

УДК 576.7+537.876

## **ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ МИТОТИЧЕСКОГО ДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК И ЧАСТОТЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ХРОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ В МЕРИСТЕМЕ КОРНЕЙ ЛУКА ALLIUM CEPА ОТ ЧАСТОТЫ ВОЗДЕЙСТВУЮЩЕГО СВЧ-ИЗЛУЧЕНИЯ**

**Лаврский А.Ю., Лебединский И.А., Четанов Н.А., Кузаев А.Ф., Артамонова О.А.**

*ГОУ ВПО «Пермский государственный гуманитарно-педагогический университет», г. Пермь, Россия (614990, г. Пермь, ул. Сибирская, 24), e-mail: chetanov@yandex.ru*

На современном уровне технологического развития достаточно актуален вопрос воздействия СВЧ-излучения локальных источников и электромагнитного смога на биологические объекты. Согласно современным литературным данным, воздействия колебаний различных частот, модуляции и интенсивности дают весьма неоднозначные эффекты. Глубокое изучение механизмов взаимодействия периодических колебаний полей и живой клетки может способствовать снижению уровня негативного воздействия фактора ЭМИ на организм человека. В данной работе в качестве биологической тест-системы используется Allium-тест, подразумевающая учет митотической активности и частоты возникновения хромосомных aberrаций в меристеме корня лука Allium cepa. Для оценки влияния излучения на модельный объект используется экспериментальная установка, обеспечивающая постоянство факторов среды при серии экспериментов, а также экранирование тестового объекта от внешнего фона электромагнитных излучений. Методика эксперимента обеспечивает облучение меристемы корня, при экранировании остальных частей растения, для предотвращения комплексного влияния на ростовые процессы. В результате исследований установлено угнетающее влияние излучений на митотическую активность, а также значительное мутагенное действие ЭМИ с частотами в диапазоне 800–1860 МГц.

Ключевые слова: Allium-тест, меристема, митотический индекс, хромосомные aberrации, мутагенный фактор, ЭМИ, митоз, ана-телофазный метод.

## **DEPENDENCE OF THE RATE MITOTIC CELL DIVISION AND FREQUENCY OF CHROMOSOME ABERRATIONS IN ROOT MERISTEM ALLIUM CEPА ON THE FREQUENCY OF THE MICROWAVE-RADIATION**

**Lavrskij A.J., Lebedinskij I.A., Chetanov N.A., Kuzaev A.F., Artamonova O.A.**

*Perm State Humanitarian Pedagogical University, Perm, Russia (614990, Perm, Sibirskaya str., 24), e-mail: chetanov@yandex.ru*

At the current level of technology is quite pressing question of the impact of local sources of microwave radiation and electromagnetic smog on biological objects. According to current literature the effect of fluctuations of different frequencies, modulation and intensity give a very ambiguous effects. A deep study of the mechanisms of interaction of periodic oscillations of the fields and living cells may help to reduce the negative impact factor of EMR on the human body. In this paper, the biological test systems used Allium test involves taking into account the mitotic activity and the frequency of chromosomal aberrations in the root meristem of onion Allium cepa. To assess the effect of radiation on the model object of the experimental setup used, ensure consistent environmental factors in a series of experiments, as well as the screening test object on the external background electromagnetic radiation. The experimental procedure provides exposure of the root meristem, the shielding of the remaining parts of the plant to prevent the combined effect on the growth processes. The studies found inhibitory effect of radiation on the mitotic activity, and a significant mutagenic effect of EMR with frequencies in the range of 800-1860 MHz.

Ke ywords: Allium test, meristem, mitotic index, chromosomal aberrations, mutagenic factor, EMR, mitosis, ana-telophase method.

Фактор электромагнитного смога влияет на различные организмы, но в большей степени, без сомнения, на человека. Вероятно, ни один современный житель города не может представить своё существование без средств мобильной связи, таким образом, добровольно подвергая себя воздействию электромагнитных излучений. Большинство современных

технологий беспроводной связи используют частоты в единицы гигагерц, работают в дециметровом диапазоне (300 МГц - 3 ГГц), а последние модели пользовательских точек доступа WI-fi в сантиметровом (5150-5350 МГц и 5650-6425 МГц).

