

ШЕЙКА М.Н.✉, СТРАШНЮК В.Ю.

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина,
Украина, 61022, г. Харьков, пл. Свободы, 4

✉ mari.sheyka25@gmail.com, volodymyr.strashnyuk@gmail.com, (067) 947-83-50, (097) 565-61-74

ПУФОВАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ У *DROSOPHILA MELANOGASTER* MEIG. ПРИ ДЕЙСТВИИ МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Цель. Целью работы было исследовать влияние микроволнового излучения различной интенсивности на пуфовую активность политенных хромосом в слюнных железах личинок *Drosophila melanogaster* Meig. **Методы.** В работе использовали аутбредную линию дикого типа *Oregon-R*. Применяли микроволновое излучение с частотой 36,64 ГГц и плотностью мощности 0,1 и 1 Вт/м². Воздействие производили в раннем эмбриогенезе после 3-часовой яйцекладки, время экспозиции составляло 30 с. На давленных ацетоорсеиновых препаратах слюнных желез личинок исследовали размеры пуфов: 2B5-6 (X-хромосома); 62E, 71CE и 72CD (хромосома 3L). Измерения проводили с помощью окуляр-микрометра. **Результаты.** Существенных изменений в размерах пуфов ни в одном из четырех изученных локусов не выявлено, независимо от примененной плотности мощности. **Выводы.** Микроволновое излучение в раннем эмбриогенезе при частоте 36,64 ГГц, плотности мощности 0,1 и 1 Вт/м² и экспозиции 30 с не оказывает значимого влияния на размеры пуфов в политенных хромосомах дрозофилы.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster* Meig., гигантские хромосомы, размеры пуфов, неионизирующее излучение.

В последние десятилетия наблюдается возрастание уровня электромагнитных полей (ЭМП) техногенного происхождения как на производстве, так и в быту, что заставляет говорить о новом экологическом факторе – электромагнитном загрязнении окружающей среды. В связи с этим приобрело актуальность изучение воздействия ЭМП на живые объекты. В частности, на это обращает внимание Всемирная организация здравоохранения [1].

Действие ЭМП на биологические объекты изучено недостаточно. Данные о механизмах такого влияния ограничены [2]. Если говорить о генетических эффектах электромагнитных полей, то в литературе рассматривается их воз-

можное влияние на мутационный процесс и модифицирующее действие на генную экспрессию [3].

Удобным объектом для визуального изучения генной активности являются пуфы политенных хромосом двукрылых насекомых (*Diptera*) [4]. Пуфы являются районами хромосом, в которых гены находятся в активном состоянии. Разрыхление материала диска и формирование из него специфического вздутия – пуфа является морфологическим проявлением активирования гена и коррелирует с определенным состоянием дифференцировки. Каждая стадия развития личинки или предкуколки характеризуется определенным набором активных генов, а следовательно и крупных пуфов. В ходе развития эти наборы закономерно сменяют друг друга [4, 5].

Политенные хромосомы считаются важнейшими объектами для анализа многочисленных особенностей интерфазной хромосомной организации и генома в целом [6, 7]. Согласно Ashburner [4], политенные хромосомы представляют собой систему, в которой дифференциальная активность генов и ее контроль могут анализироваться непосредственно на уровне генов. Размеры пуфов коррелируют с уровнем транскрипции, о чем свидетельствуют данные радиоавтографии [8].

Целью работы было изучить влияние микроволнового облучения различной интенсивности на пуфовую активность политенных хромосом в слюнных железах личинок *Drosophila melanogaster* Meig.

Материалы и методы

В работе использовали аутбредную линию дикого типа *Oregon-R Drosophila melanogaster* из коллекции кафедры генетики и цитологии Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина. Мух выращивали на стандартной сахарно-дрожжевой питательной среде при температуре 24,0 ± 0,5°C. Культуры дрозо-

филы развивались в стаканчиках объемом 60 мл. Объем питательной среды в каждом стаканчике составлял 10 мл.

