

**ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ ДЕГИДРОГЕНАЗ В КЛЕТКАХ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОПУХОЛИ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО
СВЕРХВЫСОКОЧАСТОТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

Крюкова О.В.¹, Пьянков В.Ф.^{1,2}

¹ФИЦ КНЦ СО РАН

Академгородок, 50, г. Красноярск, 660036, РФ

e-mail: marta913@mail.ru

²Сибирский федеральный университет

Свободный пр., 79, г. Красноярск, 660041, РФ

Аннотация. В работе проведена оценка изменения активности ферментов (Г6ФДГ, ГР, ЛДГ, обр.ЛДГ, НАДМДГ) в клетках асцитной карциномы Эрлиха на разных стадиях роста опухоли после воздействия сверхвысокочастотного электромагнитного излучения. Показано, что изменение активности ферментов зависит не только от оказываемого воздействия, но от особенностей метаболизма опухолевых клеток, которые связаны с переходом опухоли в следующую стадию роста в организме животного. В целом наблюдаемые изменения активности ферментов свидетельствуют о рассогласовании процессов регуляции анаэробного и аэробного обменов в клетках асцитной карциномы Эрлиха под действием сверхвысокочастотного электромагнитного излучения. При этом при воздействии электромагнитного поля изменение активности Г6ФДГ и ГР носит несогласованный характер, что в свою очередь приводит к уменьшению способности клетки противостоять процессам свободно-радикального окисления макромолекул, развивающимся в результате экстремального воздействия.

Ключевые слова: дегидрогеназы, активность ферментов, электромагнитное излучение, СВЧ-излучение, сотовый телефон, асцитная карцинома Эрлиха

**EFFECTS OF MICROWAVE RADIATION ON DEHYDROGENASE ACTIVITY IN
EXPERIMENTAL TUMOR CELLS**

Kryukova O.V.¹, Pyankov V.F.^{1,2}

¹ Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences ,
Akademgorodok, 50, Krasnoyarsk, 660036, Russia

e-mail: marta913@mail.ru

²Siberian Federal University,

Svobodnyiy Av., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia

Abstract. The changes of the enzymes activity (G6FDH, GR, LDH, MDH) in Ehrlich ascites carcinoma cells at different stages of tumor growth after exposure to microwave radiation have been studied. It is shown that the change in the activity of enzymes depends not only on the effect of microwave radiation, but on the characteristics of the metabolism of tumor cells, which are associated with the tumor growth stage in the mice organism. The observed changes in the activity of enzymes indicate discrepancy in the regulation of anaerobic and aerobic metabolism in Ehrlich ascites carcinoma cells in the microwave radiation exposure. Under microwave radiation the changes in the activity of G6PDH and GR are inconsistent, which leads to a decrease in the cell ability to resist the processes of generation of reactive oxygen.

Key words: Dehydrogenase, enzyme activity, electromagnetic radiation, microwave radiation, cell phone, Ehrlich ascites carcinoma

В процессе эволюции важная роль в формировании живых организмов отводится электромагнитным полям природного происхождения. На территории крупных городов происходит изменение естественного электромагнитного фона за счет новых функциональных источников электромагнитного излучения (ЭМИ) радиочастотного диапазона – базовых станций сотовой связи и мобильных радиотелефонов. Данные, полученные ранее, свидетельствуют о том, что в условиях мегаполиса (на примере г. Красноярск) электромагнитное загрязнение, т.е. привнесение в естественный электромагнитный фон дополнительных источников ЭМИ антропогенного происхождения, имеет нарастающий характер за счет увеличения числа передающих радиотехнических объектов, генерирующих сигнал в диапазоне частот 300 МГц – 30 ГГц, причем значительный вклад в формирование электромагнитной нагрузки вносит система сотовой связи [1]. На первый взгляд, уровни ЭМИ невысоки, но каков результат их воздействия на живой организм в многолетнем хроническом режиме, до сих пор не известно. В свою очередь ряд авторов предупреждают о рисках для здоровья населения, связанных с длительным воздействием ЭМИ [2-5].

Цель данной работы оценить влияние ЭМИ СВЧ-диапазона на активность ферментов в клетках экспериментальной опухоли.

В качестве модельной клеточной системы была выбрана асцитная карцинома Эрлиха (АКЭ), позволяющая в короткие сроки наблюдать стадии развития клеточной популяции, типичные для опухолевых клеток [6].

