

УДК 576.315.4

**ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ И МАГНИТНОЙ СОСТАВЛЯЮЩЕЙ
ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН И
СОСТОЯНИЕ ХРОМАТИНА В ЯДРАХ КЛЕТОК БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ
ЧЕЛОВЕКА**

Скамрова Г.Б.¹, Евстигнеев М.П.¹, Трушкин А.Н.¹, Шкорбатов Ю.Г.²

¹*Севастопольский национальный технический университет, Севастополь, Украина*

²*Харьковский национальный университет им. В.Н.Каразина, Харьков, Украина*

E-mail: galina_skamrova@mail.ru

Исследовано влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения с частотой 8 ГГц, а также влияние электрической и магнитной составляющей излучения по отдельности, на проницаемость мембран и состояние хроматина в ядрах клеток буккального эпителия человека. Наблюдался статистически значимый отклик клетки на данное излучение, проявляющийся в увеличении количества гранул гетерохроматина и проницаемости мембран относительно контроля. Электрическая составляющая электромагнитного излучения оказывала наибольшее влияние на процесс образования гетерохроматина.

Ключевые слова: микроволновое излучение, гетерохроматин, проницаемость мембраны, буккальный эпителий.

ВВЕДЕНИЕ

Существует много свидетельств об отрицательном воздействии электромагнитного излучения (ЭМИ) сантиметрового и миллиметрового диапазона на живые организмы, к примеру [1-4]. Так как в настоящее время в связи с научно-техническим прогрессом использование микроволнового излучения резко возросло, исследование влияния электромагнитных полей низкой интенсивности на живые организмы является важным направлением современной биологии. Особое внимание уделяется изучению влияния ЭМИ на клеточном и молекулярном уровне.

Ранее [5] были инициированы исследования, целью которых стал поиск взаимосвязи между различными параметрами ЭМИ сантиметрового и миллиметрового диапазона и реакцией организма на клеточном уровне. В качестве объекта исследований использовались клетки буккального эпителия человека. В частности, было показано, что микроволновое излучение низкой интенсивности вызывает возрастание количества гранул гетерохроматина (КГГ) и приводит к конденсации хроматина в ядрах клеток буккального эпителия. Также параметр КГГ был чувствителен к действию других факторов, таких как биологически активные вещества, ультрафиолетовое и лазерное излучение [5-8]. Явление конденсации хроматина под действие ЭМИ было обнаружено и в лимфоцитах человека [9,10] при

параметрах поля, близких к излучению мобильных телефонов. Эти результаты позволяют предположить, что состояние хроматина может служить индикатором чувствительности клеток к действию ЭМИ, поскольку известно, что конденсация хроматина связана со снижением его транскрипционной активности. Если грануляция хроматина отражает реакцию клетки на ЭМИ и связана с изменением функциональной активности хроматина, можно ожидать, что отклик на ЭМИ может также наблюдаться и в других клеточных компонентах. Известно, что важную роль в рецепции микроволнового излучения играют клеточные мембраны, состояние которых связано с состоянием самой клетки [11,12].

Для выявления механизма действия микроволнового излучения на клетки человека необходимо определить, как изменяется отклик клетки при изменении параметров ЭМИ, таких как мощность и время экспозиции, частота, поляризация и т.п. Ранее было рассмотрено влияние лево-, право- и линейно поляризованного микроволнового излучения на хроматин в ядрах человеческих клеток [5]. Также в наших предыдущих работах [13,14] был установлен характер изменения КГГ и проницаемости мембран при различных мощностях и временах излучения. Во всех процитированных исследованиях использовалось «стандартное» ЭМИ, содержащее суперпозицию колебаний электрической и магнитной составляющих. В связи с этим представляет интерес рассмотрение влияния электрического и магнитного полей по-отдельности на клеточном уровне, с целью ответа на вопрос о существовании какого-либо различия в эффекте действия каждого из них на живой организм.

