

РАДІОБІОЛОГІЯ

УДК 576.315.4

ВЛИЯНИЕ МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА СВЯЗЫВАНИЕ КАТИОННОГО КРАСИТЕЛЯ МЕТИЛЕНОВОГО ГОЛУБОГО ЯДРАМИ КЛЕТОК ГОРОХА

**© 2010 г. Ю. Г. Шкорбатов, О. С. Деренько,
В. А. Грабина, В. Н. Быков**

*Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина
(Харьков, Украина)*

Исследовали связывание катионного красителя метиленового голубого с хроматином ядер клеток корневых волосков гороха после микроволнового облучения. Количество красителя определяли с помощью компьютерного анализа микрофотографий. В качестве источника микроволн использовали установку, генерирующую излучение с частотой $36,64 \pm 0,05$ ГГц, плотность мощности на уровне объекта 10^{-4} Вт/см², время облучения составляло 1, 5 и 10 мин. Показано, что в проростках через 5 мин после облучения количество связываемого красителя возрастало, что свидетельствует об увеличении содержания в хроматине отрицательно заряженных групп. Эффект микроволнового облучения возрастал с увеличением дозы облучения. На уровне целого проростка влияние микроволн проявлялось в замедлении роста корня. Полученные данные свидетельствуют об индуцированной микроволнами дестабилизации хроматина, которая, в частности, вызывала увеличение содержания в хроматине отрицательно заряженных групп.

Ключевые слова: *Pisum sativum L.*, *корневые волоски*, *клетка*, *клеточное ядро*, *хроматин*, *электромагнитное поле*

Основными мишенями воздействия электромагнитных полей на клетку могут быть клеточные мембраны (в частности, системы транспорта ионов), протеинкиназы, являющиеся компонентами системы внутриклеточной регуляции и компоненты белоксинтезирующего аппарата (регуляторные белки FOS, JUN, MYC) (Lacy-Hulbert et al., 1998). В работе (Blank, Goodman, 2004) был предложен механизм действия электромагнитного поля на специфические промоторы генов, чувствительные к электромагнитному излучению.

Растительные объекты хорошо откликаются на электромагнитные воздействия. Существует большое количество работ, в которых

показано влияние электромагнитных полей на процессы роста и развития растений. В частности, показано, что стимуляция прорастания семян электромагнитными полями миллиметрового диапазона стимулирует прорастание семян и скорость роста проростков пшеницы, фасоли, ржи и лука, причем наиболее эффективно воздействие проявляется на ослабленные семена с низкой всхожестью (Шахбазов и др., 1996).

Изменение активности генов сопровождается изменением заряда ядра в клетке. Подобные эффекты впервые были показаны с помощью метода внутриклеточного микроэлектрофореза (Shskorbatov et al., 2002). Ранее нами было выявлено повышение электрического заряда хроматина ядер клеток эпидермиса эпикотили проростков гороха под воздействием микроволнового излучения (Шахбазов и др., 1991). В то же время известно, что количество отрицательно заряженных групп в хроматине, кото-

Адрес для корреспонденции: Шкорбатов Юрий Георгиевич, Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, 61077, Украина; e-mail: shck@mail.ru

ВЛИЯНИЕ МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

рые взаимодействуют с катионными красителями, также играет роль в регуляции функциональной активности хроматина (Itzhaki, 1971). В связи с этим в настоящей работе исследовали влияние микроволнового излучения на связывание катионного красителя метиленового голубого ядрами клеток гороха.

МЕТОДИКА

Эксперименты проводили на клетках корней гороха. Семена гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Царевич проращивали на среде Кнопа в чашках Петри в течение 4 сут. Корни проростков облучали электромагнитным полем миллиметрового диапазона. Для получения электромагнитного поля применяли оригинальную установку, изготовленную сотрудниками кафедры теоретической радиофизики ХНУ им. В.Н. Каразина. Характеристики микроволнового излучения: частота $36,64 \pm 0,05$ ГГц, плотность мощности на уровне объекта 10^{-4} Вт/см². Время облучения составляло 1, 5 и 10 мин.

