

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ УЛЬТРАШИРОКОПОЛОСНОГО ИМПУЛЬСНОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА СОСТОЯНИЕ ХРОМАТИНА В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Кузнецов К.А., Пасюга В.Н., Магда И.Ю., *Казанский О.В.,
*Иванченко Д.Д., *Колчигин Н.Н., Шкорбатов Ю.Г.

Научно-исследовательский институт биологии
Харьковского национального университета им. В.Н.Каразина, г. Харьков, Украина,
e-mail: shckor@univer.kharkov.ua;
*Кафедра теоретической радиофизики
Харьковского национального университета им. В.Н.Каразина, г. Харьков, Украина,
e-mail: Nikolay.N.Kolchigin@univer.kharkov.ua

Клетки буккального эпителия человека обрабатывали ультраширокополосным импульсным излучением с помощью целевой антенны в течение 1, 10, 100 и 1000 с. Плотность мощности излучения, действовавшего на клетки, варьировала от 10^{-6} до 10^{-2} Вт/см². Облучение приводило к конденсации хроматина в ядрах клеток. Изменение продолжительности облучения существенно не влияло на степень гетерохроматинизации. В случае прерывистого облучения эффекта конденсации хроматина не наблюдалось. Отмечены различия в реакции клеток различных доноров на облучение.

Ключевые слова: гетерохроматин, эухроматин, клеточное ядро, буккальный эпителий, UWB, электромагнитное излучение.

Введение

Считается, что применение при гипертермии злокачественных опухолей ультраширокополосного импульсного излучения (Ultrawideband and Ultrashort Impulse Signals, UWB) дает некоторые преимущества перед узкополосным микроволновым излучением [1]. Однако биологические эффекты UWB пока не исследованы полностью, и продолжается накопление опытных данных.

Ряд исследований у различных экспериментальных животных посвящен изучению последствий воздействия UWB на сердечно-сосудистую и нервную системы, онко- и тератогенез, а также на его генетическую токсичность [3]. Митогенные эффекты UWB были выявлены на гепатоцитах мышей AML-12: установлена достоверная ($p < 0,05$) дозовая зависимость жизнеспособности клеток от облучения.

Использование вестерн-блоттинга лизата гепатоцитов позволило установить повышение содержания белка циклина-А как признак активизации пролиферативных процессов [2]. Было обнаружено отсутствие изменений в росте и жизнеспособности клеток CL-S1 при обработке импульсами UWB с частотой 1 кГц и шириной импульса 10 нс в течение 0,25–3 часа, однако воздействие теми

же импульсами в течении более длительного периода (4–6 часов) привело к значительному увеличению темпов пролиферации [7].

В наших предыдущих исследованиях наблюдались значительная конденсация хроматина в ядрах клеток буккального эпителия человека под влиянием UWB с плотностью мощности 10^{-3} Вт/см² в течение 10 с и восстановление этих изменений через два часа [4].

Состояние хроматина было выбрано как показатель реакции клетки на облучение по следующей причине. Хроматин представляет собой комплекс ДНК и белков и может находиться в клеточном ядре в виде эухроматина – деконденсированной и функционально активной формы, и гетерохроматина – конденсированной и малоактивной. Состояние хроматина может быть оценено цитологическим методом [5] и характеризует клеточный ответ на внешние воздействия. Реакция гетерохроматинизации является характерным неспецифическим ответом клетки на стрессовое воздействие, в частности, в изолированных клетках количество гранул гетерохроматина повышается при действии на клетку неблагоприятных факторов: ультрафиолетового света и света гелий-неонового лазера, микро-

