

УДК 576.315.4

ДЕЙСТВИЕ МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И СЛАБОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА СОСТОЯНИЕ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ И ЯДРА КЛЕТОК ГОРОХА (*Pisum sativum* L.)

© 2014 г. О. С. Пасюга¹, В. Н. Пасюга¹,
С. С. Рябуха², Ю. Г. Шкорбатов¹

¹Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина
(Харьков, Украина)

²Институт растениеводства им. В.Я. Юрвега
Национальной академии аграрных наук Украины
(Харьков, Украина)

Исследовали влияние микроволнового излучения и слабого магнитного поля на плазматические мембраны и состояние хроматина клеток корневых волосков гороха посевного *Pisum sativum* L. сортов Царевич, Вусатый 90, Харьковский Янтарный. Проростки подвергали воздействию микроволн с частотой 36,64 ГГц и плотностью потока мощности 1 и 4 Вт/м² и постоянного магнитного поля с магнитной индукцией 25 мТл в период времени от 1 до 15 мин. Состояние плазматической мембраны оценивали по ее проницаемости для индигокармина. Состояние хроматина определяли по окрашиваемости ядер красителем акридиновым оранжевым. Микроволновое излучение и магнитное поле вызывали конденсацию хроматина и повреждение плазматической мембраны клеток. Наблюдаемые изменения состояния хроматина свидетельствуют о том, что микроволновое излучение вызывает стрессовый ответ клеток корневых волосков гороха. В клетках растений вызванные электромагнитными полями и магнитным полем изменения наблюдались при большей интенсивности действующего фактора, чем необходимо для индукции аналогичных изменений в клетках человека.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., корневые волоски, плазматическая мембрана, хроматин, микроволновое излучение, слабое магнитное поле

Растительные объекты хорошо откликаются на электромагнитные воздействия. Существует большое количество работ, в которых показано влияние электромагнитных полей на процессы роста и развития растений. Так, выявлена стимуляция роста проростков кукурузы под действием слабых магнитных полей (Rasciu et al., 2008). Слабое магнитное поле вызывало активацию корневой меристемы корней кукурузы (Bitonti et al., 2006). Низкочастотные электромагнитные поля стимулировали рост корней чабера *Satureja bachtiarica* L (Ramezani et al., 2012).

Магнитные поля влияют на многие показатели жизнедеятельности растения, в том числе на содержание ионов кальция. В работе

Pazur, Rassadina (2009) показано, что под воздействием слабого магнитного поля (0,65 Гс) наблюдалось увеличение концентрации ионов Ca²⁺ в клетках *Arabidopsis thaliana*.

Электромагнитные воздействия могут оказывать на растительную клетку как повреждающий, так и регуляторный эффект. Нарушение барьерной функции плазматической мембраны при действии различных физических факторов и, соответственно, повышение окрашиваемости клеток витальными красителями является надежным критерием повреждения клетки (Gonzalez, Barrett, 2010). Исследование цитологических характеристик клеточного ядра при действии внешних факторов позволяет изучать изменения на уровне хроматина, связанные, как известно, с регуляцией генетической активности ядра и ответом клетки на стресс (Biamonti, Vourc'h, 2010; Shckorbatov, 2012).

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

В наших предыдущих исследованиях было показано, что низкоэнергетическое микроволновое излучение и магнитное поле вызывают конденсацию хроматина и повышение проницаемости клеточных мембран клеток человека (Shckorbatov, 2012). Представляло интерес выяснить, насколько данные изменения являются общими для разных биологических объектов и вызывают ли микроволновые излучения и магнитные поля той же интенсивности аналогичные изменения в состоянии клеточного ядра и клеточных мембран растений. В качестве экспериментального объекта использовали клетки корней сортов гороха, различных по ряду показателей, в том числе по засухоустойчивости.

