответственно). Что касается скрытых тиолов, данные показывают, что облучение практически не влияет на их содержание в ядре инкубированного  $H_2O_2$  хрусталика, в то же время сильно снижает содержание скрытых тиолов в корковой части, до 30% уровня исходного хрусталика.

В совокупности данные перекисного окисления липидов и содержания восстановленных тиолов указывают на то, что вызванный  $H_2O_2$  окислительный стресс в хрусталике может быть облегчен с помощью облучения ЭМИ 460 МГц. Нами ранее в экспериментах с животными (белые крысы) было показано, что хроническое облучение дециметровым излучением на уровне целого организма приводит к окислительным изменениям в различных зрительных структурах, в том числе и хрусталике [4, 5, 8]. В противоположность облучению при высокой интенсивности (30 мкВт/см<sup>2</sup>), низкоинтенсивное облучение (10 мкВт/см<sup>2</sup>) приводило к снижению уровня ПОЛ в хрусталике (также в сетчатке и мозговых структурах), что, как было показано, сопровождалось изменением активности различных ферментных (СОД, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза) и неферментных антиоксидантов (глутатион). Поскольку эти три фермента являются ключевыми в общей регуляции процесса ПОЛ, то можно предположить, что антиоксидантное действие облучения на хрусталик опосредуется через них.

В некоторых работах, посвященных изучению механизма развития катаракты, была обнаружена активация ПОЛ в катарактальных хрусталиках, и авторы связали её с нарушениями в ферментной антиперекисной системе хрусталика [2, 3]. Кроме того, способность хрусталика разлагать перекись водорода в омывающей среде, как показано в работе [1], зависит от пула глутатиона (а он составляет подавляющую часть легкодоступных тиолов), уровень которого поддерживается активностью глутатионовой антиперекисной системы. То, что при развитии катаракты содержание восстановленного глутатиона в хрусталике сильно падает, по-видимому, является недостатком этой системы. Обнаружение в наших экспериментах снижения содержания легкодоступных тиолов в коре и ядре хрусталика и восстановление его после облучения, по-видимому, связана со стимуляцией глутатионовой системы, в первую очередь, фермента глутатионредуктазы. Система регенерации глутатиона, по-видимому, активируется под действием микроволнового излучения; напомним, что в образцах, подверженных инкубации  $H_2O_2$ , но за время облучения опытных образцов перенесенных на обычный физиологический раствор, восстановление уровня легкодоступных тиолов не происходило. Отметим, что в работе [9] было показано положительное влияние на активность данного фермента облучения ЭМИ 460 МГц при низких интенсивностях.

При развитии окислительного стресса в тканях, в особенности в начальных стадиях, часть легкодоступных тиолов, именно глутатиона, расходуется на формирование смешанных белок-тиоловых дисульфидов (этот процесс называется тиолированием) [13]. Большая интенсивность процесса тиолирования в ядре (возможно, и большая плотность белков), по-видимому, обуславливает и дополнительный расход глутатиона в нем. В литературе тиолирование рассматривают как процесс, оберегающий SH-группы важнейших белковых составляющих клетки от окисления на время действия окислительных факторов. Обратный процесс – детиолирование – происходит с помощью специальной глутаредоксиновой системы при уменьшении опасности окислительного повреждения. В этой связи интересным является факт дальнейшего снижения содержания скрытых тиолов в коре хрусталика в ходе облучения, в отличие от ядра, где уровень скрытых тиолов остается неизменным при облучении. На наш взгляд, снижение содержания белковых (скрытых) тиолов может быть обусловлено активацией защитного механизма, связанного с глутаредоксиновой системой. Детиолирование белков с помощью глутатион-зависимой тиолтрансферазы, входящей в эту систему, и обладающей значительно большей активностью в коре хрусталика, по-видимому, приводит к конформационным изменениям белков, обнажая ранее скрытые SH-группы [13]. Конечно, для данного утверждения необходимо исследование активности тиолтрансферазы под действием облучения, хотя можно отметить, что входящая в общую защитную систему хрусталика другая подобная система, тиоредоксинредуктазная система, способная восстанавливать белковые дисульфиды, может индуцироваться микроволнами [10].

