

## UTICAJ N<sup>ω</sup>-NITRO-L-ARGININ METIL ESTRA NA METABOLIZAM ARGININA I POLIAMINA U MOŽDANOM TKIVU PACOVA U TOKU IZLAGANJA MIKROTALASNOM ZRAČENJU

Dušan Sokolović<sup>1</sup>, Boris Đinđić<sup>1</sup>, Dejan Krstić<sup>2</sup>, Dejan Petković<sup>2</sup>, Vera Marković<sup>3</sup>, Jovica Jovanović<sup>1</sup>, Olivera Dunjić<sup>1</sup> i Maja Jocić<sup>1</sup>

Izlaganje mikrotalasnom zračenju (MW), koje se koristi za mobilnu telefoniju, satelitsku komunikaciju, radio emitere, radare, mikrotalasne toplotne uređaje i medicinsku dijatermiju dovodi do pojave poremećaja u različitim organskim sistemima. Dokazano je da MW mobilnih telefona dovodi do povećanja nivoa oksidativnog stresa i apoptoze neurona, narušavanja integriteta krvno-moždane barijere i poremećaja dugotrajne memorije i sposobnosti orijentacije. Iz L-arginina se pod dejstvom enzima azot monoksid sintaze (NOS) stvaraju citrulin i azot monoksid (NO), a pod dejstvom arginaze nastaju L-ornitin i poliamini (neophodni za rast, proliferaciju i regeneraciju ćelija). N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) je neselektivni kompetitivni inhibitor NOS, koji pokazuje neuroprotektivno dejstvo i sprečava oštećenje neurona.

Cilj ovog istraživanja bio je da se nakon izlaganja pacova MW mobilnog telefona, u moždanom tkivu odredi: aktivnost arginaze, količina citrulina, katabolizam poliamina (određivanjem aktivnosti PAO i DAO), kao i efekat L-NAME na metabolizam arginina i poliamina.

Wister pacovi bili su podeljeni u četiri eksperimentalne grupe: I (kontrola), II (L-NAME) – životinjama je 60 dana svakodnevno davan L-NAME (5mg/kg TM), III (ZR) – životinje su 60 dana izlagane MW (4h/dnevno), IV (ZR + L-NAME) – pacovi kojima je aplikovan L-NAME, 60 dana (4h/dnevno) su izlagani MW mobilnog telefona.

U mozgu pacova koji su bili izloženi MW zabeleženo je sniženje aktivnosti arginaze ( $0.19 \pm 0.04$  naspram  $0.25 \pm 0.05$   $\mu\text{mol/mg}$  proteina;  $p < 0.01$ ) i značajno povišenje nivoa citrulina ( $10.34 \pm 0.49$  naspram  $7.83 \pm 0.41$   $\mu\text{mol/mg}$  proteina;  $p < 0.001$ ), u odnosu na kontrolne životinje. Aplikovanje L-NAME zračenim pacovima dovodi do sniženja nivoa citrulina ( $p < 0.05$ ), kao i do povišenja aktivnosti arginaze ( $p < 0.05$ ), u odnosu na kontrolu. Aktivnost PAO u tkivu mozga ozračenih pacova je značajno povišena, dok je aktivnost DAO značajno snižena u odnosu na kontrolne životinje ( $1.12 \pm 0.10$  naspram  $0.79 \pm 0.09$  U/mg proteina;  $p < 0.001$  i  $0.51 \pm 0.06$  naspram  $0.65 \pm 0.06$  U/mg proteina;  $p < 0.05$ ). Kod pacova koji su izlagani mikrotalasnom zračenju, a kojima je aplikovana L-NAME, zapaženo je povišenje aktivnosti DAO ( $0.61 \pm 0.04$  naspram  $0.51 \pm 0.06$  U/mg proteina;  $p < 0.05$ ) u tkivu mozga u odnosu na ZR + L-NAME grupu.

Aplikovanjem L-NAME pacovima koji su izlagani MW dolazi do sprečavanja poremećaja metabolizma arginina i poliamina u moždanom tkivu i tako ova supstanca pokazuje neuroprotektivno dejstvo. *Acta Medica Medianae* 2007;46(3): 5-11.

**Ključne reči:** L-NAME, mikrotalasno zračenje, arginin, poliamini, mozak

Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu<sup>1</sup>  
Fakultet zaštite na radu Univerziteta u Nišu<sup>2</sup>  
Elektronski fakultet Univerziteta u Nišu<sup>3</sup>

Kontakt: Dušan Sokolović  
Institut za biohemiju Medicinskog fakulteta  
Bulevar Zorana Đinđića 81  
18000 Niš, Srbija  
E-mail: soko@medfak.ni.ac.yu

### Uvod

Zračenje predstavlja prenošenje energije kroz prostor podsredstvom elektromagnetnih talasa ili atomskih čestica. Elektromagnetni talasi predstavljaju kombinaciju električnog i magnetnog polja, koja su nezavisni entiteti pri niskim frekvencijama, ali sa porastom frekvencije u opsegu kiloherca,

ova polja se kombinuju u jedinstveno elektromagnetno polje (EMP). Prirodno elektromagnetno polje zemlje i elektromagnetno polje svih bioloških sistema je u opsegu ekstremno niskih frekvencija. Mikrotalasna zračenja (MW) koja se koriste za mobilnu telefoniju, satelitsku komunikaciju, radio emitere, radare, mikrotalasne toplotne uređaje i medicinsku dijatermiju su u opsegu od 300MHz do 300GHz. Pretpostavlja se da danas u svetu postoji oko 2,5 milijarde korisnika mobilne telefonije (1).