МЕТОДИКА

Работу проводили на растениях гороха (*Pisum sativum* L.) сортов Харьковский Янтарный (засухоустойчивый), Царевич и Вусатый 90 (менее устойчивые) (Чекригин та ін., 2006). Семена проращивали на водопроводной воде в чашках Петри в течение 4 сут. Корни проростков обрабатывали электромагнитным полем миллиметрового диапазона и постоянным магнитным полем. 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 1 и 4 Вт/м². Время облучения составляло 1, 5, 10 и 15 мин. В качестве источника постоянного магнитного поля использовали постоянный магнит. Величина индукции магнитного поля на уровне объекта – 25 мТл. Проростки подвергали воздействию постоянного магнитного поля в течение 1, 5, 10 и 15 мин.

После воздействия корни гороха окрашивали 0,2 % раствором индигокармина в течение 15 мин для определения процента клеток корневых волосков с поврежденными мембранами (Гольд и др., 2008) и акридинового оранжевого (концентрация 0,1 мг/мл) в течение 5 мин для определения относительного количества клеток с конденсированным хроматином (Buczowska et al., 2013). В каждом варианте эксперимента просматривали 100 ядер и определяли среднее значение и ошибку среднего. Эксперимент повторяли три раза, на рисунках представлены средние данные трех независимых экспериментов.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью теста дисперсионного анализа (ANOVA test), результаты анализа представлены в табл. 1 и 2. В работе принят уровень достоверности $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Излучение с интенсивностью 1 Вт/м² не вызывало значительного увеличения окрашиваемости клеток, связанного с повышением проницаемости мембран (рис. 1А). Микроволновое излучение мощностью 4 Вт/м² при времени воздействия 10 и 15 мин вызывало статистически достоверное увеличение процентного содержания окрашенных клеток с поврежденными мембранами, несколько менее выраженное у засухоустойчивого сорта Харьковский Янтарный (рис. 1Б, табл. 1). Известно, что при засухе в растительной клетке нарушается целостность клеточных мембран (Semenova et al., 2014) и стабильность мембран является одним из показателей, коррелирующих с засухоустойчивостью (Venkateswarlu, Ramesh, 1993). Возможно, обнаруженный нами эффект меньшей реакции мембран клеток более засухоустойчивого сорта на микроволновое излучение свидетельствует о большей неспецифической устойчивости клеточных мембран к повреждениям.

Воздействие магнитного поля не вызывало значительного увеличения количества клеток с поврежденными мембранами (рис. 2).

Микроволновое излучение с плотностью мощности излучения 1 Вт/м² вызывало увеличение процентного содержания клеток с конденсированным хроматином при экспозициях 5 и 10 мин, экспозиция проростков в течение 1 мин не вызывала конденсации хроматина (рис. 3А). Микроволновое излучение с плотностью мощности излучения 4 Вт/м² вызывало достоверное повышение степени конденсированности хроматина при всех экспозициях – 1, 5 и 10 минут, причем, как и в первом случае, эффект возрастал с увеличением экспозиции (рис. 3Б, 4). Магнитное поле 25 мТл также приводило к повышению степени конденсированности хроматина при экспозициях 1, 5 и 10 мин (рис. 5).

Для того, чтобы оценить достоверность влияния различных факторов, таких как время воздействия (Т) и различия между сортами (В) на состояние хроматина мы использовали дисперсионный анализ (ANOVA test).

