

**МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ У ПЛАНАРИЙ *DUGESIA TIGRINA* И *SHMIDTEA MEDITERRANEA* В НИЗКОИНТЕНСИВНОМ РАДИОЧАСТОТНОМ ПОЛЕ**

*Ускалова Д.В., Устенко К.В.*

Обнинский институт атомной энергетики – филиал Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ» (ИАТЭ НИЯУ МИФИ), 249040 г. Обнинск, ул. Студгородок, д. 1, [uskalovad@mail.ru](mailto:uskalovad@mail.ru)

Выявлено значимое нарушение регенерации планарий *Dugesia tigrina* и *Shmidtea mediterranea* и пролиферативной активности их клеток после низкоинтенсивного воздействия с частотой 900 МГц и плотностью потока энергии 100 мкВт/см<sup>2</sup> с экспозициями 60 и 180 минут. На 4-7 сутки эффект нивелировался. Обсуждается механизм нарушения метаболической активности клеток.

Ключевые слова: низкоинтенсивное радиочастотное излучение, регенерация, пролиферация, МТТ-тест, планарии, *Dugesia tigrina*, *Shmidtea mediterranea*

**MORPHO-FUNCTIONAL DISTURBANCES AT THE *DUGESIA TIGRINA* AND *SHMIDTEA MEDITERRANEA* PLANARIA IN LOW-INTENSE RADIO-FREQUENCY FIELD**

*Uskalova D.V., Ustenko K.V.*

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

A significant violation of the regeneration of the planaria *Dugesia tigrina* and *Shmidtea mediterranea* and the proliferative activity of their cells after low-intensity exposure with a frequency of 900 MHz and an energy flux density of 100  $\mu\text{W} / \text{cm}^2$  with exposures of 60 and 180 minutes was revealed. At 4-7 days, the effect was leveled. The mechanism of impaired metabolic activity of cells is discussed.

Keywords: low-frequency radio-frequency radiation, regeneration, proliferation, MTT test, planaria, *Dugesia tigrina*, *Shmidtea mediterranea*

Обеспечение безопасности для разных представителей биоты в условиях современного мегаполиса, пронизанного действием электромагнитного излучения (ЭМИ) разного спектра – важная задача радиобиологии и радиэкологии.

Уже сейчас некоторые водные экосистемы подвержены действию антропогенных электромагнитных полей. Водные беспозвоночные животные (в том числе планарии) играют важную роль в поддержании гомеостаза водоема. Морфо-физиологический подход в оценке действия факторов, вызывающих стресс, является важной составляющей биологического мониторинга. Комплексная, включающая разные методические подходы и показатели жизнеспособности, оценка эффектов действия низкоинтенсивного ЭМИ диапазона сотовой связи является важной теоретической и практической задачей радиобиологии неионизирующих излучений.

Известно, что необласты – стволовые клетки, составляют до 30% от общего количества клеток плоских червей планарий. В связи с этим планарии являются удобным объектом для исследования процессов посттравматического восстановления, среди которых ключевое значение имеет пролиферация клеток, в том числе стволовых

[Ermakov, Ermakova, Kudravtsev, Kreshchenko, 2012]. Влияние ЭМИ на эти процессы изучено недостаточно, и особенно мало известно об ответе стволовых клеток на такое воздействие и механизмах формирования биоэффектов.

В данной работе впервые проведен комплексный анализ закономерностей формирования острых и отдаленных эффектов действия низкоинтенсивного радиочастотного излучения с параметрами близкими к сотовой связи по показателям регенерации, пролилиферации и метаболической активности у планарий *Dugesia tigrina* и *Shmidtea mediterranea* в модельных экспериментах

