

**Градов О.В.<sup>1</sup>, Градова М.А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Институт энергетических проблем химической физики РАН

<sup>2</sup>Институт химической физики имени Н.Н. Семенова РАН

## **Система для микроскопической диагностики и картирования цитофизиологического воздействия синглетного кислорода и других активных форм кислорода (АФК), вырабатываемых при сверхвысокочастотном воздействии на живые ткани**

*Разработана специализированная установка для микроскопического исследования процессов образования активных форм кислорода (АФК) при микроволновом облучении препаратов с автоматизированным управлением / механизированным тубусом и сбором данных в реальном времени. Для биомедицинской практики созданная установка может быть полезна при: стандартизации или сертификации СВЧ источников; апробации потенциальных протекторов-антиоксидантов, защищающих ткани от воздействия АФК; тестировании флуоресцентных сенсоров на АФК; анализе компартиментализации и распределения активных форм кислорода в различных тканях в целях установления специфических фармако-физиотерапевтических и токсикологических локализаций АФК в топографо-анатомических зонах. В проекте особое внимание уделяется синглетному кислороду, вырабатываемому образцами под воздействием СВЧ, как физиологически активному высокореакционноспособному агенту.*

**Ключевые слова:** активные формы кислорода, СВЧ, микроволновое излучение, протекторы, антиоксиданты, синглетный кислород, микроскопия, картирование

### **Введение**

Проблема синглетного кислорода занимает приоритетное место для биомедицинской физики, клинической биохимии и молекулярной медицины, так как синглетный кислород является высокоактивным низкомолекулярным агентом, повреждающим мембраны [1], цитоплазматические белки [2], нуклеиновые кислоты [3] (или опосредующим воздействие на них токсических агентов как органического [4], так и неорганического [5] состава). Обычно защищающие от воздействия синглетного кислорода при фотоиндуцированных повреждениях мембранные липиды [6,7] не способны элиминировать эффект объёмного воздействия при применении других, более физиологически-активных индукторов генерации синглетного кислорода, в особенности – проникающих вглубь клетки агентов не фотобиологического плана.

Так, в частности, известно, что синглетный кислород образуется, под воздействием микроволнового излучения и в сверхвысокочастотном разряде [8,9], достижимом в таких доступных для эксперимента источниках, как химические (например, кислородно-йодные [10]) лазеры, газоразрядные лампы [11], радиочастотные или микроволновые плазматроны [12]. Есть основания полагать, что действие подобных источников на биологические ткани, не связанное с фотохимическими процессами, обуславливается санти- либо дециметровыми волнами, результатом чего, на клеточном уровне, является неспецифический окислительный стресс. Известны релевантные в медицинском контексте

сообщения об окислительном стрессе на частотах СВЧ, свойственных микроволновым печам, сотовой связи, беспроводным сетям на базе стандарта связи IEEE 802.11 (Wi-Fi) [13]. Индуцируемые этими частотами явления гистохимически значимы и могут диагностироваться как гистопатологические изменения микроскопическим путем [14]. Соответственно, возникает необходимость в конструкциях, позволяющих параллельно воздействовать на клетки или ткани частотами сантиметрового / дециметрового диапазона и микроскопически фиксировать наблюдающиеся при этом изменения вместе с картированием их лабильности к окислительному стрессу. Создание такого рода системы позволило бы не только констатировать факт изменений, но и исследовать эффективность потенциальных протекторов, на роль которых некоторыми авторами выдвигаются селен и L-карнитин [15,16]. Нами в настоящей статье описывается создание установки, способной выполнять указанные функции.

### **Конструкция установки и возможности анализа**

Предложенный нами вариант конструкции установки базируется на опубликованной ранее концепции анализа содержания активных форм кислорода в тканях при облучении с химической калибровкой по данным измерений фона в среде вблизи источника [17,18]. Это необходимо, поскольку определение отдельных активных форм кислорода достаточно затруднительно в силу колокализации их в клетке при неспецифическом окислительном стрессе и единства механизмов их воздействия на клетку (в случае СВЧ-облучения это проявляется в единстве действия озона, пероксида водорода и других активных форм кислорода и прямых эффектов СВЧ [19,20]). Собранный нами аппарат-прототип показан на рис. 1. Хемометрическая система для контроля наработки активных форм кислорода в среде, являющаяся предметом отдельной работы, на фотографии не показана.