В настоящей работе изучена реакция клеток буккального эпителия на уровне мембраны и ядра на ЭМИ с частотой 8 ГГц низкой интенсивности, а также выявлены закономерности отклика клетки на электрическую и магнитную составляющие поля по-отдельности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Эксперименты проводились на клеточной культуре буккального эпителия человека. Процесс изъятия клеток с внутренней поверхности щеки является абсолютно безболезненным и бескровным, и все доноры были проинформированы о целях эксперимента. Отбор клеток производился у трех доноров мужского пола: донор А – 21 год, В – 21 год, С – 24 года, и двух женского пола: донор D – 23 года, E – 21 год. Все доноры были не курящие.

Клетки помещались в 3,03 мМ фосфатный буфер (рН 7,0) с добавлением 2,89 мМ хлорида кальция [7,15]. Затем суспензия распределялась по полипропиленовым пробиркам «Эппендорф» (0,2 мл каждый) и помещалась в водяную баню при температуре 36 ± 1 °С. Продолжительность экспериментов составляла 2-4 часа, и за это время не наблюдалось видимых изменений в структуре ядра и мембраны клеток.

Процедура облучения

Пробирка, содержащая исследуемый образец, помещалась в волноводный тракт, в котором была сформирована стоячая волна с частотой 8 ГГц и плотностью потока мощности ~ 60 мВт/см². Принципиальная схема установки представлена на рис. 1.

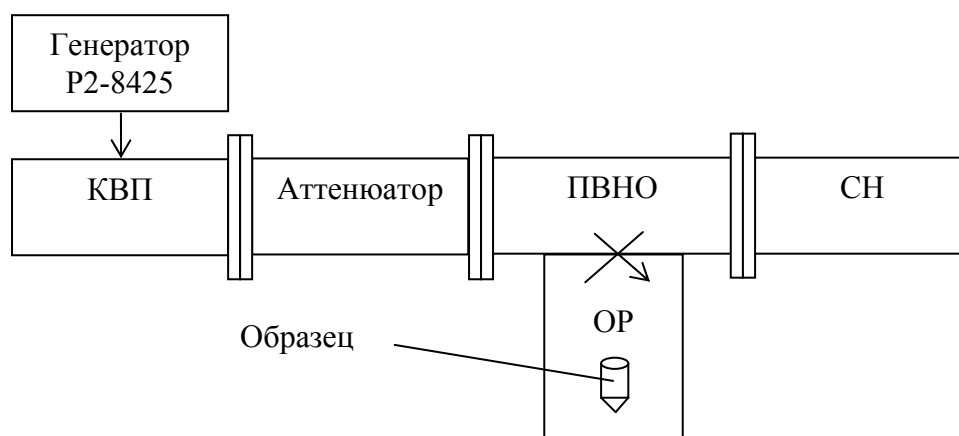


Рис. 1. Принципиальная схема установки

Примечание: Р2-8425 — генератор к панорамному измерителю коэффициента стоячей волны и ослаблений; КВП — коаксиально-волноводный переход; ПВНО — первичный волновод направленного ответвителя; ОР — объемный резонатор на основе вторичного волновода направленного ответвителя; СН — согласованная нагрузка.

Установка работает следующим образом. С помощью генератора в волноводном тракте формируется волна с частотой 8 ГГц. Первая часть падающей от генератора волны поглощается согласованной нагрузкой (СН) первичного волновода. Вторая часть этой волны ответвляется из первичного волновода во вторичный, который работает в режиме объемного резонатора (ОР). Коаксиально-волноводный переход (КВП) обеспечивает связь между коаксиальным выходом генератора и направленным ответвителем. ОР представляет собой отрезок вторичного волновода направленного ответвителя с двумя короткозамыкателями. Один из них подвижный и обеспечивает настройку резонатора на максимум электрического или магнитного поля в области пробирки.

Образец располагался в рассчитанных в соответствии с частотой и характеристиками волновода максимумах электрической и магнитной составляющей излучения, а также в положении, равноудаленном от данных максимумов. Это позволило сравнить реакцию клеток на электрический и магнитный компонент по-отдельности не только с контрольным значением, но также и с реакцией на их совместное действие. Продолжительность облучения составляла 5 минут.