Pokretanje signalne transdukcije nakon interakcije mikrotalasnog zračenja sa membranom ćelije ima značajnu ulogu u procesima apoptoze, u promociji tumorskog rasta i patofiziologiji neurodegenerativnih oboljenja kao što su Parkinson-ova i Alzheimer-ova bolest. Dokazano je da izlaganje

pacova mikrotalasnom zračenju (10 i 20 W/cm<sup>2</sup>) značajno povećava ekspresiju pro-apoptičkih Bcl-2 proteina u ćelijama testisa (2). Povišeni nivo oksidativnog stresa koji nastaje nakon delovanja MW može biti jedan od faktora koji pokreće proces apoptoze (3).

Pokazano je da mikrotalasno zračenje remeti aktivnost enzima ornitin dekarboksilaze (ODC), čime se objašnjavaju poremećaji metabolizma poliamina koji su registrovani u različitim ćelijskim kulturama nakon izlaganja MW-u. Postoje brojne varijacije u poremećajima aktivnosti ODC i metabolizma poliamina koje zavise od frekvencije upotrebljenog mikrotalasnog zračenja, vremena proteklog od ekspozicije vrste tkiva. Pokazano je da se aktivnost ODC smanjuje u periodu 3-4 sata nakon izlaganja mišićnih ćelija mikrotalasnom zračenju (4), ali su prisutni i rezultati koji ukazuju na porast aktivnosti ODC u tkivu mozga eksperimentalnih životinja (5).

Netermalni efekti mikrotalasnog zračenja dovode do ozbiljnih promena na DNK molekulima i proteinima u mozgu eksperimentalnih životinja, stvaranja mikronuklearnih ćelija u kostnoj srži, konformacionih promena proteina ili indukcije oksidativnog stresa u moždanom tkivu (6). Ovi efekti na molekularnom nivou dovode do razvoja brojnih poremećaja na ćelijskom nivou, kao što su povećani izlazak jona kalcijuma u kulturi humanih ćelija neuroblastoma, redukcija sekrecije melatonina ili poremećenog balansa u dopaminoprijatnom sistemu (7). Brojna istraživanja su pokazala sposobnost mikrotalasnog zračenja da izazove oštećenje DNK moždanih ćelija i ispolji prooksidativni potencijal koji se može korigovati primenom melatonina (8). Lai i Singh (1995) prvi su saopštili nalaze da mikrotalasno zračenje dozno-zavisno izaziva prekide jednog ili oba DNK lanaca u moždanim ćelijama pacova i na taj način ispoljava kancerogeni potencijal (9).

L-arginin je esencijalna amino kiselina koja služi kao prekursor za sintezu proteina, uree i kreatina. Iz arginina se pod dejstvom enzima azot monoksid sintaze (NOS) vrši cepanje terminalnog gvanidino azota, pri čemu se stvara citrulin i oslobađa azot monoksid (NO). Osim ćelija vaskularnog endotela i aktiviranih makrofaga, NO se stvara i u ćelijama CNS-a, timusa, jetre, pluća, bubrega, testisa, gastrointestinalnog trakta. Najnovija istraživanja govore da je NO bitan za regulaciju mnogih ćelijskih funkcija, kao što je vaskularni tonus, neurotransmisija imunogeneza. Pod dejstvom arginaze, L-arginin prelazi u ornitin, a on dekarboksilacijom (dejstvom ODC-a) služi za sintezu putrescina. Iz arginina dekarboksilacijom, pod dejstvom arginin-dekarboksilaze (ADC), nastaje agmatin. Ranije se smatralo da se ovaj metabolički put odvija samo u biljkama, ali je poslednjih godina aktivnost ADC dokazana u različitim tkivima sisara. Agmatin se hidrolizuje agmatinazom u putrescin ili oksidiše pomoću diamin oksidaze (DAO) u  $\gamma$ -gvanidino-butiraldehid, koji zatim prelazi u GABA-u (10).

Poliainini, spermin i spermidin, kao i diamin putrescin, prirodne su alifatične baze univerzalno rasprostranjene u svim biološkim sistemima. Najveća koncentracija poliamina uočena je u tkivima

kojima je svojstvena intenzivna sinteza proteina (timus, pankreas, prostata i jetra). Dokazano je da poliamini povećavaju stabilnost dvostrukog heliksa DNK. Zahvaljujući interakciji sa nukleinskim kiselinama, poliamini su uključeni u vitalne procese rasta, doobe i diferencijacije ćelija, a time i u regenerativnim, reparativnim i proliferativnim procesima (11). Poliamini ispoljavaju i anti-oksidativnu aktivnost jer reaguju sa slobodnim radikalima. Akumulacija poliamina u ćelijskim membrana ukazuje na njihovu ulogu u povećanju rigidnosti kao i regulaciji permeabilnosti ovih struktura za različite materije (12).

Inicijalna i limitirajuća reakcija u biosintezi poliamina, kod sisara je dekarboksilacija L-ornitina, pod dejstvom ODC-a kao i formiranje putrescina, iz koga nastaju spermidin i spermin. Dok su reakcije biosinteze spermidina i spermina ireverzibilne, interkonverzija poliamina natrag u putrescin ostvaruje se delovanjem dva enzima: spermidin/spermin N1-acetil transferaze (SSAT) i poliamin oksidaze (PAO), uz izdvajanje 3-Acetamidopropanala i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, toksičnih jedinjenja koja mogu izazvati oksidativni stres. Konverziju spermidina u putrescin, takođe, katalizuju ova dva enzima analognim reakcijama. Putrescin se može dalje podvrgnuti oksidativnoj dezaminaciji, pod dejstvom enzima diamin oksidaze (DAO), pri čemu nastaje  $\gamma$ -aminobutiraldehid, a iz njega GABA.

