

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ-ДЕГИДРОГЕНАЗ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ КРЫС ПРИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОМ ДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ АКТИВАЦИОННОЙ ЭЛЕКТРОМАГНИТОТЕРАПИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИЗЛУЧЕНИЯ КРАЙНЕ ВЫСОКОЧАСТОТНОГО ДИАПАЗОНА

Жукова Г.В.¹, Шихлярова А.И.¹, Бартенева Т.А.¹, Протасова Т.П.¹, Брагина М.И.¹, Ширнина Е.А.¹, Жадобина А.И.¹, Триандафилиди Е.И.¹, Быкадорова О.В.¹, Мхитарьян О.В.¹

¹ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: galya_57@mail.ru

В экспериментах на беспородных крысах-самцах с перевивной саркомой 45 была показана связь изменений активности ферментов-дегидрогеназ лимфоцитов периферической крови с противоопухолевым и антистрессорным эффектами двух различных вариантов активационной электромагнитотерапии. Выраженность такой связи различалась в зависимости от вида воздействия. В случае эффективной СКЭНАР-терапии было отмечено увеличение показателя активности α -глицерофосфат-дегидрогеназы (α -ГФДГ) в лимфоцитах в 1.3 раза при отсутствии сдвигов в активности сукцинат-дегидрогеназы (СДГ). В случае более эффективного комбинированного воздействия, включавшего СКЭНАР-терапию и электромагнитное излучение крайне высокочастотного диапазона, у животных с торможением роста опухоли наблюдалось повышение показателя активности СДГ на 26% и тенденция к повышению показателя активности α -ГФДГ. Кроме того, было отмечено изменение показателей активности СДГ и соотношения показателей активности СДГ и α -ГФДГ не менее чем в 1.5 раза в зависимости от выраженности противоопухолевого влияния комбинированного воздействия – торможения роста или регрессии опухолей. При регрессии саркомы 45 наблюдалось снижение значений указанных показателей, что расценивали как отражение наиболее полной реализации функционального потенциала лимфоцитов.

Ключевые слова: сукцинат-дегидрогеназа (СДГ), альфа-глицерофосфат-дегидрогеназа (α -ГФДГ), лимфоциты, активационная терапия, общие неспецифические адаптационные реакции организма, противоопухолевый эффект, СКЭНАР-терапия, крайне высокочастотное электромагнитное излучение (ЭМИ КВЧ).

THE ACTIVITY OF BLOOD LYMPHOCYTE DEHYDROGENASES IN RATS UNDER THE ANTITUMOR ACTION OF VARIOUS TYPES OF ACTIVATION ELECTROMAGNETIC THERAPY USING EXTREMELY HIGH-FREQUENCY RADIATION

Zhukova G.V.¹, Shikhlyarova A.I.¹, Barteneva T.A.¹, Protasova T.P.¹, Bragina M.I.¹, Shirnina E.A.¹, Zhadobina A.I.¹, Triandafilidi E.I.¹, Bykadorova O.V.¹, Mkhitaryan O.V.¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Rostov-on-Don, e-mail: galya_57@mail.ru

In experiments on unbreed male rats with transplanted sarcoma 45, the relationship between changes in the activity of dehydrogenases of peripheral blood lymphocytes with antitumor and antistress effects of two different types of activation electromagnetic therapy was shown. The significance of such relationship varied depending on the type of the therapy. In the case of effective SCENAR-therapy, an increase in the activity index of α -glycerophosphate dehydrogenase (α -GPDH) in 1.3 times was observed as well as the absence of shifts in the activity of succinate dehydrogenase (SDH). In the case of a more effective combined impact, including SCENAR therapy and electromagnetic radiation of the extremely high-frequency range, in animals with inhibition of tumor growth there was an increase in the SDH activity index by 26% and a trend towards an increase in the activity index of α -GPDH. In addition, there was a change in SDH activity index and the ratio of and α -GPDH activity indeces at least in 1.5 times, depending on the extent of the antitumor effect of the combined impact – tumor growth inhibition or tumor regression. With the regression of sarcoma 45, the values of these indices decreased, which was regarded as a reflection of the most complete realization of the functional potential of lymphocytes.