Работу проводили на мышах-самцах популяции ICR массой тела 25-27 г, полученных из питомника ФГБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Животные получали стандартный пищевой рацион вивария и имели свободный доступ к

питьевой воде в соответствии с Правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей.

Для оценки изменения активности ферментов в опухолевых клетках производили отбор проб АКЭ на 7-е, 9-е, 11-е и 13-е сутки роста опухоли у животных. Время забора проб является характерным для определенной стадии роста опухоли после инокуляции в брюшную полость мышей: 7–9-е сутки – стадия активного роста опухоли, 11–13-е сутки – терминальная стадия, за которой следует гибель организма [6]. Каждый раз выделенные клетки АКЭ делили на две группы. Клетки группы 1 (контроль) воздействию не подвергали и содержали в сходных условиях. На клетки группы 2 *in vitro* в течение 30 минут воздействовали ЭМП СВЧ-диапазона, в качестве источника ЭМИ СВЧ использовали сотовый телефон (частота 900 МГц, плотность потока энергии 9 мкВт/см²), находящийся на расстоянии не более 1 см от объекта.

Биолюминесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в клетках АКЭ проводили по методу [7] с использованием сопряженной биолюминесцентной системы, содержащей люциферазу и НАДН(Ф)-оксидоредуктазу. Определяли активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), лактатдегидрогеназы для прямой и обратной реакции (ЛДГ, обр.ЛДГ), НАД-зависимой малатдегидрогеназы (НАДМДГ), глутатионредуктазы (ГР). Активность выражали в ферментативных единицах, отнесенных к 1 мг общего белка в экстракте, где 1 Е=1 мкмоль/мин/г.

Выбор ферментов для анализа был связан с тем, что особенностью опухолевых клеток является преобладание аэробного гликолиза (эффект Варбурга) [8]. Этот биоэнергетический и метаболический признак позволяет опухолевым клеткам выживать и делиться в неблагоприятных условиях. Клетки опухоли обеспечивают необходимый НАД⁺ через реакцию, катализируемую ЛДГ, в результате которой пируват переходит в лактат с одновременной регенерацией НАД. Экспрессия гена и активность ЛДГ повышаются при различных типах опухолей по сравнению с образцами тканей здорового организма [9]. Однако существует другой путь, служащий поставщиком необходимого количества НАД для гликолиза. Цитозольная изоформа НАДМДГ участвует в окислении НАДН до НАД, который затем используется для продолжения течения реакций гликолиза [10,11]. Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа является иницирующим ферментом пентозофосфатного пути превращения глюкозы в клетках, локализованным в цитоплазме. Г6ФДГ обеспечивает образование клеточного НАДФН из НАДФ [12,13]. Ферментом, который использует образовавшуюся энергию НАДФН, является ГР.

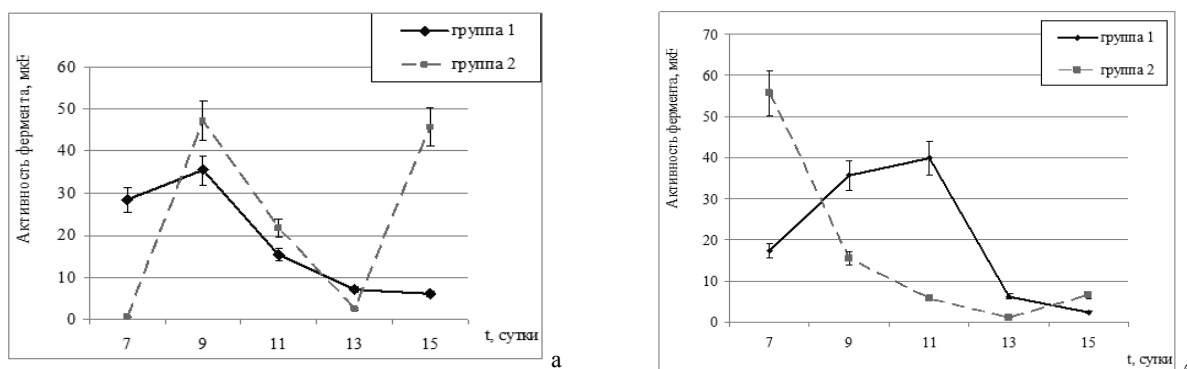


Рисунок 1 – Активность Г6ФДГ(а) и ГР (б) в клетках АКЭ. Здесь и далее по оси ординат – активность фермента, выраженная в мкЕ в пересчете на 1 г белка, по оси абсцисс – сутки роста опухоли