ДЕЙСТВИЕ МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

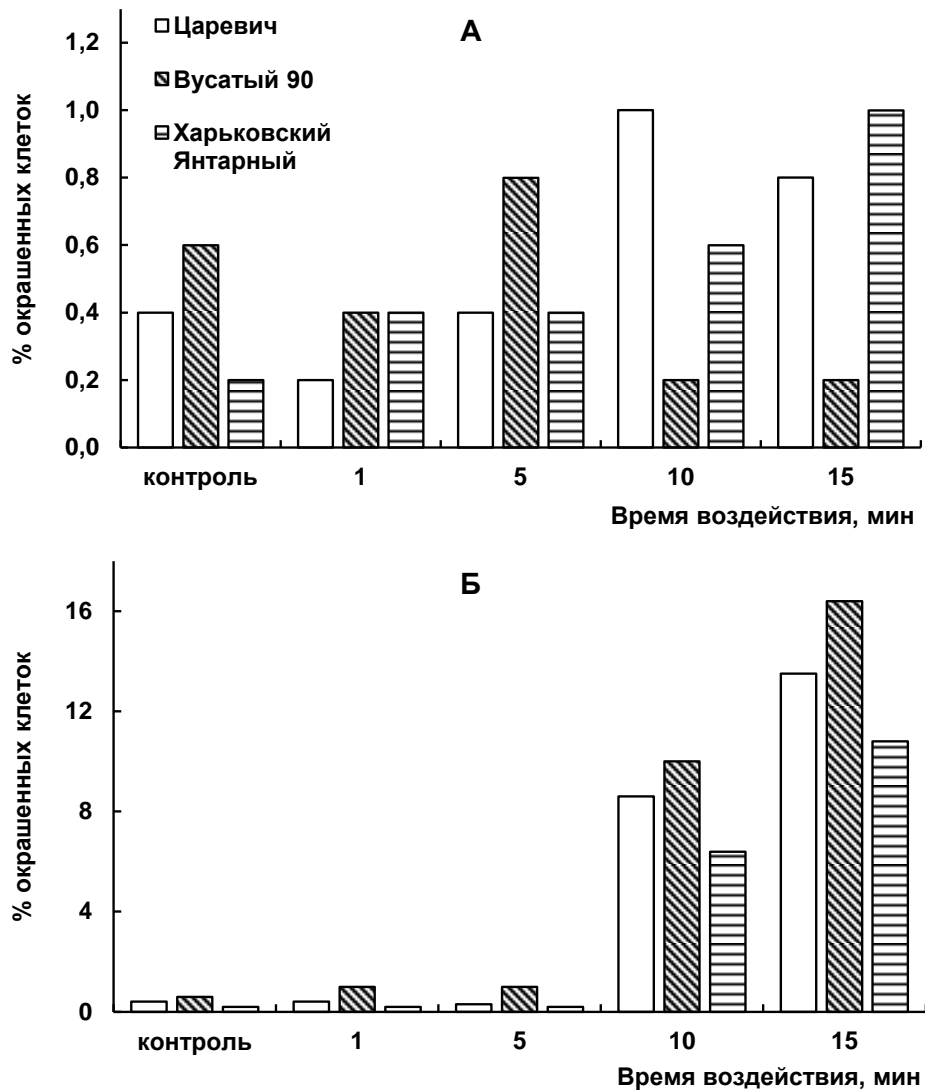


Рис. 1. Влияние микроволнового излучения с плотностью мощности 1 Вт/м² (А) и 4 Вт/м² (Б) на окрашиваемость индигокармином клеток корневых волосков гороха.

Таблица 1. Расчет достоверности влияния факторов времени воздействия микроволнового излучения и магнитного поля и различий между сортами на состояние плазматической мембраны клеток корневых волосков гороха

Факторы	SS	F _{факт}	F _{табл}	P
Микроволновое излучение с плотностью мощности 1 Вт/м ²				
T	1,38	0,49	3,24	0,69
B	2,43	2,98	3,49	0,07
B*T	1,17	0,48	2,60	0,82
Микроволновое излучение с плотностью мощности 4 Вт/м ²				
T	1804,58	291,06*	3,24	0,00
B	73,43	16,11*	3,49	0,00
B*T	42,97	3,14	2,60	0,02
Магнитное поле				
T	1,27	0,39	3,24	0,74
B	3,97	3,02	3,49	0,07
B*T	1,19	0,45	2,60	0,85

T – независимый фактор времени воздействия: 1 – 1 мин, 2 – 5 мин, 3 – 10 мин, 4 – 15 мин; B – зависимый фактор различий сортов: 1 – Царевич, 2 – Вусатый, 3 – Харьковский янтарный. * – здесь и в табл. 2 статистически достоверное наличие эффекта.