Предложенная конструкция состоит из колонны, в которой размещен передвигаемый с использованием шаговых двигателей микроскопический тубус (с opak-иллюминатором и оптоволоконным спектрофлуориметром марки «Ocean Optics» на револьверной насадке) и на которой расположен блок оптического детектирования, импульсного источника питания, модуля магнетрона с камерой предэкспонирования, в которой облучается и затем наблюдается микропрепарат, пульта управления экспозицией и компьютера с программным обеспечением для сбора и обработки данных. В исходной версии система работает на релевантной частоте 2.45 ГГц. Мощность и импульсный режим управляются с блока пульта управления, функционально аналогичного системе управления микроволновой печи. Теоретически, исходя из данных медицинской физики, может быть также логично проведение измерений при других частотах (например, 900 МГц, 930 МГц и 1.8 ГГц), на которых фиксированы генерация активных форм кислорода и явления окислительного стресса [21-23] (на 1.9 ГГц эти данные не подтверждаются [24]). Для этого в приборе предусмотрена возможность замены магнетрона и пульта управления экспозицией. Для указанного диапазона длин волн подобран измеритель шума типа X5-24, предназначенный для проведения измерений по электромагнитной шумовой протекции, так как известно, что при росте концентраций активных форм кислорода и индуцируемой ими деструкции ДНК [25] электромагнитные шумы могут ингибировать эту деструкцию, ведя к понижению концентрации активных форм кислорода [26]. Измерения проводятся в специально изготовленных камерах / резонаторах разных размеров и геометрии, после или синхронно с облучением в них в защищенных от света условиях (на момент экспозиции автоматически закрывается шторка на корпусе), чтобы исключить не предусматриваемые многими авторами (но действующие на ткани) нетепловые эффекты и индцировать лишь отклик на СВЧ-воздействие, в соответствии с работой [27]. Следует отметить, что целиком стандартизировать излучение также по длине волны авторам не удалось, так как на СВЧ-частотах магнетрон формирует диапазон от 2.3 ГГц до 2.7 ГГц и практически невозможно

нивелировать паразитную модуляцию магнетрона в рабочей зоне (3,5...4кВ). В остальном данная установка стандартизируема до уровней, колебания показаний в которых, согласно литературным данным, не меняют характера вероятных физиологических эффектов. Так как в конструкции применено двойное экранирование, пользование установкой полностью безопасно для оператора. На данной установке можно также реализовывать методики флуоресцентного картирования в случае использования чувствительных к активным формам кислорода или пероксиду водорода красителей и флуоресцентных сенсоров [28].

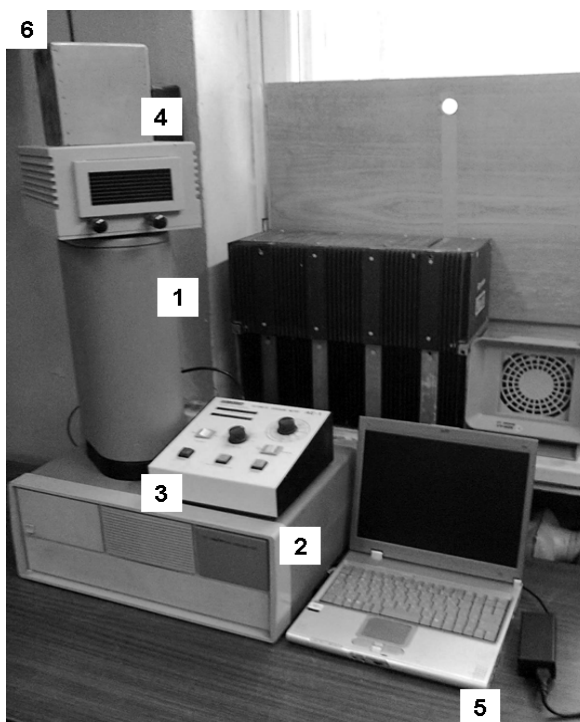


Рис. 1: Структура прототипа установки: колонна для позиционирования тубуса с опак-иллюминатором (1); блок облучения с замкнутой в период облучения камерой (2); пульт управления значением мощности и длительности экспозиции (3); камера и источник освещения для оптоволоконной подачи его на opak (4); компьютер с программой для управления PIC-контроллером и сбором данных (5); защитный колпак, предохраняющий оголенные провода и источник освещения (6).

