

ВОЗДЕЙСТВИЕ ИЗЛУЧЕНИЯ ОТ МОБИЛЬНОГО ТЕЛЕФОНА НА КРОЛИКОВ, ИЗМЕРЕННОЕ ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ В ЛИМФОЦИТАХ

© 2016 г. М.В. Захарченко, А.В. Ковзан*, Н.В. Хундерякова, Т.В. Ячкула, О.В. Крюкова**, Р.Г. Хлебопрос*, П.М. Шварцбург, Н.И. Федотчева, Е.Г. Литвинова, М.Н. Кондрашова

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3;*

**Институт экономики, управления и природопользования, Сибирский федеральный университет,
660041, Красноярск, Свободный пр., 79;*

***Красноярский научный центр СО РАН, 660036, Красноярск, Академгородок, 50
E-mail: mkondrashova23@inbox.ru*

Поступила в редакцию

Исследовано воздействие на кроликов распространенного источника электромагнитных излучений СВЧ-диапазона – абонентского мобильного телефона, предназначенного для работы в стандарте GSM 900/1800 (плотность потока энергии 5–7 мкВт/см²). Биологический эффект регистрировали чувствительным цитобioхимическим методом по выявлению физиологической регуляции активности ферментов в лимфоцитах на мазках крови. Измеряли активность сукцинатдегидрогеназы, наиболее мощного фермента энергообеспечения митохондрий, и гликолитического фермента лактатдегидрогеназы. Рассчитывали также соотношение активностей этих ферментов в качестве аналога эффекта Варбурга, показывающего соотношение процессов гликолиза и дыхания. Показано, что облучение от мобильного телефона в умеренной дозе (60 мин один раз в сутки в течение 11 суток) вызывает повышение активности сукцинатдегидрогеназы в три раза при снижении активности лактатдегидрогеназы в два раза. В результате резко (от 15 до 5) падает отношение активностей лактатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы, что свидетельствует о доминировании дыхания над гликолизом. Изменения развиваются уже после первого воздействия и достигают максимума через четверо суток. Обычно доминирование дыхания рассматривается как благоприятное состояние для организма. Однако устойчивое поддержание такой активации дыхания воздействием мобильного телефона может нарушать нормальные восстановительные процессы, поддерживаемые гликолизом в периоды отдыха.

Ключевые слова: электромагнитное излучение, мобильная связь, митохондрии, лимфоциты, сукцинатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа.

Электромагнитные поля, как от природных, так и техногенных источников, являются важным экологическим фактором с высокой биологической активностью. Наиболее распространенными источниками электромагнитных полей сверхвысокочастотного диапазона являются средства мобильной связи, создающие равномерную зону радиопокрытия за счет приемопередающих базовых станций и абонентских терминалов. В последние годы сотовый телефон стал незаменимым инструментом коммуникации [1,2]. Проводимые исследования свидетель-

ствуют о том, что электромагнитные волны, генерируемые мобильными телефонами, приводят к возникновению ряда эффектов на разных уровнях организации биологических систем – от организменного до молекулярного, что не может не вызывать беспокойство.

Для защиты клеток от стресса, вызванного экстремальным воздействием электромагнитного излучения (ЭМИ) в диапазоне сверхвысоких частот, включаются различные неспецифические защитные механизмы, такие как экспрессия белков теплового шока и избыточное образование активных форм кислорода [3–10].

Представляется важным определение физиологических и биохимических пределов адаптации в изменяющихся условиях окружающей сре-

Сокращения: ЭМИ – электромагнитное излучение, СДГ – сукцинатдегидрогеназа, ЛДГ – лактатдегидрогеназа, ИЗЛ – изолимонная кислота.

ды и поиск достаточно чувствительных индикаторов, позволяющих оценивать биологические эффекты, связанные с последствиями влияния ЭМИ на организм. Было показано, что мембраны клеток чувствительны к действию ЭМИ сверхвысокочастотного диапазона, что реализуется посредством деформационной неустойчивости, возникающей при высоких напряженностях электрического поля в клеточной мембране. Эта неустойчивость приводит к резкому изменению диффузионной «прозрачности» плазматической мембраны клеток [11,12].