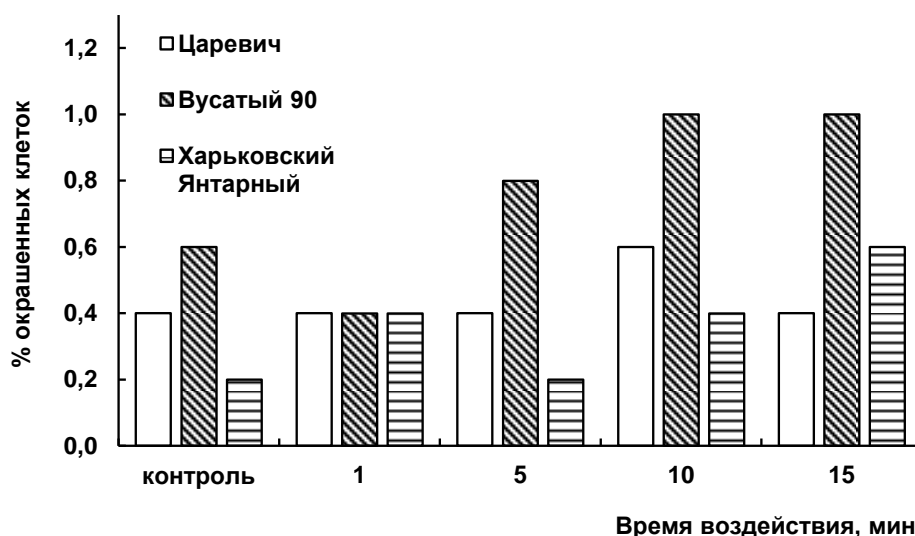


Рис. 2. Влияние магнитного поля (25 мТл) на окрашиваемость индигокармином клеток корневых волосков гороха.

