МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

**«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**(ФГБОУ ВО «КубГУ»)**

**Физико-технический факультет**

**Кафедра радиофизики и нанотехнологий**

**К У Р С О В О Й П Р О Е К Т**

**ПОВРЕЖДАЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ИЗЛУЧЕНИЙ НА МОЛЕКУЛУ ДНК**

Работу выполнил \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Рябова Ирина Сергеевна

Курс 3

Направление 11.03.04 Электроника и наноэлектроника

Научный руководитель

доцент, канд. хим.наук \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Е. Е. Текуцкая

Нормоконтролер

доцент, канд. хим.наук\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ М. Е. Соколов

Краснодар 2018

РЕФЕРАТ

Курсовая работа 33 с., 16 рис., 22 источника.

ДНК, ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ, ЭЛЕКТРОМАГНИТНОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ, ОДНОНИТЕВЫЕ РАЗРЫВЫ, ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ, АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА

Объектом исследования курсовой работы являлись водные растворы ДНК различных концентраций, обработанные электромагнитным полем (ЭМП) напряжённостью 0,32 мТл частотой 3-50 Гц при времени экспозиции 10 минут.

Целью работы являлось определение и оценка повреждающего воздействия низкочастотного ЭМП на водные растворы ДНК.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

- сбор и анализ литературы в области воздействия электромагнитного излучения на биологическую макромолекулу ДНК;

- освоение методики определения концентрации 8-оксогуанина методом иммуноферментного анализа;

- освоение метода флуоресцентной спектроскопии и методики определения однонитевых разрывов ДНК;

- изучение воздействия ЭМП низкой частоты на водные растворы ДНК с различной концентрацией с помощью флуоресцентной спектроскопии;

- анализ полученных зависимостей, выявление «окон эффективности».

В результате выполнения курсовой работы были выявлены резонансные частоты максимального воздействия ЭМП на водные растворы ДНК.

СОДЕРЖАНИЕ

|  |  |
| --- | --- |
| Обозначения и сокращения……………………………………………………. | 4 |
| Введение………………………………………………………………………… | 5 |
| 1 Литературный обзор…………………………………………………………. | 7 |
| 1.1 Структура ДНК…………………………………....................................... | 7 |
| 1.2 Методы исследования................................................................................ | 9 |
| 1.2.1 Иммуноферментный анализ............................................................. | 9 |
| 1.2.2 Метод ДНК-комет............................................................................. | 12 |
| 1.2.3 Метод полимеразной цепной реакции............................................ | 15 |
| 1.2.4 Определение однонитевых разрывов ДНК..................................... | 17 |
| 1.3 Способы образования активных форм кислорода.................................. | 19 |
| 1.4 Действие ЭМП на ДНК............................................................................. | 20 |
| 2 Экспериментальная часть................................................................................ | 22 |
| 2.1 Подготовка растворов для обработки ЭМП............................................ | 22 |
| 2.2 Обработка растворов ДНК ЭМП.............................................................. | 22 |
| 2.3 Флуоресцентная спектроскопия............................................................... | 22 |
| 2.4 Обработка данных...................................................................................... | 24 |
| Заключение……………………………………………………………………… | 29 |
| Список использованных источников…………………………………………. | 30 |

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

|  |  |
| --- | --- |
| ЭМИ | Электромагнитное излучение |
| ЭМП | Электромагнитное поле |
| ОР | Однонитевые разрывы |
| 8-ОГ | 8-оксогуанин |
| ПЦР | Полимеразная цепная реакция |
| ИФА | Иммуноферментный анализ |
| АФК | Активная форма кислорода |
| λвозб | Длина волны возбуждения |

ВВЕДЕНИЕ

Исследования по воздействию электромагнитных излучений (ЭМИ) на биологические макромолекулы, такие как белки, углеводы или ДНК, получили значительное развитие. На данный момент известно немало разновидностей повреждений молекулы ДНК, причиной которых могут быть ЭМИ различных частот, интенсивностей и времён экспозиции. Одно- и двунитевые разрывы, окисление азотистых оснований, межнитевые поперечные сшивки, формирование длинных одноцепочечных пробелов в ДНК – всё это рассматривается как критические повреждения клетки. Возникновение таких повреждений может быть ключевым событием как в этиологии, так и в терапии рака.

Быстрые темпы научно-технического прогресса приводят к образованию в биосфере неконтролируемых электромагнитных излучений, отрицательное влияние которых на живые организмы может повлиять на их развитие и жизнедеятельность. Это может повлечь за собой необратимые процессы, последствия которых могут носить непредсказуемый и неконтролируемый характер. В связи с этим проблема повреждающего воздействия ЭМИ является в настоящее время актуальной. Также будет востребовано исследование поведения ДНК клетки под действием ЭМИ и для медицины, сельского хозяйства и других сфер деятельности человека, связанных с улучшением условий жизнедеятельности.