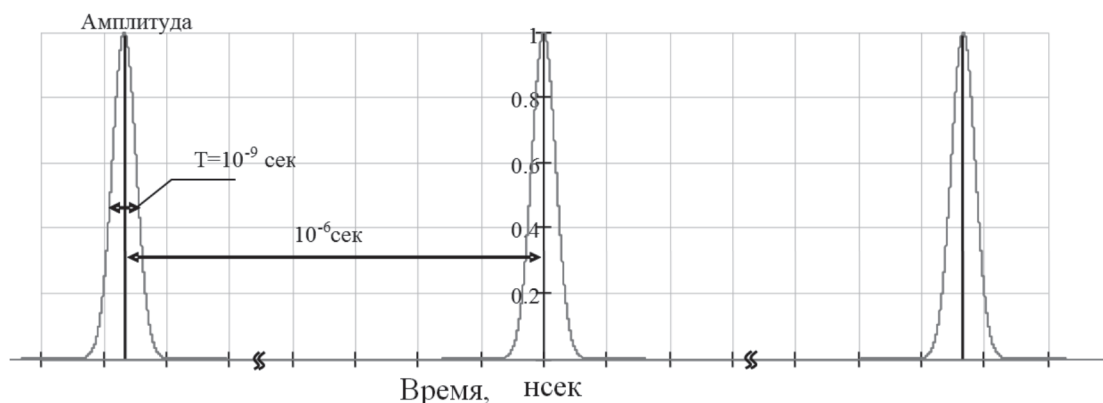


Рис.1. Временная форма сигнала (частота следования импульсов – 1 МГц)

волнового излучения и магнитного поля, с также ряда токсических веществ, например ингибиторов синтеза РНК и белка [6]. Состояние утомления, вызванное физической нагрузкой, также сопровождается повышением количества гранул гетерохроматина в клетках буккального эпителия донора [6]. Клетки буккального эпителия были взяты как экспериментальный объект в наших экспериментах по нескольким причинам. Во-первых, эти клетки обладают крупным ядром (порядка 10 мкм) с хорошо структурированным хроматином и, вследствие этого, удобны для микроскопического исследования, во-вторых, взятие клеток (соскоб тупым стерильным шпателем) совершенно безболезненно и бескровно и, наконец, клетки хорошо переживают вне организма в течение нескольких часов без изменений измеряемого нами показателя.

В настоящей работе мы исследовали эффекты воздействия UWB на клетки буккального эпителия при изменении различных параметров режима облучения – плотности мощности, длительности облучения, а также наличия коротких перерывов в облучении.

Материалы и методы исследований

В качестве экспериментального объекта использовались клетки буккального эпителия человека (клетки слизистой оболочки ротовой полости, выстилающие внутреннюю поверхность щеки). В эксперименте приняли участие 13 доноров-добровольцев, проинформированных о методике взятия клеток эпителия и о целях эксперимента. Клетки собирали с поверхности слизистой щеки тупым шпателем и помещали в 3,03 мМ фосфатный буфер (рН = 7,0) с добавлением 2,89 мМ CaCl₂. В данном растворе клетки способны храниться до 6 часов без изменения состояния хроматина в ядрах.

10 мкл клеток, суспендированных в описанном выше буферном растворе, помещали на по-

кровном стекле на излучающую щелевую антенну генератора UWB с набором разделителей мощности, специально подобранным для облучения клеток.

Генератор формировал последовательность импульсов гауссовой формы (Рис. 1) с амплитудой по напряжению 25 В и длительностью импульса на половине амплитуды 500 пс. Частота повторения импульсов 1 МГц.

Плотность мощности определялась путем экспериментального измерения уровня излученного сигнала на поверхности излучателя с расположенным на нем покровным стеклом, куда впоследствии помещался образец – капля суспензии клеток объемом 10 мкл.

Плотность мощности излучения, действовавшего на клетки, составляла 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³ или 10⁻² Вт/см². Поверхностная плотность мощности излучения, используемой в эксперименте, значительно выше уровня напряженности электромагнитного поля в промышленно развитых странах, который может достигать в крупных городах уровня 2,4×10⁻⁷ Вт/м², однако уровень ЭМП в сельской местности значительно ниже – 1,6×10⁻¹⁰ Вт/м² [8]. Клетки подвергали действию непрерывного облучения в течение 1, 10, 100 и 1000 с.

