

УДК 575:582.632.2:537.212

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ НА ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОК АПИКАЛЬНОЙ МЕРИСТЕМЫ ПРОРОСТКОВ СЕМЯН ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО (*Quercus robur* L.)

© 2003 г. В.Н. Калаев, А.К. Буторина, А.В. Панов, М.Н. Левин

Воронежский государственный университет

Проведены исследования влияния электрического поля (импульсы длительностью 10 мкс, с частотой следования 50 Гц, амплитудой 75 В/см, время экспозиции 6 с, 2,5 мин, 10 мин) на цитогенетические показатели (митотическую активность, скорость прохождения клетками стадий митоза, уровень и спектр нарушений митоза) семенного потомства дуба черешчатого. Выявлено возрастание митотической активности, уровня нарушений митоза, числа остаточных ядрышек на стадиях метафазы – телофазы митоза, изменение спектра нарушений, задержка клеток на стадии профазы и метафазы митоза. Максимальные цитогенетические эффекты наблюдаются при обработке электрическим полем в течение 2,5 минут. Высказывается предположение о механизмах, обуславливающих изменения цитогенетических характеристик, связанных с конформационными перестройками белковых молекул и деспирализацией хроматина. Предполагается существование критического времени воздействия электрического поля.

В настоящее время активно проводятся исследования влияния полей различной природы на биологические объекты. Было показано, что некоторые виды полей могут затрагивать различные уровни организации живой материи, в том числе вызывать изменения генетических структур как соматических (являются причиной их злокачественного перерождения), так и половых клеток (Антипенко, Ковешников, 1987; Григорьев, 1997, 2000; Брезницкая, Тимченко, 2000; Дейнекина, 2000 и др.). На сегодняшний день отсутствует единая теория, описывающая воздействие полей на живые организмы. Однако, несмотря на это, биологические эффекты, обусловленные ими, используются в сельском хозяйстве и промышленности (для улучшения посевной всхожести семян, стерилизации объектов и т.д.) (Левин и др., 1999; Новицкий, 1996; Серегина и др., 1991; Серегина, 1998). Кроме того разрабатываются меры защиты от полей. Считается, что лесные насаждения могут рассматриваться как защитные экраны от них (Молчанов и др., 2000). Работ по выявлению влияния электромагнитных полей на древесные растения известно немного, хотя, например, было выявлено негативное влияние указанных факторов на генетические структуры сосны обыкновенной (увеличение нарушений митоза, фрагментация ядра, образование микроядер) (Буторина и др., 2000; Миронов, 2002). Исследований влияния на генетический аппарат электрических полей не

проводилось, хотя это позволит вычленить ведущую составляющую, индуцирующую проявление биологических эффектов импульсного магнитного поля. В связи с этим представляется интересным изучить влияние электрического поля на цитогенетические характеристики семенного потомства дуба черешчатого, являющегося одной из важнейших лесообразующих пород, с целью установления как возможных цитогенетических эффектов электрического поля и механизмов его воздействия, так и разработки методов и приемов его использования для стимуляции жизненных процессов у объекта для ускорения процессов роста и развития.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для обработки электрическим полем были собраны семена дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) с экологически “чистой” территории – биостанции Воронежского госуниверситета “Веневиново” осенью 2001 года. Время экспозиции электрическими импульсами длительностью 10 мкс, с частотой следования 50 Гц, амплитудой 75 В/см на генераторе Г5-54 составило 6 с, 2,5 мин, 10 мин. После обработки желуди помещали в эмалированные кюветы с влажным песком. По достижении корнями проростков длины 1,5 – 3 см их фиксировали в ацетоалкоголе (3 части 96 % этилового спирта: 1 часть ледяной уксусной кислоты) в 22 часа по зимнему времени, когда у семенного по-

