



Скамрова Галина Борисовна

**КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ СЛАБОГО МИКРОВОЛНОВОГО
ИЗЛУЧЕНИЯ И ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ ПРЕПАРАТОВ НА КЛЕТКИ
БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА**

Специальность 03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Воронеж 2014

Работа выполнена в Севастопольском национальном техническом университете.

Научный руководитель: доктор физико-математических наук, профессор
Евстигнеев Максим Павлович

**Официальные
оппоненты:**

Чемерис Николай Константинович

доктор биологических наук, профессор, ФГБУН
Институт биофизики клетки Российской академии
наук, лаборатории клеточной нейробиологии, главный
научный сотрудник

Антипов Сергей Сергеевич

кандидат биологических наук, ФГБОУ ВПО
Пущинский естественно-научный институт, старший
научный сотрудник

Ведущая организация: Московский государственный университет имени
М.В.Ломоносова

Защита диссертации состоится «25» декабря 2014 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д.212.038.03 при Воронежском государственном университете по адресу: 394006 г. Воронеж, Университетская пл. 1., комната 59.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке Воронежского государственного университета и на сайте <http://www.science.vsu.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук,
профессор



Грабович Маргарита Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение совместного действия электромагнитного излучения (ЭМИ) и биологически-активных соединений (БАС) на биосистемы различного уровня организации представляет большой интерес в связи с перспективой использования комбинированного воздействия лекарственных препаратов и ЭМИ в терапии различных заболеваний. Особый интерес представляет слабое неионизирующее ЭМИ микроволнового диапазона, не вызывающее деструкцию субклеточных компонент и имеющее нетепловой характер действия.

Существуют основания полагать, что первичной мишенью нетеплового действия слабого излучения микроволнового диапазона на клеточном уровне является ядерный хроматин. Взаимодействие ЭМИ с хроматином может изменять степень электростатических взаимодействий ДНК-белок и вызывать изменение функционального состояния клеток, проявляющееся в разнообразных клеточных эффектах, регистрируемых различными методами. В связи с этим существует мнение, что ЭМИ может определенным образом взаимодействовать с БАС, механизм биологического действия которых обусловлен нековалентным комплексообразованием с ядерной ДНК. Имеющиеся свидетельства действительно указывают на наличие биологического синергизма при совместном действии слабого ЭМИ и ДНК-связывающихся препаратов, а также комбинаций препаратов в отсутствие ЭМИ, в частности при действии на пролиферирующие клеточные линии. Тем не менее, данные о подобном эффекте в непролиферирующих клеточных системах в настоящее время отсутствуют.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Диссертационная работа выполнена согласно плану научно-исследовательских работ кафедры физики Севастопольского национального технического университета в рамках государственной бюджетной темы «Действие электромагнитного излучения на молекулярные процессы, свойства клеток и процессы оплодотворения и эмбриогенеза» («ЭМИ»), № госрегистрации 0112U008334 (2013-2015).

Цель и задачи исследования. Целью исследования являлось установление закономерностей в отклике клеток буккального эпителия человека на комбинированное действие слабого ЭМИ и БАС.

Для достижения данной цели решались следующие задачи:

1. разработка устройства и адаптация методики исследования электрокинетических свойств ядер методом микроэлектрофореза;
2. установление закономерностей изменения состояния хроматина и клеточной мембраны под влиянием слабого ЭМИ микроволнового диапазона различных характеристик;
3. определение закономерностей процессов гетерохроматинизации в интерфазных ядрах, изменения показателя электроотрицательности ядер и барьерной функции мембран под действием ароматических БАС по отдельности и в комбинациях;
4. изучение закономерностей изменения состояния хроматина и клеточных ядер при совместном действии ЭМИ и ароматических БАС;
5. обсуждение молекулярных механизмов наблюдаемого клеточного отклика при комбинированном действии БАС и ЭМИ.

Объект исследования – реакция клеток буккального эпителия человека на действие слабого ЭМИ микроволнового диапазона и комбинаций ароматических БАС.

Предмет исследования – состояние хроматина и мембран, а также электрокинетические свойства ядер клеток буккального эпителия человека.

Методы исследования.

1. Метод определения степени конденсации хроматина в интерфазных ядрах клеток буккального эпителия по количеству гранул гетерохроматина при окрашивании орсеином.
2. Метод оценки изменения проницаемости мембран клеток буккального эпителия при окрашивании клеток раствором индигокармина.
3. Метод исследования электрокинетических свойств ядер с помощью клеточного микроэлектрофореза.
4. Билюминесцентный тест на основе морских светящихся бактерий.
5. Метод спектрофотометрии в УФ и видимом диапазоне длин волн.
6. Атомно-силовая микроскопия и микроскопия в видимом диапазоне.
7. Методы статистической обработки данных.

Научная новизна полученных результатов.

В настоящей работе впервые проведено комплексное исследование комбинированного действия слабого ЭМИ и ароматических БАС на клетки буккального эпителия человека.

Установлена корреляция между изменениями состояния хроматина и электроотрицательностью клеточных ядер под действием некоторых ДНК-интеркаляторов. Обнаружено концентрационно-зависимое увеличение количества гранул гетерохроматина и снижение электроотрицательности ядер при инкубации клеток буккального эпителия с препаратами от 10 мин до 3 часов.

На непролиферирующих клетках буккального эпителия впервые обнаружен синергетический протекторный эффект при исследовании комбинированного действия электромагнитного излучения с ДНК-интеркаляторами, проявляющийся в уменьшении клеточного отклика, вызываемого электромагнитным излучением и препаратами по-отдельности. Также наблюдался протекторный эффект C_{60} фуллерена и кофеина по отношению к действию электромагнитного излучения.

При исследовании комбинированного действия биологически активных соединения на клетках буккального эпителия обнаружен протекторный эффект кофеина и C_{60} фуллерена по отношению к генотоксическому действию ДНК-интеркаляторов. Данный эффект хорошо описывается в рамках теории интерцепторно-протекторного действия и обусловлен нековалентным комплексообразованием (гетероассоциацией) БАС друг с другом.

Существование протекторного эффекта также подтверждено на пролиферирующей клеточной культуре светящихся бактерий.

Практическое значение полученных результатов. В работе продемонстрирована возможность использования хроматина буккального эпителия человека как достаточно чувствительного объекта для качественной и количественной оценки воздействия ЭМИ и БАС на клеточном уровне. Полученные результаты также указывают на перспективу использования C_{60} фуллерена и кофеина для уменьшения потенциально генотоксического воздействия электромагнитного излучения.

Личный вклад соискателя. Соискателем самостоятельно обрабатывались литературные источники, проведена большая часть экспериментальной работы, выполнен анализ и обобщение результатов, проведена статистическая и математическая обработка данных. Совместно с научным руководителем подготавливались публикации по результатам исследований и выполнялось планирование эксперимента. Постановка методик комплексного исследования состояния ядра и мембраны клеток буккального эпителия человека проводилась совместно с заведующим отделом генетики НИИ Биологии Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина д.б.н. Шкорбатовым Ю.Г. Постановка эксперимента по индивидуальному и комбинированному действию биологически активных соединений на биолюминесценцию культуры светящихся бактерий *P. leiognathi* Sh1 проводилась совместно с заведующим кафедрой фармации Крымского государственного медицинского университета д.б.н. Кацевым А.М. Разработка СВЧ части устройства для облучения культуры клеток выполнена доцентом кафедры радиотехники СевНТУ к.т.н. Трушкиным А.Н.

Апробация результатов диссертации. Результаты диссертационной работы были представлены на VII, VIII, IX Международных научно-технических конференциях «Актуальные вопросы биологической физики и химии (БФФХ)» г. Севастополь (2011, 2012, 2013 г.г.); в Материалах Международной научно-методической конференции «Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы» г. Воронеж (Россия) (2013 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 работ (из них 3 статьи индексированы в международных наукометрических базах данных).

