

## ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК, ИОНИЗИРУЮЩИЕ ИЗЛУЧЕНИЯ И МАГНИТНЫЕ ПОЛЯ

Е.Е. Текуцкая, М.Г. Барышев

Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия

### ВВЕДЕНИЕ

Эндогенные и экзогенные источники вызывают различные виды окислительного повреждения биополимеров в живых организмах. Известными проявлениями стресс-реакции в клетках являются повреждения биологически значимых молекул и, прежде всего, ДНК. Нарушение или недостаточность процессов репарации и возникающие при этом мутации могут иметь катастрофические последствия для организма [1]. В ряде статей [2–3] было показано, что при воздействии на взвесь лимфоцитов периферической крови человека электромагнитными излучениями происходит образование активных форм кислорода (АФК). Образование АФК может приводить к повреждению первичной структуры ДНК [1], накоплению окисленных азотистых оснований 8-гидрокси-2-деоксигуанозина (8-ОНдГ), а в дальнейшем к появлению однонитевых разрывов (ОР) ДНК. Однонитевые разрывы репарируются по негомولوجичным концам ДНК на всех этапах клеточного цикла, представляющий основной механизм репарации в G1(гуанин) или гомولوجичных рекомбинациях в различных фазах клеточного цикла. Они сопровождают действие многих агентов и являются вторичными, промежуточными дефектами при репарации.

Вопросы, связанные с возможностью инициации окислительного стресса как низкоинтенсивными факторами, такими, как низкочастотное магнитное поле (МП), так и ионизирующими излучениями, используемыми в клинической медицине, и их вкладом в поддержание уже развившегося окислительного стресса, остаются малоизученными.

Цель работы – оценка степени окислительных повреждений ДНК лимфоцитов периферической крови здоровых доноров после воздействия различных видов ионизирующего излучения и переменным МП в диапазоне частот от 3 до 60 Гц *in vitro* с помощью определения уровня содержания 8-ОНдГ в ДНК с использованием иммуноферментного анализа и определения количества ОР ДНК с помощью флуоресцентного метода.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований были лимфоциты, выделенные из периферической крови здоровых доноров (20 человек), мужчины, некурящие, возраст от 21 до 23 лет. Выделение чистой взвеси лимфоцитов из донорской крови проводили в градиенте плотности фиколла-урографина (плотность 1,077 г./мл).

Для изучения влияния СВЧ-излучения на содержание ОР ДНК были использованы СВЧ генераторы: ГКЧ-53, Р2–68, Р2–69 мощностью 3 мВт. Образцы подвергали воздействию излучения в течение 10 минут при разных частотах. При изучении влияния гамма-излучения на содержание ОР ДНК в лимфоцитах был использован радиоактивный препарат  $^{137}\text{Cs}$  с активностью 0,104 МБк.

Также образцы взвеси лимфоцитов в серии экспериментов обрабатывали импульсным газоразрядным лазером на парах меди с длинами волн генерации 510,6 и 578,2 нм.

Обработку образцов переменным МП проводили в химически чистой и стерилизованной пластиковой чашке с толщиной облученного слоя 2 мм. В наших экспериментах мы использовали устройство для компьютерного исследования биологических жидкостей в переменном МП, описанное в работе [4]. Эффективное значение напряженности МП в месте нахождения образца составляло  $(550 \pm 30 \text{ А/м})$ . Измерение напряженности МП производилось прибором «Экофизика-110А» с цифровым измерительным преобразователем для измерения переменных электрических и магнитных полей ПЗ–80-ЕН500.

Температура раствора контролировалась температурным датчиком с точностью до 0,2 °С и составляла 23 °С, напряженностью  $550 \pm 30 \text{ А/м}$ , продолжительность обработки образца достигала 30 мин.

Количество ОР ДНК определяли после щелочной обработки лизатов и добавления бромистого этидия по интенсивности флуоресценции полученных образцов в кварцевой кювете на флуоресцентном спектрофотометре Hitachi F-2700 при длине волны возбуждения – 540 нм и  $\lambda_{\text{полг}}$  610  $\pm 5$  нм как это описано в [3].