Источником КВЧ-излучения служил излучатель микроволнового диапазона, разработанный на основе диода Гана и сконструированный на кафедре теоретической радиофизики Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина (автор и разработчик – В.Н. Быков). Устройство генерирует ЭМП с частотой 36,64 ГГц.

Плотность мощности излучения задавали расположением объекта на определенном расстоянии от источника. Использовали два варианта плотности: 0,1 и 1 Вт/м², экспозиция составляла 30 сек. Облучение производили в раннем эмбриогенезе. Воздействовали на свежееотложенные яйца дрозофилы, полученные от 5–6-дневных мух после короткой 3-часовой яйцекладки. Самки откладывали яйца на поверхность питательной среды. Сразу после этого их подвергали воздействию микроволн.

Политенные хромосомы исследовали на давленных ацетоорсеиновых препаратах слюнных желез личинок. Для приготовления препаратов использовали самок на стадии блуждающей личинки, в конце 3-го возраста. Паттерн пуфов в этом периоде развития изменяется под влиянием гормона линьки экдистерона [4, 5]. В то же время ряд пуфов сохраняет свою активность на протяжении всего периода экдизонной индукции. В частности, такими являются

пуфы 2B5-6 (X-хромосома); 62E, 71CE и 72CD (хромосома 3L) [7], которые мы выбрали для исследования (рис. 1).

Препараты анализировали с помощью светового микроскопа при увеличении $\times 400$. Локализацию пуфов проводили по уточненным картам Бриджеса [9]. Размеры пуфов соотносили с размерами близлежащего диска, не вовлеченного в процесс пуфирования (1F, 62C, 71A). Мерой пуфовой активности служило отношение пуф/диск: 2B5-6/1F, 62E/62C, 71CE/71A, 72CD/71A.

Было проанализировано по 5 препаратов, на каждом из них исследовали по четыре – пять ядер. Измерения производили с помощью окуляр-микрометра. Всего для каждого из пуфов проведено 20–25 измерений.

Проведен статистический анализ данных. Данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки. Для сравнения размеров пуфов в разных вариантах опыта использовали *t*-критерий Стьюдента [10].

Результаты и обсуждение

Данные о размерах пуфов политенных хромосом в норме и после микроволнового облучения представлены на рис. 2. Мы не обнаружили существенных изменений в размерах пуфов ни в одном из четырех изученных локусов, независимо от того, какая применялась плотность мощности: 0,1, или 1 Вт/м².

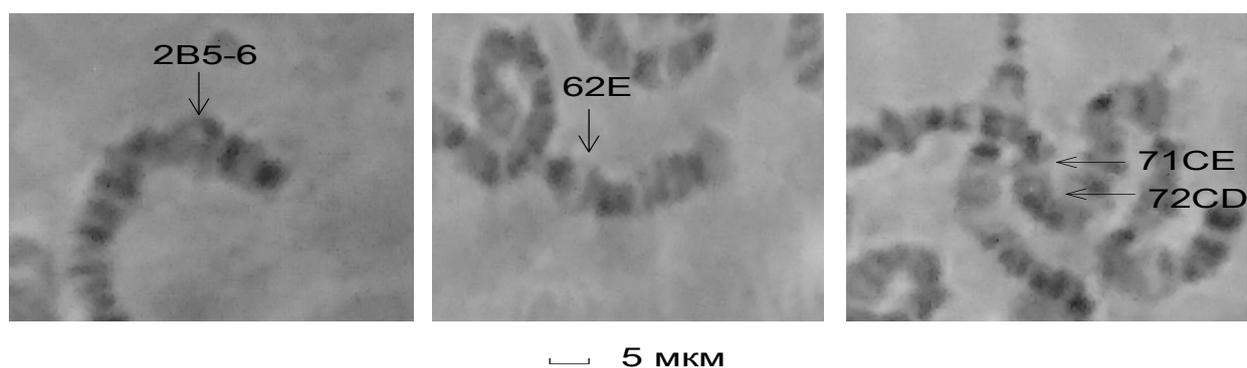


Рис. 1. Пуфы политенных хромосом: 2B5-6 (X-хромосома), 62E, 71CE, 72CD (хромосома 3L); окрашивание ацетоорсеином, увеличение $\times 400$.