N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginin metil estar (L-NAME) je neselektivni kompetitivni inhibitor azot monoksid sintaze (NOS), koji prvenstveno deluje na konstitutivne forme NOS (nNOS – ekspimirana u nervnom tkivu i eNOS - endotelna) (13). U *in vivo* istraživanju pokazano je da davanje L-NAME dovodi do parcijalne ali trajne inhibicije nNOS. Dokazano je da primena L-NAME pokazuje neuroprotektivno dejstvo i sprečava oštećenje neurona (14).

## Cilj

Cilj ovog istraživanja bio je da se nakon dvomesečnog izlaganja pacova mikrotalasnom zračenju mobilnog telefona, u moždanom tkivu odredi: aktivnost arginaze, količina citrulina, katabolizam poliamina (određivanjem aktivnosti PAO i DAO), kao i efekat L-NAME na metabolizam arginina i poliamina.

## Materijal i metode

### • Eksperimentalni model

U eksperimentu su bili korišćeni beli pacovi Wistar soja, starosti od 8 do 10 nedelja, težine oko 150 do 200 grama, muškog pola, uzgajani na Institutu za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Nišu. Za vreme eksperimenta, eksperimentalne životinje su dobijale hranu i vodu *ad libitum*. Životinje su bile podeljene u četiri eksperimentalne grupe, a svaka grupa imala je 7 eksperimentalnih životinja:

**I grupa (kontrola)** - životinjama je intraperitonealno (i.p.) aplikovano po 1,0 ml fiziološkog rastvora (0,9% NaCl) svakodnevno,

**II grupa (L-NAME)** – životinjama je 60 dana svakodnevno davan L-NAME u dozi od 5 mg/kg TM (i.p.),

**III grupa (ZR)** - životinje su 60 dana (4h/dnevno) izlagane mikrotalasnom zračenju, a 30 minuta pre zračenja i.p. aplikovano po 1,0 ml fiziološkog rastvora,

**IV grupa (ZR + L-NAME)** – pacovi kojima je i.p. aplikovan L-NAME (5 mg/kg TM, 30 minuta pre zračenja) 60 dana (svakodnevno po 4 sata) izlagani su mikrotalasnom zračenju mobilnog telefona.

#### • Model izlaganja mikrotalasnom zračenju

Sve eksperimentalne životinje su bile smeštene u istoj prostoriji sa dnevnim osvetljenjem i bez postojanja bliskih izvora elektromagnetnog polja, u kavezima od elektroneutralnog materijala (pleksiglas) veličine 30x40x40 cm (ŠxDxV). Kao izvor mikrotalasnog zračenja bio je korišćen mobilni test telefon (model NOKIA 3110; Nokia Mobile Phones Ltd), povezan komunikacionim modemom sa računarom i kontrolisan softverskim programom. Karakteristike mikrotalasnog zračenja odgovaraju frekvenciji GSM mobilne mreže u Srbiji (frekvencije 900 MHz, jačine magnetnog polja od 0,5  $\mu$ T, 0,1 mT=1G). Softverskom kontrolom simulirana je konstantna upotreba mobilnog telefona korišćenjem radnog režima. Životinje su 4 sata dnevno bile izlagane mikrotalasnom zračenju, a zatim pomerane u prostoriju bez bliskih izvora elektromagnetnog polja. Tokom ekspozicije, kavezi sa životinjama su postavljeni na apsorpcioni materijal od gume i drvenu izolacionu podlogu, bez prisustva bliskih elektroprovodnika i metalnih predmeta. Izlaganje MW zračenju trajalo je 60 dana. Mobilni telefon bio je smešten u centru kaveza, u posebnoj kaseti napravljenoj od pleksiglasa, pri čemu je rastojanje generatora EMP od poda bilo 3 cm. Maksimalno rastojanje do uglova kaveza je 28,2 cm.

Specifična stopa apsorpcije (Specific Absorption Rate-SAR) za celo telo pacova iznosilo je oko 0,025-0,05 W/kg, pri čemu je telo pacova aproksimizovano kao sferični model.

Životinje su nakon eksperimenta žrtvovane, pod Ketamin anestezijom (u dozi od 2 ml/ kg TM pacova, i.p.) posle gladovanja od 15 sati.

#### • Priprema materijala za biohemijska ispitivanja

Za biohemijska ispitivanja uzimano je tkivo mozga. Nakon žrtvovanja eksperimentalnih životinja, moždano tkivo je višestruko ispirano u hladnom izotoničnom rastvoru NaCl, odmah zamrzavano na -20° C i tako čuvano do homogenizovanja. Zatim su pripremani 20%-ni homogenati mozga, u destilovanoj vodi na 0° C (na ledu).

#### • Biohemijske metode

Aktivnost arginaze određivana je po metodi Poremske i Kedre (1975). Aktivnost enzima se meri količinom oslobođenog ornitina, a na osnovu

merjenja količine oslobođenog ornitina Chinard reakcijom, koja se bazira na činjenici da ornitin, u prisustvu koncentrovane sirćetne kiseline, reaguje sa ninhidrinom i daje obojeno jedinjenje koje ima maksimum apsorpcije na 515 nm. Aktivnost enzima u tkivima preračunava se u  $\mu$ mol/mg proteina.