С помощью иммуноферментного анализа определено содержание повреждений азотистых оснований 8-OHdG в ДНК лимфоцитов периферической крови человека после воздействия на них переменного МП с использованием моноклональных антител к 8-OHdG. Использовался готовый набор DNA Damage ELISA Kit, определение осуществлялось согласно протоколу. После внесения стоп-растворов измеряли оптическую плотность образцов при длине волны 450 нм на микропланшетном ридере Thermo Fisher Scientific Multiskan (Финляндия).

Определение общего уровня перекисей липидов в образцах плазмы крови проводили с помощью спектрофотометрического метода, используя готовый набор PerOx Immundiagnostic AG (Germany).

Лабораторное диагностическое обследование выполнено в соответствии с обязательным соблюдением этических норм, изложенных в Хельсинкской декларации 1975 г. с дополнениями 1983г.

Результаты обрабатывали статистически (ПО StatPlus). Достоверность различий между выборками оценивали, используя непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

После соответствующей обработки были сняты спектры флуоресценции лизатов лимфоцитов с бромистым этидием, спектральный диапазон регистрации составлял 500–740 нм. Как показали исследования, в лимфоцитах при воздействии гамма-излучения  $^{137}\text{Cs}$  наблюдалось увеличение количества ОР ДНК при увеличении времени облучения. При воздействии излучения в течение 30 минут увеличение составляло  $44,3 \pm 0,4 \%$ , в течение 60 минут на  $56,5 \pm 0,9 \%$ , в течение 90 минут на  $68,3 \pm 0,8 \%$  больше, чем в контрольном образце лимфоцитов без облучения.

Рассмотрено влияние СВЧ-излучения на появление ОР ДНК при облучении лимфоцитов на частотах 3,5 ГГц, 50 ГГц, 70 ГГц. В этом диапазоне работают терапевтические устройства для лечения больных облучением миллиметрового диапазона, в частности, для лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, онкологических (совместно с традиционными методами) и многих других заболеваний. Примером такого прибора может служить терапевтическая установка „ЯВБ-1“ с рабочей длиной волны 5,60 мм (частота –  $53534 \pm 10$  МГц) и плотностью мощности облучения раскрытия рупора – не менее 10 мВт/кв. см. Лимфоциты облучались СВЧ-излучением в течение 10 минут на частотах 3,5 ГГц, 50 ГГц, 70 ГГц при мощности 3 мВт. Выяснено, что с увеличением частоты количество ОР ДНК в лимфоцитах также увеличивается: при воздействии на них СВЧ-излучением с частотой 3,5 ГГц на  $32,3 \pm 0,9 \%$ , с частотой 50 ГГц на  $40,1 \pm 1,1 \%$ , с частотой 70 ГГц на  $49,8 \pm 0,7 \%$  по сравнению с контрольными образцами. Как видно, повреждающий эффект СВЧ-излучения возрастает с увеличением частоты, поэтому использование в КВЧ-терапии, более низких частот, будет увеличивать сохранность иммунокомпетентных клеток крови.

Известно применение в медицине лазера на парах меди (ЛПМ) с длинами волн генерации 510,6 и 578,2 нм. Взвесь лимфоцитов облучалась при данных длинах волн (578,2 и 510,6 нм) в течение 3 и 5 минут при средней мощности около 10 Вт. Наблюдалось увеличение количества ОР ДНК после облучения лазером при длине волны 510,6 нм на  $18,1 \pm 0,7 \%$  (время облучения 3 мин) и на  $6,1 \pm 0,5 \%$  (время облучения 5 мин) при длине волны 578,2 нм на  $18,1 \pm 0,7 \%$  (время облучения 3 мин) и на  $22,3 \pm 0,9 \%$  (время облучения 5 мин). Было обнаружено, что при длине волны генерации 578,2 нм в лимфоцитах образуется меньше ОР ДНК, чем при длине волны генерации 510,6 нм. При увеличении времени воздействия с 3 до 5 мин количество ОР ДНК лимфоцитов увеличивается в среднем в 2 – 2,5 раза.

Одним из ключевых биомаркеров окислительных повреждений нуклеиновых кислот, опосредованных с генерацией АФК, является образование 8-гидрокси-2-деоксигуанозина (8-OHdG) в ДНК [5]. Уровни содержания 8-OHdG и его аналогов 8-гидроксигуанозина и 8-гидроксигуанина связаны со многими дегенеративными заболеваниями. Так, взаимосвязь АФК и использование 8-OHdG в качестве маркера оксидативного стресса были исследованы при многих заболеваниях, включая рак простаты, муковисцидоз, атопический дерматит и ревматоидный артрит, а участок ДНК, содержащий в своём составе оксогуанин, является наиболее стабильным продуктом окисления ДНК [6].