При этом распределение наиболее окисленных областей на препарате не обязательно будет соответствовать расположению участков генерации активных форм кислорода из-за различной окисляемости макромолекулярных компонентов клеток, органелл и различий в проницаемости для разных компартментов. В связи с этим для объективного сравнения эффективности генерации синглетного кислорода в различных зонах образца логично использовать не косвенные методики определения по продуктам окисления, а прямые (в частности, флуоресцентные) методы детектирования активных форм кислорода *in situ* в ходе выделения, что требует разработки алгоритмов управления мехатронной частью установки, адекватных к конкретным временам экспонирования и изоляции для конкретной задачи.

Иными словами, в ряде экспериментальных техник данная установка позволит картировать не редокс-статус клетки как свершившийся результат химического процесса, а лабильность или резистентность (то есть – физиологический статус), окисляемость той или иной области в зависимости от параметров СВЧ-облучения. Это качественно новая форма функционально-морфологической и клинко-гистохимической интерпретации анализа *in situ* с учетом формы и параметров индуцирующего воздействия, недостаточно полно и корректно описанных нами в работе [29].

Так как СВЧ при длине волны 2.45 ГГц обеспечивает, разогрев биологических структур, а разогреваемость конкретной структуры зависит от содержания воды, возможно проведение в данной установке высокоразрешающей термографии в расширенном динамическом диапазоне – т.н. NIR-HDRI-термографии [30], с анализом колокализации содержания активных форм кислорода, воды и термографических характеристик, картируемых при СВЧ-облучении. Соответственно, в динамическом варианте предлагаемая нами методика может быть частично использована для анализа диффузионных процессов и тепломассопереноса. Это может быть полезно не столько для контроля живых клеток или тканей, которых при «пробоподготовке» такого рода просто обычно не остается, сколько для контроля везикулярных переносчиков фармпрепаратов на доклинической стадии.

Надо отметить, что первая установка, показанная на илл. 1, была неоптимальной по соотношению размера камеры и используемой длины волны, то есть: рабочая камера как резонатор образовывала неоптимальные конфигурации стоячих волн при многократных отражениях от стенок, поэтому наблюдался перегрев, градиенты нагрева и нестабильность работы (слишком малый объём камеры). Поэтому, формулируя приоритет, мы не можем пока говорить о перспективах внедрения данного инструмента в широкую практику; но, в принципе, возможна численная оптимизация с помощью HFSS (от ANSYS) или аналогов.

### **Заключение**

Таким образом, создана первая система, позволяющая: исследовать наработку активных форм кислорода (АФК) в зависимости от параметров облучения; исследовать колокализацию данных форм с другими физико-химическими параметрами, так или иначе связанными с облучением; производить термографию нагрева при СВЧ и определять с её помощью содержание аналита; использовать флуоресцентные методики с оптоволоконной спектрофлуориметрией на выходе и тем самым определять нарабатываемые активные формы кислорода / пероксид водорода.