Količina citrulina određivana je kolorometrijski, diacetil monoksim reakcijom po metodi Boyde-a (1980). Koncentracija citrulina je izražena u  $\mu$ mol/mg proteina.

Aktivnosti PAO i DAO određivane su spektrofotometrijskom metodom po Bachrach-u i Reches-u (1966), na bazi merjenja količine stvorenog aminoaldehida, dejstvom ovih oksidaza na odgovarajuće supstrate. Kao supstrat za PAO koristi se spermin, a za DAO putrescin. Aktivnost pomenutih enzima izražava se u U/mg proteina.

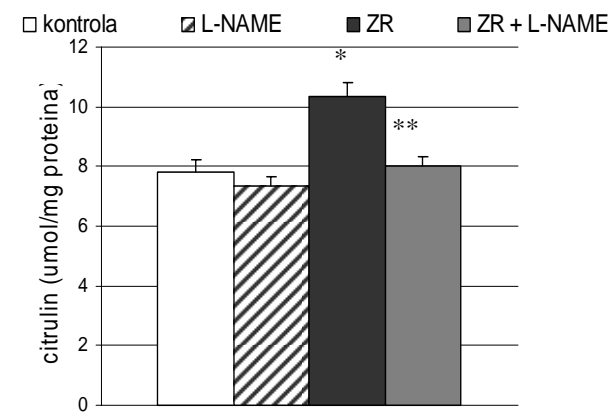
Količina ukupnih proteina u tkivima određivana je metodom po Lowry-u (1951), sa bovinim serum albuminom kao standardom.

#### • Statistička obrada podataka

Obrada dobijenih podataka izvršena je korišćenjem statističkog programskog paketa-Statistical Package for Social Science (SPSS) softverom, verzija 11.0, pri čemu su rezultati prikazani grafički.

#### Rezultati

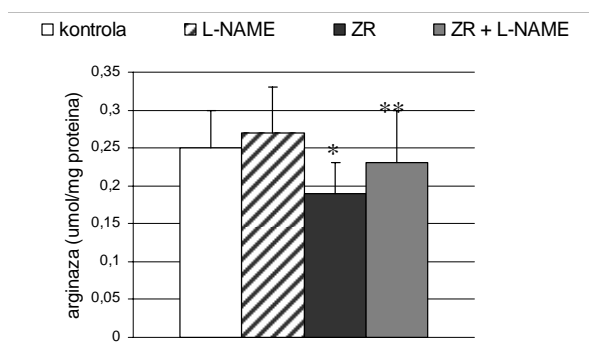
U mozgu pacova koji su bili izloženi mikrotalasnom zračenju, zabeleženo je sniženje aktivnost arginaze ( $0,19 \pm 0,04$  naspram  $0,25 \pm 0,05$   $\mu$ mol/mg proteina;  $p < 0,01$ ) i značajno povišenje nivoa citrulina ( $10,34 \pm 0,49$  naspram  $7,83 \pm 0,41$   $\mu$ mol/mg proteina;  $p < 0,001$ ), u odnosu na kontrolne životinje. Aplikovanje L-NAME zračenim pacovima dovodi do sniženja nivoa citrulina ( $p < 0,05$ ), kao i do povišenja aktivnosti arginaze ( $p < 0,05$ ), u odnosu na eksperimentalnu grupu ozračenih pacova kojima nije davana ova supstanca (Grafikoni 1 i 2).



\* $p < 0,001$  (naspram kontrole);

\*\* $p < 0,05$  (naspram zračenja)

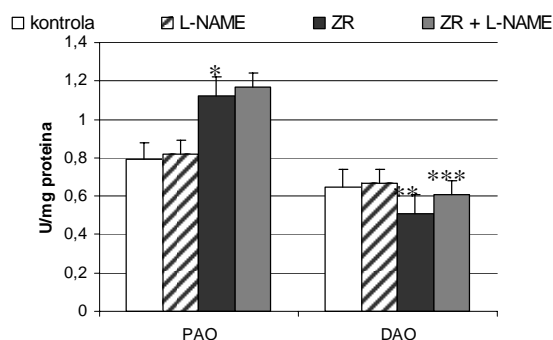
Grafikon 1. Nivo citrulina u mozgu pacova izloženih mikrotalasnom zračenju



\*p<0.01 (naspram kontrole);  
\*\*p<0.05 (naspram zračenja)

Grafikon 2. Aktivnost arginaze u moždanom tkivu pacova izloženih mikrotalasnom zračenju mobilnog telefona

Aktivnost PAO u tkivu mozga zračenih pacova je značajno veća u odnosu na kontrolne životinje (1,12±0,10 naspram 0,79±0,09 U/mg proteina; p<0,001). Aktivnost DAO pokazuje u istom tkivu suprotan trend, i vrednosti kod ozračenih pacova su značajno manje u odnosu na kontrolne životinje (0,51±0,06 naspram 0,65±0,06 U/mg proteina; p<0,05) (Grafikon 3).



\*p<0.001 (naspram kontrole);  
\*\*p<0.05 (naspram kontrole);  
\*\*\*p<0.05 (naspram zračenja)

Grafikon 3. Aktivnost PAO i DAO u moždanom tkivu pacova

Kod pacova koji su izlagani mikrotalasnom zračenju, a kojima je intraperitonealno davana L-NAME, zapaženo je blago, statistički neznačajno, povišenje aktivnosti PAO (1,17±0,07 naspram 1,12±0,10 U/mg proteina; p=ns.), kao i značajno povišenje aktivnosti DAO (0,61±0,04 naspram 0,51±0,06 U/mg proteina; p<0,05), u tkivu mozga u odnosu na ozračene pacove kojima nije davana pomenuta supstanca (Grafikon 3).

