

ВЛИЯНИЕ НИЗКОЧАСТОТНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ДНК

© 2015 г. Е.Е. Текуцкая, М.Г. Барышев, Г.П. Ильченко

Кубанский государственный университет, 350040, Краснодар, ул. Ставропольская, 149

E-mail: tekytska@mail.ru

Поступила в редакцию 29.09.14 г.

После доработки 26.08.15 г.

Показано, что ампликоны ДНК вирусов гепатита (HBV, HCV) способны индуцировать излучение после обработки электромагнитным полем в диапазоне частот от 7,5 до 30 Гц и напряженностью 24–40 А/м, которое регистрируется с помощью метода хемилюминесценции. Наибольшее влияние на водные растворы ампликонов ДНК вирусов гепатита оказывает обработка электромагнитным полем с частотой 9 Гц, наблюдается изменение гидратационной оболочки ампликонов ДНК. Высказано предположение, что изменение гидратной оболочки ДНК под действием низкочастотного электромагнитного поля приводит к восстановлению водородных связей, образованию шивок и в целом к репарации ДНК.

Ключевые слова: ампликоны ДНК, низкочастотное электромагнитное поле, водные растворы, хемилюминесценция.

В настоящее время накопилось достаточно большое количество достоверных экспериментальных данных о нетепловых эффектах электромагнитных полей (ЭМП) низкой частоты, а также о значительной чувствительности к электромагнитным полям живых организмов самых различных классов – от одноклеточных до человека [1–6]. Особый интерес привлекают биополимеры на основе нуклеиновых кислот. Авторами работы [7] установлено, что в молекуле ДНК возможен перенос заряда на большие расстояния, а также возможно испускание фотонов при возбуждении или после возбуждения молекулы ДНК. Кроме того, в работах [8,9] указывается, что некоторые вирусные ДНК-последовательности могут индуцировать низкочастотные электромагнитные волны в водных растворах высокой степени разведения.

Ранее в серии работ нами была показана возможность регуляции (активации и ингибирования) функциональных метаболических свойств биосистем различных типов с помощью электромагнитного поля низкой частоты [3,4].

Низкочастотное электромагнитное поле используется для изменения скорости ряда важных биохимических процессов: репарации отдельных участков ДНК с выделенными соматическими мутациями; генерации активных форм кислорода нейтрофилами; изменение

уровня содержания цитокинов и др. Однако до сих пор не решен вопрос, является ли электромагнитное поле низкой частоты нетеплового уровня воздействием стрессором для биологических систем и, соответственно, может ли такое воздействие запускать адаптивные реакции в клетках. Известными проявлениями стресс-реакции в клетках являются повреждения биологически значимых молекул и прежде всего ДНК.

Значительное число новых исследований фундаментальных свойств водных растворов и их чувствительности к слабым физическим факторам подтверждает гипотезу об определяющей роли водной среды в качестве первичной мишени слабых воздействий [2]. Любое воздействие растворителя на макромолекулу может осуществляться только посредством изменения состава ее ближайшего окружения (гидратационного слоя). Предполагается, что гидратационный слой играет существенную роль в определении структурной стабильности биологических макромолекул [10].

Целью данной работы было изучение влияния низкочастотного электромагнитного поля на хемилюминесценцию водных растворов ампликонов ДНК вирусов гепатита (HBV, HCV) цельной крови человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение ДНК из биологического материала. Объектом исследования были ампликоны

Сокращение: ЭМП – электромагнитное поле.

ДНК вирусов гепатита (HBV, HCV), выделенные из цельной крови человека. ДНК из биопроб выделяли с помощью реактивов готовых коммерческих наборов «ДНК-сорб-В» («АмплиСенс», ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ, Москва) сорбционным способом. Подготовку образцов осуществляли следующим образом: взятие крови проводили в пластиковые пробирки объемом 2,5 мл с добавлением в качестве антикоагулянта динатриевой соли этилендиаминтетрацетата в конечной концентрации 2,0 мг/мл. Содержимое пробирки перемешивали перевертыванием (2–3 раза), центрифугировали при 3000 об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре (18–25°C). Отбирали верхнюю фракцию и переносили в отдельную пластиковую пробирку.

