



Биол. журн. Армении, 1 (70), 2018

ВЛИЯНИЕ НЕТЕПЛОВОГО МИЛЛИМЕТРОВОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ ДНК ОПУХОЛИ САРКОМЫ 45

А.А. ТАДЕВОСЯН¹, Л.Н. ПЕТРОСЯН²,
М.А. ШАГИНЯН³, Г.Л. КАНАРЯН⁴

¹Ереванский государственный медицинский университет имени М.Гераци,

²Государственный инженерный университет,

³Ереванский госуниверситет,

⁴Ванадзорский государственный университет имени Ов.Туманяна
anitadevosyan85@gmail.com

Исследовалось влияние нетеплового миллиметрового электромагнитного излучения на водно-солевой раствор ДНК, выделенных из печени здоровых животных и с саркомой 45. Из кривых плавления необлученной и облученной ДНК определяли параметры плавления. В зависимости от длительности облучения (до 110 мин) с резонансными 64,5 ГГц и 50,3 ГГц частотами интервал плавления практически не меняется, а температура плавления ДНК из опухоли саркомы 45 увеличивается на $\approx 1.5^{\circ}\text{C}$. Предполагается, что более сильное увеличение термостабильности опухолевой ДНК по сравнению с ДНК нормы обусловлено ее структурными особенностями.

Нетепловые миллиметровые электромагнитные волны – ДНК – метилирование

Աշխատանքում ուսումնասիրվել է ոչ ջերմային միլիմետրային էՄ ալիքների ազդեցությունը առողջ առնետի լյարդից և սարկոմա-45-ից անջատված ՂՆԹ-ի վրա: Հալման կորեից որոշվել են ճառագայթված և չճառագայթված ՂՆԹ-ի հալման պարամետրերը: Ռեզոնանսային (ջրի մոլեկուլի համար) 64.5 ԳՀց և 54.3 ԳՀց հաճախություններով ճառագայթման դեպքում, կախված ճառագայթման տևողությունից (110 րոպե), հալման միջակայքը (ΔT) գրեթե չի փոփոխվում, իսկ սարկոմա-45-ից անջատված ՂՆԹ-ի հալման ջերմաստիճանը (T_m) մեծանում է $\approx 1.5^{\circ}\text{C}$: Ենթադրվում է, որ ու-ՂՆԹ-ի ջերմակայունության մեծացումը համեմատած ա-ՂՆԹ-ի հետ պայմանավորված է նրա կառուցվածքային առանձնահատկություններով:

Ոչ ջերմային միլիմետրային էլեկտրամագնիսական ալիքներ – ՂՆԹ – մեթիլացում

The influence of non-thermal millimeter electromagnetic waves on DNA from the liver of healthy rats and Sarcoma-45 was studied. The melting parameters of non-irradiated and irradiated DNA were determined from melting curves. The melting range (ΔT) of DNA from the liver of healthy rats and Sarcoma-45 under the influence of resonant (for water molecules) 64.5 GHz and 54.3 GHz frequencies as well as duration of irradiation (110 min) were not altered within the experimental error, while the melting temperature T_m of tumor DNA increases. These results assumed that the increase in thermostability is more profound in case of tumorous DNA than in healthy rat DNA due to structural peculiarity of DNA.

Non-thermal millimeter electromagnetic waves – DNA – methylation

Многочисленные физические факторы внешней среды, играющие важную роль в процессах жизнедеятельности, имеют электромагнитную природу. Электромагнитные поля искусственного происхождения разных частотных диапазонов оказывают выраженное воздействие на живые организмы и находят широкое практическое применение [7,8,10,11]. Сравнительно недавно было показано [4,7], что нетепловые миллиметровые электромагнитные (МЭМ) волны определенных частот обладают противоопухолевой активностью. При облучении крыс с саркомой 37 МЭМ волнами частотой 53,5 ГГц ежедневно в течение 30 мин рост опухоли уменьшается на 33,5%, а степень метилирования ДНК опухоли уменьшается приблизительно в 2,5 раза [4].

