

КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ, ДНК-ИНТЕРКАЛЯТОРОВ, C₆₀-ФУЛЛЕРЕНА И КОФЕИНА НА КЛЕТКИ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА

Г. Б. Скамрова¹

Ю. И. Прилуцкий²

М. П. Евстигнеев^{1,3}

¹Севастопольский национальный технический университет, Украина

²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина

³Белгородский государственный университет, Россия

E-mail: max_evstigneev@mail.ru

Получено 03.02.2014

В последние десятилетия значительно возросло количество физических и химических биологически активных повреждающих факторов. Пути нейтрализации их действия исследованы недостаточно. В работе использованы методы визуальной оценки грануляции хроматина и электроотрицательности ядер клеток буккального эпителия человека с целью изучения комбинированного влияния низкоинтенсивного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона и ДНК-интеркаляторов: антибиотика доксорубицина, мутагенов бромистого этидия и профлавина, а также кофеина и C₆₀-фуллереина, непосредственно не взаимодействующих с ДНК. При действии электромагнитного излучения с исследуемыми ДНК-связывающимися веществами обнаружен синергетический эффект, заключающийся в уменьшении клеточного ответа, обусловленного электромагнитным излучением и препаратами. Во время облучения клеток в присутствии C₆₀-фуллереина или кофеина наблюдали протекторный эффект этих веществ относительно электромагнитного излучения. Полученные результаты являются основанием для использования C₆₀-фуллереина и кофеина в качестве ДНК-протекторов при действии электромагнитного излучения.

Ключевые слова: ДНК-интеркаляторы, C₆₀-фуллерен, электромагнитное излучение, буккальный эпителий человека.

Изучение совместного действия электромагнитного излучения (ЭМИ) микроволнового диапазона и биологически активных соединений (БАС) на живой организм представляет большой интерес, обусловленный перспективой использования комбинированного воздействия лекарственных препаратов и ЭМИ в терапии различных заболеваний. Существуют основания полагать, что первичной мишенью действия слабого ЭМИ микроволнового диапазона на клеточном уровне является ядерный хроматин [1, 2]. Взаимодействие ЭМИ с хроматином может изменять степень электростатических взаимодействий ДНК–протеин и вызывать изменение функционального состояния клеток, проявляющееся в разнообразных клеточных эффектах, регистрируемых различными методами [3–6]. Учитывая это, особое внима-

ние следует уделить комбинированному взаимодействию слабого ЭМИ микроволнового диапазона с соединениями, механизм действия которых обусловлен нековалентным комплексобразованием с ядерной ДНК. Наиболее распространенной группой БАС, действующих по этому механизму, являются ароматические ДНК-интеркаляторы [7, 8]. В связи с этим в работе изучены типичные и ДНК-связывающиеся БАС: противоопухолевый антибиотик доксорубин (DOX) и ароматические мутагены профлавин (PF) и бромистый этидий (EB).

Вклад ЭМИ в повреждение ДНК, индуцированного DOX, и кинетику ее восстановления был рассмотрен в работе [9]. Результаты исследования *in vitro* на В-лимфобластоидных клетках человека показали, что ЭМИ на частоте 1,8 ГГц непосредственно не вызыва-

ло повреждения ДНК, но могло в некоторой степени влиять на процессы репарации ее повреждений, вызванных DOX. Однако при исследовании возможного взаимодействия ЭМИ миллиметрового диапазона с DOX в работе [10] подобного эффекта обнаружено не было. Также не выявлен синергизм во взаимном действии микроволнового излучения (2,45 ГГц) и ароматического мутагена RF в серии экспериментов на лейкемических клетках мышей [11].

В работе [12] исследован комбинированный эффект EB (1 мг/мл) и микроволнового излучения круговой поляризации на хроматин клеточных ядер. При облучении без EB левополяризованное излучение приводило к изменениям в конформации хроматина *E. coli*, в то время как правополяризованное излучение не вызывало никаких видимых изменений. Так, при инкубации клеток с EB правополяризованное ЭМИ становилось более эффективным, чем левополяризованное.

Существующие немногочисленные данные о комбинированном взаимодействии БАС и ЭМИ противоречивы. Наблюдаемый эффект может зависеть как от выбора объекта исследования, так и от параметров облучения ЭМИ, что затрудняет выявление механизма взаимодействия.

В работе исследовано комбинированное действие слабого ЭМИ миллиметрового диапазона и препаратов, связывающихся с ДНК — DOX, EB и RF, на клетки буккального эпителия человека. Размер этих клеток позволяет наблюдать структурные изменения хроматина в ядре и состояние мембраны при помощи оптического микроскопа с минимальным воздействием на исследуемую систему и хорошей воспроизводимостью результатов [6, 13]. В качестве тест-системы изучены соединения, не оказывающие действия непосредственно на ДНК, — кофеин (CAF) и C₆₀-фуллерен.

Материалы и методы

Эпителиальные клетки. Клетки буккального эпителия были собраны у трех взрослых доноров тупым стерильным шпателем и осаждались центрифугированием при 3000 об/мин в течение 2 мин в фосфатном буфере следующего состава: 3,03 мМ фосфатный буфер, pH 7,0, с добавлением 2,89 мМ хлорида кальция. Затем надосадок удаляли и доводили объем фосфатным буфером до 1 мл. Промывку проводили 3 раза, после

чего суспензию клеток разбавляли буферным раствором и распределяли по пробиркам по $5 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^5$ клеток в каждую. В течение всего времени эксперимента у клеток не наблюдалось видимых изменений структуры ядра и клеточной мембраны, а также показателей электроотрицательности клеточных ядер и состояния хроматина. Забор клеток проводили у двух доноров женского пола: доноры А — 24 года и В — 20 лет, и одного донора мужского пола: донор С — 21 год. Все доноры были практически здоровы, не курящие.