Метод оценки показателя КГГ

Функциональное состояние клеточных ядер напрямую зависит от структурных переходов из гетерохроматина в эухроматин. Возрастание параметра КГГ указывает на уменьшение транскрипционной активности в ядрах. Оценка параметра

КГГ проводилась с помощью метода, предложенного в [5]. Облученные клетки и контрольный образец были окрашены 2% раствором орсеина в 45% уксусной кислоте [16]. Ядра клеток были визуально изучены под микроскопом MICROmed XS-3330 с увеличением 1000. В каждом образце параметр КГГ был определен для 30 случайных клеток. Ранее [5] было показано, что данное количество является оптимальным, т.е. дальнейшее увеличение количества проанализированных ядер не приведет к значительному уменьшению стандартной ошибки, но значительно замедляет процесс анализа.

Метод оценки проницаемости клеточных мембран

Состояние клеточных мембран было оценено по процентному содержанию клеток, окрашенных 5 мМ раствором индигокармина *in vitro* в течение 1 мин [12]. При определении показателя окрашенности клеток индигокармином (ОКИ, %) в каждом образце учитывалось 300 клеток (3 повтора по 100 клеток), а затем была рассчитана средняя величина показателя ОКИ. Подсчет клеток производился визуально с помощью микроскопа MICROmed XS-3330 с увеличением 400.

Статистическая обработка данных

Расчеты средних значений и стандартных ошибок среднего производились в программе Microsoft Office Excel. Достоверность различий между средними значениями показателей после облучения и контрольного, необлученного образца оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Для оценки статистической связи между полученными данными и влиянием различных факторов в программе SigmaStat был выполнен дисперсионный анализ ANOVA. В работе был принят уровень достоверности $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние электрической и магнитной составляющей излучения на проницаемость мембран клеток буккального эпителия человека

Данные первого этапа эксперимента по влиянию электрической и магнитной составляющих ЭМИ на показатель ОКИ для всех доноров представлены на рис. 2., где указаны средние данные \pm значения стандартной ошибки среднего.

Как видно из приведенных выше гистограмм, для всех доноров наблюдается статистически значимое увеличение проницаемости мембран при действии электрического компонента излучения. Реакция мембран клеток для магнитного и смешанного компонента носят индивидуальный характер для каждого донора. В целом, зависимость показателя ОКИ от различных составляющих излучения не демонстрирует четкой тенденции, достоверное превышение эффекта электрической составляющей ЭМП над магнитной отмечено только для клеток одного донора (донор Д).

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA приведены в таблице 1.

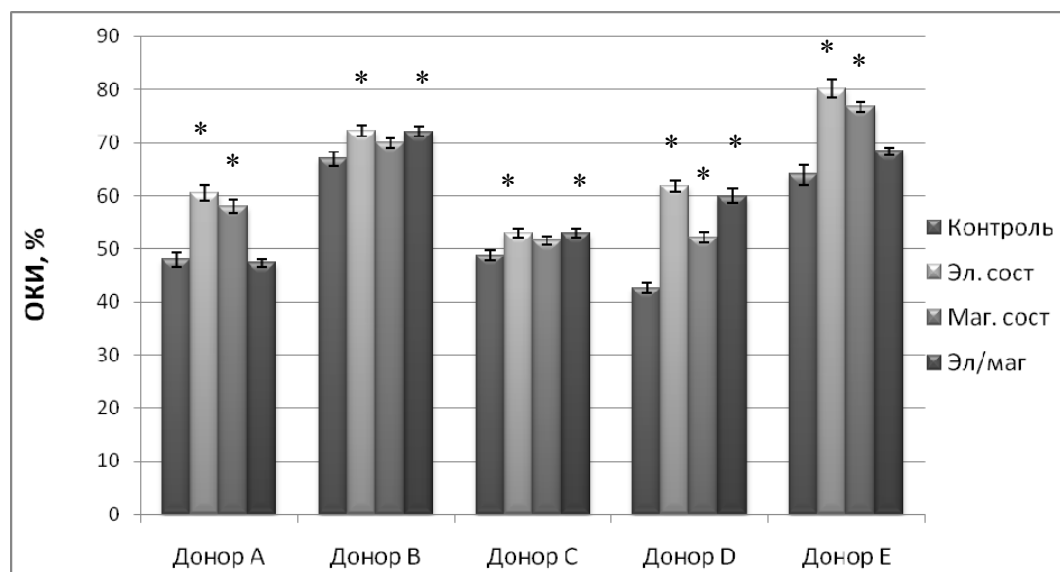


Рис. 2. Влияние электрической и магнитной составляющей излучения на окрашенность клеток индигокармином (ОКИ) для доноров А – Е.