Планарий *D. tigrina* и *S. mediterranea* облучали в низкоинтенсивном электромагнитном поле с параметрами, близкими к сотовой связи (частота  $900 \pm 100$  МГц, плотность потока энергии (ППЭ)  $100 \text{ мкВт/см}^2$ ) с экспозициями 60 и 180 мин [Ускалова, 2018]. Облучение проводили на установке, в которой постоянное НИ РЧ поле обеспечивал маломощный генератор высокочастотных сигналов Г4-76А и пирамидальная рупорная антенна типа П6-23А [Литовченко и др., 2011]. Пролиферативную активность оценивали через 6, 8 и 24 ч после облучения с помощью метода проточной цитометрии [Ускалова, 2018], который позволяет определять долю клеток на разных фазах клеточного цикла, включая S- и G2/M-фазы [Ermakov, Ermakova, Kudravtsev, Kreshchenko, 2012]. Регенерационную активность определяли на 4 и 7 сутки после декапитации и облучения количественно как отношение площади бластемы к площади всего тела планарии с использованием метода компьютерной морфометрии [Тирас, Асланиди, 2013]. МТТ-тестом оценивали цитотоксический эффект, приводящий к нарушению метаболической активности клеток [Ускалова, 2018; Савина, Ускалова, Сарапульцева, 2018]. Результаты обработаны методами вариационной статистики, применен двухфакторный дисперсионный анализ.

Методом компьютерной морфометрии выявлено снижение в 2 раза регенерационной активности планарий вида *D. tigrina* на четвертые сутки после радиочастотного воздействия и декапитации. Эффект нивелировался к 7 сут. Результаты данного эксперимента показали, что НИ РЧ поле с исследуемыми параметрами не приводит к нарушению регенерации *D. tigrina* и гибели животных.

Методом проточной цитометрии показано, что в контрольных образцах *S. mediterranea* около 70 % клеток находится в G1/G0 фазе клеточного цикла, 8-16 % – в фазе G2/M и около 18 % – в фазе S. Пролиферативная активность клеток в образцах облученных планарий первые шесть и восемь часов после воздействия не отличалась от наблюдаемой в контроле. Через 24 ч после воздействия количество митотических необластов, находящихся на стадии G1/G0, увеличилось в 1,1 раз. При этом количество клеток, характеризующих скорость пролиферации (стадия S), и клеток, характеризующих индекс пролиферации (стадии G2/M + S), снизилось в 1,5 раза по сравнению с контролем. По результатам двухфакторного дисперсионного анализа обнаружено значительное влияние НИ РЧ поля ( $p = 0,02$ ) и времени после облучения ( $p = 0,0001$ ) на пролиферацию клеток планарий.

Известно, что регенерация обеспечивает выживание планарий и зависит от пролиферативной активности стволовых клеток [Cowles., Hubert , Zayas, 2012]. Через 24 часа после действия НИ РЧ поля индекс пролиферации, определяемый как общее количество клеток на фазах S и G2/M, в 1,5 раз ниже, чем в контрольных группах планарий.

С помощью МТТ-теста обнаружено, что через 180 мин нахождения в НИ РЧ поле происходит значимое изменения оптической плотности (ОП) в 1,5 раза в облученных образцах. Данный тест позволяет сопоставить изменение ОП раствора по отношению к контролю с изменением пула жизнеспособных клеток и оценить эффективность цитотоксического действия анализируемого воздействия. Тест интегрально отражает количество активных форм кислорода, в том числе, короткоживущих супероксид анион-радикалов, инактивацию сукцинатдегидрогеназ и других митохондриальных оксидаз и работу системы антиоксидантных ферментов [Cancer Cell Culture. Methods and Protocols, 2011].

Использование планарий в качестве объекта исследования позволило проанализировать влияние НИ РЧ поля как на клеточном, так и на организменном уровнях.

Результаты, полученные в данной работе, показывают, что после НИ РЧ воздействия с параметрами, близкими к сотовой связи, происходит снижение регенерационной активности планарий за счет нарушения пролиферативной активности и снижение пула жизнеспособных клеток. Однако эффект не сказывается на жизнеспособности целостного организма. Регенерационная активность восстанавливается через неделю после облучения.

