

## ЭФФЕКТЫ ОБЛУЧЕНИЯ В НИЗКОИНТЕНСИВНОМ РАДИОЧАСТОТНОМ ПОЛЕ В УСЛОВИЯХ ГОЛОДАНИЯ НА ПРИМЕРЕ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

Устенко К.В.<sup>1</sup>, Ускалова Д.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»,  
[ksustenko@gmail.com](mailto:ksustenko@gmail.com)

<sup>2</sup>Обнинский институт атомной энергетики Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ» (ИАТЭ НИЯУ МИФИ), 249040 г. Обнинск, ул. Студгородок, д. 1

Выявлено, что облучение в НИ РЧ поле, непрерывно генерируемом с частотой 900 МГц и плотностью потока энергии 100 мкВт/см<sup>2</sup>, в пубертатный период развития голодающих ракообразных *D. magna*, оказывает значимое влияние на плодовитость, но не влияет на выживаемость. Рассматриваются возможные механизмы.

Ключевые слова: низкоинтенсивное радиочастотное излучение; выживаемость; плодовитость; цитотоксичность; пубертатный период; голодание; *Daphnia magna*.

## EFFECTS OF IRRADIATION IN A LOW-INTENSIVE RADIO-FREQUENCY FIELD UNDER HUNGER CONDITIONS BY THE EXAMPLE OF AN INVERTEBRATE ANIMALS

Ustenko K.V., Uskalova D.V.

Institute of Nuclear Power Engineering NRNU MEPHI, Studgorodok, 1, Obninsk, Kaluga reg., 249040, Russian Federation

It was found that chronic irradiation with a frequency of 900 MHz and an energy flux density of 100  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  during the development of *D. magna* crustaceans from 6 to 10 days under fasting conditions has a significant effect on overall fertility and metabolic activity, but does not affect survival.

Keywords: low-intensity radio frequency radiation; survival; fertility; cytotoxicity; puberty; starvation; *Daphnia magna*.

Современный этап развития технологий привел к появлению новых факторов, влияющих на биологические объекты и системы. Применяемые средства связи являются источниками излучения с характеристиками, не встречающимися в природе. Таким образом, актуальной проблемой радиобиологии становится изучение разных аспектов биологического действия неионизирующей радиации на представителей биоты.

За последнее десятилетие возросло количество публикаций, исследующих комбинированные эффекты воздействия на организмы природных и антропогенных факторов. Часто встречающимся биологическим стрессом является дефицит пищи, следовательно, важно определить устойчивость организмов к голоданию при различных условиях. Ряд исследований показал комбинированные эффекты воздействия температуры, химических веществ и других факторов на выживаемость и плодовитость низших ракообразных при различных пищевых режимах [Heugens, Tokkie, Kraak, 2006]. Тем не менее, комбинированные эффекты воздействия неионизирующего излучения в условиях ограничения пищевого режима, остаются недостаточно изученными.

В данной работе впервые исследованы комбинированный эффект радиочастотного облучения с параметрами, близкими к излучению базовых станций сотовой связи в пубертатный период онтогенеза беспозвоночных *Daphnia magna*, в условиях голодания животных.

В соответствии с [OECD, 2012] для работы были подготовлены партеногенетические поколения *D. magna*. Односуточных особей разделили на четыре группы: I – нормальный уровень корма (1,9 мгС/л), II – условие голодания (50% уровень от нормы (0,8 мгС/л), III – нормальный корм + облучение и IV – голодание + облучение. В качестве корма использовали суспензию зеленых водорослей *Chlorella vulgaris*. Пищевой режим в группах на протяжении всего опыта не менялся.

*D. magna* облучали в пубертатный период (с шестых по десятые сутки) на лабораторной установке, непрерывно генерирующей электромагнитное излучение с частотой  $900 \pm 100$  МГц и плотностью потока энергии (ППЭ)  $100 \text{ мкВт/см}^2$ . Во время эксперимента, исключая период облучения, дафний культивировали поодиночке в климатостате в 50 мл дважды фильтрованной водопроводной дехлорированной воды. Погибших и новорожденных *D. magna* учитывали и удаляли. Контрольные группы находились в тех же условиях, но без облучения.

Учет выживаемости и плодовитости проводили в трех последовательных поколениях до 21-суточного возраста в каждом. Для определения общей плодовитости были рассчитаны её компоненты: количество помётов на дафнию и число новорожденных на помёт. Цитотоксический эффект определяли по нарушению метаболической активности дафний. Для этого применяли стандартный колориметрический МТТ-метод, основанный на способности митохондриальных дегидрогеназ восстанавливать бесцветный тетразолий до окрашенного фармазана, с модификациями [Ускалова, 2018; Савина и др., 2018.]. Клетки с низким уровнем метаболизма слабо восстанавливают МТТ, поэтому оптическая плотность анализируемых клеточных суспензий будет ниже, чем у активно пролиферирующих клеток. МТТ-метод применяется для оценки цитотоксичности противоопухолевых препаратов *in vitro*. Тест проводили на 4-х суточных дафниях для всех групп.

Статистический анализ проведен с использованием критериев Крускал-Уоллиса,  $\chi^2$  и двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA.

Анализ выживших к 21 суткам особей не выявил значимых отличий между облученными и контрольными группами при оптимальном и недостаточном количестве пищи. Сравнение контрольных групп показало, что рацион питания существенно не влияет на выживаемость как облучённых, так и не облученных дафний.

Было обнаружено, что уровень пищи значимо влияет на плодовитость дафний. Облучение оказывает значимое влияние как на общую плодовитость (общее число потомков), так и на размер помета во всех группах. Аналогичные результаты были получены другими авторами. В исследовании [Guinee, Gardner, Howard, 2007] было показано, что в условиях ограниченных пищевых ресурсов водяные блохи обычно производят меньше потомства по количеству, но крупнее по размеру. В нашем исследовании, среднее количество потомства на дафнию показало высокую корреляцию с уровнем питания в группах. Значимое снижение плодовитости было выявлено в группах контроля и у облученных дафний при недостаточном количестве пищи. Так же, облучение *D. magna* приводит к значимым эффектам снижения плодовитости в первом, и втором пострадиационных поколениях. Анализ ANOVA показал, что облучение и

трофические условия независимо влияли на общую плодовитость, так как все условия взаимодействия не были значительными.

МТТ-тестом был обнаружен значимый токсический эффект облучения дафний в пубертатный период. Известно, что в этот период у ракообразных формируются эмбрионы. Таким образом, при облучении с 6 по 10 сутки, электромагнитное воздействие было оказано также на половые клетки формирующихся эмбрионов. Полученные нами данные по облучению дафний в условиях голодания согласуются с данными, полученные при исследовании действия гербицида пропанила на выживаемость *D. magna* [Pereira, Mendes, Goncalves, 2007].

Известно, что воздействие НИ РЧ поля увеличивает чувствительность *D. magna* к другим факторам, например, к действию кадмия [Гапочка, Гапочка, Дрожжина и др., 2012]. Однако, результаты нашего исследования показали, что хроническое облучения в НИ РЧ полем в условиях голодания независимо влияют на показатели жизнеспособности ракообразных.

#### *Литература*

1. Guinnee M.A., Gardner A., Howard A.E., West S.A., Little T.J. The causes and consequences of variation in offspring size: a case study using *Daphnia* // Journal of evolutionary biology, 2007. P. 577-87.
2. Neugens E.H.W., Tokkie L.T.B., Kraak M. H.S, Hendriks J.A., Van Straalen Nico M., Admiraal W. Population growth of *Daphnia magna* under multiple stress conditions: joint effects of temperature, food, and cadmium // Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 25, No. 5, 2006. P. 1399–1407.
3. OECD, 2012. Organisation for Economic Co-operation and Development. In: Test No 202: *Daphnia* Sp. Acute Immobilisation Test. OECD Publishing, Paris.
4. Pereira J.L., Mendes C. D., Goncalves F. Short- and long-term responses of *Daphnia* spp. to propanil exposures in distinct food supply scenarios // Ecotoxicology and Environmental Safety 68, 2007. P. 386–396.
5. Гапочка Л.Д., Гапочка М.Г., Дрожжина Т.С., Исакова Е.Ф., Павлова А.С., Шавырина О.Б. Эффекты облучения культуры *Daphnia magna* на разных стадиях развития электромагнитным полем миллиметрового диапазона низкой интенсивности // Вестник московского университета. Серия 16. Биология, 2012. № 2. С. 43-48.
6. Савина Н.Б., Ускалова Д.В., Сарапульцева Е.И. Использование МТТ-теста для изучения отдаленных эффектов острого  $\gamma$ -облучения у ракообразных *Daphnia magna*// Радиация и риск, 2018. Т. 27, №1. С. 86 – 93
7. Ускалова Д.В., Влияние низкоинтенсивного радиочастотного излучения на морфо-функциональные показатели у простейших и беспозвоночных животных// Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук, – Обнинск, 2018 – 137 с

