

ДИКА Л.Д., СТРАШНЮК В.Ю.✉

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна,
Україна, 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4, e-mail: lilya_dikaya@ukr.net
✉ volodymyr.strashnyuk@gmail.com, (068) 146-90-54, (067) 947-83-50

ВПЛИВ МІКРОХВИЛЬ НА ПРОЯВ ЕФЕКТУ ПОЛОЖЕННЯ ГЕНА МОЗАЇЧНОГО ТИПУ У *DROSOPHILA MELANOGASTER* MEIG.

Мета. Метою дослідження було вивчення впливу мікрохвильового опромінення різної інтенсивності на прояв мозаїчного ефекту положення гена (МЕПГ) у *Drosophila melanogaster* Meig. **Методи.** Експерименти проводилися на мутантній лінії $In(1)w^{m4}$, у. Застосовували мікрохвильове випромінювання з частотою 36,64 ГГц та щільністю потужності 0,01; 0,1 та 1 Вт/м². Вплив мікрохвиль здійснювали у ранньому ембріогенезі після 2-годинної яйцекладки. Час експозиції становив 30 с. МЕПГ досліджували в опромінених та неопромінених (контроль) мух. **Результати.** У самок мікрохвильове опромінення за щільності потужності 1 Вт/м² призвело до посилення інактивації гена $white^+$, перенесеного до прицентромерного гетерохроматину в Х-хромосомі. Ефект не був виявлений за інтенсивності опромінення 0,01 і 0,1 Вт/м². У самців спостерігали супресію генетичної інактивації за щільності потужності 0,01 Вт/м². **Висновки.** Мікрохвильове опромінення здатне впливати на розмір гетерохроматинових блоків, що викликають сайленсінг генів за МЕПГ. Ефект залежить від статі та інтенсивності випромінювання.
Ключові слова: *Drosophila melanogaster* Meig., ефект положення гена, гетерохроматин, сайленсінг генів, неіонізуюче випромінювання.

Дія електромагнітних полів (ЕМП) на біологічні об'єкти інтенсивно досліджується у зв'язку з проблемою електромагнітного забруднення середовища. Джерелами ЕМП антропогенного походження є лінії електропередач, засоби комунікації (мобільні телефони, радіотехніка), радарні установки, побутова електротехніка тощо. ЕМП застосовуються на виробництві та в медицині.

Електромагнітне опромінення може мати негативні наслідки для організму. Допускається можлива канцерогенна дія електромагнітних

хвиль за перевищення допустимих нормативів. Всесвітня організація охорони здоров'я вважає вирішення цієї проблеми одним із найважливіших наукових завдань [1, 2].

Сучасний рівень знань про біологічну дію ЕМП є недостатнім. Механізми і закономірності цих процесів поки що не пізнані. Серед можливих генетичних наслідків дії ЕМП на організми розглядаються дві категорії ефектів: індукція різних генетичних порушень за одних режимів впливу та модифікування генної експресії за інших [3].

Одним із чинників, що впливає на експресію генів, є компактизація геному внаслідок гетерохроматизації [4, 5]. Проявом впливу гетерохроматизації на генну активність є, зокрема, ефект положення гена мозаїчного типу. Мозаїчна інактивація генів відбувається внаслідок їх перенесення у ділянку хромосоми, багату на гетерохроматин. Сучасні уявлення про механізми генетичної інактивації за ефекту положення обговорюються в роботах [6, 7].

Метою роботи було дослідити вплив мікрохвильового опромінювання різної інтенсивності на прояв ефекту положення гена мозаїчного типу у *Drosophila melanogaster* Meig.

Матеріали і методи

У роботі використовували мутантну лінію $In(1)white^{motted4}$, $yellow$ ($In(1)w^{m4}$, у) *Drosophila melanogaster*, отриману з колекції Bloomington *Drosophila* Stock Center, Indiana University (США). Мутація w^{m4} проявляється у порушенні пігментації частини очних фасеток, спричиненої інактивацією гена $white^+$ (w^+), перенесеного внаслідок інверсії в межі прицентромерного гетерохроматину Х-хромосоми [6], за даними Купера [8], – у район, розташований на дистальній межі ядерцевого організатора. Експресивність ознаки варіює залежно від частки клітин, у яких відбувається інактивація гена w^+ , що у нормі

контролює розвиток червоної пігментації очей (рис. 1).

