

ВЛИЯНИЕ МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА СОСТОЯНИЕ ХРОМАТИНА ЯДЕР И СОДЕРЖАНИЕ В КЛЕТКАХ РЕГУЛЯТОРНОГО БЕЛКА ЦИКЛИНА А

Кузнецов К.А., Мирошник Д.Б., Пасюга В.Н., Иванченко Д.Д.,
*Ключевская О.Ю., *Стойка Р.С., Шкорбатов Ю.Г.

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, Институт биологии,
г. Харьков, майдан Свободы, 4, 61022 Украина,
e-mail: shkor@univer.kharkov.ua;

*Институт биологии клетки Национальной академии наук Украины,
г. Львов, ул. Драгоманова, 14/16, 79005 Украина,
e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Показано влияние микроволнового излучения (частота 36,64 ГГц, плотность мощности 1 Вт/м²) и магнитного поля (индукция 25 мТл) на изменение степени конденсированности хроматина в ядрах клеток букального эпителия человека и содержание белка циклина А в клетках культуры макрофагов мыши J774.2. Состояние хроматина оценивали с помощью окрашивания клеток орсеином, содержание белков – с помощью метода вестерн-блоттинга. Показаны индуцированные микроволновым облучением и магнитным полем повышение степени конденсированности хроматина и рост содержания циклина А в клетках.

Ключевые слова: электромагнитное излучение, магнитное поле, циклин А, хроматин, гетерохроматин.

Введение

Проблема рисков воздействия антропогенных электромагнитных полей на человека вызывает большой общественный интерес в связи с постепенным повышением уровня «электромагнитного загрязнения» окружающей среды за счет работы мобильных телефонов, базовых станций мобильной связи, телевизионных передатчиков. Так, согласно замерам, произведенным в Австрии, плотность мощности высокочастотных электромагнитных излучений в диапазоне от 80 МГц до 2 ГГц составляла в разных местах от 0,0002 до 1,4 мВт/м² [8], при этом 73% ее давали мобильные телекоммуникации. Средние уровни воздействия были несколько выше в сельской местности (0,05 мВт/м²), чем в городской (0,02 мВт/м²). Было показано существование корреляции между плотностью мощности электромагнитных излучений в помещении и некоторыми болезненными симптомами, - например, головной болью [8]. Известны факты негативного влияния излучения мобильных телефонов на сперматогенез у мужчин [3]. Некоторые исследования указывают на повышенный риск развития рака (нейромы слухового нерва, глиомы,

рака кожи) через 10 и более лет использования мобильного телефона; их авторы полагают, что действующий стандарт на конструкцию последнего нуждается в пересмотре [6,7].

В то же время в других исследованиях не подтверждается увеличение риска заболевания некоторыми формами рака - базально-клеточной карциномой, плоскоклеточным раком, меланомой головы и шеи, - среди пользователей мобильных телефонов [16]. Не обнаружено связи между риском ранних раковых заболеваний у детей и проживанием матери во время беременности вблизи базовых станций мобильной связи [4].

Медико-эпидемиологические данные обусловили интерес к изучению биологических механизмов действия электромагнитного излучения и магнитного поля (МП) на клеточном уровне. Было показано, что поля низкой интенсивности вызывают ряд изменений в энергетическом метаболизме клетки, свойствах клеточных мембран, транспорте ионов через мембраны, структуре и свойствах клеточного ядра, процессах регуляции генной активности, свободно-радикального окисления и других внутриклеточных процессах [2, 9,

[14]. Ранее нами показано, что микроволновое излучение (МВИ) и МП вызывают изменения в основных регуляторных процессах в клетке, в частности - увеличение степени конденсированности хроматина в ядрах клеток человека [18].

Целью настоящей работы было исследование влияния МВИ и МП на изменение степени конденсированности хроматина в ядрах клеток человека, а также изменение содержания регуляторных белков в клетках модельного объекта – культуры макрофагов мыши линии J774.2.