Оценка количества гранул гетерохроматина (КГГ). Исследования процесса гетерохроматинизации дает возможность оценить изменения функциональной активности клеточного ядра [14]. Оценку КГГ осуществляли с помощью метода, подробно описанного в работе [6]. Облученные клетки и контрольный образец были окрашены 2%-м раствором орсеина в 45%-й уксусной кислоте. Ядра клеток визуально изучали под микроскопом MICROmed XS-3330 при увеличении 1000. В каждом образце КГГ было определено для 30 случайно выбранных клеток [6].

Оценку электроотрицательности ядер (ЭОЯ, %) проводили по методу, предложенному в [15]. Клетки буккального эпителия помещали в камеру для микроэлектрофореза между двумя покровными стеклами. Камеру заполняли фосфатным буфером и помещали под микроскоп. Исследования выполняли при напряженности поля 10–12 В/см, электрическом токе 0,2–0,4 мА и фиксированной частоте 0,1 Гц. На протяжении эксперимента (на пиках напряженности) производили снимки образца. Ядра в клетках буккального эпителия в данных условиях эксперимента либо проявляли отрицательный заряд, либо не смещались в электрическом поле, т. е. не имели заряда. Показателем ЭОЯ служил процент клеточных ядер, смещающихся в сторону анода, т. е. несущих отрицательный заряд. Для каждого образца проводили 3 измерения ЭОЯ по 100 ядер в каждом, а затем рассчитывали его среднюю величину.

Вещества. Раствор доксорубицина (Doxorubicin Teva, Нидерланды) при концентрации 2 мг/мл ($3,448 \cdot 10^{-3}$ моль/л) получали путем растворения точной навески (10 мг) вещества в 5 мл буферного раствора. Затем 0,058 мл этого раствора разбавили 0,942 мл фосфатного буферного раствора до концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

Раствор бромистого этидия (Sigma, США) концентрацией $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л был получен растворением 1,97 мг навески вещества в 5 мл фосфатного буфера. Далее 0,4 мл исходного раствора разбавили 0,6 мл буфера до концентрации $4 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

Раствор профлавина (Sigma, США) концентрацией $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л получили, растворив 1,05 мг навески вещества в 5 мл фосфатного буфера. Затем 0,4 мл исходного раствора разбавляли 0,6 мл буфера до концентрации $4 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

Водный раствор немодифицированного C_{60} -фуллерена был приготовлен согласно методике [16, 17]. Насыщенный раствор C_{60} -фуллерена (чистота 99,5%) в толуоле смешивали с таким же количеством дистиллированной воды. На полученную двухфазную систему воздействовали ультразвуком до полного испарения толуола. Далее раствор фильтровали для удаления нерастворенного C_{60} -фуллерена. Таким образом получили стабильный коллоидный водный раствор C_{60} -фуллерена при концентрации 0,1 мг/мл ($1,39 \cdot 10^{-4}$ моль/л).

Раствор кофеина (Sigma, США) концентрацией $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л был получен путем растворения 9,71 мг навески вещества в 5 мл буфера.

Метод определения токсичности БАС. К 0,5 мл клеточной суспензии добавляли 0,5 мл раствора препаратов в фосфатном буфере. В таблице представлена концентрация используемых растворов.

Концентрация растворов биологически активных соединений

Препарат	Концентрация, моль/л
Доксорубин (DOX)	$5 \cdot 10^{-6}$
Бромистый этидий (EB)	$1 \cdot 10^{-5}$
Профлавин (PF)	$1 \cdot 10^{-5}$
C_{60} -фуллерен	$6,65 \cdot 10^{-5}$
Кофеин (CAF)	$4,75 \cdot 10^{-3}$

Клетки буккального эпителия человека инкубировали с растворами БАС в фосфатном буфере в течение 10 мин при комнатной температуре. Для каждого вещества были приготовлены 2 образца, один из которых подвергался облучению в процессе воздействия БАС.

Источник излучения. Клетки облучали ЭМИ на частоте беспроводной связи WiMAX 3,7 ГГц. Беспроводная сеть WiMAX предоставляет связь на больших расстояниях и в

настоящее время активно развивается. Для генерирования ЭМИ с частотой 3,7 ГГц применяли установку, схема и принцип действия которой подробно описаны в работе [18]. Образец облучали в течение 10 мин в пробирках Eppendorf (1,5 мл) при значении плотности потока мощности, равной 40 мкВт/см². Ранее на клетках буккального эпителия было показано, что при этой мощности и времени экспозиции наблюдается статистически значимое увеличение КГГ относительно контрольного необлученного образца [18].

