

ИМПУЛЬСНО-МОДУЛИРОВАННОЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ КРАЙНЕ ВЫСОКИХ ЧАСТОТ ЗАЩИЩАЕТ ДНК КЛЕТОК ОТ ПОВРЕЖДАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ *in vitro*

© 2015 г. А.Б. Гапеев* **, Н.А. Лукьянова* **

* **Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3;

* **Пущинский государственный естественно-научный институт,

142290, Пущино Московской области, просп. Науки, 3

E-mail: a_b_g@mail.ru

Поступила в редакцию 10.06.15 г.

После доработки 25.06.15 г.

С помощью щелочного варианта метода «комета-тест» исследованы защитные эффекты электромагнитного излучения крайне высоких частот при повреждающем действии рентгеновского излучения, перекиси водорода и алкилирующего агента метилметансульфоната на ДНК лейкоцитов периферической крови мыши. Показано, что предварительное облучение клеток низкоинтенсивным импульсно-модулированным электромагнитным излучением (42,2 ГГц, 100 мкВт/см², экспозиция 20 мин, частоты модуляции 1 и 16 Гц) оказывало защитное действие, снижая уровень повреждений ДНК на 20–45% в зависимости от типа генотоксического агента. Эффективность импульсно-модулированного излучения возрастала в ряду метилметансульфонат – рентгеновское излучение – перекись водорода. Непрерывное электромагнитное излучение не оказывало защитного действия. Механизмы обнаруженных защитных эффектов могут быть связаны с индукцией адаптивного ответа наномолярными концентрациями активных форм кислорода, образующимися под действием импульсно-модулированного излучения.

Ключевые слова: электромагнитное излучение крайне высоких частот, импульсная модуляция, повреждение ДНК, рентгеновское излучение, перекись водорода, метилметансульфонат, комета-тест, адаптивный ответ.

Сочетанное действие физико-химических факторов на биологические системы стало неизбежным в современных условиях. Согласно данным международных организаций в последние десятилетия резко увеличивается химическое загрязнение окружающей среды в результате переработки сырья и синтеза новых химических веществ. Как показывают исследования, многие из этих химических веществ обладают цитостатическими, канцерогенными и генотоксическими свойствами или сами по себе или в комбинации с другими экологическими факторами [1,2]. Развитие телекоммуникационных технологий, средств связи, радиолокации и радионавигации влечет за собой освоение новых диапазонов частот радиочастотных электромагнитных излучений (ЭМИ), увеличение мощности и площади покрытия радиопередаю-

щих систем, усложнение структуры электромагнитных сигналов. Все это приводит к очевидному вопросу о потенциальных неблагоприятных воздействиях техногенных ЭМИ различных частотных диапазонов, включая возможные генотоксические эффекты [3]. Учитывая расширяющееся применение ионизирующих излучений в медицине в диагностических и терапевтических целях, а также в связи с сохраняющейся опасностью поражения при возникновении внештатных ситуаций на объектах атомной промышленности, увеличивается вероятность случаев контакта людей и животных с ионизирующей радиацией. Таким образом, в настоящее время биологические системы подвергаются воздействию большого количества потенциально генотоксических факторов окружающей среды, включая химические агенты, ионизирующие излучения и неионизирующие ЭМИ, которые способны вызывать повреждения клеточной ДНК [4,5]. При комбинированном действии этих факторов могут наблюдаться аддитивные, синергические, антагонистические и потенци-

Сокращения: ЭМИ – электромагнитное излучение, УПМ – удельная поглощенная мощность, КВЧ – крайне высокие частоты, АФК – активные формы кислорода, АП – апуриновый/апиридиновый.

рующие эффекты; может существовать сильная зависимость от последовательности воздействий и исходного функционального состояния облучаемой биологической системы.

Защита живых организмов от повреждающего действия ЭМИ является одной из важных и чрезвычайно сложных проблем современной электромагнитной биологии и радиобиологии. В современной радиобиологии имеется достаточно фактов, свидетельствующих о том, что радиорезистентность организма может изменяться под влиянием нерадиационных факторов различной природы [3–5]. При этом основой неспецифического повышения резистентности, как правило, рассматривали механизмы стресса, т.е. реакции организма на воздействие чрезвычайных раздражителей. Низкоинтенсивные неионизирующие ЭМИ являются одним из физических факторов, который оказывает выраженное влияние на различные биологические процессы [6]. Однако механизмы биологических эффектов низкоинтенсивных неионизирующих ЭМИ, несмотря на их широкое применение для профилактики и терапии широкого спектра заболеваний, остаются в значительной степени неизвестными [7–9].

