

Ю. Г. ШКОРБАТОВ, д-р биол. наук, ст. научн. сотр., **В. Н. ПАСЮГА**, асп.,
А. Л. САВЕНКОВА *, асп., **Н. Н. КОЛЧИГИН**, д-р физ.-мат. наук, проф.,
В. А. ГРАБИНА, канд. физ.-мат. наук, ст. научн. сотр.

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина

**Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт»*

СОСТОЯНИЕ ХРОМАТИНА КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА КАК ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ ПОКАЗАТЕЛЬ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ СРЕДЫ

Запропоновано метод дослідження хроматину в клітинах букального епітелію людини у зв'язку із впливом екологічно шкідливих чинників для оцінки шкідливості дії. Проведено аналіз впливу низькоенергетичного мікрохвильового випромінювання, а також широкого діапазону енергій широкопалосового імпульсного випромінювання на стан хроматину в ядрах клітин букального епітелію людини. Проведено дослідження впливу розчинів нітрату свинцю різної концентрації, а також води із артезіанських свердловин, збагачених іонами хрому, на даний показник. Показана стресова реакція клітини на вказані чинники, проявом якої є конденсація хроматину.

Ключові слова: стресові чинники зовнішнього середовища, електромагнітне поле, іони важких металів, букальний епітелій, хроматин

The method of assessment of ecological hazards by chromatin state of condensation was proposed. The influence of low-level microwave irradiation and ultra wideband pulse irradiation of broad range of intensity was studied. The effects of heavy metal ions (Pb^{2+}) and natural water with elevated concentration chrome was also investigated. Stress reaction of cells expressed by chromatin condensation was shown.

Key words: environmental stress factors, electromagnetic field, heavy metal ions, buccal epithelium, chromatin

Предлагается метод исследования хроматина в клетках буккального эпителия человека в связи с влиянием экологически вредных факторов для оценки вредности воздействия. Проведен анализ влияние низкоэнергетического микроволнового излучение, а также широкого диапазона энергий широкополосного импульсного излучения на состояние хроматина в ядрах клеток буккального эпителия человека. Проведено исследование влияния растворов нитрата свинца разной концентрации, а также воды из артезианских колодцев, обогащенных ионами хрома, на данный показатель. Показана стрессовая реакция клетки на указанный факторы, которая проявляется в конденсации хроматина.

Ключевые слова: стрессовые факторы внешней среды, электромагнитное поле, ионы тяжелых металлов, буккальный эпителий, хроматин

Разработка методов оценки влияния факторов окружающей среды на организм человека остается актуальной проблемой. В существующих биологических экспресс-методах в качестве биологических индикаторов используют различные организмы различных таксономических групп – бактерий, простейших, ракообразных, позвоночных. Вместе с тем, биологическое действие

различных факторов среды на организм человека может иметь определенную специфичность и, следствие этого, данные, полученные на других организмах, нельзя механистически применять к человеку. Исследования влияния средовых факторов на человеческий организм в эксперименте невозможно, поэтому особое значение приобретают исследования на культурах клеток человека. Имеются методы определения мутагенности средовых факторов по учету частоты возникновения хромосомных aberrаций или микроядер [3]. Вместе с тем, эти методы доста-

точно сложны методически, требуют дорогостоящего оборудования и длительного времени исследований (как минимум, нескольких суток). Целью данного исследования было разработка нового общего подхода к исследованию влияния разнообразных средовых факторов, как физической, так и химической природы, на клетки человека в культуре.

