

УДК 612.014.42

ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ МИЛЛИМЕТРОВОГО ДИАПАЗОНА

Трибрат Н. С.¹, Джелдубаева Э. Р.¹, Чуян Е. Н.¹, Трибрат А. Г.²

¹*Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия*

²*Медицинская академия имени С. И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия*
E-mail: tribratnatalia@rambler.ru

Исследовано изменения кофакторов окислительного метаболизма и редокс отношения в динамике трехнедельного наблюдения, а также модулирующему воздействию низкоинтенсивного миллиметрового излучения (длина волны – 7,1 мм, плотность потока мощности – 0,1 мВт/см²) в эти же сроки. Исследование показателей окислительного метаболизма осуществлялось методом флуоресцентной спектроскопии. Оценивали такие показатели как восстановленная форма НАДН, окисленная форма ФАД, а также редокс-отношение, свидетельствующее о сопряженности процессов окисления и восстановления.

Было показано, что в течение 20-тидневного наблюдения отмечались ритмические изменения со стороны восстановленной формы НАДН и окисленной формы ФАД. Низкоинтенсивное электромагнитное излучение миллиметрового диапазона поддерживает и усиливает эту ритмическую активность с смещением пиков в 2 дня.

Ключевые слова: редокс отношение, восстановленная форма НАДН, окисленная форма ФАД, низкоинтенсивное миллиметровое излучение.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из актуальных направлений современной электромагнитной биологии является исследование физико-химических механизмов действия электромагнитного излучения (ЭМИ) на биологические системы различного уровня организации [1]. В наших предыдущих исследованиях показано, что низкоинтенсивное ЭМИ миллиметрового (ММ) диапазона (длина волны 7,1 мм и плотность потока мощности 0,1 мВт/см²) при изолированном, превентивном и комбинированном со стресс-факторами разной природы действия модулирует активность всех звеньев нейроиммуноэндокринной системы организма, а в механизмах физиологического действия этого физического фактора важную роль играют нормализация прооксидантного/антиоксидантного равновесия, модификация временной организации физиологических процессов и др. [2–4]. Кроме того, показано, что в основе многих механизмов реакции живой системы на электромагнитное воздействие лежит влияние данного фактора на окислительный метаболизм. Так, известно, что параметры окислительного метаболизма, особенно антиоксидантной

системы, рассматриваются как биохимические детерминанты радиорезистентности [5]. Однако исследования данных показателей в динамике электромагнитного воздействия единичны и в основном посвящены их эффекту в ряде тканей и органов. При этом методологический подход к оценке окислительных процессов, нельзя назвать оптимальным, поскольку в большинстве работ состояние окислительного метаболизма характеризуется по ограниченному числу показателей.

Вместе с тем, изучение редокс-сигналирования и редокс-регуляции клеточных процессов становится все более весомым и распространенным для определения роли участников внутриклеточных и внеклеточных механизмов регуляции метаболизма, прежде всего в процессах свободно-радикального окисления. Это имеет и важное практическое значение в виду возможности, в том числе нефармакологической, оказывать влияние на изменение энергоснабжения тканей.

Эффекты влияния низкоинтенсивного ЭМИ ММ диапазона на динамику коферментов окислительного метаболизма не исследованы, что и является целью настоящей работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика» ФГАУО ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского».

Исследование было выполнено на 20 беспородных белых крысах самцах в возрасте 6–8 месяцев. Животные были разделены на две равноценные группы по 10 особей в каждой: I группа животных составила биологический контроль, II группа – животные, подвергавшиеся воздействию низкоинтенсивного ЭМИ ММ.

Воздействие низкоинтенсивным ЭМИ ММ (плотность потока мощности – $0,1 \text{ мВт/см}^2$, длина волны – $7,1 \text{ мм}$) осуществляли в течение 20-ти суток ежедневно, в утреннее время суток с экспозицией 30 минут на шейно-воротниковую область крысы [2].

Интенсивность окислительного метаболизма целесообразно использовать с помощью неинвазивного метода флуоресцентной спектроскопии, основанной на регистрации флуоресцентного отклика тканевыми флуорофорами, участвующих в начальных реакциях окислительного фосфорилирования [Крупаткин, Сидоров, 2014].