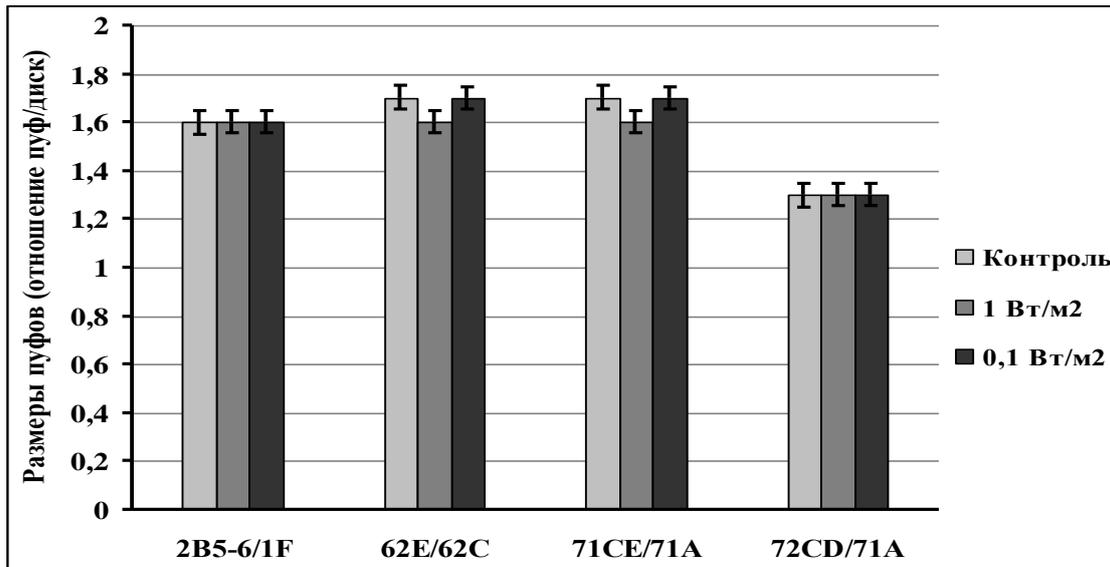


Рис. 2. Размеры пухов политенных хромосом в норме и после микроволнового излучения в линии *Oregon-R Drosophila melanogaster*.

Полученные нами данные несколько отличаются от результатов работы [11], авторы которой исследовали влияние на пуфовую активность у *D. melanogaster* микроволн такой же частоты – 36,64 ГГц с плотностью мощности 0,4 Вт/м² и экспозицией 10 сек. В исследовании использовали инбредную линию *Canton-S*. Облучали яйца дрозофилы после двухчасовой яйцекладки. Размеры пухов изучали в восьми локусах: 21F, 22C, 23E (хромосома 2L), 63F, 71CE, 72CD (хромосома 3L); 82EF, 83E (хромосома 3R). В трех из этих локусов (71CE, 82EF и 83E) авторы обнаружили угнетение пуфовой активности. В остальных пяти локусах активность пухов не отличалась от контрольных значений. Авторы также выявили увеличение частоты доминантных летелей и снижение количества потомков имаго после облучения мух родительского поколения.

Однако в работе [12] была выявлена повышенная активность пуффинга в гигантских хромосомах *Drosophila melanogaster*, вызванная микроволновым излучением с частотой 2,45 ГГц, мощностью 200 Вт при экспозиции 90 с. Облучению подвергали личинок в возрасте 72 ч. В то же время после 60 с экспозиции различия с контролем были незначительны. Авторы также обнаружили повышенный уровень мутаций после облучения, а также суточную задержку в развитии при мощности микроволн 200 Вт.