Всероссийская конференция

Актуальные проблемы радиобиологии и гигиены неионизирующих излучений

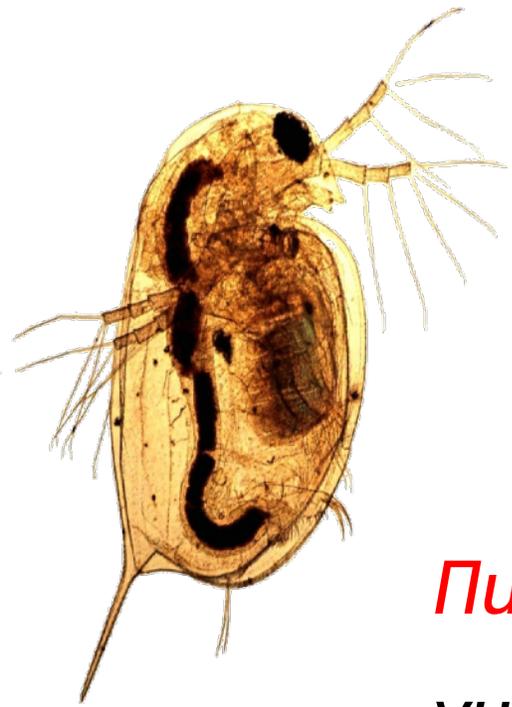
ЭФФЕКТЫ ОБЛУЧЕНИЯ В  
НИЗКОИНТЕНСИВНОМ РЧ ПОЛЕ В  
УСЛОВИЯХ ГОЛОДАНИЯ НА ПРИМЕРЕ  
*Daphnia magna*

Устенко К.В.<sup>1</sup> Ускалова Д.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>НИЯУ МИФИ <sup>2</sup>ИАТЭ НИЯУ МИФИ



## Объект исследования



Низшие ветвистоусые ракообразные *Daphnia magna*

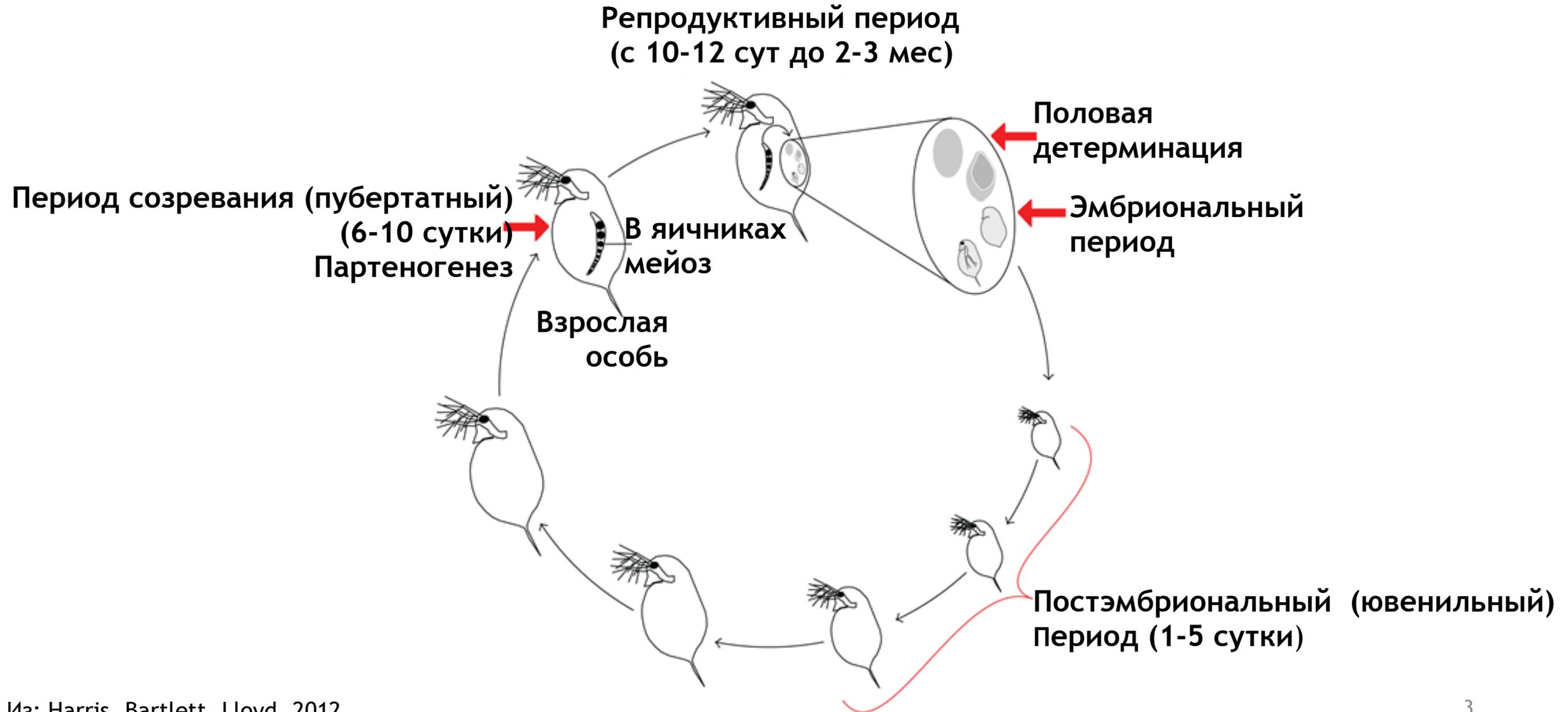
**Питание:** зеленые одноклеточные водоросли *Chlorella vulgaris*, фильтрующий тип

**Продолжительность жизни:** 2 - 3 месяца

**Плодовитость:** 10 - 40 особей на самку каждые 3 - 4 сут

**Размер :** новорожденные 0,2 - 0,5 мм, взрослые 2,2 - 2,5 мм

# Жизненный цикл *Daphnia magna*



# Цель исследования

Анализ эффектов хронического радиочастотного облучения ракообразных *Daphnia magna* в ювенильный период онтогенеза по изменению **выживаемости**, **плодовитости**, **размеров тела** и **метаболической активности** в условиях голодания

## Установка для облучения в радиочастотном поле



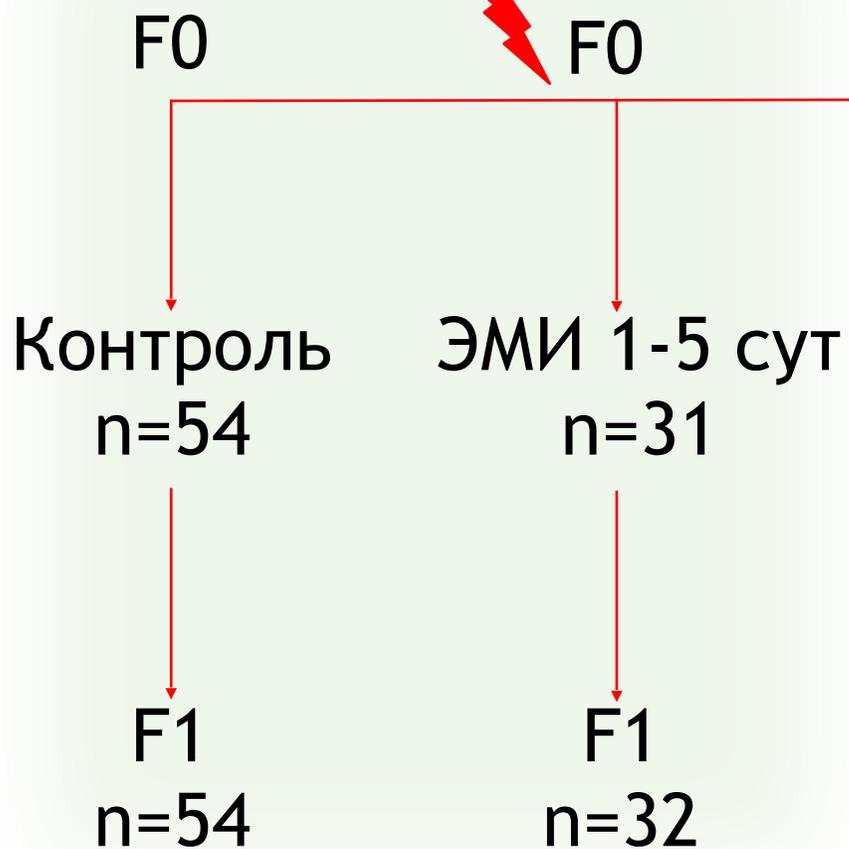
Генератор Р2-52  
непрерывное ЭМП  
частота 900 МГц, ППЭ 100 мкВт/  
см<sup>2</sup>