В части опытов на клетки воздействовали UWB с плотностью мощности 10⁻⁴ Вт/см² в течение 10 с, причем облучение клеток производилось с несколькими интервалами: оно прерывалось на равные временные промежутки 1, 2 и 4 раза, с учетом перерывов в облучении общее время обработки клеток составляло 1 мин. или 10 мин. Например, если общее время обработки составляло 1 мин. и прерывалось 1 раз, облучение проводилось 2 раза по 5 с, интервал между облучениями составлял 50 с; если облучение прерывалось 2 раза, проводили 3 облучения в такой последовательности: 3 с, 4 с, 3 с, перерывы между облучениями составляли по 25 с; если облучение пре-

рывалось 4 раза, проводилось 5 облучений по 2 с при паузах между ними по 12 с. Если же общее время облучения составляло 10 мин., а облучение прерывалось 1 раз, проводилось два облучения по 5 с, интервал между облучениями составлял 4 мин. 50 с; если облучение прерывалось 2 раза, проводили 3 облучения в такой последовательности: 3 с, 4 с, 3 с, перерывы между облучениями составляли по 4 мин. 55 с; если же облучение прерывалось 4 раза, проводилось 5 облучений по 2 с при паузах между ними по 2 мин. 27 с.

Подсчет содержания гранул гетерохроматина (СГГ) в ядрах контрольных клеток по методике, описанной ранее [5] производили в клетках, окрашенных орсеином (2 % раствор орсеина в 45 % уксусной кислоте) при увеличении $\times 600$. В клетке определяли значение СГГ, затем определяли среднее значение СГГ в 30 ядрах и стандартное отклонение от среднего [5], затем данные для каждого эксперимента усредняли по трем независимым повторностям, эксперимент проводили в разные дни, то есть в каждом варианте эксперимента исследовали 90 ядер В контроле за время эксперимента (около 2 часов) значимых изменений СГГ не наблюдалось. Пробы облученных клеток окрашивали орсеином с одновременной фиксацией сразу после воздействия UWB. На 10 мкл суспензии клеток брали 10 мкл красителя.

Результаты и обсуждение

В разделе представлены не все полученные результаты, для иллюстрации полученных результатов представлены типичные данные.

Во многих случаях клетки доноров реагировали на воздействие UWB увеличением числа гранул хроматина в ядрах по сравнению с контролем. Типичные данные, полученные при одном из сочетаний условий облучения на клетках 11 доноров, представлены в табл. 1.

Из приведенных данных видно, что облучение вызывает значительное повышение показателя СГГ в клетках всех обследованных доноров.

В среднем, реакция клеток на облучение UWB развивается преимущественно по типу реакции порогового, триггерного типа. Так, опытные данные,



Рис. 1. Содержание гранул гетерохроматина (СГГ) в ядрах клеток донора С после воздействия UWB с различной плотностью мощности (10^{-3} и 10^{-2} Вт/см²) и продолжительностью (1, 10 и 100 с). Здесь и на нижеследующих рисунках значимое отличие от контроля ($p > 0,95$) отмечено звездочкой.

полученные на клетках донора С (рис. 1), говорят о том, что при плотности мощности излучения 10^{-2} Вт/см² величина СГГ не зависит от времени облучения, хотя при меньшей интенсивности воздействия такая зависимость имеет место.

С другой стороны, при постоянной продолжительности облучения и различной его интенсивности реакция клеток может начать проявляться, как в случае доноров В и С, лишь начиная с плот-

Таблица 1

Изменение показателя СГГ в клетках буккального эпителия человека после облучения UWB с плотностью мощности 10^{-3} Вт/см² и продолжительностью 10 с.

Донор	Возраст, пол		СГГ, контроль	СГГ, опыт
А	17	женск.	14,5±0,45	21,2±0,67
В	19	мужск.	16,3±0,69	22,6±0,78
С	20	мужск.	15,6±0,49	21,9±0,64
Д	25	мужск.	15,6±0,49	22,9±0,76
Е	26	мужск.	15,8±0,52	17,2±0,68
Ф	35	мужск.	16,8±0,58	22,7±0,69
Г	37	женск.	16,9±0,51	22,0±0,74
Н	43	женск.	16,9±0,58	22,5±0,72
О	50	мужск.	16,4±0,40	22,4±0,60
Р	52	мужск.	16,7±0,60	23,0±0,66
Q	53	мужск.	17,3±0,55	22,0±0,64