На защиту выносятся следующие положения:

1. Слабое микроволновое излучение сантиметрового диапазона вызывает статистически-значимый отклик клеток буккального эпителия человека в виде роста количества гранул гетерохроматина и увеличения проницаемости мембран для витального красителя, отражающий изменение функциональной активности клеточного ядра.

2. Введение ароматических ДНК-интеркаляторов (доксорубицина, профлавина и бромистого этидия) вызывает конденсацию хроматина и снижение электроотрицательности клеточных ядер.

3. Ароматические ДНК-интеркаляторы (доксорубицин, профлавин, бромистый этидий и кофеин) и C_{60} фуллерен проявляют протекторный эффект по отношению к действию слабого микроволнового излучения на хроматин клеток буккального эпителия человека, заключающийся в восстановлении функциональной активности клеточного ядра.

4. Введение C_{60} фуллерена или кофеина совместно с ароматическими ДНК-интеркаляторами позволяет уменьшить эффект, вызванной индивидуальным действием ДНК-интеркаляторов на уровне ядра и хроматина клеток буккального эпителия.

5. Экспериментальные данные изменения числа гранул гетерохроматина как функции концентрации интерцептора (C_{60} фуллерена или кофеина) при введении в клетку ДНК-интеркалятора хорошо описываются в рамках теории интерцепторно-протекторного действия, в основе которой лежит представление о гетероассоциации и конкуренции интеркалятора и интерцептора за места посадки на биорецептор.

Структура и объем работы. Текст диссертации включает введение, 5 глав, выводы, список использованных источников и приложение. Текст диссертации изложен на 201 странице машинописного текста и включает в себя 44 рисунка и 9 таблиц в основном тексте, и 1 рисунок и 16 таблиц в приложении. Список литературы содержит 286 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы диссертации, связь работы с научными программами и темами, сформулированы цель и задачи исследования, показана новизна и практическая значимость полученных результатов, обговорен личный вклад соискателя в опубликованные с соавторами работы.

В **главе 1** рассмотрены основные нетепловые эффекты действия неионизирующего ЭМИ на биологические системы клеточного и субклеточного уровней, в частности на уровне ДНК и хроматина, клеточной мембраны, ионных

потоков и экспрессии генов, а также влияние ЭМИ на пролиферацию клеток и апоптоз. Обсуждены основные молекулярные механизмы взаимодействия ЭМИ с биологическими объектами. Особое внимание уделено механизмам биологического действия ароматических БАС на молекулярном уровне. Рассмотрены основные представления теории интерцепторного и протекторного механизма действия ароматических БАС по отношению к ДНК, которая дает возможность количественного описания данных биологического эксперимента *in vitro* на основании известных параметров межмолекулярного взаимодействия в трехкомпонентной смеси Препарат-Интерцептор-ДНК. Последний подраздел посвящен комбинированному воздействию ЭМИ и БАС на живые организмы. Сделан вывод о том, что в силу ограниченности научных знаний и сложности природы рассмотренных явлений единого мнения о биофизических механизмах взаимодействия ЭМИ микроволнового диапазона с биологическими объектами, а также с БАС на настоящий момент не существует.

В главе 2 приведена информация по материалам и методам, используемым в работе.

Объекты экспериментальных исследований. В данном подразделе обоснован выбор клеток буккального эпителия человека в качестве объектов исследований. Соскоб клеток буккального эпителия делался с внутренней поверхности щеки донора с помощью тупого стерильного шпателя. Затем клетки помещались в 3.03 ммоль/л фосфатный буфер (рН=7.0) с добавлением 2.89 ммоль/л хлорида кальция.

Состояние хроматина в клетках буккального эпителия человека оценивалось по количеству гранул гетерохроматина (КГГ) в ядрах клеток после окрашивания орсеином (Shckorbatov et al., 1999). Фотографии ядер клеток буккального эпителия после окрашивания орсеином (увеличение 1000) представлены на рис. 1(а).

Проницаемость клеточных мембран оценивалась по процентному содержанию клеток (параметр ОКИ), окрашенных раствором индигокармина *in vitro* (Shckorbatov et al., 1995). Фотографии клеток (увеличение 100) представлены на рис. 1(б).

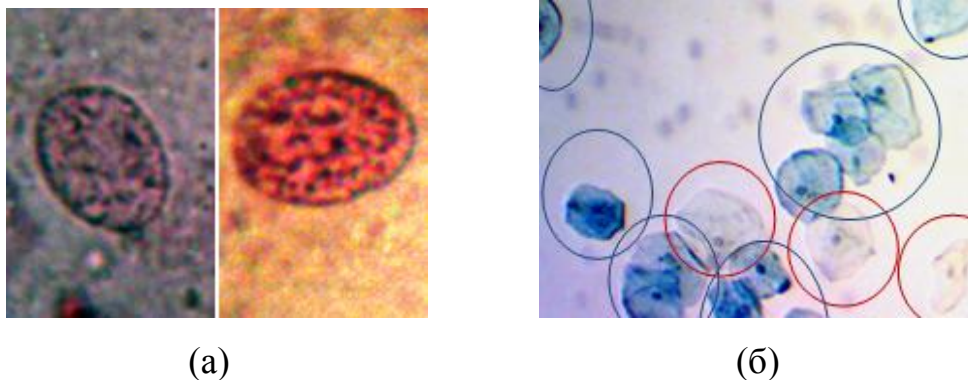


Рис.1. (а) - ядра клеток буккального эпителия человека после окраски орсеином (слева КГГ≈10, справа КГГ≈16); (б) клетки, окрашенные (выделены синим) и неокрашенные (выделены красным) индигокармином

Исследование электрокинетических свойств ядер (показателя электроотрицательности ядер - ЭОЯ) проводилось с помощью внутриклеточного микроэлектрофореза (Шахбазов и др., 1986). Приведена подробная схема установки для микроэлектрофореза, разработанной в рамках настоящей работы.

Биолюминесцентный анализ проводился с помощью светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi* Sh1 выделенных из Азовского моря (Katsev et al., 2004). До высевания на питательную среду музейная культура хранилась на полужидком агаре под вазелиновым маслом.

Воздействие ЭМИ на клетки буккального эпителия человека проводилось с помощью волноводной системы на базе направленного ответвителя, возбуждаемого генератором СВЧ (рис. 2), описание которых приведено в соответствующем подразделе, а также с помощью мобильных телефонов с различным уровнем удельного коэффициента поглощения SAR.

Воздействие БАС на клетки человека. Клетки буккального эпителия подвергались воздействию доксорубицина, бромистого этидия, профлавина, кофеина и C_{60} фуллерена в течение 10 мин, 1 и 3 ч. Состояние C_{60} фуллерена в растворе контролировалось с помощью атомно-силовой микроскопии (система «Solver Pro M», Россия).

Спектры растворов в УФ и видимой области регистрировались с использованием двухлучевого спектрофотометра SQ-4802 (UNICO, США).

Статистическая обработка данных производилась в программах Microsoft Office Excel, SigmaPlot и SigmaStat. В работе был принят уровень достоверности $p < 0.05$.