Целью курсовой работы является изучение воздействия ЭМИ низких частот на молекулу ДНК посредством определения концентрации активных форм кислорода (АФК), которые являются одной из разновидностей повреждений.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

- сбор и анализ литературы в области воздействия ЭМИ на биологическую макромолекулу ДНК;

- освоение методики определения концентрации 8-оксогуанина методом иммуноферментного анализа (ИФА);

- освоение метода флуоресцентной спектроскопии и методики определения однонитевых разрывов (ОР) ДНК;

- определение количества ОР ДНК при воздействии ЭМИ частот 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 Гц и времени экспозиции 10 минут;

- анализ полученных зависимостей.1 Литературный обзор

1.1 Структура ДНК

ДНК является одной из трёх основных макромолекул клетки и обеспечивает хранение, передачу и реализацию генетической информации о развитии и функционировании живых организмов. В эукариотах ДНК располагается в ядрах клеток в составе хромосом и некоторых клеточных органоидах.

Молекула ДНК представляет собой биополимер, мономеры которого – это нуклеотиды [1]. Каждый нуклеотид состоит из азотистого основания, остатка фосфорной кислоты и сахара дезоксирибозы, что является основным различием между ДНК и РНК. Основу структуры рассматриваемой макромолекулы составляют четыре азотистых основания, которые входят в состав нуклеотидов ДНК: аденин и гуанин являются производными пуринов, цитозин и тимин– пиримидинов.

Известная двойная спираль ДНК образуется из двух спиралевидных полинуклеотидных цепей, каждая из которых представляет собой последовательное соединение нуклеотидов в различном порядке. Каждый нуклеотид содержит одно из азотистых оснований, которые были перечислены ранее. Между собой они связаны с помощью молекул дезоксирибозы, которые образуют связь с фосфатами третьим и пятым атомами углерода (рисунок 1). То есть азотистые основания присоединяются к углеводам, которые чередуются с молекулами фосфорной кислоты. Так устроена первичная структура ДНК.

Полинуклеотидные цепи антипаралленьны друг к другу. Если брать некоторый участок цепи ДНК, где его началом будет третий атом углерода в «первой» молекуле дезоксирибозы, а конец – пятый атом в «последней» молекуле, то второй такой же участок будет образовывать с первым вторичную структуру при условии их противоположной направленности (рисунок 2).

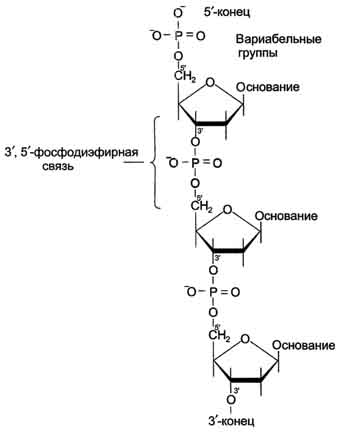


Рисунок 1 – Первичная структура ДНК [1]

Если последнее соблюдено, то по принципу комплементарности аденин начинает образовывать слабую водородную связь с тимином, а гуанин – с цитозином (рисунок 3).



Рисунок 2 – Вторичная структура ДНК [1]

В работе [2] авторы теоретически обосновали применение структуры ДНК (её зеркальная асимметрия, форма двойной спирали, наноразмеры) как энантиоморфный компонент композиционного радиопоглощающего материала (РПМ). Согласно их приведённой модели, при помощи растяжения одиночной молекулы ДНК можно варьировать взаимодействием с внешним ЭМИ.

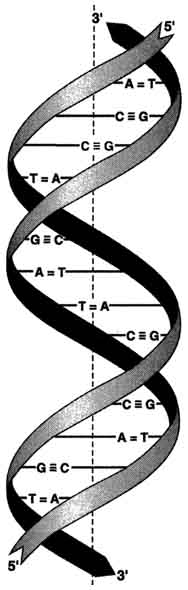


Рисунок 3 – Третичная структура ДНК [1]

Предполагается, что растянутое состояние ДНК представляет собой двуспиральную молекулу, на основе которой современные технологии позволяют создать искусственные материалы с регулируемыми электромагнитными свойствами. В Гомельском государственном медицинском университете были получены уравнения, которые показывают, что переменное магнитное поле может индуцировать в молекулах вещества электрические дипольные моменты. А переменное электрическое способно создавать в молекулах вещества магнитные моменты. Это объясняется тем, что в хиральных молекулах электрические и дипольные моменты неразрывно связаны. Это даёт возможность выделить отдельную молекулу ДНК, модифицировать форму и размеры спирали, придать новые свойства и создать на её основе уникальные наноматериалы и наноустройства, в том числе и РПМ.

1.2 Методы исследования

1.2.1 Иммуноферментный анализ

Метод ИФА предназначен для детектирования и количественной оценки веществ, способных вызывать образование антител. ИФА на протяжении нескольких десятилетий успешно применяются в научных и диагностических целях в области  медицины, иммуногистохимии,  иммунологии, ветеринарии, микробиологии и пищевой промышленности [3]. Он сочетает в себе уникальную специфичность с чрезвычайно высокой чувствительностью,  достигающей    97 - 99 %.

Принцип работы данного метода основан на иммунной и ферментативной реакциях. Иммунная реакция позволяет обнаружить нарушение в молекуле ДНК, тогда как ферментативная реакция делает искомый объект видимым для оператора, что даёт возможность измерить урон ДНК количественно.

