

Биология

УДК 533.9.57+577.3

А. В. ГРИГОРЯН

ВЛИЯНИЕ НЕТЕПЛОВЫХ КОГЕРЕНТНЫХ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ
ВОЛН ММ-ДИАПАЗОНА НА ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ ДНК И ЕЕ
КОМПЛЕКСОВ С Hoechst 33258

Проведено исследование влияния электромагнитных волн мм-диапазона (ММЭМВ) на термостабильность ДНК и ее комплексов с Hoechst 33258 в интервале изменения ионной силы раствора 0,002–0,1 М Na⁺. Обнаружено, что при низких ионных силах раствора ($\mu \sim 0,002$ М Na⁺) термостабильность ДНК и ее комплексов с Hoechst 33258 при облучении ММЭМВ значительно увеличивается по сравнению с необлученными препаратами. При увеличении ионной силы раствора термостабильности облученных и необлученных образцов мало отличаются. Выявлено также, что при облучении специфичность Hoechst 33258 к АТ-последовательностям ДНК при высоких ионных силах не проявляется.

Введение. Влияние нетепловых когерентных электромагнитных волн мм-ого диапазона (ММЭМВ) на биологические системы в настоящее время широко исследуется, поскольку известна их аномально высокая биологическая активность, в том числе терапевтическое действие при различных заболеваниях. Особенность свойств ММЭМВ заключается в том, что их биологическое воздействие на живые организмы проявляется при крайне низком нетепловом уровне мощности. Обнаружено, что нетепловые миллиметровые волны действуют на различные биологические системы, а также на активность энзимов, синтез РНК и ДНК и др. [1, 2].

Для объяснения наблюдаемых эффектов была высказана гипотеза об информационно-резонансном характере взаимодействий ММЭМВ с биологическими объектами [3]. Однако и с этих позиций трудно объяснить, каким образом «информация» передается вглубь биологической среды организма, состоящей на 70–80% из воды, т.к. известно, что вода сильно поглощает ММЭМВ и излучение не может проникать глубже 1 мм. Были предложены различные физические и биомедицинские модели [3], но ни одна из них принципиально не решала проблему.

Новым шагом в развитии биофизических представлений о взаимодействии ММЭМВ с биологическими объектами была разработка радиофизи-

ческого метода прямой регистрации процесса взаимодействия ММЭМВ с объектами любой природы, в том числе такими, как водные среды и растворы [4, 5]. Было показано, что в миллиметровом диапазоне частот (1–120 ГГц) резонансы наблюдаются при 50, 65 и 100 ГГц и принадлежат к двум возможным типам нормальных колебаний водной структуры. Анализ экспериментальных данных показал, что резонансные спектры воды, клеток и тканей организмов идентичны, что указывает на единую природу взаимодействия ММЭМВ с этими средами, связанную с молекулярно-кластерной структурой воды [6, 7].

Исходя из этого можно полагать, что ММЭМВ способны влиять также на структуры ДНК и ее комплексов с различными соединениями опосредованно через водную систему клетки.

Целью данной работы явилось исследование влияния ММЭМВ на водно-солевые растворы ДНК и ее комплексов с лигандами.

Материалы и методы. В работе использовались высокоочищенная ДНК тимуса теленка (т.т.) (среднее ГЦ-содержание 42%), любезно предоставленная проф. Д.Ю. Ландо, и Hoechst 33258 (H33258) («Serva», Германия). Все препараты использованы без дополнительной очистки. Концентрации ДНК и лиганда определялись спектрофотометрически с коэффициентами экстинкции $\varepsilon_{260}=6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для ДНК т.т., $\varepsilon_{343}=42000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для H33258. Плавление комплексов ДНК с H33258 проводилось при ионных силах растворов 0,002; 0,01; 0,02 и 0,1 М Na⁺ и исследовалось на спектрофотометре PUE UNICAM-SP8-100 (Англия). Спектральные измерения проводились в герметически закрытых кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см, которые помещались в термостатируемые ячейки спектрофотометра и нагревались со скоростью 0,25 град/мин. Данные по поглощению образцов выводились на программируемый микрокалькулятор Hewlett Packard 97S I/O (США).