Материалы и методы

Источником МВИ с частотой 36,64 ГГц (диапазон крайне высоких частот - КВЧ) и плотностью падающего потока мощности на поверхности объекта 1 Вт/м² служил в наших опытах генератор на основе диода Ганна, сконструированный на кафедре теоретической радиофизики Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина. МП с величиной магнитной индукции 25 мТл создавалось с помощью магнита, насаженного на ось высокоскоростного электромотора [1]. В разных вариантах эксперимента этот магнит создавал статическое либо вращающееся МП (по часовой или против часовой стрелки).

Эксперименты по оценке состояния хроматина в ядрах проводили на клетках буккального эпителия четырех доноров-добровольцев, информированных о цели эксперимента (донор А – возраст 21 год; донор Б - 22 года; донор В - 23 года; донор Г - 59 лет). Клетки были взяты с внутренней поверхности щеки доноров (эта операция абсолютно безболезненна и бескровна). Затем их суспендировали в буферном растворе (3,03 мМ фосфатный буфер, рН = 7,0 с добавлением 2,89 мМ CaCl₂).

Изолированные клетки буккального эпителия человека подвергали воздействию МВИ с вышеуказанными параметрами в течение 30 секунд, воздействию МП - в течение 5 минут; применялись также различные комбинации этих воздействий. Для исследования гетерохроматина клетки окрашивали раствором орсеина (2% орсеин в 45% уксусной кислоте). Содержание гранул гетерохроматина (СГГ) в ядре подсчитывали при увеличении микроскопа x400 по методу, описанному ранее [17]. Величину СГГ в каждом варианте эксперимента определяли в 30 ядрах в трех повторностях, то есть всего в 90 ядрах. О различиях между контролем и опытом судили по средним величинам СГГ (N=90).

Исследование изменений в количестве регуляторных белков проводили на культуре макрофагов мыши линии J774.2 (Институт Уильяма

Гарвея, г. Лондон, Великобритания). Клетки культивировали на среде RPMI-1640 (HyClone Laboratories, USA) с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота (PAA Laboratories GmbH, Austria), 300 мг/л глутамин и 50 мг/мл гентамицина (Sigma-Aldrich, USA) в CO₂-инкубаторах при температуре 37°C. Концентрация клеток в опытах составляла 500x10³ клеток/мл.

Для идентификации белков в лизате клеток линии J774.2 был использован метод вестерн-блоттинга. Анализ проводили через 30 минут, 1 и 3 часа после 10-секундного воздействия на культуру МВИ с плотностью мощности и частотой, указанными выше, после 10-минутного воздействия статическим МП, а также МП, вращающимся по и против часовой стрелки.

Белки разделяли с помощью вертикального электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу, предложенному Лэммли [11]. Для иммуноблот - анализа проводили перенос белков с ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану (Hybond, США) под действием электрического тока с последующей обработкой полученных мембран антителами. Иммунореактивные белковые зоны выявляли с помощью хемилюминесценции. Для этого мембрану инкубировали в присутствии специфических моноклональных антител кролика к фосфорилированным формам белков (циклин А, Cdk2, каспаза -3, cPARP и p21) в течение 12 часов при 4° С при медленном перемешивании. Инкубацию мембраны со вторыми антителами, мечеными пероксидазой, проводили в течение 1 часа при 4° С при встряхивании.

Места связывания конъюгированных с пероксидазой антител с исследуемыми белками выявляли с помощью хемилюминесценции, вызванной инкубированием нитроцеллюлозной мембраны в течение 1 минуты в буфере для детекции, содержащем 1,25 мМ люминола (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион (Sigma)), 2,72 мМ кумариновой кислоты (4- гидроксидинаминовая кислота, Sigma) и 0,01% перекиси водорода в 0,1 М Tris - HCl (рН 8,5). Мембраны, обработанные таким образом, экспонировали в течение 1-10 минут с рентгеновской пленкой (Fujifilm, Япония). Пленку помещали в стандартный фенидон-гидрохиноновый проявитель для фотографий и фиксировали кислым фиксажем. Иммунореактивные белковые зоны давали сигнал на рентгеновской пленке. Выравнивание количества нанесенного белка в образцах для электрофореза проводили относительно клеточного белка с массой 58 кДа на электрофореграммах, окрашенных красителем понсо красный 4R. На рисунке 5 в прилагаемых электрофореграммах мо-

лекулярная масса 53 кДа соответствует массе исследуемого белка циклина А.