## Diskusija

Opasnosti koje nosi izlaganje mikrotalasnom zračenju mobilnih telefona nisu vidljive u kratkom periodu, jer su efekti na ljudsko zdravlje i okolinu mali i kumulativni. Za njihovo ispoljavanje potreban je dugotrajni period ekspozicije. Zbog toga, u novije vreme, široka upotreba mobilnih telefona dovodi do sve glasnijih upozorenja o negativnim efektima na ljudsko zdravlje. Jedna od prvih opservacija o negativnom dejstvu EMP na ljudsko

zdravlje je pojava različitih nespecifičnih simptoma: razdražljivost, neurovegetativna distonija i nesаница kod radnika na radarskim postrojenjima i radio odašiljačima. Primećeno je da eksperimentalne životinje izložene mikrotalasnom zračenju pokazuju poremećaje dugotrajne memorije i sposobnosti orijentacije (15).

Utvrđeno je da azot monoksid sintaza (NOS) i arginaza konkurišu za L-arginin u određenim uslovima, regulišući dostupnost ove amino kiseline kao supstrata za sintezu citrulina i NO, odnosno poliamina. To je dokazano i u našem eksperimentalnom modelu, gde je u mozgu pacova izloženih mikrotalasnom zračenju mobilnog telefona zabeleženo značajno povećanje nivoa citrulina i sniženje aktivnosti arginaze (Grafikoni 1 i 2). Verovatno delovanjem mikrotalasnog zračenja na moždano tkivo, katabolizam L-arginina ide u pravcu sinteze citrulina i NO, a ne u pravcu sinteze ornitina poliamina.

Ilhan i saradnici (2004) dokazali su da se nakon sedmodnevnog izlaganja pacova mikrotalasnom zračenju mobilnog telefona (1 h/dnevno), u moždanom tkivu javlja značajno povišenje nivoa NO (16). Eksperimentalno je dokazano značajno povišenje nivoa NO u retini i mozgu pacova izlaganih mikrotalasnom zračenju u periodu od 60 dana (17). Ozguner i saradnici (2005) su eksperimentalno potvrdili značajno povećanje koncentracije azot monoksida u miokardu pacova nakon 10 dana izlaganja zračenju mobilnog telefona (30 min/dnevno) (18).

Azot monoksid je važan modulator niza fizioloških funkcija u CNS-u, kao što su interneuronalna komunikacija, sinaptička plastičnost, oslobađanje neurotransmitera (19). On ispoljava i brojna toksična dejstva stvaranjem nitroksil radikala, peroksinitrita ili kroz posredovanje NMDA neurotoksičnosti. Studije ekscitotoksičnih oštećenja CNS-a pokazale su da povećana sinteza NO od strane neurona doprinosi ćelijskoj smrti, dok NO poreklom iz endotela ima neuroprotektivne efekte, prevashodno zbog dilatacije krvnih sudova. Inhibitori NOS, koji antagonizuju i eNOS i nNOS, nisu efektivni neuroprotektivni agensi, zato što dovode do kompromitovanja cerebralne cirkulacije (14).

Studija Bauera i sar. (2001) je eksperimentalno demonstrirala da azot monoksid može da inhibira enzim ornitin dekarboksilazu (ODC), direktno S-nitrozilacijom SH grupe cisteina (koji se u ODC-u nalazi u položaju 360) (20). Na osnovu toga, može se pretpostaviti da povećana produkcija citrulina, a samim tim i NO u mozgu ozračenih pacova, može da inhibira sintezu poliamina (direktno preko inhibicije ODC).

Postoje dve izoforme arginaze – arginaza I i II. Aktivnost citozolarne arginaze I je otkrivena u periportalnim hepatocitima i ona učestvuje u ciklusu sinteze uree, dok je arginaza II dokazana u mozgu, bubregu i tankom crevu (21). Hipoteza da arginaza može da reguliše dostupnost arginina za sintezu poliamina dokazana je činjenicom da je aktivnost arginaze koindukovana sa ODC i da ćelije sa deficitom arginaze ne mogu da proliferišu u medijumu bez dodatka ornitina i poliamina.

Poliamini se nalaze u velikim količinama u nervnom tkivu (nivo spermidina je najveći u beloj

masi, spermin ne pokazuje promenu sadržaja u raznim delovima mozga, dok je koncentracija putrescina najveća u kori velikog mozga, hipotalamusu, cerebelumu i kičmenoj moždini) (21). Dokazano je da su ćelije mozga osetljive na smanjenje nivoa poliamina i sposobne su da prepoznaju pad njihove koncentracije i da pokrenu regulatorne mehanizme, čiji je krajnji cilj održavanje normalnog nivoa ovih jedinjenja (12).