Одной из систем, которая чутко реагирует на изменение окружающих условий среды, является система крови. В ряде работ показаны изменения в клетках крови и костного мозга в ответ на действие ЭМИ, генерируемого на частоте работы сотовых телефонов [13–15].

В настоящей работе предпринята попытка выявить влияние ЭМИ, генерируемого сотовым телефоном, на организм кроликов. В качестве показателя ответа организма была выбрана активность наиболее мощного фермента энергообеспечения митохондрий – сукцинатдегидрогеназы (СДГ), окисляющей янтарную кислоту, а также показателя активности гликолиза – лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Активность ферментов измеряли усовершенствованным авторами методом определения в лимфоцитах крови на мазке. Метод объединяет преимущества цитохимического и биохимического определений, исключает их недостатки и назван цитобиохимическим.

Этот метод в большей степени, чем другие, сохраняет на выделенном препарате состояние фермента в организме [16–20]. Поэтому результаты, полученные с его использованием, лучше отражают изменения в организме по сравнению с другими энзиматическими определениями.

Работа имеет и другие методические преимущества. Очень важным является проведение опытов на кроликах – животных, близких к человеку по соотношению адренэргической и холинэргической регуляции. По сравнению с человеком у мелких животных преобладает адренэргическая регуляция, т.е. возбуждение. У человека она более уравновешена холинэргической регуляцией. Это важное отличие обеспечивает лучшее протекание восстановительных процессов, большую устойчивость к сильным и патогенным воздействиям [21–26].

Эта роль холинэргической регуляции была обнаружена в работах И.А. Аршавского в 80-х годах прошлого века [21]. Она обусловлена ацетилхолином, появляющимся в крови не в качестве известного медиатора синапсов. Независимо образование не-нейронального ацетил-

холина было обнаружено в начале 2000-х годов. [22,23]. Была показана также защитная восстановительная роль ацетилхолиновых центров вазгуса [24]. Выявлена глобальная сеть холинэргической регуляции в мозгу [25]. Показана связь известного регулятора процессов восстановления – мелатонина с холинэргической регуляцией [26]. Таким образом, новейшие исследования открывают новую роль холинэргической регуляции – участие во всех процессах адаптации и усиление восстановительных процессов в организме. Поэтому очень важно иметь для исследования животное с хорошо выраженной холинэргической регуляцией.

Близко к человеку по уровню холинэргической регуляции из доступных лабораторных животных стоят морские свинки и кролики. Исследования на кроликах, помимо выраженности холинэргической регуляции, представляют преимущества возможности повторной работы на одном животном, ввиду удобства ушных вен для введения разных веществ. Это позволяет наблюдать высокую воспроизводимость результатов, а также сопоставлять цитобиохимические исследования с индивидуальными физиологическими характеристиками животного.

Кроме двух отмеченных важных преимуществ работы на кроликах, мы обнаружили еще одно, также имеющее существенное значение. На кроликах, даже генетически близких, из одного помета, отчетливо наблюдаются два типа поведения – спокойный (холинэргический) и спонтанно возбужденный (адренэргический). Это позволяет легко проводить сопоставления цитобиохимических показателей с особенностями поведения. Отмеченные преимущества исследований на кроликах делают их индивидуализированными в отличие от среднестатистических обезличенных данных на мелких животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные и процедуры. В опытах использовали кроликов-самцов породы шиншилла (возраст 7 месяцев, масса 3,8–4,1 кг), выращенных в виварии ИТЭБ РАН. Наблюдали заметное различие в поведении животных до начала их взаимодействия с экспериментатором. Один из кроликов был наиболее возбужденным, пугливым. Второй и третий были исходно спокойнее. Но после приучения к рукам и проведения опыта поведение животных выровнялось и возбуждение уменьшилось. Они также не возбуждались при процедурах.