Облучение ММЭМ-волнами образцов осуществлялось в чашках Петри, толщина которых не превышала 1 мм, при помощи генератора Г4-141 с выходной мощностью 0,6 мВт/см².

Измерения для каждого образца проводились с 5-кратным повтором, после чего данные усреднялись. Ошибка экспериментальных результатов не превышала 5%.

Результаты и обсуждение. Известно, что температуры плавления ДНК (T_0) и ее комплексов с различными низкомолекулярными веществами (T_m) являются сравнительно легко определяемыми опытным путем термодинамическими параметрами, характеризующими стабильность образцов [8]. В настоящей работе с целью выяснения влияния ММЭМВ на термостабильность облученных и необлученных образцов ДНК и комплексов ДНК–H33258 нами проводились эксперименты по их плавлению в ультрафиолетовой области поглощения ДНК [9] в широком интервале изменения ионной силы раствора (0,002–0,1 М Na⁺). Из полученных кривых плавления были определены значения температуры плавления и ширины интервала плавления (ΔT) для всех исследуемых образцов, которые обобщены в таблице. В ней приведены также

значения изменения температуры и ширины интервалов плавления облученных и необлученных образцов ДНК и комплексов ДНК–Н33258.

Значения температуры и ширины интервала плавления ($^{\circ}\text{C}$) необлученных и облученных образцов ДНК и ее комплексов с Н33258 в интервале изменения ионной силы раствора 0,002–0,1 $M \text{Na}^+$

μ , $M \text{Na}^+$	ДНК						ДНК–Н33258					
	$T_0^{\text{необл}}$	$\Delta T_0^{\text{необл}}$	$T_0^{\text{обл}}$	$\Delta T_0^{\text{обл}}$	δT_0^*	$\delta \Delta T_0^{**}$	$T_m^{\text{необл}}$	$\Delta T_m^{\text{необл}}$	$T_m^{\text{обл}}$	$\Delta T_m^{\text{обл}}$	δT_m^*	$\delta \Delta T_m^{**}$
0,002	51,5	13,2	58	15,7	6,5	2,5	57,5	23,3	66	26	8,5	2,7
0,01	63	13,5	66	14	3	0,5	66	12,5	68,8	15	2,8	2,5
0,02	69	14,5	70,5	14,8	1,5	0,3	70,5	14,8	72	16,2	1,5	1,4
0,1	82,5	13	84	13	1,5	0	84	10	85,5	10	1,5	0

* $\delta T_0 = T_0^{\text{обл}} - T_0^{\text{необл}}$, где $T_0^{\text{обл}}$ и $T_0^{\text{необл}}$ – температуры плавления облученной и необлученной ДНК; $\delta T_m = T_m^{\text{обл}} - T_m^{\text{необл}}$, где $T_m^{\text{обл}}$ и $T_m^{\text{необл}}$ – температуры плавления облученных и необлученных комплексов ДНК–Н33258.

** $\delta \Delta T_0 = \Delta T_0^{\text{обл}} - \Delta T_0^{\text{необл}}$, где $\Delta T_0^{\text{обл}}$ и $\Delta T_0^{\text{необл}}$ – ширины интервалов плавления облученной и необлученной ДНК; $\delta \Delta T_m = \Delta T_m^{\text{обл}} - \Delta T_m^{\text{необл}}$, где $\Delta T_m^{\text{обл}}$ и $\Delta T_m^{\text{необл}}$ – ширины интервалов плавления облученных и необлученных комплексов ДНК–Н33258.