Как следует из данных, представленных на рисунке 1 а, активность Г6ФДГ в контроле (группа 1) к 15 суткам развития опухоли снижается, в то время как при облучении клеток ЭМИ СВЧ (группа 2) происходит повышение активности Г6ФДГ на 9, 11 и особенно заметно на 15 сутки развития опухоли. Полученный в результате реакции НАДФН необходим для поддержания уровня восстановленного глутатиона в клетке. Повышение активности Г6ФДГ может свидетельствовать об активизации этого метаболического пути и перераспределении части глюкозы с энергетических нужд клетки на пластические процессы. Снижение уровня активности Г6ФДГ отражает замедление переноса продуктов липидного катаболизма на окислительно-восстановительные реакции гликолиза. Реакцию, катализируемую Г6ФДГ, с кинетической точки зрения можно рассматривать как двусубстратную реакцию, протекающую с участием субстрата и кофермента, выполняющего роль второго субстрата. Фермент очень сильно ингибируется возрастающей концентрацией НАДФН и АТФ, по типу конкурентного ингибирования. ГР использует энергию НАДФН, образовавшегося в результате работы Г6ФДГ, для восстановления дисульфидной связи окисленного глутатиона [15,16].

Поскольку в результате деятельности Г6ФДГ образуется НАДФН, необходимый для регенерации восстановленного глутатиона, возрастание активности Г6ФДГ можно рассматривать как элемент адаптационной реакции клетки. Это утверждение согласуется и с данными литературы, в которых показано увеличение активности Г6ФДГ при ряде экстремальных воздействий, коррелирующее с повышением в клетке концентрации НАДФН и восстановленного глутатиона [17,18].

На рисунке 1б представлена активность ГР в клетках АКЭ после воздействия ЭМИ СВЧ-диапазона. Как следует из представленных данных, на 7 сутки активность ГР в клетках, подвергавшихся воздействию

электромагнитного поля, выше, чем в контроле. При этом с ростом опухоли в организме происходит снижение активности фермента как в экспериментальной, так и в контрольной группах.

Резонно было бы ожидать, что активность ГР будет изменяться синхронно с изменением активности Г6ФДГ, но наблюдаемые изменения носят несогласованный характер при воздействии электромагнитного поля, излучаемого сотовым телефоном, что в свою очередь приводит к уменьшению способности клетки противостоять процессам свободно-радикального окисления макромолекул, развивающимся в результате экстремального воздействия.

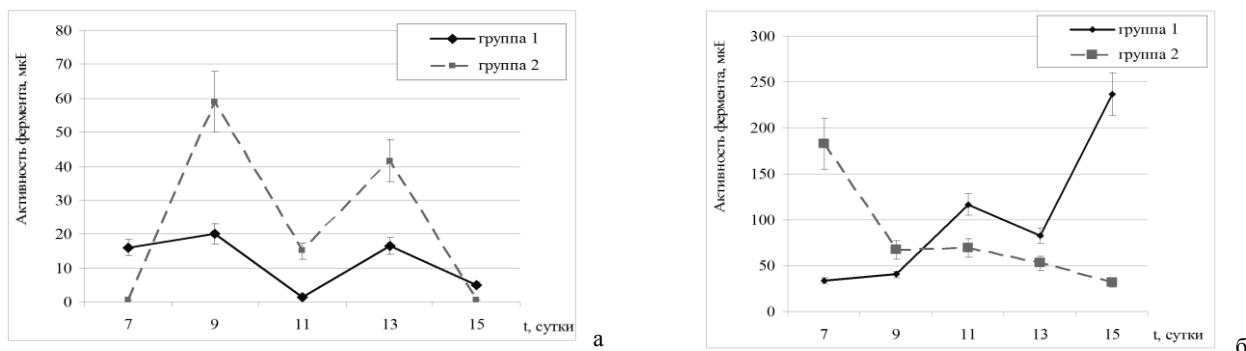


Рисунок 2 – Активность ЛДГ (а) и обр.ЛДГ (б) в клетках АКЭ

На рисунке 2 представлены данные об активности ЛДГ – цитоплазматического фермента, принимающего участие в реакциях гликолиза и катализирующего передачу восстановительного эквивалента от лактата на НАД или от НАДН на пируват. Равновесие реакции сдвинуто в сторону образования лактата. При высоких концентрациях лактата и НАД возможно смещение равновесия реакции в сторону окисления лактата в пируват. ЛДГ катализирует реакцию в обоих направлениях, но подобно всем ферментам на положение химического равновесия не влияет [17].