Мух вирощували на стандартному цукрово-дріжджовому живильному середовищі за температури $24,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Культури дрозофіли розвивалися в стаканчиках об'ємом 60 мл. Обсяг живильного середовища в кожному стаканчику становив 10 мл.

Джерелом НВЧ-випромінювання служив випромінювач мікрохвильового діапазону, розроблений і сконструйований на кафедрі теоретичної радіофізики Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна на основі діода Гана (автор і розробник В.Н. Биков). Цей пристрій генерує ЕМП з частотою 36,64 ГГц. Використовували три варіанти щільності: 0,01; 0,1 і 1 Вт/м^2 , експозиція становила 30 секунд. Опромінювали яйця дрозофіли, відкладені на свіже живильне середовище групою самок у віці 5–6 діб за 3 години.

Після вильоту імаго розділяли на 4 класи за ступенем порушень пігментації очних фасеток: 1 – пігментація порушена у менш ніж 25% фасеток; 2 – в 25–50%; 3 – в 50–75%; 4 – більше ніж у 75% фасеток. Враховували частку особин кожного класу в контролі та після опромінювання. Окремо вели облік досліджуваного ефекту в лівому і правому оці.

Дослідження проводили сліпим методом, варіанти досліду були зашифровані до кінця експерименту. Проведено три повторності досліду. В кожному варіанті досліджено від 57 до 90 мух.

Зроблено статистичний аналіз даних. Для порівняння розподілів у різних варіантах досліду застосовували F -критерій Фішера з використанням ϕ -перетворення часток [9]. Для оцінки значущості впливу мікрохвиль на прояв ефекту положення гена, враховуючи множинні порів-

няння з контролем, застосовували поправку Бонферроні. Відмінності вважалися значущими за $p \leq 0,017$.

Результати та обговорення

Дані про прояв мозаїчного ефекту положення гена в контролі та за впливу мікрохвиль різної щільності потужності представлені на рисунку 2. Частка незабарвлених очних фасеток у самців була значно вищою, ніж у самок. Різниця, вочевидь, пов'язана з гемізіготністю Х-зчепленої ознаки у самців. Це дає можливість оцінювати стан гетерохроматину індивідуально в кожній Х-хромосомі. У самок має місце взаємодія генів двох Х-хромосом. Для того, щоб мозаїчна інактивація гена проявилася у фенотипі, потрібно, щоб вона відбулася в кожній з двох Х-хромосом.

Отримані дані свідчать про відсутність асиметрії за лівим і правим оком як у контролі, так і в дослідних варіантах. Це стосується як самок, так і самців. Враховуючи це, подальші порівняння дослідних груп із контролем проводили, об'єднавши дані для лівого і правого ока. Результати представлені в таблиці.

У самок за щільності потужності 0,01 і $0,1 \text{ Вт/м}^2$ значущого впливу мікрохвильового випромінювання не виявлено. За інтенсивності фактора 1 Вт/м^2 спостерігали значуще зменшення частки мух із мінімальною часткою незабарвлених очних фасеток (1-й клас, до 25% фасеток) – у середньому на 9,4%. Водночас частка особин 3-го класу, у яких були незабарвлені більше 50% очних фасеток, була у 8,2 раза більшою, ніж у контролі. В сумі частка мух, у яких пігментація була відсутня більш ніж у 25% фасеток ока, була у 2,3 раза вищою за контрольні значення.