Статистическая обработка данных. Расчеты средних значений и стандартных ошибок среднего производили в программе Microsoft Office Excel и SigmaPlot. Достоверность различий между средними значениями полученных показателей и контролем оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Влияние ЭМИ миллиметрового диапазона на хроматин и ядра клеток буккального эпителия человека. Ранее в рамках изучения влияния ЭМИ с различными характеристиками на клетки буккального эпителия человека был опубликован ряд исследований, результаты которых позволили выявить ответ клеток на ЭМИ [6, 18–23]. В частности, обнаружено, что микроволновое излучение может вызывать переходы из эухроматина в гетерохроматин, т. е. приводить к увеличению КГГ в ядрах клеток человека [6, 18, 21–23]. Кроме того, установлено, что это явление связано с видом поляризации электромагнитной волны [6] и зависит от мощности [18] и времени экспозиции [19]. Выявлено также, что действие электрического поля на хроматин выражено сильнее, чем магнитного [20]. По результатам исследований выдвинута гипотеза о том, что изменения структуры хроматина (процесс гетерохроматинизации) могут быть связаны с электростатическими индуцированными ЭМИ взаимодействиями между ДНК и протеинами в ядре. Следует также упомянуть об электрокинетических свойствах клеточных ядер, тесно связанных с процессами регуляции активности клеток. Изменение ЭОЯ клеток буккального эпителия человека под воздействием ЭМИ выявлено в работах [22–25]. Также было продемонстрировано, что слабое ЭМИ миллиметрового диапазона приводило к увеличению проницаемости мембран клеток буккального эпителия для витальных

красителей индигокармина и трипанового синего [23, 24, 26, 27]. Однако изменения проницаемости клеточных мембран выражено менее интенсивно, чем КГГ, что может указывать на большую чувствительность хроматина к ЭМИ в миллиметровом диапазоне.

В работе в качестве предварительного этапа изучения комбинированного действия ЭМИ и БАС исследовано влияние ЭМИ на частоте 3,7 ГГц при 10-минутной экспозиции на грануляцию хроматина и изменение ЭОЯ клеток буккального эпителия человека. Результаты представлены на рис. 1. Из них следует, что для всех доноров при воздействии ЭМИ наблюдается значительное увеличение КГГ относительно контроля. При этом у донора А обнаружена наибольшая чувствительность к действию ЭМИ. В то же время для всех доноров при данных условиях облучения наблюдалось снижение величины ЭОЯ. Подобная корреляция между электроотрицательностью клеточного ядра и состоянием хроматина была установлена ранее [28] и указывает на единообразный характер проявления механизма действия ЭМИ на функциональное состояние ядра. Выше было упомянуто, что и грануляция гетерохроматина, и уменьшение показателя ЭОЯ свидетельствуют об уменьшении активности клеток. Следует отметить, что показатель ЭОЯ, согласно результатам данной работы, оказался менее чувствительным к воздействию ЭМИ, чем КГГ.

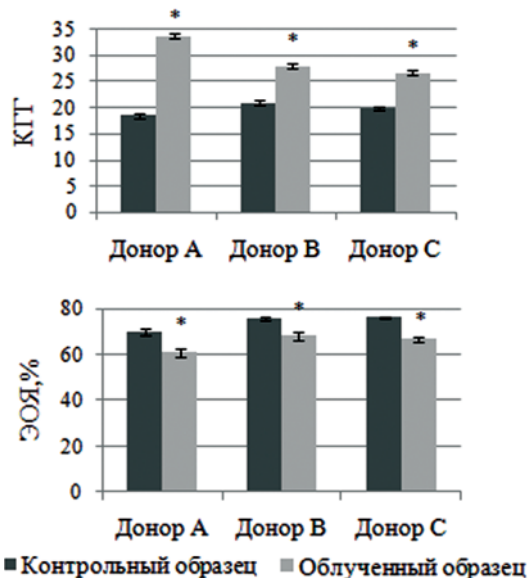


Рис. 1. Изменение количества гранул гетерохроматина и электроотрицательности ядер в клетках буккального эпителия человека под воздействием электромагнитного излучения.

Здесь и далее приведены значения $M \pm m$;
* — $P < 0,05$ по сравнению с контролем

Таким образом, на клетках буккального эпителия человека наблюдается выраженный эффект воздействия низкоинтенсивного ЭМИ на хроматин и электрокинетические свойства клеточных ядер, хорошо согласующийся с результатами предыдущих исследований, описанных выше, и косвенно подтверждающий гипотезу, что клеточный хроматин и, в частности, ДНК могут играть роль первичных рецепторов ЭМИ миллиметрового диапазона.

Влияние БАС на хроматин и ядра клеток буккального эпителия человека. Результаты эксперимента по воздействию антибиотика DOX и мутагенов EB и PF на хроматин и ЭОЯ буккального эпителия человека представлены на рис. 2. Эффект исследуемых БАС является подобным для всех доноров и веществ и проявляется в увеличении КГГ относительно контроля. Так же, как и для ЭМИ, наблюдается уменьшение показателя ЭОЯ, коррелирующее с КГГ, однако в некоторых случаях изменения ЭОЯ, согласно t-тесту, не являются статистически значимыми. Как и в предыдущем эксперименте с ЭМИ, показатель ЭОЯ менее чувствителен, чем КГГ.

Для дополнительного подтверждения того факта, что исследуемые препараты DOX/EB/PF при введении в клеточную суспензию действуют непосредственно на уровне хроматина (т. е. интеркалируют в ДНК), а не косвенно, в частности воздействием на другие клеточные компоненты, был проведен подобный эксперимент с C_{60} -фуллереном и САФ, которые не воздействуют на ДНК и *in vitro* оказывают на ДНК лишь косвенное влияние путем комплексообразования с другими БАС [29–32]. Результаты этого эксперимента представлены на рис. 3.