Из данных об активности ЛДГ и обр.ЛДГ в клетках АКЭ представленных видно, что в клетках, подвергавшихся воздействию ЭМИ СВЧ (группа 2) уровень активности обр.ЛДГ значительно снижается в течение всего исследуемого нами периода, в то время как активность фермента в контроле (группа 1) возрастает к 15 суткам развития опухоли. Такая картина обуславливает смещение равновесия между пируватом и лактатом в сторону уменьшения концентрации последнего в клетках АКЭ, подвергавшихся воздействию (группа 2) и увеличение содержания лактата в контрольной группе к 15 суткам. Поскольку пируват является предшественником ацетил-КоА, первичного субстрата ЦТК, снижение его концентрации может вызывать и снижение общего субстратного потока в этом цикле.

Следующий фермент, активность которого исследовали – НАДМДГ. В результате проведенных измерений выявлено, что для МДГ также характерны отличия активности между начальными и поздними стадиями роста АКЭ (рисунок 3). Так, на 7 и 9 сутки активность фермента в после воздействия ЭМИ СВЧ превышает значения активности фермента в контрольной группе, тогда как на 11-15 сутки, наоборот, активность фермента в клетках, подвергавшихся воздействию электромагнитного поля, ниже, чем в клетках контрольной группы.

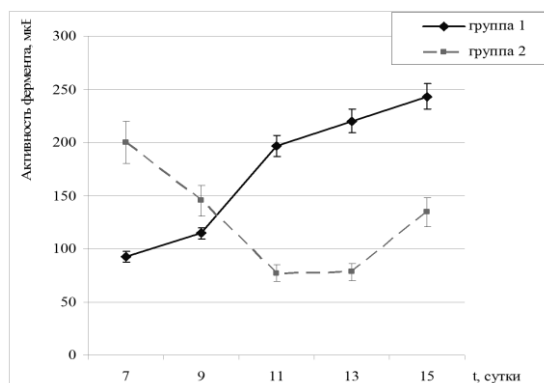


Рисунок 3 – Активность МДГ в клетках АКЭ

Как видно из рисунка 3, изменение активности МДГ в клетках АКЭ происходит не только в результате воздействия ЭМИ СВЧ-диапазона, но и связано с переходом опухоли в следующую стадию роста в организме животного. Увеличение активности МДГ приводит к усилению работы ЦТК, в результате чего образуется НАДН, который может использоваться в реакциях энергетического обмена клеток АКЭ. Снижение активности МДГ при одновременном понижении уровня активности обр.ЛДГ свидетельствует о рассогласовании процессов регуляции анаэробного и аэробного обменов в клетках АКЭ при воздействии ЭМИ СВЧ.

Получение энергии в результате гликолиза приводит к образованию промежуточных метаболитов – лактата, пирувата. Вовлечение этих субстратов в ЦТК замедляется вследствие снижения уровня активности МДГ. Известно, что при таком сбое в регуляции углеводного обмена, опухолевые клетки способны выбрасывать накапливающиеся в них лактат и пируват в межклеточное пространство [19,20]. На уровне целого организма это будет приводить к увеличению содержания лактата и пирувата в периферической крови животных реципиентов АКЭ.

Наблюдаемые нами изменения активности ферментов в клетках АКЭ, вероятно, тесно связаны с чувствительностью клеток к ЭМИ СВЧ-диапазона. Одной из работ, объясняющих механизмы влияния электромагнитных волн на биологические объекты, является теоретическая работа [21] о фазовых переходах в мембранах и возникновении пор при понижении мембранного потенциала, что скорее всего и приводит к изменению диффузионной проницаемости плазматической мембраны клеток для ряда низкомолекулярных субстратов, чем, по-видимому, и можно объяснить перераспределение метаболических потоков в клетках АКЭ.

Список литературы / References:

1. Кочемарова Е.В., Кочемарова Ю.В., Круглик О.В., Моргулис И.И. Электромагнитная нагрузка на человека и природу. *Инженерная экология*, 2012, № 6, с. 35-46. [Kochemarova E.V., Kochemarova Ju.V., Kruglik O.V., Morgulis I.I. The effect of electromagnetic fields on biological objects. *Inzhenernaya ekologiya*, 2012, no. 6, pp. 35-46. (In Russ.)]
2. Григорьев Ю.Г. Принципиально новое электромагнитное загрязнение окружающей среды и отсутствие адекватной нормативной базы – к оценке риска (анализ современных отечественных и зарубежных данных). *Гигиена и санитария*, 2014, № 3, с. 11-16. [Grigor'ev Ju.G. Fundamentally new electromagnetic pollution and the lack of adequate regulatory framework – on the risk assessment (analysis of modern domestic and foreign data). *Gigiya i sanitariya*, 2014, no. 3, pp. 11-16. (In Russ.)]
3. Григорьев Ю.Г., Бирюков А.П. Радиобиология мобильной связи: современные аспекты фундаментальных и прикладных исследований. *Медикобиологические проблемы жизнедеятельности*, 2014, № 1 (11), с. 6-16. [Grigor'ev Ju.G., Birjukov A.P. [Radiobiology of mobile communication: Modern aspects of fundamental and applied research. *Mediko-biologicheskie problemy zhiznedeyatel'nosti*, 2014, no. 1 (11), pp. 6-16. (In Russ.)]
4. Markov M., Grigoriev Y.G. Wi-Fi technology – an uncontrolled global experiment on the health of mankind. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 2013, vol. 32, no. 2, pp. 200-208.
5. Gaestel M. Biological monitoring of non-thermal effects of mobile phone radiation: recent approaches and challenge. *Biological Reviews*, 2010, vol. 85, no. 3, pp. 489-500.
6. Ozaslan M., Karagoz I.D., Kilic I.H., Guldur M.E. Ehrlich ascites carcinoma. *African Journal of Biotechnology*, 2013, vol. 10, no. 13, pp. 2375-2378.
7. Савченко А.А. БиOLUMИнесцентное определение активности НАД- и НАДФ-зависимых глутаматдегидрогеназ лимфоцитов. *Лабораторное дело*, 1991, № 11, с. 22-25. [Savchenko A.A. Bioluminescent determination of the activity of NAD- and NADP-dependent glutamate dehydrogenases of lymphocytes *Laboratornoe delo*, 1991, no. 11, pp. 22-25. (In Russ.)]
8. Gatenby R.A., Gillies R.J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*. 2004, vol. 4, pp. 891-899.
9. Talaiezadeh A., Shahriari A., Tabandeh M.R., Fathizadeh P., Mansouri S. Kinetic characterization of lactate dehydrogenase in normal and malignant human breast tissues. *Cancer Cell Int.*, 2015, vol. 15, p.19.
10. DeBerardinis R.J., Lum J.J., Hatzivassiliou G., Thompson C.B. The biology of cancer: Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.*, 2008, vol. 7, pp. 11-20.
11. Stanton R.C. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 2012, vol. 64, no. 5, pp. 362-369.
12. Diaz-Flores M., Ibanez-Hernandez M.A., Galvan R.E., Gutierrez M., Duran-Reyes G., Medina-Navarro R., Pascoe-Lira D., Ortega-Camarillo C., Vilar-Rojas C., Cruz M., Baiza-Gutman L.A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and NADPH/NADP⁺ ratio in liver and pancreas are dependent on the severity of hyperglycemia in rat. *Life Sciences*, 2006, vol. 78, pp. 2601-2607.
13. Schafer F.Q., Buettner G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine*, 2001, vol. 30, no. 11, pp. 1191-1212.
14. Lypez-Mirabal H.R., Winther J.R. Redox characteristics of the eukaryotic cytosol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, vol. 1783, pp. 629-640.
15. Barron J.T., Gu L., Parrillo J.E. NADH/NAD redox state of cytoplasmic glycolytic compartments in vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2000, vol. 279, pp. H2872-H2878.
16. Inzhevatin E.V., Savchenko A.A. The nonspecific metabolic reaction of cells to extreme exposures. *Biology Bulletin.*, 2016, vol. 43, no. 1, pp. 2-11.
17. Inzhevatin E.V., Fomenko E.Yu., Slepov E.V., Savchenko A.A. Metabolic changes of lymphocytes and neoplastic cells in mice with Ehrlich ascites carcinoma during tumor growth. *Biology Bulletin*, 2007, vol. 34, no. 3, pp. 310-313.

18. Fischer K., Hoffmann P., Voelkl S., Meidenbauer N., Ammer J., Edinger M., Gottfried E., Schwarz S., Rothe G., Hoves S. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*, 2007, vol. 109, pp. 3812-3819.

19. Martinez-Outschoorn U.E., Lin Z., Trimmer C., Flomenberg N. Cancer cells metabolically 'fertilize' the tumor microenvironment with hydrogen peroxide, driving the Warburg effect: Implications for PET imaging of human tumors. *Cell Cycle*, 2011, vol. 10, pp. 2504-2520.