томства дуба черешчатого отмечается пик митотической активности (Butorina, Kalaev, 1998). Материал хранили в холодильнике при температуре +4 °С. Изготовление микропрепаратов и их анализ осуществляли по описанной ранее методике (Буторина и др., 2000) на микроскопе Laboval-4 (Carl Zeiss, Jena) при увеличении 10x1,5x40 и 10x1,5x100. На препаратах определяли митотическую активность (% делящихся клеток от общего числа проанализированных клеток), профазную, метафазную и анафазно-телофазную митотическую активность (долю клеток на указанных стадиях митоза от общего числа проанализированных клеток, %), % клеток с нарушениями в митозе от общего их числа на стадии метафазы, анафазы, телофазы митоза. Классификацию патологических митозов проводили по Алову (1965). Выявляли частоту встречаемости (в %) метафаз, анафаз, телофаз с остаточными ядрышками от общего числа проанализированных соответствующих фаз. Обработку результатов проводили с использованием статистического пакета программ "Stadia". Процедура группировки данных и их обработка изложены в работе Кулаичева (1996). Сравнение значений выборок по митотической активности проводили с использованием t-критерия Стьюдента, для выявления различий по частоте встречаемости нарушений митоза и клеток с остаточным ядрышком на стадии метафазы, анафазы, телофазы митоза применяли X-критерий рангов Ван-дер-Вардена. Влияние фактора обработки электрическим полем на цитогенетические показатели выявляли с помощью параметрического и непараметрического (Краскелл-Уоллиса) дисперсионного анализа. Силу влияния фактора определяли по Снедекору. Кластерный анализ проводили с использованием метрики нормированного Эвклида, стратегия классификации – группового соседа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований выявлено влияние электрического поля на цитогенетические показатели семенного потомства дуба черешчатого. Однофакторный дисперсионный анализ показал достоверное влияние фактора обработки на встречаемость патологических митозов ($P < 0,05$). Во всех экспериментах отмечается рост нарушений митоза, причем их максимум выявляется при обработке электрическим полем с временем экспозиции 2,5 минуты (рис. 1). Однако, при обработке в течение 10 минут статистически достоверных различий с контролем не

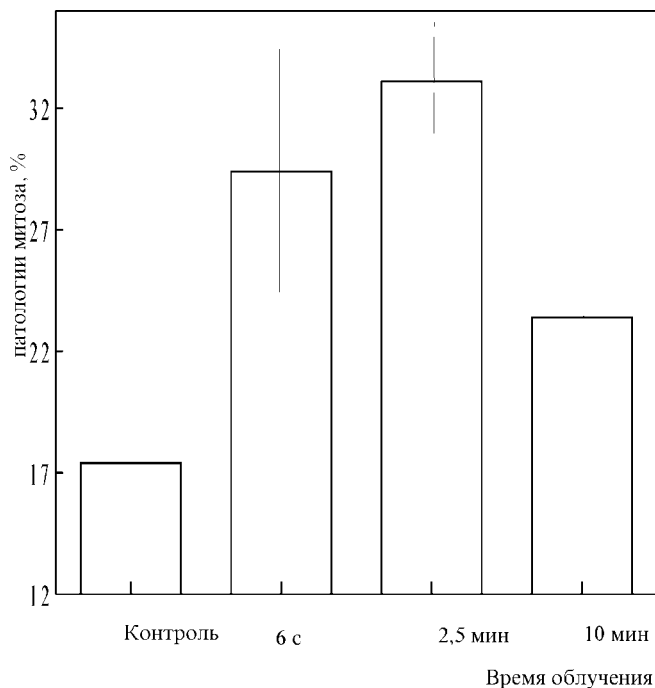


Рис. 1. Частота встречаемости нарушений митоза в клетках апикальной меристемы корней проростков семян дуба черешчатого, облученных электрическим полем

выявлено, что может являться следствием двух причин: 1) невозможностью перехода клеток из профазы в метафазу, где нарушения могут быть обнаружены используемым нами методом (как правило, в таких случаях наблюдается резкий рост доли профазных клеток); 2) нелинейными дозозависимыми эффектами при воздействии электрическим полем. Для проверки первого предположения была проанализирована митотическая активность профазных клеток (табл.). Дисперсионный анализ выявил влияние фактора обработки на указанную характеристику ($P < 0,05$; сила влияния – 8,7%). Исследование митотической активности профазных клеток обнаружило достоверный рост их доли только при обработке в течение 2,5 минут, именно при этой экспозиции отмечается максимальный рост нарушений митоза. Поэтому, можно предположить, что возрастание количества профазных клеток связано с повреждением хромосом и невозможностью или задержкой перехода из стадии профазы митоза в метафазу. Подобные нарушения отмечаются в клетках животных и растений как в условиях лабораторного опыта, так и в природных условиях при некоторых стрессовых воздействиях, обусловленных воздействием химических соединений или антропогенным загрязнением окружающей среды (Казанцева, 1981; Буторина и др., 1996). Отсутствие повышения митотической активности

Цитогенетические характеристики семенного потомства дуба черешчатого при обработке электрическим полем