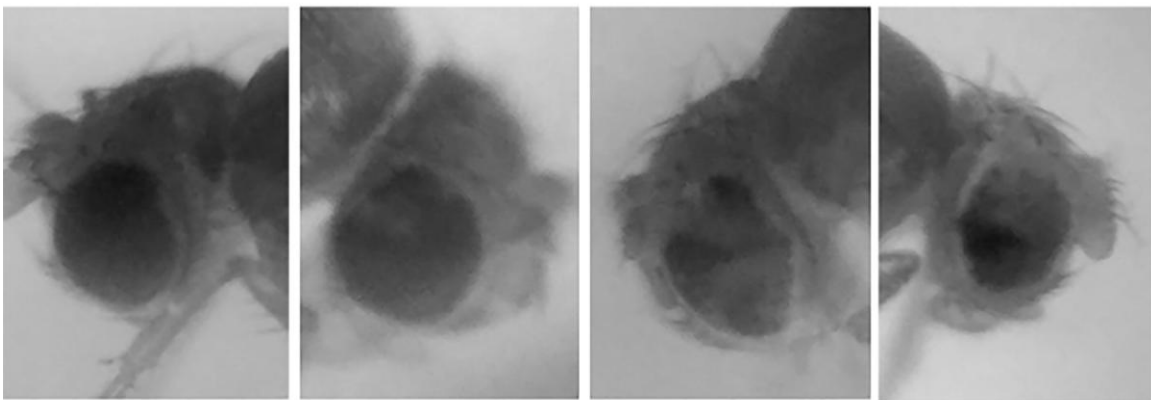


Рис. 1. Варіювання ознаки w^{m4} в лінії $In(1)w^{m4}$, у *Drosophila melanogaster*.