Регистрацию параметров тканевой флуоресценции проводили диагностическим комплексом «ЛАЗМА МЦ» (Модификация ЛАЗМА-МЦ-III, ООО НПП «ЛАЗМА», Москва, Россия). В доплеровском канале применялся лазерный модуль с длиной волны излучения 1064 нм , для возбуждения флуоресценции использовались источники на длинах волн излучения 365 и 450 нм . Доставка зондирующего излучения и прием обратно отраженного от ткани вторичного излучения осуществлялись одним оптическим волоконным зондом с диаметром 3 мм .

В канале флуоресцентной спектроскопии диаметры всех зондирующих и принимающих волокон составляли 400 мкм . Расстояние между источником и приемником равнялось 1 мм . Числовая апертура волокон – $0,22$. При проведении исследований с учетом данных, полученных в работе [6], отдельное внимание

уделялось минимизации механического давления, оказываемого зондом на кожу. Фиксацию волновода осуществляли у основания хвоста животных, предварительно фиксируя его пластырем.

Для оценки внутриклеточных энергетических обменных и процессов методом флуоресцентной спектроскопии оценивали следующие показатели:

- индекс тканевого содержания для восстановленного *NADH*;
- индекс тканевого содержания для окисленной формы *FAD*.

Индексы тканевого метаболизма исчислялись по следующей формуле:

$$I^{\lambda_1/\lambda_2} = \beta * I^{\lambda_1}_f / I^{\lambda_1}_1 + \beta * I^{\lambda_2}_f,$$

где I^{λ_1/λ_2} – определяемый индекс тканевого содержания вещества, λ_1 и λ_2 – используемые длины волн (нм) для возбуждения и регистрации флюоресценции соответственно, β – коэффициент ослабления порогового фильтра в приборе.

- редокс-отношение (PO) или индекс флюоресценции, определяемого по формуле:

$$PO = (I_f NADH / I_f FAD) * (I FAD / I NADH).$$

Последний имеет прямо пропорциональную связь с активностью окислительного метаболизма [7].

Регистрацию показателей окислительного метаболизма проводили в обеих группах животных, определяя фоновые значения показателей, а также на 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 и 20 сутки исследования.

Достоверность межгрупповых различий оценивали по критерию Манна-Уитни. Внутригрупповые различия оценивали по критерию Фридмана.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты настоящего исследования, при исследовании фоновых значений показателей окислительного метаболизма, межгрупповых различий не отмечалось.

В период трехнедельного наблюдения динамика значений показателя НАДН (восстановленная форма) характеризовалась отчетливой фазностью. Так, в первые 6 суток наблюдения, значения НАДН поддерживались на исходном уровне, затем было отмечено резкое падение к 8 суткам наблюдения (снижение на 27,30 %, $p \leq 0,05$ в сравнении с фоном) с дальнейшим подъемом к 14–18 суткам (возрастание в среднем на 18,01 %, $p \leq 0,05$ с исходными данными этого показателя), с последующим восстановлением к исходным значениям к 20 суткам наблюдения (рис. 1).

В группе животных, подвергавшихся воздействию низкоинтенсивного ЭМИ ММ диапазона, отмечалось подобная динамика значений показателя восстановленной формы НАДН, однако с запаздыванием в среднем на 2 суток. Межгрупповые различия были обнаружены на 8-е (рост уровня НАДН на 43,18 %, $p \leq 0,05$ при действии ЭМИ ММ), 1-е (рост уровня НАДН на 24,49 %, $p \leq 0,05$ при действии ЭМИ ММ) и 14-е сутки (депрессия уровня НАДН на 28,33 %, $p \leq 0,05$ в сравнении с контролем) наблюдения. Межгрупповые различия, по-видимому, обусловлены смещением пиков ритмических изменений данного показателя. Смещение ритмов регистрируемой активности показателя НАДН нивелировалась к

концу наблюдения – на 18–20 сутки. Следует отметить, что при воздействии ЭМИ ММ изменения показателя НАДН, были более выраженными, в сравнении с данными этого показателя, зарегистрированными в контрольной группе животных, хотя направленность изменений полностью совпадала с контрольной группой. Роль низкоинтенсивного ЭМИ ММ, вероятно, сводится, к возрастанию глубины модуляции естественной ритмической активности восстановленной формы НАДН, что проявляется в увеличении фазных пиков его возрастания и снижения.