Антенна в виде рупора  
 $S=25 \times 25$  см

# Схема эксперимента

пища 100% (1,9 мгС\л)

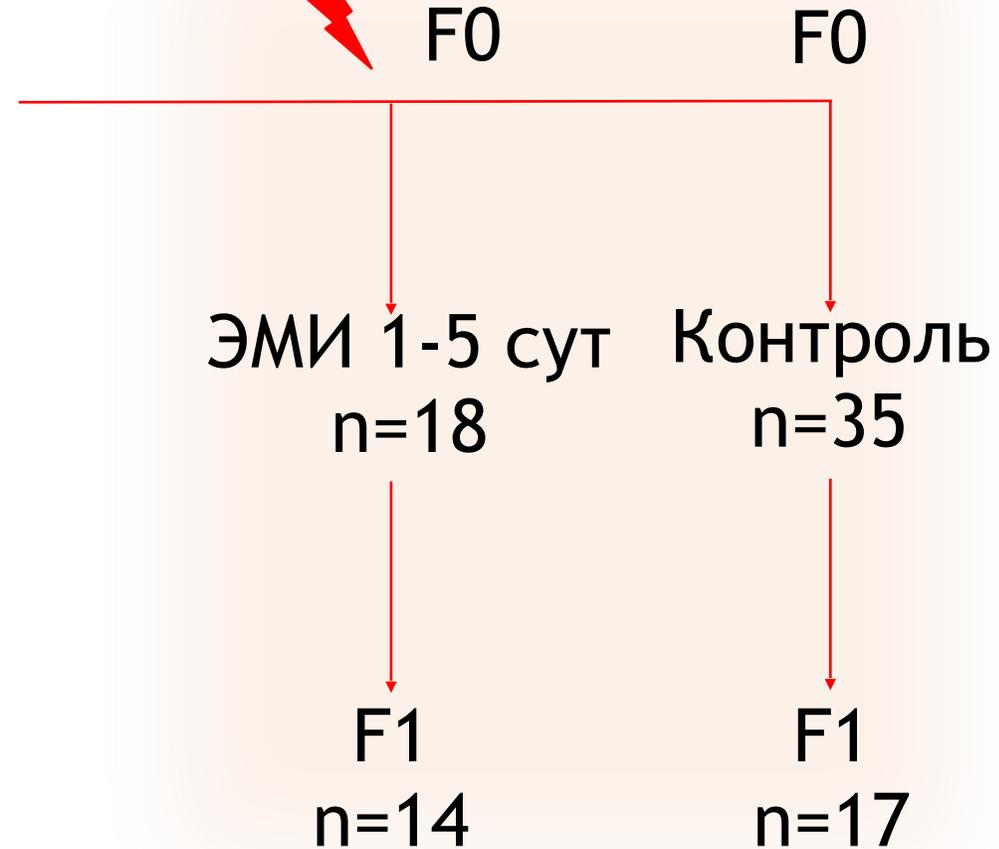


*Daphnia magna*



1 суточные

пища 50% (0,8 мгС\л)



# Выживаемость и плодовитость

**Культивирование** в климатостате (модель Р2, Россия):

Освещение 12/12 ч свет : тьма

Температура  $21 \pm 1$  °C

Вентилирование

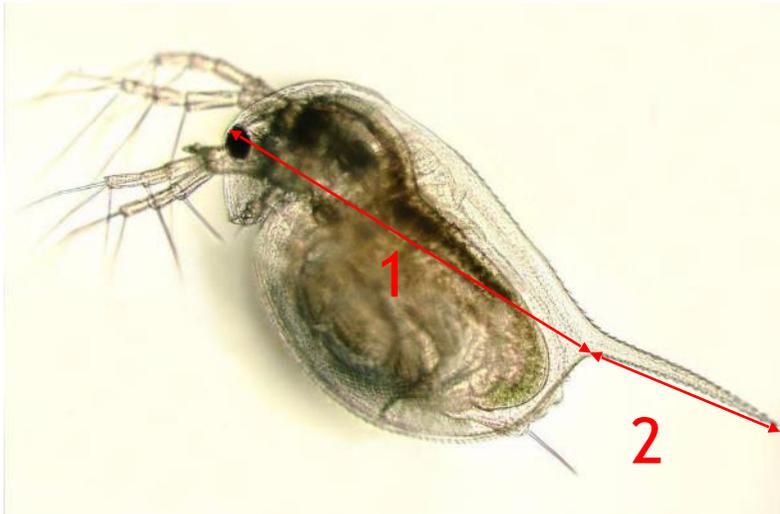
1. Выживаемость в динамике к 21 суткам;
2. Плодовитость к 21 суткам:
  - Среднее число помётов на самку к 21 суткам;
  - Среднее число новорожденных на помёт к 21 суткам;
  - Среднее число новорожденных на особь к 21 суткам.

*Статистический анализ проведен с использованием критериев Крускала-Уоллеса,  $\chi^2$  и двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA.*



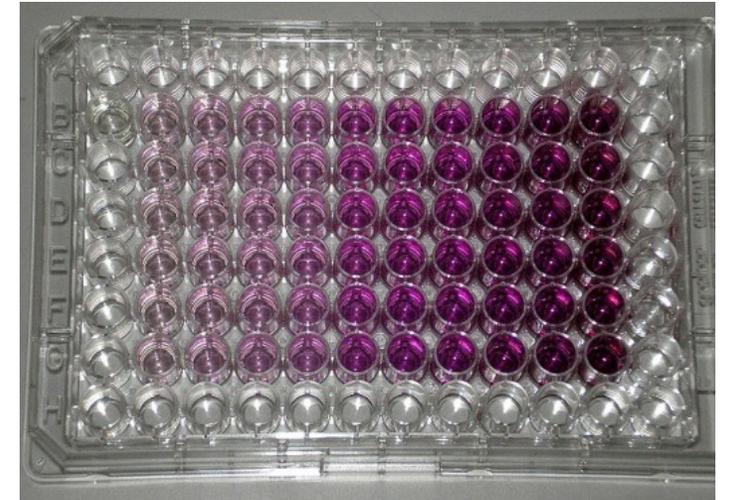
## Морфометрия

- 1-, 10- и 21-суточных *D.magna*;
- Система видеонаблюдения:
  - цифровая камера Myscore 300M,
  - микроскоп МБС-10;
- Анализ изображений в программе Image-Pro;
- Измеряли:
  - длину тела (1)
  - длину шипа (2)
  - размер тела (1) + (2)



## МТТ-анализ

- Измерения МТТ-показателя в единицах оптической плотности (ОП) проводили на планшетном иммуноферментном анализаторе StatFax 2100 (США, VIS-модель).
- 1-суточных: 50 особей на образец
- 5-суточных: 20 особей на образец
- 21-суточных: 3 особи на образец.



Планшет с образцами для определения оптической плотности

*Статистический анализ проведен с использованием критериев Крускала-Уоллиса с поправкой Бонферрони на множественное сравнение в программе STATISTICA12*