Примечание: * - статистически значимое отклонение от контрольного значения.

Таблица 1

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA для данных первого этапа эксперимента

| Фактор | Количество степеней свободы | Общая сумма квадратов | Средний квадрат | Критерий Фишера | Уровень значимости |
|-----------|-----------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| Донор | 4 | 1667,4 | 416,8 | 5,3 | 0,02 |
| Компонент | 2 | 281,2 | 140,6 | 1,8 | 0,23 |

Как видно из таблицы 1, критерий Фишера максимален для фактора «донор», что соответствует наличию индивидуальных закономерностей в отклике клетки на ЭМИ среди пяти доноров в соответствии с рис. 2. Уровень значимости для фактора «компонент» превышает допустимый, следовательно, различие в действии электрической и магнитной составляющих ЭМП на проницаемость мембран клетки не является статистически значимым.

Влияние электрической и магнитной составляющей излучения на состояния хроматина в ядрах клеток буккального эпителия человека

Результаты по влиянию электрической и магнитной составляющих ЭМИ на показатель КГГ для всех доноров представлены на рис. 3, где указаны средние данные ± значения стандартной ошибки средних.

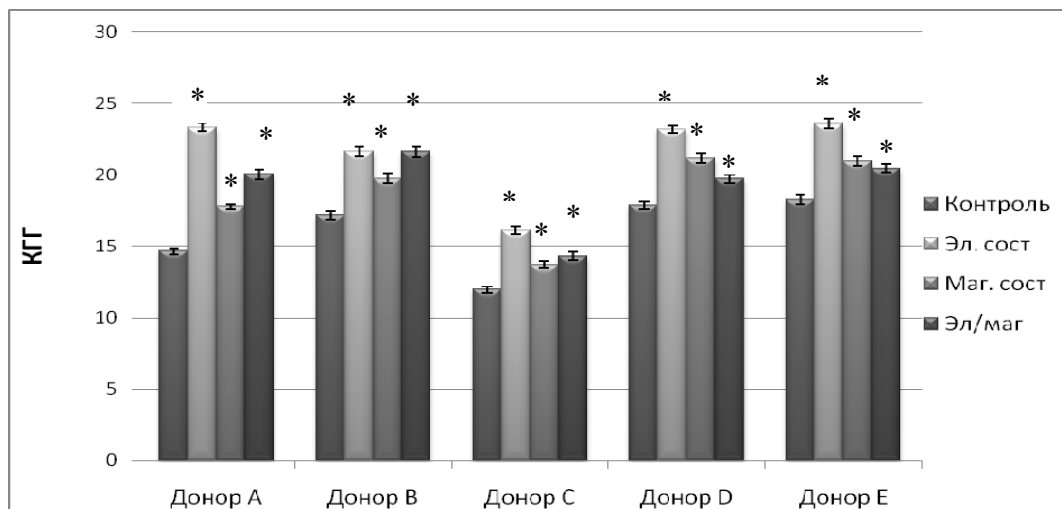


Рис. 3. Влияние электрической и магнитной составляющей излучения на показатель ККГ для пяти доноров.

Примечание: * - статистически значимое отклонение от контрольного значения.

Ключевым результатом данного эксперимента является то, что при данной частоте и длительности экспозиции для всех доноров во всех рассмотренных случаях наблюдается статистически значимое увеличение показателя ККГ относительно контрольного значения. Это согласуется с данными, полученными ранее [8, 9] и ещё раз доказывает, что конденсация хроматина (изменение показателя ККГ) может быть рассмотрена как маркер отклика клетки на ЭМИ.