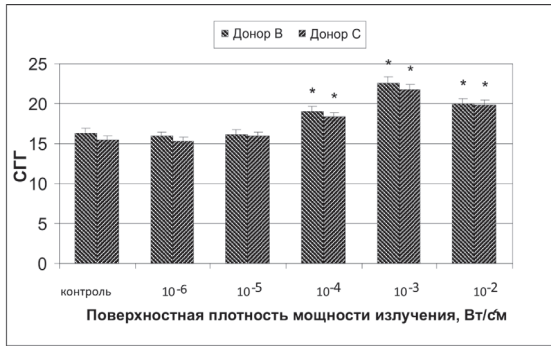


Рис. 2. Содержание гранул гетерохроматина (СГГ) в ядрах клеток доноров В и С после воздействия UWB с различной плотностью мощности (10^{-6} – 10^{-2} Вт/см²) и продолжительностью 10 с.

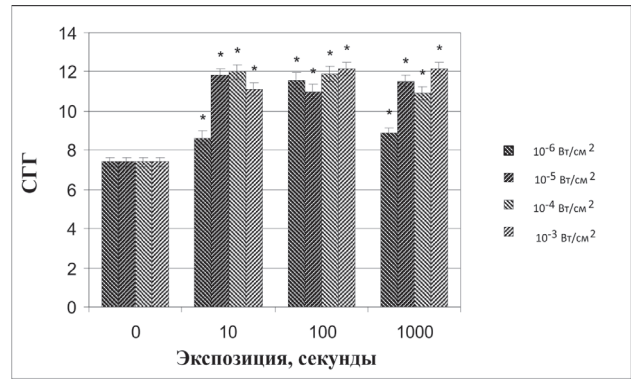


Рис. 3. Содержание гранул гетерохроматина (СГГ) в ядрах клеток донора R после воздействия UWB различной интенсивности (10^{-6} – 10^{-3} Вт/см²) и продолжительности (10, 100 и 1000 с).

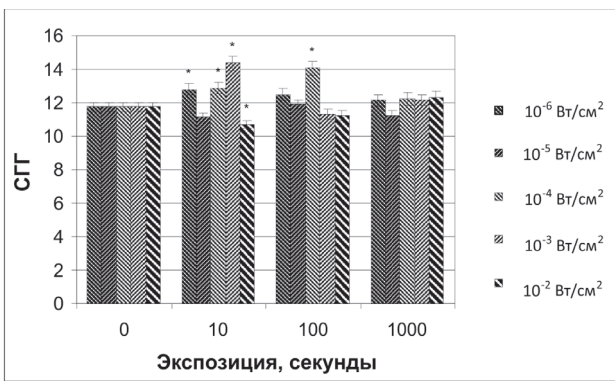


Рис. 4. Содержание гранул гетерохроматина (СГГ) в ядрах клеток донора S после воздействия UWB различной интенсивности (10^{-6} – 10^{-2} Вт/см²) и продолжительности (10, 100 и 1000 с).

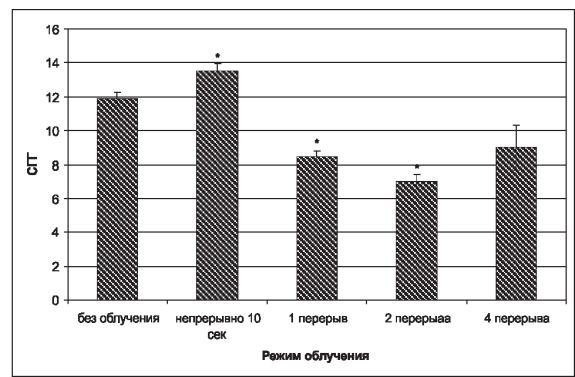


Рис. 5. Содержание гранул гетерохроматина (СГГ) в ядрах клеток донора R после воздействия UWB с плотностью мощности 10^{-4} Вт/см² и продолжительностью 10 с. Облучение прерывалось на равные временные промежутки 1, 2 и 4 раза в течение 1 мин.