Keywords: succinate dehydrogenase (SDH), alpha-glycerophosphate dehydrogenase (α -GPDH), lymphocytes, activation therapy, general nonspecific adaptive reactions of the organism, antitumor effect, SCENAR-therapy, extremely high-frequency electromagnetic radiation (EHF EMR).

Ранее была показана возможность получения выраженных противоопухолевых эффектов при использовании электромагнитных воздействий в режимах активационной терапии без применения цитостатиков и ионизирующих излучений [1-3]. При этом наблюдался четкий параллелизм противоопухолевого и антистрессорного влияния факторов с признаками значительной активизации органов иммунной системы и ряда эндокринных желез, характерными соотношениями уровней гормонов и биогенных аминов в тканях и крови [1; 4; 5]. Параметры применявшихся воздействий – низкая интенсивность и преимущественная локализация на область кожной проекции регуляторных структур организма – исключали возможность прямого повреждающего действия использованных факторов на опухоль, что указывало на иммунные механизмы их противоопухолевого влияния. В связи с этим представлял интерес вопрос об изменениях в разных звеньях иммунной системы животных при эффективной активационной электромагнитотерапии.

В последние годы накапливаются сведения о тесной связи сдвигов клеточного метаболизма с изменением функционирования иммунокомпетентных клеток и развитием ряда патологий [6; 7]. Полученные данные свидетельствуют о вовлеченности ферментов-дегидрогеназ лимфоцитов в нейроиммунные взаимоотношения как при развитии различных нарушений, так и при восстановлении функционального состояния организма [8-10]. Более того, была показана возможность регуляторного влияния метаболических изменений и процессов в митохондриях на функциональную активность лимфоцитов, принадлежавших к различным популяциям [11-13]. При использовании активационной терапии в комплексном противоопухолевом лечении наблюдалась корреляция изменений активности дегидрогеназ лимфоцитов крови с эффективностью лечения и последующей динамикой функционального состояния людей и животных [14]. Таким образом, сдвиги активности ключевых ферментов цикла Кребса и гликолиза, а также соотношение активности этих ферментов могут рассматриваться в качестве информативных показателей функционального состояния лимфоцитов крови и динамики состояния организма-опухоленосителя. Это определило целесообразность изучения активности дегидрогеназ лимфоцитов периферической крови для выяснения механизмов эффективного действия активационной электромагнитотерапии, используемой в эксперименте в качестве единственного противоопухолевого фактора.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на 59 белых беспородных крысах-самцах весом 180-290 г, разделенных на контрольную и две основные группы. Саркому 45 перевивали путем подкожного введения 0,3 мл суспензии клеток, разведенной физиологическим раствором в соотношении 1:3, в область нижнебоковой поверхности спины. Определение объема опухолей осуществлялось по формуле Шрека для эллипсоида.

В двух основных группах животных воздействия начинали при достижении саркомой

45 объема 0,7–1,2 см³, при котором спонтанная регрессия опухоли маловероятна. Продолжительность курса воздействий составила 4 недели. В каждой из основных групп применяли один из двух вариантов электромагнитотерапии: СКЭНАР-терапию или комбинацию СКЭНАР-терапии и КВЧ-терапии, использующей низкоинтенсивное (10 мВт/см²) электромагнитное излучение (ЭМИ) крайне высокочастотного (КВЧ) диапазона (42.1 ГГц). Воздействия осуществляли по алгоритмам активационной терапии [1-3] в первой половине дня с помощью аппарата «СКЭНАР-97.1», имевшего выносной «электрод-расческу», позволявший достигать контакта с кожей животного, а также с помощью аппарата для КВЧ-терапии «Явь-1». При СКЭНАР-терапии действовали на проекцию позвоночника, паравертебрально, проекцию гипоталамуса, печени и зону опухоли. В случае КВЧ-терапии воздействие было локализовано только на зону проекции гипоталамуса. При этом ежедневно изменяли (повышали или снижали) экспозицию воздействия, соблюдая экспоненциальную зависимость. В целом при СКЭНАР-терапии диапазон изменения экспозиции воздействия составил 5-15 сек. В случае применения ЭМИ КВЧ величину экспозиции изменяли в интервале 15-24 мин. Кроме того, при использовании ЭМИ КВЧ осуществляли частотную модуляцию высокочастотного сигнала в полосе 200 МГц (42.1 ГГц±100 МГц) последовательностью сигналов низких биоэффективных частот – 1.7-3.4-7.8-15.6 Гц [1; 2] с помощью модулятора, сконструированного на базе генератора сигналов специальной формы Г6-37.