20. Swietach P., Vaughan-Jones R.D., Harris A.L. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, vol. 26, pp. 299-310.

21. Zakhvataev V.E., Khlebopros R.G. The Kupershtokh-Medvedev electrostrictive instability as possible mechanism of initiation of phase transitions, domains and pores in lipid membranes and influence of microwave irradiation on cell. *Biophysics*, 2012, vol. 57, no. 1, pp. 61-67.

ВЛИЯНИЕ ПРОТИВОМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

Белослудцев К.Н.^{1,2}, Белослудцева Н.В.¹, Теньков К.С.², Косарева Е.А.², Таланов Е.Ю.¹, Дубинин М.В.²

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

Институтская, 3, г. Пуцино, Московская обл., 142290, РФ

e-mail: bekonik@gmail.com;

²Марийский государственный университет

пл. Ленина, 1, г. Йошкар-Ола, Марий Эл, 424001, РФ

Аннотация. В работе исследуется влияние ряда противомикробных препаратов различной структуры (триклозан, деквалиний, бедаквиллин и итаконовая кислота) на изолированные митохондрии печени крыс. Показано, что эти соединения оказывают значительное воздействие на параметры дыхания митохондрий и/или проницаемость их мембран. Установлено, что триклозан способен ингибировать комплекс II дыхательной цепи и пермеабиллизировать внутреннюю митохондриальную мембрану. Механизм пермеабиллизации внутренней мембраны связан, вероятно, с индукцией липидной поры. Итаконовая кислота ингибирует комплекс II дыхательной цепи митохондрий. Деквалиний подавляет работу комплекса III дыхательной цепи и индуцирует неспецифическую проницаемость внутренней мембраны. В отличие от триклозана, деквалиний-индуцированная пермеабиллизация связана с открытием в митохондриях циклоспорин А-чувствительной МРТ поры. Бедаквиллин вызывает резкое снижение скорости митохондриального дыхания во всех функциональных состояниях органелл, а также ингибирование Ca²⁺-зависимой циклоспорин А-чувствительной МРТ поры в мембране митохондрий. Обсуждаются механизмы токсического действия противомикробных препаратов на клетки эукариот.

Ключевые слова: митохондрии, триклозан, итаконовая кислота, деквалиний, бедаквиллин.

EFFECTS OF ANTIMICROBIAL DRUGS ON RAT LIVER MITOCHONDRIA

Belosludtsev K.N.^{1,2}, Belosludtseva N.V.¹, Tenkov K.S.², Kosareva E.A.², Talanov E.Yu.¹, Dubinin M.V.²

¹Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences

Institutskaya 3, Pushchino, Moscow region, 142290, Russia

e-mail: bekonik@gmail.com

²Mari State University,

pl. Lenina 1, Yoshkar-Ola, Mari El, 424001, Russia

Abstract. The work examines the effects of a number of antimicrobial agents (triclosan, dequalinium, bedaquiline and itaconic acid) on isolated rat liver mitochondria. It has been shown that these compounds dramatically affect mitochondrial respiration and/or permeability of the inner mitochondrial membrane. Triclosan inhibits complex II of the mitochondrial respiratory chain and permeabilizes the inner mitochondrial membrane. The permeabilization of the mitochondrial membrane is associated with the formation of lipid pores in lipid bilayer. Itaconic acid inhibits succinate dehydrogenase, but does not permeabilize the mitochondrial membrane. Dequalinium is a potent inhibitor of the complex III of the mitochondrial respiratory chain and induces a nonspecific permeability of the inner mitochondrial membrane. Unlike triclosan, the dequalinium-induced mitochondrial permeabilization is associated with the opening of cyclosporin A-sensitive MPT pore. Bedaquiline inhibits the respiration rates at all functional states of mitochondria. In addition, it is able to inhibit the opening of Ca²⁺-dependent cyclosporin A-sensitive MPT pores in the mitochondrial membrane. The mechanisms of the toxic effect of antimicrobial agents on eukaryotic cells are discussed.

Key words: mitochondria, triclosan, itaconic acid, dequalinium, bedaquiline

Известно, что механизм действия большинства противомикробных лекарственных препаратов связан с подавлением функционирования специфических метаболических путей или ключевых ферментов бактериальной клетки. Как правило, ферментами-мишенями являются бактериальные белки, ответственные за синтез клеточной стенки или генерацию энергии [1-4]. В связи с тем, такие ферментные системы отсутствуют в клетках эукариот, долгое время предполагалось, что противомикробные препараты непосредственно не влияют на эукариотические