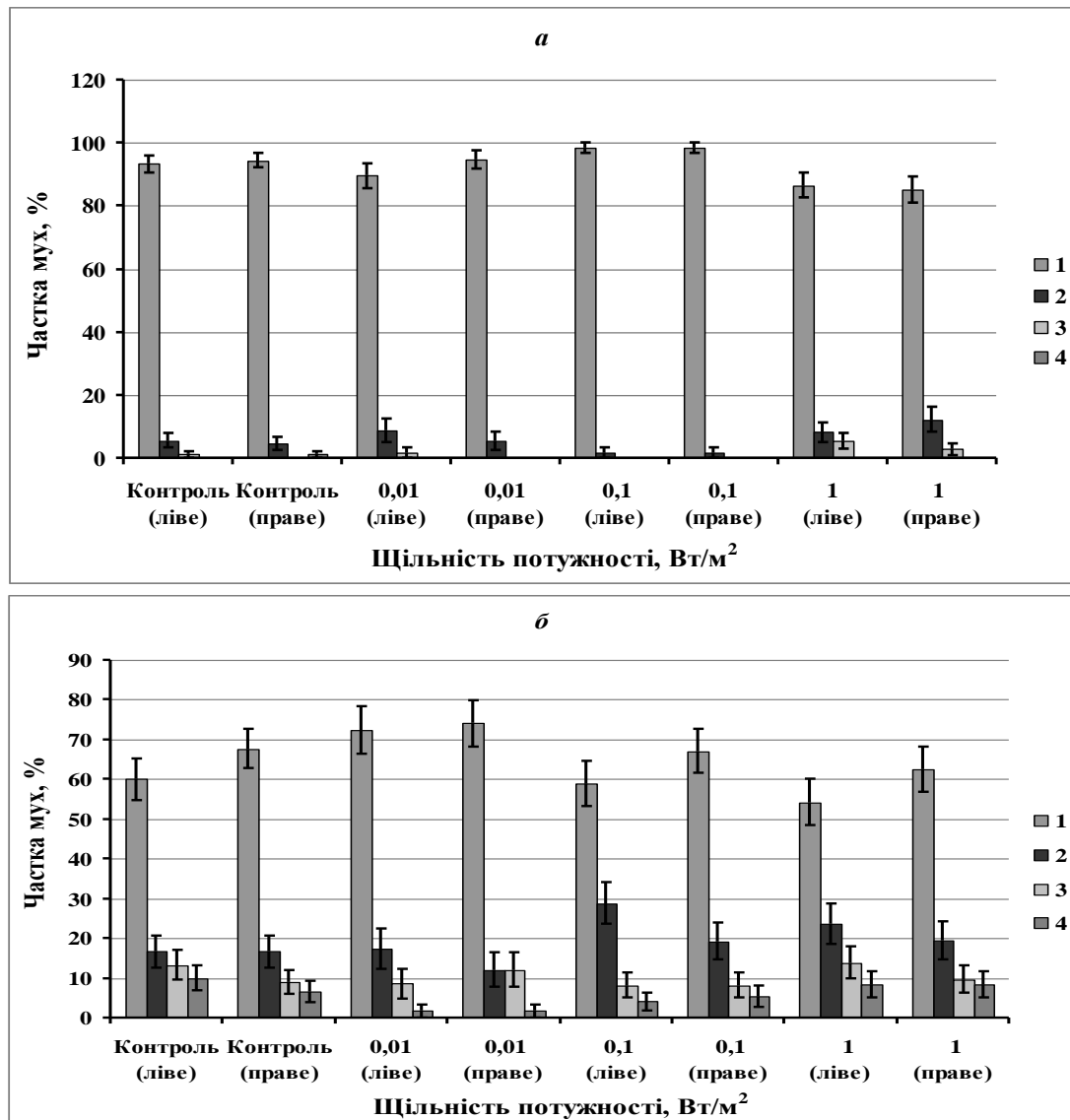


Рис. 2. Розподіл мух із різним проявом ефекту положення гена мозаїчного типу за впливу мікрохвильового опромінювання в лінії *In(1)w^{m4}*, у *Drosophila melanogaster*: (а) – самки, (б) – самці; (ліве) – ліве око, (праве) – праве око; 1–4 – класи мух із різною часткою незабарвлених очних фасеток.

Таким чином, за щільності потужності мікрохвиль 1 Вт/м² у самок спостерігали підвищений рівень мозаїчної інактивації гена *w⁺*, перенесеного до гетерохроматинової ділянки в лінії *In(1)w^{m4}*, у *D. melanogaster*. Це свідчить про збільшення розмірів гетерохроматинових блоків в Х-хромосомі у самок дрозофіли за мікрохвильового опромінювання такої інтенсивності.

У самців, незважаючи на більшу варіабельність мозаїчної інактивації гена, суттєвого впливу мікрохвиль за щільності потужності 0,1 і 1 Вт/м² не спостерігали. За щільності потужності 0,01 Вт/м² мало місце зниження відсотка мух із максимальною кількістю незабарвлених фасеток ока (понад 75% фасеток, 4-й клас). Частка

таких мух була в 4,9 раза меншою, ніж у контролі. Таким чином, у цьому випадку відбувалося зменшення розмірів гетерохроматинових ділянок в Х-хромосомі самців.

Ефект положення гена мозаїчного типу був відкритий у 1930 році Г.Дж. Мюллером [10]. Після рентгенівського опромінювання вчений спостерігав незвичний фенотип із варіюванням очей мух, у яких одні фасетки були червоні, а інші – білі. Подальші дослідження політеничних хромосом показали, що такий фенотип є результатом перенесення гена *white⁺* в межі прицентромерного гетерохроматину внаслідок інверсії.

Таблиця. Розподіл мух із різним проявом ефекту положення гена мозаїчного типу за впливу мікрохвильового опромінювання в лінії $In(1)w^{m4}$, у *Drosophila melanogaster* (об'єднані дані)

Стать	Класи мух	Щільність потужності випромінювання			
		Контроль	0,01 Вт/м ²	0,1 Вт/м ²	1 Вт/м ²
♀	1	93,9 ± 1,8	92,1 ± 2,5	98,3 ± 1,2	85,8 ± 2,9**
	2	5,1 ± 1,6	7,0 ± 2,4	1,7 ± 1,2	10,1 ± 2,5
	3	0,5 ± 0,5	0,9 ± 0,9	0	4,1 ± 1,6*
	4	0,5 ± 0,5	0	0	0
♂	1	63,8 ± 3,6	73,3 ± 4,1	63,0 ± 4,0	58,3 ± 4,1
	2	16,7 ± 2,8	14,7 ± 3,3	24,0 ± 3,5	21,6 ± 3,4
	3	11,1 ± 2,3	10,3 ± 2,8	8,2 ± 1,2	11,8 ± 2,7
	4	8,4 ± 2,1	1,7 ± 1,2**	4,8 ± 1,8	8,3 ± 2,3

Примітка. Відмінності від контролю значущі за * $p < 0,017$, ** $p < 0,01$.