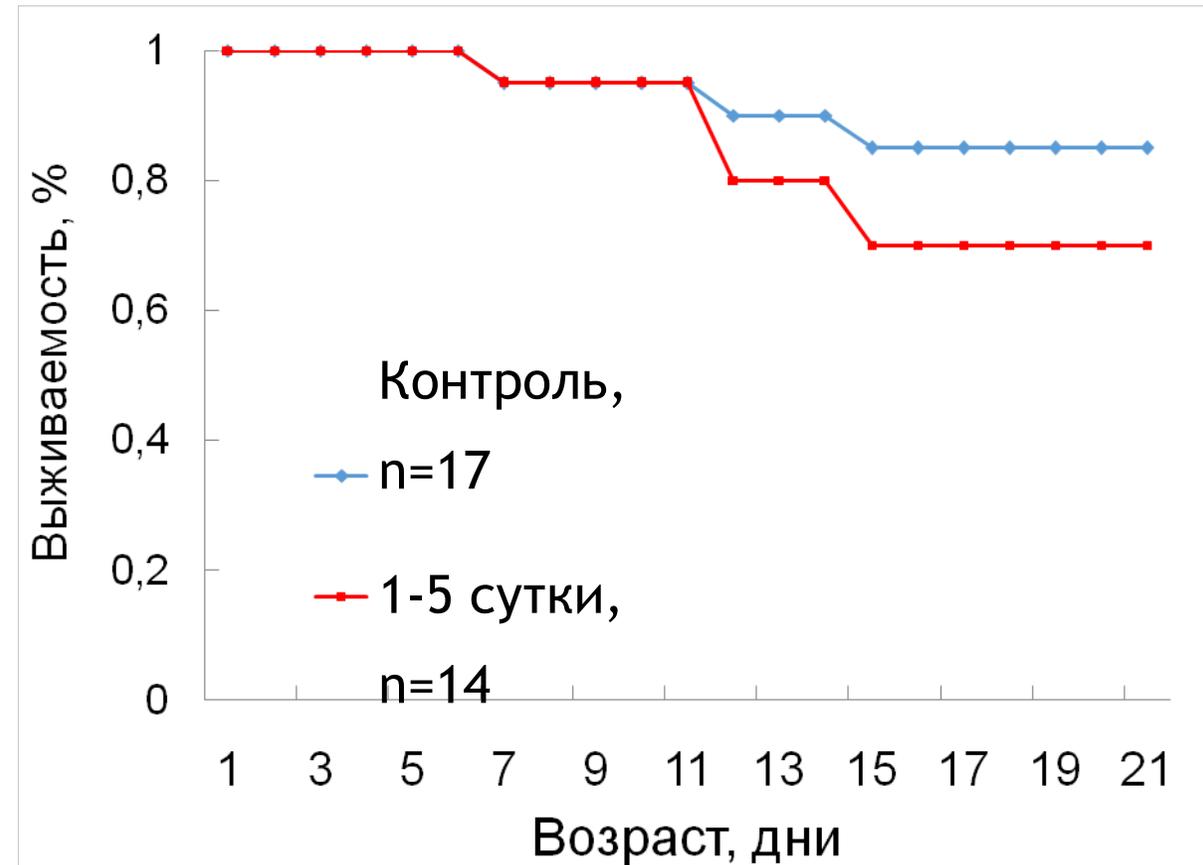
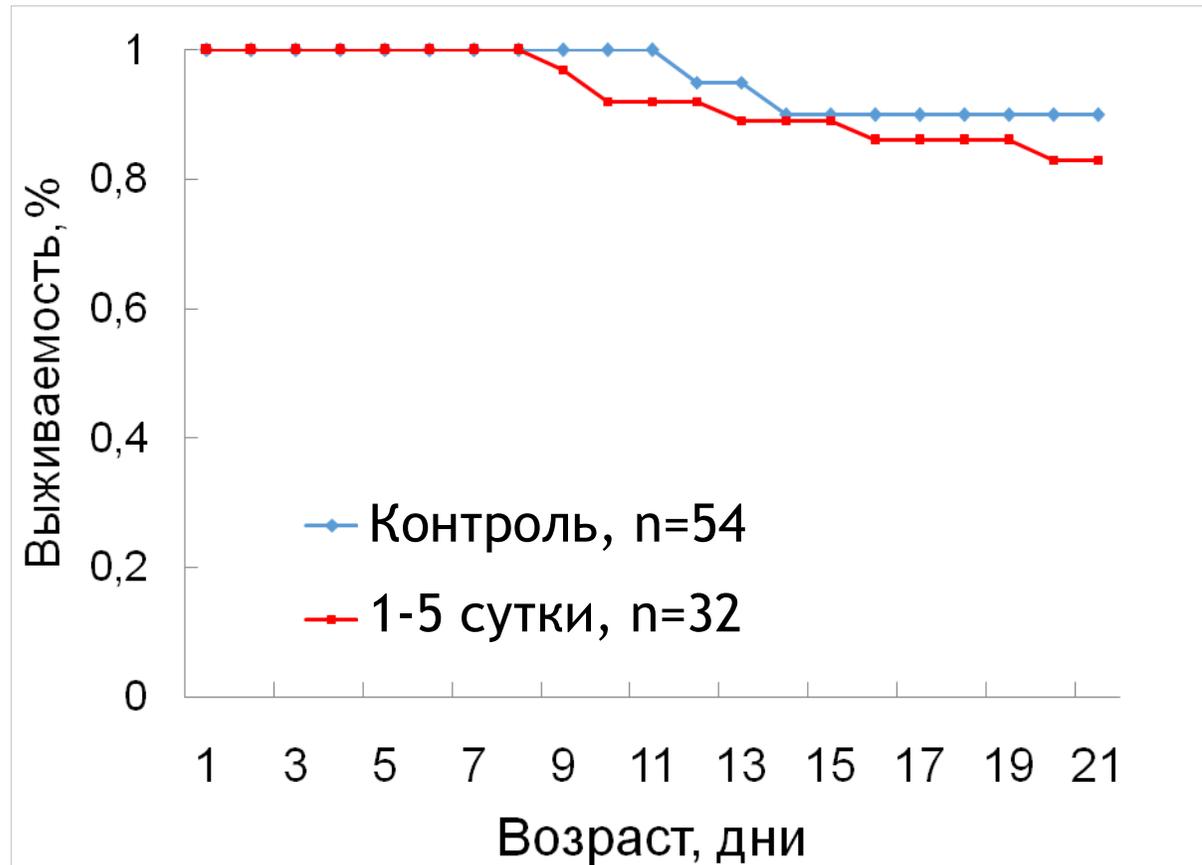


Выживаемость необлученного потомства *D.magna* к 21 суткам под воздействием ЭМИ с частотой 900 МГц и ППЭ 100 мкВт/см<sup>2</sup>

пицца 100%

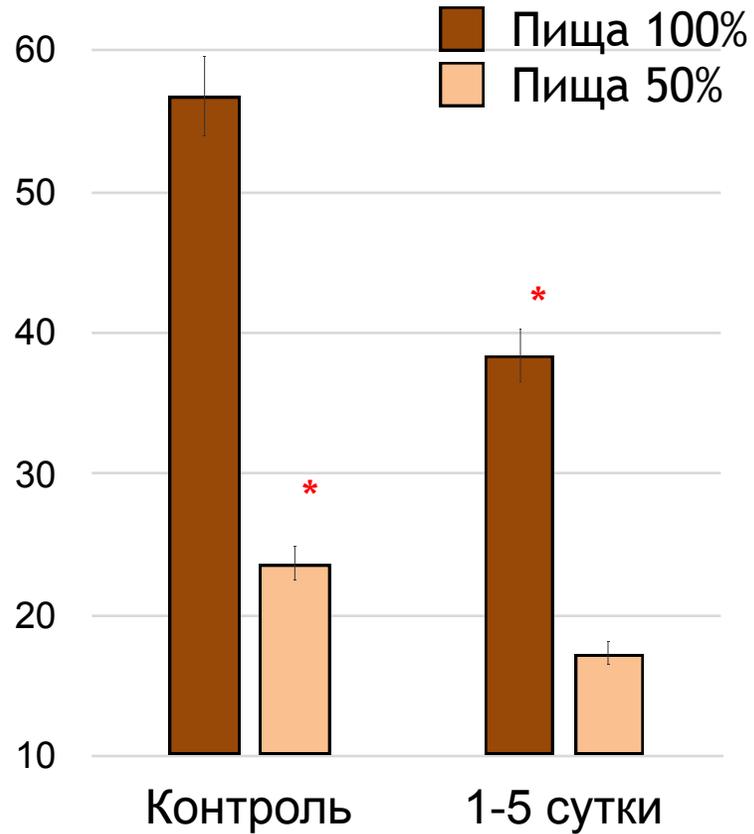
F1

пицца 50%

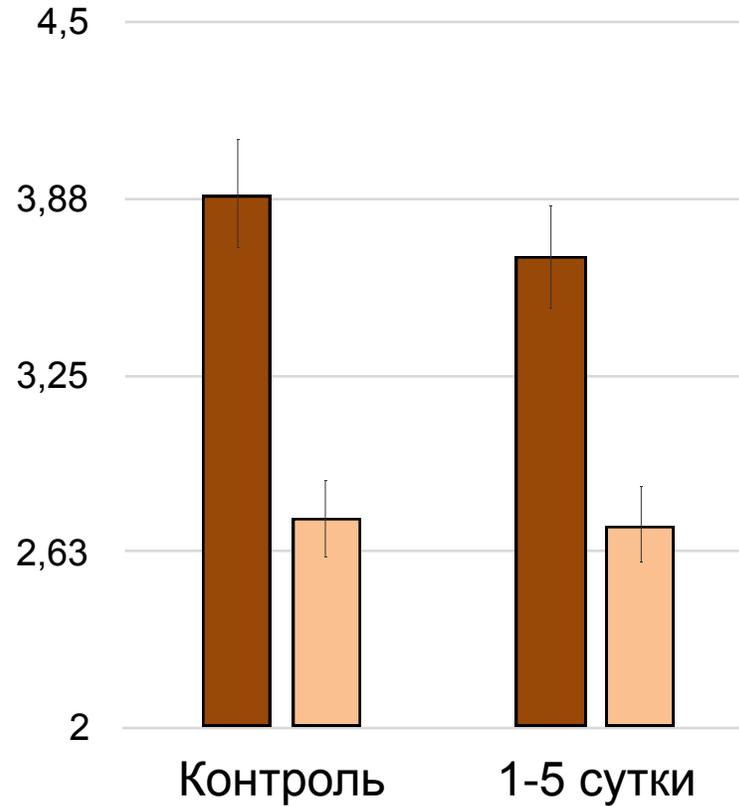


Плодовитость *D.magna* к 21-м суткам при воздействии ЭМИ с частотой 900 МГц и ППЭ 100 мкВт/см<sup>2</sup> в ювенильный период