### **Библиографический список**

1. Kochevar I.E., Lambert C.R., Lynch M.C., Tedesco A.C. Comparison of photosensitized plasma membrane damage caused by singlet oxygen and free radicals // *Biochim. Biophys. Acta*. 1996. Vol. 1280. № 2. PP. 223-230.
2. He Y.Y., Council S.E., Feng L., Bonini M.G., Chignell C.F. Spatial distribution of protein damage by singlet oxygen in keratinocytes // *Photochem. Photobiol.* 2008. Vol. 84, № 1. PP. 69-74.
3. Di Mascio P., Kaiser S.P., Devasagayam T.P.A., Sies H. Biological Significance of Active Oxygen Species: In Vitro Studies on Singlet Oxygen-Induced DNA Damage and on the Singlet Oxygen Quenching Ability of Carotenoids, Tocopherols and Thiols // *Advances in Experimental Medicine and Biology (Biological Reactive Intermediates: IV)*. 1991. Vol. 283. PP. 71-77.
4. Ray R.S., Mujtaba S.F., Dwivedi A., Yadav N., Verma A., Kushwaha H.N., Amar S.K., Goel S., Chopra D. Singlet oxygen mediated DNA damage induced phototoxicity by ketoprofen resulting in mitochondrial depolarization and lysosomal destabilization // *Toxicology*. 2013. Vol. 314. № 2-3. PP. 229-237.
5. Fenoglio I., Ponti J., Alloa E., Ghiazza M., Corazzari I., Capomaccio R., Rembges D., Oliaro-Bosso S., Rossi F. Singlet oxygen plays a key role in the toxicity and DNA damage caused by nanometric TiO<sub>2</sub> in human keratinocytes // *Nanoscale*. 2013. Vol. 5. № 14. PP. 6567-6576.
6. Rokitskaya T.I., Kotova E.A., Agapov I.I., Moisenovich M.M., Antonenko Y.N. Unsaturated lipids protect the integral membrane peptide gramicidin A from singlet oxygen // *FEBS Lett.* 2014. Vol. 588. № 9. PP. 1590-1595.
7. Zarebski M., Kordon M., Dobrucki J.W. Photosensitized damage inflicted on plasma membranes of live cells by an extracellular generator of singlet oxygen – a linear dependence of a lethal dose on light intensity // *Photochem. Photobiol.* 2014. Vol. 90. № 3. PP. 709-715.
8. Savin Yu.V., Goryachev L.V., Adamenkov Yu.A., Rakhimova T.V., Mankelevich Yu.A., Popov N.A., Adamenkov A.A., Egorov V.V., Ilyin S.P., Kolobyanin Yu.V., Kudryashov E.A., Rogozhnikov G.S.,