1. Ermakov A.M., Ermakova O.N., Kudravnitskiy A.A., Kreshchenko N.D. Study of planarian stemcell proliferation by means of flow cytometry // MolBiolRep, 2012. V. 39. P.3073–3080
2. 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.
3. Литовченко А.В., Козьмин Г.В., Игнатенко Г.К., Сарапульцева Е.И., Иголкина Ю.В.. Комплект установок для исследования влияния низкоинтенсивных электромагнитных полей на живые организмы // Биомедицинская радиоэлектроника, 2011. № 12. С. 15–19
4. Тирас Х.П., Асланиди К.Б. Тест-система для неклинического исследования медицинской и экологической безопасности на основе регенерации планарий. учебно-методическое пособие. – Пущино: Пущинский государственный естественно-научный институт, 2013. – 64 с
5. 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
6. Cowles M. W., Hubert A., Zayas R. M. A Lissencephaly-1 Homologue Is Essential for Mitotic Progression in the Planarian *Schmidtea mediterranea* // Developmental dynamics. 2012. V. 241. N 5. P. 901–910
7. Cancer Cell Culture. Methods and Protocols. / Ed.I.A. Cree. Second ed. – Springer New York Dordrecht Heidelberg London: Human Press, 2011. P. 237–244

**МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ  
НАРУШЕНИЯ У ПЛАНАРИЙ *DUGESIA  
TIGRINA* И *SHMIDTEA MEDITERRANEA* В  
НИЗКОИНТЕНСИВНОМ  
РАДИОЧАСТОТНОМ ПОЛЕ**

Ускалова Д.В., Устенко К.В.

ИАТЭ НИЯУ МИФИ

Актуальные проблемы радиобиологии и гигиены неионизирующих излучений»,  
Москва, 12-13 ноября 2019 г.

# Объекты исследования



*Dugesia tigrina*



*Schmidtea mediterranea*

- Размер особей около 1 см
- Продолжительность жизни до года
- Содержат 30% стволовых клеток

# Культивирование планарий

- Каждый вид культивировали в отдельных стеклянных эксикаторах с дважды фильтрованной водопроводной водой (рН 7,5 - 8,2,  $O_2$  ~10,0 мг/л; общая жесткость ~ 6,8 мг/л).
- Плотность посадки до 100 особей на литр
- Климатостат марки Р2 (Спецкомплектресурс, Россия)
- Режим освещения 12/12 свет/тьма
- Температура  $20 \pm 1$  °С.
- Кормление раз в неделю говяжьей печенью.
- После кормления воду на 2/3 заменяли свежеприготовленной.

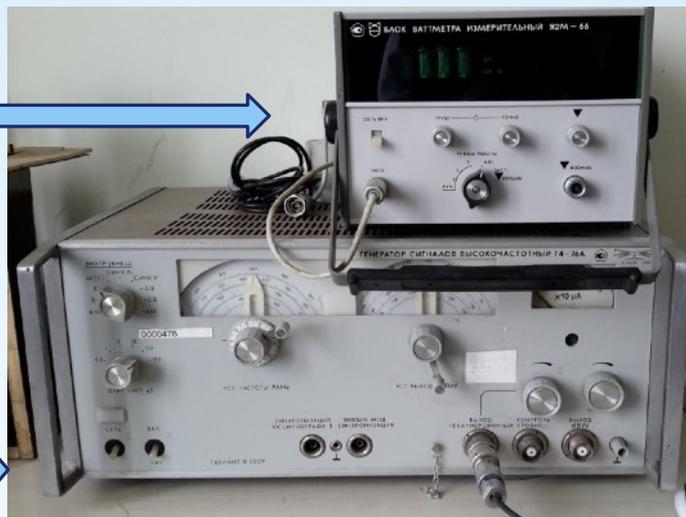


## Схема облучения

- \* По 10 особей в 4 мл воды в чашках Петри ( $d=3,5$  см), высота водяного столба  $\leq 1$  см
- \* Экспозиция 60 и 180 мин
- \* Частота 900 МГц, ППЭ  $100$  мкВт/см<sup>2</sup>