Имеются многочисленные свидетельства отрицательного влияния низкоэнергетического микроволнового облучения на состояние здоровья человека [5, 8, 9, 11]. По нашему мнению, основой влияния электромагнитных факторов на организм является влияние этих факторов на клетку и клеточное ядро, поскольку Факторы электромагнитной природы способны непосредственно проникать внутрь клетки и взаимодействовать со структурами клетки. Известно, что микроволновое облучение вызывает ряд морфологических изменений, в частности, увеличение объема ядер и клеток [2]. В наших исследованиях было показано влияние низкоэнергетического микроволнового излучения на структуру хроматина [13], а также импульсных широкополосных излучений на состояние хроматина в клетках человека [14]. Аналогичное действие оказывает и излучение гелий-неонового лазера [12], теплового шок и ультрафиолетового излучение [7]. С другой стороны, ранее нами было показано изменение показателя степени конденсированности хроматина при действии токсических химических веществ, растворенных в воде [6]. Мы предлагаем использовать в качестве общего индикатора влияния неблагоприятных факторов среды состояние хроматина в клетках буккального эпителия человека. В данной работе рассмотрены эффекты последствий электромагнитных полей и токсических веществ, растворенных в воде на состояние хроматина в клетках.

Материалы и методы. В наших исследованиях применяли переживающую культуру клеток буккального эпителия. Клетки помещали в буферный раствор следующего состава: 3,03 мМ фосфатный буфер, pH=7,0 с добавлением 2,89 мМ хлорида кальция. Клетки буккального эпителия получали, соскабливая тупым шпателем с внутренней пове-

рхности щеки. Клетки окрашивали 2% орсеином в 45% уксусной кислоте в течение 5 минут [12]. Состояние хроматина в ядрах клеток оценивали по содержанию гранул гетеро-хроматина (СГГ) при увеличении $\times 600$. Количество гранул гетерохроматина подсчитывали в одном ядре и затем среднее количество гранул определяли для 30 ядер. В каждом варианте опыта проводили от 3-х до 4-х независимых экспериментов (в каждом эксперименте исследовали 30 ядер, эксперименты производились в разные дни). Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента. Стандартная ошибка не превышала 5% от среднего значения СГГ.

Клетки человека подвергали действию электромагнитного поля с частотой 36,5 ГГц и интенсивностью на уровне объекта от 10^{-6} до 10^{-4} Вт/см² и широкополосного импульсного поля с интенсивностью от 10^{-6} до 10^{-2} Вт/см². Для получения электромагнитного поля заданных характеристик применяли оригинальные установки. Время облучения составляло 10 с. Клетки также подвергали действию водных растворов солей свинца, а также воды из артезианских скважин и водопроводной воды течение 6 часов. Мы использовали следующие варианты воздействия: (1) контроль - клетки в буферном растворе (см. выше), (2) водопроводная вода, (3) вода из артезианского колодца №1, содержащая Cr^{6+} в концентрации 3,0 мг/л, (4) вода из артезианского колодца №2, $^{4\pm}$ содержащая Cr^{6+} в концентрации 1,5 мг/л, (5) упомянутый выше буферный раствор с добавлением Pb^{2+} в концентрации 50 мг/л; (5) раствор с Pb^{2+} в концентрации 100 мг/л. Все растворы готовили следующим образом – к 10 мкл суспензии клеток в буферном растворе, описанном выше, добавляли 10 мкл исследуемого раствора.

Результаты и обсуждение. На рис. 1-3 представлены результаты эксперимента по влиянию широкополосного импульсного и микроволнового излучения на состояние хроматина в ядрах клеток человека. Из приведенных данных видно, что широкополосное импульсное и микроволновое излучение вызывают стрессовую

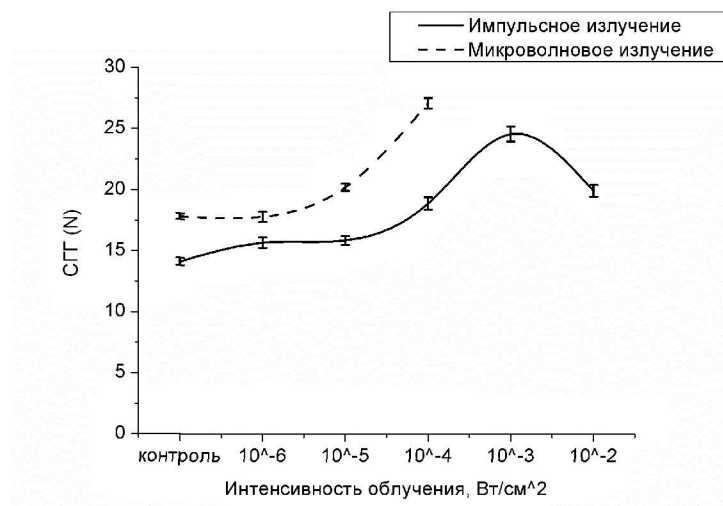


Рисунок 1 – Влияние широкополосного импульсного и микроволнового излучения на показатель СГГ клеток буккального эпителия человека (Донор А)