Существует довольно обширный материал о биологических эффектах электромагнитных полей у дрозофилы, в том числе об их гене-

тических последствиях. Многие авторы отмечают, что результаты, полученные разными группами исследователей, часто противоречивы [2, 13, 14]. Это может быть объяснено различиями в частотных характеристиках поля, разной плотностью мощности, экспозицией, стадией развития организмов, на которой проводилось воздействие. Клетки разного генотипа и на разных стадиях дифференцировки обнаруживают различные реакции на одни и те же ЭМП. В частности, в работе [13] говорится о том, что инбредные формы проявляют большую чувствительность к действию ЭМП.

В нашей работе мы использовали аутбредную линию *Oregon-R*. По ряду признаков ее реакция на действие ЭМП отличалась от инбредной линии *Canton-S*. В частности, мы не обнаружили изменений по количеству потомков имаго после облучения мух родительского поколения микроволнами при плотностях мощности 0,01; 0,1 и 1 Вт/м². При интенсивности 1 Вт/м² частота ДЛМ в нашем эксперименте снизилась в 5 раз по сравнению с контролем [14].

Одним из оснований для изучения активности пухов послужили данные ряда авторов о влиянии ЭМП на продолжительность предимагинального развития у дрозофилы. С приведенными выше данными Tomomura et al. [12] согласуются результаты работы [15], в которой личинок *D. melanogaster* подвергали воздействию ЭМП 10 ГГц непрерывно (3 ч, 4 ч и 5 ч) и прерывисто (экспозиция 3 часа + 30-минутный ин-

тервал + 3 часа экспозиции). Оценивали время перехода от личинок к куколке и от куколок к имаго. Был сделан вывод, что ЭМП может вызывать задержку развития и уменьшить количество потомков у дрозофилы.

В работе [16] изучали последствия КВЧ-облучения в линиях *D. melanogaster*, несущих мутацию *black*. Излучение с частотой 37,7 ГГц и мощностью 10 мкВт (экспозиция 1 и 5 мин) и 100 мкВт (экспозиция 1 мин) применяли на стадии эмбриогенеза, после 2-часовой яйцекладки. Авторы отмечают задержку предимагинального развития при мощности 10 мкВт и ускорение при 100 мкВт.

В развитии дрозофилы наблюдаются закономерные изменения паттернов пуфовой активности [4, 5]. Учитывая данные о влиянии ЭМП на динамику развития, можно ожидать, что при определенных условиях облучения, вызывающих замедление или ускорение развития, активность пуфирования также может подвергаться модификациям. Некоторым авторам удалось зафиксировать подобные изменения. Однако в нашем исследовании мы этого не обнаружили.

В целом следует отметить, что в изучении биологических эффектов ЭМП хромосомный уровень исследований представлен весьма ограниченным числом работ. В уже упоминавшейся работе Tonomura et al. [12] в слюнных железах личинок 3-го возраста наблюдали асинопсис хромосомных плеч, разрыхление эухроматина после 90 с облучения при мощности микроволн 200 Вт, а также после 5 с при мощности 500 Вт

(частота 2,45 ГГц). Одним из наиболее важных последствий микроволнового облучения авторы считают индукцию полиплоидии в зародышевых клетках дрозофилы.

Снижение частоты спонтанного асинопсиса после микроволнового облучения частотой 36,64 ГГц при плотности мощности 1 Вт/м² и экспозиции 30 с наблюдали в работе [17]. При совместном воздействии микроволн и постоянного магнитного поля напряженностью 25 мТл (5 мин экспозиции) эффект усиливался.

В работе [18] было показано, что микроволновое облучение на стадии эмбриогенеза (частота 36,64 ГГц, плотность мощности 1 Вт/м², экспозиция 30 с) оказывает стимулирующее влияние на эндоредупликацию в онтогенезе дрозофилы: в слюнных железах 0-часовых предкуколок степень полипloidии хромосом увеличивалась.