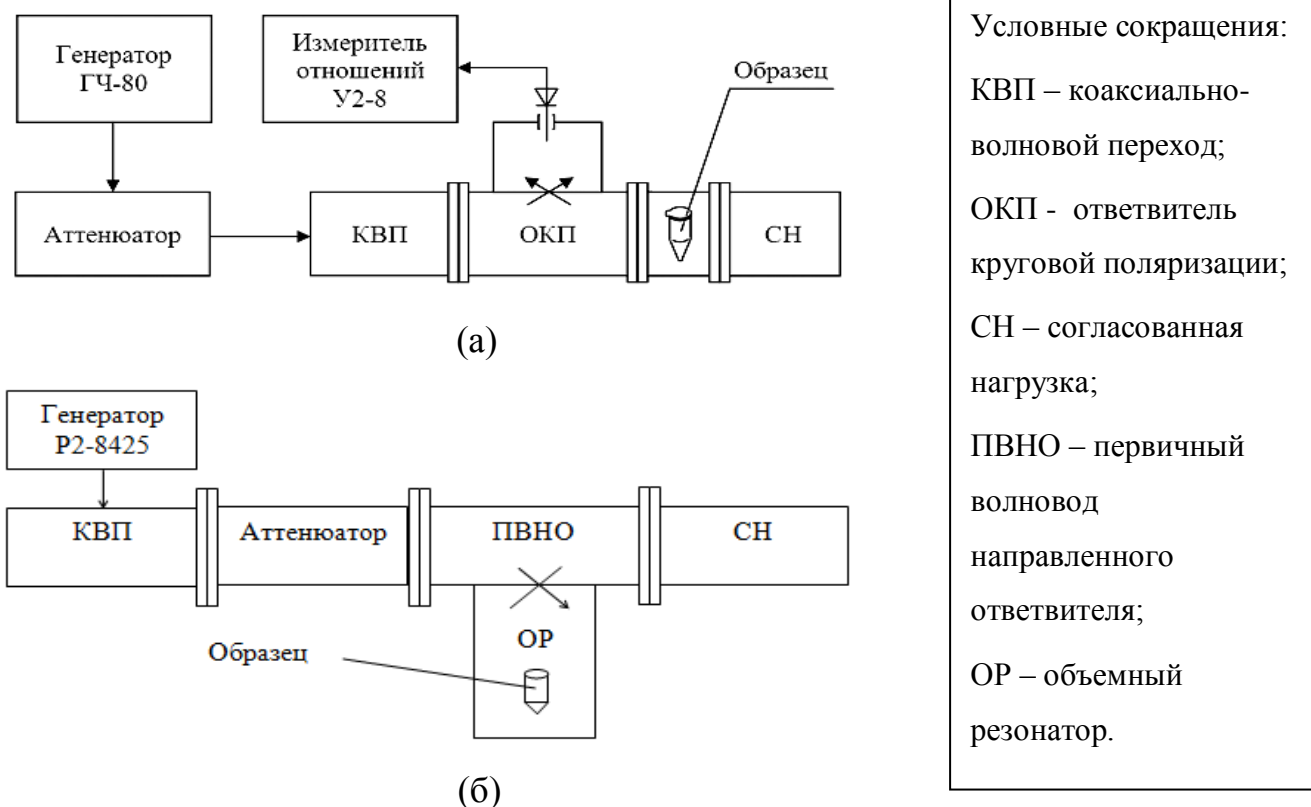


Рис.2. (а), (б) - принципиальные схемы использованных волноводных систем

В главе 3 производилось предварительное исследование действия слабого ЭМИ микроволнового диапазона в отсутствие БАС с целью определения изменений клеточного отклика в зависимости от различных условий облучения, а также для подбора оптимальных условий для реализации последующих глав работы. Изучена реакция клеток буккального эпителия на ЭМИ различных характеристик: излучение рабочей частоты WiMAX (3.7 ГГц) с варьируемыми мощностью и временем экспозиции, излучение мобильных телефонов (900 МГц) с двумя различными уровнями SAR, а также отклик клеток на электрическую и магнитную составляющую ЭМИ на частоте 8 ГГц по отдельности. Исследовались проницаемости мембран клеток буккального эпителия для витального красителя индигокармина, а также изменение состояния хроматина как факторы реакции клетки на действие ЭМИ в зависимости от различных условий облучения.

Влияние ЭМИ на частоте беспроводной связи WiMAX (3.7 ГГц) на состояние хроматина и мембраны клеток буккального эпителия человека. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о наличии существенного влияния микроволнового излучения рабочей частоты WiMAX при плотности потока мощности до 40 мкВт/см^2 на клетки буккального эпителия человека. Установлен

характер изменения состояния хроматина и проницаемости мембраны в зависимости от времени экспозиции и мощности излучения. Показано, что реакция клетки в виде изменения степени проницаемости мембраны на величину плотности потока мощности ЭМИ частотой 3.7 ГГц характеризуется четким максимумом в диапазоне плотностей потока 2.5...10 мкВт/см², при этом мощность 1.25 мкВт/см² является пороговой, начиная с которой эффект действия ЭМИ на проницаемость мембран приобретает статистическую значимость. Также наблюдается увеличение показателя КГГ при возрастании мощности излучения, при этом нижнее пороговое значение мощности, при котором ещё не наблюдалось гранулирование хроматина, не превышает плотности потока мощности 2.5 мкВт/см². Важно отметить, что увеличение КГГ связывают с уменьшением функциональной активности хроматина и клетки в целом.

Влияние излучения мобильного телефона на состояние хроматина и мембраны клеток буккального эпителия человека. Полученные в данном подразделе результаты указывают на статистически значимый отклик клеток буккального эпителия человека на излучение мобильного телефона, проявившийся в изменении числа гранул гетерохроматина в ядрах и проницаемости мембран. Наблюдаемые изменения являются качественно подобными и характеризуются пороговым значением времени, не превышающим 1 мин и насыщением при времени экспозиции большем, чем 30 мин. Продолжительность ЭМИ оказывает значительное влияние на отклик клеток, в то время как уровень SAR мобильного телефона практически не вносит вклад в наблюдаемый эффект.

Влияние электрической и магнитной составляющей ЭМИ на состояние хроматина и проницаемость мембран клеток буккального эпителия человека. При облучении клеток ЭМИ с частотой 8 ГГц было зафиксировано изменение количества гранул гетерохроматина и проницаемости мембран относительно контрольного значения. Электрическая составляющая ЭМИ оказывает незначительно преобладающее влияние на увеличение гетерохроматинизации в сравнении с магнитной для всех доноров. Для показателя окрашенности клеток индигокармином при тех же условиях облучения подобной закономерности выявлено не было.

Результаты исследований и дисперсионный анализ ANOVA показали, что параметр КГГ проявил большую чувствительность к изменениям характеристик ЭМИ. Изменение проницаемости клеточных мембран было менее выражено и носило индивидуальный характер для каждого донора. Таким образом, было предположено, что первичной мишенью действия слабого ЭМИ микроволнового диапазона на клеточном уровне является ядерный хроматин. Также следует отметить, что ЭМИ на частоте 3.7 ГГц приводило к наиболее интенсивному росту КГГ, достигающему своего максимума при 10 мин облучении и плотности потока мощности 40 мкВт/см^2 , что будет учтено при подборе условий облучения в следующих главах.

На основании полученных данных было сделано предположение о связи наблюдаемых процессов гетерохроматинизации и возрастания проницаемости мембран с изменениями в электростатических взаимодействиях между ДНК и белками в ядре, а также с перераспределением ионов, индуцированными ЭМИ. В свете данной гипотезы вызывает интерес возможная роль воды и компонентов буферного раствора в рецепции ЭМИ.

Роль воды в рецепции ЭМИ. Исследование производилось с целью выявления возможной роли буферного раствора в первичной рецепции ЭМИ и наблюдаемых клеточных откликах. При помещении клеток в предварительно облученный буферный раствор наблюдались статистически значимые изменения в структуре хроматина и проницаемости клеточных мембран, подобные полученным при непосредственном облучении самих клеток, помещенных в буферный раствор. Было предположено, что вода может рассматриваться как первичный рецептор микроволнового ЭМИ, который в определенной степени вносит вклад в наблюдаемый отклик клетки на ЭМИ.