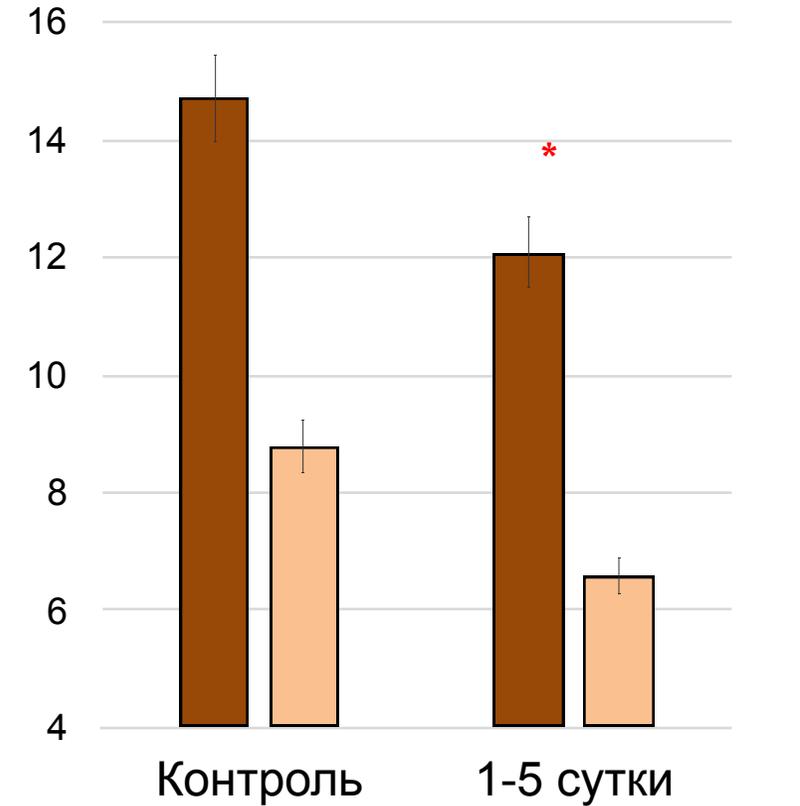
F0



Общая плодовитость

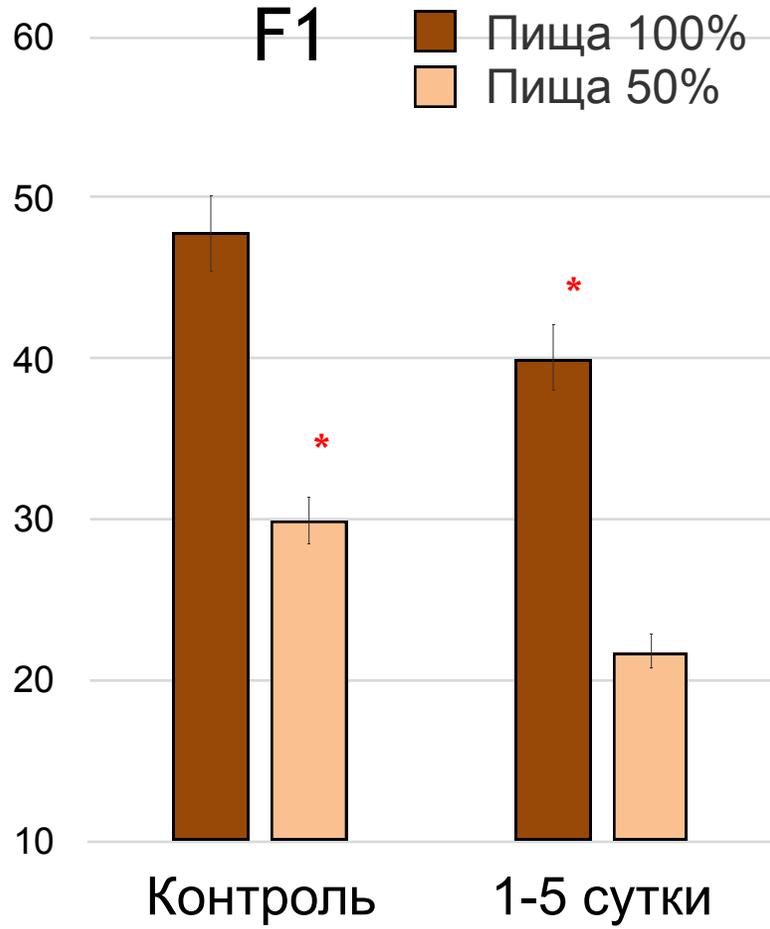


Число пометов на самку

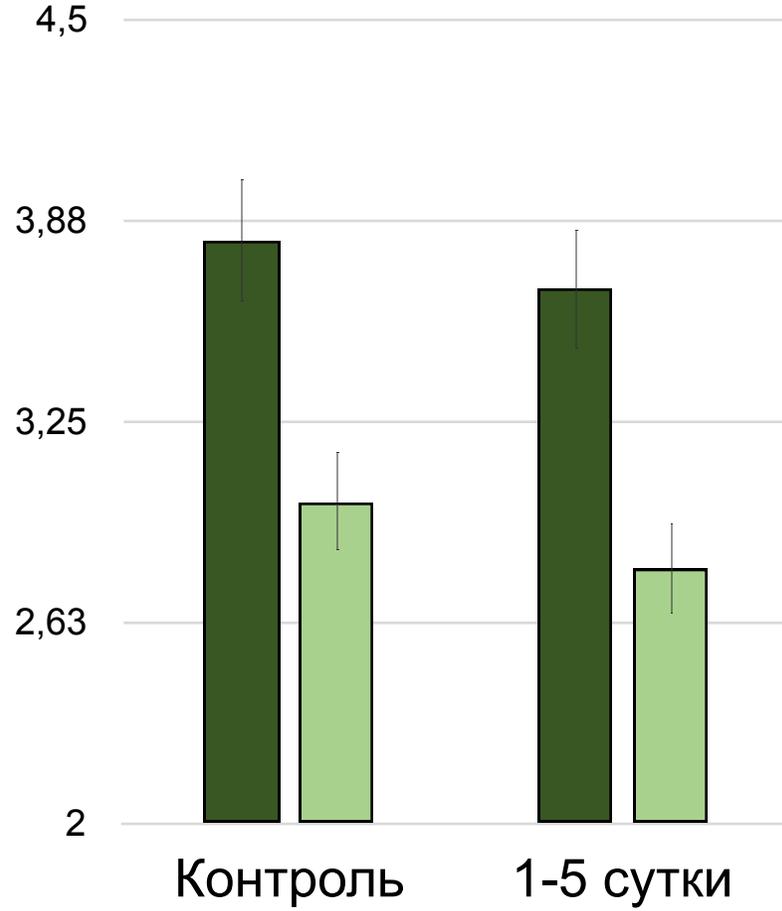


Размер пометов  
(число новорожденных на самку)