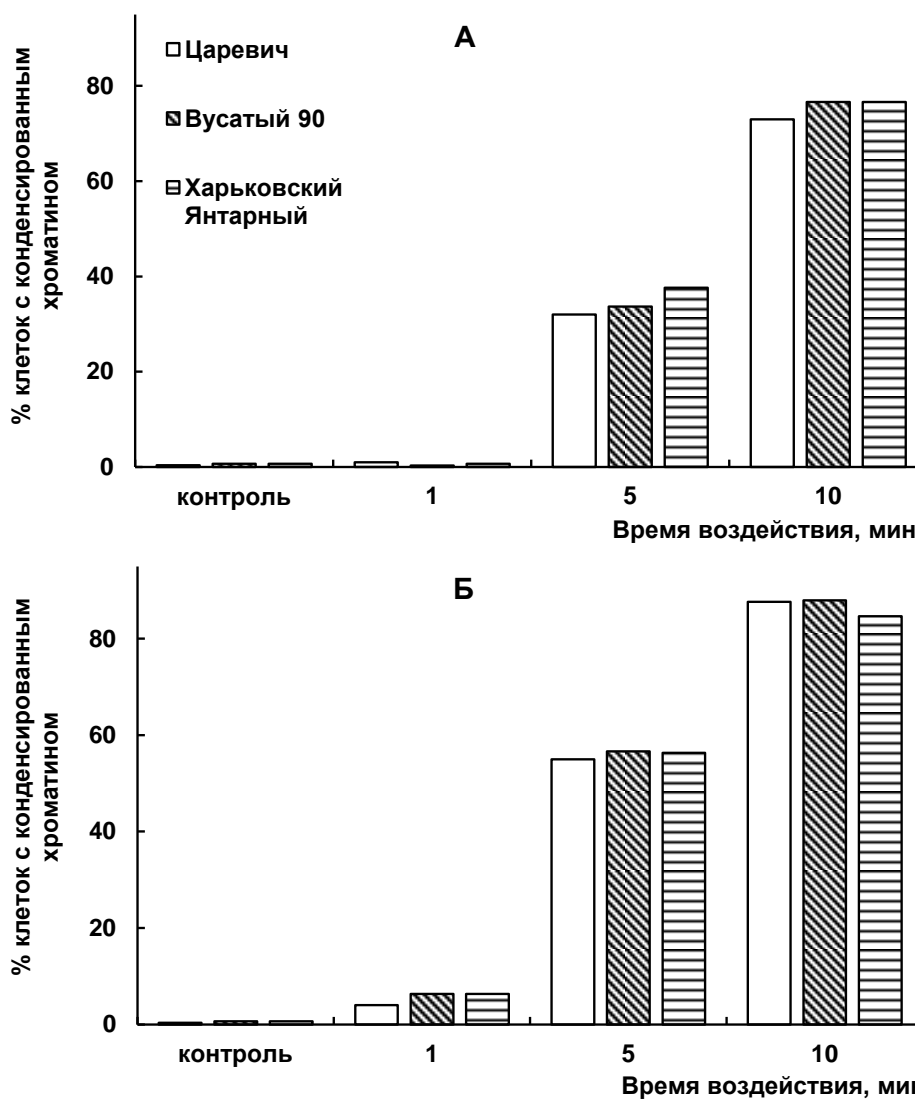


Рис. 3. Влияние микроволнового излучения с плотностью мощности 1 Вт/м² (А) и 4 Вт/м² (Б) на процентное содержание клеток корневых волосков гороха с конденсированным хроматином.

ДЕЙСТВИЕ МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

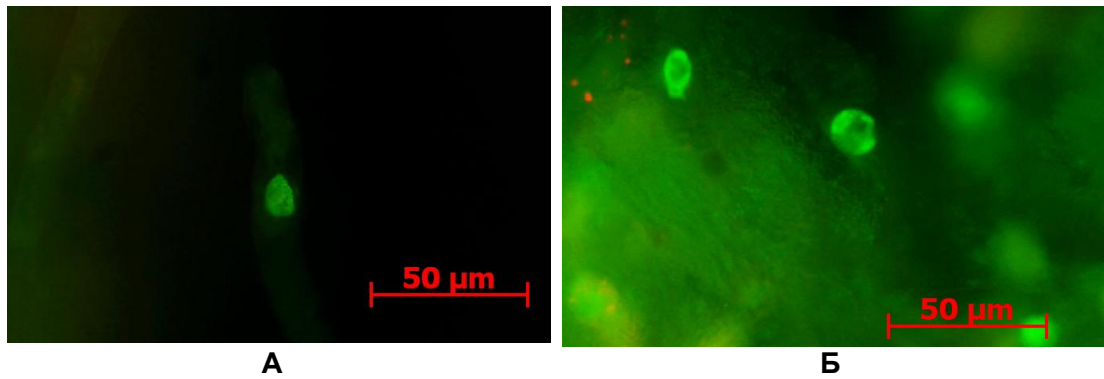


Рис. 4. Клетки корневых волосков гороха, окрашенные акридиновым оранжевым. А – контроль, Б – микроволновое излучение 4 Вт/м², время воздействия 10 мин.

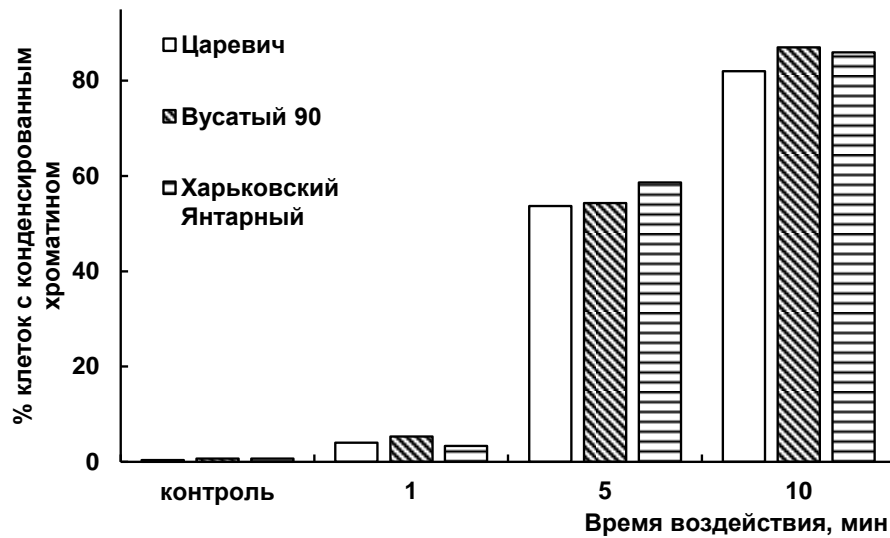


Рис. 5. Влияние магнитного поля (25 мТл) на процентное содержание клеток корневых волосков гороха с конденсированным хроматином.