За мозаїчного ефекту положення в одних клітинах ген зберігає свою активність, а в інших інактивується, тобто, має місце мозаїчна інактивація гена. На рівні морфологічної ознаки ефект проявляється в тому, що частина клітин має нормальний фенотип, а інша частина – мутантний. За ступенем прояву мутантної ознаки можна судити про частку клітин, у яких відбулася інактивація гена.

Структура гена за мозаїчного ефекту положення не порушується. Ген стає транскрипційно неактивним внаслідок компактизації, що ініціюється в особливих центрах гетерохроматину і розповсюджується на ділянку розташування гена, що інактивується. У цьому процесі беруть участь складні білкові комплекси, що змінюють стан компактизації хроматину. Згідно з гіпотезою Тартофа [11], розповсюдження хвилі гетерохроматизації на еухроматинові ділянки хромосом відбувається через розрив ДНК внаслідок хромосомної перебудови і порушення природного кордону між еу- та гетерохроматином. У результаті ген потрапляє в сферу дії ініціації компактизації всередині гетерохроматинного домену.

За даними літератури, пенетрантність *white* варіювання в лініях w^{m4} є 100%, хоча ступінь варіювання може проявляти істотну індивідуальну мінливість. Інактивація гена *white* не впливає на життєздатність чи плодючість, про що свідчить багато дослідів із мухами, гомозиготними за мутацією w^{m4} [7].

Ступінь *white* варіювання може змінюватися за впливу як генетичних факторів, так і умов середовища. Серед генетичних чинників виділяють кілька десятків генів – енхансерів і супресорів генетичної інактивації. Генів-супресорів (пригнічувачів інактивації) нарахо-

вується в декілька разів більше, ніж енхансерів (посилувачів інактивації) [6]. Підвищення температури, за якої відбувається розвиток мух, з 25°C до 29°C спричиняє супресію ефекту (втраату інактивації), тоді як зниження температури до 18°C призводить до посилення сайленсінгу.

Візуальні спостереження політених хромосом личинок дрозофіли з хромосомною перебудовою показали, що ділянка, в якій розташований досліджуваний ген, упакована у щільний блок гетерохроматину лише в тих клітинах, в яких ген інактивований [12].

На думку Жимульова [6], явище мозаїчного ефекту положення гена представляє собою чудову модель для вивчення дії білків, що змінюють стан компактизації хроматину. В нашому випадку це зручна модель для дослідження дії електромагнітних полів на стан хроматину.

Раніше на хромосомному рівні було показано пригнічення пуфової активності гігантських хромосом дрозофіли за впливу мікрохвиль [13]. У певній мірі цей ефект компенсувався стимулюючим впливом мікрохвильового опромінення на ендоредуплікацію [14]. Результати цих досліджень узгоджуються з думкою про те, що електромагнітні чинники здатні впливати на рівень експресії генів.

Збільшення вмісту гранул гетерохроматину в клітинному ядрі за впливу мікрохвиль спостерігали під час дослідження клітин буккального епітелію людини [15]. Згідно зі Шкорбатовим [16], конденсація хроматину є однією із захисних реакцій на дію ЕМП, яка завжди реєструється безпосередньо після застосування ЕМП. На думку автора, дослідження молекулярних механізмів, що лежать в основі цієї реакції, можуть дати нову важливу інформацію про первинні механізми дії ЕМП на клітину.