Еженедельно, а также в начале и конце эксперимента, по показателям лейкоцитарной формулы периферической крови, подсчитанной на 200 клеток, определяли характер и напряженность общих неспецифических адаптационных реакций организма (АР) [1; 4; 5]. В конце эксперимента в лимфоцитах мазков периферической крови методом Пирса в модификации Р.П. Нарциссова определяли активность митохондриальных ферментов – сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и α -глицерофосфат-дегидрогеназы (α -ГФДГ) – играющих ключевую роль в окислительном фосфорилировании и гликолизе [15]. По окончании эксперимента фрагменты ткани из опухолевой зоны фиксировали в жидкости Карнуа и после парафиновой проводки и последующей депарафинизации окрашивали по методу Браше.

При статистической обработке результатов применяли t-критерий Стьюдента, критерий Вилкоксона, вычисляли коэффициент вариации.

Результаты и обсуждение. В таблице 1 представлены результаты влияния СКЭНАР-терапии и комбинированного воздействия на саркому 45. СКЭНАР-терапия оказалась эффективной в 53% случаев. При этом у одной трети животных было отмечено торможение роста опухоли на 57%, а у 20% животных - регрессия опухоли на 50-100%. Это привело к снижению среднего размера опухолей в группе к концу эксперимента в 1.8 раза по

сравнению с показателем у крыс контрольной группы (табл. 1).

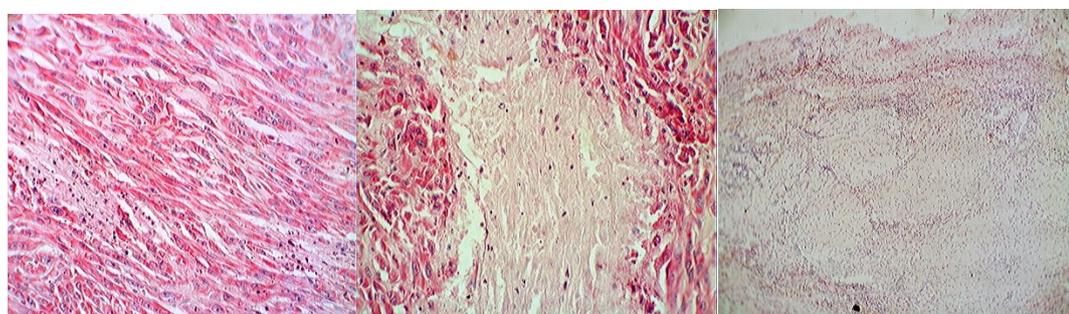
Таблица 1

Эффект исследованных электромагнитных воздействий на саркому 45
у белых беспородных крыс-самцов

Показатель/группа	Контроль n=15	СКЭНАР n=15	СКЭНАР+ЭМИ КВЧ n=21
Вес опухоли, г	12,09±1,43	6,6±1,2 *	2,1±0,8*● □
Случаи регрессии опухоли, %	0	20	33
Случаи торможения роста опухоли, %	0	33	67

Примечание. Различия по отношению к контролю: * – $p < 0,05-0,001$; к группе СКЭНАР: ● – $p < 0,01$.

В случае комбинированного действия СКЭНАР-терапии и ЭМИ КВЧ эффект был еще более выражен: размеры опухоли оказались в 3 раза ниже, чем при эффективной СКЭНАР-терапии, и в 5.7 раза ниже, чем в контрольной группе (табл. 1). При этом противоопухолевое влияние комбинированного воздействия было отмечено у всех животных: в 33% случаев наблюдалась регрессия опухоли на 70-100%, а у остальных крыс - торможение роста опухоли на 71% (табл. 1). Изменения в ткани саркомы 45 при эффективных электромагнитных воздействиях представлены на рисунке.