По мнению ряда авторов, естественный электромагнитный фон является одним из факторов эволюционного процесса, но существенно не угнетает жизнедеятельность организмов [2]. Спектр искусственных источников СВЧ-излучений, в отличие от фона, имеет области со значительной интенсивностью, кроме того, направленные источники колебаний в случае человека нередко находятся в непосредственной близости от живых тканей. Эукариотическая клетка, растительная или животная, представляет собой сложнейшую систему из электрически-неоднородных элементов, областей концентрации зарядов, с динамическим равновесием ионов, характерным для ее нормальной жизнедеятельности, либо того или иного функционального состояния [1].

Именно клетка, содержащая ядро, представляется наиболее чувствительной к высокочастотным колебаниям из-за относительно больших размеров и значительно большей протяженности заряженных мембранных структур по сравнению с прокариотами. Эти факты говорят в пользу предположения, что взаимодействия клетки с периодическими колебаниями электрического и магнитного полей могут не ограничиваться исключительно температурным эффектом, т.е. поглощением энергии радиоволн с преобразованием в тепловую, что подтверждается работами ряда исследователей [4].

Воздействия ЭМИ различной амплитуды, частот и при разной экспозиции могут приводить к неоднозначным эффектам, служить как слабым стимулирующим, так и мутагенным и митотоксическим фактором [5; 7; 9].

Для глубокого понимания внутриклеточных процессов, вызываемых воздействием высокочастотных электромагнитных колебаний, необходимо выявить области спектра, имеющие наибольший отклик на биологических тест-системах. Данные подобных исследований представляют несомненный интерес с точки зрения биологии, кроме того, могут послужить в пользу сокращения влияния патогенных факторов индустриальной среды на здоровье человека.

Наиболее доступной биологической тест-системой для оценки стрессового влияния факторов является *Allium-test*. Эта тест-система имеет ряд преимуществ перед другими, в том числе растительными. Высокая скорость смены клеточных поколений в корневой меристеме лука *Allium cepa* обеспечивает достаточную чувствительность и сравнительно быструю реакцию на воздействующий фактор, которая проявляется в изменении скорости роста корней, а, следовательно, и деления клеток [8]. Методика имеет такие достоинства, как высокая скорость оценки, доступность материалов и хорошая корреляция с результатами

исследований на клеточных культурах других представителей эукариот [6; 8; 10]. Данный тест позволяет выявлять митотоксическое либо стимулирующее действие фактора, сказывающееся на скорости деления клеток меристемы корня и митотическом индексе MI (%) – отношении числа клеток в различных фазах митоза к общему числу клеток [4; 7]. Кроме того, данная методика позволяет учитывать количество хромосомных aberrаций, являющихся результатом мутагенного воздействия фактора, при помощи ана-телофазного метода. Хромосомные aberrации, возникающие при митотических делениях, как правило, довольно типичны и поддаются учету на давленных препаратах меристем, окрашенных красителями, специфичными к хроматину [8]. Частота возникновения aberrаций ХА (%) выражается как отношение aberrантных митозов в анафазе и телофазе к общей сумме клеток, зафиксированных в этих фазах.

Цель данной работы – поиск зависимости частоты возникновения хромосомных aberrаций в клетках корневой меристемы лука *Allium cepa* от частоты воздействующего СВЧ-излучения.

### **Методика**

Для замеров исходного уровня мощности служил телефон E-Ten glofiish – X500, работающий в диапазонах GSM 850, GSM 900, GSM 1800, GSM 1900, с возможностью их ручного переключения. Уровень мощности излучения замерялся с помощью анализатора спектра на расстоянии 1 см от антенны телефона как в режиме разговора (прием + передача), так и в экранированной камере с минимальным качеством связи и принудительным переключением диапазонов. Показатель SAR (*Specific Absorption Rate*) для упомянутой модели телефона составляет 0,74 Вт/кг, что соответствует передатчику стандарта GSM среднего уровня мощности.

С помощью устройства-эмулятора имитировался источник излучений равной мощности, но различных частот.