Облучение кроликов проводили в течение 11 дней по 1 ч в одно и то же время (10.00). В качестве источников электромагнитного СВЧ-излучения использовали абонентские мобильные устройства, работающие в стандарте GSM 900/1800 (плотность потока энергии 5–7 мкВт/см²), закрепляемые у кроликов на спине при помощи шлейки. Телефоны работали в режиме голосовой связи (но без звука), т.е. передавали и принимали сигнал непрерывно в течение часа. После облучения телефон и шлейку снимали с кролика, затем в течение 5–20 мин производили забор крови в следующие сроки: в 1-й день непосредственно перед началом облучения, в 1-й день после облучения, в 4-й, 7-й, 11-й дни (последний день облучения), 14-й день (через три дня после облучения). Всего, таким образом, имели шесть заборов крови от каждого животного.

Измерение активности дегидрогеназ в лимфоцитах. Измерение активности ДГ проводили в мазке крови, полученной после прокола ушной вены, без добавления антикоагулянтов. Свежеприготовленные мазки крови фиксировали в течение 30 с 60%-м ацетоном, забуференным 10 мМ HEPES, при комнатной температуре, рН 5,2–5,4. Затем ополаскивали дистиллированной водой и высушивали на воздухе.

Активность ферментов измеряли по восстановлению нитросинего тетразолия в свежеприготовленном мазке крови по описанной ранее методике [17] в среде, содержащей 125 мМ KCl (Sigma, США), 10 мМ HEPES (Sigma, США), 1,22 мМ нитросинего тетразолия хлорида (Dudley Chemical Corporation) с добавками, указанными ниже, в течение 1 ч при 37°C, рН 7,20 0,05.

Для измерения активности дегидрогеназ использовали набор проб, которые формируют комплекс ответов, рассматриваемый как определенный тип или «паттерн» состояния дегидрогеназ митохондрий. Получаемые паттерны позволяют анализировать биохимические механизмы регуляции активности дегидрогеназ.

5 мМ янтарной кислоты – основная проба, характеризующая активность СДГ и степень адренергической регуляции в организме. Возрастание активности СДГ отражает сначала физиологическую активацию адренергической регуляции, затем патогенную гиперактивацию и ее переход в патологическое ингибирование. Эти стадии выявляются в следующей пробе с добавлением изолимонной кислоты (ИЗЛ).

Изолимонную кислоту добавляли к 5 мМ янтарной кислоты в концентрации 5 мМ. Отсутствие влияния ИЗЛ на активность СДГ характерно для состояния покоя. Понижение ак-

тивности СДГ после добавления ИЗЛ свидетельствует об активации адренергической регуляции, а повышение – о развивающемся в организме ингибировании, возникающем при стрессорном действии адреналина.

Лактат (5 мМ) + малонат (5 мМ) + НАД (0,5 мМ) – проба, характеризующая активность гликолиза, а именно лактатдегидрогеназы. Одновременное определение активности сукцинатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы дает гораздо более полную картину окислительного обмена в клетке, которая недоступна при исследовании выделенных митохондрий.