Результаты и обсуждение

Данные, полученные в экспериментах по определению изменений в состоянии хроматина в ядрах клеток донора А после воздействия МВИ КВЧ и/или МП, представлены на рис. 1. Видно, что все виды воздействия приводили к достоверному росту показателя СГГ относительно интактного контроля, то есть к конденсации или гетерохроматинизации хроматина. Необходимо от-

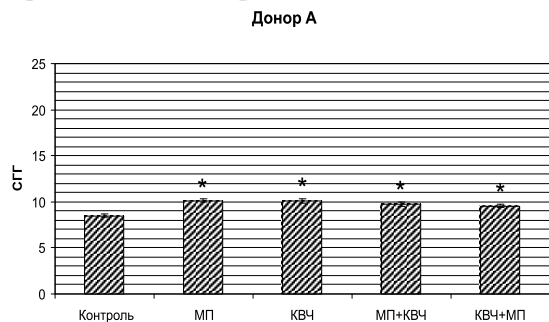


Рис. 1. Содержание гранул гетерохроматина в клетках буккального эпителия донора А; * (здесь и далее) – отличия от контроля статистически достоверны, $p < 0,05$

метить, что реакция клеток на комбинированные воздействия оказалась менее выраженной.

Клетки донора Б оказались наиболее чувствительными ко всем видам воздействий (рис. 2), однако эффект от комбинации МП и МВИ КВЧ также был ниже, чем от отдельных факторов.

Клетки донора В оказались наиболее устойчивыми к электромагнитным воздействиям. Содержание в них гранул гетерохроматина снизилось относительно контроля только в результате комбинированного воздействия МП + МВИ КВЧ

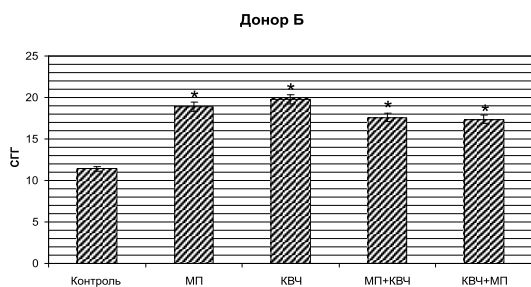


Рис. 2. Содержание гранул гетерохроматина в клетках буккального эпителия донора Б

(рис. 3). Другие типы воздействия не вызвали статистически значимых изменений величины СГГ.

Различные варианты воздействия МП и МВИ КВЧ на клетки донора Г (рис. 4) привели к повышению уровня СГГ, как и у доноров А и Б.

Таким образом, в наших экспериментах воздействие электромагнитных полей в большин-

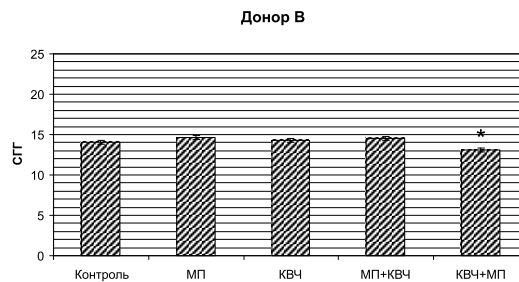


Рис. 3. Содержание гранул гетерохроматина в клетках буккального эпителия донора В

стве случаев привело к достоверным изменениям в количестве гранул гетерохроматина в ядрах клеток буккального эпителия: для клеток трех доноров из четырех наблюдали повышение показателя СГГ после действия МП и МВИ. Согласно результатам предыдущих исследований, это может быть свидетельством стресс-реакции на клеточном уровне, наблюдаемой при действии разных факторов – ингибиторов биосинтеза РНК и белка, гормонов стресс-реакции, ультрафиоле-