А

В

С

Микрокартина ткани саркомы 45 при эффективных электромагнитных воздействиях. А. - Контроль. Рост опухоли. Плотное расположение клеток веретеновидной формы. Браше. Ув. x 400.

В. – СКЭНАР-терапия. Обширные участки некроза при торможении роста опухоли. Браше. Ув. x 400.

С. Комбинированное действие СКЭНАР-терапии и ЭМИ КВЧ. Полная регрессия опухоли. Замещение ткани опухоли соединительной тканью, обильно инфильтрированной клетками иммунной системы. Браше. Ув. x 100

В рассматриваемом эксперименте, как и в ранее проведенных исследованиях [1-3], наблюдался параллелизм выраженности противоопухолевого и антистрессорного эффектов

рассматриваемых воздействий. У животных контрольной группы в ходе эксперимента наблюдались АР стресс (55%) и напряженные антистрессорные АР. В случае применения СКЭНАР-терапии, помимо АР стресс (22%) и напряженных антистрессорных АР (28%), в половине случаев, у животных с выраженным противоопухолевым эффектом, была отмечена АР повышенной активации без заметных признаков напряженности. Группа с применением наиболее эффективного комбинированного воздействия характеризовалась отсутствием случаев развития АР стресс и преобладанием АР спокойной и повышенной активации без заметных признаков напряженности (64% случаев).

В таблице 2 представлены данные об активности ферментов-дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови экспериментальных животных в зависимости от эффективности исследованных воздействий. У животных контрольной группы показатели активности СДГ и α -ГФДГ были снижены соответственно на 17 и 42% по сравнению с показателями у здоровых интактных крыс-самцов. Неравномерное снижение рассматриваемых показателей, более выраженное для α -ГФДГ, привело к росту соотношения показателей активности СДГ и α -ГФДГ по сравнению с его значением у интактных крыс (табл. 2).

Таблица 2

Активность дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови крыс с саркомой 45 при противоопухолевых эффектах СКЭНАР-терапии и комбинированного электромагнитного воздействия (СКЭНАР+ЭМИ КВЧ)

Группы/подгруппы		№	СДГ	α -ГФДГ	СДГ/ α -ГФДГ
Интактные крысы, n=12		1	13,80±0,63	15,9±1,23	0,93±0,09
Контроль, n=11		2	11,32±0,06 p1<0,01	9,12±0,70 p1<0,001	1,26±0,11 p1<0,05
СКЭНАР	Рост опухоли, n=7	3	11,40±0,70 p1<0,05	7,90±0,50 p1<0,001	1,50±0,20 p1<0,05
	Торможение и регрессия, n=8	4	10,7±0,8 p1<0,01	10,2±0,16 p1,3<0,001-0.05	1,02±0,08 p3<0,1
СКЭНАР+ ЭМИ КВЧ	Торможение, n=13	5	14,25±1,3 p2, 4<0,05 p3<0,1	11,10±0,70 p1,3<0,01 p2<0,1	1,26±0,06 p1,3<0,01- 0.05
	Регрессия, n=8	6	8,6±0,05 p1-5<0,001-0.05	10,4±0,7 p1,3<0,01-0.05	0,83±0,09 p2,3,5<0.01- 0,05

Примечание: p_i (где i = 1, 2,...5) – уровень достоверности, отличий от значений в i-й группе/подгруппе животных.