Независимый фактор времени воздействия оказывал статистически достоверное влияние на показатель конденсации хроматина в ядрах клеток коневых волосков гороха при облучении микроволновым излучением мощностью 1 и 4 Вт/м² (табл. 2). Зависимый фактор различий между сортами (В) оказывал статистически достоверное влияние на изменения в состоянии хроматина в этих условиях. На данном этапе исследований трудно объяснить, чем конкретно обусловлено это влияние. Воздействие магнитного поля также достоверно влияло на состояние хроматина, хотя сортовые различия в этом случае не сказываются на проявлении эффекта поля (табл. 2).

Известно, что электромагнитное излучение вызывает реакцию проростков растений, аналогичную реакции клетки на стрессовые воздействия: холод, механические повреждения. Показано, что микроволновое излучение вызывает повышение образования вторичных меристем в проростках льна (Tafforeau et al.,

2004). Электромагнитное излучение вызывало увеличение митотического индекса меристемы корней лука (Tkalec et al., 2009).

Клеточное ядро и плазматические мембраны являются одними из мишеней, на которые влияет электромагнитное поле. Ранее нами было показано, что микроволновое излучение частотой 36,64 ГГц и мощностью 1 и 4 Вт/м² и магнитное поле интенсивностью 25 мТл вызывает конденсацию хроматина и повреждение мембран клеток буккального эпителия человека (Шкорбатов и др., 2009; Shckorbatov et al., 2011).

Полученные в данной работе данные свидетельствуют о том, что микроволновое излучение вызывает нарушение барьерной функции мембраны растительных клеток, проявляющееся в повышении процентного содержания клеток, окрашенных индигокармином. Микроволновое излучение вызывает конденсацию хроматина в ядрах, что является проявлением клеточной реакции на стрессовые воздействия.

Таблица 2. Расчет достоверности влияния факторов времени воздействия микроволнового излучения и магнитного поля и различий между сортами на конденсацию хроматина в ядрах клеток корневых волосков гороха

Фактор	SS	Fфакт	Fтабл	P
Микроволновое излучение с плотностью мощности 1 Вт/м ²				
T	25240,96	2542,93*	5,14	0,00
B	40,52	4,48*	3,89	0,04
B*T	37,93	2,10	3,26	0,14
Микроволновое излучение с плотностью мощности 4 Вт/м ²				
T	30266,89	5754,97*	5,14	0,00
B	10,89	3,59	3,89	0,06
B*T	24,89	4,10*	3,26	0,03
Магнитное поле				
T	30081,41	3500,85*	5,14	0,00
B	40,07	2,37	3,89	0,14
B*T	52,37	1,55	3,26	0,25

T – независимый фактор времени воздействия: 1 – 1 мин, 2 – 5 мин, 3 – 10 мин; B – зависимый фактор различий сортов: 1 – Царевич, 2 – Вусатый, 3 – Харьковский янтарный.

Магнитное поле интенсивностью 25 мТл не влияет на состояние мембран, но вызывает конденсацию хроматина.

Полученные результаты свидетельствуют о большей устойчивости клеток гороха к электромагнитным воздействиям по сравнению с клетками человека. Так, в работе (Shckorbatov et al., 2011) было показано, что микроволновое излучение с частотой 36,6 ГГц и поверхностной плотностью мощности излучения 1 Вт/м² при воздействии в течение 10 с вызывает конденсацию хроматина в ядрах клеток буккального эпителия человека. В настоящем исследовании показано отсутствие действия облучения с этими характеристиками на морфологические характеристики хроматина ядер клеток гороха при экспозиции в течение 1 мин. В этой же работе (Shckorbatov et al., 2011) показано, что проницаемость мембран клеток буккального эпителия для красителя трипановый синий возрастает уже после 10-секундного облучения микроволнами (36,64 ГГц, 1 мВт/см²). В клетках гороха облучение микроволнами с такими же характеристикам в течение 1 и 5 мин не вызвало повышения проницаемости мембран для индигокармина.

Аналогичная картина наблюдается и при воздействии магнитного поля. Так, в работе (Шкорбатов и др., 2009) было показано, что постоянное магнитное поле интенсивностью 25 мТл при времени экспозиции 10 мин вызывает значительное повышение проницаемости мембран клеток буккального эпителия человека для витального красителя трипанового синего.