В целом, имеющиеся экспериментальные данные позволили установить факт действия ЭМИ на клетки буккального эпителия человека, проявляющегося в увеличении КГГ в ядрах клеток, а также проницаемости клеточной мембраны, что связывают со снижением функциональной активности клеток. В главе определены оптимальные параметры ЭМИ по времени экспозиции и мощности излучения, при которых наблюдается значительный отклик исследуемой системы, а также

обсуждены возможные механизмы рецепции ЭМИ.

В **главе 4** рассмотрено комбинированное действие БАС и ЭМИ с частотой 3.7 ГГц на состояние ядра и хроматина и проницаемость мембран клеток буккального эпителия человека. В предыдущей главе на основании полученных данных была выдвинута гипотеза, что ядерный хроматин является основной мишенью действия микроволнового излучения. Следовательно, особый интерес представляют соединения, механизм действия которых обусловлен комплексообразованием с ядерной ДНК. В качестве исследуемых препаратов использовались типичные и сравнительно хорошо изученные ДНК-связывающиеся ароматические БАС: противоопухолевый антибиотик доксорубицин (DOX) и ароматические мутагены профлавин (PF) и бромистый этидий (EB). В качестве тест-системы рассмотрены соединения, не вызывающие биологический эффект путем воздействия на хроматин – кофеин (CAF) и C₆₀ фуллерен.

Индивидуальное действие биологически активных соединений на клетки буккального эпителия человека. В данном подразделе проводилось комплексное исследование изменений электрокинетических свойств ядер и состояния хроматина, а также проницаемости клеточной мембраны, при воздействии исследуемого вещества на клетки буккального эпителия в зависимости от концентрации препаратов и времени экспозиции. Результаты исследования индивидуального влияния ДНК-интеркаляторов показали, что действие исследуемых веществ DOX, EB и PF проявляется на уровне хроматина и клеточного ядра и не проявляется на уровне мембраны. Косвенно это указывает на ДНК-зависимый механизм действия данных препаратов на функциональное состояние клетки. В качестве примера на рис.3 представлены результаты по воздействию DOX при различных концентрациях и времени экспозиции на клетки буккального эпителия.

Максимальные изменения состояния хроматина и электроотрицательности ядер наблюдались при следующих концентрациях: $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л для DOX и $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л для EB и PF и времени 1 час и значительно не менялись при дальнейшем увеличении времени экспозиции.

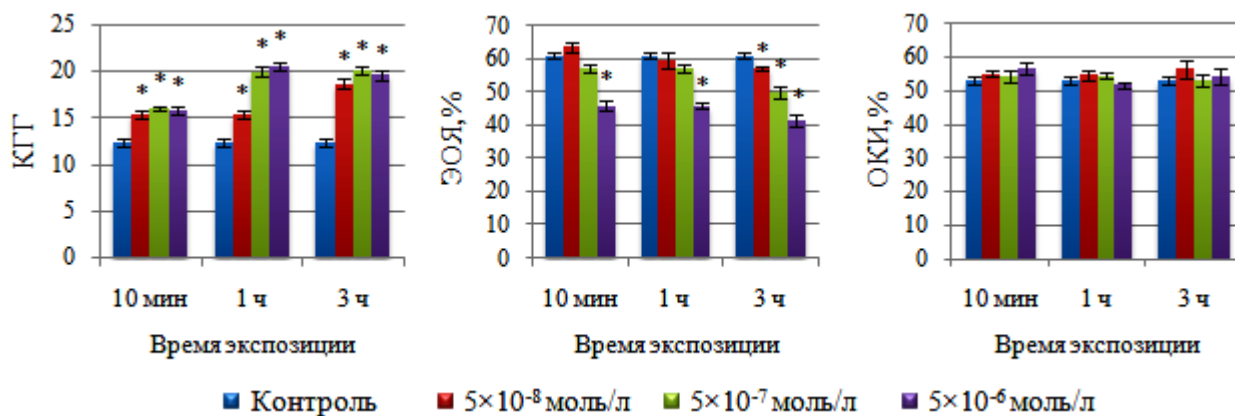


Рис.3. Влияние DOX на состояние ядра (ЭОЯ) и хроматина (КТГ) и проницаемость мембран (ОКИ) клеток буккального эпителия человека; * - статистически значимое отклонение от контрольного значения

Действие фуллерена C_{60} и САФ без ДНК-интеркаляторов не проявилось ни на уровне ядра, ни на уровне мембраны, что косвенно указывает на отсутствие выраженных биологических последствий связывания фуллерена C_{60} и САФ непосредственно с ДНК или другими клеточными компонентами.

Полученные данные позволили в дальнейшем исключить тест на проницаемость мембраны как показатель биологического воздействия исследуемых препаратов.

В целом, анализ индивидуального действия ЭМИ микроволнового диапазона (см. главу 3) и исследуемых ароматических БАС (данный подраздел) показал однонаправленный характер отклика клеток, проявляющийся в увеличении числа гранул гетерохроматина и уменьшении электроотрицательности клеточных ядер.

Комбинированное действие слабого ЭМИ микроволнового диапазона и БАС на состояние хроматина и ядер клеток буккального эпителия человека. При исследовании комбинированного действия ЭМИ с исследуемыми ДНК-связывающимися веществами обнаружен синергетический эффект, заключающийся в уменьшении клеточного отклика, вызываемого ЭМИ и препаратами по отдельности. В качестве примера приведены результаты комбинированного действия ЕВ и ЭМИ (рис.4) из которого следует снижение гранулирования хроматина и увеличение процента ЭОЯ при облучении клеток в присутствии ЕВ.

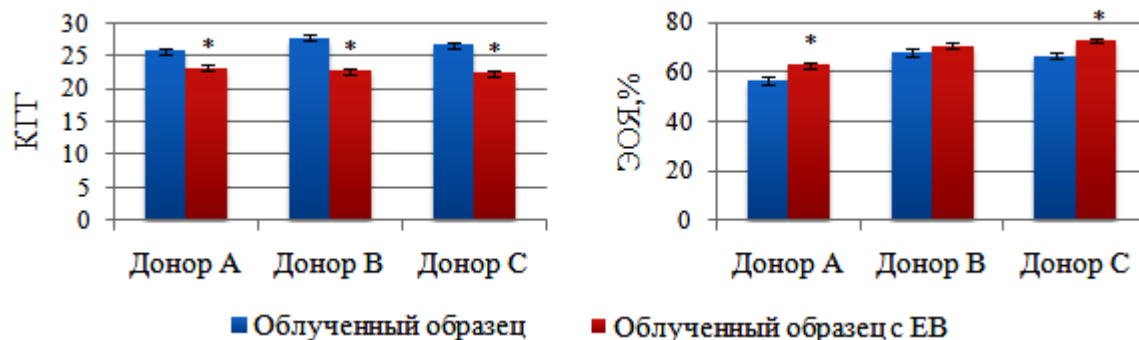


Рис. 4. Изменение количества гранул гетерохроматина (КГГ) и электроотрицательности ядер (ЭОЯ) в клетках буккального эпителия человека при комбинированном воздействии EB и ЭМИ; * - значения, достоверно отличающиеся от показателей для облученного образца

В контексте обнаруженного взаимоподавления эффектов действия ЭМИ и ДНК-связывающихся препаратов, важным является вопрос о возможном взаимодействии ЭМИ с C_{60} фуллереном и САФ, которые, как показали результаты исследования в предыдущем подразделе, не оказывают видимого эффекта на хроматин в отсутствие излучения.

При облучении клеток в присутствии C_{60} фуллерена или САФ наблюдался протекторный эффект веществ по отношению к действию ЭМИ, т.е. восстановление КГГ при облучении клеток в присутствии C_{60} фуллерена или САФ (рис. 5).