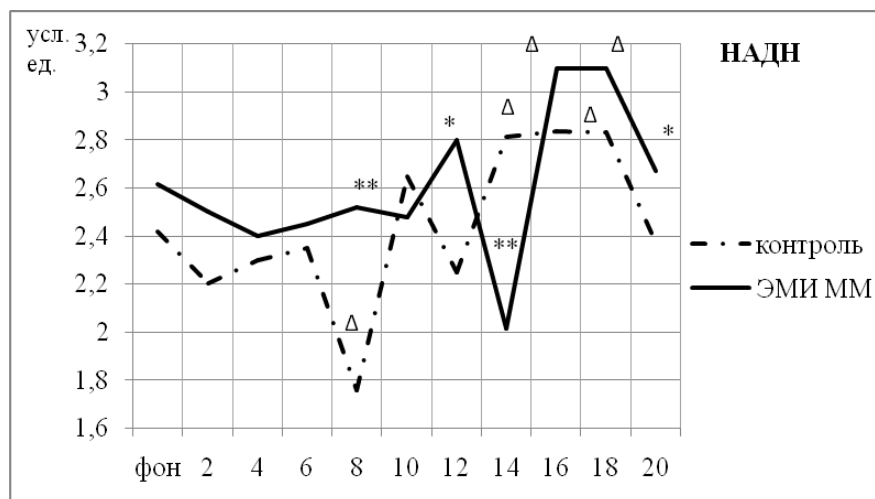


Рис. 1. Динамика значений показателя восстановленной формы НАДН, зарегистрированная в контрольной группе животных и в группе, подвергнутой воздействию ЭМИ ММ.

Примечание: достоверность различий * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$ по критерию Манна-Уитни, достоверность различий Δ – $p \leq 0,05$, по критерию Фридмана.

Динамика показателя окисленной формы ФАД в контрольной группе животных также была подвержена циклическим изменениям: поддержание уровня фоновых значений отмечалось в первые 4 суток наблюдения, на 6 сутки – тенденция к росту окисленной формы кофермента с дальнейшим падением на 10 сутки (14,67 %, $p \leq 0,05$) и максимальным возрастанием к 16–18 суткам наблюдения (в среднем на 17,01 %, $p \leq 0,05$) с последующим восстановлением к исходным значениям данного показателя к 20 суткам наблюдения (рис. 2).

В группе животных, подвергнутой воздействию низкоинтенсивного ЭМИ ММ, отмечалась схожая динамика значений показателя ФАД с аналогичным смещением пиков изменений (запаздыванием) также на 2-е суток в сравнении с контролем. Изменения значений показателя ФАД характеризовались не только смещением пиковых фаз, но и большей выраженностью, что проявлялось в значительном возрастании пиков естественных изменений. Таким образом, низкоинтенсивное ЭМИ ММ диапазона также усиливает ритмическую активность окисленной формы ФАД.

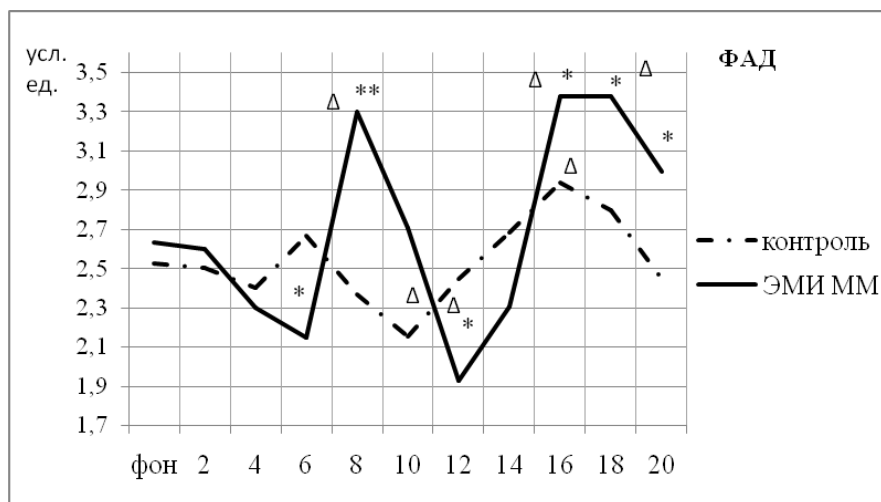


Рис. 2. Динамика значений показателя окисленной формы ФАД, зарегистрированная в контрольной группе животных и в группе, подвергнутой воздействию ЭМИ ММ.