Экспозиция клеток гороха в таких же условиях не вызвала изменений проницаемости мембран.

Таким образом, было показано, что микроволновое излучение и слабое постоянное магнитное поле вызывают конденсацию хроматина и повреждение плазматической мембраны клеток корневых волосков гороха. Наблюдаемые изменения состояния хроматина свидетельствуют о том, что микроволновое излучение вызывает стрессовый ответ клеток корневых волосков гороха. Вызванные электромагнитными полями и магнитным полем изменения наблюдаются при большей интенсивности действующего фактора, чем необходимо для индукции аналогичных изменений в клетках человека.

ЛИТЕРАТУРА

- Гольд В.М., Гаевский Н.А., Голованова Т.И. Физиология растений. Методические указания по лабораторным работам. – Красноярск, 2008. – 61 с.
- Чекригин П.М., Безуглий И.М., Василенко А.О., Загинайло М.І. Каталог сортів гороху селекції Інституту рослинництва ім. В.Я.Юр'єва. – Х.: Магда LTD, 2006. – 22 с.
- Шкорбатов Ю.Г., Грабина В.А., Пасюга В.Н. Влияние постоянного и вращающегося магнитного поля вихревого типа на проницаемость мембран клеток человека // Фотобиология та фотомедицина. – 2009. – Т. 6, № 4. – С. 67-72.
- Biamonti G., Vourc'h C. Nuclear stress bodies // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2010. – V. 2. – a000695.

ДЕЙСТВИЕ МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

- Bitonti M.B., Mazzuca S., Ting T., Innocenti A.M. Magnetic field affects meristem activity and cell differentiation in *Zea mays* roots // *Plant Biosys.* – 2006. – V. 140. – P. 87-93.
- Byczkowska A., Kunikowska A., Kaźmierczak A. Determination of ACC-induced cell-programmed death in roots of *Vicia faba* ssp. minor seedlings by acridine orange and ethidium bromide staining // *Protoplasma.* – 2013. – V. 250. – P. 121-128.
- Gonzalez M.E., Barrett D.M. Thermal, high pressure, and electric field processing effects on plant cell membrane integrity and relevance to fruit and vegetable quality // *J. Food Sci.* – 2010. – V. 75, № 7. – P. 121-130.
- Pazur A., Rassadina V. Transient effect of weak electromagnetic fields on calcium ion concentration in *Arabidopsis thaliana* // *BMC Plant Biol.* – 2009. – V 9. – P. 47-55.
- Semenova G., Fomina I., Ivanov A. Combined effect of water deficit and salt stress on the structure of mesophyll cells in wheat seedlings // *CellBio.* – 2014. – V. 3. – Article ID:43429,11 pages.
- Shckorbatov Y. The state of chromatin as an integrative indicator of cell stress // *New Developments in Chromatin Research* / Eds: N.M. Simpson, V.J. Stewart. – New York, 2012. – P. 123-144.
- Shckorbatov Y.G., Pasiuga V.N., Kolchigin N.N., Grabina V.A., Ivanchenko D.D., Bykov V.N., Dumin O.M. Cell nucleus and membrane recovery after exposure to microwaves // *Proc. Lat. Acad. Sci. Sect. B.* – 2011. – V. 65, № 1/2 (672/673). – P. 20-27.
- Tafforeau M., Verdus M., Norris V., White G.J., Cole M., Demarty M., Thellier M., Ripoll C. Plant sensitivity to low intensity 105 GHz electromagnetic radiation // *Bioelectromagnetics.* – 2004. – V. 25. – P. 403-407.
- Tkalec M., Malari K., Pavlica M., Pevalsek-Kozlina B., Vidakovic-Cifrek Z. Effects of radiofrequency electromagnetic fields on seed germination and root meristematic cells of *Allium cepa* L. // *Mut. Res.* – 2009. – V. 672. – P. 76-81.
- Racuciu M., Creanga D., Horga I. Plant growth under static magnetic field influence // *Rom. Journ. Phys.* – 2008. – V. 53, № 1-2. – P. 353-359.
- Ramezani V.F., Majd A., Nejdassattari T., Arbabian S. Study of effects of extremely low frequency electromagnetic radiation on biochemical changes in *Satureja bachtiarica* L. // *Int. J. Sci. Technol. Res.* – 2012. – V. 1, Is. 7. – P. 77-82.
- Venkateswarlu B., Ramesh K. Cell membrane stability and biochemical response of cultured cells of groundnut under polyethylene glycol-induced water stress // *Plant Sci.* – 1993. – V. 90. – P. 179-185.