В качестве источника исходного сигнала использовался генератор РГШ-3000, разработанный ООО «Радий-ТН», работающий в диапазоне 1-3000 МГц, имеющий возможности программного аттенюатора и модуляции сигнала. Сигнал с генератора поступал на усилитель на основе микросхемы GSM-передатчика SKY77325 и регулировался с помощью анализатора спектра до нужного уровня для корректировки неравномерности АЧХ выходного тракта эмулятора.

Для анализа воздействия электромагнитных колебаний на делящиеся клетки меристемы корня лука *Allium cepa* были предприняты меры по стабилизации других факторов среды, которые потенциально могли бы внести ошибку в результаты измерений.

Жидкая среда, на которой проращивались луковицы во всех опытах и контроле, термостатировалась при температуре 25 °С. Из-за неоднозначного влияния искусственных составов в качестве среды для проращивания для всей серии опытов применялась разово закупленная природная артезианская вода с известным и сбалансированным ионным составом.

Для равномерного облучения корней 10-12 луковиц лука сорта Штутгартен-ризен диаметром 15-18 мм проращивались в прямоугольной пластиковой кювете объемом 1270 мл, в узкой канавке из пищевого пластика, образованной стенкой кюветы и прямоугольной вставкой. В верхней части канавка расширялась, позволяя донцам луковиц свободно погружаться в раствор. Образованная полость толщиной 3 мм нижней и боковыми краями сообщалась с объемом кюветы, таким образом, корни располагались веерообразно, не контактируя ни с чем в толще раствора концевыми участками, что предотвращает влияния механических контактов на корневой прирост.

Луковицы снизу экранировались от области облучения сеткой из нержавеющей стали с ячейкой 1 мм, расположенной сразу под донцами, через которую корни проходили в кювету, по бокам и сверху - кожухом из фольгированного пенополиэтилена с вентиляционными отверстиями. Эта мера направлена на предотвращение облучения апикальной меристемы луковиц и возможного изменения уровня фитогормонов, влияющих на рост корней.

Излучатель электромагнитных колебаний, помещенный в гидроизоляционный чехол, располагался вдоль всей боковой стенки кюветы, и представлял собой антенну, выполненную на полоске стеклотекстолита с подключенным экранированным кабелем.

Такая конструкция позволяет равномерно облучать исследуемый материал, измеряя амплитуду воздействующих колебаний в разных участках зоны прорастания с помощью анализатора спектра с предварительно откалиброванной шкалой. Размещение образцов в непосредственной близости от излучателя позволяет облучать большее их количество с равномерной мощностью. Вся конструкция помещалась в экранированный заземленный металлический кожух, воздух в который подавался микрокомпрессором со скоростью 2,3 л/мин.

Исходя из того что клеточный цикл лука *Allium cepa* составляет, по данным разных авторов, 14-17,8 ч [1; 3], был определен 18-часовой период облучения.

После облучения срезались концевые участки корней по 3-5 мм и фиксировались с помощью фиксатора Кларка, после чего окрашивались 2%-ным ацетоорсеином, с последующей обработкой в 45%-ной уксусной кислоте и переносом в 70%-ный этанол для длительного хранения [1; 3].

Для анализа давленных препаратов меристем использовался микроскоп Ломо-Микмед-6 при увеличении  $\times 400$  с CMOS-камерой EVS-5,17 mp. Проводился анализ 1000 клеток на 1 корень с последующим подсчетом митотического индекса и частоты хромосомных aberrаций с использованием MS Excel.

В результате данного исследования были выявлены статистически достоверные отличия между такими показателями, как митотический индекс (МИ) и количество хромосомных aberrаций (ХА) для контрольной выборки луковиц, проращиваемых в экранированном кожухе без излучения, и этими показателями для выборок, в течение 18 часов подвергавшихся воздействию ЭМИ различных частот.

Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1.