Данные приведенных выше работ свидетельствуют о том, что микроволновое излучение при определенных условиях способно оказывать влияние на структуру и функционирование полипloidных хромосом.

Выводы

Микроволновое излучение в раннем эмбриогенезе при частоте 36,64 ГГц, плотности мощности 0,1 и 1 Вт/м² и экспозиции 30 с не оказывает значимого влияния на размеры пуфов 2B5-6 (X-хромосома); 62E, 71CE и 72CD (хромосома 3L) в полипloidных хромосомах личинок линии дикого типа *Oregon-R Drosophila melanogaster*.

Литература

1. WHO/International Agency for Research on Cancer (IARC). 2011. Press Release N° 208, 31 May.
2. Shckorbatov Y. The main approaches of studying the mechanisms of action of artificial electromagnetic fields on cell. *J. Electr. Electron. Syst.* 2014. Vol. 3 (2). P. 123. doi: 10.4172/2332-0796.1000123.
3. Крюков В.И. Генетические эффекты электромагнитных полей. *Вестник новых медицинских технологий.* 2000. Т. 7, № 2. С. 8–13.
4. Ashburner M. Puffs, genes, and hormones revisited. *Cell.* 1990. Vol. 61. P. 1–3.
5. Richards G., Ashburner M. Insect hormones and the regulation of genetic activity. *Biol. Develop.* 1984. Vol. 34 B. P. 215–253.
6. Zhimulev I.F., Belyaeva E.S., Semeshin V.F., Koryakov D.E., Demakov S.A., Demakova O.V., Pokholkova G.V., Andreyeva E.N. Polytene chromosomes: 70 years in genetic research. *Int. Rev. Cytol.* 2004. Vol. 241. P. 203–275.
7. Жимулёв И.Ф. Хромомерная организация полипloidных хромосом. Новосибирск: ВО «Наука». Сибирская издательская фирма, 1994. 565 с.
8. Pelling G. Chromosomal synthesis of ribonucleic acid as shown by incorporation of uridine labelled with tritium. *Nature.* 1959. Vol. 184. P. 655–656.
9. Lindsley D.L., Grell E.H. Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Inst. Wash. Publ., 1968. № 627. 472 p.
10. Атраментова Л.О., Утевська О.М. Статистика для біологів. Харків: Видавництво «НТМТ», 2014. 331 с.
11. Shakina L.A., Pasiuga V.N., Dumin O.M., Shckorbatov Yu.G. Effects of microwaves on the puffing pattern of *D. melanogaster*. *Cent. Eur. J. Biol.* 2011. Vol. 6 (4). P. 524–530.
12. Tonomura Y., Shima T., Kimura K. Effects of microwaves on *Drosophila*. Part 2. *Science Reports of Tokyo Woman's Christian Univrsity.* 1992. Vol. 42. P. 1159–1175.

13. Шкорбатов Ю.Г., Шахбазов В.Г. Влияние микроволнового облучения на биологические объекты. *Радиофизика и электроника*. 2000. Т. 5, № 1. С. 179–185.
14. Дика Л.Д., Страшнюк В.Ю., Шкорбатов Ю.Г. Компоненти пристосованості у *Drosophila melanogaster* за впливу мікрохвильового опромінювання. *Вісник Харківського нац. ун-ту імені В.Н. Каразіна. Серія «Біологія»*. 2016. № 26. С. 65–73.
15. Atli E., Unlü H. The effects of microwave frequency electromagnetic fields on the development of *Drosophila melanogaster*. *Int. Journ. Radiat. Biol.* 2006. Vol. 82. P. 435–441.
16. Горенская О.В., Шкорбатов Ю.Г., Гаврилов А.Б. Особенности адаптивного ответа крайневысокочастотного облучения линий *Drosophila melanogaster*, несущих мутацию *black*. *Вісник Харківського нац. ун-ту імені В.Н. Каразіна. Серія «Біологія»*. 2016. № 26. С. 108–116.
17. Dyka L.D., Shakina L.A., Strashnyuk V.Yu. Peculiarities of homologous conjugation of polytene chromosomes after exposure to microwaves and static magnetic field in *Drosophila melanogaster* Meig. *Вісник Харківського нац. ун-ту імені В.Н. Каразіна. Серія «Біологія»*. 2017. Вип. 29. С. 41–48.
18. Dyka L.D., Shakina L.A., Strashnyuk V.Yu., Shckorbatov Yu.G. Effects of 36,6 GHz and static magnetic field on degree of endoreduplication in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Inter. J. Radiat. Biol.* 2016. Vol. 92. P. 222–227. doi: 10.3109/09553002.2016.1137105.