Имеющиеся литературные данные указывают на то, что неионизирующие электромагнитные поля способны модифицировать эффекты ионизирующей радиации и химических агентов *in vitro* и *in vivo* [3,4,10]. Увеличение числа клеток с микроядрами наблюдалось в культивируемых клетках трахеи крыс, облученных γ -излучением в дозе 6 Гр и переменным магнитным полем (50 Гц, 0,1 мТл), по сравнению с клетками, облученными только γ -излучением; магнитное поле само по себе также не оказывало существенного влияния на индукцию микроядер [11]. Показано увеличение скорости апоптоза клеток гепатомы человека BEL-7402 после воздействия рентгеновского излучения (2–8 Гр) и переменного магнитного поля (100 Гц, 0,7 мТл) [12]. Предварительное облучение лимфоцитов периферической крови человека радиочастотными ЭМИ (1950 МГц UMTS, в течение 20 ч при удельной поглощенной мощности (УПМ) 0,3 Вт/кг) значительно уменьшало образование микроядер в клетках после последующего воздействия рентгеновского излучения (1,0 и 1,5 Гр) по сравнению с клетками, облученными только рентгеновским излучением [13]. В то же время с использованием метода «комета-тест» не было обнаружено каких-либо сочетанных эффектов радиочастотных ЭМИ (1,8 ГГц, облучение в течение 24 ч при УПМ 2 Вт/кг) и рентгеновского излучения в дозах

0,25, 0,5, 1,0 и 2,0 Гр на лейкоцитах крови человека *in vitro* [14].

Воздействие радиочастотных ЭМИ (900 МГц GSM, в течение 20 ч при средней УПМ 1,25 Вт/кг) на лимфоциты периферической крови человека, стимулированные фитогемагглютинином, приводило к значительному снижению образования микроядер при последующей обработке клеток митомицином С в концентрации 100 нг/мл [15]. Позднее было показано, что эффективность электромагнитного излучения сильно зависит от фазы клеточного цикла, в которую происходит облучение [16]. Предполагается, что эффективность ЭМИ может также зависеть от УПМ, причем при низких УПМ (0,3–0,6 Вт/кг) эффекты оказываются более выраженными [17]. Обнаружен защитный эффект радиочастотных ЭМИ (900 МГц, УПМ 25 мВт/г, облучение по 1 ч в сутки в течение трех суток подряд) от последующего токсического действия химиотерапевтического агента доксорубина в концентрации 125 нг/л, который проявлялся в увеличении жизнеспособности клеток промиелоцитарной лейкемии человека HL-60, снижении уровня апоптоза, увеличении мембранного потенциала митохондрий, снижении внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и увеличении активности Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы [18]. В работе [19], напротив, обнаружено усиление мутагенных свойств митомицина С по увеличению частоты обмена сестринскими хроматидами при предварительном облучении лимфоцитов человека радиочастотными ЭМИ (954 МГц GSM, в течение 2 ч при УПМ 1,5 Вт/кг). Увеличение уровня повреждений ДНК, выявляемых методом «комета-тест», было обнаружено при предварительном облучении лимфоцитов крови человека радиочастотного ЭМИ (2,45 ГГц, в течение 2 ч при интенсивности 5 мВт/см²) с последующей обработкой митомицином С в концентрациях более 25 нг/мл [20]. Анализ комбинированного действия радиочастотного ЭМИ (1,8 ГГц, УПМ 3 Вт/кг) и четырех мутагенов, различающихся по механизмам индукции повреждений ДНК, показал, что синергический эффект ЭМИ и химических мутагенов реализуется при участии определенных путей репарации ДНК [21].

На организменном уровне показано, что при летальной дозе γ -излучения предварительное облучение мышей ЭМИ сверхвысоких частот (2–8 ГГц, частота свипирования 12–14 Гц, 5 мкВт/см², 23 ч) задерживало время наступления гибели животных на 2,8–4,2 сут [22]. Предварительное облучение интактных мышей ЭМИ крайне высоких частот (КВЧ) ($42,19 \pm 0,15$ ГГц, 15–17 мВт/см², 25 мин/сут) перед γ -облучением

(6,5 Гр) повышало выживаемость животных в два раза и увеличивало среднюю продолжительность жизни в 1,5 раза [23]. Показано, что ЭМИ, воздействующее до γ -облучения, снижает выраженность нейроморфологических эффектов, а в пострadiационном периоде усиливает их по многим патоморфологическим критериям [24]. Обнаружено, что облучение лабораторных животных ЭМИ КВЧ (53,57 и 42,2 ГГц, 10 мВт/см², экспозиция 30–60 мин) до и после воздействия ионизирующей радиации (4 Гр) оказывает выраженный противолучевой эффект, проявляющийся в увеличении выживаемости и средней продолжительности жизни мышей, улучшению морфологического состава и антиоксидантного статуса крови крыс [25]. Радиочастотное излучение (900 МГц, 0,12 мВт/см², 14 сут по 1 ч/сут) увеличивало продолжительность жизни мышей после γ -облучения в дозе 8 Гр, снижало тяжесть патологических изменений в костном мозге и селезенке [26], а также снижало уровень повреждений ДНК в лейкоцитах периферической крови [27] и формирование микроядер в незрелых эритроцитах в периферической крови и костном мозге [28], индуцированных воздействием γ -излучения в дозе 3 Гр.

Из приведенных литературных данных видно, что в ряде случаев комбинированного действия неионизирующих электромагнитных полей и генотоксических факторов наблюдаются положительные эффекты, свидетельствующие об индукции адаптивного ответа на уровне клеток и целого организма. Среди возможных механизмов защитных эффектов мы выделяем интенсификацию работы систем репарации ДНК, активацию экспрессии определенных генов и синтеза белков, активацию определенных сигнальных систем, иммуностимулирующее действие, стимуляцию пролиферации гематopoетических стволовых клеток и ускорение репопуляции поврежденных клеток, снижение уровня токсинов и окислительного стресса.