Примечание: достоверность различий * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$ по критерию Манна-Уитни, достоверность различий Δ – $p \leq 0,05$, по критерию Фридмана.

Межгрупповые различия были зарегистрированы на 6-е (снижение уровня ФАД на 19,56 %, $p \leq 0,05$ под воздействием ЭМИ ММ), 8-е (возрастание уровня ФАД почти на 40 %, $p \leq 0,05$ при действии ММ-излучения), 12-е (снижение на 21,27 %, $p \leq 0,05$ при действии низкоинтенсивного фактора), 16-е и 18-е (возрастание в среднем на 21,56 %, $p \leq 0,05$ при воздействии физического фактора) сутки наблюдения. Межгрупповые различия, по всей видимости, также обусловлены смещением пиков ритмических изменений окисленной формы кофермента ФАД (рис. 2).

Циклические изменения уровня восстановленной формы НАДН и окисленной формы ФАД, принимающих участие в первой и во второй реакциях окислительного фосфорилирования, ведут к циклическим изменениям РО и, как следствие, интенсивности и эффективности окислительного метаболизма.

В контрольной группе животных также отмечалась ритмичность изменений показателя РО. Так, первые 4–6 суток значения РО поддерживались на уровне фоновых значений, начиная с 6 суток отмечалось падение значений РО, достигая своего минимального значения на 8-е сутки наблюдения (снижение на 26,54 %, $p \leq 0,05$ в сравнении с исходными значениями этого показателя) с дальнейшим, возможно, компенсаторным подъемом РО на 10–12 сутки исследования и последующим возвращением к исходным значениям к 14–20 суткам наблюдения (рис. 3).

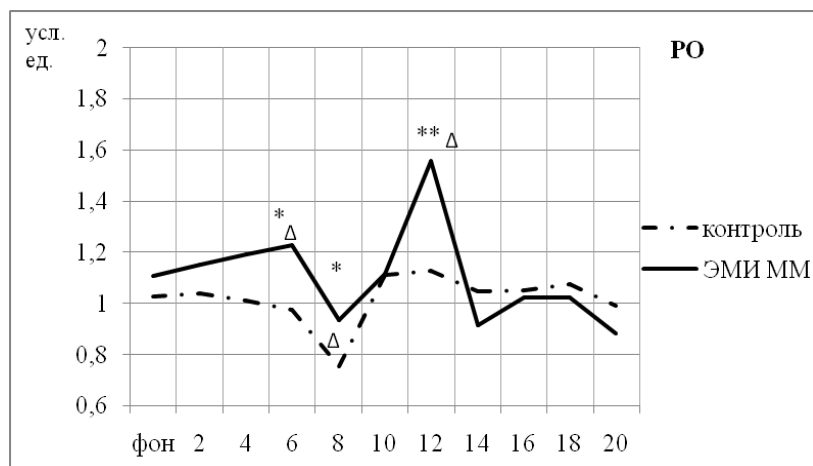


Рис. 3. Динамика изменения редокс отношения (РО) в контрольной группе и в группе животных, подвергавшихся воздействию ЭМИ ММ.

Примечание: достоверность различий * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$ по критерию Манна-Уитни, достоверность различий Δ – $p \leq 0,05$, по критерию Фридмана.