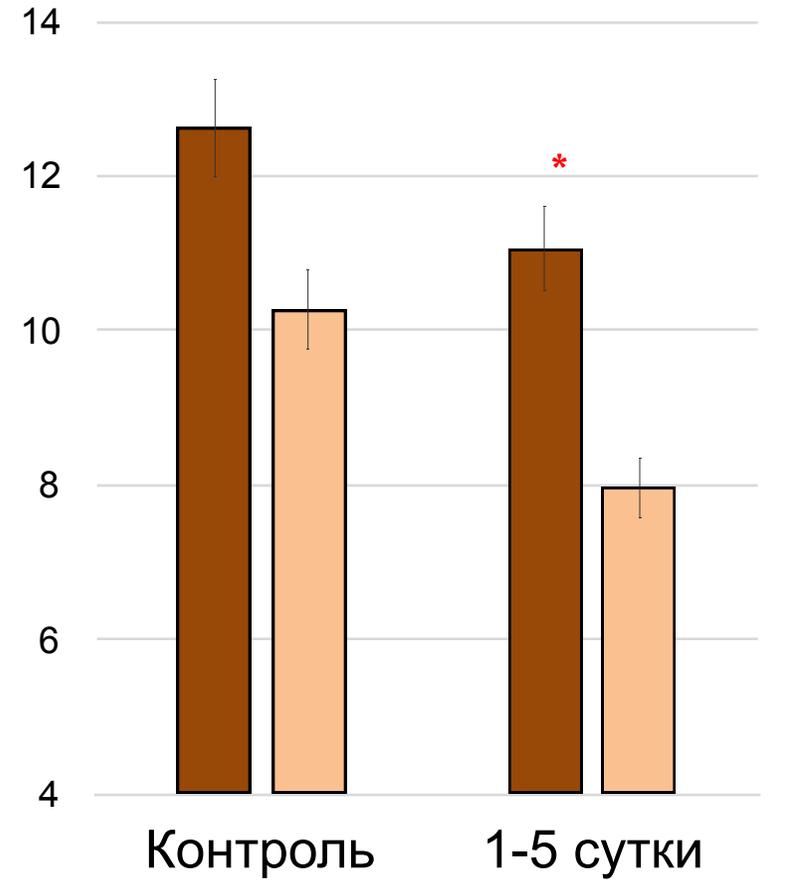
Плодовитость необлученного потомства *D.magna* к 21 суткам под воздействием ЭМИ с частотой 900 МГц и ППЭ 100 мкВт/см<sup>2</sup>



Общая плодовитость

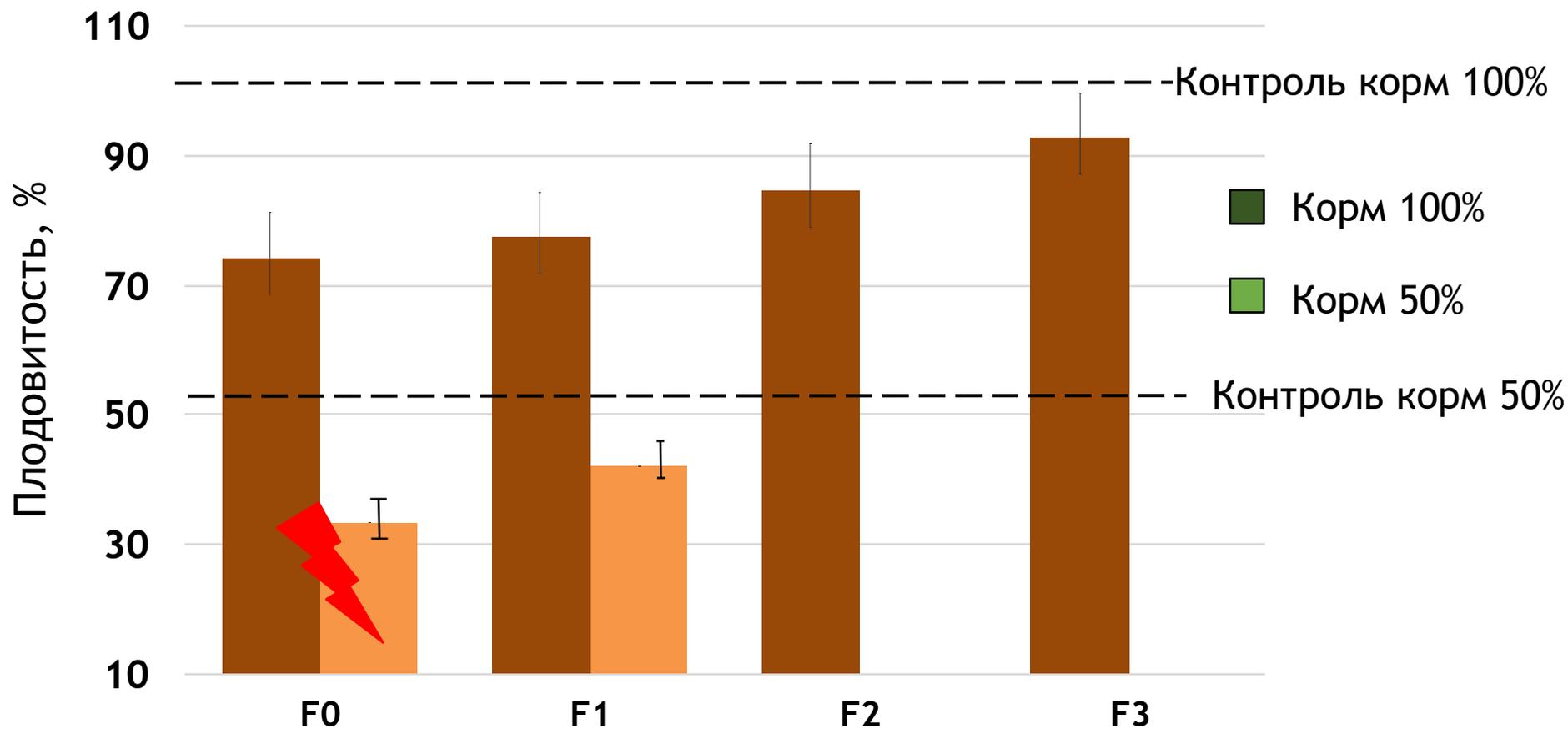


Число пометов на самку



Размер пометов  
(число новорожденных на самку)

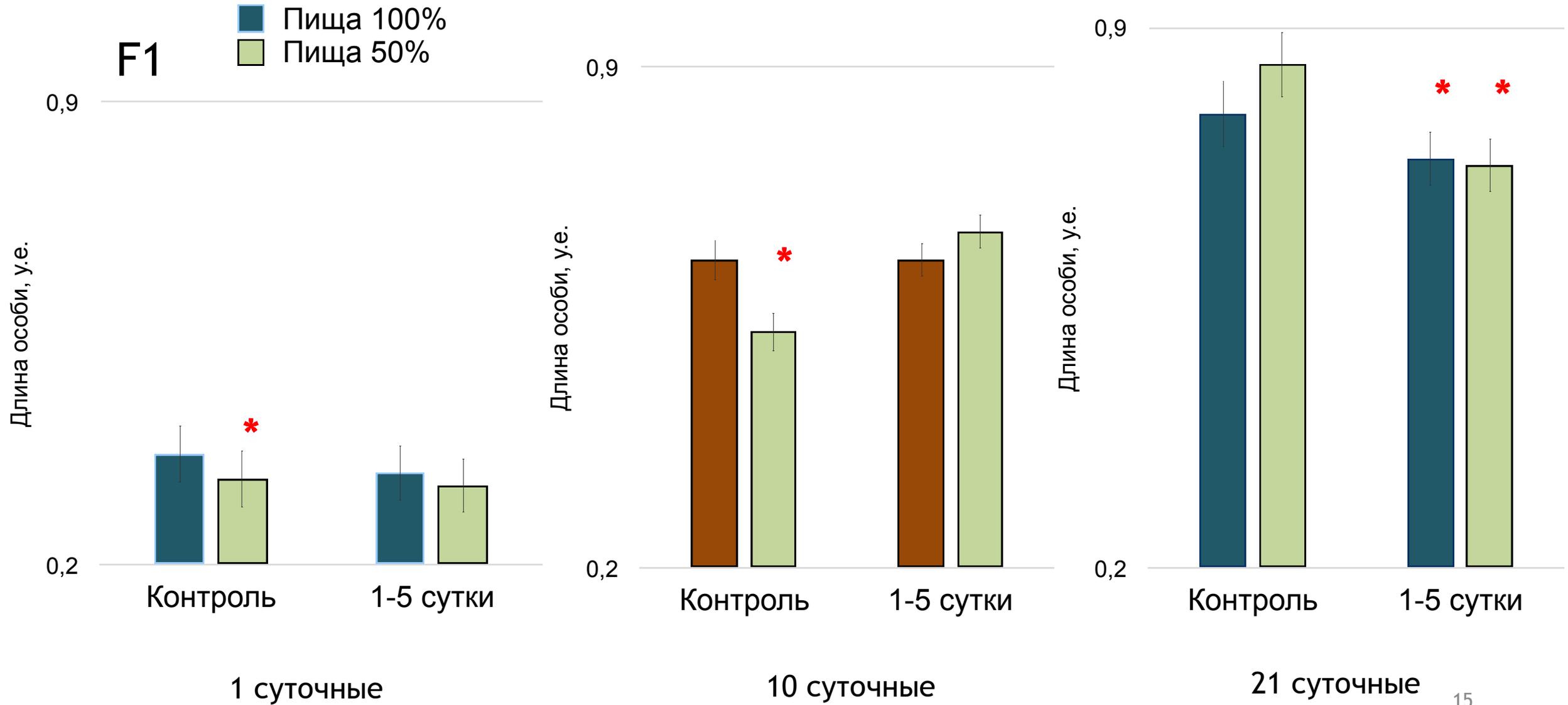
Плодовитость *D. magna* в поколениях при разном уровне пищи