Ранее мы показали, что непрерывное и импульсно-модулированное ЭМИ КВЧ низких интенсивностей способно вызывать положительные эффекты в животных моделях патологических состояний. Обнаружено, что облучение животных с местным и системным воспалительными процессами ЭМИ КВЧ с определенными физическими параметрами оказывало выраженное противовоспалительное действие [29–31]. Показано, что воздействие на мышей импульсно-модулированным ЭМИ КВЧ до или после рентгеновского облучения способствовало восстановлению массы тимуса и его жирнокислотного состава, измененных действием рентгенов-

ских лучей [32]. Противовоспалительные и радиозащитные эффекты ЭМИ КВЧ сопровождались существенным уменьшением уровня повреждений ДНК в лейкоцитах периферической крови животных. На основе этих результатов мы предположили, что ЭМИ КВЧ может защищать ДНК клеток от повреждающего действия различных физических, химических и биологических агентов. Проверка этой гипотезы являлась одной из задач настоящего исследования.

Цель исследования состояла в определении особенностей комбинированных эффектов различных физических и химических факторов (индукторы окислительного стресса, алкилирующий агент, рентгеновское излучение, ЭМИ КВЧ) на целостность клеточной ДНК в интактных лейкоцитах периферической крови мыши.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение биологических образцов. Во всех экспериментах использовали взрослых мышей-самцов (возраст 2 месяца, масса 20–23 г) линии Кv:SHK. Мышей выращивали и содержали в контролируемых условиях при периодическом световом режиме 12:12, животные получали стандартную лабораторную диету и воду *ad libitum*.

Периферическую кровь мышей забирали из хвостовой вены в пробирки, содержащие фосфатный буфер с добавлением 1 мМ ЭДТА в качестве антикоагулянта. Для приготовления препаратов использовали цельную кровь, разведенную в 10 раз для того, чтобы конечная концентрация лейкоцитов в составе агарозных слайдов составляла около 0,5 млн/мл.

Облучение ЭМИ КВЧ, рентгеновским излучением и обработка химическими агентами. Источником ЭМИ КВЧ служил высокочастотный генератор Г4-141 («Исток», Фрязино). Лейкоциты периферической крови мышей облучали при комнатной температуре (20–22°C) в составе микроскопных агарозных слайдов в дальней зоне пирамидальной рупорной антенны с апертурой 32×32 мм [33]. В экспериментах использовали эффективные параметры и условия воздействия ЭМИ КВЧ (несущая частота 42,2 ГГц, плотность потока мощности 100 мкВт/см², длительность экспозиции 20 мин) в режиме непрерывной генерации и при импульсной модуляции меандром с частотами 1 и 16 Гц [30]. Частоты излучения контролировали с помощью волномера Ч2-25. Стабильность частоты генератора в режиме непрерывной генерации была не хуже ± 15 МГц. Выходную мощность генератора из-

меряли с помощью термисторной головки М5-49 с ваттметром поглощаемой мощности М3-22А и устанавливали таким образом, чтобы плотность потока энергии в плоскости облучаемого объекта составляла 100 мкВт/см². При этом расчетное значение удельной поглощенной мощности в плоскости облучаемого объекта составляло около 1,5 Вт/кг [34]. Для контрольных образцов проводили процедуры имитации воздействия, для чего препараты помещали в зону облучения при включенном высокочастотном генераторе, но отсутствии мощности на выходе излучателя. Во всех экспериментах фоновая индукция геомагнитного поля составляла 45 ± 3 мкТл.

Облучение клеток рентгеновским излучением в дозе 4 Гр проводили с использованием оборудования Центра коллективного пользования ИБК РАН на установке РУТ-250-15-1 («Мосрентген», Москва) при мощности дозы 1 Гр/мин (напряженность 200 кВ, сила тока 20 мА, фильтры 1 мм Al и 1 мм Cu, фокусное расстояние 37,5 см) в составе микроскопных слайдов при комнатной температуре. При комбинированном действии ЭМИ КВЧ и рентгеновского излучения облучение последним начинали через 5 мин после окончания процедуры КВЧ-облучения.

В качестве химических генотоксических агентов использовали перекись водорода (H₂O₂) и метилметансульфонат, которые различаются механизмами повреждающего действия. Обработку клеток H₂O₂ в концентрации 20 мкМ и метилметансульфонатом в концентрации 2,5 мМ осуществляли в составе микроскопных слайдов, которые инкубировали в присутствии генотоксикантов в течение 10 мин при 37°C. При комбинированном действии ЭМИ КВЧ и H₂O₂ или метилметансульфоната обработку химическими генотоксикантами начинали через 5 мин после окончания процедуры КВЧ-облучения.