Иммунную реакцию, как первый этап в ИФА, ещё называют стадией «узнавания» анализируемого соединения [4]. Это происходит с помощью специфического антитела, которое связывается с соответствующим ему антигеном. По образовавшимся иммунным комплексам можно дать количественную оценку. При крайне низких концентрациях компонентов образование простого бинарного комплекса антиген-антитело не может быть зарегистрировано. В этом случае необходимо использовать меченые соединения, в которых метка может легко детектироваться в концентрациях, сопоставимых с определяемой концентрацией анализируемого соединения. От типа метки зависит и название анализа, поэтому в данном методе используются ферментные метки.

Второй общей стадией является ферментативная реакция, во время которой происходит формирование связи меченного ферментом соединения со специфическим комплексом или свободными центрами связывания. Ферменты являются биокатализаторами, т.е. веществами биологического происхождения, ускоряющими химические реакции [3]. При конкурентном анализе образование комплекса с меченым ферментом соединением может проходить одновременно со стадией «узнавания».

Последним обязательным процессом в ИФА является «трансформация» фементной метки в соответствующий сигнал, измеряемый различными физико-химическими методами (люменисцентными, спектрофотометрическими и т.д.), что достигается проведением реакции фермента с субстратами.

Существует три базовых варианта проведения ИФА:

1 прямой;

2 непрямой;

3 сэндвич-метод.

Основная общая методика состоит из следующих этапов:

1 приготовление стандартного раствора исследуемого вещества и образцов в удвоенных экземплярах, которые затем вносятся по 50 мкл в лунки 96-луночного планшета;

2 добавление в каждую лунку, кроме бланка (лунка с нулевой концентрацией детектируемого вещества), разведённого анти-гена (весь планшет или все используемые стрипы закрывают и отправляют на инкубацию при комнатной температуре или непосредственно при температуре инкубации (37 °С));

3 промывка лунок готовым буфером для промывок 6 раз;

4 добавление по 100 мкл разведённого конъюгата антител в каждую лунку, кроме бланка;

5 после накрытия планшета проводится при комнатной температуре в течение часа повторная инкубация (затем повторяют пункт 3);

6 добавление по 100 мкл стабилизированного субстрата тетраметилбензидина в каждую лунку с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 15 минут в темноте;

7 добавление по 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку;

8 измерение абсорбцию при длине волны 450 нм на спектрофотометре;

9 построение калибровочной прямой и расчёт концентрации детектируемого повреждения в ДНК в исследуемых образцах.

Метод ИФА обладает следующими преимуществами:

- высокая чувствительность;

- стабильность при хранении всех ингридиентов, необходимых для ИФА;

- возможность автоматизации всех этапов метода;

- возможность использовать минимальные объёмы материалов;

- удобство и быстрота проведения диагностики.

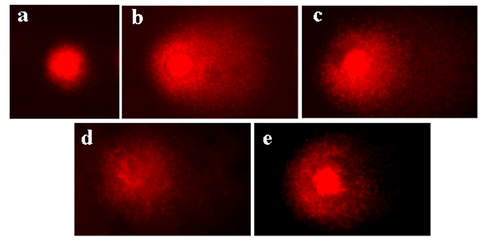
В настоящее время ИФА находит своё применение не только в научных исследованиях, но и в диагностике заболеваний, определении токсинов, гормонов, онкомаркеров, лекарственных препаратов, наркотиков, пептидов и белков в биосредах человека, животных и культуральных средах [3]. Благодаря своей относительно невысокой стоимости и  экологической безопасности ИФА перешёл в разряд стандартных методов качественного и количественного анализа веществ.

1.2.2 Метод ДНК-комет

Метод ДНК-комет является наиболее простым в исполнении методом, который позволяет обнаружить изменения и повреждения структуры молекул ДНК. Этот метод применяется во многих странах для проведения анализов на генотоксичность, активность систем репарации ДНК, апоптоза и т.д. Метод ДНК-комет становится неотъемлемой частью программ по оценке влияния на организм факторов внешней среды.

Данный метод предназначен для выявления повреждений ДНК клеток в тканях живых организмов, вызванных широким спектром факторов физической, химической и биологической природы. Он позволяет изучить накопление повреждений ДНК и оценить степень этого повреждения.

Этот экспресс-метод основан на использовании микроэлектрофореза ДНК нуклеотидов индивидуальных клеток, где происходит регистрация фрагментов ДНК лизированных клеток, заключённых в суспензию. Содержание изучаемых клеток в суспензии является одним из главных требований метода ДНК-комет [5]. Под воздействием электрического поля молекулы ДНК распределяются в порах геля. Само электрическое поле создаётся в нейтральном буфере. При этом поврежденные фрагменты мигрируют в сторону анода, формируя электрофоретический хвост. После окрашивания люминесцентным красителем молекула ДНК образует картину электрофореза, которая напоминает хвост и ядро кометы, откуда происходит название метода. Ядро показывает неповреждённую ДНК. ДНК-кометы ранжируют на 5 условных типов с соответствующими для каждого номерами от 0 до 4 (рисунок 4).



