

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор УРАН Институт физиологии
им. И.П. Павлова РАН, чл.-корр. РАН



Д.Н. Дворецкий

20 июня 2011 г.

Отчет по НИР
**«Проверка мутагенности электромагнитного
излучения крайне высокой частоты (КВЧ-излучения)»**

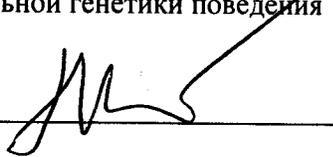
Авторы отчета:

Брагина Ю.В., старший научный сотрудник, кандидат биологических наук
Беседина Н.Г., старший научный сотрудник, кандидат биологических наук
Камышев Н.Г., заведующий лабораторией, доктор биологических наук,
старший научный сотрудник

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН

Санкт-Петербург, 2011

Руководитель работы:
доктор биологических наук,
заведующий лабораторией
сравнительной генетики поведения


Н.Г. Камышев

Введение

КВЧ-излучение (излучение ММ-диапазона) по длине волны охватывает от 1 до 10 мм, а по частоте – от 30 до 300 ГГц. Миллиметровые волны относятся к неионизирующим излучениям. Энергия кванта в миллиметровом диапазоне меньше энергии теплового движения. Одна из важных особенностей ММ-волн состоит в том, что они сильно поглощаются водой и водными растворами (Бецкий и др., 2009).

Идея о возможности специфического воздействия волн ММ-диапазона на биологические структуры и организмы впервые была высказана Н.Д.Девятковым, М.Б.Голантом и Э.А. Гельвичем в 1964-1965 гг. и состояла в следующем. Миллиметровое излучение внеземного происхождения сильно поглощается водными парами атмосферы Земли. Поэтому живые организмы могут не иметь естественных (эволюционных) механизмов защиты от колебаний заметной интенсивности в этом диапазоне, обусловленным внешними причинами, и этот диапазон частот мог быть использован живыми организмами для собственных нужд в целях передачи информации (управляющих сигналов) между клетками внутри живых организмов (Бецкий и др., 2009). Эта оригинальная идея впоследствии получила не только теоретическое [(Девятков и др., 1991, 1994; Бецкий и др., 2004), но и практическое подтверждение в сотнях работ, выполненных как у нас в стране, так и в ряде зарубежных стран (Миллиметровые волны..., 2007).

Гомеостаз организма связан с генерацией клетками полей в КВЧ-диапазоне. Амплитудно-частотные характеристики излучения больного и здорового организма различаются. Суть КВЧ-терапии состоит в том, что внешнее КВЧ-излучение имитирует собственное излучение организма и выполняет функцию синхронизирующего устройства, утраченную организмом в процессе заболевания. Основные, первоначальные, события разыгрываются в клеточных мембранах (акустоэлектрические волны или колебания Фрелиха). Первичной мишенью являются молекулы воды, а главными элементами, с которыми связано возбуждение в мембранах акустоэлектрических волн, — мембранные рецепторы как вход регуляторных систем (Девятков и др., 1991, 1994; Бецкий и др., 2004, 2009).

Наиболее интересные биологические эффекты имеют место при низких интенсивностях (плотностях мощности) ММ-излучения, $P < 10$ мВт/см² и имеют пороговый характер: они наблюдаются уже при плотностях мощности порядка 100 мкВт/см², затем при возрастании мощности биологический эффект почти скачком достигает

максимального значения и далее практически не меняется при увеличении мощности ММ-излучения на порядок или более. Существует четко выраженная зависимость биологических эффектов от частоты КВЧ-излучения ("резонансные эффекты ММ-излучения"). В экспериментах с микроорганизмами (кишечной палочкой) и лабораторными животными (мыши), были определены две ярко выраженные стимулирующие частоты — 53,53 ГГц и 42,20 ГГц. По совокупности экспериментально обнаруженных закономерностей взаимодействия низкоинтенсивных ММ-волн с биологическими объектами было сформулировано принципиальное положение, заключающееся в том, что биологические эффекты в ММ-диапазоне носят нетепловой (неэнергетический) характер, то есть обладают всеми признаками информационного воздействия (Бецкий и др., 2009).