Учитывая полученные ранее данные о том, что окислительная реакция хрусталика на микроволновое излучение *in vivo* формируется непосредственно процессами в самом хрусталике (хотя в других зрительных структурах, например, в сетчатке, влияние излучения может быть частично опосредовано центральными структурами) [7], и в силу полуавтономности жизнедеятельности хрусталика, нам представляется вполне приемлемым перенесение результатов *in vitro* облучения изолированного хрусталика на ситуацию *in vivo*. Следовательно, имея ввиду, что катаракта является в большей частью болезнью старения, можно говорить о том, что процессы, инициирующие начало развития болезни, в том числе и свободнорадикальные реакции, носят накопительный характер. Отсюда можно прийти к выводу о том, что при развитии соответствующей фундаментальной базы микроволновая антиоксидантная профилактика катаракты может быть реализована в физиотерапевтической практике.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бабижаев М.А., Деев А.И., Владимиров Ю.А., Деева И.Б. Разложение перекиси водорода катарактальными хрусталиками человека. // Бюлл. exper. биол. – 1986. - Т. 102. - № 8. - С. 158-160.
2. Бабижаев М.А., Айтмагамбетов М.Т., Деев А.И., Владимиров Ю.А. Индукция перекисного окисления липидов в хрусталике. // Бюлл. exper. биол. – 1987. - Т. 103. - № 1. - С. 38-40.
3. Бабижаев М.А., Архипенко Ю.В., Каган В.Е. Активность антиоксидантных ферментов и метаболизм перекисных соединений в хрусталике при катарактогенезе. // Бюлл. exper. биол. – 1987. - Т. 103. - № 2. - С. 143-146.
4. Гаджиев А.М., Юсифов Э.Ю., Аббасова М.Т. и др. Изучение окислительного действия микроволнового излучения на организм. // Актуальные проблемы сравнительной физиологии и биохимии: Труды 3-го Съезда Азербайджанского Общества Физиологов, посвящ. 95-летию акад. А.И.Караева. – Баку, 2005. - С. 278-290.
5. Гаджиев А.М., Мусаев А.В., Исмаилова Л.Ф. Влияние микроволн дециметрового диапазона на тиоловую

- систему защиты в зрительных структурах животных разного возраста. // Физиотерапия, бальнеология, реабилитация. – 2005. - № 6. - С. 13-17.
6. Зубкова С.М. Биофизические и физиологические механизмы лечебного действия электромагнитных излучений. // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. – 2002. - № 2. - С. 3-9.
  7. Исмаилова Л.Ф. Особенности действия дециметрового электромагнитного излучения (460 МГц) на зрительные структуры на клеточном и субклеточном уровнях. // Современные проблемы сравнительной физиологии и биохимии: Сборник научных трудов ин-та физиологии НАН Азерб. – Баку, 2006. - Т. 24. - С. 167-174.
  8. Мусаев А.В., Исмаилова Л.Ф., Шабанова А.Б. и др. Про- и антиоксидантное действие электромагнитных полей сверхвысокой частоты (460 МГц) на ткани мозга в эксперименте. // Вопр. курортол. – 2004. - № 2. – С. 19-23.
  9. Шабанова А.Б., Юсифов Э.Ю. Изучение активности глутатионредуктазы в тканях зрительной системы молодых и взрослых крыс, облучаемых дециметровыми микроволнами. // Вопросы физиологии и биохимии: Сборник научных трудов ин-та физиологии НАН Азерб. – Баку, 2002. - Т. 20. - С. 216-222.
  10. Шабанова А.Б., Юсифов Э.Ю. Влияние микроволн на активность тиоредоксинредуктазы и ферментов антиоксидантной защиты в тканях зрительной системы крыс. // Проблемы физиологии и биохимии: Сборник научных трудов ин-та физиологии НАН Азерб. – Баку, 2003. - Т. 21. - С. 391-398.
  11. Asakawa T., Matsushita S. Coloring condition of TBA test for detecting lipid hydroperoxides. // Lipids. – 1980. - Vol. 15. - No 3. - P. 137-140.
  12. Brocklehurst B., McLauchlan K.A. Free radical mechanism for the effects of environmental electromagnetic fields on biological systems. // Int. J. Radiat. Biol. – 1996. - Vol. 69. - No 1. - P. 3-24.
  13. Lou M.F. Redox regulation in the lens. // Progress in Retinal and Eye Research. – 2003. – Vol. 22. - P. 657–682.
  14. Sedlak J., Lindsey R.H. Estimation of Total, Protein-Bound and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent. // Anal. Biochem. – 1968. - Vol. 25. – P. 192-205.
  15. Spector A. The search for a solution to senile cataracts. // Invest. Ophthal. – 1984. – Vol. 25. – P. 130-146.