Как видно из приведенных данных, значения δT_0 практически совпадают с δT_m при $0,01 \leq \mu \leq 0,1 M \text{Na}^+$. Причем некоторое различие обнаруживается при ионной силе раствора $0,002 M \text{Na}^+$. Этот результат указывает на то, что облученные комплексы более термостабильны, чем необлученные. По всей вероятности, увеличение термостабильности облученных образцов связано с тем, что при облучении водно-солевого раствора молекулы воды высвобождаются из гидратной оболочки ионов соли и переходят в свободное состояние [7]. Вследствие этого увеличивается активность воды, что в свою очередь влияет на гидратацию ДНК. При этом структура ДНК претерпевает такие изменения, что ее комплексы с Н33258 становятся более термостабильными, чем необлученные. На эти изменения указывает и тот факт, что $\delta \Delta T_m$ существенно отличаются от $\delta \Delta T_0$ при ионных силах $0,01$ и $0,02 M \text{Na}^+$, в то время как эти величины практически одинаковы при $0,002 M \text{Na}^+$ (см. таблицу). Известно, что степень гидратированности ДНК играет основную роль при связывании Н33258 с ДНК. Как было показано в работе [10], при $\mu = 0,002 M \text{Na}^+$ специфичность Н33258 к АТ-последовательностям ДНК исчезает, а термостабильность комплексов увеличивается по сравнению с аналогичными эффектами при $\mu \geq 0,002 M \text{Na}^+$. Поскольку при $0,002 M \text{Na}^+$ степень гидратированности как облученной, так и необлученной ДНК больше, чем при более высоких ионных силах, то $\delta \Delta T_m$ и $\delta \Delta T_0$ мало отличаются друг от друга. Облучение при ионных силах $0,01$ и $0,02 M \text{Na}^+$ увеличивает степень гидратированности ДНК и АТ-специфичность лиганда исчезает, вследствие чего $\Delta T_m^{\text{обл}}$ возрастает по сравнению с $\Delta T_m^{\text{необл}}$ (см. таблицу). Эти результаты хорошо согласуются с данными работы [10], где показано, что увеличение μ приводит к предпочтительному связыванию Н33258 с АТ-богатыми последо-

вательностями ДНК, вследствие чего уменьшается разность $T_{ГЦ} - T_{АТ}$. Увеличение концентрации ионов Na^+ ($\mu \geq 0,002 \text{ M Na}^+$) приводит к исчезновению разницы между температурами плавления облученных и необлученных образцов ($\delta T_0 = \delta T_m = 1,5^\circ\text{C}$, см. табл). Интересно, что параметр $\delta \Delta T$ – изменение ширины интервала плавления, который отражает изменение стабильности АТ-пар, с увеличением μ монотонно убывает (от значения 2,7 до 0) и при $0,1 \text{ M Na}^+$ (значение, близкое к физиологическим условиям) разница между ширинами интервалов плавления облученных и необлученных образцов исчезает. Возможно, это следствие того, что при высоких ионных силах облучение вызывает небольшие изменения в структуре водно-солевого раствора, вследствие чего параметры плавления ДНК и ее комплексов с H33258 практически совпадают с таковыми необлученных образцов.

Таким образом, накопленный экспериментальный материал указывает на то, что влияние ММЭМВ на биологические системы, в частности на ДНК, осуществляется путем изменения структуры воды, т.е. изменения гидратного окружения биологических макромолекул [11, 12].