Так как КВЧ-излучение уже довольно широко применяется в медицинской практике, встает вопрос о его возможном мутагенном действии. Работ, посвященных действию КВЧ-излучения на генетический аппарат клетки, не много. Сообщалось об отсутствии генетических эффектов КВЧ-облучения у бактерий и дрожжей (Dardalhon et al., 1981). В то же время ряд исследований показал, что миллиметровые волны могут воздействовать на тонкую структуру хромосом, толерантность клеток к мутагенам и репарацию повреждений (обзор Pakhomov et al., 1998). Было показано влияние КВЧ-облучения на частоту мейотической рекомбинации у дрозофилы (Желнина и др., 2002; Чернова и др., 2002). Интересно, что КВЧ-излучение может оказывать протективное действие по отношению к мутагенному ультрафиолетовому излучению. Экспозиция обработанных ультрафиолетом клеток *E. coli* к КВЧ-излучению (61 ГГц) повышала выживаемость клеток (Rojavin, Ziskin, 1995). Этот эффект отсутствовал, если порядок обработок был обратным, т.е. вначале проводили облучение миллиметровыми волнами, а затем ультрафиолетом. Авторы предполагают, что механизм этого эффекта состоит в прямой или непрямой активации темновой репарационной системы.

В задачу настоящего исследования входило изучение возможного мутагенного эффекта КВЧ-излучения прибора «Гармонизатор CGI» (производитель ООО "Триомед", г. Санкт-Петербург) с использованием модельного объекта – дрозофилы (*Drosophila melanogaster*).

Материал и методы.

Для эксперимента использовали мух линии дикого типа *Canton-S* и линии *C(1)DX, y f/Y*. Самки последней несут сцепленные X-хромосомы, маркированные мутациями *yellow* (*y*, желтое тело) и *forked* (*f*, раздвоенные щетинки), а также Y-хромосому. Самцов линии дикого типа собирали с использованием холодового наркоза, содержали по 25 особей при $t=25^{\circ}\text{C}$. Облучение самцов экспериментальной группы проводили на третий день после вылупления из куколки прибором «Гармонизатор CGI» (производитель ООО "Триомед", г.Санкт-Петербург) в режиме №1 в течение 2,5 часов. Стаканчики с мухами располагали на расстоянии 50 см от прибора. Контрольную группу собирали и содержали в таких же условиях, но не подвергали облучению. В тот же день самцов контрольной и экспериментальной групп скрещивали с самками *C(1)DX, y f/Y* (10 самок x 10 самцов), всего было заложено по 25 скрещиваний для каждой группы. Каждые 2 дня самцов отсаживали от ранее оплодотворенных ими самок (последних ликвидировали) и перемещали на свежую среду, вновь скрещивая с девственными самками. Таким образом было получено 7 последовательных 2-дневных кладок яиц. В отличие от кладок, полученных простой пересадкой на новую среду тех же самцов и самок (что имело место в предыдущем эксперименте), кладки, полученные в результате последовательных скрещиваний одних и тех же самцов с новыми девственными самками, мы далее называем брудями (от англ. brood). Количество яиц в каждой кладке подсчитывали после удаления родителей, далее учитывали число окуклившихся особей и, после вылупления потомства, - число самок и самцов в каждой кладке.

Последовательные стадии проведения эксперимента показаны на Рис. 1, схема скрещивания – на Рис. 2.

Для каждого стаканчика в каждой кладке вычисляли долю от числа отложенных яиц: окуклившихся особей, числа вылупившихся самок и самцов; а также долю самцов от числа вылупившихся особей. Сравнения этих переменных проводили двухфакторным дисперсионным анализом (модель с взаимодействием) с помощью статистического пакета Statistica 8.0. Первым фактором выступало наличие или отсутствие облучения (опыт-контроль), вторым – последовательные бруды, т.е. стадии зрелости клеток мужского зародышевого пути, на которые воздействовало облучение.