Анализ уровня повреждений ДНК в клетках проводили с использованием щелочного варианта «комета-теста» с некоторыми модификациями [31]. Метод основан на анализе картины электрофореза индивидуальных клеток, ДНК которых окрашена флуоресцентным красителем [35]. Свое название метод получил из-за визуального сходства получаемых электрофореграмм с кометами: наблюдаются яркая флуоресцирующая «голова кометы» и «хвост», образующийся в результате миграции поврежденных или расплетенных участков ДНК после электрофореза в геле агарозы. Микроскопные слайды готовили из трех слоев 0,5%-й легкоплавкой агарозы (Serva, Германия) с клетками, иммобилизованными в средний слой. После

различных воздействий слайды подвергали процедурам «комета-теста»: лизис клеток в лизирующем растворе (1%-й лаурилсаркозинат натрия, 2,5 М NaCl, 0,1 М ЭДТА, 0,01 М трис-HCl, pH 10 и 1% тритона X-100) в течение 25 мин при 37°C; щелочная денатурация ДНК в щелочном растворе (0,3 М NaOH, 0,001 М ЭДТА, pH > 13) в течение 20 мин при 4°C; электрофорез в свежей порции щелочного раствора в течение 20 мин при 4°C в электрофоретической камере SE-1/S-1N (ООО «Хеликон», Москва) при напряженности электрического поля 2 В/см и силе тока 300 мА; нейтрализация щелочи дистиллированной водой; окрашивание ДНК в фосфатном буфере, содержащем 1 мкг/мл бромистого этидия, в течение 1 ч. Перед анализом каждый слайд в течение 5 мин промывали в дистиллированной воде и накрывали покровным стеклом. Все процедуры проводили при искусственном освещении с использованием ламп накаливания во избежание возникновения дополнительных повреждений ДНК в клетках. Препараты анализировали с использованием аппаратно-программного комплекса «Комет Эксперт» (ООО «Ген Эксперт», Пушкино). В качестве индикатора величины повреждения ДНК использовали процентное содержание ДНК в «хвосте кометы» (%ТДНК) [36]. Из каждого образца крови готовили необходимое число слайдов в соответствии с числом воздействий. На каждом слайде регистрировали по 30–50 изображений «комет», по которым рассчитывали средний уровень %ТДНК. Средние значения и стандартные ошибки среднего для каждого варианта воздействия вычисляли по результатам независимых экспериментов ($n = 9$).

Статистический анализ. Все эксперименты проведены по протоколу «слепого контроля», когда экспериментатор, проводивший измерения, не знал, какие воздействия были использованы. Все данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка. Поскольку все данные имели нормальное распределение (по тесту Колмогорова–Смирнова), то статистический анализ проводили с использованием ANOVA и критерия Даннета для множественного сравнения ($p < 0,01$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цель исследования состояла в оценке способности низкоинтенсивного непрерывного и импульсно-модулированного ЭМИ КВЧ при предварительном воздействии (т.е. до действия генотоксического агента в высокой повреждающей дозе или концентрации) защищать клеточ-

Таблица 1. Уровень повреждений ДНК в лейкоцитах крови мыши при действии непрерывного и импульсно-модулированного ЭМИ КВЧ (несущая частота 42,2 ГГц, плотность потока мощности 100 мкВт/см², длительность экспозиции 20 мин) и рентгеновского излучения в дозе 4 Гр

Условия воздействия	Процентное содержание ДНК в «хвосте кометы», %	Фактор уменьшения дозы
Контроль	0,23 ± 0,06	–
ЭМИ КВЧ (непрерывная генерация)	0,25 ± 0,11	–
ЭМИ КВЧ (импульсная модуляция 1 Гц)	0,30 ± 0,14	–
Рентгеновское излучение (4 Гр)	9,93 ± 0,27	1,00
Sham + рентгеновское излучение (4 Гр)	9,97 ± 0,51	1,00
ЭМИ КВЧ (непрерывная генерация) + рентгеновское излучение (4 Гр)	10,53 ± 0,41	0,94
ЭМИ КВЧ (импульсная модуляция 1 Гц) + рентгеновское излучение (4 Гр)	7,42 ± 0,34*	1,34
ЭМИ КВЧ (импульсная модуляция 16 Гц) + рентгеновское излучение (4 Гр)	7,27 ± 0,37*	1,37

Примечание. Представлены средние значения и величины стандартных ошибок: * – $p < 0,001$ от других условий воздействия по множественному критерию Даннета, $n = 9$.

ную ДНК лейкоцитов крови. Для исследования радиозащитных эффектов ЭМИ КВЧ в качестве повреждающего физического фактора мы выбрали рентгеновское излучение в дозе 4 Гр, поскольку она является максимальной нелетальной дозой для мышечной ткани *Kv:SHK in vivo* [37] и в наших экспериментах облучение лейкоцитов крови мыши в этой дозе вызывало достаточно высокий, но не критический уровень повреждений ДНК – около $9,9 \pm 0,3\%$ (табл. 1). Облучение клеток ЭМИ КВЧ как в режиме непрерывной генерации, так и при импульсной модуляции с частотами 1 и 16 Гц не приводило к каким-либо изменениям уровня повреждений ДНК по сравнению с контролем. Предварительное ложное облучение (sham + рентгеновское излучение 4 Гр) или воздействие ЭМИ КВЧ в режиме непрерывной генерации + рентгеновское излучение (4 Гр) достоверно не изменяло уровень повреждений ДНК, индуцируемых только рентгеновским излучением (табл. 1). Предварительное облучение клеток импульсно-модулированным ЭМИ КВЧ (42,2 ГГц, 100 мкВт/см², экспозиция 20 мин) с частотами модуляции 1 и 16 Гц приводило к достоверному снижению уровня повреждений ДНК в среднем до $7,3 \pm 0,4\%$ ($p < 0,001$ по сравнению с действием только рентгеновского излучения) (табл. 1). Фактор уменьшения дозы составил около 1,35. Таким образом, показано, что импульсно-модулированное ЭМИ КВЧ при фиксированных несущей частоте 42,2 ГГц и интенсивности 100 мкВт/см² (частоты модуляции 1 и 16 Гц) способно в отличие от непрерывного