После воздействия корни гороха окрашивали раствором метиленового голубого (концентрация 60 мкг/мл) в течение 5 мин. Исследовали клетки корневых волосков на расстоянии 1-1,5 см от кончика корня. Препараты фотографировали и определяли степень окрашивания ядер с помощью программы Photoshop. На рис. 1 показано ядро в клетке корневых волоска гороха. В каждом эксперименте просматривали 30 ядер и определяли среднее значение оптической плотности внутри ядра, вычитая значение оптической плотности в цитоплазме, и ошибку среднего. Эксперименты повторяли 3 раза, затем определяли среднее значение и ошибку среднего. На рис. 2 представлены усредненные данные трех независимых экспериментов.

Для определения влияния облучения на растение в целом определяли длину корней проростков гороха после облучения на 4, 5 и 6 сут роста (в случае облучения через 1 и 2 сут после облучения). В каждом варианте эксперимента измеряли длину 100 корней, эксперимент повторяли 3 раза и затем определяли среднее значение и ошибку среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Микроволновое излучение вызывало усиление окрашиваемости ядер клеток гороха (рис. 2). Увеличение времени облучения приводило к повышению степени окрашиваемости ядер. Максимальный эффект наблюдался при

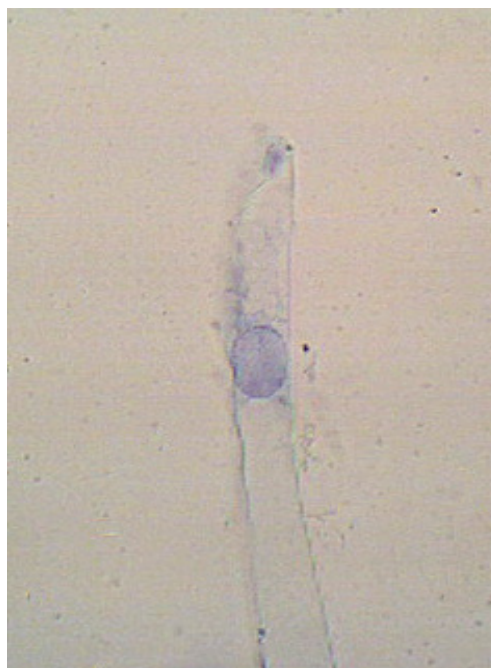


Рис. 1. Клетка корневых волоска корня гороха, окрашенная метиленовым голубым.

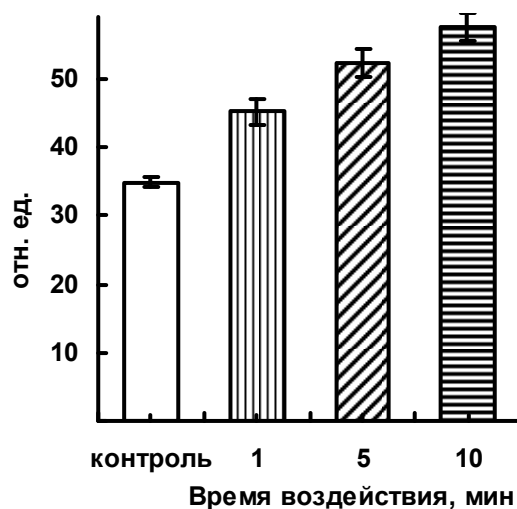


Рис. 2. Влияние микроволнового излучения на окрашиваемость (отн. ед.) ядер клеток гороха метиленовым голубым.

облучении электромагнитным полем в течение 10 мин. Повышение степени окрашивания свидетельствует об увеличении количества свободных зарядов хроматина. В предыдущей работе мы исследовали изменение заряда хроматина в клетках эпидермиса эпикотилия с помощью методики внутриклеточного электрофореза. Было показано, что через 24 ч после воздействия микроволн с длиной волны 5,1 мм и интенсивностью 20 мкВт/см² электрофоретическая подвижность хроматина в ядрах и, соот-