В группе с применением СКЭНАР-терапии активность ферментов также была снижена по сравнению с показателями у интактных животных. При этом степень снижения активности α -ГФДГ различалась в зависимости от эффекта воздействия (табл. 2). Минимальные значения показателя активности α -ГФДГ были отмечены при росте опухоли – и могли быть связаны с истощением энергетических резервов. В случае торможения роста опухоли и ее регрессии под влиянием СКЭНАР-терапии показатель активности α -ГФДГ был в 1.3 раза выше, чем при росте саркомы 45 в той же группе (табл. 2). Это позволило предположить и более высокий уровень функциональной активности лимфоцитов при эффективной СКЭНАР-терапии. При этом обращала на себя внимание высокая стабильность рассматриваемого показателя в данной группе животных, коэффициент вариации которого составил всего 4%. Это могло отражать синхронизацию определенных видов активности лимфоцитов под влиянием СКЭНАР-терапии. При эффективной СКЭНАР-терапии существенно изменялось соотношение показателей активности СДГ и α -ГФДГ, приближаясь к значениям у интактных животных (табл. 2). Все это могло указывать на повышение участия лимфоцитов в противоопухолевых процессах под влиянием СКЭНАР-терапии.

В группе животных, получавших комбинированное воздействие СКЭНАР-терапии и ЭМИ КВЧ, характеристики активности ферментов различались в зависимости от выраженности противоопухолевого эффекта – торможения роста саркомы 45 или её регрессии. Случаи торможения роста опухоли отличались наиболее высоким среди всех групп крыс-опухоленосителей показателем активностью СДГ, сходным со значением этого показателя у интактных животных и на 26% превышавшим значения показателя у крыс контрольной группы (табл. 2). При этом была отмечена тенденция ($p < 0.1$) к повышению показателей активности α -ГФДГ у этих животных по сравнению со значениями показателей у крыс контрольной группы и их сходство с показателями животных, у которых было отмечено торможение роста саркомы 45 под влиянием СКЭНАР-терапии (табл. 2).

При регрессии саркомы 45 под влиянием комбинированного воздействия значения показателя активности СДГ, напротив, были снижены не только по сравнению с интактными животными, но и по сравнению со значениями показателя во всех других экспериментальных группах и подгруппах (табл. 2). По нашему мнению, такая фазная динамика данного показателя могла отражать значительную активизацию процессов окислительного фосфорилирования под влиянием комбинированного воздействия, что позволило обеспечить высокий уровень активности иммунокомпетентных клеток, который закономерно снижался по мере эффективной реализации ими своего функционального и

энергетического потенциала и достигал минимальных значений к моменту полной регрессии опухолей. В случае регрессии саркомы 45 под влиянием комбинированного воздействия: соотношение активности изученных ферментов было четко сдвинуто в сторону активности α -ГФДГ аналогично имевшему место у интактных животных (табл. 2). Возможно, уменьшение соотношения показателей активности СДГ и α -ГФДГ при регрессии опухоли отражало не только процесс снижения активности СДГ, закономерно сменивший фазу выраженной активизации этого фермента, но и восстановление в лимфоцитах баланса процессов окислительного фосфорилирования и гликолиза, свойственного им в условиях физиологической нормы.

Заключение. Результаты проведенного исследования являются еще одним свидетельством целесообразности применения режимов активационной терапии при использовании факторов электромагнитной природы в противоопухолевом лечении. Была показана связь противоопухолевого и антистрессорного эффектов двух различных вариантов активационной электромагнитотерапии с изменениями цитохимических показателей активности ферментов-дегидрогеназ лимфоцитов в крови экспериментальных животных. При этом выраженность такой связи различалась в зависимости от вида воздействия. В случае эффективной СКЭНАР-терапии было отмечено увеличение показателя активности α -ГФДГ в лимфоцитах (в 1.3 раза) при значительной стабильности данного показателя в группе и отсутствии сдвигов в уровне активности СДГ. В случае более эффективного комбинированного воздействия, включавшего ЭМИ КВЧ и СКЭНАР-терапию, наблюдались повышение показателя активности СДГ (на 26%) и тенденция к повышению показателя активности α -ГФДГ ($p < 0.1$) при торможении роста опухоли. Кроме того, была отмечена зависимость изменения активности СДГ и соотношения уровней активности СДГ и α -ГФДГ от выраженности противоопухолевого влияния комбинированного воздействия. При регрессии саркомы 45 значения указанных показателей были в 1.5 раза и более снижены по сравнению со случаями торможения роста опухоли. При эффективных воздействиях соотношения показателей активности СДГ и α -ГФДГ приближались к значениям у интактных животных. Все это свидетельствует о вовлеченности лимфоцитов крови в механизмы противоопухолевого влияния исследованных факторов, особенно значительной в случае комбинированного воздействия, вызвавшего у 33% животных регрессию саркомы 45. Полученные сведения расширяют представления о процессах в иммунной системе при повышении неспецифической противоопухолевой резистентности под влиянием активационной электромагнитотерапии.