Гетерохроматизація, імовірно, є проявом більш загальної реакції клітини на стрес, оскільки в щільно запакованому хроматині ДНК краще захищена від дії пошкоджувальних агентів. Сигналом для конформаційних перетворень хроматину можуть слугувати зміни іонного складу цитоплазми і каріоплазми, пов'язані зі змінами проникнення мембран, що спостерігаються за мікрохвильового опромінювання [17].

Висновки

У самок *D. melanogaster* мікрохвильове опромінювання у ранньому ембріогенезі (частота 36,64 ГГц, експозиція 30) за щільності потужності 1 Вт/м² спричиняє посилення мозаїчної

інактивації гена w^+ , перенесеного до прицентромерного гетерохроматину в лінії $In(1)w^{m4}$, у. Значного впливу мікрохвиль 0,01 та 0,1 Вт/м² не виявлено.

У самців мало місце зниження рівня генетичної інактивації за щільності потужності 0,01 Вт/м². Істотного впливу мікрохвиль 0,1 і 1 Вт/м² не спостерігали.

Отримані дані свідчать про здатність мікрохвиль впливати на розміри гетерохроматинових блоків, що спричиняють генетичну інактивацію мозаїчного типу у дрозофіли. Ефект залежить від статі та інтенсивності випромінювання.

Література

1. WHO International EMF Project. 1997. URL: www.who.int/entity/peh-emf/en (дата звернення: 21.02.2018).
2. WHO/International Agency for Research on Cancer (IARC). 2011. Press Release N° 208, 31 May.
3. Крюков В.И. Генетические эффекты электромагнитных полей. *Вестник новых медицинских технологий*. 2000. Т. 7, № 2. С. 8–13.
4. Прокофьева-Бельговская А.А. Гетерохроматические районы хромосом. М.: Наука, 1986. 431 с.
5. Weiler K., Wakimoto B. Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 1995. Vol. 29 (1). P. 577–605. doi: 10.1146/annurev.ge.29.120195.003045. PMID 8825487.
6. Жимулёв И.Ф. Мозаичный эффект положения гена. *Соросовский образовательный журнал*. 2001. Т. 7, № 1. С. 4–9.
7. Elgin S.C.R., Reuter G. Position-effect variegation, heterochromatin formation, and gene silencing in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013. Vol. 5 (8). a017780. doi: 10.1101/cshperspect.a017780.
8. Cooper K.W. Cytogenetic analysis of major heterochromatic elements (especially Xh and Y) in *Drosophila melanogaster* and the theory of "heterochromatin". *Chromosoma*. 1959. Vol. 10. P. 535–588.
9. Атраментова Л.О., Утевська О.М. Статистика для біологів. Харків: Видавництво «НТМТ», 2014. 331 с.
10. Muller H.J. Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *J. Genet.* 1930. Vol. 22. P. 299–334.
11. Tartof K.D., Bishop C., Jones M., Hobbs C.A., Locke J. Towards an understanding of position effect variegation. *Genesis*. 1989. Vol. 10 (3). P. 162–173.
12. Zhimulev I.F., Belyaeva E.S., Fomina O.V., Protopopov M.O., Bolshakov V.N. Cytogenetic and molecular aspects of position effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*. 1986. Vol. 94. P. 492–504.
13. 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.
14. 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.
15. Shckorbatov Yu.G., Pasiuga V.N., Kolchigin N.N., Grabina V.A., Batrakov D.O., Kalashnikov V.V., Ivanchenko D.D., Bykov V.N. The influence of differently polarised microwave radiation on chromatin in human cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 2009. Vol. 85 (4). P. 322–329.
16. 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.
17. Skamrova G.B., Lantushenko A.O., Shckorbatov Yu.G., Evstigneev M.P. Influence of mobile phone radiation on membrane permeability and chromatin state of human buccal epithelium cells. *Biochemistry and Biophysics*. 2013. Vol. 1 (2). P. 22–28.