Поступила в редакцию
09.11.2013 г.

INFLUENCE OF MICROWAVE IRRADIATION AND MAGNETIC FIELD ON THE STATE OF PLASMA MEMBRANE AND CHROMATIN OF PEA (*Pisum sativum* L.) CELLS

O. S. Pasiuga¹, V. N. Pasiuga¹, S. S. Ryabukha², Y. G. Shckorbatov¹

¹V.N. Karazin Kharkiv National University
(Kharkiv, Ukraine)
e-mail: shck@mail.ru

²V.Ya. Yuriev Plant Production Institute
of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine
(Kharkiv, Ukraine)

The effect of microwave radiation and a weak magnetic field on the plasma membrane of cells and the chromatin state of root hairs of pea *Pisum sativum* L. was investigated. Three varieties of peas of different drought-resistance: Tsarevich, Vusatiy 90, Kharkivskiy Yantarny. The microwave irradiation frequency was 36.64 GHz, the power flux density was 1 and 4 W/m² and static magnetic field intensity 25 mT, exposure time from 1 to 15 min. State of plasma membrane permeability was assessed by the stainability by indigocarmin. Chromatin state was assessed by staining of nuclei with acridine orange dye. Microwave radiation and a weak static magnetic field induce chromatin condensation. Membrane integrity was influenced by microwaves only. The observed changes in chromatin indicate that microwave radiation causes a stress response in the cells of pea root hairs. The changes are observed at higher intensity of acting factor than is necessary for the induction of similar changes in human cells.

Key words: *Pisum sativum* L., root hairs, plasma membrane, chromatin, microwave radiation, magnetic field

ПАСЮГА и др.

**ДІЯ МІКРОХВИЛЬОВОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ
І СЛАБКОГО МАГНІТНОГО ПОЛЯ НА СТАН КЛІТИННОЇ МЕМБРАНИ
ТА ЯДРА КЛІТИН ГОРОХУ (*Pisum sativum* L.)**

О. С. Пасюга¹, В. М. Пасюга¹, С. С. Рябуха², Ю. Г. Шкорбатов¹

¹*Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна
(Харків, Україна)
e-mail: shck@mail.ru*

²*Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва
Національної академії аграрних наук України
(Харків, Україна)*

Досліджували вплив мікрохвильового випромінювання та слабкого магнітного поля на плазматичні мембрани і стан хроматину клітин кореневих волосків гороху посівного *Pisum sativum* L. сортів Царевич, Вусатий 90, Харківський Янтарний. Проростки опромінювали мікрохвильовим випромінюванням з частотою 36,64 ГГц, густина потоку потужності 1 і 4 Вт/м², час опромінення від 1 до 10 хв та обробляли постійним магнітним полем з магнітною індукцією 25 мТл протягом 1-15 хвилин. Стан плазматичної мембрани оцінювали за її проникністю для індигокарміну. Стан хроматину визначали за забарвлюваністю ядер барвником акридиноним оранжевим. Мікрохвильове випромінювання і слабе постійне магнітне поле спричиняло конденсацію хроматину і пошкодження плазматичної мембрани клітин кореневих волосків гороху. Зміни стану хроматину свідчать про те, що мікрохвильове випромінювання викликає стресову відповідь клітин кореневих волосків гороху. Зміни, спричинені електромагнітними полями і магнітним полем, спостерігаються за більшої інтенсивності чинника, ніж необхідно для індукції аналогічних змін у клітинах людини.

Ключові слова: *Pisum sativum* L., кореневі волоски, плазматична мембрана, хроматин, мікрохвильове випромінювання, слабе магнітне поле