# Установка ЭМИ

**Ваттметр**  
измерительный Я2М-66



**Генератор** непрерывного электромагнитного  
излучения Г4-76А

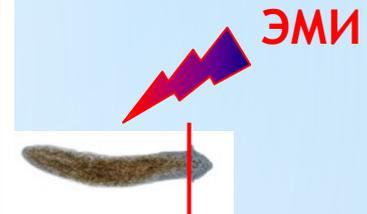
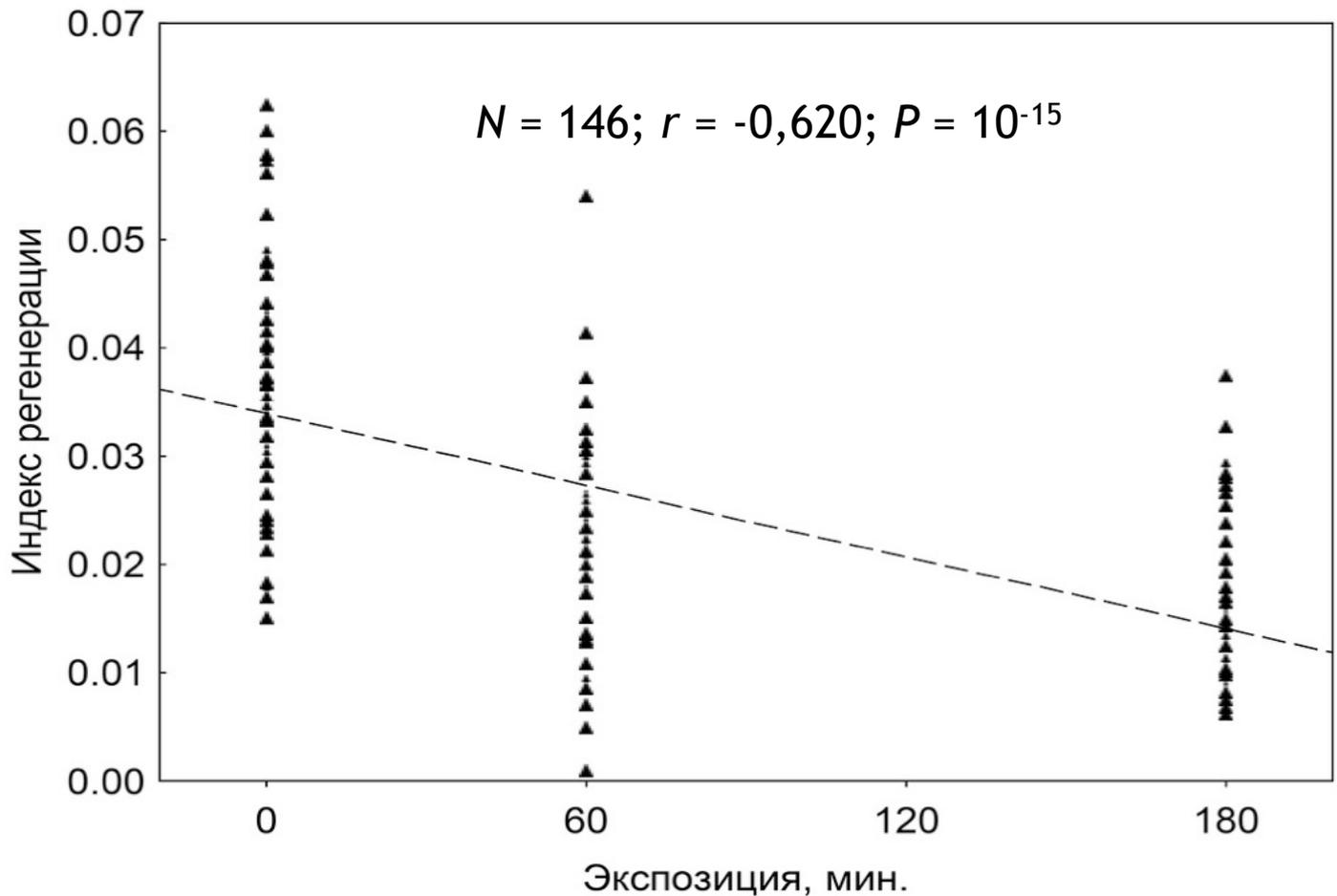
**Антенна** в виде пирамидального рупора с  
фокусирующей линзой 25x25 см



# Методы анализа биологических эффектов

Вид	Метод	Критерии
<i>Dugesia tigrina</i>	<b>МТТ-тест</b> (Caminada, Escher, Fent, 2006, модификация (Ускалова, 2018))	Оптическая плотность ( $OD$ )
	<b>Компьютерная морфометрия</b> (Тирас, 1980; Тирас, Асланиди, 2013)	Индекс регенерации, $IR = S/s$
<i>Schmidtea mediterranea</i>	<b>Проточная цитометрия</b> (Ertaikov et al, 2012, модификация (Ускалова, 2018))	Скорость пролиферации ( $S$ ) Индекс пролиферации (ИП) $= S+G2+M$