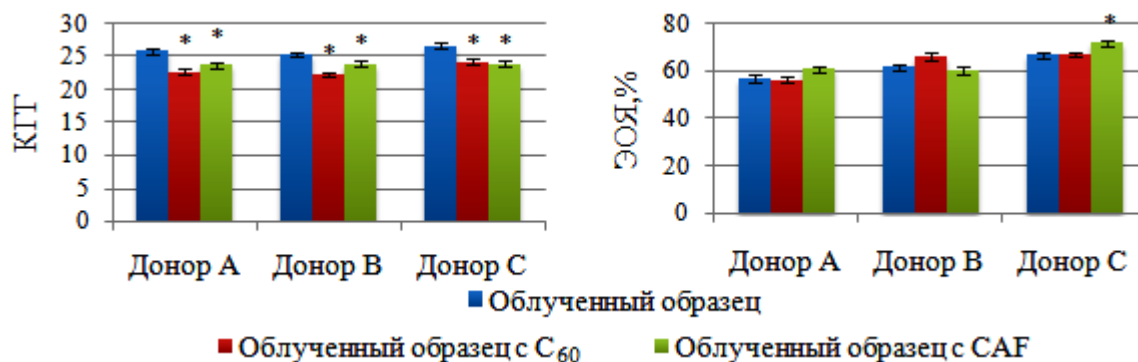


Рис. 5. Изменение количества гранул гетерохроматина (КГГ) и электроотрицательности ядер (ЭОЯ) в клетках буккального эпителия человека при комбинированном воздействии C_{60} фуллерена/САФ и ЭМИ; * - значения, достоверно отличающиеся от показателей для облученного образца

Наличие протекторного действия как у САФ, так и у ДНК-несвязывающегося C_{60} фуллерена, указывает на то, что механизм протекторного эффекта ДНК-связывающихся препаратов DOX, EB и PF, обнаруженный выше, может быть не связан (или лишь частично связан) с их непосредственным комплексообразованием с ДНК. Дополнительное подтверждение данного предположения были получено после изучения изменений оптических плотностей растворов DOX/EB/PF с ДНК

тимуса теленка при облучении ЭМИ. За исключением системы DOX-ДНК, где наблюдалось незначительное уменьшение оптической плотности после облучения ЭМИ, для EB и PF не обнаружено видимого изменения оптической плотности после воздействия ЭМИ. Можно предположить, что наблюдаемый в данном подразделе протекторный эффект может осуществляться не на уровне комплекса Препарат-ДНК, а посредством иных механизмов, одним из которых может быть взаимодействие препаратов с облученной водной средой (см. главу 3).

Полученные в данной главе результаты могут открыть новые перспективы в технологии использования C₆₀ фуллерена и кофеина для уменьшения потенциально генотоксического воздействия ЭМИ.

В главе 5 рассмотрено комбинированное действие ДНК-интеркаляторов (DOX, EB и PF) с молекулами-интерцепторами: фуллереном C₆₀ и САФ. Протекторный эффект, подобный описанному в главе 4, был обнаружен ранее при комбинированном действии перечисленных БАС *in vitro* в различных пролиферирующих клеточных линиях в отсутствие ЭМИ. В данной главе интерес представляет возможный синергизм при комбинированном действии БАС на непролиферирующие клетки буккального эпителия человека, а также возможность количественного описания полученных данных на основании современных представлений о механизмах совместного действия ДНК-связывающихся БАС.

Общие представления о механизмах комбинированного действия ДНК-интеркаляторов. Согласно современным представлениям, в основе механизма комбинированного действия некоторых ароматических ДНК-связывающихся препаратов лежит нековалентное комплексообразование препаратов друг с другом, называемое гетероассоциацией. Регулирующее действие гетероассоциации по отношению к совместному введению в биосистему *in vitro* различных комбинаций ароматических соединений, одно из которых является основным действующим соединением, а другое – молекулой-интерцептором, известно достаточно давно как интерцепторный механизм. Однако изучение механизма такого регулирующего действия усложняется возможным влиянием других молекулярных процессов, из которых наиболее часто рассматривается так называемый протекторный механизм, т.е. конкуренция препаратов за места посадки на ДНК – все это составляет предмет

исследования теории интерцепторно-протекторного действия (ИПД) при комбинированном использовании ДНК-связывающихся препаратов (Evstigneev et al., 2008, 2010). Наиболее хорошо изученным в рамках теории ИПД соединением в настоящее время является САФ, который, являясь ДНК-связывающимся БАС, не оказывает непосредственного влияния на биологическую функцию ДНК, но регулирует действие ДНК-интеркаляторов посредством интерцепторного и протекторного механизма. Важно также отметить выявленный недавно на *in vivo* и *in vitro* уровнях протекторный эффект фуллерена C_{60} по отношению к цитотоксическому действию ароматического антибиотика DOX (Prylutska et al., 2011), интерпретируемый в терминах интерцепторного механизма действия. Роль протекторного механизма в отношении C_{60} фуллерена на данный момент остается под вопросом, так как, согласно имеющимся литературным данным, характеристики связывания C_{60} фуллерена с ДНК в условиях, приближенных к физиологическим, неизвестны.

Обобщая все вышесказанное, был сделан вывод о том, что интерес к изучению комбинаций ДНК-интеркаляторов с молекулами-интерцепторами САФ и фуллереном C_{60} в рамках настоящей работы на клетках буккального эпителия человека обусловлен следующими причинами:

- Молекулы-интерцепторы САФ и C_{60} фуллерен модулируют биологическую активность ДНК-интеркаляторов, по всей видимости, посредством интерцепторного механизма (гетероассоциации) в пролиферирующих клеточных линиях. Если интерцепторный механизм действительно является общезначимым, то возможно ожидать биологический синергизм комбинаций Препарат- C_{60} /САФ на клетках буккального эпителия, которые являются непролиферирующими.

- Если будет обнаружено, что комбинации Препарат- C_{60} /САФ демонстрируют биологический синергизм в клетках буккального эпителия, то следует ожидать количественного соответствия данных биологического эксперимента параметрам межмолекулярного комплексообразования (концентрациям и равновесным константам). Эта ситуация может быть описана в рамках теории ИПД.

Комбинированное действие БАС на состояние ядра и хроматина клеток буккального эпителия человека. При исследовании комбинированного действия

БАС на клетки буккального эпителия человека было обнаружено концентрационно-зависимое восстановление функциональной активности клеточного ядра, подвергнутого воздействию исследуемых ароматических препаратов, при введении чистого фуллерена C_{60} или САФ. Более того, наблюдаемый эффект характеризовался хорошей корреляцией между двумя исследуемыми параметрами: числом гранул гетерохроматина и электроотрицательностью ядер, и был качественно подобным для всех доноров.

В качестве примера на рис. 6 представлены результаты комбинированного действия РФ с C_{60} фуллереном и САФ для клеток одного из доноров (в подписях указаны концентрации C_{60} фуллерена и САФ соответственно). Для каждого препарата наблюдается снижение КГГ от позитивного контроля к негативному, а также восстановление показателя ЭОЯ, с увеличением концентрации C_{60} фуллерена или САФ, что свидетельствует о восстановлении функциональной активности ядра в присутствии молекул-интерцепторов. При этом диапазон изменения значений показателя КГГ для всех препаратов и доноров в среднем в два раза выше, чем показателя ЭОЯ, что указывает на большую чувствительность фактора изменения структуры гетерохроматина, чем электроотрицательности ядра, к действию комбинаций веществ.

Таким образом, был выявлен протекторный эффект молекул-интерцепторов C_{60} фуллерена и САФ по отношению к исследуемым ДНК-интеркаляторам. Более того, наблюдаемый эффект не зависел от индивидуальных особенностей доноров, значит, в целом, характер проявления интерцепторного механизма в непролиферирующих клетках буккального эпителия оказывается подобным тому, что наблюдается в пролиферирующих клеточных линиях. Следовательно, полученный эффект можно рассмотреть в рамках теории ИПД с целью поиска корреляций между данными биологического эксперимента и физико-химическими параметрами комплексообразования (концентрациями и равновесными константами комплексообразования), подобных обнаруженным ранее другими авторами в различных биологических системах.