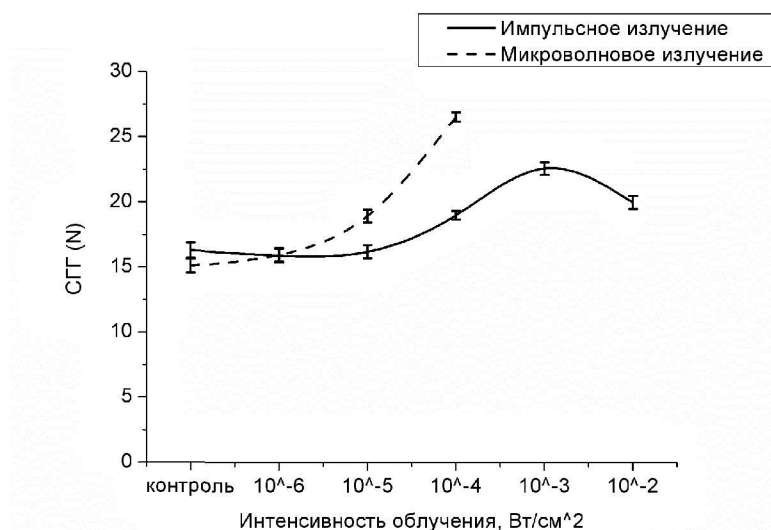


Рисунок 2 – Влияние широкополосного импульсного и микроволнового излучения на показатель СГГ клеток буккального эпителия человека (Донор В)

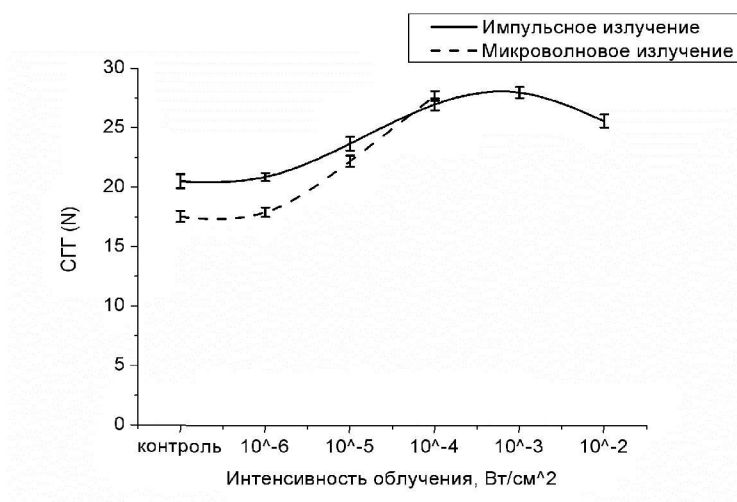


Рисунок 3 – Влияние широкополосного импульсного и микроволнового излучения на показатель СГГ клеток буккального эпителия человека (Донор С)

реакцию клетки – конденсацию хроматина в ядрах клеток человека. Микроволновое излучение вызывает больший по силе эффект, чем широкополосное импульсное той же мощности. При действии электромагнитного поля наблюдается нелинейная зависимость биологического эффекта от мощности излучения. Пороговой мощностью для микроволнового излучения является 10^{-5} Вт/см², для импульсного – значительно выше – 10^{-4} Вт/см².