Ереванский государственный архитектурно-строительный университет

Поступила 12.03.2009

ЛИТЕРАТУРА

1. **Goodman R. and Henderson A.S.** Mechanistic Approaches to Interaction of Electric and Electromagnetic Fields with Living Systems. Eds. Blank M. and Findi E. New York, London: Plenum Press, 1987, p. 217.
2. **Grundler W., Keilman F., Putterlik V., Santo L., Strube D., Zimmerman I.** Nonthermal Resonant Effects of 42 GHz Microwaves on the Growth of Yeast Cultures. In Coherent Excitations in Biological Systems. Eds. Froblich H. and Kremer F. Springer, 1983, p. 21–37.
3. **Девятков Н.Д., Голант М.Б., Бецкий О.В.** Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности. М.: Радио и связь, 1991.
4. **Классен В.И.** Омагничивание водных систем. М.: Химия, 1982, 296 с.
5. **Бецкий О.В., Девятков Н.Д., Кислов В.В.** Биомедицинская радиоэлектроника, 1998, № 4, с. 13–29.
6. **Петросян В.И., Жигенева Э.А., Гуляев Ю.В.** Биомедицинская радиоэлектроника. Радиотехника, 1996, № 9, с. 20–31.
7. **Петросян В.И., Синицин Н.И., Елкин В.А., Девятков Н.Д., Гуляев Ю.В.** Биомедицинская радиоэлектроника, 2001, № 5–6, с. 62–114.
8. **Karapetian A.T., Mehrabian N.M., Terzikian G.A., Vardevanian P.O., Antonian A.P., Borisova O.F., Frank-Kamenetskii M.D.** J. Biomol. Struct. Dyn., 1996, v. 14, № 2, p. 275–283.
9. **Кантор И., Шиммель П.** Биофизическая химия. Т. 2. М.: Мир, 1984.
10. **Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Pirumyan K.V., Muradyan A.M., Karapetian A.T.** J. Biomol. Struct. Dyn., 2008, v. 25, № 6, p. 641–646.
11. **Бабаян Ю.С., Акопян С.Н., Казарян Р.С., Калантарян В.П., Симонян Г.С., Хачатрян А.Б., Антонян А.П., Вардеванян П.О.** Биомедицинские технологии и радиоэлектроника, 2006, № 11, с. 64–68.
12. **Pakhomov A.G., Akyel Y., Pakhomova O.N., Stuck B.E., Murphy M.P.** Current State and Implications of Research on Biological Effects of Millimeter Waves: A review of the literature. Biomagnetics, 1998, v. 19, p. 393–413.

Ա. Վ. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ

ՄՄ-ԱՅԻՆ ՏԻՐՈՒՅԹԻ ՈՉ ՋԵՐՍԱՅԻՆ ԿՈՀԵՐԵՆՏ
ԷԼԵԿՏՐՄԱԳՆԻՍԱԿԱՆ ԱԼԻՔՆԵՐԻ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԳՆԹ-Ի ԵՎ
Hoechst 33258 ՄԻԱՑՈՒԹՅԱՆ ՀԵՏ ՆՐԱ ԿՈՍՊԼԵՔՍՆԵՐԻ
ՋԵՐՍԱԿԱՅՈՒՆՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ամփոփում

Ուսումնասիրվել է մի-ային էլեկտրոմագնիսական ալիքների (ՄՄԷՄ) ազդեցությունը ԳՆԹ-ի և Hoechst 33258 միացության հետ նրա կոմպլեքսների ջերմակայունության վրա լուծույթի իոնական ուժի փոփոխության լայն միջակայքում (0,002–0,1 $M Na^+$): Հայտնաբերվել է, որ ՄՄԷՄ-ով ճառագայթելիս լուծույթի ցածր իոնական ուժերի դեպքում ($\mu \sim 0,002 M Na^+$) ԳՆԹ-ի և Hoechst 33258-ի հետ նրա կոմպլեքսների ջերմակայունությունը զգալիորեն մեծանում է չճառագայթված նմուշներից հետ համեմատած: Լուծույթի իոնական ուժի մեծացման դեպքում ճառագայթված և չճառագայթված նմուշների ջերմակայունությունները քիչ են տարբերվում: Հայտնաբերվել է նաև, որ ճառագայթելիս Hoechst 33258 միացության կողմից ԳՆԹ-ի ԱԹ-հաջորդականությունների մկատմամբ սպեցիֆիկություն չի դրսևորվում լուծույթի բարձր իոնական ուժերի դեպքում:

A. V. GRIGORYAN

INFLUENCE OF NOT THERMAL COHERENT ELECTROMAGNETIC
WAVES OF MM-DIAPAZON ON THERMOSTABILITY OF DNA AND
ITS COMPLEXES WITH Hoechst 33258

Summary

The influence of MMEMW on thermostability of DNA and its complexes with Hoechst 33258 in a wide interval of ionic strength of the solution (0,002–0,1 $M Na^+$) has been carried out. It is revealed that at low ionic strength of a solution ($\mu \sim 0,002 M Na^+$) thermostability of DNA and its complexes with Hoechst 33258 at irradiation by MMEMW considerably increases in comparison with nonirradiated samples.

Increasing the ionic strength of the solution the thermostability of the irradiated and nonirradiated samples differ very little. It is also revealed that at irradiation the specificity of Hoechst 33258 to AT-sequences of DNA at high ionic strength is not shown.