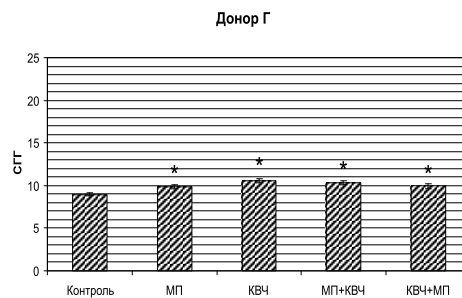


Рис. 4. Содержание гранул гетерохроматина в клетках буккального эпителия донора Г

тового излучения, экстремальной температуры, электромагнитных полей [18].

Уровень чувствительности к электромагнитным полям был самым высоким в клетках донора Б (22 года), наименее чувствительными оказались клетки донора В (23 года). Таким образом, возрастные различия в реактивности клеток на эти факторы не выявлены; можно отметить лишь значительные индивидуальные различия между донорами.

При комбинированном воздействии МВИ КВЧ + МП в клетках двух доноров (Б и В) наблюдались меньшие величины показателя СГГ, чем при воздействии только МВИ ($p > 0,95$); в этом случае можно говорить о частичном восстановлении уровня показателя после действия МП. Защитный эффект предварительного воздействия

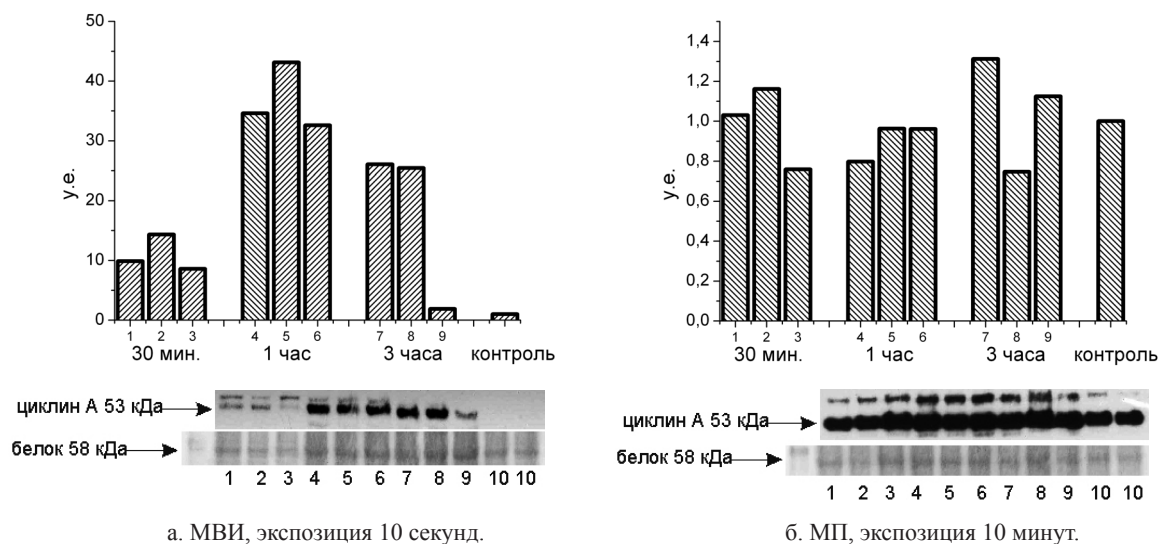


Рис. 5. Изменение содержания регуляторного белка циклина А в клетках макрофагов мыши линии J774.2 под влиянием МВИ и МП: варианты 1, 4, 7 - линейно поляризованное МВИ и постоянное МП; варианты 2, 5, 8 - левополяризованное МВИ и МП, вращающееся влево (против часовой стрелки); варианты 3, 6, 9 - правополяризованное МВИ и МП, вращающееся вправо (по часовой стрелке), 10 – интактный контроль.