Pošto je u ovom eksperimentalnom istraživanju zabeležen pad aktivnosti arginaze, a porast nivoa citrulina, može se pretpostaviti da je u moždanom tkivu ozračenih pacova došlo do smanjenja biosinteze poliamina. Postoje oprečni stavovi o efektima poliamina u moždanom tkivu. Oni imaju paradoksalnu ulogu u izazivanju apoptoze i njenoj prevenciji (22). Mogući neuroprotektivni efekti poliamina pripisuju se anti-apoptičkim i anti-oksidativnim efektima, promenom neuronalne ekscitabilnosti stabilizacijom hromatina (23). Spermin je jak inhibitor povećane propustljivosti mitohondrijalne membrane, sprečavajući izlazak citohroma c iz nje i onemogućavajući aktivaciju apoptoze (24). Eventualni mehanizmi neuronalnog oštećenja koji zavise od poliamina su: 1) aktivacija fluksa Ca<sup>2+</sup>, oslobađanje neurotransmitera u oblastima sa povećanom produkcijom putrescina, 2) povećana stimulacija NMDA receptorskog kompleksa, izazvana oslobađanjem poliamina u ekstracelularni prostor, tokom i nakon oštećenja CNS-a, 3) spermin može da pokrene apoptozu ćelija mozga, stimulišući oslobađanje citohroma c iz mitohondrija aktivirajući kaspazu-3 (25).

Cerebralni ODC/poliaminski sistem je veoma osetljiv na fiziološke i patološke stimuluse u moždanom tkivu (uključujući i oštećenje CNS-a u uslovima izlaganja mikrotalasnom zračenju). Dokazano je da su promene u metabolizmu poliamina, povezane sa stepenom oštećenja CNS-a, značajno uključene u degeneraciji neurona (26).

Značajan porast aktivnosti PAO u mozgu pacova izloženih mikrotalasnom zračenju (Grafikon 3) mogao bi se objasniti intenziviranjem procesa interkonverzije poliamina, u kome ovaj enzim katalizuje reakciju konverzije spermina u spermidin i spermidina u putrescin. Ovaj acetilazno/oksidazni put omogućava regulaciju nivoa poliamina i mogućnost njihove dispozicije. Za katabolizam spermina/spermidina u putrescin, koji se odvija pomoću enzimskog sistema SSAT/PAO, karakteristično je izdvajanje 3-acetaminopropanala i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Vodonik peroksid i aminoaldehidi, proizvedeni tokom degradacije poliamina, imaju citotoksična svojstva. Citotoksičnost 3-aminopropanala je regulisana oticanjem u akrolein. Toksičan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (reaktivna vrsta kiseonika - ROS) može da ošteti proteine, DNK i lipide, kao i da pokrene apoptozu. Mnoge studije sugerišu da je poliaminska toksičnost direktna posledica oslobađanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (njegovim katabolizmom) (27). Izvesni toksični efekti intermedijera katabolizma poliamina vezani su za mogućnost nastajanja MDA (8,12).

Primećeno je da se u toku izlaganja organizma mikrotalasnom zračenju javlja značajno oksidativno oštećenje molekula DNK i pojava apoptoze zbog povećane aktivnosti enzima spermin oksidaze (SMO) i poliamin oksidaze (PAO). U jedru i citoplazmi ćelija mozga, zbog značajnog porasta

aktivnosti ovih enzima, povećano se produkuje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, iz koga se u Fentonovoj reakciji stvara još toksičniji OH<sup>•</sup>, koji dovodi do povećanja intenziteta oksidativnog stresa (28).

Agmatin je modulator intracelularnih nivoa poliamina. On smanjuje nivoe spermina spermidina, indukovanjem aktivnosti spermidin/spermin N<sup>1</sup>-acetil transferaze (SSAT). Dokazano je da je agmatin pokretač apoptoze, što se povezuje sa opadanjem nivoa poliamina u ćeliji. Eksperimentalno je pokazano da u kulturi hepatocita, u prisustvu agmatina, dolazi do povećanja broja apoptotičnih ćelija, jer dolazi do povećane razgradnje agmatina dejstvom DAO oslobađanja toksičnog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (29). Galea i saradnici (1996) su dokazali da je agmatin kompetitivni inhibitor NOS, naročito njegove inducibilne izoforme (30).

Promena aktivnosti DAO udružena je sa brojnim patološkim stanjima, kao što je pad aktivnosti DAO kod tumora na mozgu. U mozgu pacova koji su izlagani šezdesetodnevnom mikrotalasnom zračenju, nađeno je da je aktivnost DAO značajno snižena u odnosu na kontrolne životinje (Grafikon 3). Sniženje aktivnosti DAO u ozračenom moždanom tkivu verovatno smanjuje i nivo katabolizma putrescina, čime se povećava koncentracija ovog poliamina u mozgu. Povećavanjem nivoa putrescina u moždanom tkivu, intenziviraju se i njegovi neuroprotektivni efekti.

Rezultati prikazani na Grafikonima 1 i 2 pokazuju da je aplikovanje L-NAME ozračenim pacovima dovelo do sniženja nivoa citrulina, kao i do povišenja aktivnosti arginaze, u odnosu na grupu ozračenih pacova kojima nije davana ova supstanca. S obzirom da L-NAME inhibira metabolički put sinteze NO i citrulina iz arginina, logično je bilo očekivati da će njegova aplikacija povećati dostupnost ovog supstrata za arginazu i izazvati porast aktivnosti ovog enzima. Tako se aplikacijom L-NAME, katabolizam L-arginina usmerava ka sintezi poliamina, ali ne i prema stvaranju citrulina i NO. Može se pretpostaviti da se na taj način onemogućava smanjenje nivoa poliamina kod ozračenih pacova kojima je aplikovana L-NAME.