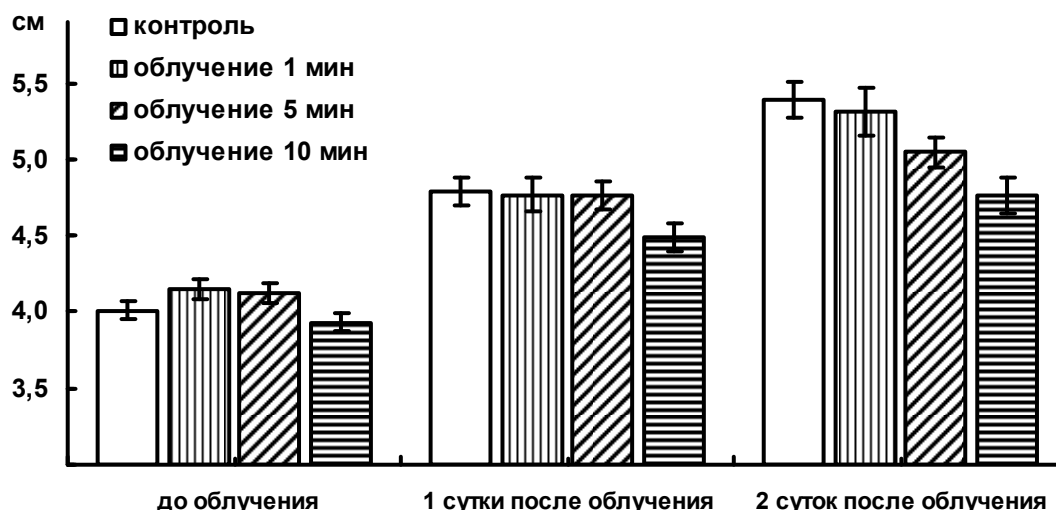


Рис. 3. Влияние микроволнового излучения на длину корня проростков гороха (N=300).

ветственно, отрицательный заряд хроматина в ядрах повышается (Шахбазов и др., 1991). Таким образом, результаты настоящего исследования хорошо согласуются с нашими более ранними данными, однако в настоящей работе мы исследовали начальный этап реакции клеток гороха на микроволновое облучение, в первые 5 мин после облучения.

На рис. 3 показано, что микроволновое излучение вызывало изменение скорости роста корней гороха. Из представленных данных видно, что достоверное ($P < 0,05$) снижение длины корней через 1 сут после облучения наблюдалось при 10-минутном облучении. Достоверное торможение роста корней через 2 сут после облучения отмечалось при 5- и 10-минутном облучении.

Отрицательный заряд хроматина в основном обусловлен свободными фосфатными группами в молекулах нуклеиновых кислот. Для оценки количества свободных отрицательных зарядов в ДНК и хроматине был применен метод окрашивания катионным красителем азур А. Этот метод показал, что около 50% фосфатных групп ДНК в хроматине способны взаимодействовать с красителем, то есть находятся в «свободном» от взаимодействия с гистонами состоянии (Klein, Szirmal, 1963). Количество свободных фосфатных групп зависит от функционального состояния хроматина, оно выше в функционально активном хроматине (Kurashina et al., 1970). Количество отрицательно заряженных групп в хроматине возрастает в результате отделения молекул белков гистонов от молекул ДНК. В работах (Itzhaki, 1971;

Ansevin et al., 1975) показано, что повышение отрицательного заряда хроматина приводило к увеличению его матричной активности. Обнаруженный нами эффект повышения отрицательного заряда хроматина может лежать в основе действия микроволнового излучения на клеточное ядро и хроматин. Можно полагать, что электромагнитные поля вызывают разделение отрицательно заряженных молекул ДНК и положительно заряженных белков, вероятно, гистонов. По-видимому, дестабилизация хроматина в результате действия микроволнового излучения может иметь негативные последствия на уровне целого организма. Об этом косвенно свидетельствует показанное в настоящей работе (см. рис. 3) подавление роста корней гороха под влиянием микроволнового излучения.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Института растениеводства им. В.Я. Юрьева НААНУ за предоставление семенного материала.

ЛИТЕРАТУРА

- Шахбазов В.Г., Чепель Л.М., Горобец Н.Н. и др. Влияние микроволн различной поляризации на биологические качества семян // СВЧ-техника и телекоммуникационные технологии. Матер. 6-й Междунар. Крымской конф. – Севастополь, 1996. – С. 463.
- Шахбазов В.Г., Шкорбатов Ю.Г., Грабина В.А. Влияние электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на электрокинетические свойства хроматина и клеточных ядер // Молеку-