Список литературы

1. Гаркави Л.Х. Активационная терапия. – Ростов н/Д: Изд-во Рост. гос. ун-та, 2006. – 256 с.
2. Жукова Г.В. Использование принципов активационной терапии для повышения противоопухолевой эффективности электромагнитных воздействий в эксперименте: дис. ... докт. биол. наук. - Ростов-на-Дону, 2006. – 364 с.
3. Противоопухолевое действие и другие регуляторные эффекты низкоинтенсивных факторов электромагнитной и химической природы в эксперименте / Л.Х. Гаркави [и др.] // Биофизика. – 2014. – Т. 59, № 6. – С. 1161-1172.
4. Об информативности некоторых гистохимических, цитологических и биоритмических показателей для оценки изменения функционального состояния организма / Г.В. Жукова [и др.] // Вестник Южного научного центра РАН. - 2010. - Т. 6, № 3. - С. 49-59.
5. Kit O.I., Shikhlyarova A.I., Maryanovskaya G.Y. et al. Theory of health: successful translation into the real life. General biological prerequisites. *Cardiometry*, 2015, no. 7, pp. 11-17.
6. Савченко А.А. Основы клинической иммунометаболомики / А.А. Савченко, А.Г. Борисов. – Новосибирск: Наука, 2012. – 263 с.
7. Loftus R.M., Finlay D.K. Immunometabolism: cellular metabolism turns immune regulator. *J. Biol. Chem.*, 2016, vol. 291, pp. 1–10. doi:10.1074/jbc.R115.693903.
8. Кондрашова М.Н., Хундерякова Н.В., Захарченко М.В. Оригинальный цитохимический метод выявления индивидуальных различий физиологического состояния организма по комплексной характеристике (паттерну) активности сукцинатдегидрогеназы // Российский биомедицинский журнал. - 2009. - Т. 10, № 1. - С. 27-43.
9. Kondrashova M.N., Zakharchenko M.V., Khunderyakova N.V. et al. States of succinate dehydrogenase in the organism: dormant vs. Hyperactive (pushed out of equilibrium). *Biophysics*, 2013, vol. 58, no 1, pp. 86-94.
10. Состояние вегетативной нервной системы и метаболизма клеток иммунной системы у младших школьников при воздействии школьных информационных нагрузок / В.В. Фефелова [и др.] // Гигиена и санитария. - 2016. - № 2. - С. 177-181.
11. Buck M.D., O’Sullivan D., Klein Geltink R.I. et al. Mitochondrial dynamics controls T cell fate through metabolic programming. *Cell*, 2016, vol. 166, pp. 63–76. doi:10.1016/j.cell.2016.05.035.
12. Keating S.E., Zaiatz-Bittencourt V., Loftus R.M. et al. Metabolic reprogramming supports IFN-gamma production by CD56bright NK cells. *J. Immunol.*, 2016, vol.196, pp. 2552–60. doi:10.4049/jimmunol.1501783.

13. Gardiner C.M., Finlay D.K. What Fuels Natural Killers? Metabolism and NK Cell Responses. *Front. Immunol.*, 03 April 2017. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00367>. (дата обращения: 15.06.2018).
14. Shikhlyarova A.I., Zhukova G.V., Kit O.I., Babieva S.M. Energetic criteria of lymphocytes in evaluation of efficacy of system processes correction under oncopathology. *Cardiometry*, 2016, no. 9, pp. 70-73.
15. Зарецкая Ю.М. Клиническая иммуногенетика. – М.: Медицина, 1983. – 208 с.