Однако наиболее важным результатом в контексте настоящей работы является то, что для каждого донора электрическая составляющая ЭМИ оказывает большее влияние на увеличение показателя ККГ, чем магнитная и электромагнитное поле, согласно t-тесту Стьюдента. Результаты t-теста представлены в таблице 2. Разница между показателями ККГ для пар «электрическая – магнитная» и «электрическая – электромагнитная» для всех доноров является статистически значимой. Статистических различий между воздействием магнитной компоненты и воздействием электромагнитного поля согласно t-тесту не наблюдалось.

Таблица 2

Результаты t-теста по сравнению показателей ККГ для электрической и магнитной составляющих ЭМИ

| Донор | Количество исслед. ядер | Среднее значение | Среднекв. отклонение | Стандартная ошибка среднего | t-критерий | Уровень значимости |
|-------|-------------------------|------------------|----------------------|-----------------------------|------------|--------------------|
| А | 30 | 23,4 | 1,8 | 0,33 | 71,5 | <0,001 |
| В | 30 | 21,6 | 1,7 | 0,32 | 67,8 | <0,001 |
| С | 30 | 16,1 | 1,4 | 0,25 | 65,2 | <0,001 |
| D | 30 | 23,2 | 1,4 | 0,26 | 88,2 | <0,001 |
| E | 30 | 23,6 | 1,8 | 0,32 | 73,0 | <0,001 |

Результаты двухфакторного анализа ANOVA представлены в таблице 3.

Таблица 3

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA для данных второго этапа эксперимента

| Фактор | Количество степеней свободы | Общая сумма квадратов | Средний квадрат | Критерий Фишера | Уровень значимости |
|-----------|-----------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| Донор | 4 | 860,7 | 215,2 | 4,4 | 0,04 |
| Компонент | 2 | 998,9 | 499,5 | 10,1 | 0,01 |

Согласно полученным результатам, критерий Фишера максимален для фактора «компонент». Уровень значимости в обоих случаях меньше установленного (0,05), следовательно, значения критерия Фишера для каждого фактора является статистически значимой величиной. Таким образом, из таблицы 3 следует, что компоненты ЭМИ оказывают значительное влияние на изменение показателя КГГ, в то время как фактор «Донор» влияет слабее.

Как следует из полученных выше результатов, ЭМИ с частотой 8 ГГц и плотностью потока мощности порядка 60 мВт/см² оказывает большее влияние на ядро клетки (повышение гетерохроматинизации), чем на нарушение целостности мембран (рост показателя ОКИ). Таким образом, наиболее значимый эффект, наблюдаемый нами в эксперименте, заключается в конденсации хроматина. Известно о наличии электростатического взаимодействия между отрицательно заряженной ДНК и положительно заряженными белками-гистонами в нуклеосоме [17], а также что данное взаимодействие во многом обуславливает состояние хроматина [18-21]. Существует несколько представлений о механизмах влияния ЭМИ на живые организмы, основным из которых является поляризация связанных зарядов, ориентация постоянных диполей и перемещение свободных ионов [22, 23]. Важную роль в этом механизме играет электрическое поле. На уровне нуклеосомы влияние электрической компоненты ЭМИ должно проявляться следующим образом: под действием облучения происходит перераспределение заряда компонентов нуклеосомы, что в свою очередь приведет к ослаблению или усилению связи гистон-ДНК, то есть к деконденсации или конденсации хроматина, соответственно. Полученные нами результаты косвенно согласуются с этими представлениями, а именно, на уровне хроматина нами наблюдался больший эффект действия электрической составляющей ЭМИ, чем магнитной. Отметим, однако, что это не исключает роли магнитного поля в отклике клеток. Известно [22, 23], что магнитные поля индуцируют электрические токи в организме, зависящие от условий облучения и расположения объекта в поле, которые в свою очередь действуют по описанной выше схеме. Данная модель соответствует полученным в работе результатам: и при действии как электрической, так и магнитной составляющей ЭМИ наблюдается увеличение показателя КГГ, однако действие электрического поля на хроматин выражено сильнее, чем действие магнитного.