Типы ДНК-комет: a – 0, b – 1, c – 2, d – 3, e − 4

Рисунок 4 – Типы ДНК-комет [5]

Степень повреждения ДНК определяется по индексу ДНК-комет (ИДК), определяемому формулой, упомянутой в статье [6],

ИДК = (0∙n0+1∙n1+2∙n2+3∙n3+4∙n4)/Σ, (1)

где число n0-n4 – количество ДНК-комет каждого типа;

Σ – сумма проанализированных ДНК-комет.

С момента открытия метода ДНК-комет он приобрёл большое количество собственных разнообразных модификаций и усовершенствований. Это позволило расширить область применения данного метода и повысить его чувствительность, следовательно, и точность экспериментальных данных.

Общая схема метода предполагает следующие этапы:

1 подготовка суспензии исследуемых клеток;

2 получение гель-слайдов с подложкой из агарозы;

3 помещение клеток в агарозный гель, нанесение на гель-слайды;

4 лизис (растворение клеток и их систем под влиянием ферментов, антибиотиков и т.д.);

5 электрофорез (процесс движения фрагментов ДНК под действием внешнего электрического поля и разделения их по размеру);

6 нейтрализация (процедура, которую проходит образец и после которой фрагменты ДНК случайным образом ренатурируют в двунитевую ДНК);

7 окрашивание флуоресцентным красителем;

8 микроскопирование и анализ исследуемого образца.

В статье [7] данный метод использовался для исследования генотоксичности электромагнитного излучения. Объектом исследования было ЭМП промышленной частоты (50 Гц) индукцией 1,33 мкТл. В качестве источника лейкоцитов использовали периферийную кровь человека, разведённую фосфатно-солевым буферным раствором, что является одним из примеров модификации метода ДНК-комет. После затвердевания геля с клетками их экспонировали при воздействии ЭМП промышленной частоты индукцией 1,33 мкТл в течение 30 и 60 минут на льду для снижения влияния репарации ДНК. В данном исследовании в качестве показателя поврежденности ДНК использовали длину хвоста кометы, процентное количество ДНК в хвосте или момент хвоста, равный произведению последних двух критериев. За показатель генотоксичности брали индекс повреждения (ИП), который оказался менее чувствительным критерием повреждения ядерной ДНК лейкоцитов. Исследователи предположили, что это связано с тем, что «момент хвоста» отражает не только процент повреждений ДНК, но и степень ее фрагментации, которая заметно возрастает с увеличением продолжительности экспозиции в ЭМП. Таким образом, исследователями НИИ биологии Южного федерального округа был сделан вывод о том, что при увеличении экспозиции в ЭМП возрастает не только процент повреждений ДНК, но и её количество одно- и двухнитевых разрывов на единицу длины поврежденной ДНК.

Метод ДНК-комет имеет ряд преимуществ, в который входит:

- высокая чувствительность;

- возможность регистрации повреждений ДНК в клетках любых тканей и даже на уровне одной клетки;

- минимальное количество требуемо материала;

- относительно небольшая стоимость исследований данным методом;

- быстрота проведения экспериментов.

Метод ДНК-комет в настоящее время находит своё применение как в научной деятельности, так и в области медицины. Например, в онкологии для выявления предрасположенности к раковым заболеваниям, обнаружения раковых опухолей на ранних стадиях или для контроля эффективности терапии при раке. Также данный метод даёт возможность оценить влияние внешних факторов среды на живой организм, в т.ч. воздействие ЭМП. В научных исследованиях ДНК-кометы также приносят большую пользу. В статье [8] исследовались накопления в клетках шахтёров хромосомных аберраций, сестринских хроматидных обменов, микроядер и разрывов ДНК, выявляемых методом ДНК-комет.

1.2.3 Метод полимеразной цепной реакции

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – экспериментальный метод, который позволяет многократно увеличивать количество определённых молекул ДНК в анализируемом образце. ПЦР представляет собой многократно повторяющиеся операции (циклы) с реакционной смесью, которая в первую очередь содержит в себе исследуемый образец. С каждым циклом экспоненциально увеличивается количество выбранного фрагмента ДНК, ограниченного двумя олигонуклеотиднымипраймерами. Этот процесс называется амплификацией – увеличением числа копий ДНК (рисунок 5).

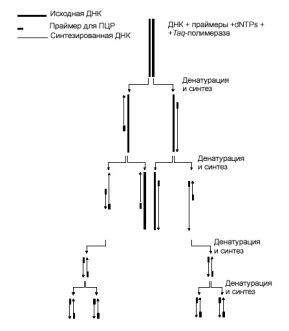


Рисунок 5 – Диаграмма полимеразной цепной реакции [9]

Особенностью ПЦР является то, что она требует цикличной смены температур для обеспечения последовательной денатурации двухцепочечных молекул ДНК, отжига олигонуклеиновыхпраймеров на образовавшейся в результате воздействия высоких температур одноцепочечной ДНК и элонгации отжегшихся праймеров с помощью термостабильной ДНК-полимеразы.

Данный метод включает в себя следующие основные этапы:

1 подготовку реакционной смеси, в которой содержатся следующие компоненты;

2 помещение смеси в амплификатор, где обычно проводится 30-40 циклов, (каждый цикл состоит из денатурации, отжига и элонгации;

1. регистрация результатов.