Для каждого донора, согласно t-тесту, не было выявлено статистически значимого изменения КГГ при добавлении в биосистему C_{60} -фуллерена и САФ. Изменения ЭОЯ, наблюдаемые у доноров В и С, также весьма незначительны по сравнению с изменением данного параметра под действием ДНК-интеркаляторов. Таким образом, полученные данные косвенно указывают на отсутствие взаимодействия C_{60} -фуллерена и САФ с хроматином и ядром клеток буккального эпителия человека. Этот результат согласуется с распространенным мнением о нетоксичности чистого C_{60} -фуллерена и САФ по отношению к клеточным органеллам [33, 34]. Принимая во внимание изменения в структуре хроматина и электроотрицательности ядер

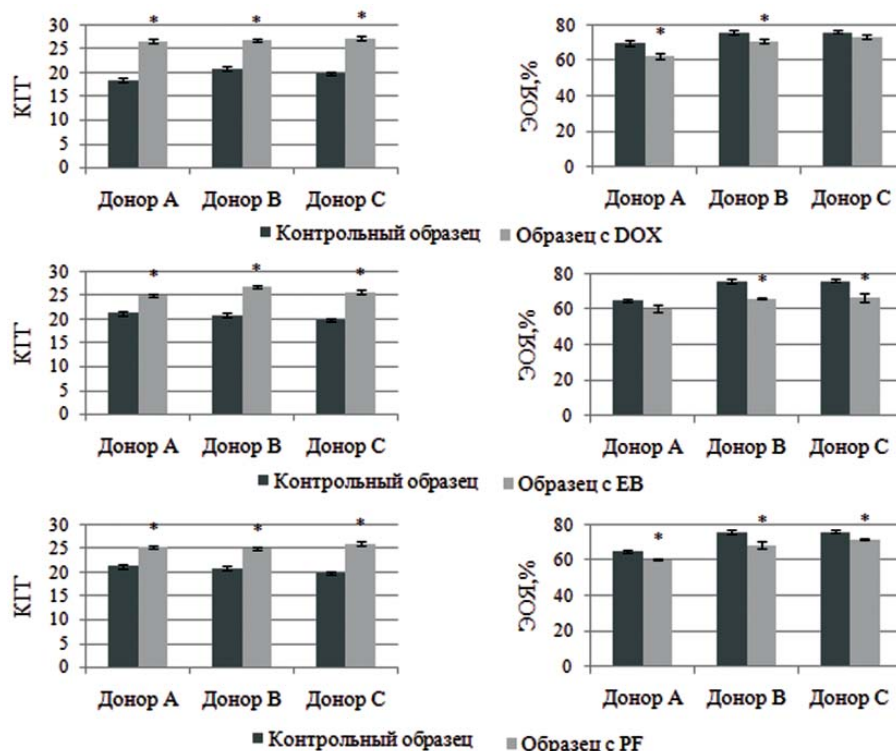


Рис. 2. Изменение количества гранул гетерохроматина и электроотрицательности ядер в клетках буккального эпителия человека под воздействием ароматических БАС

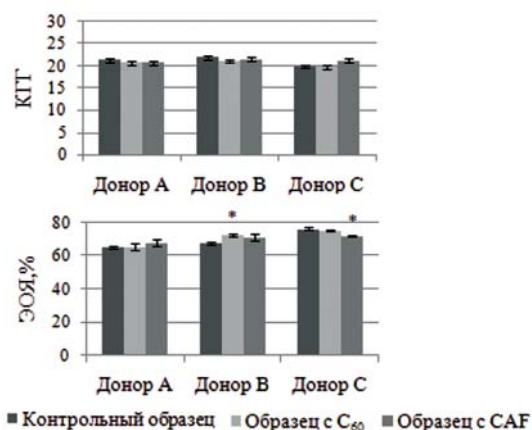


Рис. 3. Изменение количества гранул гетерохроматина и электроотрицательности ядер в клетках буккального эпителия человека под воздействием С₆₀-фуллера и САФ

под воздействием DOX/EB/PF (рис. 2), можно предположить, что исследуемые ДНК-интеркаляторы при введении в клеточную суспензию действуют непосредственно на ДНК, при этом С₆₀-фуллерен и САФ не оказывают на ДНК видимого прямого воздействия.

Полученные результаты соответствуют сведениям о ДНК-повреждающем действии используемых в данной работе ДНК-интеркаляторов. В частности, известно, что DOX

вызывает хромосомные aberrации в лейкоцитах человека [35], в соматических и герминальных клетках мышей [36], а также приводит к апоптозу посредством оксидативного повреждения [37]. Под действием EB наблюдались конденсация хроматина в лимфоцитах человека [38] и положительная суперспирализация ДНК в клетках *E. coli* [12]. PF вызывает мутации по типу сдвига рамки в вирусах, бактериофагах и бактериях, а также приводит к повреждению ДНК в клетках млекопитающих [39].

Действие ЭМИ миллиметрового диапазона и исследуемых ароматических БАС, в соответствии с полученными результатами, имеет однонаправленный характер, проявляющийся в увеличении числа гранул гетерохроматина и уменьшении электроотрицательности клеточных ядер; это дает основания предположить, что первичной мишенью указанных воздействий может быть ДНК, что согласуется с [1, 3–5, 7, 8, 12]. При этом, в отличие от ЭМИ, механизм взаимодействия препаратов DOX, EB и PF с ДНК изучен достаточно полно [40].