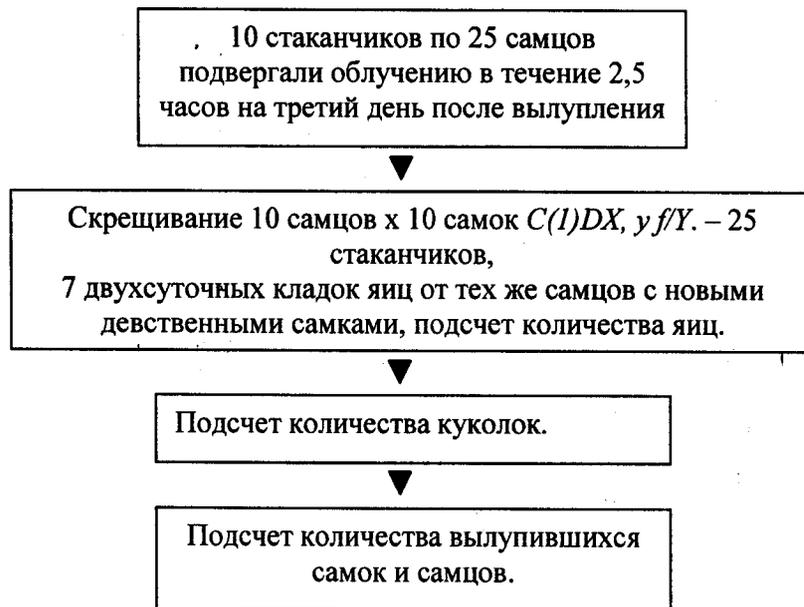


Рис. 1. Последовательные стадии проведения эксперимента. Контрольная группа проходила все те же стадии, но без облучения.

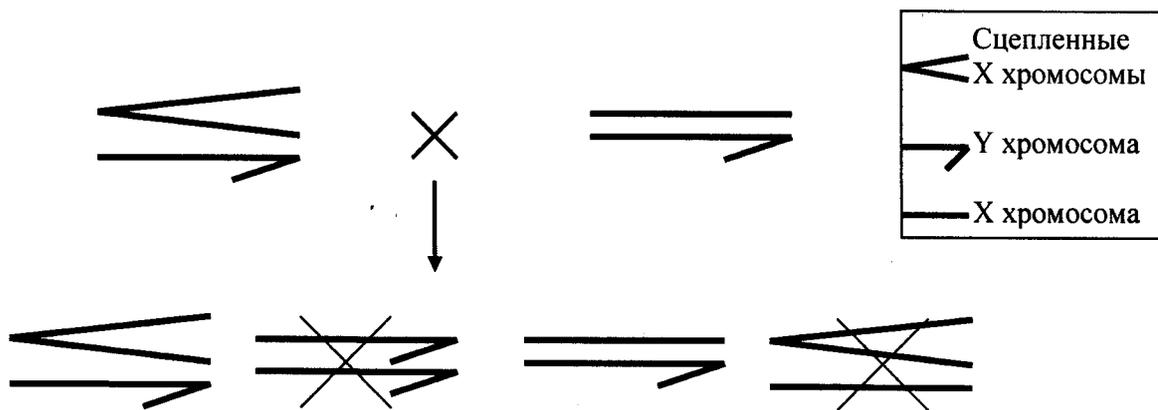


Рис. 2. Схема скрещиваний самок $C(1)DX, y f/Y$ с самцами дикого типа. Самки несут сцепленные X-хромосомы и Y-хромосому, самцы – нормальные X и Y хромосомы. Потомки, получившие из половых хромосом только 2 Y-хромосомы или тройной набор X-хромосом (2 сцепленные + 1 нормальная) погибают. X-хромосома наследуется сыновьями от отца.

Результаты и обсуждение

Для анализа влияния КВЧ-излучения на вероятность возникновения рецессивных летальных мутаций в X-хромосоме использовали скрещивание, представленное на Рис. 2. X-хромосома, подвергнутая действию излучения в клетках зародышевого пути родительских самцов, передается от них к сыновьям, оставаясь в гемизиготном состоянии. Если излучение вызывает в ней летальные мутации, то это проявляется в виде повышенной смертности самцов-потомков. Самки получают сцепленные X-хромосомы от матери, которая не подвергалась действию излучения. В случае мутагенности излучения доля самцов в потомстве облученных самцов (опыт) должна быть снижена по сравнению с контролем (без облучения).

Соотношение полов в виде доли самцов от общего числа особей в семи последовательных двухдневных брудах представлено на Рис. 3.