С увеличением частоты МП содержание 8-OHdG в ДНК лимфоцитов изменяется сложным образом. Так, обработка МП с частотой 50 Гц не приводила к увеличению количества 8-OHdG в ДНК. Напротив, при воздействии МП с частотой 3 Гц наблюдалось увеличение количества 8-OHdG в ДНК в 1,5 раза. Изменение количества 8-OHdG в ДНК не может быть вызвано депуринизацией модифицированного основания, так как данная модификация приводит не к ослаблению, а к повышению устойчивости гликозидной связи.

Известно, что гуанин в ДНК имеет самый низкий окислительно-восстановительный потенциал среди природных оснований [7] и в большей степени подвержен окислению. Как донор электронов, он способен отдавать свой электрон различным акцепторам, образуя гуанин-радикал-катион, который затем мигрирует вдоль цепи ДНК по гуанинам прыжковым способом, пока не происходит его окисление с образованием 8-охоГ [8–10]. Возможно, что под действием МП с частотами 3, 30 и 50 Гц происходит и дальнейшее окисление 8-охоГ до таких продуктов, как оксазолон, гуанидиногидантоин и спироиминодигидантоин. Таким образом, при воздействии МП с частотами от 3 до 30 Гц скорость доокисления 8-оксогуанина сопоставима со скоростью окисления нативных гуанинов ДНК. В ходе выполнения экспериментов выяснилось, что скорость образования продуктов окисления азотистых оснований под действием МП зависит от концентрации растворенного кислорода в растворе.

Наличие кислородного эффекта при низкоинтенсивных воздействиях на молекулу ДНК впервые продемонстрировано в работе [11]. В частности, было показано, что образование продуктов депуринизации, урацила и 8-оксогуанина происходит в ДНК за счет АФК, образующихся в растворе под действием тепла. Это согласуется с мнением, изложенным в работах [2, 3], в которых указывается, что одной из причин изменения хемилюминесценции водных растворов ДНК при действии на них ЭМП НЧ может быть образование активных форм кислорода в водном растворе. Об образовании двух- и однонитевых разрывов в растворе ДНК под действием как пероксирадикалов, так и низкочастотного ЭМП отмечается и авторами статьи [8].

Увеличение уровня окисленных модификаций азотистых оснований 8-охоГ в ДНК сыворотки крови здоровых доноров после обработки МП, по-видимому, связано с генерацией АФК при воздействии НЧ МП [3, 8 – 11]. Установлено, что первичной мишенью при воздействии таких низкоинтенсивных физических факторов, как тепло, видимый свет, лазерное излучение (632,8 нм) является растворенный в водной фазе кислород [9]. Как отмечают авторы, начальным этапом для этого процесса является переход кислорода из триплетного в синглетное состояние. По оценке Красновского [12] время жизни синглетного кислорода в биологических системах невелико – от 0,2 для цитоплазмы до 1  $\mu\text{s}$  для плазмы крови и 0,05  $\mu\text{s}$  для мембраны эритроцитов, коэффициент диффузии находится в пределах от  $4 \times 10^{-6}$  до  $7 \times 10^{-7} \text{ см}^2 \text{ с}^{-1}$ . Даже этого короткого времени достаточно для запуска дальнейших процессов: восстановления синглетного кислорода до супероксид-анион радикала, протонированная форма которого дисмутирует с образованием наиболее долгоживущей АФК – перекиси водорода. Процессы образования АФК в водной среде происходят по типу химического осциллятора и постепенно затухают, если не поддерживаются внешней энергией низкоинтенсивных факторов, к которым можно отнести НЧ МП. Процессы такого характера крайне чувствительны к слабым резонансным воздействиям [2].