Комбинированное влияние ЭМИ и БАС на хроматин и ядра клеток буккального эпителия человека. На рис. 4 представлены результаты комбинированного влияния низкоин-

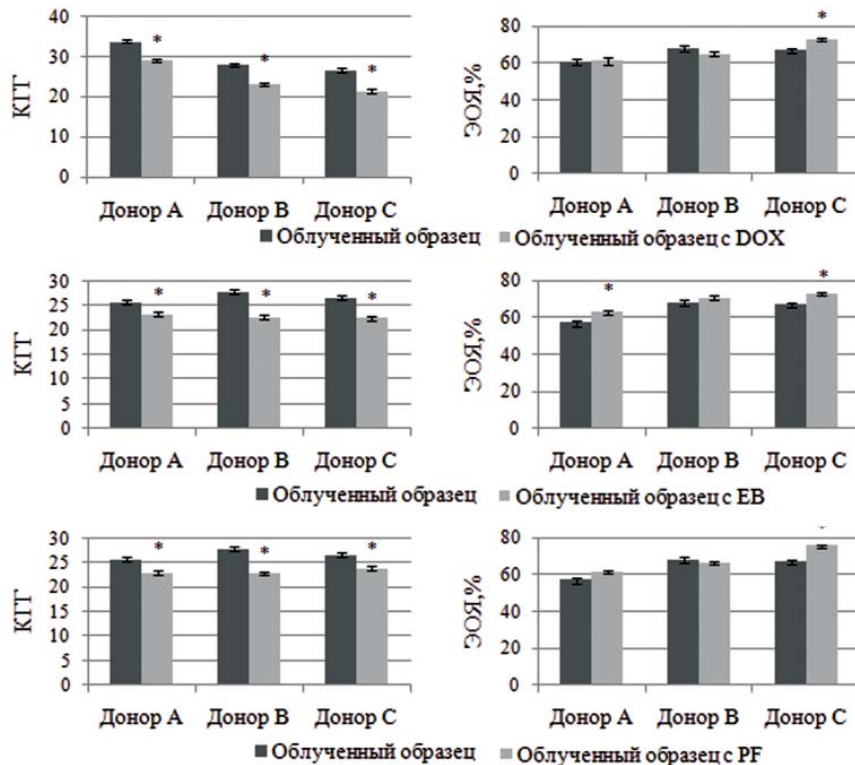


Рис. 4. Изменение количества гранул гетерохроматина и электроотрицательности ядер в клетках буккального эпителия человека при комбинированном воздействии БАС и электромагнитного излучения. Здесь и на рис. 5 * — $P < 0,05$ по сравнению с облученным образцом

тенсивного ЭМИ миллиметрового диапазона и ароматических БАС, из которых следует однотипное для всех доноров снижение КГГ при облучении в случае добавления препарата. За исключением реакции клеток донора А в растворе с DOX, значения КГГ при совместном воздействии ЭМИ и БАС также значительно ниже показателей КГГ при воздействии препаратов. В то же время изменение показателя ЭОЯ в случае добавления DOX, EB или PF статистически значимо лишь для донора С, а также для донора А при добавлении EB.

Как отмечалось выше, действие ЭМИ и БАС на клетки буккального эпителия характеризуется изменением хроматина и клеточных ядер в целом. Однако при совместном действии миллиметрового излучения и препаратов наблюдается синергетический эффект, т. е. снижение гранулирования хроматина и увеличение процента ЭОЯ. Подобно исследуемым препаратам ЭМИ, очевидно, действует непосредственно на ДНК. При этом БАС и ЭМИ проявляют сходный эффект на хроматин и ядра, следовательно, механизмы их действия могут быть противоположными, т. е. либо ЭМИ защищает клетки от ДНК-повреждающего действия рассмотренных в данной работе БАС, либо ДНК-интер-

калаторы экранируют действие ЭМИ. Подобное явление было описано группой ученых из Института микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины. Изучение биологических эффектов излучения при действии стрессового фактора в виде фунгицидных антибиотиков на клетки различных культур дрожжей позволило авторам выявить протекторный характер влияния слабого ЭМИ, который проявляется в повышении устойчивости микроорганизмов к действию антибиотиков при предварительном облучении [41–43]. Подобная защитная роль слабого ЭМИ разных диапазонов частот уже упоминалась ранее в ряде работ [44, 45].

Таким образом, впервые на непролиферирующих клетках буккального эпителия человека обнаружен протекторный эффект при взаимодействии низкоинтенсивного ЭМИ миллиметрового диапазона и ароматических БАС. Выявить молекулярный механизм наблюдаемого эффекта пока не представляется возможным.

Из приведенных на рис. 5 гистограмм следует, что C_{60} -фуллерен и САФ оказывают протекторное действие, подобное тому, что наблюдалось для DOX, EB и PF, т. е. наблюдается восстановление КГГ при облучении клеток в присутствии данных веществ.

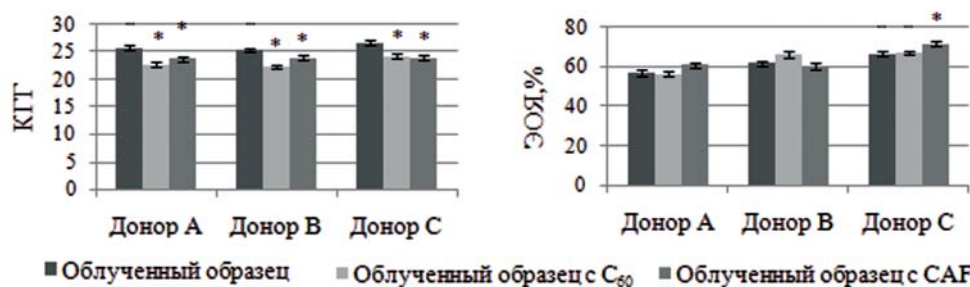


Рис. 5. Изменение количества гранул гетерохроматина и электроотрицательности ядер в клетках буккального эпителия человека при комбинированном воздействии C₆₀-фуллерена/САФ и электромагнитного излучения