К преимуществам метода полимеразной цепной реакции можно отнести:

- высокая чувствительность, позволяющая получать точные результаты;

- универсальность;

- требуется малый объем биологического материала;

- быстрота проведения эксперимента.

Основным недостатком метода ПЦР является его же высокая чувствительность, которая также создаёт некоторые сложности в проведении исследования, где самые незначительные нарушения могут привести к получению искажённых или ложных данных.

В настоящее время ПЦР широко используется в научных исследованиях во многих областях биологии и смежных дисциплинах, а также особенно актуально вмолекулярно-генетической диагностике. Метод ПЦР применяется в судебно-медицинской экспертизе, медицине, палеонтологии, пищевой промышленности. Данный метод позволяет отслеживать изменения состояния окружающей среды по повреждениям молекул ДНК, в том числе и повреждения ЭМП.

В статье [10] было определено наличие влияние ЭМИ трансформатора Тесла на полиморфизм продуктов ПЦР. Данное воздействие было отнесено к «нетепловым» эффектам ЭМИ, что, возможно, объясняется резонансным совпадением собственных частот отдельных клеточных компонентов с частотой колебаний внешнего ЭМИ. Ими было также обнаружено, что чем сложнее была организация генома, тем выше был полиморфизм. Это является подтверждением комплексного характера воздействия ЭМИ радиодиапазона.

1.2.4 Определение однонитевых разрывов ДНК

Однонитевые разрывы ДНК в эукариотических клетках являются частым явлением. Одно- и двунитевые повреждения образуются в результате разрыва связей в полинуклеотидных цепях между молекулами фосфорного остатка и дезоксирибозы.

Они сопровождают действие очень многих агентов и являются вторичными, промежуточными дефектами при функционировании эксцизионной репарации. Также они позволяются количественно оценить повреждение в молекуле ДНК. Наряду с двунитевыми разрывами они возникают в результате окислительного стресса [11], патологических процессов [12], действия ионизирующего излучения [13], спонтанного гидролиза ковалентных связейили при физиологических условиях в лимфоцитах.

Данные повреждения в ДНК в исследуемых образцах подсчитываются статистически. Например, в статье [14] авторы с помощью раствора бромистого этидия, маркера, широко применяемого во флуоресцентной маркировке, помечали двухцепочечные молекулы ДНК. Количество ОР в ДНК оценивали по отношению величин интенсивности флуоресценции контрольных и экспериментальных образцов.

В определении уровня возникновения ДР в молекуле ДНК хорошо зарекомендовал себя метод ДНК-комет [15]. В данной работе рассматривали ДНК ионизирующим излучением, однако это не мешает предположить, что данный метод будет полезен в исследовании воздействия низкочастотного излучения (0-100 Гц) на ДНК. А для определения уровня ОР по степени фрагментации рекомендовали к использованию щелочную версию метода ДНК-комет [15].

Накопления однонитевых разрывов ДНК в больших количествах препятствуют процессам транскрипции, репликации и репарации. Некорректное функционирование данных процессов приводит, в свою очередь, к нарушению процессов клеточного деления и метаболизма, и, как следствие, к потенциальным рискам развития онкологических и нейродегенеративных заболеваний [16].

На сегодняшний день известно, что вода с пониженным содержанием дейтерия способна существенно уменьшить количество ОР в ДНК в условиях инкубации при температуре 24 °С в течение 16 часов [17]. Авторы данного исследования предполагают, что такая жидкость может запускать процессы репарации в ДНК или ингибировать апоптоз иммунокомпетентных клеток. Также авторами статьи был сделан вывод, что среда с пониженным содержанием дейтерия создаёт благоприятные условия функционирования клеток иммунной системы и ДНК-репарации.

1.3 Способы образования активных форм кислорода

Активные формы кислорода вызывают различные окислительные повреждения ДНК. Повышенный уровень образования АФК, опосредованный физическими, химическими или биологическими факторами среды, называют окислительным стрессом, который является наиболее генотоксическим процессом, воздействующим на ДНК [18]. Преимущественно, повреждениям в ДНК подвергаются азотистые основания. Самыми распространёнными АФК, используемыми в современных исследованиях и медицинской диагностике как биомаркеры окислительного повреждения, являются 8-оксогуанини перекись водорода как долгоживущая форма АФК, которая образуется в водных растворах ДНК [19].

На рисунке 6 изображена схема формирования АФК и антиоксидантной защиты организма.

Активные формы кислорода (АФК) представляют собой отдельную систему в организме, главным системообразующим фактором которой является текущий уровень АФК в тканях. Система самоорганизована за счет контроля уровня генерации АФК в митохондриях и микросомах, контроля активности оксидаз и антиоксидантных ферментов тканей, суммарного уровня антиоксидантной активности крови [20].В организме АФК играю двоякую роль. С одной стороны, они приводят к окислительным повреждениям нуклеиновых кислот, белков, и других биомакромолекул. Окислительные повреждения ДНК являются одной из основных причин мутагенеза, канцерогенеза и ряда болезней пожилого возраста. С другой стороны, АФК выполняют в организмах млекопитающих сигнально-регуляторную функцию. Установлено, что млекопитающие обладают, по крайней мере, одним сенсором O2●- и двумя типами H2O2-сенсорами, направленные на адаптацию к окислительному стрессу [19].