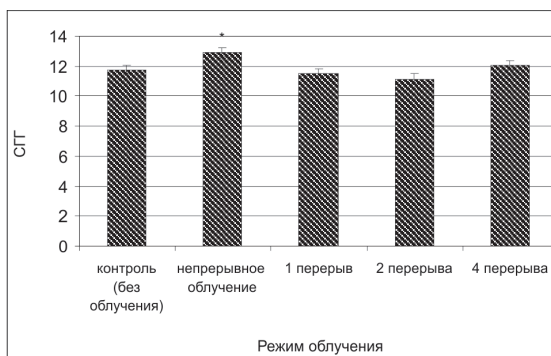


Рис. 6. Содержание гранул гетерохроматина (СГГ) в ядрах клеток донора S после воздействия UWB с плотностью мощности 10^{-4} Вт/см² и продолжительностью 10 с. Облучение прерывалось на равные временные промежутки 1, 2 и 4 раза в течение 1 мин.

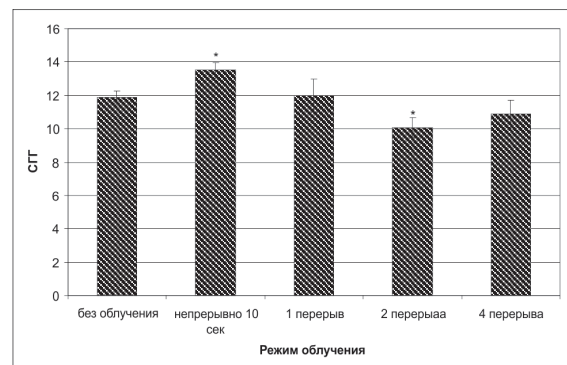


Рис. 7. Содержание гранул гетерохроматина (СГГ) в ядрах клеток донора R после воздействия UWB с плотностью мощности 10^{-4} Вт/см² и продолжительностью 10 с. Облучение прерывалось на равные временные промежутки 1, 2 и 4 раза в течение 10 мин.

ности мощности 10^{-4} Вт/см²; при меньшей интенсивности эта реакция отсутствует, и величина СГГ не отличается от уровня контроля (рис. 2).

Вместе с тем нередко реакция клеток на UWB носит индивидуальный характер. Как видно на рис. 3, клетки донора R отреагировали на облучение при всех уровнях плотности мощности от 10^{-6} до 10^{-3} Вт/см². При этом UWB в интервале от 10^{-5} до 10^{-3} Вт/см² вызвало приблизительно одинаковый эффект, а увеличение продолжительности облучения от 10 до 1000 с не привело к значительным изменениям клеточной реакции.

Такие результаты могут быть связаны с «триггерным эффектом» UWB по отношению к некоторым внутриклеточным процессам. Как известно, реакция клеток на неблагоприятные факторы (УФ-излучение, ингибиторы метаболизма и т.п.) связана с формированием гранул гетерохроматина в ядре [6]; клеточная реакция на UWB также может быть связана с неспецифическим стрессовым ответом.

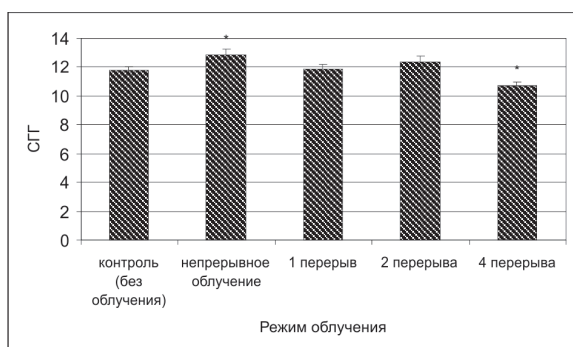


Рис. 8. Содержание гранул гетерохроматина (СГГ) в ядрах клеток донора S после воздействия UWB с плотностью мощности 10^{-4} Вт/см² и продолжительностью 10 с. Облучение прерывалось на равные временные промежутки 1, 2 и 4 раза в течение 10 мин.

Клетки донора S также отреагировали на облучение UWB ростом показателя СГГ (рис. 4), но не так, как клетки донора R: это увеличение произошло в случаях 10-секундного облучения с плотностями мощности 10^{-6} , 10^{-4} и 10^{-3} Вт/см², а после облучения в течение 100 с - только при плотности мощности 10^{-4} Вт/см². Примечательно, что наиболее длительное облучение (1000 с) не вызвало значимых изменений клеточной реакции.