Выделение ДНК из крови производили в стерильном ламинарном боксе «БАВп-01-Ламинар», оснащенном термостатом для пробирок типа «эппендорф», вакуумным отсасывателем для удаления надосадочной жидкости и вортексом.

В качестве исследуемого материала для выделения ДНК были отобраны следующие пробы: положительный контроль выделения, отрицательный контроль выделения и внутренний контроль выделения, представляющий собой образцы крови здорового человека и крови с нагрузками. Объем каждой пробы составил 0,1 мл. Отличительной особенностью внутреннего контроля выделения является то, что он представляет не плазмидную ДНК, а модифицированный с помощью генно-инженерных манипуляций фаг лямбда. Использование фага лямбда позволяет предъявлять более низкие требования к условиям хранения препарата по сравнению с плазмидной ДНК. После отбора необходимого материала для исследований в пробирки вносили лизирующий раствор гуанидина. Отобранные и подготовленные описанным выше способом пробы подвергали тщательному ресуспензированию на вортексе для удаления фрагментов клеточных органелл и мембран. После этого во все пробы вносили универсальный сорбент по 25 мкл в каждую пробирку. Процедуру ресуспензирования производили несколько раз и сопровождали последующим центрифугированием при 5000 об/мин. После этого надосадочную жидкость удаляли с помощью вакуумного отсасывателя.

Далее пробы с сорбентом многократно и тщательно промывали и затем высушивали при температуре 65°C в течение 5–10 мин. После этого в пробирки добавляли по 50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК. Полученную жидкость ресуспензировали на вортексе, высушивали в

термостате около 5 мин при температуре 65°C и снова центрифугировали уже при 12000 об/мин в течение 1 мин. После проделанных процедур надосадочная жидкость содержала очищенную ДНК, которую отделяли от осадка с помощью вакуумного отсасывателя и помещали в отдельные пробирки. Концентрацию ДНК в конечном растворе определяли спектрофотометрически, используя коэффициент экстинкции, равный $E_{260\text{nm}} = 200$.

Режимы проведения ПЦР. Для проведения ПЦР использовали реактивы из набора «АмплиСенс», включающие в себя полимеразу (TagF), ТМ-ревертазы (MMIv) и буферные растворы. Реакционные смеси готовили из расчета на 10 исследуемых образцов. ПЦР проводили на приборе для проведения полимеразной цепной реакции роторного типа Rotor-Gene Q (Австралия).

Для осуществления ПЦР в приборе Rotor-Gene Q на программном уровне задавали определенные температурные режимы, специально подобранные для каждого этапа реакции. Детекция флуоресценции происходила на последних циклах амплификации на детекторах Green и Yellow. Режимы работы Rotor-Gene Q, используемые при проведении эксперимента, отражены в таблице.

Программа амплификации включала в себя расплетение двойных спиралей ДНК, отжиг праймеров, циклирование и элонгацию цепи для накопления коротких отрезков ДНК. Длина полученных ампликонов составляла примерно 410 нуклеотидных пар.

Для проведения экспериментов использовали дистиллированную воду с удельным сопротивлением 300 кОм/см.

Обработка проб электромагнитным полем. Обработку водных растворов ампликонов ДНК электромагнитным полем низкой частоты проводили в химически чистой стерильной пластиковой посуде при температуре 20–22°C и толщине облученного слоя 2 мм. Время обработки составляло 10 мин. Напряженность магнитной составляющей поля составляла (24 ± 4) А/м, частоту изменяли с шагом 0,2 Гц от 3 до 30 Гц.