Рисунок 6 – Общая схема формирования активных форм кислорода и

антиоксидантной защиты организма [20]

1.4 Действие ЭМИ на ДНК

Известно, что ЭМИ любой длины волны наносят ДНК внутримолекулярные повреждения, которые сопровождаются образованием АФК, процессами репарации ДНК и другими биохимическими процессами. Однако механизмы биологического действия ЭМИ для разных диапазонов, интенсивностей и способов экспозиции различны.

Электромагнитное излучение имеет две составляющие: электрическую и магнитную. Разброс в экспериментальных данных по биологическим эффектам электрического поля заметно больше, чем в сходных экспериментах по биологическим эффектам магнитного поля [21]. При экспозиции во внешнем электрическом поле последнее нелинейно накладывается на чрезвычайно сложное распределение электрического поля внутри организма. Поэтому эффекты, возникающие вследствие экспозиции в электрическом поле, разнообразны и менее предсказуемы. Магнитное поле проникает в биологические ткани практически без искажений.

При этом больший эффект способно производить на клетки именно электрическое поле, комбинированное с магнитным.

Механизмы биологического действия электрического поля различны для разных диапазонов его интенсивности и способов экспозиции. Биологическое действие низкочастотного электрического поля, преимущественно, сводится к действию вызванных им ионных токов во внутри- и внеклеточной плазме. Перераспределение ионов ведёт к локальным изменениям электропотенциалов на поверхности макромолекул и клеточных мембран. Данное явление сопровождается изменением скоростей биохимических реакций.

Особенно актуальны исследования воздействия на внутримолекулярные процессы в клетках ЭМИ промышленных частот 50 и 60 Гц, так как они повсеместно присутствуют в повседневной жизни современного человека. Известно, что импульсы электрического тока способствуют проникновению крупных молекул (белки, ДНК и др.) внутрь клеток. На этих частотах магнитные поля с напряжённостью около 1 мТл могут создавать вихревые электрические токи, заметно превышающие естественные биотоки.

Вихревые электрические поля, превышающие установленный уровень, вызывают электрический пробой биологических мембран. Это влечёт за собой локальные нарушения метаболизма клетки и запускает комплекс неспецифических защитных реакций, направленных на восстановление химического равновесия (гомеостаза). Подобное явление могут применять следующим образом. Если какой-либо конкретный участок тела несёт некоторое заболевание, то индуцированные полем защитные реакции способны воздействовать на ход заболевания благоприятным для организма образом.

2 Экспериментальная часть

2.1 Подготовка растворов для обработки их ЭМП

Для исследования воздействия ЭМП на молекулу ДНК были приготовлены растворы из концентрата синтезированных ДНК в следующих концентрациях: 0,0025, 0,00025 и 0,000025 мг/мл.

Для получения концентрации 0,0025 мг/мл был разбавлен в 1000 раз раствор синтезированных молекул ДНК, исходная концентрация которого составляла 0,25 %. Затем полученный раствор разбавляли в 10 и в 100 раз для получения концентраций 0,00025 и 0,000025 мг/мл соответственно.

2.2 Обработка растворов ДНК ЭМП

Приготовленные водные растворы ДНК концентраций 0,0025, 0,00025 и 0,000025 мг/мл обрабатывались ЭМП напряжённостью 0,32 мТл на частотах 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 Гц в течение 10 минут с целью оценить уровень повреждения молекул ДНК низкочастотным ЭМП.

2.3 Флуоресцентная спектроскопия

Флуоресценцией называют испускание кванта видимого или УФ света возбуждённой молекулой при переходе электрона между состояниями с одинаковой мультиплетностью. На ней основана флуоресцентная спектроскопия.

Интенсивность света, испускаемого флюоресцирующим раствором, представляет простую функцию от концентрации растворенного вещества, что можно использовать для анализа. Тем не менее, довольно трудной задачей является измерение абсолютной интенсивности флюоресценции, поэтому измерения проводят по отношению к результату контрольного образца. Общая схема флюоресцентной спектроскопии состоит в возбуждении флюоресценции излучением при длине волны максимума поглощения и в измерении или сравнении интенсивности флюоресцирующего света с флюоресценцией контрольного образца. Флюоресцирующий свет не должен перекрываться с рассеянным светом, падающим на вещество. Интенсивность флюоресценции обычно измеряется в условных единицах, пропорциональных ответу приёмникови является эмпирическим выражением флюоресцентной активности. Спектр флюоресцентного излучения – зависимость интенсивности флуоресценции раствора от концентрации вещества, которое было растворено. Обычно представляется в графической форме.

В данной работе исследовалось влияние НЧ излучения на молекулу ДНК. Для этого определялось количество однонитевых разрывов ДНК в растворе синтезированных ДНК. Однонитевые разрывы ДНК являются начальным этапом фрагментации молекулы ДНК и предшествуют переходу клетки в состояние апоптоза (гибели).