ВЫВОД

Результаты, полученные в данной работе, указывают на существование статистически значимого отклика клеток буккального эпителия человека на электромагнитное излучение на частоте 8 ГГц и плотности потока мощности 60 мВт/см², проявляющегося в изменении количества гранул гетерохроматина и проницаемости мембран относительно контрольного значения.

Показано, что электрическая составляющая электромагнитного поля 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 не наблюдалось. Полученные результаты указывают на возможный механизм взаимодействия электромагнитного излучения сантиметрового диапазона с клеточным хроматином, в основе которого лежит изменение степени взаимодействия ДНК-гистон.

Список литературы

1. Repacholi M.H. Radiofrequency field exposure and cancer: What do the laboratory studies suggest? / M.H. Repacholi // *Env. Yealth Res. Persp.* – 1997. – Vol.105, Suppl. 6. – P. 1565-1568.
2. Szmidielski S. Cancer morbidity in subjects occupationally exposed to high frequency (radio-frequency and microwave) electromagnetic radiation / S. Szmidielski // *Sci. Total Environ.* – 1996. – Vol.160. – P. 9-17.
3. Kerbacher J.J. Influence of Radiofrequency Radiation on Chromosome Aberrations in CHO Cells and Its Interaction with DNA-Damaging Agents / J.J. Kerbacher, M.L. Meltz, D.N. Erwin // *Radiation Research.* – 1990. – Vol. 123, No. 3. – P. 311-319.
4. Изменение свойств клеточных мембран, хроматина и электрокинетических свойств ядер клеток человека при действии низкоэнергетического микроволнового облучения / Ю.Г. Шкорбатов, В.Г. Шахбазов, В.В. Навроцкая [и др.] // *Матер. 11 Международ. Крымской конф. CriMiCo.* – 2001. – С. 92-950.
5. The influence of differently polarized microwave radiation on chromatin in human cells / Y.G. Shckorbatov, V.N. Pasiuga, N.N. Kolchigin [et al.] // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2009. – Vol. 85, No.4. – P. 322–329.
6. Shckorbatov Y. Age-related changes in the state of chromatin in human buccal epithelium cells / Y. Shckorbatov // *Gerontology.* – 2001. – Vol.47. – P. 224–225.
7. Microwave irradiation influences on the state of human cell nuclei / Y.G. Shckorbatov, V.G. Shakhbazov, N.N. Grigoryeva [et al.] // *Bioelectromagnetics.* – 1998. – Vol. 19. – P. 414–419.
8. Changes in the state of chromatin in human cells under the influence of microwave radiation / Y.G. Shckorbatov, V.G. Shakhbazov, V.V. Navrotska [et al.] // *16th International Wroclaw Symposium and Exhibition on electromagnetic compatibility, Wroclaw Part.* – 2002. – Vol. 1. – P. 87–88.
9. Microwaves from GSM mobile telephones affect 53BP1 and g-H2AX foci in human lymphocytes from hypersensitive and healthy persons / E. Markova, L. Hillert, L. Malmgren [et al.] // *Environmental Health Perspectives.* – 2005. – Vol. 113. – P. 1172–1177.
10. Sarimov R. Nonthermal GSM microwaves affect chromatin conformation in human lymphocytes similar to heat shock / R. Sarimov, L.O. Malmgren, E. Markova // *Plasma Science, IEEE Transactions.* – 2004. – Vol. 32. – P. 1600–1608.
11. The process of recovery of cell membrane damage produced by the low-level microwave radiation / V.N. Pasiuga, Yu.G. Shckorbatov, N.N. Kolchigin [et al.] // *International Conference on Antenna Theory and Techniques (ICATT)* – 2009. – P. 360-362.
12. On age-related changes of cell membrane permeability in human buccal epithelium cells / Yu.G. Shckorbatov, V.G. Shakhbazov, A.M. Bogoslavsky [et al.] // *Mech. Ageing and Develop.* – 1995.– Vol. 83, No 1.– P.87-90.