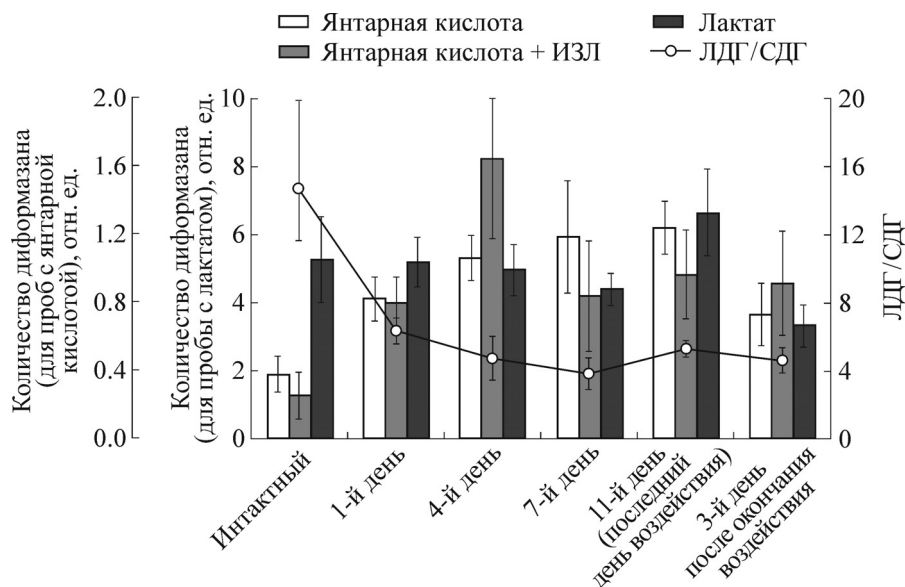
После инкубации мазки докрашивали ядерным красителем нейтральным красным (0,5%) в течение 8 мин.

Мазки после развития окраски красителя наблюдали на микроскопе Leica-DM 2000 с цветной фотокамерой Leica DFC 425 при увеличении 100× под масляной иммерсией. Для поиска и захвата клеток использовали специализированную компьютерную программу «Bloodrunner». Из каждого мазка набирали 50–100 лимфоцитов. Для количественного морфологического анализа цветных изображений использовали специально разработанную компьютерную программу «Cell Composer», позволяющую определить количество и распределение красителя в клетке на основе вычисления декомпозиции красителей по данным цветового пространства, а также базовые морфологические параметры клетки. Таким образом вычисляли концентрацию продукта реакции – диформаза на в каждой клетке.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

О реакции организма судили по измерению активности СДГ, ЛДГ, влияния на активность СДГ добавления изолимонной кислоты, что позволяет уточнить функциональное состояние фермента, а также соотношение ЛДГ/СДГ.

Ранее было показано, что добавление изолимонной кислоты, предшественника α -кетоглутарата, позволяет отличить активное и гиперактивное состояние СДГ от ингибированного. Активированные состояния снижаются при добавлении ИЗЛ, а ингибированные – повышаются. На спокойное состояние ИЗЛ не влияет. В механизме действия изолимонной кислоты на активность СДГ лежит как хорошо известное восстановление ее окислением дыхательной цепи, так и не учитываемое сопрягающее действие гуанозинтрифосфата, образующегося при субстратном фосфорилировании при окислении α -кетоглутарата [17–19].



Активность ферментов в лимфоцитах кроликов после воздействия ЭМИ.

Соотношение ЛДГ и СДГ по нашему предложению используется как показатель соотношения активности дыхания и гликолиза. Этот показатель является аналогом эффекта Варбурга, который был описан около века назад, а в последнее время вновь привлек внимание исследователей как показатель усиления гликолиза у опухолевых клеток [27–29]. Он не является однозначным показателем именно опухолевого роста, и позволяет определять количественно соотношение дыхания и гликолиза в разных состояниях организма. Предложенный нами показатель соотношения активностей ЛДГ и СДГ удобен для таких исследований.

Данные по измерению активности дегидрогеназ, усредненные для трех животных, представлены на рисунке. Обращает на себя внимание хорошее согласование результатов измерений на трех кроликах. У всех после первого облучения наблюдается возрастание активности СДГ. До четвертого дня она возрастает вдвое, а после семи дней до конца курса – втрое. На четвертый день наблюдается появление внутреннего ингибирования, так как изолимонная кислота сильно повышает активность. При дальнейшем облучении развивается гиперактивация, так как добавление ИЗЛ снижает активность. После завершения облучения активность СДГ почти вдвое повышена по сравнению с исходным состоянием. При этом ее активность сдерживается внутренним ингибированием, так как добавление изолимонной кислоты немного ее повышает.

После окончания облучения почти вдвое снижается активность ЛДГ по отношению и к исходному значению и к небольшому его повышению в конце курса. В результате особенно сильно меняется отношение активностей ЛДГ/СДГ. Оно составляет около 15 исходно и около 5 после курса.