Porast aktivnosti DAO u mozgu pacova koji su izlagani mikrotalasnom zračenju, a kojima je intraperitonealno davana L-NAME, u odnosu na ozračene pacove kojima nije davana pomenuta supstanca (Grafikon 3), može da ukaže na intenziviranje katabolizma putrescina u ovim uslovima (31). Imajući u vidu da inhibitori sinteze NO smanjuju oslobađanje GABA u kori mozga (32), moguće je da se u uslovima smanjenog nivoa NO u ovom eksperimentalnom modelu MW zračenja aktivira alternativni put sinteze GABA iz putrescina, katalizovan DAO, što je logično objašnjenje za porast aktivnosti ovog enzima.

## Zaključci

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se u moždanom tkivu pacova izlaganih mikrotalasnom zračenju, u trajanju od 60 dana, javlja porast nivoa citrulina, pad aktivnosti arginaze, kao i povećanje aktivnosti PAO i sniženje aktivnosti DAO. Davanjem L-NAME zračenim životinjama sprečava se poremećaj u metabolizmu arginina (povećanjem aktivnosti arginaze i nivoa citrulina) i poliamina (povećavanjem aktivnosti DAO).

## Literatura

1. Krstić D, Đinđić B, Kocić G, Petković D, Radić S, Sokolović D. Štetna delovanja elektromagnetnog polja učestanosti 50 Hz na biološke sisteme. *Acta Medica Medianae* 2003; 42(4):7-14.
2. Yu CH, Guo C, Yao YQ. Effects of high power microwave on the expressions of Bcl-2 and C-myc proteins in the rat testis. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2005; 11(1): 22-5.
3. Djindjić B, Sokolović D, Radić S, Pavlović T, Cvetković M, Radisavljević J. Biološki efekti mikrotalasnog zračenja na moždano tkivo kod pacova. *Acta Medica Medianae* 2003; 42(2):9-12.
4. Cain CD, Thomas DL, Ghaffari M, Adey WR. 837 MHz Digital Cellular Telephone RF Fields and Induced ODC Activity in C3H10T1/2 Cells, The Bioelectromagnetics Society Meeting, Victoria, BC, Canada, 1996.
5. Paul Raj R, Behari J, Rao AR. Effects of low level 2.45 GHz microwave radiation on Ca<sup>2+</sup> efflux and ODC activity in chronically exposed developing rat brain. *Natural Seminar on Low-Level Electromagnetic Field Phenomena in Biological Systems*, New Delhi, Indija, 1999.
6. Demisia G, Vlastos D and Matthopoulos DP. Effect of 910-MHz electromagnetic field on rat bone marrow. *ScientificWorld Journal* 2004; 4:48-54.
7. Burch JB, Reif JS, Noonan CW, Ichinose T, Bachand AM and Koleber TL et al. Melatonin metabolite secretion among cellular telephone users. *Int J Radiat Biol* 2002; 78:1029-36.
8. Sokolovic D, Djindjic B, Nikolic J, Bjelakovic G, Pavlovic D, Kocic G, et al. Melatonin reduces oxidative stress induced by chronic exposure of microwave radiation from mobile phones in rat brain. *J Radiat Res* 2008; 49(6):579-586.
9. Lai H, Singh NP. Acute low-intensity microwave exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells *Bioelectromagnetics* 1995;16(3):207-10.
10. Grillo MA and Colombatto. Metabolism and function in animal tissues of arginine, a biogenic amine formed from arginine. *Amino Acids* 2004; 26:3-8.
11. Bjelaković G, Kocić G, Pavlović D, Nikolić J, Stojanović I, Bjelaković GB, Jevtović T, Sokolović D. Effects of Folic Acid on Polyamine Concentrations and Polyamine Oxidase Activity in Regenerating Rat Liver. *Pteridines* 2003;14: 109-113.
12. Sokolović D, Bjelaković G, Zajić S, Damnjanović Z, Nikolić J, Kocić G et al. Efekti L-metionina na metabolizam poliamina u moždanom tkivu pacova sa holestazom. *Acta Medica Medianae* 2006; 45(1):21-26.
13. Boehr R, Ulrich WR, Klein T, Mirau B, Haas S, Baur I. The inhibitory potency and selectivity of arginine substrate site nitric oxide synthase inhibitors is solely determined by their affinity toward the different isoenzymes. *Mol Pharmacol* 2000; 58(5): 1026-34.
14. Zhang ZG, Reif D, MacDonald J, Tang WX, Kamp DK, Gentile RJ, Shakespeare WC, Murray RJ, Chopp M. ARL 17477, a potent and selective neuronal NOS inhibitor decreases infarct volume after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16: 599-604.
15. Laurence AJ, French WP, Linder AR, McKenzie RD. Biological effects of electromagnetic fields-mechanism for the effects of pulsed microwave radiation on protein conformation. *J Theor Biol* 2000;206:291-8.
16. Ilhan A, Gurel A, Armutcu F, Kamisli S, Iraz M, Akyol O, and Ozen S. Ginkgo biloba prevents mobile phone-induced oxidative stress in rat brain. *Clin Chim Acta* 2004; 340:153-62.
17. Ozguner F, Bardak Y, Comlekci S. Protective effect of melatonin and caffeic acid phenethyl ester against retinal oxidative stress in long-term use of mobile phone: A comparative study. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2006; 282: 83-88.
18. Ozguner F, Oktem F, Ayata A, Koyu A, Yilmaz H. R. A novel antioxidant agent caffeic acid phenethyl ester prevents long-term mobile phone exposure-induced renal impairment in rat *Molecular and Cellular Biochemistry* 2005; 277:73-80.
19. Liaudet L, Soriano FG, Szabo C. Biology of nitric oxide signalling. *Critical Care Med* 2000; 28(4):N37-N52.
20. Bauer PM, Buga GM, Fukuto JM, Pegg AE, Ignarro LJ. Nitric oxide inhibites ornithine decarboxylase via S-nitrosylation of cysteine 360 in the active site of the enzyme. *J Biol Chem* 2001; 276(37):34458-64.
21. Gotoh T, Araki M, Mori M. Chromosomal lokalizatio of arginase II gene and tissue distribution of its mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 233:487-91.
22. Thomas T and Thomas TJ. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58:244-58.
23. Adibhatla RA, Hatcher JF, Sailor K, Dempsey J. Polyamines and central nervous system injury: spermine and spermidine decrease following transient focal cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Brain Research* 2002; 1: 30-8.
24. Stefanelli C, Stanić I, Zini M, Bonavita F, Flamigni F, Zambonin L, Landi L et al. Polyamines directly induce release of cytochrome c from heart mitochondria. *Biochem J* 2002; 347:875-80.
25. Muralikrishna Rao A, Hatcher J, Dempsey R. Polyamine response to CNS injury: for better or for worse? *Recent Research Developments in Neurochemistry* 1999; 2: 517-32.
26. Henley CM, Wey K, Takashima A, Mills C, Granmayeh E, Krishnappa I et al. S-adenosylmethionine decarboxylase activity is decreased in the rat cortex after traumatic brain injury. *J Neurochem* 1997;69:259-65.
27. Paschen W. Polyamine metabolism in different pathological states of the brain. *Mol Chem Neuropath* 1992; 16: 241-71.
28. Amendola R, Bellini A, Cervelli M, Degan P, Marecoci L, Martini F, Mariottini P. Direct oxidative DNA damage, apoptosis and radio sensitivity by spermine oxidase activities in mouse neuroblastoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1755:15-24.
29. Gardini G, Cravanzola C, Testore G, Solinas SP, Colombatto S. Agmatine inhibits the proliferation of rat hepatoma cells by modulation of polyamine metabolism. *Abstracts Meeting "Biogenic Amines"*, Albere di Tenna, Trento, 2002, p 4P.
30. Galea E, Regunathan S, Eliopoulos V, Feinstein DL, Reis DJ. Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. *Biochem J* 1996;316: 247-49.
31. Wallace H, Fraser A and Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J* 2003; 376:1-14.
32. Montague PR, Gancayco CD, Winn MJ, Marchase RB, Friedlander MJ. Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science* 1994; 263: 973-7.