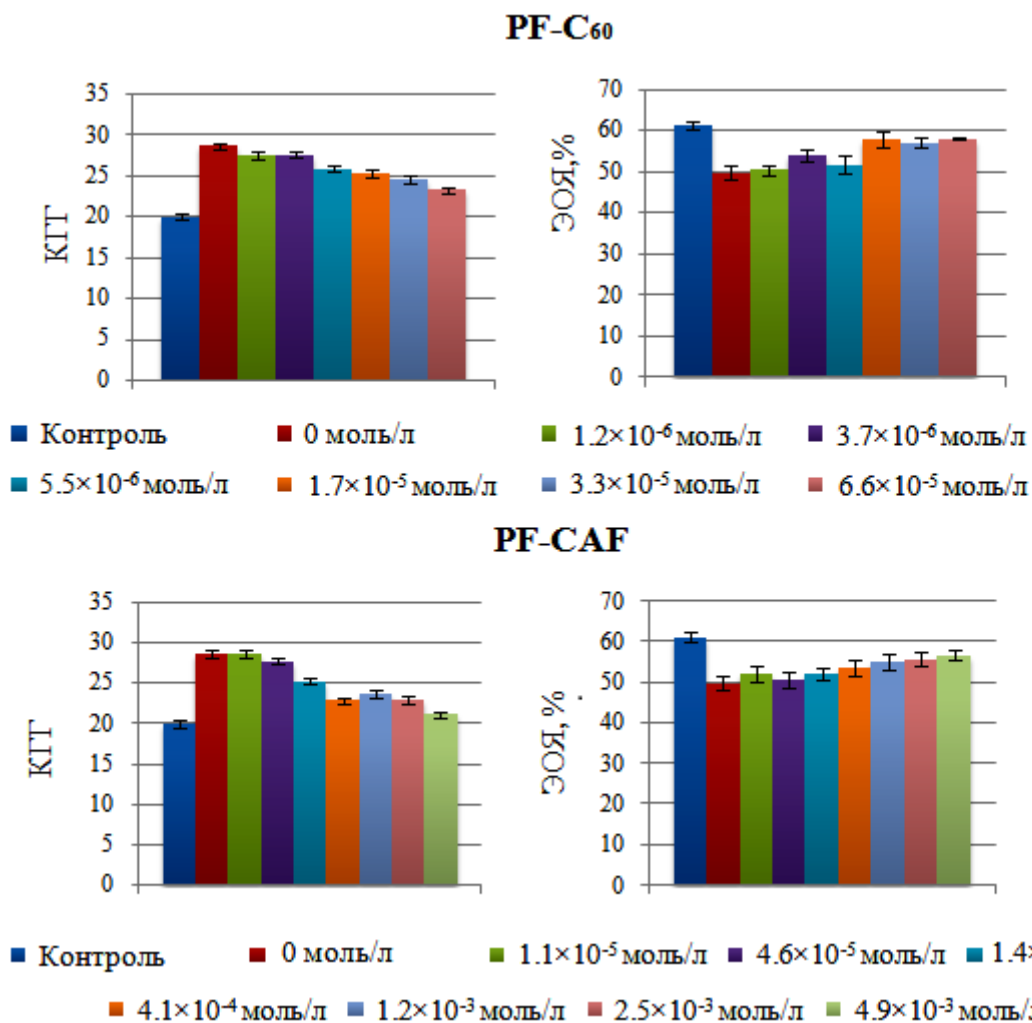


Рис. 6. Влияние PF на состояние ядра (ЭОЯ) и хроматина (КГТ) клеток буккального эпителия человека в присутствии C₆₀ фуллерена или CAF

Анализ результатов комбинированного действия БАС с точки зрения теории ИПД. В данном подразделе рассмотрена возможность существования корреляции данных проведенного выше биологического эксперимента и физико-химических параметров комплексообразования. На основании известных значений констант гетероассоциации Препарат-Фуллерен и Препарат-Кофеин в качестве рабочей гипотезы была допущена возможная роль интерцепторного механизма в наблюдаемых эффектах действия комбинаций Препарат-Фуллерен на состояние хроматина в клетках буккального эпителия.

В основе теории ИПД лежит система уравнений баланса масс и вычисляемый из нее некий фактор A_D , пропорциональный доле вытесненного из ДНК препарата X при введении интерцептора Y , $f_{C(0)}^X - f_C^X$, относительно доли комплексов X -ДНК в отсутствии Y , $f_{C(0)}^X$:

$$A_D = \frac{f_{C(0)}^X - f_C^X}{f_{C(0)}^X}, \quad (1)$$

причем мольные доли f^X в (1) определяются как $f^X = \frac{K_{XN}x_1N_1}{x_0}$, где K_{XN} – равновесная константа комплексообразования X с ДНК; x_1 , x_0 – концентрации свободного препарата X и полная концентрация X в системе; N_1 – концентрация свободных для связывания X участков ядерной ДНК (N_0 – общая концентрация). Считается, что в такой формулировке фактор A_D пропорционален изменению некоторого измеряемого *in vitro* биологического параметра (в данном случае КГГ, как наиболее чувствительного к изменению состояния клеток параметра) по отношению к контролю, что было доказано ранее другими авторами на лейкемических клеточных линиях (Evstigneev et al., 2006, 2008, 2010).

Для составления системы уравнений баланса масс и нахождения концентраций x_1 , N_1 , использовалась упрощенная модель действия комбинации веществ Препарат-Интерцептор на ДНК в предположении малых концентраций препарата x_0 и 1:1 стехиометрии гетероассоциации X - Y :

$$\begin{cases} x_0 = x_1 + K_{XN}x_1N + K_h x_1 y_1 \\ y_0 = y_1 + K_{YN}y_1N + K_h x_1 y_1, \\ N_0 = N + K_{XN}x_1N + K_{YN}y_1N \end{cases} \quad (2)$$

где y_1 и y_0 – концентрация интерцептора, не связанного с препаратом, и его общая концентрация; K_h , K_{YN} – константа гетероассоциации X - Y и равновесная константа комплексообразования Y с ДНК соответственно. Концентрации x_0 , N_0 соответствуют т.н. «квазифизиологическим» условиям, определенным в (Evstigneev et al., 2008). Параметры K_h , K_{XN} , K_{YN} берутся из литературных данных. Такой подход ранее подтвердил свое соответствие данным *in vitro* эксперимента в системах Препарат-Ксантин (Evstigneev et al., 2008).

Для начала рассмотрим систему Препарат- C_{60} фуллерен, в которой отсутствует протекторный механизм ($K_{YN}=0$). Следует учесть тот факт, что общая концентрация доступных для связывания участков ядерной ДНК N_0 мала и имеет порядок 10^{-6} - 10^{-5} моль/л, а порядок использованных в эксперименте концентраций C_{60} фуллерена y_0 большой и составляет 10^{-5} - 10^{-4} моль/л. При этом сродство рассматриваемых препаратов к ДНК и к C_{60} фуллерену соизмеримо и имеет порядок

$K_h \sim K_{XN} \sim 10^4 - 10^5$ моль⁻¹. Из этого следует, что значительно большая часть препарата X находится в комплексах с фуллереном C₆₀, по сравнению с комплексами с ДНК, в связи с чем слагаемым $K_{XN}x_1N_1$ в уравнениях (2) можно в первом приближении пренебречь. Кроме этого, следует учесть малость использованных в эксперименте концентраций препаратов $x_0 \sim 10^{-6} - 10^{-5}$ моль/л, следовательно, $K_h x_1 \ll 1$. Совокупность указанных допущений позволяет редуцировать систему уравнений (2) к виду $N_0 \approx N_1$,

$$x_1 = \frac{x_0}{1 + K_h y_1}, \quad y_0 \approx y_1, \quad \text{откуда, с учетом (1), вытекает приближенное выражение для}$$

фактора A_D :

$$A_D \approx \frac{K_h y_0}{1 + K_h y_0} \quad (3)$$

Оценка экспериментальных значений фактора A_D при всех исследованных концентрациях фуллерена C₆₀ производилась путем расчета изменения измеряемого в эксперименте ряда значений КГГ в присутствии фуллерена C₆₀ по отношению к значению этого параметра в отсутствии фуллерена C₆₀, но при одних и тех же концентрациях препарата:

$$A_D = \frac{N_C - N_i}{N_C - N_0} \quad (4)$$

где N_C и N_0 – показатель КГГ в присутствии препарата и в его отсутствии (контроле), соответственно, N_i - КГГ при постоянной концентрации препарата и варьируемой концентрации C₆₀ фуллерена.