Цитогенетические характеристики	Время экспозиции электрическим полем			
	контроль	6 с	2,5 мин	10 мин
Митотическая активность, %	10,8±0,3	11,0±0,2	13,1±0,4**	12,3±0,4*
Профазная митотическая активность, %	9,0±0,3	8,9±0,1	9,8±0,3*	9,9±0,4
Метафазная митотическая активность, %	0,8±0,1	0,9±0,1	1,8±0,1***	1,4±0,2*
Анафазно-телофазная митотическая активность, %	2,0±1,4	1,2±0,1	1,6±0,2	1,1±0,1

Обозначения: * - различия с контролем достоверны (P<0,05); ** - различия с контролем достоверны (P<0,01); *** - различия с контролем достоверны (P<0,001)



Рис. 2. Спектр нарушений митоза в клетках апикальной меристемы корней проростков семян дуба черешчатого, облученных электрическим полем

профазных клеток в других экспериментах, как нам представляется, подтверждает второе предположение о нелинейных дозозависимых эффектах при воздействии электрическим полем.

Анализ спектра нарушений митоза (рис. 2) показывает его значительное расширение в опытных образцах по сравнению с контрольными. В контроле было обнаружено только отставание хромосом в метакинезе, что характерно для дуба

черешчатого в норме (Калаев, 2000). При обработке электрическим полем с экспозицией 6 с, 2,5 минуты в спектре нарушений появляется деспирализация хромосом на стадии метафазы митоза, когда наряду с сильно конденсированными участками присутствуют слабо спирализованные. Подобное явление отмечалось в клетках животных при воздействии некоторых химических соединений (Казанцева, 1981), а также у древесных

растений в условиях значительного антропогенного загрязнения (Буторина и др., 2000). Наиболее широкий спектр нарушений выявлен при воздействии электрическим полем в течение 2,5 минут, что свидетельствует о более значительном деструктивном воздействии указанной дозы. Помимо вышеперечисленных аномалий у семенного потомства дуба черешчатого при обработке электрическим полем встречались асимметричные и трехполосные митозы, а также мосты. Максимальная частота встречаемости мостов отмечается при экспозиции 6 с. Характерно, что для активно пролиферирующей ткани преобладание в спектре нарушений мостов свидетельствует об активной работе систем репарации (Симаков, 1983; Акопян, 1967). Скорее всего, при указанной экспозиции происходит активация этих систем, помогающих организму компенсировать неблагоприятное воздействие. При увеличении времени экспозиции происходит угнетение систем репарации, что выражается в уменьшении доли мостов и появлении более значительных повреждений генетического материала.

Изучение важного показателя морфогенеза – митотической активности – показало достоверное его изменение при воздействии электрическим полем ($P < 0,001$; сила влияния – 7,3 %). При воздействии электрическим полем в течение 2,5 и 10 минут наблюдается достоверное увеличение по сравнению с контролем числа делящихся клеток ($P < 0,01$ и $P < 0,05$ соответственно) (табл.) за счет возрастания доли профазных и метафазных клеток. Сила влияния фактора обработки на последнюю цитогенетическую характеристику составила 10,1 % ($P < 0,001$). Максимальный рост числа метафаз выявлен при обработке в течение 2,5 минут, при экспозиции в течение 10 минут происходит снижение их числа, но уровень остается достоверно выше контрольного. Задержка клеток на стадии метафазы митоза является следствием нарушения формирования веретена деления и запуска механизма checkpoint-контроля целостности генетического материала (Колтовая, 2000).

Исследование времени прохождения клетками стадий анафазы и телофазы митоза не показало влияния обработки на этот показатель, в связи с чем возможно предположить, что электрическое поле не оказывает влияния на протекание процессов цитотомии.

При обработке желудей электрическим полем в течение 6 с в клетках меристемы корней наблюдается тенденция к росту встречаемости остаточных ядрышек на стадии метафазы, анафазы, те-