Данные близки во всех точках после воздействия. Только в исходном состоянии наблюдается большой разброс. Это согласуется и с большими отличиями в поведении животных в исходном состоянии, чем после курса. По ходу облучения разброс отношения активностей ЛДГ/СДГ незначителен и резко падает уже после первого облучения, достигая на четвертый день значения, соответствующего значению после всего курса. Снижение этого показателя свидетельствует о том, что гликолиз лучше сдерживается активным дыханием, чем в состоянии покоя.

Обычно усиление торможения гликолиза дыханием рассматривается как благоприятный показатель аэробной клетки. Его называют эффектом Пастера. Однако неясно, можно ли с его помощью объяснить наблюдаемый эффект облучения. Все-таки оно переводит в активированное состояние митохондрии у животного в покое. Мы ранее рассматривали потерю состояния покоя ферментом СДГ, как самый первый признак предпатологии, в том числе не проявляющейся через клинические симптомы. К этому выводу мы пришли на основании исследования больных гипертонией и аллергическими пищевыми расстройствами, а также жи-

вотных при стрессе [18,19]. В качестве одного из возможных нарушений нормальных функций клетки при таком сдвиге в покое может явиться ослабление биосинтетических восстановительных процессов, которые происходят именно при отключении активности, в периоды отдыха. В том случае, если электромагнитное излучение поддерживает клетки в активном состоянии, восстановление, по-видимому, нарушается. Этому соответствует и спад нашего показателя, аналогичного эффекту Варбурга, от 15 в покое до 5 во время курса и после него. Такую точку зрения поддерживают и данные работы [30], в которой делается вывод, что аэробный гликолиз не слабость опухолевой клетки, а необходимое свойство, обеспечивающее ее интенсивный рост.

В результате исследования мы можем сделать вывод о том, что применение облучения от мобильного телефона в очень умеренной дозе – в течение часа раз в сутки – вызывает четко выраженную активацию основного фермента энергообеспечения сукцинатдегидрогеназы. Эта активация сопряжена и с подавлением активности фермента гликолиза лактатдегидрогеназы. Однако пока преждевременно давать заключение о физиологической значимости для организма наблюдаемого сдвига активностей ферментов. Одно из возможных опасений последствий такой активации состоит в нарушении восстановительных биосинтетических процессов, включая деление клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 13-04-01049а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ю. Б. Кудряшов, *Радиационная биофизика: радиочастотные и микроволновые электромагнитные излучения: учебник* (Физматлит, М., 2008).
2. В. О. Самойлов, *Радиобиология неионизирующих и ионизирующих излучений: учебное пособие для студентов высших учебных заведений* (Политехн. ун-т, СПб., 2011).
3. В. Aydin, *Electromagnetic Biol. Med.* **32** (1), 20 (2013).
4. М. Blank, *Pathophysiology* **16**, 71 (2009).
5. С. Calderon, *Bioelectromagnetics* **35**, 210 (2014).
6. E. Calabrt, S. Condello, M. Currò et al., *World J. Biol. Chem.* **3** (2), 34 (2012).
7. A. Ghanmi, *Bioelectromagnetics* **35**, 568 (2014).
8. N. D. Volkow, D. Tomasi, G. J. Wang, et al., *J. Amer. Medical Association* **305** (8), 808 (2011).
9. Ю. Г. Григорьев, *Радиационная биология. Радиэкология* **2**, 215 (2014).
10. Ю. Г. Григорьев и О. А. Григорьев, *Сотовая связь и здоровье. Электромагнитная обстановка, радиобиологические и гигиенические проблемы, прогноз опасности* (Экономика, М., 2013).
11. В. Е. Захватаев, *Биофизика* **57** (1), 75 (2012).
12. О. В. Круглик, И. И. Моргулис и Р. Г. Хлебоброс, *Докл. РАН* **449** (1), 104 (2013).
13. I. Y. Belyaev, *Bioelectromagnetics* **30** (2), 129 (2009).
14. S. Szmigielski, *Sci. Total Environ.* **454–455**, 393 (2013).
15. М. М. Rosado, *Bioelectromagnetics* **35**, 559 (2014).
16. М. N. Kondrashova, M. V. Zakharchenko, and N. V. Khunderyakova, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 2036 (2009).
17. М. V. Zakharchenko, A. V. Zakharchenko, N. V. Khunderyakova, et al., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45** (1), 190 (2013).
18. М. Kondrashova, M. Zakharchenko, A. Zakharchenko, et al., in *Dehydrogenases*, Ed. by R. A. Canuto (InTech, Turin, 2012), pp. 235–257.
19. М. Н. Кондрашова, М. В. Захарченко, Н. В. Хундерякова и др., в сб. *Инновационные методы диагностики в медицине* (НП «Сибак», Новосибирск, 2013), сс. 10–58.
20. М. Н. Кондрашова, М. В. Захарченко, Н. В. Хундерякова и др., *Биофизика* **58** (1), 106 (2013).
21. И. А. Аршавский, *Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития* (Наука, М., 1982).
22. К. Kawashima and T. Fujii, *J. Pharmacol. Sci.* **106**, 167 (2008).
23. К. Kawashima and T. Fujii, *Pharmacol. Ther.* **86**, 29 (2000).
24. К. J. Tracey, *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 418 (2009).
25. H. Soreq, *Trends Neurosci.* **38** (7), 448 (2015).
26. К. J. Schippers and S. A. Nichols, *Cell* **159**, 9 (2014).
27. М. Wu, A. Neilson, A. L. Swift, et al., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292** (1), 125 (2007).
28. М. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, and C. B. Thompson, *Science* **324**, 1029 (2009).
29. R. J. DeBerardinis, J. J. Lum, G. Hatzivassiliou et al., *Cell Metab.* **7** (1), 11 (2008).
30. P. S. Ward and C. B. Thompson, *Cancer Cell* **21** (3): 297 (2012).