Таким образом, количественное и даже качественное проявление клеточных реакций на действие UWB у разных доноров может существенно различаться. При повторных измерениях индивидуальные особенности в реакции клеток каждого донора на облучение сохранялись. Каких-либо корреляций, связанных с возрастом или полом, в

реакции СГГ на облучение мы не наблюдали, хотя сам по себе показатель СГГ в контроле достоверно коррелирует с возрастом донора (коэффициент линейной корреляции между возрастом донора и СГГ в контроле для данных, приведенных в таблице 1 составляет $r=0,77$, уровень достоверности $p<0,05$). Этот результат хорошо согласуется с нашими предыдущими данными о повышении СГГ в ядрах клеток буккального эпителия с возрастом донора [9]. Возможно, обнаруженные нами индивидуальные различия в реакции клеток на UWB облучение связаны с индивидуальной устойчивостью организма к облучению.

На рис. 5–8 представлены данные по прерываемому воздействию UWB на клетки буккального эпителия. В целом, из этих данных можно заключить, что наибольшее влияние на рост показателя СГГ оказывало непрерывное облучение, что также свидетельствует о триггерной реакции клетки на воздействие UWB.

Данные, представленные на рис. 5–8, могут быть интерпретированы следующим образом. Если процесс конденсации хроматина (величина СГГ) связан лишь с непрерывным облучением UWB, то при прерывании облучения конденсация отсутствует, хотя клетки в сумме получают ту же дозу облучения. Это, возможно, связано с быстрой репарацией изменений, вызванных воздействием UWB. Время восстановления клеток после облучения, достаточное для снижения степени конденсации хроматина, составило менее 2,5 с (наименьшая пауза между облучениями в наших экспериментах). Вероятно, этот процесс быстрого восстановления отличается от процесса восстановления клетки после образования «созревших» гранул гетерохроматина при постоянном воздействии UWB. Ранее было установлено, что восстановление последних (обратный переход в эухроматин) после окончания микроволнового облучения занимает около 2 часов [10].

Выводы

Результаты данного исследования подтверждают выводы наших предыдущих экспериментов об индуцировании UWB перехода эухроматина в гетерохроматин (процесс гетерохроматинизации) в ядрах изолированных клеток буккального эпителия человека. Эти изменения связаны, вероятно, с ответом клетки на стресс и с уменьшением биосинтетической активности хроматина. Эффект воздействия UWB на клетку носит триггерный характер и не увеличивается с возрастанием времени облучения. Нижний предел чувствительности клеток к UWB излучению в пределах от 10^{-6} до 10^{-4} Вт/см² при 10-секундной экспози-

ції и реакція на облучення в течение 100 и 1000 секунд в широких пределах падающей мощности излучения различался для клеток разных доно-

ров, что может быть связано с индивидуальной устойчивостью организма к облучению.

Література

1. Converse M. A computational study of ultra-wideband versus narrowband microwave hyperthermia for breast cancer treatment / M.Converse, E.J.Bond, B.D. Van Veen, S.C.Hagness // IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques.– 2006.– Vol.54.– P.2169-2180.
2. Dorsey W.C. Induced mitogenic activity in AML-12 mouse hepatocytes exposed to low-dose ultra-wideband electromagnetic radiation / W.C.Dorsey, B.D.Ford, L.Roane et al. // Int. J. Environ. Res. Public Health.– 2005.– Vol.2.– P.24-30.
3. Seaman R.L. Effects of exposure of animals to ultra-wideband pulses // Health Phys.- 2007.– Vol.92.– P.629-634.
4. Shckorbatov Y.G. Changes in the human nuclear chromatin induced by ultra wideband pulse irradiation / Y.G.Shckorbatov, V.N.Pasiuga, N.N.Kolchigin et al. // Central European Journal of Biology.– 2009.– Vol.4.– P.97-106.
5. Shckorbatov Y.G. He-Ne laser light induced changes in the state of chromatin in human cells // Naturwissenschaften.– 1999.– Vol.86.– P.452-453.
6. Shckorbatov Y. The state of chromatin as an integrative indicator of cell stress // New Developments in Chromatin Research, ed.: N.M.Simpson and V.J.Stewart. Chapter 6.– New York: Nova Science Publishers, Inc., 2012.– P.123-144.
7. Sylvester P.W. Effects of ultra-wideband electromagnetic pulses on pre-neoplastic mammary epithelial cell proliferation / P.W.Sylvester, S.J.Shah, D.T.Haynie, K.P.Briski // Cell Proliferatio.– 2005.– Vol.38.– P.153–163.
8. Estenberg J.I., Augustsson T. Extensive frequency selective measurements of radiofrequency fields in outdoor environments performed with a novel mobile monitoring system. Bioelectromagnetics.– 2014.– 35(3):227-230. doi: 10.1002/bem.21830.
9. Shckorbatov Y.G. Age-related changes in the state of chromatin in human buccal epithelium cells // Gerontology.- 2001.- V.47.- Suppl. 1.-P. 224-225.
10. Shckorbatov Y.G., Pasiuga V.N., Kolchigin N.N., Grabina V.A., Ivanchenko D.D., Bykov V.I., Dumin O.M. Cell nucleus and membrane recovery after exposure to microwaves // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B.– 2011.- Vol. 65, No. 1/2 (672/673), p. 13–20.