# Изменение регенерационной активности у планарии *Dugesia tigrina*



Тест Крускала-Уоллиса: 68.78; df=2;  $P = 1,11 \times 10^{-15}$

**7 сутки**

$N = 30, t_{st} = 0,92, p = 0,36$

$ИР (контроль) = (0,049 \pm 0,014)$  и  $ИР (опыт) = (0,048 \pm 0,009)$

# Изменение активности регенерации у планарий *D. tigrina* после облучения с частотой 900 МГц и ППЭ 100 мкВт/см<sup>2</sup>

## 4 сутки после облучения и декапитации

Время экспозиции, мин	N*	Индекс регенерации ± s.e.m.	Значения теста К-У**	P***
0 (контроль)	54	0,037 ± 0,002	-	-
180	48	0,016 ± 0,008	57,80	5,79 × 10 <sup>-14</sup>

## 7 сутки после облучения и декапитации

Время экспозиции, мин	N*	Индекс регенерации ± s.e.m.	Значения теста К-У**	P***
0 (контроль)	54	0,048 ± 0,009	-	-
180	48	0,049 ± 0,014	tst = 0,92	P = 0,36

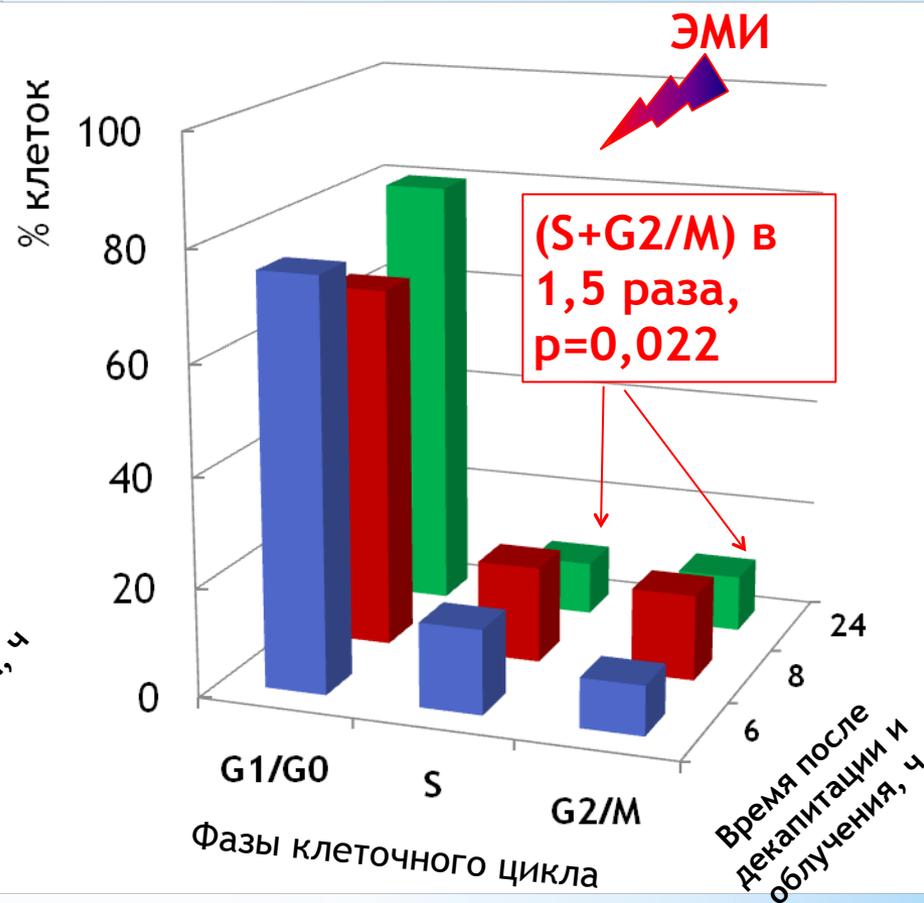
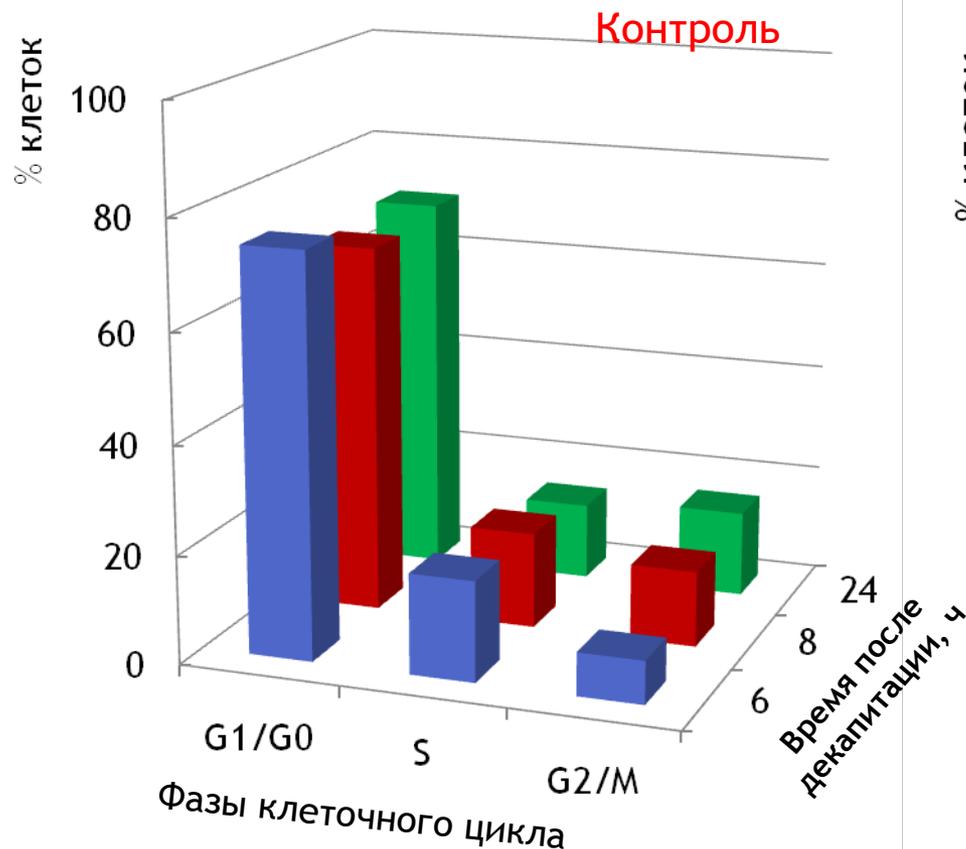
\* размер выборки