На рис. 7 в качестве примера представлены экспериментальные (пересчитанные по формуле (4)) и теоретически рассчитанные (по формуле (3)) значения фактора A_D для системы DOX - C₆₀ фуллерен.

Анализ полученных результатов показал, что экспериментальные зависимости количества гранул гетерохроматина от концентрации C₆₀ фуллерена в присутствии ДНК-интеркаляторов для всех доноров удалось достаточно хорошо описать в рамках теории ИПД в предположении доминирования в наблюдаемых биологических эффектах интерцепторного механизма, т.е. нековалентного комплексообразования (гетероассоциации) препарата с C₆₀ фуллереном.

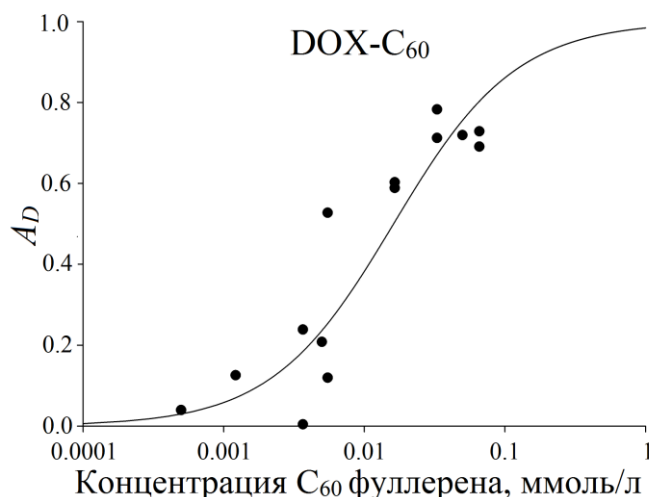


Рис.7. Зависимость фактора A_D в системе «DOX - C_{60} » от концентрации фуллерена C_{60} (экспериментально измеренный A_D для трех доноров (точки); расчетный A_D (сплошная кривая, $K_h=61.9 \cdot 10^3$ моль $^{-1}$)

Независимая проверка возможности применения теории ИПД к результатам, полученным на клетках буккального эпителия человека, была также проведена на примере наиболее хорошо изученной в рамках теории ИПД системы Препарат-CAF (DOX/EB/PF-CAF) на основании измеренных данных по параметру КГГ, обсужденных выше. При концентрации CAF ≈ 5 ммоль/л (при которой, согласно литературным данным, обнаружен выраженный протекторный эффект) наблюдалось хорошее качественное совпадение результатов теоретического предсказания и эксперимента (кроме DOX), причем исключение протекторного механизма, как и следовало ожидать, несколько ухудшало качество совпадения теории и эксперимента.

В целом полученные результаты указывают на существование единого молекулярного процесса (в данном случае - гетероассоциации), который осуществляет регуляцию наблюдаемого *in vitro* изменения биологического эффекта ароматических препаратов при введении в биосистему молекул-интерцепторов на примере непрролиферирующей клеточной линии буккального эпителия человека. Так как наблюдаемый в данной работе эффект наиболее вероятно происходит на уровне клеточного ядра и хроматина и практически не зависит от индивидуальных особенностей доноров, как уже было отмечено выше, существует возможность, что он также не зависит от типа исследуемой клеточной системы. Для подтверждения данного предположения в следующем подразделе рассмотрено комбинированное действие БАС на биолюминесцентные бактерии.

Индивидуальное и комбинированное действие БАС на биолюминесценцию культуры светящихся бактерий *P. leiognathi* Sh1. Исследование индивидуального действия препаратов на люминесцентные бактерии показало разнонаправленный характер влияния мутагенных веществ: САФ и ЕВ приводили к значительному возрастанию интенсивности бактериального свечения, РF – к полному её тушению. Был сделан вывод о том, что реакция бактериальной культуры на ароматические мутагены в виде изменения биолюминесценции является результатом совместного действия токсического и мутагенного эффектов, причем при близких значениях молярных концентраций в тесте на хроническое действие РF проявляет токсические свойства, а ЕВ – мутагенные.

При комбинированном воздействии исследуемыми ДНК-интеркаляторами (РF и ЕВ) на культуру светящихся бактерий *P. leiognathi* Sh1 был обнаружен концентрационно-зависимый протекторный эффект действия САФ на биолюминесценцию, заключающийся в восстановлении биолюминесцентного сигнала при введении САФ (рис. 8) и соответствующий результатам, полученным на непродлиферирующих клетках буккального эпителия человека. Следовательно, наблюдаемый на двух клеточных линиях с помощью различных методик эффект комбинированного воздействия БАС подтверждает выдвинутое ранее предположение, что в основе наблюдаемого эффекта, по-видимому, лежит единый механизм: нековалентное комплексообразование (гетероассоциация) препарата с молекулами-интерцепторами.

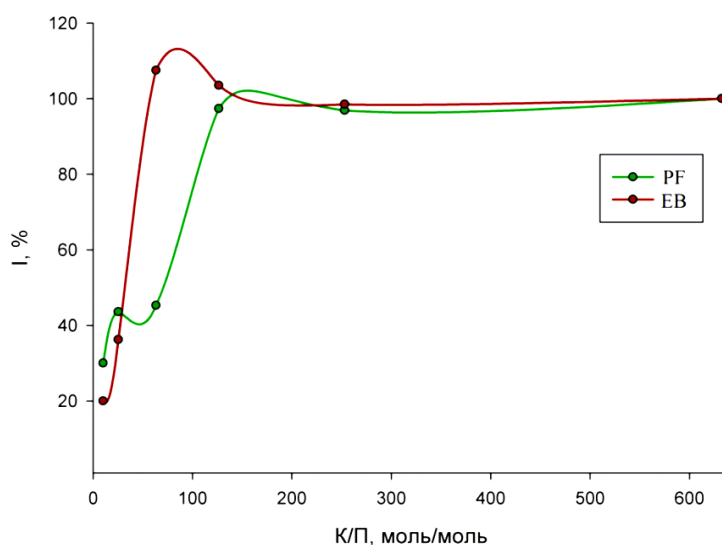


Рис. 8. Острое действие РF и ЕВ в присутствии САФ (по оси Y: I – процентное отношение интенсивности биолюминесценции в присутствии вещества к контролю; по оси X: К/П – соотношение кофеин/препарат, моль/моль)

Данные проведенных исследований дают основание утверждать, что биолюминесценция нативных светящихся бактерий, а также изучение электрокинетических свойств ядер и состояния хроматина, проведенное на клетках буккального эпителия человека, являются достаточно хорошими показателями биологического эффекта ароматических БАС и их комбинаций.