ВПЛИВ РІЗНИХ РЕЖИМІВ УЛЬТРАШИРОКОСМУГОВОГО ІМПУЛЬСНОГО ОПРОМІНЕННЯ НА СТАН ХРОМАТИНУ В КЛІТИНАХ ЛЮДИНИ

*Кузнецов К.А., Пасюга В.М., Магда І.Ю., *Казанський О.В.,*

**Іванченко Д.Д., *Колчигін М.М., Шкорбатов Ю.Г.*

*Науково-дослідний інститут біології Харківського національного університета ім. В.Н.Каразіна,
м. Харків, Україна, e-mail: shckor@univer.kharkov.ua;*

**Кафедра теоретичної радіофізики, Харківського національного університета ім. В.Н.Каразіна,
м. Харків, Україна, e-mail: Nikolay.N.Kolchigin@univer.kharkov.ua*

Клітини букального епітелію людини обробляли ультраширокополосним імпульсним випромінюванням за допомогою цілинної антени протягом 1, 10, 100 і 1000 с. Щільність потужності випромінювання, що діяло на клітини, варіювала від 10^{-6} до 10^{-2} Вт/см². Опромінення призводило до конденсації хроматину в ядрах клітин. Зміна часу опромінення істотно не впливало на ступінь гетерохроматинізації. У разі переривчастого опромінення ефекту конденсації хроматину не спостерігалось. Спостерігались відмінності в реакції клітин різних донорів на опромінення.

Ключові слова: *гетерохроматин, еухроматин, клітинне ядро, букальний епітелій, UWB, електромагнітне випромінювання*

***EFFECT OF DIFFERENT REGIMES OF ULTRAWIDEBAND PULSE IRRADIATION
ON THE STATE OF CHROMATIN IN HUMAN CELLS***

*Kuznetsov K.A., Pasyuga V.N., Magda I.Y., *Kazanskiy O.V.,*

**Ivanchenko D.D., *Kolchigin N.N., Shkorbatov Y.G.*

Research Institute of Biology of V.N.Karazin Kharkiv National University,

Kharkiv, Ukraine, e-mail: shckor@univer.kharkov.ua;

**Department of Theoretical Physics of V.N.Karazin Kharkiv National University,*

Kharkiv, Ukraine, e-mail: Nikolay.N.Kolchigin@univer.kharkov.ua

Human buccal epithelial cells were exposed to ultrawideband ultrashort pulsed radiation by means of slot antenna for 1, 10, 100 and 1000 s. Surface power of cells irradiation was from 10^{-6} to 10^{-2} W/cm². The cell exposure resulted in condensation of chromatin in cell nuclei. Changing of the exposure time not significantly affect the degree of heterochromatinization. In the case of intermittent irradiation exposure the effect chromatin condensation was not observed. There were shown individual differences in the responses to irradiation of cells from various donors.

Keywords: *heterochromatin, euchromatin, cell nucleus, buccal epithelium, UWB, electromagnetic radiation.*