Наблюдаемый эффект можно связать с разной степенью поглощения энергии излучения в водной среде, она выше для микроволнового излучения миллиметрового диапазона, чем для широкополосного импульсного излучения. При этом широко-полосное импульсное излучение может проникать

глубже в водную среду и ткани человека, чем микроволновое излучение [10]. Увеличение мощности широкополосного импульсного излучения до 10^{-2} Вт/см² приводит к уменьшению степени конденсации хроматина, относительно уровня, наблюдаемого при меньшей мощности – 10^{-3} Вт/см². Мы полагаем, что это связано с гибелью клеток вследствие термического эффекта излучения, поскольку данная мощность оказывает тепловое действие [4].

Мы также исследовали влияние химических агентов на предлагаемый показатель состояние хроматина в клетках человека. На рис. 4 представлены результаты эксперимента по влиянию водных растворов свинца и воды из артезианских колодцев на состояние хроматина в ядрах клеток человека.

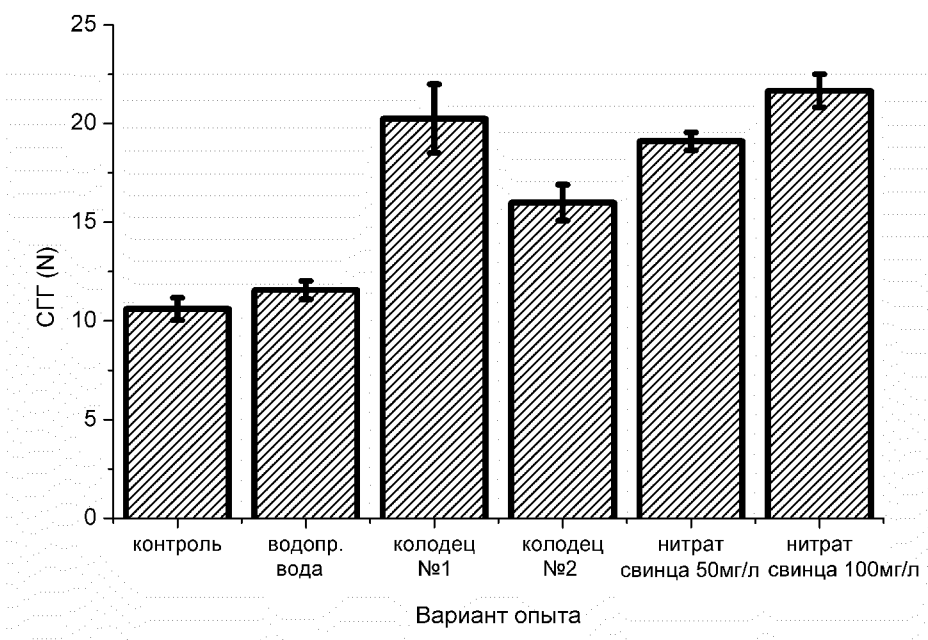


Рисунок 4 – Влияние водных растворов нитрата свинца и воды из артезианских колодцев на показатель СГГ клеток букального эпителия человека (Донор D)

Известно было, что в воде из артезианских колодцев повышено содержание хрома, в частности, имеется значительное содержание шестивалентного хрома, содержание которого в питьевой воде в концентрации, регистрируемой стандартными методами, не допустимо [1]. Для сравнения, в качестве заведомо токсичных растворов использовали растворы нитрата свинца, приготовленные на описанном ниже буферном растворе.

Из представленных данных видно, что раствор нитрата свинца вызывает значи-

тельное увеличение СГГ, причем увеличение концентрации вызывает возрастание степени гетерохроматинизации. Статистически значимое возрастание СГГ вызывает и вода из артезианских колодцев, причем более выраженный эффект вызывает вода из колодца №1. Водопроводная вода не оказывала статистически значимого влияния на показатель СГГ.

Выводы. Представленные данные дают возможность сделать вывод, что физические факторы электромагнитной природы (микроволновое и широкополосное импульсное из-

лучение) вызывает стрессовую реакцию на клеточном уровне, которая проявляется в конденсации хроматина в гранулы, регистрируемая с помощью предложенной методики. Аналогичные изменения вызывают и ионы тяжелых металлов (Pb^{2+}) в эксперименте и шестивалентного хрома в воде из артезианских скважин.