\*\* значения теста Крускала-Уоллиса (df=1) для сравнения с контрольной группой

\*\*\* вероятность отличия с поправкой Бонферрони на множественное сравнение

\*\*\*\* значения теста Крускала-Уоллиса для проверки на гомогенность контрольной и облученных групп

# Динамика нарушения пролиферативной активности в образцах планарий *S. mediterranea*

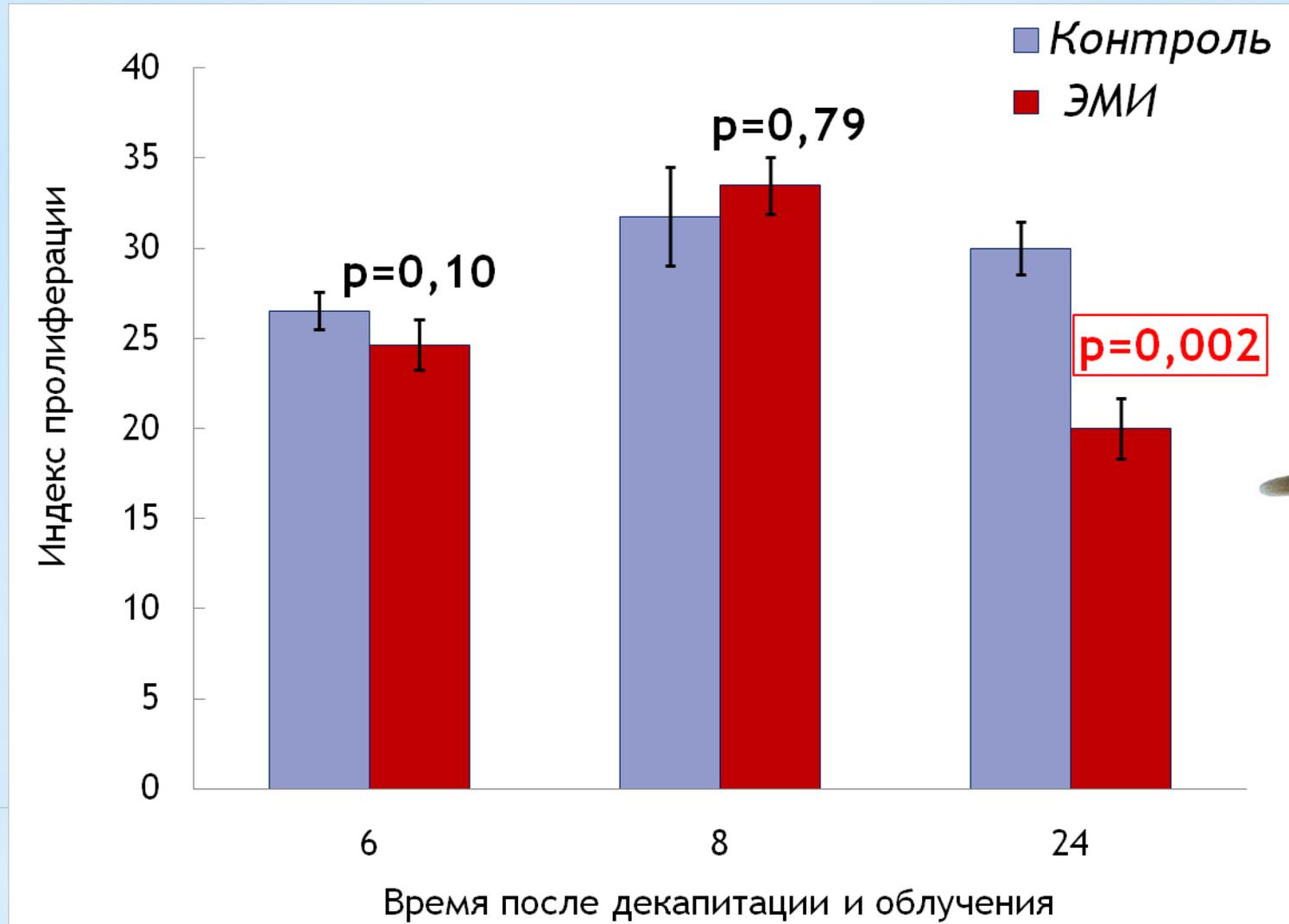


$N = 57; r = 0,008; P = 0,96$

$IR$  (контроль) =  $(0,028 \pm 0,006)$  и  $IR$  (опыт) =  $(0,026 \pm 0,004)$

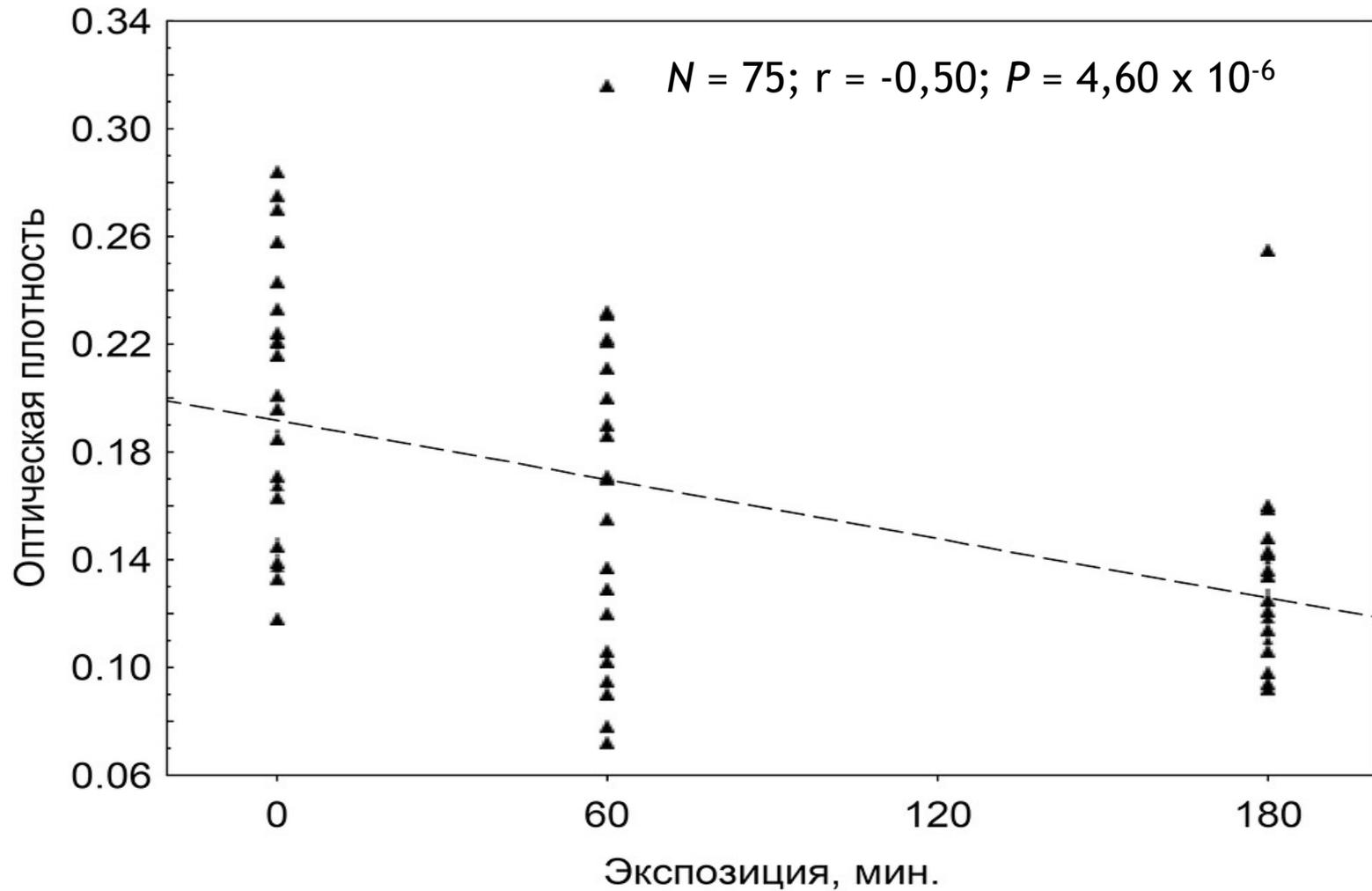


# Динамика изменения индекса пролиферации у планарий *S. mediterranea*



Вероятность вклада в эффект	
Электромагнитное воздействие	0,022
Время после облучения	0,0001
Взаимодействие факторов	0,0030

# Изменение оптической плотности (МТТ-показателя) в образцах *Dugesia tigrina*



ЭМИ



Тест Крускала-Уоллиса: 21,22;  $df=2; P = 2,47 \times 10^{-5}$

Изменение оптической плотности (МТТ-показатель) в образцах планарий *Dugesia tigrina* после облучения с частотой 900 МГц и ППЭ 100 мкВт/см<sup>2</sup>

Время экспозиции, МИН	N*	Оптическая плотность ± s.e.m.	Значения теста К-У**	P***
0 (контроль)	25	0,196 ± 0,010	-	-
60	23	0,163 ± 0,013	3,76	0,105
180	27	0,128 ± 0,006	24,46	1,58 × 10 <sup>-6</sup>

\* размер выборки

\*\* значения теста Крускала-Уоллиса (df=1) для сравнения с контрольной группой

\*\*\* вероятность отличия с поправкой Бонферрони на множественное сравнение

\*\*\*\* значения теста Крускала-Уоллиса для проверки на гомогенность контрольной и облученных групп

# Заключение

- \* Использование планарий в качестве объекта исследования позволило проанализировать влияние НИ РЧ поля как на клеточном, так и на организменном уровнях.
- \* НИ РЧ воздействие с параметрами, близкими к сотовой связи, приводит к снижению регенерационной активности планарий за счет нарушения пролиферативной активности и снижению пула жизнеспособных клеток.
- \* Эффект не сказывается на жизнеспособности целостного организма. Регенерационная активность восстанавливается через неделю после облучения.