В данной работе использовался флуоресцентный спектрофотометр HITACHI F-2700. Основные технические характеристики:

- источник света – 150 Вт ксеноновая лампа с самодеозонированием;

- монохроматор – безаберрационная вогнутая дифракционная решетка большого диаметра 900 линий/мм. Длина волны блеска: зона возбуждения 300 нм, зона излучения 400 нм;

- диапазон длин волн – 320-750 нм и свет нулевого порядка в зонах возбуждения и излучения (индикация длины волны 220-800 нм и свет нулевого порядка);

- чувствительность – отношение сигнал/шум 250 (межпиковое) и более; излучение при комбинационном рассеянии: длина волны возбуждения 320 нм; щель (обе зоны возбуждения и излучения): 10 нм; отклик 2 с.;

- скорость сканирования длины волны – 60 - 12000, нм/мин (при управлении ПК).

2.4 Обработка и анализ данных

После обработки результатов на спектрофотометре Hitachi F-2700 были получены следующие данные:

- зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации ДНК, которая также соответствует теоретическим данным в [22] (рисунок 7);

- обзорные спектры водных растворов ДНК, обработанных ЭМП;

- зависимости интенсивности флуоресценции от частоты ЭМП.

Рисунок 7 – Спектры флуоресценции водных растворов ДНК, λвозб = 320 нм,

tº = 23ºC

Данные спектры были сняты в диапазоне длин волн от 320 до 750 нм. Как видно, наблюдаются три пика, которые соответствуют 362 нм, 406 нм и 642 нм соответственно. Изменения последнего пика после обработки ЭМП показывают количественное изменение АФК в водных растворах ДНК.

Также для указанных концентраций были сняты спектры флуоресценции с водных растворов ДНК, подверженных воздействию ЭМП напряжённостью 0,32 мТл при частотах 3-50 Гц в течение 10 минут. Результаты показаны на рисунках 8-10.

Рисунок 8 – Обзорные спектры флуоресценции водных растворов ДНК с концентрацией 0,0025 мг/мл, λвозб = 320 нм, tº = 23ºC после обработки ЭМИ

Рисунок 9 – Обзорные спектры флуоресценции водных растворов ДНК с концентрацией 0,00025 мг/мл, λвозб = 320 нм, tº = 23ºC после обработки ЭМИ

Рисунок 10 – Обзорные спектры флуоресценции водных растворов ДНК с концентрацией 0,000025 мг/мл, λвозб = 320 нм, tº = 23ºC

На рисунках 11-13 подробно рассматривается третий пик, соответствующий длине волны, равной 642 нм.

Рисунок 11 – Спектры флуоресценции водного раствора ДНК концентрации 0,0025 мг/мл после воздействия на него ЭМП частот 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 и 50 Гц

Рисунок 12 - Спектры флуоресценции водного раствора ДНК концентрации 0,00025 мг/мл после воздействия на него ЭМП частот 3, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 и 50 Гц

Рисунок 13 - Спектры флуоресценции водного раствора ДНК концентрации 0,000025 мг/мл после воздействия на него ЭМП частот 3, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 и 50 Гц

Для наглядности построены зависимости интенсивности флуоресценции от частоты ЭМП в области третьего пика (рисунки 14-16). Как видно из рисунков, наблюдаются постоянные минимумы в районе 20 и 40 Гц. По мере уменьшения концентрации ДНК в водном растворе интенсивность флуоресценции также уменьшается. Характер зависимости на рисунках 14, 15 в целом сходен: наблюдаются максимумы на 3, 5 и 45-50 Гц.

Рисунок 14 – Зависимость интенсивности флуоресценции раствора ДНК концентрации 0,0025 мг/мл от частоты ЭМП

Рисунок 15 – Зависимость интенсивности флуоресценции раствора ДНК концентрации 0,00025 мг/мл от частоты ЭМП

Рисунок 16 – Зависимость интенсивности флуоресценции раствора ДНК концентрации 0,000025 мг/мл от частоты ЭМП

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе курсовой работы были выполнены поставленные задачи:

1 сбор и анализ литературы в области воздействия ЭМИ на биологическую макромолекулу ДНК и методов качественного и количественного определения её повреждений;

2 освоение методики определения концентрации 8-оксогуанина методом ИФА, метода флуоресцентной спектроскопии и методики определения ОР ДНК;

3 изучение воздействия ЭМП низкой частоты на водные растворы ДНК с различной концентрацией с помощью флуоресцентной спектроскопии;

4 анализ полученных зависимостей, выявление «окон эффективности».

В результате выполнения курсовой работы были выявлены резонансные частоты максимального воздействия ЭМП на водные растворы ДНК. Интенсивность флуоресценции наиболее явно изменялась в районе третьего пика при длине волны 642 нм для всех изучаемых концентраций. Это может быть связано с изменением концентрации АФК, преимущественно, с образованием синглетного кислорода, поскольку, по данным литературы, молекулы синглетного кислорода могут образовывать возбуждённые димеры, которые переходят в основное состояние с испусканием света в видимом диапазоне в районе 635-640 нм.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Биохимия / Под ред. Е.С. Северина. – М: ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 779 с.