AŞAĞI İNTENSİVLİKLİ ELEKTROMAGNİT ŞUALANMASI GÖZ BÜLLURUNDA  
OKSIDLƏŞDİRİCİ STRES VƏZİYYƏTİNİ ZƏİFLƏDİR

*A.İ.Qarayev adına Azərbaycan MEA-nın fiziologiya institutu, baki şəh.*

## XÜLASƏ

Perspektivdə kataraktın inkişafının qarşısını almaq məqsədi ilə desimetr diapazonunda elektromaqnit şüalanmasının göz büllurunda oksidləşdirici stresin səviyyəsinə təsiri tədqiq edilmişdir. Eksperimental oksidləşdirici stress 3 aylıq ağ siçovullardan ayrılmış büllur nümunələrində oksidləşdirici agentin - hidrogen peroksidin təsiri altında yaradılmışdır. Billur toxumalarında oksidləşdirici stresin səviyyəsi lipid peroksidləşməsi məhsullarının və reduksiya olunmuş tiolların miqdarı ilə qiymətləndirilib. Göstərilmişdir ki, billurun tərkibində 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> olan fizioloji məhlul mühitində 1 saat müddətində inkubasiyası yolu ilə yaradılmış mülayim oksidləşdirici stress onun aşağı intensivlikli elektromaqnit şüalanmasının (460 MHz, 10 mKVt/sm<sup>2</sup>) təsirinə məruz qalması nəticəsində praktik olaraq aradan götürülür. Bunu billurun növü və qabıq hissələrində lipid peroksidləşməsinin zəifləməsi və müxtəlif növ tiolların miqdarının bərpası sübut edir. Tədqiqatın nəticələri fizioterapiyada yeni bir yanaşmanın, kataraktın mikrodalğa antioksidant profilaktikasının inkişafı üçün əsas verir.

Ibrahimova Zh.M.

LOW INTENSITY ELECTROMAGNETIC RADIATION REDUCES OXIDATIVE STRESS LEVEL IN EYE  
CRYSTALLINE LENS

*Physiological Institute after A.I.Garayev of National Academy of Sciences.*

## SUMMARY

A possibility of oxidative stress reduction in crystalline lens by using decimetric electromagnetic irradiation has been studied in order to prevent a cataract formation. Oxidative stress in isolated lenses from 3-months age rats was induced by treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Lipid peroxidation product malon dialdehyde and reduced thiols (non-protein and protein thiols) contents were measured for evaluation of oxidative stress level. It has been shown that the moderate oxidative stress induced in crystalline lens by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM, for 1 hour) becomes weak when lens is exposed to low intensity irradiation 460 MHz; both decreased lipid peroxidation levels and enhanced reduced thiols content in nuclear and cortical regions give evidence for this. The results of study will probably be useful for development of new approach which may be named a microwave antioxidant prophylaxis.