оказывать радиозащитное действие на уровне клеточной ДНК.

Принимая во внимание тот факт, что рентгеновское излучение повреждает ДНК как напрямую при поглощении энергии излучения атомами и молекулами, так и косвенно за счет активных форм кислорода (АФК), образующихся при радиоллизе воды [38], большая часть повреждений обусловлена действием АФК. В связи с этим важно было проверить, будет ли обладать низкоинтенсивное ЭМИ КВЧ защитным действием, если последующие повреждения ДНК будут вызваны АФК, в частности перекисью водорода, которые вызывают окислительные повреждения ДНК. Мы провели специальную серию экспериментов по оценке защитного действия низкоинтенсивного непрерывного и импульсно-модулированного ЭМИ КВЧ при облучении клеток до обработки перекисью водорода. Было показано, что при инкубировании лейкоцитов крови мыши в течение 10 мин при 37°C в присутствии H₂O₂ в концентрации 20 мкМ уровень повреждений ДНК составил $5,0 \pm 0,2\%$ (табл. 2). Предварительное облучение лейкоцитов крови непрерывным ЭМИ КВЧ (42,2 ГГц, 100 мкВт/см², 20 мин) достоверно не изменяло уровень повреждений ДНК, индуцированных H₂O₂ ($4,7 \pm 0,5\%$). При предварительном облучении лейкоцитов крови импульсно-модулированным ЭМИ КВЧ с частотами модуляции 1 и 16 Гц наблюдался защитный эффект, который проявлялся в снижении повреждений ДНК, индуцируемых H₂O₂, в среднем до $2,4 \pm 0,3\%$ ($p < 0,001$) и $3,1 \pm 0,1\%$

Таблица 2. Уровень повреждений ДНК в лейкоцитах крови мыши при действии перекиси водорода в концентрации 20 мкМ, непрерывного и импульсно-модулированного ЭМИ КВЧ (несущая частота 42,2 ГГц, плотность потока мощности 100 мкВт/см², длительность экспозиции 20 мин)

Условия воздействия	Процентное содержание ДНК в «хвосте кометы», %	K**
H ₂ O ₂ (20 мкМ)	5,04 ± 0,21	1,00
ЭМИ КВЧ (непрерывная генерация) + H ₂ O ₂ (20 мкМ)	4,70 ± 0,46	0,93
ЭМИ КВЧ (импульсная модуляция 1 Гц) + H ₂ O ₂ (20 мкМ)	2,37 ± 0,30*^	0,47
ЭМИ КВЧ (импульсная модуляция 16 Гц) + H ₂ O ₂ (20 мкМ)	3,08 ± 0,15*^	0,61

Примечание. Представлены средние значения и величины стандартных ошибок: * – $p < 0,001$ по сравнению с действием только перекиси водорода (H₂O₂, 20 мкМ); ^ – $p < 0,01$ по сравнению с комбинированным действием непрерывного ЭМИ КВЧ и H₂O₂ в концентрации 20 мкМ (ЭМИ КВЧ в режиме непрерывной генерации + H₂O₂) по множественному критерию Даннета, $n = 9$; ** – относительный уровень повреждений ДНК по сравнению с действием перекиси водорода (H₂O₂, 20 мкМ).

Таблица 3. Уровень повреждений ДНК в лейкоцитах крови мыши при действии метилметансульфоната в концентрации 2,5 мМ, непрерывного и импульсно-модулированного ЭМИ КВЧ (несущая частота 42,2 ГГц, плотность потока мощности 100 мкВт/см², длительность экспозиции 20 мин)

Условия воздействия	Процентное содержание ДНК в «хвосте кометы», %	K**
Метилметансульфонат (2,5 мМ)	2,98 ± 0,10	1,00
ЭМИ КВЧ (непрерывная генерация) + метилметансульфонат (2,5 мМ)	3,17 ± 0,10	1,06
ЭМИ КВЧ (импульсная модуляция 1 Гц) + метилметансульфонат (2,5 мМ)	2,30 ± 0,10*^	0,77
ЭМИ КВЧ (импульсная модуляция 16 Гц) + метилметансульфонат (2,5 мМ)	2,40 ± 0,10*^	0,81

Примечание. Представлены средние значения и величины стандартных ошибок: * – $p < 0,001$ по сравнению с действием только метилметансульфоната (2,5 мМ); ^ – $p < 0,001$ по сравнению с комбинированным действием непрерывного ЭМИ КВЧ и метилметансульфоната в концентрации 2,5 мМ (ЭМИ КВЧ в режиме непрерывной генерации + метилметансульфонат) по множественному критерию Даннета, $n = 9$; ** – относительный уровень повреждений ДНК по сравнению с действием метилметансульфоната в концентрации 2,5 мМ.