магнитного поля (МП + МВИ КВЧ), то есть ослабление последующего влияния микроволн, был отмечен только для клеток донора Б ($p > 0,95$).

Наши результаты хорошо согласуются с данными работы [21], где показано, что в культивируемых клетках хрусталика человека шумовое низкочастотное электромагнитное поле, которое представляло собой сигналы случайной последовательности в диапазоне 30–90 Гц, с величиной магнитной индукции 2 мТл, подавляет образование двухцепочечных разрывов ДНК, которые образуются при действии МВИ с частотой 1,8 ГГц. Действие низкочастотного электромагнитного поля снижало уровень свободных радикалов, который повышался под влиянием МВИ КВЧ [21].

Подобные результаты были получены и на клетках головного мозга крыс – одновременное облучение микроволнами с частотой 2,45 ГГц и шумовым электромагнитным полем (30–100 Гц, 4,5 мкТл) приводило к блокированию одноцепочечных и двуцепочечных разрывов ДНК, вызываемых МВИ. Следует отметить, что воздействие шумового электромагнитного поля после воздействия микроволн не приводило к подобному эффекту [12]. Показано также [10], что низкочастотное электромагнитное поле (100 Гц) при одновременном воздействии с МВИ КВЧ (2,45 ГГц) ослабляет влияние последнего на содержание мелатонина, активность креатинкиназы и каспазы 3 в клетках сперматозоидов крыс после облучения *in vivo*.

Таким образом, в ряде исследований установлен факт модификации эффектов, вызываемых МВИ

КВЧ при одновременном или последующем воздействии низкочастотного электромагнитного поля. Нами показано наличие модифицирующего действия статического МП, однако проявление этого эффекта зависит от индивидуальных особенностей клеток донора (два случая из четырех). Эти отличия в реакции клеток разных доноров на МВИ и МП может быть связано с феноменом гиперчувствительности отдельных людей к факторам электромагнитной природы [13]. Вероятно, наряду с гиперчувствительностью существует и индивидуальная пониженная чувствительность к электромагнитным полям.

Чтобы исследовать процессы, происходящие в клетках при действии МВИ и МП, на молекулярном уровне, было недостаточно того количества биологического материала, которое можно получить от доноров-добровольцев. В этой связи нами было исследовано изменение под влиянием этих факторов содержания в клетках макрофагов мыши линии J774.2 проапоптотических белков (каспаза-3, cPARP и p 21), а также белков - регуляторов клеточного цикла (циклин А и Cdk 2). В лизате клеток был обнаружен белок циклин А; другие белки в лизате клеток макрофагов отсутствовали.

По данным, представленным на рис. 5а, видно, что МВИ с вышеуказанными параметрами и экспозицией 10 секунд вызывает повышение содержания циклина А через 1 и 3 часа после воздействия. Как известно, циклин А является одним из сигналов к началу деления клетки [5]. Таким образом, полученные данные можно интерпретировать как индукцию клеток J774.2 микроволнами к делению.

Эффектам воздействия электромагнитных полей на иммунную систему посвящено много работ, - в частности, проанализированных в обзоре [20]. Имеются экспериментальные данные о том, что клетки диффузной нейроиммуноэндокринной системы (тучные клетки, пинеалоциты, гранулярные лейкоциты и полиморфоядерные лейкоциты) могут активироваться с помощью факторов электромагнитной природы [15;19]. Наши данные свидетельствуют о стимуляции клеток иммунной системы (макрофаги) к делению под влиянием МВИ, что может способствовать активации иммунной системы при действии электромагнитных полей.

Заключение

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при воздействии МВИ и МП на изолиро-

ванные клетки человека и мыши *in vitro* могут наблюдаться значительные эффекты. Так, в клетках человека в ряде случаев это вызывает конденсацию хроматина (гетерохроматинизацию). С другой стороны, отмечены факты частичного восстановления (деконденсации) хроматина при последовательном воздействии МВИ КВЧ и МП. Вышеуказанные эффекты имеют индивидуальную специфичность, то есть наблюдаются в клетках одних доноров, но не наблюдаются в клетках других, что может быть связано с индивидуальной чувствительностью к ним клеток разных доноров.