References

1. WHO/International Agency for Research on Cancer (IARC). 2011. Press Release N° 208, 31 May.
2. Shckorbatov Y. The main approaches of studying the mechanisms of action of artificial electromagnetic fields on cell. *J. Electr. Electron. Syst.* 2014. Vol. 3 (2): 123. doi: 10.4172/2332-0796.1000123.
3. Kryukov V.I. Genetic effects of electromagnetic fields. *Journal of New Medical Technologies*. 2000. Vol. 7, No. 2. P. 8–13.
4. Ashburner M. Puffs, genes, and hormones revisited. *Cell*. 1990. Vol. 61. P. 1–3.
5. Richards G., Ashburner M. Insect hormones and the regulation of genetic activity. *Biol. Develop.* 1984. Vol. 34 B. P. 215–253.
6. Zhimulev I.F., Belyaeva E.S., Semeshin V.F., Koryakov D.E., Demakov S.A., Demakova O.V., Pokholkova G.V., Andreyeva E.N. Polytene chromosomes: 70 years in genetic research. *Int. Rev. Cytol.* 2004. Vol. 241. P. 203–275.
7. Zhimulev I.F. Chromomeric organization of polytene chromosomes. Novosibirsk: "Nauka". Siberian Publishing Company, 1994. 565 p.
8. Pelling G. Chromosomal synthesis of ribonucleic acid as shown by incorporation of uridine labelled with tritium. *Nature*. 1959. Vol. 184. P. 655–656.
9. Lindsley D.L., Grell E.H. Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Inst. Wash. Publ., 1968. № 627. 472 p.
10. Atramentova L.A., Utevskaia O.M. Statistics for biologists. Kharkiv: NTMT Publishing House, 2014. 331 p.
11. Shakina L.A., Pasiuga V.N., Dumin O.M., Shckorbatov Yu.G. Effects of microwaves on the puffing pattern of *D. melanogaster*. *Cent. Eur. J. Biol.* 2011. Vol. 6 (4). P. 524–530.
12. Tonomura Y., Shima T., Kimura K. Effects of microwaves on *Drosophila*. Part 2. *Science Reports of Tokyo Woman's Christian Univrsity*. 1992. Vol. 42. P. 1159–1175.
13. Shckorbatov Yu.G., Shakhbazov V.G. Influence of microwave irradiation on biological objects. *Radiophysics and Electronics*. 2000. Vol. 5, No. 1. P. 179–185.
14. Dyka L.D., Strashnyuk V.Yu., Shckorbatov Yu.G. Fitness components in *Drosophila melanogaster* after the exposure to microwave radiation. *The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University Series: Biology*. 2016. Issue 26. P. 65–73.
15. Atli E., Unlü H. The effects of microwave frequency electromagnetic fields on the development of *Drosophila melanogaster*. *Int. Journ. Radiat. Biol.* 2006. Vol. 82. P. 435–441.
16. Gorenskaya V.O., Shckorbatov Y.G., Gavrilov A.B. Features of the adaptive response to the short-term influence of microwave radiation in *Drosophila melanogaster* stocks with *black* mutation. *The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University Series: biology*. 2016. Issue 26. P. 108–116.
17. Dyka L.D., Shakina L.A., Strashnyuk V.Yu. Peculiarities of homologous conjugation of polytene chromosomes after exposure to microwaves and static magnetic field in *Drosophila melanogaster* Meig. *Вісник Харківського нац. ун-ту імені В.Н. Каразіна. Серія «Біологія»*. 2017. Вип. 29. С. 41–48.
18. Dyka L.D., Shakina L.A., Strashnyuk V.Yu., Shckorbatov Yu.G. Effects of 36,6 GHz and static magnetic field on degree of endoreduplication in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Inter. J. Radiat. Biol.* 2016. Vol. 92. P. 222–227. doi: 10.3109/09553002.2016.1137105.