n = 351

Факторы	Общая плодовитость		Помётов на самку		Размер помётов	
	F (df)	Pa	F	Pa	F	Pa
<b>ANOVA-анализ</b>						
Облучение	12.507	8.012x10 <sup>-6</sup>	2.947	0.055	7.667	0.001
Пища	193.970	1.898x10 <sup>-11</sup>	56.013	2.484x10 <sup>-11</sup>	126.302	2.067x10 <sup>-11</sup>
Взаимодействи	3.269	0.040	3.196	0.043	0.088	0.916

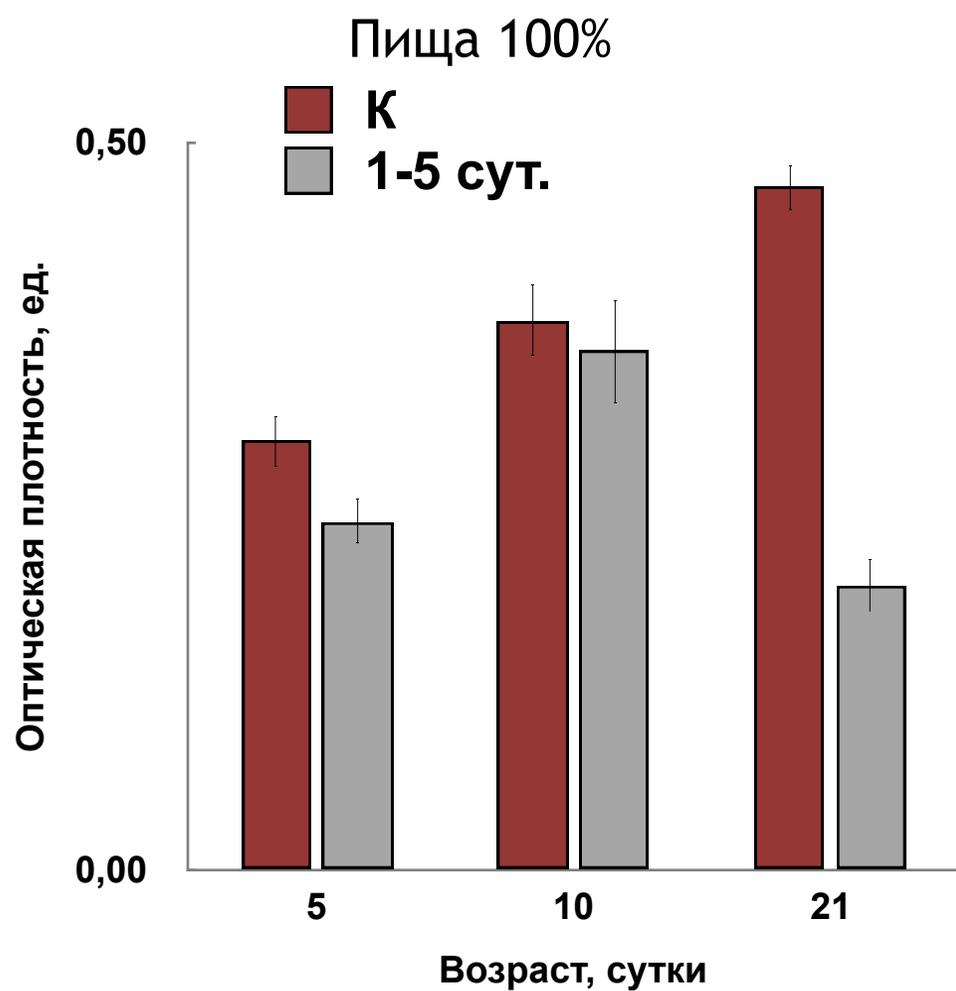
# Изменение длины тела *D. magna* в поколении F1 при разном уровне пищи под воздействие ЭМИ с частотой 900 МГц и ППЭ 100 мкВт/см<sup>2</sup>



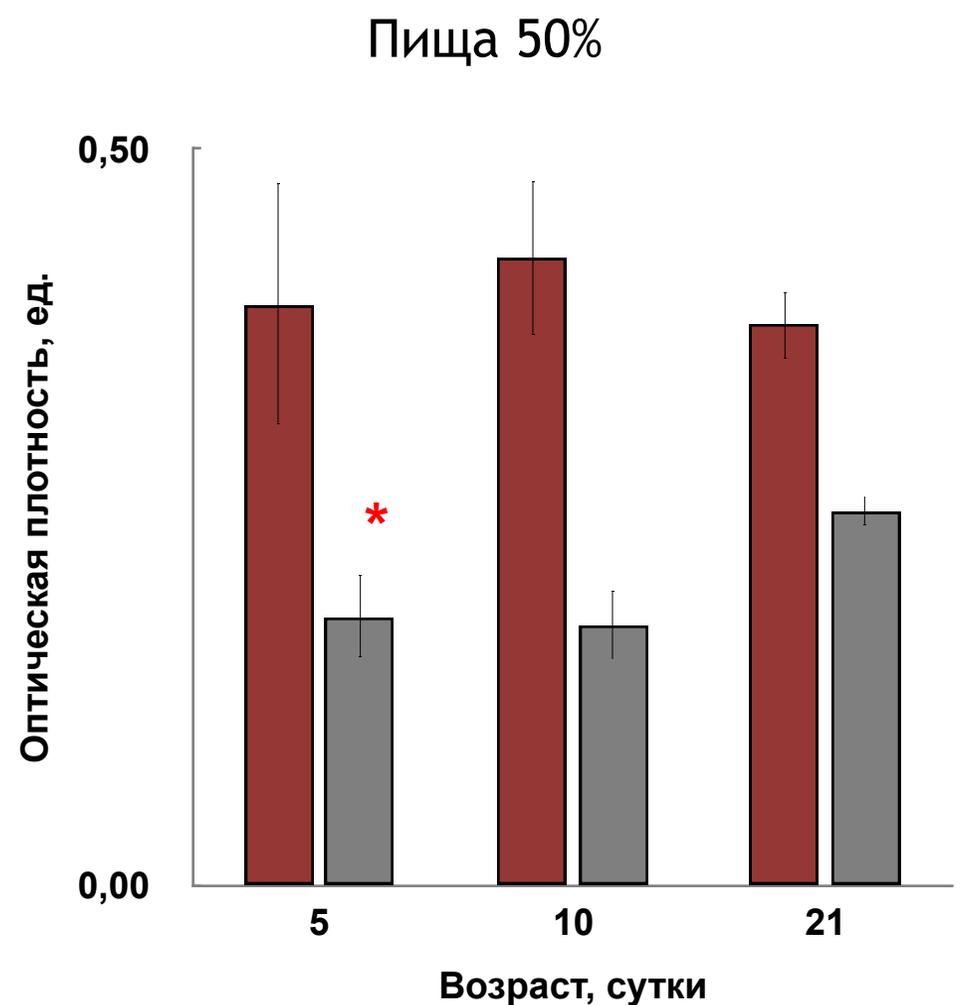
ANOVA-анализ влияния облучения и питания  
на длину тела *D. magna* в поколении F1

Фактор	SS	df	MS	F	P
<b>Возраст 1 сутки, n = 114</b>					
Облучение	0.0068	1	0.0068	4.3047	<b>0.0415</b>
Пища	0.0135	1	0.0135	8.5673	<b>0.0046</b>
Взаимодействие	0.0013	1	0.0013	0.8331	0.3644
<b>Возраст 10 сутки, n = 120</b>					
Облучение	0.0001	1	0.0001	0.1563	0.6937
Пища	0.0256	1	0.0256	28.3371	<b>9.9895x 10<sup>-7</sup></b>
Взаимодействие	3.2279x 10 <sup>-6</sup>	1	3.2279x 10 <sup>-6</sup>	0.0036	0.9525
<b>Возраст 21 сутки, n = 93</b>					
Облучение	0.1073	1	0.1073	64.4729	<b>2.4002x 10<sup>-11</sup></b>
Пища	0.0091	1	0.0091	5.4590	<b>0.0232</b>
Взаимодействие	0.0164	1	0.0164	9.8749	<b>0.0027</b>