References

1. WHO International EMF Project. 1997. URL: www.who.int/entity/peh-emf/en (Last accessed: 21.02.2018).
2. WHO/International Agency for Research on Cancer (IARC). 2011. Press Release N°208, 31 May.
3. Kryukov V.I. Genetic effects of electromagnetic fields. *Journal of New Medical Technologies*. 2000. Vol. 7, No 2. P. 8–13.
4. Prokofyeva-Belgovskaya A.A. Heterochromatic regions of chromosomes. Moscow: Nauka, 1986. 431 p.
5. Weiler K., Wakimoto B. Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 1995. Vol. 29 (1). P. 577–605. doi: 10.1146/annurev.ge.29.120195.003045. PMID 8825487.
6. Zhimulev I.F. Position effect variegation. *Soros Educational Journal*. 2001. Vol. 7, No. 1. P. 4–9.
7. Elgin S.C.R., Reuter G. Position-effect variegation, heterochromatin formation, and gene silencing in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013. Vol. 5 (8): a017780. doi: 10.1101/cshperspect.a017780.
8. Cooper K.W. Cytogenetic analysis of major heterochromatic elements (especially Xh and Y) in *Drosophila melanogaster* and the theory of "heterochromatin". *Chromosoma*. 1959. Vol. 10. P. 535–588.

9. Atramentova L.A., Utevskaia O.M. Statistics for biologists. Kharkiv: NTMT Publishing House, 2014. 331 p.
10. Muller H.J. Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *J. Genet.* 1930. Vol. 22. P. 299–334.
11. Tartof K.D., Bishop C., Jones M., Hobbs C.A., Locke J. Towards an understanding of position effect variegation. *Genesis*. 1989. Vol. 10 (3). P. 162–173.
12. Zhimulev I.F., Belyaeva E.S., Fomina O.V., Protopopov M.O., Bolshakov V.N. Cytogenetic and molecular aspects of position effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*. 1986. Vol. 94. P. 492–504.
13. 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.
14. 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.
15. Shckorbatov Yu.G., Pasiuga V.N., Kolchigin N.N., Grabina V.A., Batrakov D.O., Kalashnikov V.V., Ivanchenko D.D., Bykov V.N. The influence of differently polarised microwave radiation on chromatin in human cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 2009. Vol. 85 (4). P. 322–329.
16. 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.
17. Skamrova G.B., Lantushenko A.O., Shckorbatov Yu.G., Evstigneev M.P. Influence of mobile phone radiation on membrane permeability and chromatin state of human buccal epithelium cells. *Biochemistry and Biophysics*. 2013. Vol. 1 (2). P. 22–28.

DYKA L.D., STRASHNYUK V.Yu.

V.N. Karazin National University of Kharkiv,

Ukraine, 61022, Kharkiv, Svoboda sq., 4, e-mail: lilya_dikaya@ukr.net, volodymyr.strashnyuk@gmail.com

MICROWAVE INFLUENCE ON THE POSITION EFFECT VARIATION IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* MEIG.

Aim. The purpose of investigation was to study the effect of microwave irradiation of different intensity on the manifestation of the position effect variegation (PEV) in *Drosophila melanogaster* Meig. **Methods.** Experiments were carried out on mutant strain *In(1)w^{m4}*, y. Microwave radiation with frequency 36.64 GHz and power density 0.01; 0.1 and 1 W/m², was used. Exposure to microwaves was applied in early embryogenesis after 2-hour oviposition. Exposure time was 30 sec. PEV was examined in the irradiated and non-irradiated (control) flies. **Results.** In females, microwave irradiation at a power density of 1 W/m² led to an enhance in the inactivation of the *white*⁺ gene transferred into a vicinity of pericentric heterochromatin in the X-chromosome. No effect was detected by irradiation intensity of 0.01 and 0.1 W/m². In males, there was a suppression of genetic inactivation at a power density of 0.01 W/m². **Conclusions.** Microwave irradiation can affect the size of heterochromatin blocks that cause gene silencing in PEV. The effect depends on the sex and intensity of the radiation.

Keywords: *Drosophila melanogaster* Meig., position effect variegation, heterochromatin, gene silencing, non-ionising radiation.