Стоит отметить, что в группе животных, подвергавшихся влиянию ЭМИ ММ, отмечалась та же фазность изменения РО, что и в контрольной группе. Однако, низкоинтенсивное ЭМИ ММ оказывало модифицирующее влияние на РО. Так, на 6, 8 и 12 сутки воздействия низкоинтенсивным фактором, отмечалось возрастание значений РО в сравнении со значениями этого показателя, зарегистрированными в контрольной группе животных на 25,69 %, $p \leq 0,05$, 23,54 %, $p \leq 0,05$ и 37,81 %, $p \leq 0,01$ соответственно (рис. 3). Очевидно, что модифицирующее действие низкоинтенсивным фактором проявилось в начальной фазе падения РО (начиная с 6 суток) и продлилось до дальнейшего восстановления этого показателя к исходным значениям (к 12-е суток наблюдения). В дальнейшем, начиная с 14 суток наблюдения, динамика показателя РО в группе ЭМИ ММ была близкой к значениям этого показателя, зарегистрированным в контрольной группе животных, без статистически значимых различий.

Таким образом, изменения РО как интегрального показателя окислительного метаболизма, характеризующего сопряжение между донорами и акцепторами электронов в электрон-транспортной цепи является следствием периодической (ритмической) активности коферментов как в восстановленной, так и в окисленной формах или процессов, которые являются «поставщиками» этих коферментов.

Известно, что НАДН локализуется преимущественно в митохондриях, где он в дальнейшем подвергается окислению, являясь одним из триггеров цикла реакций окислительного фосфорилирования с дальнейшим образованием АТФ. Изменения уровня НАДН, по-видимому, связано с периодическими изменениями цикла Кребса, гликолиза или бета-окисления жирных кислот, поскольку эти биохимические циклы являются естественным донором восстановленной формы НАДН. Таким образом, можно предположить, что низкоинтенсивный физический фактор не только

поддерживает, но и усиливает ритмические изменения биохимических циклов, поставляющих НАДН, что в дальнейшем находит отражение в циклических изменениях окислительного метаболизма

Согласно литературным данным, концентрации субстратов в гликолизе в парах глюкоза/глюкозо-6-фосфат, фруктозо-6-фосфат/фруктозо-1,6-дифосфат и пируват/фосфоенолпируват проявляют ритмическую, а именно, циркадианную активность, изменяясь при этом синфазно [8]. Известны также циклические изменения цикла трикарбоновых кислот в рамках циркадианной активности. Вероятно, это одна из возможных причин циклического изменения НАДН. Воздействие глобальных факторов физической природы (например, гелиогеомагнитная активность) на активность окислительного метаболизма требуют дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В 20-тидневной динамике наблюдения за показателями окислительного метаболизма отмечаются циклические изменения восстановленной формы кофермента НАДН и окисленной формы кофермента ФАД, а также их соотношения – редокс отношения.
2. Низкоинтенсивное электромагнитное излучение миллиметрового диапазона усиливает модуляцию естественной ритмической активности коферментов окислительного метаболизма.
3. Воздействие низкоинтенсивного миллиметрового излучения приводит к смещению пиков ритмической активности коферментов окислительного метаболизма в среднем на двое суток.

Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика» ФГАОУВО «Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского».

Список литературы

1. Азанова А. В. Воздействие электромагнитных и магнитных полей на жизнеспособность биологических объектов: автореф. дис. ... канд. биол. наук / А. В. Азанова – Красноярск: КГАУ, 2013. – 19 с.
2. Чуян Е. Н. Механизмы антиноцицептивного действия низкоинтенсивного миллиметрового излучения / Е. Н. Чуян, Э. Р. Джелдубаева. – Симферополь: «ДИАЙПИ», 2006. – 458 с.
3. Чуян Е. Н. Тканевая микрогемодинамика: влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона / Е. Н. Чуян, Н. С. Трибрат, М. Ю. Раваева. – Симферополь: ИТ «Ариал», 2017. – 325 с.
4. Физиологические механизмы биологических эффектов низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ [Текст] / Е. Н. Чуян [и др.]. – Симферополь: Эльиньо, 2003. – 448 с.
5. Мазурик В. К. О некоторых молекулярных механизмах основных радиобиологических последствий действия ионизирующих излучений на организм млекопитающих / В. К. Мазурик, В. Ф. Михайлов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1999. – Т. 39, № 1. – С. 89–96.
6. Zharebtsov E. Fibre-optic probe for fluorescence diagnostics with blood influence compensation / E. Zharebtsov, V. Dremin, E. Zharkikh, A. Zharebtsova, I. Rafailov, A. Dunaev, N. Bazieva, E. Rafailov // Proc. SPIE 10493. 2018, 104931L.