Таким образом, в данной работе на клетках буккального эпителия человека с использованием визуальной оценки грануляции хроматина и электроотрицательности ядер был продемонстрирован синергетический эффект частичного восстановления функциональной активности клеток при комбинированном воздействии низкоинтен-

сивного ЭМИ миллиметрового диапазона и ароматических ДНК-интеркаляторов (DOX, EB и PF), а также протекторный эффект C₆₀-фуллерена и САФ по отношению к действию ЭМИ. Полученные результаты указывают на перспективу использования C₆₀-фуллерена и САФ в качестве биопрепаратов-протекторов ДНК-повреждающего воздействия ЭМИ.

REFERENCES

- Belyaev I. Y., Shcheglov V. S., Alipov E. D., Ushakov V. D. Nonthermal effects of extremely high-frequency microwaves on chromatin conformation in cells in vivo-dependence on physical, physiological, and genetic factors. *Microwave Theory and Techniques, IEEE Transactions on*. 2000, 48(11), 2172–2179.
- Bernhardt J. Non-ionizing radiation safety: radiofrequency radiation, electric and magnetic fields. *Phys. Med. Biol.* 1992, 37(4), 807.
- Belyaev I. Y., Hillert L., Protopopova M., Tamm C., Malmgren L. O., Persson B. R., Selivanova G., Harms-Ringdahl M. 915 MHz microwaves and 50 Hz magnetic field affect chromatin conformation and 53BP1 foci in human lymphocytes from hypersensitive and healthy persons. *Bioelectromagnetics*. 2005, 26(3), 173–184.
- Lai H. Single- and double-strand DNA breaks in rat brain cells after acute exposure to radiofrequency electromagnetic radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 1996, 69(4), 513–521.
- Tice R. R., Hook G. G., Donner M., McRee D. I., Guy A. W. Genotoxicity of radiofrequency signals. I. Investigation of DNA damage and micronuclei induction in cultured human blood cells. *Bioelectromagnetics*. 2002, 23(2), 113–126.
- Shckorbatov Y. G., Pasiuga V. N., Kolchigin N. N., Grabina V. A., Batrakov D. O., Kalashnikov V. V., Ivanchenko D. D., Bykov V. N. The influence of differently polarized microwave radiation on chromatin in human cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 2009, 85(4), 322–329.
- Graves D. E., Velea L. M. Intercalative binding of small molecules to nucleic acids. *Cur. Org. Chem.* 2000, 4(9), 915–929.
- Pullman B. Molecular mechanisms of specificity in DNA-antitumor drug interactions. *Springer*. 1989, 123–144 p.
- Zhijian C., Xiaoxue L., Yezhen L., Shijie C., Lifan J., Jianlin L., Deqiang L., Jiliang H. Impact of 1.8-GHz radiofrequency radiation (RFR) on DNA damage and repair induced by doxorubicin in human B-cell lymphoblastoid cells. *Mut. Res.* 2010, 695(1), 16–21.
- Ciaravino V., Meltz M. L., Erwin D. N. Absence of a synergistic effect between moderate-power radio-frequency electromagnetic radiation and adriamycin on cell-cycle progression and sister-chromatid exchange. *Bioelectromagnetics*. 1991, 12(5), 289–298.
- Meltz M. L., Eagan P., Erwin D. N. Proflavin and microwave radiation: absence of a mutagenic interaction. *Bioelectromagnetics*. 1990, 11(2), 149–157.
- Ushakov V. L., Shcheglov V. S., Belyaev I. Y., Harms-ringdahl M. Combined effects of circularly polarized microwaves and ethidium bromide on *E. coli* cells. *Elect. Biol. Med.* 1999, 18(3), 233–242.
- Shckorbatov Y., Pasiuga V., Kolchigin N., Batrakov D., Kazansky O., Kalashnikov V. Changes in the human nuclear chromatin induced by ultra wideband pulse irradiation. *Cent. Eur. J. Biol.* 2009, 4(1), 97–106.
- Therman E., Susman M. Human chromosomes: structure, behavior, and effects. *New York: Springer-Verlag*. 1993, 91 p.
- Shakhbazov V. G., Colupaeva T. V., Nabokov A. L. A new method for determining the biological age. *Lab delo*. 1986, 7, 404–406. (In Russian).
- Scharff P., Carta-Abelmann L., Siegmund C., Matyshevska O. P., Prylutska S. V., Koval T. V., Golub A. A., Yashchuk V. M., Kushnir K. M., Prylutskiy Yu. I. Effect of X-ray and UV irradiation of the C₆₀ fullerene aqueous solution on biological samples. *Carbon*. 2004, 42(5–6), 1199–1201.