- Vyskubenko B.A. Singlet oxygen production and quenching mechanisms in travelling microwave discharges // *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2004. Vol. 37. № 22. PP. 3121-3128.
9. Popović S., Rašković M., Kuo S.P., Vušković L. Reactive Oxygen Emission from Microwave Discharge Plasmas // *Journal of Physics: Conference Series*. 2007. Vol. 86, Art. № 012013. PP. 1-15.
  10. Pitz G.A., Lange M.A., Perram G.P. Singlet oxygen kinetics in a double microwave discharge // *Proc. SPIE*. 2004. Vol. 5448 (High-Power Laser Ablation V). PP. 1039-1048.
  11. Yu Y., Zhang T., Zheng L., Yu J. Detection of reactive oxygen species generated by microwave electrodeless discharge lamp and application in photodegradation of H<sub>2</sub>S // *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2013. Vol. 30. № 7. PP. 1423-1428.
  12. Lange M.A., Pitz G.A., Perram G.P. Effect of Residence Time on Singlet Oxygen Production in Microwave and RF Discharges // *AIP Conf. Proc.* 2010. Vol. 1278. PP. 482-491.
  13. Özorak A., Nazıroğlu M., Çelik Ö., Yüksel M., Özçelik D., Özkaya M.O., Çetin H., Kahya M.C., Kose S.A Wi-Fi (2.45 GHz)– and mobile phone (900 and 1800 MHz)– induced risks on oxidative stress and elements in kidney and testis of rats during pregnancy and the development of offspring // *Biol. Trace Elem. Res.* 2013. Vol. 156. № 1-3. PP. 221-229.
  14. Saygin M., Caliskan S., Karahan N., Koyu A., Gumral N., Uguz A. Testicular apoptosis and histopathological changes induced by a 2.45 GHz electromagnetic field // *Toxic. Ind. Health*. 2011. Vol. 27. № 5. PP. 455-463.
  15. Gumral N., Nazıroglu M., Koyu A., Ongel K., Celik O., Saygin M., Kahriman M., Caliskan S., Kayan M., Gencil O., Flores-Arce M.F. Effects of selenium and L-carnitine on oxidative stress in blood of rat induced by 2.45-GHz radiation from wireless devices // *Biol. Trace Elem. Res.* 2009. Vol. 132. № 1-3. PP. 153-163.
  16. Türker Y., Nazıroğlu M., Gümral N., Celik O., Saygın M., Cömlekçi S., Flores-Arce M. Selenium and L-carnitine reduce oxidative stress in the heart of rat induced by 2.45-GHz radiation from wireless devices // *Biol. Trace Elem. Res.* 2011. Vol. 143. № 3. PP. 1640-1650.
  17. Gradov O.V. Experimental setups for ozonometric microscopy // *Biomed. Eng.* 2013. Vol. 46, № 6. PP. 260-264.
  18. Градов О.В. Экспериментальные установки для озонметрической микроскопии // *Медицинская техника*. 2012. Вып. 6. С. 42-47.
  19. Yin G., Liao P.H., Lo K.V. An ozone / hydrogen peroxide / microwave-enhanced advanced oxidation process for sewage sludge treatment // *Journ. Envir. Sci. Health. A: Tox. Hazard. Subst. Envir. Eng.* 2007. Vol. 42. № 8. PP. 1177-1181.
  20. Wong W.T., Chan W.I., Liao P.H., Lo K.V. A hydrogen peroxide / microwave advanced oxidation process for sewage sludge treatment // *Journ. Envir. Sci. Health A: Tox. Hazard. Subst. Envir. Eng.* 2006. Vol. 41. № 11. PP. 2623-2633.
  21. Zmyślony M., Politanski P., Rajkowska E., Szymczak W., Jajte J. Acute exposure to 930 MHz CW electromagnetic radiation in vitro affects reactive oxygen species level in rat lymphocytes treated by iron ions // *Bioelectromagnetics*. 2004. Vol. 25. № 5. PP. 324-328.
  22. Kesari K.K., Kumar S., Behari J. 900-MHz microwave radiation promotes oxidation in rat brain // *Electromag. Biol. Med.* 2011. Vol. 30. № 4. PP. 219-234.
  23. Ni S., Yu Y., Zhang Y., Wu W., Lai K., Yao K. Study of oxidative stress in human lens epithelial cells exposed to 1.8 GHz radiofrequency fields // *PLoS One*. 2013. Vol. 8. Art. №. E72370. PP. 1-9.
  24. Brescia F., Sarti M., Massa R., Calabrese M.L., Sannino A., Scarfi M.R. Reactive oxygen species formation is not enhanced by exposure to UMTS 1950 MHz radiation and co-exposure to ferrous ions in Jurkat cells // *Bioelectromagnetics*. 2009. Vol. 30. № 7. PP. 525-535.
  25. Campisi A, Gulino M, Acquaviva R, Bellia P, Raciti G, Grasso R, Musumeci F, Vanella A, Triglia A. Reactive oxygen species levels and DNA fragmentation on astrocytes in primary culture after acute exposure to low intensity microwave electromagnetic field // *Neurosc. Lett.* 2010. Vol. 473. № 1. PP. 52-55.
  26. Yao K., Wu W., Wang K., Ni S., Ye P., Yu Y., Ye J., Sun L. Electromagnetic noise inhibits radiofrequency radiation-induced DNA damage and reactive oxygen species increase in human lens epithelial cells // *Mol. Vis.* 2008. Vol. 14. PP. 964-969.
  27. Marjanović A.M., Pavičić I., Trošić I. Biological indicators in response to radiofrequency / microwave exposure // *Arh. Hig. Rad. Toks.* 2012. Vol. 63. № 3. PP. 407-416.
  28. Mishina N.M., Tyurin-Kuzmin P.A., Markvicheva K.N., Vorotnikov A.V., Tkachuk V.A., Laketa V., Schultz C., Lukyanov S., Belousov V.V. Does cellular hydrogen peroxide diffuse or act locally? // *Antioxidants and Redox Signaling*. 2011. Vol. 14. № 1. PP. 1–7.
  29. Градов О.В., Градова М.А. Автоволновые измерения при СВЧ-индуцированной самоорганизации структур // Сб. конф. "Микроэлектроника СВЧ - 2012". 2012. СПб. С. 371-376.
  30. Градов О.В., Нотченко А.В. Картирование градиента в NIR-HDRI-термографии в CMOS-лабораториях на чипе // Сб. II Международной конференции «Современные методы и средства исследований теплофизических свойств веществ». 2012. СПб. С. 245-246.