В культуре клеток мыши после облучения МВИ КВЧ обнаружено повышение содержания регуляторного белка циклина А, что предполагает стимуляцию клеток к делению.

Литература

1. Грабіна В.А. Пристрій впливу обертовим магнітним полем вихрового типу на біологічні об'єкти / В.А.Грабіна, А.М.Коробов, В.А.Луньова, Г.К.Лала.- Патент України №38540, 2009, Бюл. №1.
2. Banik S. Bioeffects of microwave – a brief review / S.Banik, S.Bandyopadhyay, S.Ganguly // Biore-source Technology.– 2003.– Vol.87.– P.155-159.
3. Bhat M.A. Effects of electromagnetic waves emitted by mobile phones on male fertility // Computer Engineering & Intelligent Systems.– 2013.– Vol.4, Issue 3.– P.51-64.
4. Elliott P. Mobile phone base stations and early childhood cancers: case-control study / P.Elliott, M.B.Toledano, J.Bennett et al. // Brit. Med. J.– 2010.– Vol.340.– P.c3077.
5. Harashima H. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom / H.Harashima, N.Dissmeyer, A.Schnittger // Trends in Cell Biology.– 2013.– Vol.23, Issue 7.– P.345–356.
6. Hardell L. Epidemiological evidence for an association between use of wireless phones and tumor diseases / L.Hardell, M.Carlberg, K.Hansson-Mild // Pathophysiology.– 2009.– Vol.16.– P.113-122.
7. Hardell L. Use of mobile phones and cordless phones is associated with increased risk for glioma and acoustic neuroma / L.Hardell, M.Carlberg, K.Hansson-Mild // Pathophysiology.– 2013.– Vol.20.– P.85-110.
8. Hutter H.-P. Subjective symptoms, sleeping problems, and cognitive performance in subjects living near mobile phone base stations / H.-P.Hutter, H.Moshammer, P.Wallner, M.Kundi // Occup. Environ. Med.– 2006.– Vol.63.– P.307-313.
9. Kesari K.K. Cell phone radiation exposure on brain and associated biological systems / K.K.Kesari, M.H.Siddiqui, R.Meena et al. // Indian J. Exp. Biol.– 2013.– Vol.51.– P.187-200.
10. Kumar S. The therapeutic effect of a pulsed electromagnetic field on the reproductive patterns of male Wistar rats / S.Kumar, K.K.Kesari, J.Behari // Clinics.– 2011.– Vol.66.– P.1237-1245.
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.– 1970.– Vol.227.– P.680-685.
12. Lai H. Interaction of microwaves and a temporally incoherent magnetic field on single and double DNA strand breaks in rat brain cells / H.Lai, N.P.Singh // Electromagnetic Biology and Medicine.– 2005.– Vol.24.– P.23-29.
13. Levallois P. Hypersensitivity of human subjects to environmental electric and magnetic field exposure: a review of the literature // Environmental Health Perspectives.– 2002.– Vol.110, Suppl.4.– P.613-618.
14. Markov M.S. Electromagnetic fields and life // J. Electr. Electron. Syst.– 2014.– Vol.3.– P. 119.
15. Martynyuk V.S. Interference of the mechanisms of influence that weak extremely low-frequency electromagnetic fields have on the human body and animals / V.S.Martynyuk, Yu.V.Tseysler, N.A.Temuryants // Izvestia, Atmospheric and Ocean Physics (Перевод журнала Известия РАН. Физика атмосферы и океана). – 2012.– Vol.48, №8.– P.832-846.
16. Poulsen A.H. Mobile phone use and the risk of skin cancer: a nationwide cohort study in Denmark / A.H.Poulsen, S.Friis, C.Johansen et al. // Amer. J. Epidemiol.– 2013.– Vol.178.– P.190-197.
17. Shckorbatov Y.G. He-Ne laser light induced changes in the state of the chromatin in human cells // Naturwissenschaften.– 1999.– Vol.86.– P.450-453.
18. Shckorbatov Y. The state of chromatin as an integrative indicator of cell stress // New Developments in Chromatin Research / Eds. N.M.Simpson and V.J.Stewart, 2012.– Chapter 6.– P.123-144.
19. Simko M. Extremely low frequency electromagnetic fields as effectors of cellular responses in vitro: possible immune cell activation / M.Simko, M.O.Mattsson // J. of Cellular Biochemistry.– 2004.– Vol.93.– P.83-92.
20. Szmigielski S. Reaction of the immune system to low-level RF/MW exposures // Science of the Total Environment.– 2013.– Vol. 454-455.– P.393-400.
21. Yao K. Electromagnetic noise inhibits radiofrequency radiation-induced DNA damage and reactive oxygen species increase in human lens epithelial cells / K.Yao, W.Wu, K.Wang et al. // Mol. Vis.– 2008.– Vol.14.– P.964-969.