17. Prylutska S., Matyshevska O., Grynyuk I., Prylutskiy Yu. I., Ritter U., Scharff P. Biological effects of C₆₀ fullerenes *in vitro* and in a model system. *Mol. Cryst. Liquid Cryst.* 2007, 468(1), 265–274.
18. Boiko O. V., Lantushenko A. O., Lukyanchuk G. A., Salamatin V. V., Shkhorbatov Y. G. The effect of mobile phone microwave radiation and influence of electromagnetic radiation (EMR) of different intensities of WiMAX radio frequency on chromatin in human cells. *Scientific Notes of Taurida National Vernadsky University. Series: Biology and Chemistry.* 2010, 23(62), 56–64. (In Russian).
19. Skamrova G. B., Lantushenko A. O., Shkhorbatov Y. G., Evstigneev M. P. Influence of mobile phone radiation on membrane permeability and chromatin state of human buccal epithelium cells. *Biochem. Biophys.* 2013, 1(2), 22–28.
20. Skamrova G. B., Evstigneev M. P., Trushkin A. N., Shkhorbatov Y. G. The effect of mobile phone and WiMAX network microwave radiation on membrane permeability of human buccal epithelium cells. *Scientific Notes of Taurida National Vernadsky University. Series: Biology and Chemistry.* 2012, 25(64), 187–195. (In Russian).
21. Shkhorbatov Y., Shakhbazov V., Navrotska V., Zhuravliova L., Gorobets N., Kiyko V., Fisun A., Sirenko S. Changes in the state of chromatin in human cells under the influence of microwave radiation. *Sixteenth International Wrocław Symposium and Exhibition on Electromagnetic Compatibility. (11–13 June 2002, Wrocław, Poland).* 2002, V. 1, P. 87–88.
22. Shkhorbatov Y., Grigoryeva N., Shakhbazov V., Grabina V., Bogoslavsky A. Microwave irradiation influences on the state of human cell nuclei. *Bioelectromagnetics.* 1998, 19(7), 414–419.
23. Shkhorbatov Y. G., Shakhbazov V. G., Navrotskaya N. N., Zhuravleva L. A., Gorobets N. N., Kiyko V. I. Changes in cell membrane properties, chromatin state, and electrokinetic properties of human cell nuclei under the influence of low level microwave irradiation. *Microwave and Telecommunication Technology (CriMiCo), 11th International Crimean Conference.* 2001, 92–950 p. (In Russian).
24. Shkhorbatov Y. G., Shakhbazov V. G., Navrotskaya V. V., Grabina V. A., Sirenko S. P., Fisun A. I., Gorobets N. N., Kiyko V. I. Electrokinetic properties of nuclei and membrane permeability in human buccal epithelium cells influenced by the low-level microwave radiation. *Electrophoresis.* 2002, V. 23, P. 2074–2079.
25. Shkhorbatov Y. G., Shakhbazov V. G., Navrotskaya V. V., Grabina V. A., Sirenko S. P., Fisun A. I., Gorobets N. N., Kiyko V. I. Application of intracellular microelectrophoresis to analysis of the influence of the low-level microwave radiation on electrokinetic properties of nuclei in human epithelial cells. *Electrophoresis.* 2002, 23(13), 2074–2079.
26. Shkhorbatov Y. G., Navrotskaya V. V., Zhuraveleva L. A., Gorobets N. N., Kiyko V. I., Sirenko S. P. The influence of microwave irradiation on human epithelial cells. *Phys. and Engineering of Millimeter and Sub-Millimeter Waves, 2001. The Fourth International Kharkov Symposium.* 2001, 2, 937–938.
27. Shkhorbatov Y. G., Pasiuga V. N., Grabina V. A., Artemenchuk O. V., Kolchigin N. N., Bykov V. N., Ivanchenko D. D. Changes in human cell membrane permeability after irradiation by microwaves with different elliptical polarization. *Microwave and Telecommunication Technology (CriMiCo), 20th International Crimean Conference.* 2010, P. 1138–1139.
28. Shkhorbatov Y. G., Shakhbazov V. G., Gorenskaya O. V., Dmitruk T. V., Montvid P. Y. Changes in the state of nucleus and chromatin in human cells under the influence of hormonal factors *in vitro.* *Cytology and Genetics.* 1999, 33(5), 64–71. (In Russian).
29. Buchelnikov A., Kostyukov V., Evstigneev M., Prylutskiy Yu. I. Mechanism of complexation of the phenothiazine dye methylene blue with fullerene C₆₀. *Russ. J. Phys. Chem. A.* 2013, 87(4), 662–667.
30. Evstigneev M. P., Buchelnikov A. S., Voronin D. P., Rubin Yu. V., Belous L. F., Prylutskiy Yu. I., Ritter U. Complexation of C₆₀ fullerene with Aromatic Drugs. *Chem. Phys. Chem.* 2013, 14(3), 568–578.
31. Mchedlov-Petrosyan N., Klochkov V., Andrievsky G., Ishchenko A. Interaction between colloidal particles of C₆₀ hydrosol and cationic dyes. *Chem. Phys. Lett.* 2001, 341(3), 237–244.
32. Evstigneev M. P., Khomich V. V., Davies D. B. Complexation of anthracycline drugs with DNA in the presence of caffeine. *Eur. Biophys. J.* 2006, V. 36, P. 1–11.
33. Shi X., Dalal N., Jain A. Antioxidant behaviour of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. *Food Chem. Toxicol.* 1991, 29(1), 1–6.
34. Prylutska S. V., Grynyuk I. I., Matyshevska O. P., Prylutskiy Yu. I., Ritter U., Scharff P. Antioxidant properties of C₆₀ fullerenes *in vitro.* *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures.* 2008, 16(5–6), 698–705.
35. Vig B. Chromosome aberrations induced in human leukocytes by the antileukemic antibiotic adriamycin. *Cancer Res.* 1971, 31(1), 32–38.
36. Au W. W., Hsu T. The genotoxic effects of adriamycin in somatic and germinal cells of the mouse. *Mut. Res.* 1980, 79(4), 351–361.
37. Müller I., Jenner A., Bruchelt G., Niethammer D., Halliwell B. Effect of concentration on the cytotoxic mechanism of doxorubicin—apoptosis and oxidative DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 230(2), 254–257.
38. Belyaev I. Y., Eriksson S., Nygren J., Torudd J., Harms-Ringdahl M. Effects of ethidium bromide on DNA loop organisation in human lymphocytes measured by anomalous viscosity time dependence and single cell

- gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta (General Subjects)*. 1999, 1428(2), 348–356.
39. Kozurková M., Sabolová D., Janovec L., Mikes J., Koval J., Ungvarský J., Stefanisinová M., Fedorocko P., Kristian P., Imrich J. Cytotoxic activity of proflavine diureas: synthesis, antitumor, evaluation and DNA binding properties of 10, 100-(acridin-3, 6-diyl)-30, 300-dialkyldiureas. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, V. 16, P. 3976–3984.
40. Evstigneev M. P. DNA-binding aromatic drug molecules: physico-chemical interactions and their biological roles. *LAP Lambert Academic Publishing*. 2010, 96 p.
41. Voichuk S., Gromozova E. Effect of radio-frequency of electromagnetic radiation on yeast sensitivity to fungicide antibiotics. *Mikrobiol. J.* 2003, 66(4), 69–77.
42. Voychuk S., Gromozova E., Lytvyn P., Podgorsky V. Changes of surface properties of yeast cell wall under exposure of electromagnetic field (40.68 MHz) and action of nystatin. *Environmentalist*. 2005, 25(2–4), 139–144.
43. Podgorskii V., Voichuk S., Gromozova E., Gordienko A. Protective action of electromagnetic (40.68 MHz) on *Saccharomyces cerevisiae* UCM Y-517. *Mikrobiol. J.* 2004, 66(5), 48.
44. Tambiev A., Kirikova N., Betsky O., Gulyaev Y. Millimeter wave and photosynthetic organisms. *Moscow: Radiotekhnika*. 2003, 175 p. (In Russian).
45. Nakamura H., Nakamura K., Yodoi J. Redox regulation of cellular activation. *Ann. Review Immunol.* 1997, 15(1), 351–369.

КОМБІНОВАНА ДІЯ ЕЛЕКТРОМАГНІТНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ, ДНК-ІНТЕРКАЛЯТОРІВ, C₆₀-ФУЛЕРЕНУ ТА КОФЕЇНУ НА КЛІТИНИ БУКАЛЬНОГО ЕПІТЕЛІЮ ЛЮДИНИ

Г. Б. Скамрова¹
Ю. І. Прилуцький²
М. П. Євстигнєєв^{1,3}

¹Севастопольський національний технічний університет, Україна

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна

³Белгородський державний університет, Росія

E-mail: max_evstigneev@mail.ru

За останнє десятиліття значно зросла кількість фізичних і хімічних біологічно активних ушкоджувальних факторів.

Шляхи нейтралізації їхньої дії досліджено недостатньо. У роботі використано методи візуальної оцінки грануляції хроматину та електронегативності ядер клітин букального епітелію людини з метою вивчення комбінованого впливу низькоінтенсивного електромагнітного випромінювання міліметрового діапазону і ДНК-інтеркаляторів: антибіотика доxorубіцину, мутагенів бромистого етидію і профлавіну, а також кофеїну і C₆₀-фулерену, які безпосередньо не взаємодіють з ДНК. За дії електромагнітного випромінювання з досліджуваними ДНК-зв'язувальними речовинами виявлено синергетичний ефект, який полягає у зменшенні клітинної відповіді, зумовленої електромагнітним випромінюванням і препаратами. За опромінення клітин у присутності C₆₀-фулерену або кофеїну спостерігали протекторний ефект цих речовин стосовно електромагнітного випромінювання. Одержані результати можуть слугувати основою для використання C₆₀-фулерену і кофеїну як ДНК-протекторів за дії електромагнітного випромінювання.

Ключові слова: ДНК-інтеркалятори, C₆₀-фулерен, електромагнітне випромінювання, букальний епітелій людини.

COMBINED EFFECT OF ELECTROMAGNETIC RADIATION, DNA-INTERCALATORS, C₆₀-FULLERENE AND CAFFEINE ON HUMAN BUCCAL EPITHELIUM CELLS

G. B. Skamrova¹
Yu. I. Prylutskyi²
M. P. Evstigneev^{1,3}

¹Sevastopol National Technical University, Ukraine

²Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

³Belgorod State University, Russia

E-mail: max_evstigneev@mail.ru

Now the number of physical and chemical biologically active damage factors dramatically increased. The ways to neutralize such effects have not been studied enough. In this work the techniques of visual assessment of chromatin granulation and electronegativity of human buccal epithelium cell nuclei were used in order to study the combined effects of the exposure to low-intensity electromagnetic radiation of the millimeter range electromagnetic radiation and DNA-binding compounds, such as antibiotic doxorubicin, mutagens ethidium bromide and proflavine, as well as caffeine and C₆₀-fullerene which are not directly interact with DNA. When the action of electromagnetic radiation and DNA-binding compounds is combined, a synergistic effect of reducing the cell response was observed in contrast to the effects caused by electromagnetic radiation and drugs separately. When cells were irradiated in the presence of C₆₀-fullerene or caffeine, a protective effect of compounds against electromagnetic radiation influence was observed. The obtained results enable to provide perspectives for C₆₀ fullerene and caffeine using as DNA-protectors under electromagnetic radiation.

Key words: DNA-intercalators, C₆₀-fullerene, electromagnetic radiation, human buccal epithelium.