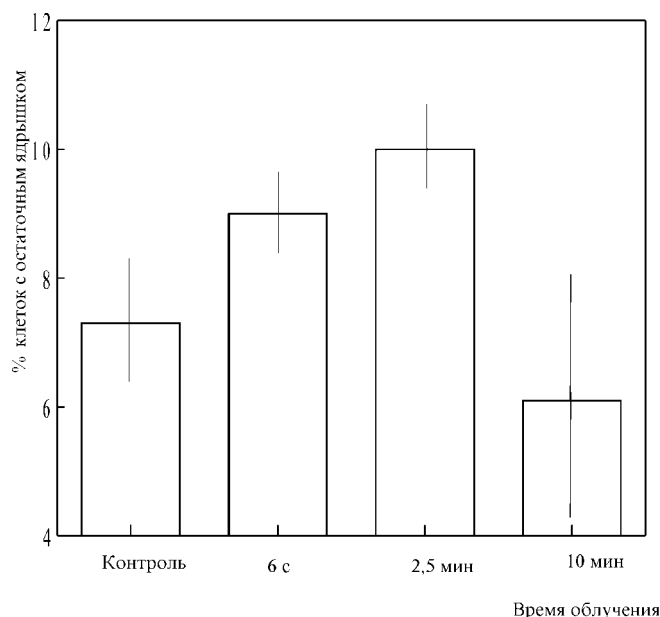
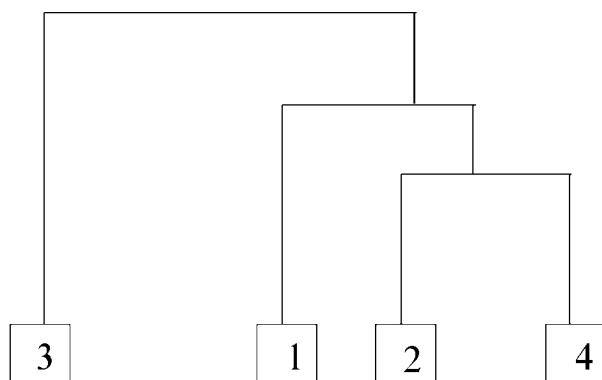


Рис. 3. Встречаемость остаточных ядрышек на стадии метафазы - телофазы митоза в клетках апикальной меристемы проростков семян дуба черешчатого, облученных электрическим полем

лофазы митоза по сравнению с контролем (рис. 3), при обработке в течение 2,5 минут отличия указанных характеристик от контроля достоверны. Остаточные ядрышки появляются в результате ослабления связи ДНК-белок во время митоза, когда хромосома максимально спирализована. Ранее они были обнаружены в клетках проростков дуба черешчатого из района 30 км зоны Чернобыльской АЭС и из экологически "чистого" района в пике митотической активности (Butorina et al., 1997; Калаев, 2000). При 10-минутной обработке встречаемость остаточных ядрышек ниже контрольного, однако различия не достоверны, что свидетельствует о незначительном влиянии указанной экспозиции на цитогенетические показатели семенного потомства дуба черешчатого.

Кластерный анализ цитогенетических показателей выявил, что наиболее близкое расстояние отмечается между опытными образцами при обработке в течение 6 с и 10 минут (рис. 4). Они образуют единый кластер. Контроль занимает промежуточное положение между указанными экспозициями и временем обработки 2,5 минуты. Т.о., можно утверждать, что наиболее близки по совокупности цитогенетических реакций экспозиции электрического поля в течение 6 с и 10 минут, т.е. при воздействии электрическим полем возникают нелинейные биологические эффекты. Зависимость степени поражения генетического материала носит волнообразный характер (с увеличением времени экспозиции эффект нарастает, а затем, при



Обозначения:

- 1 - контроль;
- 2 - облучение электрическим полем в течение 6 с;
- 3 - облучение электрическим полем в течение 2,5 мин;
- 4 - облучение электрическим полем в течение 10 мин.

Рис. 4. Дендрограмма кластерных расстояний различных экспозиций электрическим полем, определенных по цитогенетическим эффектам, наблюдаемым у облученного семенного потомства дуба черешчатого

дальнейшем увеличении времени воздействия, цитогенетические эффекты резко уменьшаются). Установлено критическое время воздействия электрическим полем (2,5 минуты), когда биологический эффект от него максимален.

Опираясь на результаты экспериментов, можно предположить, что механизм воздействия электрического поля на генетический материал дуба черешчатого связан с нарушением взаимодействий типа белок-ДНК и белок-белок и изменением конформации полипептидных цепей в результате повреждения слабых водородных связей, что приводит к нарушению веретена деления и обуславливает деконденсацию хроматина в митотических хромосомах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Акопян Э.М.* Влияние различных типов ионизирующих излучений на возникновение хромосомных aberrаций у гороха. I. Пострадиационное восстановление // *Генетика*. – 1967. – Т. 3, № 5. – С. 45 – 51.
2. *Алов И. А.* Патология митоза // *Вестник АМН СССР*.-1965.- №11. -С. 58 – 66.
3. *Антипенко Е.Н., Ковешникова И.В.* Цитогенетические эффекты микроволн нетепловой интенсивности у млекопитающих // *Докл. АН СССР*. – 1987. – Т. 296, № 3. – С. 724 – 726.
4. *Брезицкая Н.В., Тимченко О.И.* К механизму цитогенетического действия электромагнитных излучений: роль окислительного стресса // *Радиационная биология. Радиоэкология*. – 2000. – Т. 40, вып. 2. – С. 149 – 153.