**Митотический индекс (МИ) и частота хромосомных aberrаций (ХА) в меристеме корня лука *Allium cepa* при воздействии СВЧ-излучения различных частот**

**( $n = 10, p < 0,05$ )**

частота, МГц	МИ, %	ХА, % Частота хромосомных aberrаций	<i>d</i>	<i>t</i>
контроль	$2,54 \pm 0,1302$	$6,03 \pm 2,4375$	-	-
660	$2,23 \pm 0,0658$	$19,95 \pm 3,9447$	13,92	3,00
800	$1,93 \pm 0,1495$	$31,31 \pm 6,2478$	25,28	3,77
930	$2,01 \pm 0,0956$	$36,95 \pm 8,8532$	30,92	3,37
1000	$2,38 \pm 0,1240$	$22,91 \pm 4,7527$	16,88	3,16
1110	$2,33 \pm 0,0709$	$37,47 \pm 7,9152$	31,44	3,80
1252	$2,46 \pm 0,1637$	$30,34 \pm 4,9626$	24,31	4,40
1853	$2,37 \pm 0,1128$	$27,03 \pm 2,8366$	21,00	5,62

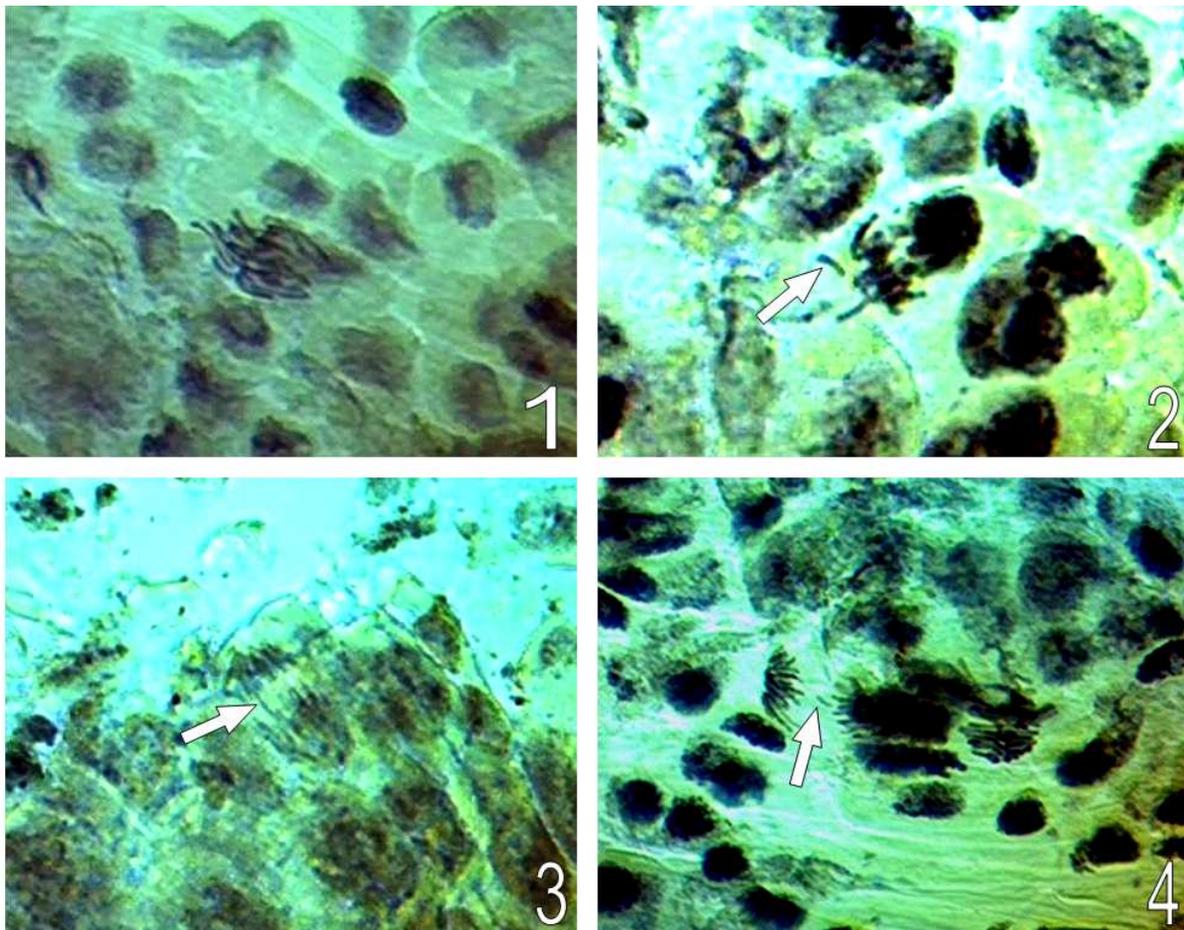


Рис 1. Фазы митоза и хромосомные aberrации (1 – нормальная метафаза; 2 – потеря хромосомы в анафаза; 3 – мост в анафаза; 4 – потеря хромосом в анафаза)

Наиболее распространенными оказались патологии типа «мост» - результат объединения хромосом разных дочерних клеток, а также фрагменты, наблюдаемые, как правило, в анафаза, и потери целых хромосом при расхождении. Некоторые типы наблюдаемых хромосомных aberrаций в анафаза митоза представлены на рис. 1.