7. Крупаткин А. И. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем: колебания, информация, нелинейность: рук-во для врачей / под ред. А. И. Крупаткина, В. В. Сидорова. – Москва: Либроком, 2014. – 498 с.
8. Каминский Ю.Г. Суточные ритмы в метаболизме. автореферат дис. ... доктора биологических наук / Ю. Г. Каминский– Москва: 1989. – 35 с.

DYNAMICS OF OXIDATIVE METABOLISM INDICATORS UNDER INFLUENCE THE LOW-INTENSITY ELECTROMAGNETIC RADIATION MILLIMETER RANGE

Tribrat N. S., Dzheldubaeva E. R., Chuyan E. N., Tribrat A. G.

*V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russia
E-mail: tribratnatalia@rambler.ru*

The article is devoted to research of cofactors of oxidative metabolism changes and the redox ratio during dynamics of a three-week observation/ More over, it was shown, that low-intensity millimeter radiation (wavelength – 7.1 mm, power flux density – 0,1 mW / cm²) is having a modulating effected on a dynamic data of oxidation metabolism.

The study of oxidative metabolism was carried out by fluorescence spectroscopy. Evaluated such indicators: reduced form of NADH, the oxidized form of FAD, the redox ratio, indicating the conjugation of oxidation and reduction processes.

It was shown that during a 20-day observation, rhythmic changes were noted from the restored form of NADH and the oxidized form of FAD.

Low-intensity millimeter-wave electromagnetic radiation maintains and enhances this rhythmic activity with a peak shift of 2 days.

Periodic changes in the cofactors of oxidative metabolism during the 20 days of observation are apparently due to cyclical changes in processes where the oxidized and reduced forms of cofactors are products, for example, periodic changes in the Krebs cycle or glycolysis. Changes in the ratio of reduced form of NADH and FAD affect the efficiency of oxidative phosphorylation.

Keywords: redox ratio, reduced form of NADH, oxidized form of FAD, low-intensity millimeter radiation.

References

1. Azanova A. V. *Vozdeystviye elektromagnitnykh i magnitnykh poley na zhiznesposobnost' biologicheskikh ob"yektov*: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk , (KGAU, Krasnoyarsk:, 2013), p. 19 s.
2. Chuyan E. N., Dzheldubayeva E. R. *Mekhanizmy antinotsitseptivnogo deystviya nizkointensivnogo millimetrovogo izlucheniya* (DIAYPI, Simferopol, 2006), p. 458.
3. Chuyan E. N., Tribrat N. S., Ravayeva M. Yu. *Tkanevaya mikrogemodinamika: vliyaniye nizkointensivnogo elektromagnitnogo izlucheniya millimetrovogo diapazona* (Arial, Simferopol, 2017), p. 325

4. Chuyan E. N., Temur'yants N. A., Moskovchuk O. B., Chirskiy N. V., Verko N. P., Tumanyants Ye. N., Ponomareva V. P. *Fiziologicheskiye mekhanizmy biologicheskikh effektov nizkointensivnogo EMI KVCH: Monogr.* / (El'in'o, Simferopol, 2003), p. 447.
5. Mazurik V. K., Mikhaylov V. F. O nekotorykh molekulyarnykh mekhanizmax osnovnykh radiobiologicheskikh posledstviy deystviya ioniziruyushchikh izlucheniye na organizm mlekoopitayushchikh, *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*, **39** (1), 89 (1999).
6. Zharebtsov E., Dremin V., Zharkikh E., Zharebtsova A., Rafailov I., Dunaev A., Bazieva N., E. Rafailov Fibre-optic probe for fluorescence diagnostics with blood influence compensation, *Proc. SPIE*, **10493**, 2018, 104931L (2018).
7. Krupatkin A. I. *Funktsional'naya diagnostika soctoyaniya mikrotsirkulyatorno-tkanevykh cictem: kolebaniya, informatsiya, nelineynost': ruk-vo dlya vrachey* (Librokom, Moskva, 2014), p. 498 c.
8. Kaminskiy YU. G. *Sutochnyye ritmy v metabolizme. avtoreferat dis. ... doktora biologicheskikh nauk* (Moskva, 1989), p. 35.