Установка для обработки водных растворов ампликонов ДНК электромагнитным полем низкой частоты состояла из генератора колебаний низкой частоты, заземленной экранированной камеры, излучателя, представляющего собой многослойную катушку, держателя для фиксации посуды с раствором на постоянном расстоянии от излучателя. В качестве генератора синусоидальных колебаний крайне низкочастотного диапазона использовали генератор

Режимы работы Rotor-Gene Q при проведении ПЦР

Этапы ПЦР	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
Плавление	50	15 мин	1
	95	15 мин	1
Отжиг праймеров Циклирование	95	5 с	5
	60	20 с	
	75	15 с	
Наращивание числа ампликонов	95	5 с	40
	60	20 с	
	72	15 с	

ГЗ-118. Нестабильность частоты в диапазоне 3–30 Гц составляла 0,2%. Стенки экранированной камеры состояли из двух слоев: наружного, выполненного из стали толщиной 3 мм, и внутреннего, выполненного из медной фольги. Камера обеспечивала ослабление внешних постоянных (в том числе геомагнитного) и переменных полей не менее чем в 100 раз. Напряженность магнитной составляющей поля, создаваемого излучателем, контролировали измерителем напряженности электрических и магнитных полей ПЗ-80. Обработку электромагнитными полями растворов ампликонов ДНК проводили в течение 8 ч при температуре 19–22°C.

Регистрация хемилюминесценции водных растворов ампликонов ДНК. Измеряли интенсивность собственной хемилюминесценции водных растворов ампликонов ДНК до их обработки ЭМП (контроль) и хемилюминесценции этих же растворов после их обработки ЭМП разной частоты в течение 10 мин. В данном случае индуктором хемилюминесценции является ЭМП, другие стимуляторы хемилюминесценции не использовались. После каждой обработки образца электромагнитным полем низкой частоты снимали зависимости интенсивности хемилюминесценции полученных растворов ампликонов ДНК от частоты электромагнитного поля. Использованный в работе хемилюминометр Lum-5773 измерял интенсивность света, возникающего в химических и биологических образцах, значения интенсивности свечения соответствовали световому потоку, т.е. количеству фотонов в единицу времени. При этом $1 \text{ мВ} \approx 1 \text{ фотону/с}$. Полученные данные обработаны с помощью программы Statistica (версия 6.0).

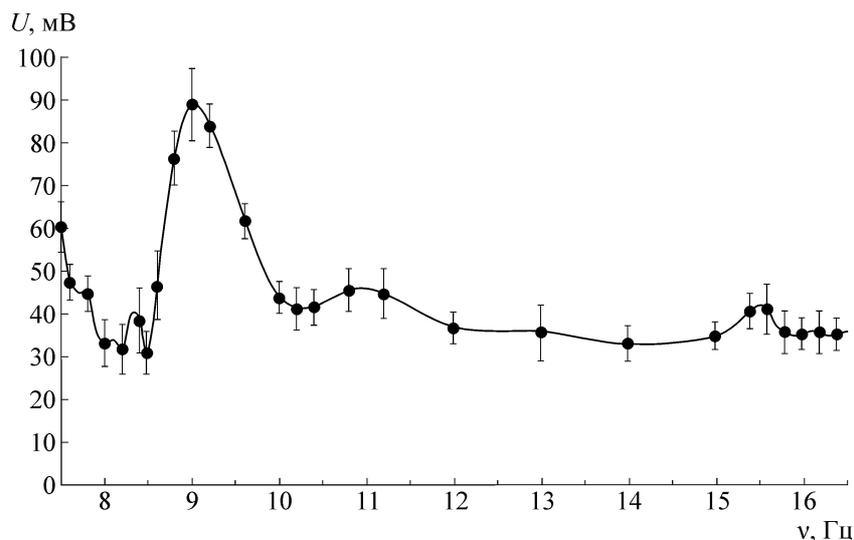
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенного эксперимента получена зависимость интенсивности хемилюминесцен-

ции водных растворов ампликонов ДНК от частоты электромагнитного поля. Для наглядности общего эксперимента по обработке растворов ампликонов ДНК электромагнитным полем целесообразно представить общий усредняющий график зависимости интенсивности хемилюминесценции водных растворов ДНК от частоты электромагнитного поля. Максимальный разброс полученных значений интенсивности хемилюминесценции составлял $\pm 5 \text{ мВ}$. Полученные результаты приведены на рисунке.