2 Азаренок А.С. Энантиоморфные радиопоглощающие материалы на основе ДНК-подобных структур / А.С. Азаренок, В.А. Банный, В.А. Ломач //Полимерные композиты и трибиология. – Гомель: Институт механики и металлополимерных систем имени В.А. Белого , 2015. – С. 269.

3 Круглов С.В. Основы метода иммуноферментного анализа: [Учебное пособие] / С.В. Круглов, И.Ю. Малышев. – Москва, 2010. – 57 с.

4 Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров, А.П.Осипов, Б.Б. Дзантиев и др. – М.: Высшая школа, 1991. – 77 с.

5 Aviello G. Potent Antioxidant and Genoprotective Effects of Boeravinone G, a Rotenoid Isolated from Boerhaavia diffusa /, Jasna M. Canadavonic-Brunet, Natasa Milic et al., November 11, 2010 // (Engl.). − URL: 10.1371/journal.pone.0019628 [20 May 2011]

6 Филиппов Э. В. Использование метода «ДНК-комет» для детекции и оценки степени повреждений ДНК клеток организмов растений, животных и человека, вызванных факторами окружающей среды / Э. В. Филлипов // Наука и образование. – 2014. – Т. 74. - № 2. – С. 72-78.

7 Трубник Р.Г. Исследование генотоксичности ЭМИ при помощи метода ДНК-комет in vitro / Р.Г. Трубник, И.С. Сазыкин, М.А. Сазыкина // Валеология. – 2014. – № 2. – С. 49-52.

8 Кулемин Ю.Е. Исследования повреждений ДНК у шахтеров (обзор литературы) / Ю.Е. Кулемин, В.И. Минина, Р.А. Типов // Вестник Кемеровского Государственного Университета. – 2014. – Т. 3. − № 3. – С. 11-14.

9 Анализ генома. Методы / Под ред. К. Дэйвиса. – М: Мир, 1990. – 177 с.

10 Лучкина Л.А. Влияние излучения трансформатора Тесла на полиморфизм продуктов полимеразной цепной реакции с праймерами произвольной последовательности / Л.А. Лучкина, А.П. Роганов, Р.А. Пантина // Журнал Радиоэлектроники. – 2015. – № 3. – С. 1-7.

11 Фрагменты внеклеточной ДНК из среды инкубирования лимфоцитов человека, облученных в малых дозах, запускают развитие окислительного стресса и адаптивного ответа в необлученных лимфоцитах / А.В. Ермаков, М.С. Конькова, С.В. Костюк и др. // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2008. – Т. 48. – № 5. – С. 553-564.

12 Воробьева Н. Ю. Особенности реакции лимфоцитов крови больных раком молочной железы на облучение in vitro / Н.Ю. Воробьева, А.В. Антоненко, А.Н. Осипов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2011. – Т. 51. – № 4. – С. 451-456.

13 Воробьева Н. Ю. Чувствительность лимфоцитов периферической крови летчиков и космонавтов к воздействию гамма-излучения: индукция двунитевых разрывов ДНК / Н.Ю. Воробьева, А.Н. Осипов, И.И. Пелевина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 144. – № 10. – С. 404-407.

14 Текуцкая Е.Е. Структурные повреждения ДНК лимфоцитов периферической крови человека при воздействии физических факторов / Е.Е. Текуцкая, Р.В. Василиади // Экология человека. – 2017. − № 12. – С. 9-14.

15 Пастухова Е.И. Двунитевые разрывы ДНК и репарация у хронически облучённых на реке Теча лиц / Е.И. Пастухова, В.В. Олейникова // Вестник Челябинского государственного университета. – 2015. – Т. 3. – № 21. – С. 78-83.

16 Волох О.И. Исследование взаимодействий ДНК с лигандами методами компьютерного моделирования и электронной микроскопии: дис. канд. биол. наук.: 03.01.02 / О. И. Волох; МГУ им. М. В. Ломоносова. – Москва, 2016. – 136 с.

17 Оценка влияния среды с различным изотопным D/H составом на репарацию ДНК лимфоцитов / Е.Е. Текуцкая, С.С. Джимак, А.А. Басов и др. // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2015. – Т. 10. − № 3. – С. 287-292.

18 Образование 8-оксогуанина и его окисленных продуктов в ДНК in vitro под действием температуры 37 °С / В.С. Смирнова, С.В. Гудков, А.В. Черников и др. // Биофизика. – 2005. – Т. 50. – С. 243-252.

19 Образование активных форм кислорода в воде под действием видимого и инфракрасного излучений в полосах поглощения молекулярного кислорода / С.В. Гудков, О.Э. Карп, С.А. Гармаш и др. // Биофизика. – 2012. – Т. 57. – С. 5-13.

20 Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении / В.И. Донцов, В.Н. Крутько, Б.М. Мрикаев и др.// Труды ИСА РАН. – 2006. – Т. 19. – С. 50-69.

21 Бинги В. Н. Принципы электромагнитной биофизики / В. Н. Бинги. – М: ФИЗМАТЛИТ, 2011. – 591 с.

22 Жерносек А. К. / Аналитическая химия для будущих провизоров часть 1 // А. К. Жерносек, И. Е. Талуть. – Витебск: ВГМУ, 2003. – 362 с.