13. Влияние микроволнового излучения на частотах мобильной связи и сети WiMAX на состояние хроматина клеток буккального эпителия человека / О.В. Бойко, А.О. Лантушенко, Г.А. Лукьянчук [и др.] // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2010. – Том 23 (62), № 4. – С. 56-65.
14. 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. [и др.] // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2011. – Том 24 (63), № 4. – С. 282-291.
15. Тартаковский А.Д. Питательные среды для культивирования клеток млекопитающих. Методы культивирования клеток / Тартаковский А.Д. – Л.: Наука, 1988. – С.44-63.
16. Shckorbatov Y. He-Ne laser light induced changes in the state of the chromatin in human cells / Y. Shckorbatov // Naturwissenschaften. – 1999. – Vol. 86. – P. 450-453.
17. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution / K. Luger, A.W. Mader, R.K. Richmond [et al.] // Nature. – 1997. – Vol. 389. – P. 251-260.
18. Roth S.Y. Chromatin condensation: does histone H1 dephosphorylation play a role? / S.Y. Roth, C.D. Allis // Trends in biochem.sciences. – 1992. – Vol.17. – P. 93-98.
19. Hilder V.A. Studies on the Template Activity of "Isolated" Xenopus Erythrocyte Nuclei / V.A. Hilder, N. Maclean // J Cell Sci – 1974. – Vol.16. – P. 133-142.
20. Korolev N. Physicochemical analysis of electrostatic foundation for DNA–protein interactions in chromatin transformations / N. Korolev, O.V. Vorontsova, L. Nordenskiöld // Progr. in biophysics and mol. biology. – 2007. – Vol. 95. – P. 23-49.
21. Korolev N. Modelling chromatin structure and dynamics: Status and prospects / N. Korolev, Y. Fan, A.P. Lyubartsev [et al.] // Current Opinion in Structural Biology. – 2012. – Vol. 22(2). – P. 151-159.
22. McKinlay A. ICNIRP - basis for EMF exposure guidelines / A. McKinlay, J. Bernhardt // 3rd International EMF Seminar in China: Electromagnetic Fields and Biological Effects. – 2003. – P. 63-67.
23. Bernhardt J.H. Non-ionizing radiation safety: radiofrequency radiation, electric and magnetic fields / J.H. Bernhardt // Phys. Med. Biol. – 1992. – Vol. 37(4). – P. 807-844.

Скамрова Г.Б. Вплив електричного і магнітної складової електромагнітного поля на проникність мембран і стан хроматину в ядрах клітин буккального епітелію людини / Г.Б. Скамрова, М.П. Євстигнєєв, А.М. Трушкин, Ю.Г. Шкорбатов // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 187-195.

Досліджено вплив низькоінтенсивного електромагнітного випромінювання з частотою 8 ГГц, а також вплив електричної та магнітної складової випромінювання окремо на проникність мембран і стан хроматину в ядрах клітин буккального епітелію людини. Спостерігався статистично значимий відгук клітини на дане випромінювання що проявляється в збільшенні кількості гранул гетерохроматину і проникності мембран відносно контролю. Електрична складова електромагнітного випромінювання здійснювала найбільший вплив на процес утворення гетерохроматину.

Ключові слова: мікрохвильове випромінювання, гетерохроматин, проникність мембрани, буккальний епітелій.

Skamrova G.B. The effect of mobile phone and WiMAX network microwave radiation on membrane permeability of human buccal epithelium cells / G.B. Skamrova, M.P. Evstigneev, A.N. Trushkin, Y.G. Shckorbatov // Scientific Notes OF Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 187-195.

The effect of low-intensity electromagnetic radiation at 8 GHz frequency, and the influence of electrical and magnetic radiation components separately on membrane permeability and chromatin state in the nuclei of human buccal epithelium cells was investigated. The statistically meaningful cells response to this radiation manifested by increase in the number of heterochromatin granules and membrane permeability with respect to control mean was observed. The electrical component of electromagnetic radiation has the greatest influence on the heterochromatin formation.

Keywords: microwave radiation, heterochromatin, membrane permeability, buccal epithelium.

Поступила в редакцію 11.09.2012 г.