На основании полученных данных можно сделать некоторые предварительные выводы.

1. На всех использованных в эксперименте частотах ЭМИ установлено достоверное отличие по частоте возникновения хромосомных aberrаций между контрольной и экспериментальной выборками, что говорит о мутагенном воздействии этого фактора.
2. Контроль имеет собственную фоновую частоту возникновения aberrаций, несмотря на тщательную изоляцию контрольной выборки от внешних воздействий и стабилизацию факторов среды. Это может быть обусловлено различными причинами как биологического характера, так и несовершенством экспериментальной установки.
3. Наибольшее число aberrаций зафиксировано при частотах 930 МГц и 1100 МГц. По всей видимости, наименьшим мутагенным эффектом при одинаковой мощности обладает излучение на частоте 660 МГц.

4. Перечисленные пики мутагенной активности в диапазоне исследованных частот не соответствуют частотам, демонстрирующим наибольший митотоксический эффект, что может быть вызвано разными причинами, такими как воздействие колебаний на различные внутриклеточные структуры с разными последствиями.

*Работа выполнена в рамках программы стратегического развития Пермского государственного гуманитарно-педагогического университета ПСР/НИР-15.*

### Список литературы

1. Алов И.А. Цитофизиология и патология митоза. – М. : Медицина, 1972. – 263 с.
2. Девятков Н.Д., Голант М.Б., Бецкий О.В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности. – М. : Радио и связь, 1991. – 169 с.
3. Дмитриева С.А., Минибаева Ф.В., Гордон Л.Х. Митотический индекс меристематических клеток и рост корней гороха *Pisum sativum* при действии модуляторов инозитольного цикла // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 6. – С. 475-479.
4. Иванов В.Б. Клеточные основы роста растений. – М. : Наука, 1974. – 231 с.
5. Коваленко О.И., Кивва Ф.В., Литвин В.В. Модификация биологической активности семян пшеницы низкоинтенсивным электромагнитным воздействием // Вестник КДПУ. – 2007. – № 6. – С. 47.
6. Левина А.А., Трушин М.В., Ратушняк А.А. Растительные тест-системы в оценке состояния окружающей среды // Сборник научных трудов Sworld по материалам международной научно-практической конференции. – 2012. – Т. 28, № 2. – С. 50-54.
7. Песня Д.С., Романовский А.В., Прохорова И.М., Артемова Т.К., Ковалева М.И., Фомичева А.Н., Кондакова Е.С., Халюто К.М., Вакорин С.А. Исследование мутагенного эффекта модулированного УВЧ-излучения сотовых телефонов на растительных и животных организмах *in vivo* // Доклады IV Всероссийской научно-технической конференции «Радиолокация и радиосвязь». – М. : Изд. JRE – ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН, 2010. – С. 924-929.
8. Прохорова И.М. Растительные тест-системы для оценки мутагенов / сост. И.М. Прохорова. – Ярославль : ЯрГУ, 1988. – 13 с.
9. Pesnya Dmitry S., Romanovsky Anton V. Comparison of cytotoxic and genotoxic effects of plutonium-239 alpha particles and mobile phone GSM 900 radiation in the *Allium cepa* test // Mutation Research. – 750 (2013). – P. 27– 33.
10. Tedesco S.B., Laughinghouse H.D. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test // Environmental Contamination. – 2012. – P. 137.

### Рецензенты:

Золотухин Игорь Александрович, доктор технических наук, профессор кафедры ботаники, Пермский государственный гуманитарно-педагогический университет, г. Пермь.

Шураков Аркадий Иванович, доктор биологических наук, профессор кафедры зоологии, Пермский государственный гуманитарно-педагогический университет, г. Пермь.