($p < 0,001$) соответственно (табл. 2). Необходимо отметить, что величина защитного эффекта импульсно-модулированного ЭМИ КВЧ от повреждающего действия перекиси водорода составила в среднем около 45%.

Учитывая обнаруженный нами защитный эффект при комбинированном действии импульсно-модулированного ЭМИ КВЧ и перекиси водорода, отдельный интерес представляло исследование защитных свойств ЭМИ КВЧ при повреждении ДНК клеток алкилирующими агентами на примере метилметансульфоната. Метилметансульфонат напрямую взаимодействует с ДНК и вызывает ее метилирование, что приводит к образованию апуриновых/апиримидиновых (АП)-сайтов. N7-Метилгуанин является преобладающим типом повреждений из всех продуктов алкилирования, индуцируемых метилметансульфонатом [39]. Продукты алкилирования обычно удаляются из ДНК специфическими

гликозилазами в течение первого этапа эксцизионной репарации оснований [40]. Образующийся АП-сайт затем расщепляется АП-эндонуклеазой, позволяя другим ферментам, вовлеченным в эксцизионную репарацию оснований, заполнить и запечатать пробел [41]. Неотрепарированные на момент лизиса клеток АП-сайты под действием щелочи превращаются в одиночные разрывы, которые и являются причиной миграции ДНК при электрофорезе в щелочных условиях «комета-теста», т.е. являются причиной образования «комет».

Эксперименты показали, что при инкубировании лейкоцитов крови мыши в течение 10 мин при 37°C в присутствии метилметансульфоната в концентрации 2,5 мМ уровень повреждений ДНК составил 3,0 ± 0,1% (табл. 3). Предварительное облучение лейкоцитов крови непрерывным ЭМИ КВЧ (42,2 ГГц, 100 мкВт/см², экспозиция 20 мин) достоверно не изменяло

уровень повреждений ДНК, индуцированных метилметансульфонатом ($3,2 \pm 0,1\%$). При предварительном облучении лейкоцитов крови импульсно-модулированным ЭМИ КВЧ с частотами модуляции 1 и 16 Гц наблюдался защитный эффект, который проявлялся в снижении уровня повреждений ДНК, индуцируемых метилметансульфонатом, в среднем до $2,3 \pm 0,1\%$ ($p < 0,001$). Величина защитного эффекта импульсно-модулированного ЭМИ КВЧ от повреждающего действия метилметансульфоната составила в среднем около 20%.

Таким образом, мы впервые показали, что защитный эффект низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ от повреждающего действия химических генотоксических агентов, H_2O_2 и метилметансульфоната, и рентгеновского излучения наблюдается только при действии импульсно-модулированного излучения, непрерывное излучение оказалось неэффективным. Величина защитного эффекта ЭМИ КВЧ сильно зависит от действующего генотоксического агента, т.е. от типа индуцируемых им повреждений ДНК, и возрастает в ряду метилметансульфонат – рентгеновское излучение – H_2O_2 .

Мы предположили, что механизмы радиозащитного и защитного действия ЭМИ КВЧ могут быть связаны с индукцией адаптивного ответа наномолярными концентрациями АФК, образующимися под действием импульсно-модулированного излучения. Ранее было показано, что облучение водных систем неионизирующими ЭМИ может вызывать образование в них АФК [42,43], которые в свою очередь могут быть потенциальными индукторами адаптивного ответа. Недавно мы обнаружили, что облучение водных растворов импульсно-модулированным ЭМИ КВЧ (42,2 ГГц, 0,1 мВт/см², экспозиция 20 мин, частоты модуляции 1 и 16 Гц) приводит к образованию в них перекиси водорода в концентрациях $4,6 \pm 0,3$ нМ и $6,8 \pm 0,6$ нМ соответственно в зависимости от частоты модуляции [44,45].

Адаптивный ответ является одним из механизмов индукции защитного эффекта и является универсальным ответом клеток на облучение в малых дозах, что проявляется в повышенной устойчивости к повреждающему воздействию больших доз ионизирующих излучений или других агентов нерадиационной природы [46,47]. Адаптивный ответ в биомедицине лежит в основе защитного эффекта различных агентов с мутагенными и генотоксическими свойствами [48,49]. По мнению многих исследователей, механизмы адаптивного ответа связаны с модификацией работы систем репарации ДНК [50,51]. Адаптивный ответ может запуститься и

переключаться различными индукторами стресса, в том числе повышением температуры и другими физическими факторами, биологически активными веществами, а также АФК.