Все это позволяет рекомендовать данный метод для оценки экологической вредности. Метод является экспресс методом (время исследования 10-15 мин), является достаточно удобным и недорогостоящим.

ЛИТЕРАТУРА

1. Державні санітарні правила і норми "Вода питна. Гігієнічні вимоги до якості води централізованого господарсько-питного водопостачання" Затверджено наказом Міністерства охорони здоров'я України від 23 грудня 1996 р. № 383. Зареєстровано в Міністерстві юстиції України 15 квітня 1997 р. за № 136/1940
2. Залюбовская Н. П. Влияние электромагнитных волн миллиметрового диапазона на клетки культуры ткани / Н. П. Залюбовская, Р. И. Киселев, Е. Ф. Тесленко-Пономаренко // Экспериментальная и клиническая радиология. – 1973. – № 9. – С. 177-179.
3. Колубаева С. Н. Исследование радиационных повреждений в лимфоцитах человека методом микроядерного и хромосомного анализа / С. Н. Колубаева, В. В. Ракецкая, Е. А. Борисова, В. Е. Комар // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1995. – Т. 35, вып. 2. – С. 150 – 156.
4. Майкельсон С. М. Биологические эффекты СВЧ-излучения: Обзор / С. М. Майкельсон // ТИИЭР. – 1980. – Т. 68, № 1. – С. 49-60.
5. Сердюк А. М. Взаимодействие организма с электромагнитными полями как факторами окружающей среды / А. М. Сердюк – К.: Наукова думка, 1977. – 228 с.
6. Шкорбатов Ю. Г. Состояние хроматина как индикатор экологической безопасности / Ю. Г. Шкорбатов, А. Л. Савенкова // Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии – 2009: материалы V Международной научно-технической конференции – Севастополь, 2009. – С. 222-224.
7. Шкорбатов Ю. Г. О роли изменений состояния хроматина и биоэлектрических свойств ядер в реакции клеток на внешние воздействия / Ю. Г. Шкорбатов, В. Г. Шахбазов, А. О. Руденко, М. Болхассани // Труды по фундаментальной и прикладной генетике. – Х.: Штрих, 2001. – С. 128-139
8. Lacy-Hulbert A., Metcalfe J.C., Hesketh R. Biological responses to electromagnetic fields / A. Lacy-Hulbert, J.C. Metcalfe, R. Hesketh // The FASEB Journal. – 1998. – No 12. – P. 395-420.
9. Repacholi M. H. Radifrequency field exposure and cancer: What do the laboratory studies suggest? / M. H. Repacholi // Env. Health Res. Persp. – 1997. – V. 105, Suppl. 6. – P. 1565 - 1568.
10. Simicevic N. Exposure of biological material to ultra-wideband electromagnetic pulses. Dosimetric implications / N. Simicevic // Health Physics. – 2007 – V. 92, No 6. – P. 574-583.
11. Szmigielski S. Cancer morbidity in subjects occupationally exposed to high frequency (radio-frequency and microwave) electromagnetic radiation / S. Szmigielski // Sci. Total Environ. – 1996. – V. 180. – P. 9-17.
12. Shckorbatov Y. G. He-Ne laser light induced changes in the state of chromatin in human cells / Y. G. Shckorbatov // Naturwissenschaften. – 199. – V. 86, No 9. – P. 452-453.
13. Shckorbatov Y. G. Changes in the human nuclear chromatin induced by ultra wideband pulse irradiation / Y. G. Shckorbatov, V. N. Pasiuga, N. N. Kolchigin and others // Central European Journal of Biology. – 2009. – V. 4, No 1. – P. 97-106.
14. Shckorbatov Y. G. The influence of differently polarized microwave radiation on chromatin in human cells / Y. G. Shckorbatov, V. N. Pasiuga, N. N. Kolchigin and others // International Journal of Radiation Biology. – 2009. – V. 85, No 4. – P. 322-329.

Надійшла до редколегії 23.09.2009