## THE INFLUENCE OF N<sup>ω</sup>-NITRO-L-ARGININE METHYL ESTER ON ARGININE AND POLYAMINE METABOLISM IN RAT'S BRAIN TISSUE DURING EXPOSITION TO MICROWAVE RADIATION

Dusan Sokolovic, Boris Djindjic, Dejan Krstic, Dejan Petkovic, Vera Markovic, Jovica Jovanovic, Olivera Dunjic and Maja Jovic

Exposition to microwave radiation (MW) from mobile phones, satellite communications, radio relays, radars and microwave devices in medicine induce disturbances in different organ systems. It has been shown that MW from mobile phones induce increasing of oxidative stress and apoptosis of neurons with impairment of blood brain barrier, disturbances of memory and space orientation. Citrulline and nitric oxide -NO are products of L-arginine by NO sintase-NOS. L-ornithine and polyamines are products of L-arginine by arginase. N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) competitive inhibits NOS and exerts neuroprotective effects.

The aim of this investigation was to determine the arginase, PAO and DAO activity, concentration of citrulline, as well as the effects of L-NAME on arginine and polyamine metabolism in brain tissue of rats exposed to MW.

Four groups of Wistar rats were investigated during 60 days: I-control-sham exposed, II (L-NAME)-rats treated with L-NAME (5 mg/kg b.w. i.p.), III (MW)-rats exposed to MW (4 h/day), IV (MW + L-NAME). The source of MW was mobile test telephone.

Decreasing activity of arginase ( $0.19 \pm 0.04$  vs.  $0.25 \pm 0.05$  mmol/mg prot;  $p < 0.01$ ) and increasing of citrulline concentration ( $10.34 \pm 0.49$  vs.  $7.83 \pm 0.41$  mmol/mg prot;  $p < 0.001$ ) were registered in the brain of MW exposed rats compared to controls. In L-NAME group there was a decrease of citrulline level ( $p < 0.05$ ), and increase in arginase activity ( $p < 0.05$ ) compared to controls. In the brain of exposed rats, the activity of PAO was significantly increased, while the activity of DAO was significantly increased vs. controls ( $1.12 \pm 0.10$  vs.  $0.79 \pm 0.09$  U/mg prot;  $p < 0.001$  and  $0.51 \pm 0.06$  vs.  $0.65 \pm 0.06$  U/mg prot;  $p < 0.05$ , prospectively). In MW+L-NAME group we registered increasing of DAO activity ( $0.61 \pm 0.04$  vs.  $0.51 \pm 0.06$  U/mg prot;  $p < 0.05$ ) in the brain tissue compared with MW group.

Having considered the obtained results, we concluded that L-NAME exerted neuroprotective effects by preventing polyamine and arginine metabolism disturbances in the rats' brain under exposition to MW. *Acta Medica Medianae 2007;46(3):5-11.*

**Key words:** L-NAME, microwave radiation, arginine, polyamine, brain