ВЫВОДЫ

В настоящей работе выполнено комплексное исследование изменения электрокинетических свойств ядер и состояния хроматина, а также проницаемости мембран клеток буккального эпителия человека, подверженных комбинированному действию слабого микроволнового излучения (900 МГц, 3.7 ГГц, 8 ГГц) и биологически активных соединений: ароматических ДНК-интеркаляторов (доксорубицина, бромистого этидия, профлавина), кофеина и C_{60} фуллерена.

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Установлен характер реакции клеток буккального эпителия на электромагнитное излучение различных характеристик: излучение рабочей частоты WiMAX (3.7 ГГц) с варьируемыми мощностью и временем экспозиции, излучение мобильных телефонов (900 МГц) с различными уровнями SAR, а также отклик клеток на электрическую и магнитную составляющую ЭМИ на частоте 8 ГГц по отдельности. Наблюдалась выраженная конденсация хроматина и увеличение проницаемости клеточной мембраны как функции времени экспозиции с характерным порогом и областью насыщения. При этом электрическая составляющая электромагнитного поля оказывает большее влияние на увеличение гетерохроматинизации в сравнении с магнитной.

2. Введение в клетки ароматических ДНК-интеркаляторов приводит к конденсации хроматина и снижению электроотрицательности клеточных ядер, при этом действие кофеина и ДНК-несвязывающегося C_{60} фуллерена видимых изменений состояния хроматина и электрокинетических свойств ядер не вызывало. Влияния всех исследуемых препаратов на проницаемость клеточной мембраны обнаружено не было.

3. При исследовании комбинированного действия электромагнитного излучения с ДНК-связывающимися веществами обнаружен синергетический протекторный эффект, заключающийся в уменьшении клеточного отклика, вызываемого электромагнитным излучением и препаратами по-отдельности. При действии C_{60} фуллерена и кофеина также наблюдался протекторный эффект по отношению к действию электромагнитного излучения на хроматин клеток буккального эпителия человека. На основании полученных результатов был сделан вывод о том, что возможный механизм наблюдаемых эффектов не связан непосредственно с комплексообразованием Препарат-ДНК, а может осуществляться посредством взаимодействия препаратов с облученной водной средой.

4. При комбинированном воздействии ДНК-интеркаляторов на непролиферирующие клетки буккального эпителия выявлено концентрационно-зависимое восстановление функциональной активности клеточного ядра при введении немодифицированного C_{60} фуллерена или кофеина. Полученные экспериментальные зависимости количества гранул гетерохроматина от концентрации C_{60} фуллерена или кофеина хорошо описываются в рамках теории интерцепторно-протекторного действия, в основе которой лежит представление о двух молекулярных процессах: интерцепторном (гетероассоциации) и протекторном.

5. Обнаружено концентрационно-зависимое восстановление клеточного отклика при действии комбинаций Интеркалятор-Кофеин на пролиферирующую культуру светящихся бактерий *P. leiognathi* Sh1. Показано, что наблюдаемый эффект подобен тому, что обнаружен в системах Интеркалятор-Кофеин на непролиферирующих клетках буккального эпителия, что указывает на существование единого механизма комбинированного действия ароматических соединений, в основе которого лежит нековалентное комплексообразование препаратов друг с другом и с ДНК.

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ

1. **Скамрова, Г.Б.** Влияние микроволнового излучения на частотах мобильной связи и сети wimax на проницаемость мембран клеток буккального эпителия человека / Скамрова Г.Б., Евстигнеев М.П., Лантушенко А.О., Лукьянчук Г.А., Саламатин В.В., Шкорбатов Ю.Г. // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2011. – Т. 24(63). – № 4. – С. 282-291.

2. **Скамрова, Г.Б.** Влияние электрической и магнитной составляющей электромагнитного поля на проницаемость мембран и состояние хроматина в ядрах клеток буккального эпителия человека / Скамрова Г.Б., Евстигнеев М.П., Трушкин А.Н., Шкорбатов Ю.Г. // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012. – Т. 25(64). – № 3. – С. 187-195.

3. **Skamrova, G.B.** Influence of Mobile Phone Radiation on Membrane Permeability and Chromatin State of Human Buccal Epithelium Cells / G.B. Skamrova, A.O. Lantushenko, Y.G. Shckorbatov, M.P. Evstigneev // Biochemistry and Biophysics. – 2013. – V. 1. – № 2. – P. 22-28.

4. **Скамрова, Г.Б.** Комбинированное воздействие электромагнитного излучения, ДНК-интеркаляторов и C60 фуллерена на клетки буккального эпителия человека / Г.Б. Скамрова, Ю.И. Прилуцкий, М.П. Евстигнеев // Биотехнология. – 2014. – Т. 7. - № 2. – С. 54-62.

5. **Skamrova, G.B.** Interceptor effect of C60 fullerene on the in vitro action of aromatic drug molecules / G.B. Skamrova, I.V. Laponogov, A.S. Buchelnikov, Y.G. Shckorbatov, S.V. Prylutska, U. Ritter, Y.I. Prylutskyu, M.P. Evstigneev // European Biophysics Journal. – 2014. – P. 1-12.

6. **Скамрова, Г.Б.** Влияние микроволнового излучения на частотах мобильной связи и сети WIMAX на проницаемость мембран клеток буккального эпителия человека / Г.Б. Скамрова, А.О. Лантушенко // VII Междунар. науч.-технич. конфер. «Актуальные вопросы биологической физики и химии "БФФХ–2011"», Севастополь, 26-30 апреля 2011 г. - Севастополь, 2011. - С. 69-70.

7. **Скамрова, Г.Б.** Влияние излучения мобильного телефона на состояние мембран и хроматина клеток буккального эпителия человека / Г.Б. Скамрова, М.П.

Евстигнеев, А.О. Лантушенко, Ю.Г. Шкорбатов // VIII Междунар. науч.-технич. конфер. «Актуальные вопросы биологической физики и химии "БФФХ–2012"», Севастополь, 23-27 апреля 2012 г. - Севастополь, 2012. - С. 38-40.

8. Рубакина, В.А. Влияние электрической и магнитной составляющей электромагнитного поля на проницаемость мембран и состояние хроматина в ядрах клеток буккального эпителия человека / В.А. Рубакина, **Г.Б. Скамрова**, А.Н. Трушкин // IX Междунар. науч.-технич. конфер. «Актуальные вопросы биологической физики и химии "БФФХ–2013"», Севастополь, 22-26 апреля 2013 г. - Севастополь, 2013. - С. 46-47.

9. Gavrilov, P.E. Investigation of the nuclei electronegativity in human cells by the method of microelectrophoresis/ P.E. Gavrilov, **G.B. Skamrova**, I.V. Laponogov // IX Междунар. науч.-технич. конфер. «Актуальные вопросы биологической физики и химии "БФФХ–2013"», Севастополь, 22-26 апреля 2013 г. - Севастополь, 2013. - С. 58-59.

10. **Скамрова, Г.Б.** Интерцепторное действие фуллерена C₆₀ на клетки буккального эпителия человека в присутствии доксорубина / Г.Б. Скамрова, М.П. Евстигнеев, Ю.И. Прилуцкий // Материалы Междунар. науч.-мет. конф. «Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы». Воронеж (Россия). - Воронеж, 2013. - С. 155-158.

11. Кацев, А.М. Изучение биологического действия комбинаций ДНК-интеркаляторов с кофеином на люминесцентные бактерии / А.М. Кацев, **Г.Б. Скамрова**, М.П. Евстигнеев // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2014. – Т. 27(66). – № 2. – С. 186-195.

Работы № 3, 4, 5 опубликованы в изданиях, соответствующих списку ВАК РФ.

Подписано в печать ____._.__.2014. Формат 60x84/16. Усл печ. л. 1,6.
Бумага офсетная. Печать офсетная.
Тираж 100 экз. Заказ № 14.

Издательство СевНТУ,
299053, г. Севастополь, ул. Университетская, 33, Студгородок, НМЦ
т. (0692)253-210