SHEYKA M.N., STRASHNYUK V.Yu.

V.N. Karazin National University of Kharkiv,

Ukraine, 61022, Kharkiv, Svoboda sq., 4, e-mail: mari.sheyka25@gmail.com, volodymyr.strashnyuk@gmail.com

PUFFING ACTIVITY IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* MEIG. POLYTENE CHROMOSOMES AFTER EXPOSURE TO MICROWAVE RADIATION

Aim. The aim of the work was to study the effect of microwave radiation of varying intensity on the polytene chromosomes puffing activity in larvae salivary glands of *Drosophila melanogaster*. **Methods.** The wild type outbred strain *Oregon-R* was used as the material. Microwave radiation with a frequency of 36.64 GHz and a power density of 0.1 and 1 W / m² was used. Exposure to microwaves was applied in early embryogenesis after 3-hour oviposition. Exposure time was 30 sec. The puff sizes were studied on the squashed preparations of larvae salivary glands stained

with acetoorcein. Dimensions of four puffs were investigated[^] 2B5-6 (X chromosome); 62E, 71CE and 72CD (chromosome 3L). The measurements were carried out using an ocular-micrometer. **Results.** There were no significant changes in the size of the puffs in any of the four loci studied, regardless of the applied power density. **Conclusions.** Microwave radiation in early embryogenesis at a frequency of 36.64 GHz, a power density of 0.1 and 1 W/m², and an exposure of 30 sec does not have a significant effect on the puff sizes in the *Drosophila* polytene chromosomes. **Keywords:** *Drosophila melanogaster* Meig., giant chromosomes, puff sizes, non-ionizing radiation.

ШЕЙКА М.М., СТРАШНЮК В.Ю.

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна,
Україна, 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4, e-mail: mari.sheyka25@gmail.com, volody-
myr.strashnyuk@gmail.com

ПУФОВА АКТИВНІСТЬ ПОЛІТЕННИХ ХРОМОСОМ У *DROSOPHILA MELANOGASTER* MEIG. ЗА МІКРОХВИЛЬОВОГО ОПРОМІНЮВАННЯ

Мета. Метою роботи було вивчити вплив мікрохвильового опромінювання різної інтенсивності на пуфову активність політенних хромосом у слинних залозах личинок *Drosophila melanogaster* Meig. **Методи.** У роботі використовували аутбредну лінію дикого типу *Oregon-R*. Застосовували мікрохвильове випромінювання з частотою 36,64 ГГц і щільністю потужності 0,1 і 1 Вт/м². Вплив здійснювали у ранньому ембріогенезі після 3-годинної яйцекладки, час експозиції становив 30 с. На давлених ацетоорсеїнових препаратах слинних залоз личинок досліджували розміри пуфів: 2B5-6 (X-хромосома); 62E, 71CE і 72CD (хромосома 3L). Вимірювання проводили за допомогою окуляр-мікрометра. **Результати.** Істотних змін у розмірах пуфів в жодному з чотирьох досліджених локусів не виявлено, незалежно від застосованої щільності потужності. **Висновки.** Мікрохвильове випромінювання в ранньому ембріогенезі за частоти 36,64 ГГц, щільності потужності 0,1 і 1 Вт/м² і експозиції 30 с не має суттєвого впливу на розміри пуфів у політенних хромосомах дрозофіли. **Ключові слова:** *Drosophila melanogaster* Meig., гігантські хромосоми, розміри пуфів, неіонізуюче випромінювання.