Учитывая, что вследствие облучения крыс рост опухоли замедляется и степень метилирования ДНК уменьшается [4,7], в данной работе исследовалось влияние *in vitro* МЭМ волн на термостабильность ДНК, выделенной из опухоли.

Материал и методика. В опытах использовали здоровых и трансплантированных саркомой 45 белых беспородных крыс массой 100-200 г. На 15-е сутки опыта животных декапитировали и извлекли у них печень и опухоль. ДНК из тканей выделяли по модифицированному методу Мармура, что подробно описано в работах [4, 7]. Использовали ДНК, выделенную из печени здоровых крыс (зДНК) и из опухоли крыс с саркомой 45 (оДНК). Содержание белка в зДНК составляло $1,5 \pm 0,2$ %, а в оДНК – $1,3 \pm 0,2$ %. Для зДНК и оДНК соотношение A_{260}/A_{280} находилось в области 1,8-1,9, а соотношение A_{260}/A_{230} между 2,2-2,4. Маточные растворы ДНК были приготовлены в 1мМ раствора NaCl и выдерживались до полного растворения нативной соли ДНК при 0-2°C. Концентрация ДНК в маточном растворе приблизительно 1,5 г/л. Исследуемый раствор был приготовлен из маточного раствора за несколько часов до измерений. Вся процедура осуществлялась при комнатной температуре. Все образцы ДНК изучали в водном растворе, содержащем 0,1М NaCl, 10 мМ Трис, 0,5 мМ ЭДТА, pH=7,4. pH среды измеряли на pH-673-метре при 25°C.

Спектры поглощения и кривые плавления получены на спектрофотометрах SPECORD M40 (Германия). Для снятия кривых плавления (зависимость поглощения при 260 нм от температуры) обычно использовался непрерывный режим нагрева раствора ДНК со скоростью 0,3°C/мин. Измерения проводили в термостатированных ячейках с использованием 10 мм кварцевых кювет с плотно закрывающимися крышками. Точность определения температуры $\pm 0,05^\circ\text{C}$, а оптической плотности – 10^{-4} оптических единиц. Кривые плавления каждого образца снимались по 6-8 раз. Из каждой кривой плавления вычислялись температура (T_m) и интервал (ΔT) плавления, затем эти параметры усреднялись. Среднее квадратическое отклонение оценивалось по формуле

$$\sigma = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{d_i^2}{n-1}},$$

где d_i – отклонение от среднего арифметического для i -го измерения, n – количество измерений. Результаты представлены в виде: среднее значение $\pm$ стандартная ошибка, рассчитанные по n независимым экспериментам.

Облучение проводили в специальном стеклянном сосуде. Растворы сверху закрывались прозрачной для излучения тонкой хлорвиниловой пленкой. Толщина облучения образца приблизительно 1 мм. Для облучения использовались генератор ГИ-142 и ГИ-141 (Россия). Интервал частоты для ГИ-141 составляет 37,5-53,7 ГГц (плотность потока на листе нахождения образца составляет 0,6 мВт/см²), для ГИ-142 – 53,3-78,33 ГГц (плотность потока – 50 мкВт/см²). Растворы облучали резонансными (50,3 и 64,5 ГГц) и нерезонансными (48,3 ГГц) частотами колебаний водных молекулярных структур.

Результаты и обсуждение. Водно-солевые растворы зДНК и оДНК, приготовленные для спектрофотометрических измерений, облучались 30, 40, 60, 90 и 110 мин соответственно. Получены кривые плавления необлученных и облученных с резонансными (64,5 и 50,3 ГГц) и нерезонансной (48,3 ГГц) частотами коле-

баний водных структур зДНК и оДНК. На рис. 1 приведены кривые плавления зДНК и оДНК необлученных и облученных 90 мин с частотой 50,3 ГГц. Как следует из рис. 1, вследствие облучения термостабильность ДНК увеличивается – увеличение больше для оДНК.