5. *Буторина А.К., Калаев В.Н., Вострикова Т.В., Мяжкова О.Е.* Цитогенетическая характеристика семенного потомства некоторых видов древесных растений в условиях антропогенного загрязнения г. Воронежа // *Цитология*. – 2000. – Т. 42, № 2. – С. 196 – 201.

6. *Буторина А.К., Калаев В.Н., Луняк А.И., Вахтель В.М.* Цитогенетический мониторинг в районах Брянской и Воронежской областей, подвергшихся воздействию аварии Чернобыльской АЭС // *Актуальные вопросы экологии и охраны природных экосистем южных и центральных регионов России: Материалы межресп. науч.-практ. конференции*. – Краснодар, 1996. – С. 166 – 167.

7. *Григорьев Ю.Г.* Отдаленные последствия биологического действия электромагнитных полей // *Радиационная биология. Радиоэкология*. – 2000. – Т. 40, вып. 2. – С. 217 – 225.

8. *Григорьев Ю.Г.* Человек в электромагнитном поле (ожидаемые эффекты и оценка опасности) // *Радиационная биология. Радиоэкология*. – 1997. – Т. 37, вып. 4. – С. 690 – 702.

9. *Дейнекина Т.А.* Влияние электромагнитных полей на кластогенез периферической крови человека // 2 съезд ВОГиС. – СПб., 2000. – Т. 2. – С. 153.

10. *Казанцева И.А.* Патология митоза в опухолях человека. – Новосибирск: Наука, 1981. – 114 с.

11. *Калаев В.Н.* Цитогенетический мониторинг загрязнения окружающей среды с использованием растительных тест-объектов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Воронеж, 2000. – 25 с.

12. *Колтовая Н.А.* Механизм checkpoint-контроля у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. – Пушкино: Препринт Пушкино, 2001. – 38 с.

13. *Кулаичев А.П.* Методы и средства анализа данных в операционной среде Windows. Stadia 6.0. – М.: Информатика и компьютеры, 1996. – 257 с.

14. *Левин М.Н., Битюцкая Л.А., Панкратьева Е.А., Саврасова О.А.* Стимулирование процессов прорастания семян воздействием импульсных электромагнитных полей // *Физические проблемы экологии: тез. докл 2 всеросс. науч. конф.* – М., 1999. – С. 108.

15. *Миронов А.Н.* Цитогенетические эффекты от воздействия ионизирующей радиации и импульсных электромагнитных полей на древесные растения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Воронеж, 2002. – 24 с.

16. *Молчанов М.М., Федоров М.Н., Чердаков М.Ю.* Лесополосы как естественные экраны для защиты от электромагнитного поля, создаваемого воздушными линиями электропередач // *Интеграция фундаментальной науки и высшего лесотехнического образования по проблемам ускоренного воспроизводства, использования и модификации древесины: матер.*

международ. научно-практич. конф. – Воронеж, 2000. – Т. 2. – С. 27 – 31.

17. *Новицкий Ю.И.* Действие магнитного поля на сухие семена некоторых злаковых // Собрание по изучению влияния магнитных полей на биологические объекты: тез. докл. – М., 1996. – С. 50.

18. *Серегина М.Т.* Эффективность использования физических факторов при предпосевной обработке картофеля // Электронная обработка материалов. – 1998. – № 1. – С. 67 – 70.

19. *Серегина М.Т., Павлова Н.А., Алимova З.И.* Биологическое действие магнитного поля на рост, развитие и продуктивность озимых культур // Электронная обработка материалов. – 1991. – № 1. – С. 67 – 71.

20. *Симаков Е.А.* О пострadiационном восстановлении цитогенетических повреждений в проростках семян разных форм картофеля // Радиобиология. – 1983. – Т. 23, вып. 5. – С. 703 – 706.

21. *Butorina A. K., Kalaev V.N.* Diversity of Cytological Characteristics in Oak Under Normal Conditions // Diversity and Adaptation in Oak Species. Proceedings of a conference of IUFRO Working Party 2.08.05 held Oct. 12-17, 1997, College of Agricultural Sciences, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, U.S.A. – Pennsylvania, 1998. – P. 46-48.

22. *Butorina A.K., Kosichenko N.E., Isakov Y.N.* et al. The effects of irradiation from the Chernobyl nuclear power plant accident on the cytogenetic behaviour and anatomy of trees // Cytogenetic studies of forest trees and shrub species. – Zagreb, 1997. – P. 211 – 226.