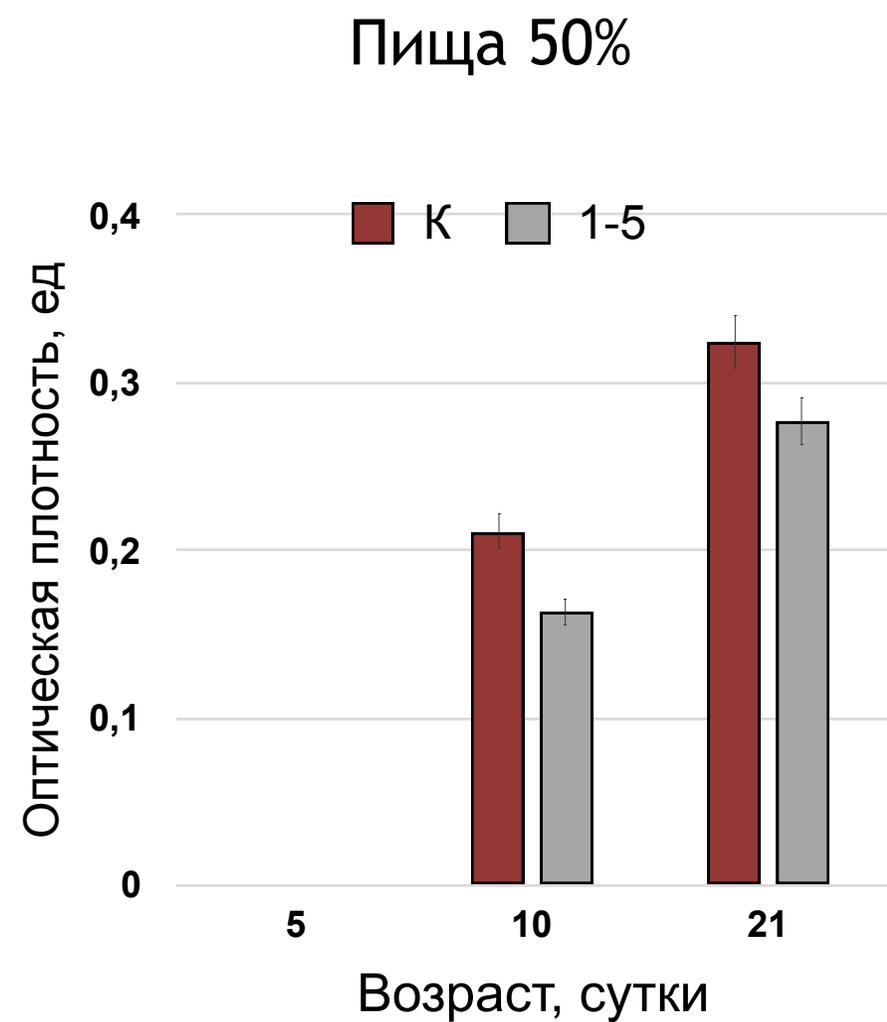
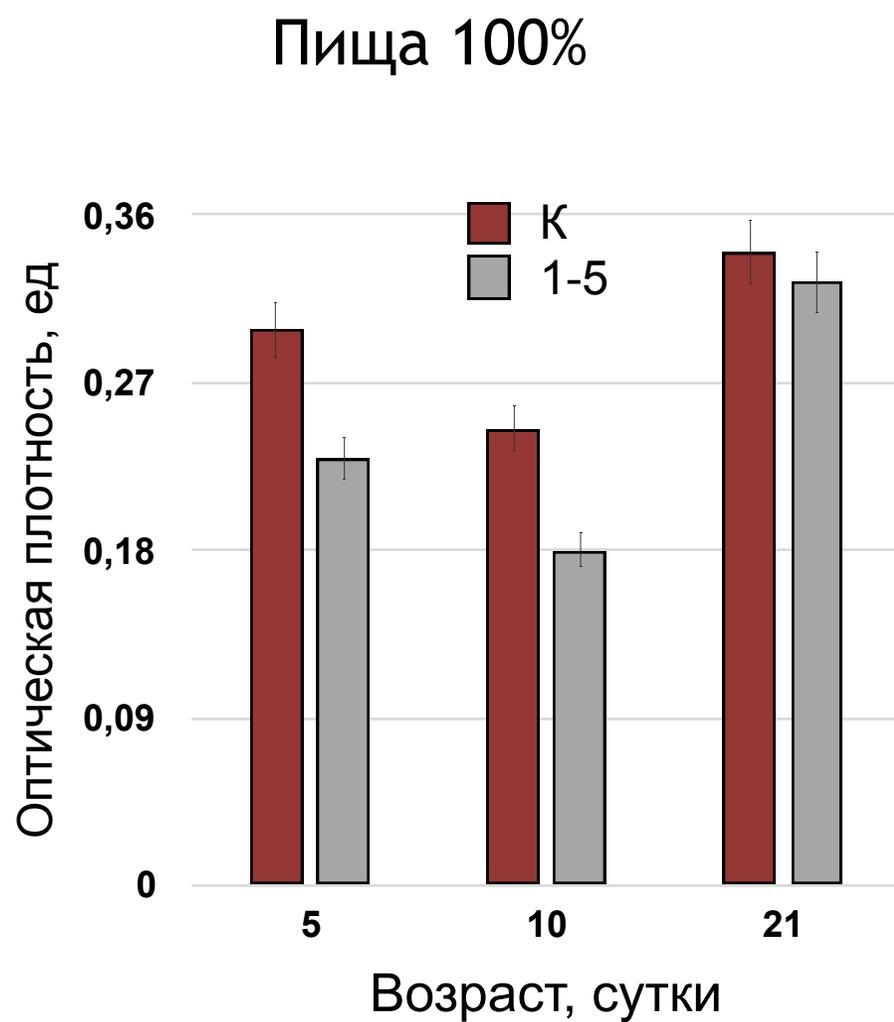
Метаболическая активность *D. magna* при разном количестве пищи под воздействием облучения ЭМИ с частотой 900 МГц и ППЭ 100 мкВт/см<sup>2</sup>



F0



Воздействие облучения ЭМИ с частотой 900 МГц и ППЭ 100 мкВт/см<sup>2</sup> на метаболическую активность *D. magna* у необлученного потомства при разном количестве пищи



ANOVA-анализ влияния облучения при разном количестве  
пищи на метаболическую активность

Фактор	SS	df	MS	F	P
<b>Возраст 5 сутки, n = 114</b>					
Облучение	0.1705	1	0.1705	20.2403	<b>2.4513x10<sup>-5</sup></b>
Пища	0.0046	1	0.0046	0.5406	0.4645
Взаимодействие	0.0558	1	0.0558	6.6228	<b>0.0120</b>
<b>Возраст 10 сутки, n = 120</b>					
Облучение	0.2127	1	0.2127	9.5690	<b>0.0024</b>
Пища	0.1517	1	0.1517	6.8273	<b>0.0100</b>
Взаимодействие	0.0607	1	0.0607	2.7334	0.1006
<b>Возраст 21 сутки, n = 93</b>					
Облучение	0.2048	1	0.2048	38.5404	<b>5.8236 x10<sup>-8</sup></b>
Пища	0.0042	1	0.0042	0.7820	0.3801
Взаимодействие	0.0100	1	0.0100	1.8842	0.1751

## Выводы

1. Облучение *D. magna* в ЭМП с частотой 900 МГц и ППЭ 100 мкВт/см<sup>2</sup> в ювенильный период (1-5 сут) в условиях голодания не изменяют выживаемость.
2. Облучение *D. magna* в ювенильный период в условиях голодания независимо и значимо снижают плодовитость в непосредственно облученном поколении F<sub>0</sub> и в двух пострадиационных поколениях (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>). К третьему поколению (F<sub>3</sub>) эффект нивелируется.
3. Облучение *D. magna* в условиях голодания независимо и значимо снижают линейный размер тела в поколении F<sub>1</sub>.
4. Облучение *D. magna* в условиях голодания независимо и значимо снижают метаболическую активность рачков в F<sub>0</sub> и F<sub>1</sub>.

Спасибо за внимание!