Растворы ампликонов ДНК без обработки электромагнитным полем не имели фотонного отклика, а среднее значение напряжения фотоэлектронного умножителя было достаточно мало и составляло в среднем $(30 \pm 2) \text{ мВ}$ – контроль. На рисунке видно, что для обработанных образцов фотонный отклик заметно увеличивается. Установлено, что наибольшая интенсивность хемилюминесценции наблюдается при обработке растворов ампликонов ДНК электромагнитным полем с частотой 9 Гц. Так, по сравнению с контрольным необработанным ЭМП раствором интенсивность хемилюминесценции увеличивалась в 2,5–2,8 раза.

Низкочастотное ЭМП использовалось для изменения скорости протекания ряда важных биопроцессов: репарации отдельных участков ДНК с выявленными соматическими мутациями, генерации активных форм кислорода нейтрофилами, изменения уровня содержания цитокинов и др. [1,2]. Многочисленные явления такого типа объединены тем, что воздействия в них носят характер сигналов, а адекватный результат воздействия при этом зависит не столько от энергии воздействия, сколько от его информационной значимости для мишени. Энергия же ответной реакции заимствуется из энергии самой мишени, которая находится в термодинамически неравновесном состоянии и обладает большим запасом свободной энергии [2].



Зависимость интенсивности хемилюминесценции водных растворов ампликонов ДНК вирусов гепатита (HBV, HCV) от частоты электромагнитного поля, 21°C ($n = 5$, $p = 0,95$, $t_{0,95} = 2,78$).

Согласно точке зрения, высказанной в работах [5,6], низкочастотное ЭМП может выполнять лишь управляющую функцию, производя перераспределение суммарной энергии между компонентами раствора.

Одной из причин обнаруженного увеличения интенсивности хемилюминесценции в водных растворах ампликонов ДНК, обработанных ЭМП низкой частоты, по-видимому, является действие ЭМП на вероятность и скорость переноса протонов по цепочкам водородных связей в жидкой воде, где большинство молекул связано сеткой лабильных водородных связей (кластеры), и в гидратационном слое, непосредственно окружающем молекулы ДНК. Свойства воды в гидратационном слое заметно отличаются от свойств обычной воды. Так, среднее время жизни водородных связей в гидратационном слое в 5–10 раз больше, чем в воде. Время жизни водородных связей между полярными группами макромолекулы (ампликонов ДНК) и поверхностными молекулами воды также заметно больше, чем время жизни водородных связей между двумя молекулами воды в чистой воде [11]. Флуктуация плотности, а также такие свойства воды, как трансляционная диффузия или ориентационная релаксация, значительно замедлены в гидратационном слое. ДНК является спиралевидной, близкой к правильной симметрии, молекулой. Изменение состояния гидратационного слоя может приводить к искривлению спирали, разрывам водородных связей в молекулах ДНК, нарушению стейкинга ее оснований, изменению конформации спирали, что согласуется с мнением авторов

работ [8,9]. Этот процесс, возможно, и продуцирует регистрируемый всплеск хемилюминесценции после обработки растворов ампликонов ДНК ЭМП.

Структурное искривление молекулы ДНК также может происходить и за счет спинового изменения под воздействием только магнитной составляющей поля, как указывается в монографии [2].