Анализ литературных данных показывает, что низкие концентрации перекиси водорода могут стимулировать синтез и экспрессию антиапоптозного белка Bcl-2 [48]. Bcl-2 может препятствовать проапоптотическому действию Bax, тем самым повышая выживаемость клеток. Увеличенное соотношение Bcl-2/Bax в клетках может подавлять расщепление поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1 (PARP-1), которая активируется при появлении одонитевых разрывов в ДНК, участвует в репарации ДНК и ремоделировании хроматина, способствует выживанию клеток [52]. На основании этих литературных данных можно предположить, что клеточные ответы на наномолярные концентрации перекиси водорода в наших экспериментах могут быть схожими, но конкретная цепочка реакций, приводящая к индукции адаптивного ответа и реализации защитного эффекта, должна быть детально исследована. Низкие концентрации АФК, индуцируемые низкоинтенсивным импульсно-модулированным ЭМИ КВЧ, которые не являются генотоксичными сами по себе, могут вызывать небольшой уровень повреждений ДНК, тем самым оказывая «праймирующее» действие на системы репарации ДНК и подготавливая их к действию высоких концентраций или доз повреждающих агентов.

Детальные механизмы индукции адаптивного ответа к настоящему времени, к сожалению, не выяснены. Установлено, что микромолярные концентрации перекиси водорода способны индуцировать *de novo* синтез большого числа белков, которые участвуют в энергетическом метаболизме, сигнализации, трансляции, транскрипции, репарации ДНК, регуляции окислительно-восстановительного потенциала, стресс-реакциях, апоптозе, фолдинге белков и др. [49,53]. Обнаружено блокирование под действием микромолярных концентраций перекиси водорода активации стресс-активируемой протеинкиназы SAPK/JNK и связанных с ней сигнальных путей [54]. Эти и другие экспериментальные данные указывают на то, что адаптивный ответ является комплексной реакцией, затрагивающей широкий спектр клеточных функций.

Выяснение механизмов модифицирующих эффектов неионизирующих ЭМИ на фоне повышенного радиационного фона и воздействия химических агентов является крайне важным с точки зрения гигиенического нормирования ЭМИ и их использования в биомедицине. По-