Из кривых плавления определены параметры плавления – температура (T_m) и интервал (ΔT). В табл. 1 приведены данные о параметрах плавления зДНК и оДНК, облученных резонансной 50,3 ГГц частотой в зависимости от длительности облучения. Как следует из табл. 1, с увеличением длительности облучения увеличивается T_m оДНК и зДНК: увеличение термостабильности происходит в основном в интервале до 90 мин. При облучениях свыше 90 мин параметры плавления почти не меняются. При облучении 90 мин резонансной частотой 50,3 ГГц T_m зДНК увеличивается. В работе [6] было показано, что МЭМ волны, совпадающие по частоте с резонансными колебаниями водных структур, не поглощаются поверхностным слоем водно-солевых растворов, проникают в более глубокие слои жидкости и приводят к дегидратации присутствующих в растворе ионов. Поэтому наблюдаемые более сильные изменения параметров плавления оДНК, возможно, обусловлены структурными отличиями оДНК по сравнению с зДНК [1,3,9], вследствие чего гидратация оДНК в определенных гиперметилованных участках может сильно отличаться от гидратации остальных участков [2,7]. Вследствие дегидратации присутствующих в растворе ионов Na^+ и более сильной дегидратации оДНК при облучении резонансными частотами, термостабильность оДНК увеличивается больше, что и наблюдалось нами в данной работе (табл. 1 и 2).

Как следует из табл. 2, при облучении нерезонансной частотой 48,3 ГГц параметры плавления также изменяются, однако эти изменения находятся в пределах погрешности эксперимента.

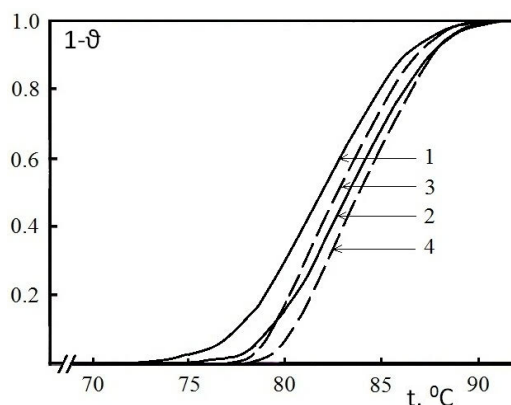


Рис. 1. Кривые плавления необлученных (1,3) и облученных (2,4) 90 мин с частотой 50,3 ГГц для оДНК (1,2) и зДНК (3,4), θ – степень спиральности ДНК.

Известно, что резонансные частоты поглощения для ДНК находятся в области от 2 до 9 ГГц [2,7]. Следовательно, увеличение термостабильности ДНК, вследствие облучения МЭМ волнами резонансных для колебаний молекулярных водных структур частот, обусловлено опосредственным влиянием МЭМ волн на ДНК, вследствие изменения структуры связанной воды: имеет место дегидратация нуклеотидных пар и ионов Na^+ , находящихся в непосредственной близости по отношению к молекуле ДНК, вследствие чего они более эффективно стабилизируют

ют двойную спираль ДНК, причем более сильно для миллиметровых волн резонансных частот (табл. 2).

Таблица 1. Температура и интервал плавления ДНК, выделенных из печени здоровых крыс и опухоли саркомы 45, облученных МЭМ волнами с частотой 50,3 ГГц.

Длительность облучения, мин	оДНК		зДНК	
	$T_m, ^\circ\text{C}$	$\Delta T, ^\circ\text{C}$	$T_m, ^\circ\text{C}$	$\Delta T, ^\circ\text{C}$
0	82.0±0.2	6.6±0.2	83.1±0.1	5.7±0.1
30	82.1±0.2	6.6±0.1	83.0±0.2	5.8±0.1
40	82.2±0.1	6.5±0.2	83.5±0.1	5.7±0.1
60	82.8±0.1	6.3±0.1	83.8±0.2	5.6±0.2
90	83.3±0.2	6.2±0.2	83.9±0.1	5.6±0.2
110	83.2±0.1	6.2±0.2	84.0±0.2	5.6±0.1

Применение: Интервал плавления определяли как разность температур в точках, где оптическая плотность раствора ДНК изменяется от 17 до 83%.