Другой причиной изменения хемилюминесценции водных растворов ДНК при действии на них ЭМП низкой частоты может быть образование перекисных соединений в водном растворе. Авторами работ [12,13] показано, что низкочастотное магнитное поле может влиять на вероятность образования пероксирадикалов в биологических системах, ими найдены оптимальные параметры внешнего электромагнитного поля, приводящие к повышению концентрации пероксирадикалов.

Как известно, перекись водорода наряду с люминолом (или люцигенином) используется для усиления (стимуляции) собственной хемилюминесценции биосред [14]. Увеличение/уменьшение концентрации перекиси водорода в растворе ампликонов ДНК также могло бы изменять интенсивность хемилюминесценции. Так, об образовании двух- и односторонних разрывов в растворе ДНК под действием как пероксирадикалов, так и низкочастотного ЭМП указывалось авторами работы [15].

Таким образом, по-видимому, реализуется несколько механизмов влияния ЭМП низкой частоты на интенсивность хемилюминесценции водных растворов ДНК. В целом ЭМП низкой

частоты способно существенно влиять на равновесные концентрации функционально важных состояний биологических макромолекул *in vivo* и способно оказывать влияние на функциональные метаболические свойства биосистем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Н. А. Темурьянц, Б. М. Владимирский и О. Г. Тишкин, *Сверхнизкочастотные электромагнитные сигналы в биологическом мире* (Наук. думка, Киев, 1992).
2. В. Н. Бинги, *Принципы электромагнитной биофизики* (ФИЗМАТЛИТ, М., 2011).
3. Е. Е. Текуцкая, Ю. А. Васильев и А. А. Храмова, *Росс. иммунол. журн.* **8** (3), 466 (2014).
4. Е. Е. Tekutskaya and M. G. Barishev, *Odessa Astronomical Publications* **26** (2), 303 (2013).
5. В. В. Новиков, В. В. Кувычкин и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **44** (2), 224 (1999).
6. В. В. Новиков, *Биофизика* **43** (4), 588 (1998).
7. В. Д. Лахно и В. Б. Султанов, *Биофизика* **48** (5), 797 (2003).
8. L. Montagnier, *J. Physics: Conf. Series* **306**, 53 (2011).
9. L. Montagnier, *Interdiscip. Sci. Comput. Life* **1**, 81 (2009).
10. А. Ф. Бункин, *Биофизика* **54** (3), 396 (2009).
11. Н. В. Пеньков, Н. Э. Швирст, В. А. Яшин и Е. Е. Фесенко, *Биофизика* **58** (6), 933 (2013).
12. В. О. Пономарев, В. В. Новиков, А. В. Карнауков и О. А. Пономарев, *Биофизика* **53** (2), 197 (2008).
13. В. В. Новиков, В. О. Пономарев, Г. В. Новиков и др., *Биофизика* **55** (4), 631 (2010).
14. Ю. А. Владимиров, *Вестн. РАМН*, № 7, 43 (1998).
15. J. L. Phillips, N. P. Singh, and H. Lay, *Pathophysiology* **16**, 79 (2009).

Influence of Low-Frequency Electromagnetic Field on DNA Molecules in Water Solutions

E.E. Tekutskaya, M.G. Barishev, and G.P. Ilchenko

Kuban State University, ul. Stavropolskaya 149, Krasnodar, 350040 Russia

It is shown that the amplicons of hepatitis virus DNA (hepatitis B virus, hepatitis C virus) are capable of inducing radiation after an exposure to electromagnetic fields in the frequency range from 3 to 30 Hz and the field strength, 24-40 A/m, registered by means of a chemiluminescence method. The most effect of the electromagnetic field on water solutions of the amplicons of hepatitis virus DNA occurs at the frequency of 9 Hz, the change in the hydration shell of DNA amplicons is observed. It is suggested that the change in the hydration shell of DNA amplicons exposed to the low-frequency electromagnetic field leads to restoration of hydrogen bonding, stitchings formation and DNA repair as a whole.

Key words: DNA amplicons, low-frequency electromagnetic field, water solutions, chemiluminescence