лученные новые знания будут способствовать разработке стратегии и средств защиты организма от ионизирующих ЭМИ и повреждающих концентраций химических агентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- D. Belpomme, P. Irigaray, L. Hardell, et al., *Environ. Res.* **105**, 414 (2007).
- R. W. Clapp, M. M. Jacobs, and E. L. Loechler, *Rev. Environ. Health* **23**, 1 (2008).
- Vijayalaxmi, Y. Cao, and M. R. Scarfi, *Mutat. Res.*, doi: 10.1016/j.mrrev.2014.02.002, (2014) (in press).
- L. Manti and A. D'Arco, *Mutat. Res.* **704**, 115 (2010).
- J. Juutilainen, *Radiat. Prot. Dosimetry* **132**, 228 (2008).
- D. O. Carpenter, *Rev. Environ. Health* **28**, 159 (2013).
- A. G. Pakhomov and M. R. Murphy, *IEEE Trans. Plasma Sci.* **28**, 34 (2000).
- К. В. Лушников, А. Б. Гапеев и Н. К. Чемерис, *Радиационная биология. Радиоэкология* **42**, 533 (2002).
- А. Б. Гапеев, *Биомед. радиоэлектроника* **6**, 20 (2014).
- F. Artacho-Cordyn, M. del Mar Salinas-Asensio, I. Calvente, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 14974 (2013).
- I. Lagroye and J. L. Poncy, *Int. J. Radiat. Biol.* **72**, 249 (1997).
- W. Jian, Z. Wei, C. Zhiqiang, and F. Zheng, *Bioelectromagnetics* **30**, 163 (2009).
- A. Sannino, O. Zeni, S. Romeo, et al., *J. Radiat. Res.* **55**, 210 (2014).
- C. Zhijian, L. Xiaoxue, L. Yezhen, et al., *Mutat. Res.* **677**, 100 (2009).
- A. Sannino, M. Sarti, S. B. Reddy, et al., *Radiat. Res.* **171**, 735 (2009).
- A. Sannino, O. Zeni, M. Sarti, et al., *Int. J. Radiat. Biol.* **87**, 993 (2011).
- O. Zeni, A. Sannino, S. Romeo, et al., *Mutat. Res.* **747**, 29 (2012).
- Z. Jin, C. Zong, B. Jiang, et al., *PLoS One* **7**, e46102 (2012).
- A. Maes, M. Collier, D. Slaets, and L. Verschaeve, *Environ. Mol. Mutagen.* **28**, 26 (1996).
- M. B. Zhang, J. L. He, L. F. Jin, and D. Q. Lu, *Biomed. Environ. Sci.* **15**, 283 (2002).
- W. Baohong, H. Jiliang, J. Lifan, et al., *Mutat. Res.* **578**, 149 (2005).
- И. Г. Акоев, А. Ф. Кожокару, В. М. Мельников и А. В. Усачев, *Радиационная биология. Радиоэкология* **34**, 675 (1994).
- А. Ю. Сазонов, Л. В. Рыжкова, в сб. докл. 10 Росс. симп. с междунар. участием «Миллиметровые волны в медицине и биологии» (М.: ИРЭ РАН, 1995), сс. 112–114.
- О. С. Саурина, В. Г. Зуев и В. П. Федоров, *Вестн. Российской военно-мед. академии* **23**, 141 (2008).
- В. Ю. Тегза, О. П. Резункова, Л. И. Корытова и др., *Вестн. Российской военно-мед. академии* **1**, 224 (2012).
- Y. Cao, Q. Xu, Z. D. Jin, et al., *Int. J. Radiat. Biol.* **87**, 720 (2011).
- B. Jiang, J. Nie, Z. Zhou, et al., *PLoS One.* **7**, e32040 (2012).
- B. Jiang, C. Zong, H. Zhao, et al., *Mutat. Res.* **751**, 127 (2013).
- A. B. Gapeyev, E. N. Mikhailik, and N. K. Chemeris, *Bioelectromagnetics* **29**, 197 (2008).
- A. B. Gapeyev, E. N. Mikhailik, and N. K. Chemeris, *Bioelectromagnetics* **30**, 454 (2009).
- А. Б. Гапеев, Н. А. Романова, and Н. К. Чемерис, *Биофизика* **56**, 688 (2011).
- A. B. Gapeyev, A. V. Aripovsky, and T. P. Kulagina, *Int. J. Rad. Biol.* **91**, 277 (2015).
- А. Б. Гапеев и Н. К. Чемерис, *Биомед. радиоэлектроника* **1**, 13 (2010).
- А. Б. Гапеев, П. А. Соколов, и Н. К. Чемерис, *Биофизика* **47**, 759 (2002).
- O. Ostling and K. J. Johanson, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **123**, 291 (1984).
- N. P. Singh, M. T. McCoy, R. R. Tice, and E. L. Schneider, *Exp. Cell. Res.* **175**, 184 (1988).
- S. V. Gudkov, O. Y. Gudkova, A. V. Chernikov, and V. I. Bruskov, *Int. J. Radiat. Biol.* **85**, 116 (2009).
- Ю. Б. Кудряшов, *Радиационная биофизика (ионизирующие излучения)*, под ред. В. К. Мазурика и М. Ф. Ломанова (Физматлит, М., 2004).
- D. T. Veranek, *Mutat. Res.* **231**, 11 (1990).
- H. E. Krokan, R. Standal, and G. Slupphaug, *Biochem. J.* **325**, 1 (1997).
- L. A. Loeb and B. D. Preston, *Annu. Rev. Genet.* **20**, 201 (1986).
- О. Ю. Гудкова, С. В. Гудков, А. Б. Гапеев и др., *Биофизика* **50**, 773 (2005).
- S. V. Gudkov, V. I. Bruskov, M. E. Astashev, et al., *J. Phys. Chem. B* **115**, 7693 (2011).
- С. В. Гудков, В. Е. Иванов, О. Э. Карп и др., *Биофизика* **59**, 862 (2014).
- A. B. Gapeyev, N. A. Lukyanova, and S. V. Gudkov, *Cent. Eur. J. Biol.* **9**, 915 (2014).
- G. Olivieri, J. Bodycote, and S. Wolff, *Science* **223**, 594 (1984).
- C. Stecca and G. B. Gerber, *Biochem. Pharmacol.* **55**, 941 (1998).
- V. I. Lushchak, *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **153**, 175 (2011).
- Q. Wei, H. Huang, L. Yang, et al., *Environ. Toxicol.* **29**, 478 (2014).
- M. C. Joiner, P. Lambin, and B. Marples, *C. R. Acad. Sci., Ser. III* **322**, 167 (1999).
- L. Samson and J. L. Schwartz, *Nature* **287**, 861 (1980).
- D. Nguyen, M. Zajac-Kaye, L. Rubinstein, et al., *Cell Cycle* **10**, 4074 (2011).
- J. K. Seong, D. K. Kim, K. H. Choi, et al., *Exp. Mol. Med.* **34**, 374 (2002).
- D. K. Kim, E. S. Cho, J. K. Seong, and H. D. Um, *J. Cell Sci.* **114**, 4329 (2001).

Pulse-modulated Electromagnetic Radiation of Extremely High Frequencies Protects Cellular DNA against Damaging Effect of Physico-Chemical Factors *in vitro*

A.B. Gapeyev* ** and N.A. Lukyanova* **

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Pushchino State Institute of Natural Sciences, prosp. Nauki 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

Using a comet assay technique, we investigated protective effects of extremely high frequency electromagnetic radiation in combination with the damaging effect of X-ray irradiation, the effect of damaging agents hydrogen peroxide and methyl methanesulfonate on DNA in mouse whole blood leukocytes. It was shown that the preliminary exposure of the cells to low intensity pulse-modulated electromagnetic radiation (42.2 GHz, 0.1 mW/cm², 20-min exposure, modulation frequencies of 1 and 16 Hz) caused protective effects decreasing the DNA damage by 20–45%. The efficacy of pulse-modulated electromagnetic radiation depended on the type of genotoxic agent and increased in a row methyl methanesulfonate – X-rays – hydrogen peroxide. Continuous electromagnetic radiation was ineffective. The mechanisms of protective effects may be connected with an induction of the adaptive response by nanomolar concentrations of reactive oxygen species formed by pulse-modulated electromagnetic radiation.

Key words: extremely high-frequency electromagnetic radiation, pulse modulation, DNA damage, X-rays, hydrogen peroxide, methyl methanesulfonate, comet assay, adaptive response