**ВПЛИВ МІКРОХВИЛЬОВОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НИЗЬКОЇ ІНТЕНСИВНОСТІ
І МАГНІТНОГО ПОЛЯ НА СТАН ХРОМАТИНУ В ЯДРАХ ТА ВМІСТ У КЛІТИНАХ
РЕГУЛЯТОРНОГО БІЛКУ ЦИКЛІНУ А**

*Кузнецов К.А., Мірошник Д.Б., Пасюга В.М., Іванченко Д.Д.,
*Ключівська О.Ю., *Стойка Р.С., Шкорбатов Ю.Г.
Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, інститут біології
м. Харків, майдан Свободи, 4, 61022 Україна, e-mail: shckor@univer.kharkov.ua
² Інститут біології клітини Національної Академії Наук України
Львів, 79005, вул. Драгоманова, 14/16, e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua*

*Показаний вплив низькоінтенсивного мікрохвильового випромінювання (частота 36,64 ГГц густи-
на потужності 1 Вт/м²) та магнітного поля (індукція 25 мТл) на зміни ступеню конденсованості
хроматину в ядрах клітин букального епітелію людини та вміст білку цикліну А в клітинах культури
макрофагів миші J774.2. Стан хроматину оцінювали за допомогою забарвлення клітин орсеїном,
вміст білків – за допомогою методу вестерн-блотингу. Показано індуковане мікрохвильовим
випромінюванням та магнітним полем підвищення конденсованості хроматину та підвищення
вмісту білку цикліну А у клітинах.*

Ключові слова: *електромагнітне випромінювання, магнітне поле, циклін А, хроматин, гетерох-
роматин.*

**EFFECT OF LOW INTENSITY MICROWAVE RADIATION AND MAGNETIC FIELD
ON THE STATE OF CHROMATIN IN CELL NUCLEI AND CONTENTS
OF REGULATORY PROTEIN CYCLIN A IN CELLS**

*Kuznetsov K.A., Miroshnik D.B., Pasiuga V.N., Ivanchenko D.D.,
*Kluchivs'ka O.Y., *Stoika R.S., Shckorbatov Y.G.
V.N. Karazin Kharkov National University, Research Institute of Biology,
Kharkov, 61022, Svobody Sq., 4, Ukraine, e-mail: shckor@univer.kharkov.ua
*Research Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine,
L'viv, 79005, Dragomanova Str., 14/16, Ukraine, e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua*

*The influence of low-level microwave radiation (frequency 36,64 GHz, power density 1 W/m²) and
magnetic field (induction 25 mT) on changes of chromatin condensation rate in human buccal epithelium
cells and contents of protein cyclin A in macrophage cells of mice J774.2. The chromatin state was evaluated
by orcein staining, contents of proteins – by western-blotting. The increase of chromatin condensation and
content of protein cyclin A in cells induced by the microwave irradiation and magnetic field were detected.*

Keywords: *electromagnetic radiation, magnetic field, cyclin A, chromatin, heterochromatin.*