ВЛИЯНИЕ МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

- лярная генетика и биофизика. – 1991. – №16. – С. 30-33.
- Ansevin T., Macdonald K.K., Smith C.E., Hnilica L.S.* Mechanics of chromatin template activation. Physical evidence for destabilization of nucleoproteins by polyanions // *J. Biol. Chem.* – 1975. – V. 250. – P. 281-289.
- Blank M., Goodman R.* Initial interactions in electromagnetic field-induced bisynthesis // *J. Cel. Phys.* – 2004. – V. 199. – P. 359-363.
- Itzhaki R.F.* Studies on the accessibility of deoxyribonucleic acid in deoxyribonuclear protein to cationic molecules // *Biochem. J.* – 1971. – V. 122. – P. 583-592.
- Klein F., Szirmal J.A.* Quantitative studies on the interactions of Azure A with deoxyribonucleic acid and deoxyribonucleoprotein // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1963. – V. 72. – P. 48-61.
- Kurashina Y., Ohba J., Mizuno D.* Template activity of partially dehistoned nucleohistones for DNA dependent RNA polymerase // *J. Biochem.* – 1970. – V. 67. – P. 661-665.
- Lacy-Hulbert A., Metcalfe J.C., Hesketh R.* Biological responses to electromagnetic fields // *FASEB J.* – 1998. – V. 12. – P. 395-420.
- Shckorbatov Y. G., Shakhbazov V.G., Navrotskaya V.V. et al.* Electrokinetic properties of nuclei and membrane permeability in human buccal epithelium cells influenced by the low-level microwave radiation // *Electrophoresis.* – 2002. – V. 13. – P. 2074-2079.
- Klein F., Szirmal J.A.* Quantitative studies on the interactions of Azure A with deoxyribonucleic acid and

Поступила в редакцию
11.05.2010 г.

INFLUENCE OF MICROWAVE RADIATION ON BINDING OF CATIONIC STAIN METHYLENE BLUE BY NUCLEUSES OF PEA CELLS

Yu. G. Shckorbatov, O. S. Derenko, V. A. Grabina, V. N. Bykov

*V.N. Karazin Kharkiv National University
(Kharkiv, Ukraine)*

Binding of vital dye methyl blue with chromatin of pea cell nucleus in root fibrils after microwave irradiation was investigated. Computer analysis of methyl blue amount in cell nucleus was done. As a source of electromagnetic radiation of frequency $f=36,64$ GHz we applied a semi-conductor device. In all experiments irradiation power density at the surface of exposed object was $P=100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Irradiation time in all experiments was 1, 5 and 10 minutes. The increase of dye absorption by cell nucleus after microwave irradiation was shown. The increase of absorption indicates increase of amount of negatively charged groups in chromatin. Biological effects of microwave irradiation increased with irradiation dose. The decrease of root growth rate after microwave irradiation was shown. Our data demonstrate chromatin destabilization after microwave irradiation.

Key words: *Pisum sativum L., root fibril, cell nucleus, chromatin, methyl blue, electromagnetic field, electric charge*

**ВПЛИВ МІКРОХВИЛЬОВОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА ЗВ'ЯЗУВАННЯ
КАТІОННОГО БАРВНИКА МЕТИЛЕНОВОГО БЛАКИТНОГО
ЯДРАМИ КЛІТИН ГОРОХУ**

Ю. Г. Шкорбатов, О. С. Деренько, В. А. Грабіна, В. Н. Биков

*Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна
(Харків, Україна)*

Досліджували зв'язування катіонного барвника метиленового блакитного з хроматином ядер клітин кореневих волосків гороху після мікрохвильового опромінювання. Кількість барвника визначали за допомогою комп'ютерного аналізу мікрофотографій. Як джерело мікрохвиль використовували установку, що генерувала випромінювання з частотою $36,64 \pm 0,05$ ГГц, щільність потужності на рівні об'єкта 10^{-4} Вт/см², час опромінювання складав 1, 5 і 10 хв. Показано, що в проростках через 5 хв після опромінення зв'язування барвника зростало, що свідчить про збільшення вмісту в хроматині негативно заряджених груп. Ефект мікрохвильового опромінювання збільшувався зі зростанням дози опромінення. На рівні цілого проростка вплив мікрохвиль виявлявся в уповільненні росту кореня. Отримані дані свідчать про індуковану мікрохвилями дестабілізацію хроматину, яка, зокрема, спричиняла збільшення вмісту негативно заряджених груп в хроматині.

Ключові слова: *Pisum sativum L.*, кореневі волоски, клітинне ядро, хроматин, метиленовий блакитний, електромагнітне поле, електричний заряд