Несмотря на то, что энергия НЧ МП чересчур мала для какого-нибудь значительного повреждения ДНК, однако, ее может быть достаточно для перехода растворенного кислорода из триплетного в синглетное состояние и дальнейшей генерации каскада АФК. В хромосомах ДНК-связывающие белки защищают ее от окислительных повреждений, что связано как с компактной упаковкой молекулы ДНК, так и с взаимодействием белковых молекул с образующимися АФК. Однако, установлено [9], что долгоживущие белковые радикалы являются источниками продолжительного образования АФК, посредниками окислительного стресса в биологических системах и способны к переносу радикальных повреждений на ДНК. Так, гидропероксиды гистона H1 индуцируют образование 8-оксогуанина в ДНК [6]. Таким образом, все образующиеся при воздействии на растворы ДНК и образцы крови переменным МП АФК и белковые радикалы могут атаковать молекулу ДНК, тем самым приводя к окислительным повреждениям азотистых оснований и накоплению 8-охоГ в ДНК.

Таким образом, появление и накопление окислительных повреждений 8-ОНдГ в ДНК после обработки крови здоровых доноров переменным МП и накопление ОР ДНК может свидетельствовать с одной стороны о генерации АФК при воздействии различных видов ионизирующего излучения и переменным МП, а с другой – об участии АФК в повреждении ДНК.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Генерация активных форм кислорода при воздействии различных видов ионизирующего излучения и переменным МП на образцы крови *in vitro* приводит к накоплению окислительных повреждений азотистых оснований 8-охоГ в ДНК. Дальнейшее развитие окислительного стресса способствует нарушению процессов репарации ДНК и приводит к появлению и накоплению ОР ДНК. В основе подобных типов повреждений ДНК, приводящих к образованию ОР и продуктов окисления азотистых оснований, по-видимому, лежит универсальный механизм, связанный с генерацией АФК в водном растворе под действием МП и ионизирующих излучений. Данный процесс оказывает существенное влияние на функциональные метаболические свойства биосистем в целом.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках научного проекта № МФИ-20.1/119*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease // Cancer Letters 327 (2012) 26–47
2. Текуцкая Е.Е., Барышев М.Г., Ильченко Г.П. Влияние низкочастотного электромагнитного поля на хемилюминесценцию водных растворов ДНК // Биофизика, 2015, Т. 60, вып. 6, С. 1099–1103. DOI 10.1134/S000635091506024X
3. Tekutsкая E.E. Conformational changes in natural biopolymers induced by electromagnetic field and cadmium ion exposure // Russian Open Medical Journal, 2019, V.8, Uss.2, DOI: 10.15275/rusomj.2019.0202. URL: <http://www.romj.org/2019-02>
4. Ильченко Г.П., Барышев М.Г., Текуцкая Е.Е., Шелистов В.С., Никитин А.В. Устройство для поиска оптимальных параметров обработки биологических объектов переменным магнитным полем // Измерительная техника, 2017, №6. С. 69–72 DOI: 10.1007/s11018-017-1247-7
5. Huizhen W., Xin Z. Magnetic fields and reactive oxygen species // International Journal of Molecular Sciences, V. 18, 2017 URL: [doi:10.3390/ijms18102175](https://doi.org/10.3390/ijms18102175) [October 18, 2017]
6. Рогачева М.В., Кузнецова С.А. Репарация 8 оксогуанина в ДНК. Механизмы ферментативного катализа // Успехи химии, 2008. Т. 77, № 9. С. 817–843.
7. Страйер Л. Биохимия Т.3, Москва: Мир. 1985
8. Текуцкая Е.Е., Барышев М.Г., Гусарук Л.Р., Ильченко Г.П. Окислительные повреждения ДНК при действии переменного магнитного поля // Биофизика, 2020, Т. 65, № 4, С. 664–669 DOI: 10.31857/S0006302920040055
9. Chernikov A.V., Gudkov S.V., Shtarkman I.N., Bruskov V.I. Oxygen effect in heat-induced DNA damage // Biophysics. 2007. Т. 52, № 2, С. 185–190
10. Текуцкая Е.Е., Лупаш Н.Г., Майорова А.В. Медико-социальные аспекты экологической гастроэнтерологии // Журнал «Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология» 2013. № 1. С. 015–019
11. Гудков С.В., Карп О.Э., Гармаш С.А. и др. Образование активных форм кислорода в воде под воздействием видимого и инфракрасного излучения в полосах поглощения молекулярного кислорода // Биофизика. 2012. Т. 57. № 1. С. 5–13.
12. Krasnovsky A.A. Membrane and cell biology, 1998, Т.15, С. 530