The Effect of Mobile Phone Radiation on Rabbits: Lymphocyte Enzyme Activity Data

M.V. Zakharchenko*, A.V. Kovzan, N.V. Khunderyakova*, T.V. Yachkula*,
O.V. Krukova***, R.G. Khlebopros**, P.M. Shvartsburd*, N.I. Fedotcheva*,
E.G. Litvinova*, and M.N. Kondrashova***

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Institute of Economics, Management and Environmental Management, Siberian Federal University,
Svobodnyi prosp. 79, Krasnoyarsk, 660041 Russia*

****Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Akademgorodok, 50, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

The effect of GSM 900/1800 mobile phone, the widespread source of electromagnetic radiation of microwave frequency in environment, on rabbits was studied at power densities of 5–7 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$. A biological effect was registered by a sensitive method upon the detection of physiological regulation of enzyme activity inside lymphocytes in blood smears. Succinate dehydrogenase, the most powerful enzyme of energy supply in mitochondria, and lactate dehydrogenase, the enzyme of glycolysis, were measured. Lactate dehydrogenase to succinate dehydrogenase activity ratio was also calculated as an analog of the Warburg Effect which demonstrates the relationship between glycolysis and respiration. After 60 minutes of mobile phone exposure per day for 11 days at a moderate dose the emitted radiation induces a three-fold increase in succinate dehydrogenase activity and a two-fold decrease in lactate dehydrogenase activity. As a result, lactate dehydrogenase/succinate dehydrogenase activity ratio falls down from 15 to 5 thus indicating that respiration is dominant over glycolysis. Following exposure to the first radiation, the changes developed shortly after and reached nearly maximum in four days. A dominance of respiration is commonly considered as a beneficial state for the organism. However, a continuous respiration activation by exposure to mobile phone may cause the damage to normal restorative processes supported by glycolysis at periods of rest.

Key words: electromagnetic radiation, mobile communication, mitochondria, lymphocytes, succinate dehydrogenase, lactate dehydrogenase