Таблица 2. Температура и интервал плавления ДНК, выделенных из печени здоровых крыс и опухоли саркомы 45, облученных МЭМ волнами в течение 90 мин

Частота облучения, ГГц	оДНК		зДНК	
	$T_m, ^\circ\text{C}$	$\Delta T, ^\circ\text{C}$	$T_m, ^\circ\text{C}$	$\Delta T, ^\circ\text{C}$
0	82.0±0.2	6.6±0.2	83.1±0.1	5.7±0.1
64.5	83.5±0.2	6.2±0.2	84.1±0.2	5.6±0.2
50.3	83.3±0.2	6.2±0.2	83.9±0.1	5.6±0.2
48.3	82.3±0.2	6.5±0.1	83.3±0.2	5.7±0.1

Применение: Значения приведенных данных представляют средние арифметические из 6-и измерений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабаян Ю.С., Гарибян Д.В. Структурные особенности ДНК опухоли саркомы 45. Биофизика, 35, 4, с. 592-596, 1990.
2. Бабаян Ю.С., Маркарян А.Ш., Калантарян В.П., Казарян Р.С., Парсадян М.А., Вардеванян П.О. Воздействие низкоэнергетического миллиметрового электромагнитного излучения на стабильность молекул ДНК. Биофизика, 52, 2, с. 382-384, 2007.
3. Житина Г.П., Скалацкая С.И., Бунина Е.Ф., Круглякова К.Е., Эмануэль Н.М. О природе дефектов вторичной структуры ДНК опухолевых клеток. ДАН СССР, 265, 5, с. 1268-1272, 1982.
4. Калантарян В.П., Бабаян Ю.С., Нерсисян Л.Э., Даниелян И.С., Агаронян А.С., Худавердян Н.В., Гарибян Д.В. Влияние миллиметрового излучения на ДНК опухолевой клетки in vivo. Биомед. Электроника, 12, с. 12-16, 2010.
5. Петросян В.И., Сеницын Н.И., Елкин В.А., Девятков Н.Д., Гуляев Ю.В. Роль резонансных молекулярно-волновых процессов в природе и их использование для контроля и коррекции состояния экологических систем. Биомед. Радиоэлектроника, 5-6, с. 62-114, 2001.
6. Kalantaryan V.P., Hakobyan S.N., Babayan Yu.S. Influence of millimeter wave electromagnetic radiation of nonthermal intensity on density of aqueous solutions. J.Contemporary Phys., 52, 1, p. 58-62, 2017.
7. Kalantaryan V., Martirosyan R., Babayan Yu., Nersesyan L., Stepanyan H. Preliminary results of influence of nonionizing electromagnetic radiation on tumor and healthy DNA and role of water. Amer. J. Med. Biol. Res., 2, 1, p. 18-25, 2014.

8. *Logani M.K., Srabo I., Makar V.R., Bhanushali A., Alekseev S.I., Ziskin M.C.* Effect of millimeter wave irradiation on tumor metastasis. *Bioelectromag*, 2007, v. 27, p. 258-264.
9. *Patha M.D., Rakesh S.* DNA methylation and cancer. *Clinical Oncology*, 22, 22, p. 4632-4642, 2004.
10. *Vardevanyan P.O., Shahinyan M.A., Nerkaryan A.V., Mikaelyan M.S., Darbinyan M.R.* Effect of low intensity EMW EHF on suspension density of rat blood erythrocytes. *Braz. J. of Biol. Sci.*, 2, 4, p. 193-197, 2015.
11. *Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Shahinyan M.A., Mikaelyan M.S.* Influence of millimeter electromagnetic waves on fluorescence of water-saline solutions of human serum albumin. *J. of Appl. Spectr.*, 83, 3, p. 486-489, 2016.

Поступила 09.11.2017