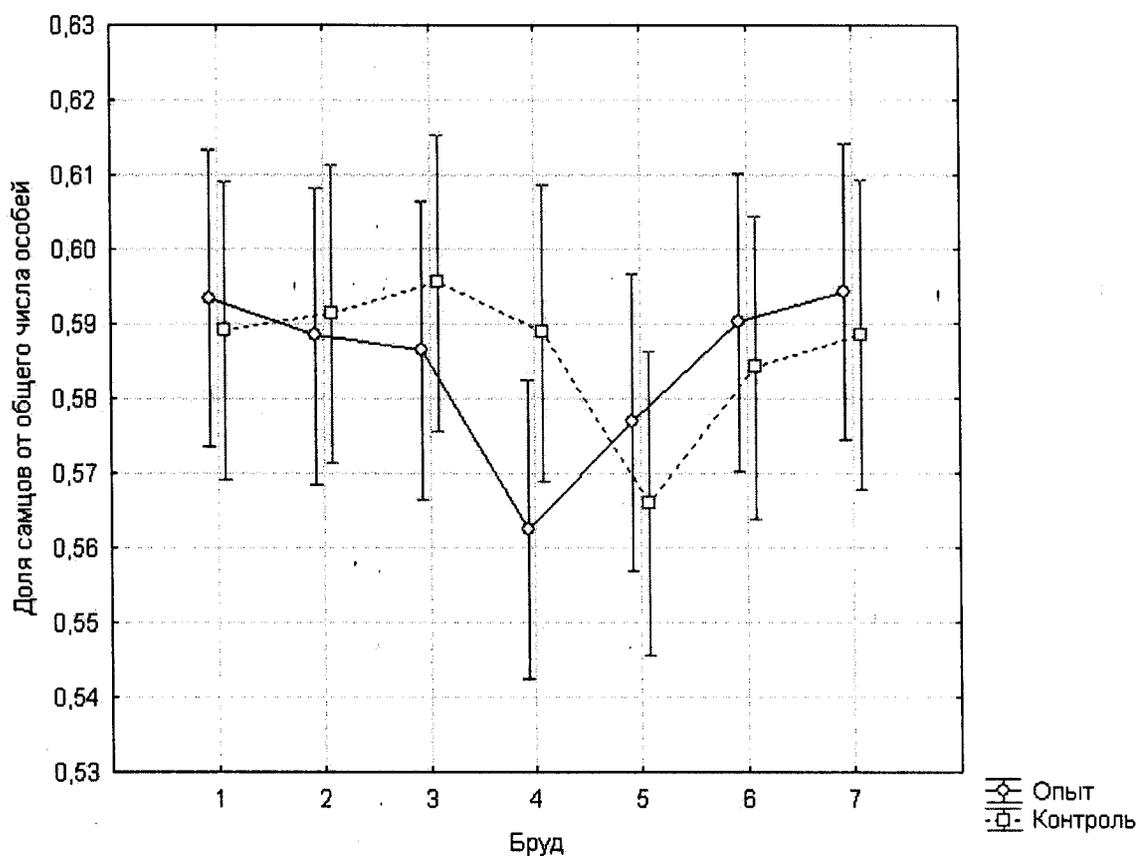


Рис. 3. Соотношение полов в опытной (КВЧ-облучение) и контрольной группах. Здесь и далее показаны средние значения с 95-процентными доверительными интервалами. Остальные объяснения в тексте.

Таблица 1. Двухфакторный дисперсионный анализ для доли самцов от общего числа особей

Фактор	SS	df	MS	F	p
Точка отсчета (отличие от нуля)	118,4970	1	118,4970	46144,31	0,000000
Облучение	0,0002	1	0,0002	0,09	0,765280
Бруд	0,0205	6	0,0034	1,33	0,242671
Взаимодействие	0,0121	6	0,0020	0,78	0,583175
Ошибка	0,8526	332	0,0026		

SS – сумма квадратов, df – степени свободы, MS – средний квадрат, F – F-отношение, p – вероятность нулевой гипотезы.

Табл. 1, представляющая результаты двухфакторного дисперсионного анализа, показывает, что облучение не оказывает влияния на соотношение полов ($p=0,77$). Не наблюдается также достоверных изменений этого параметра в ряду последовательных брудов ($p=0,24$). Отсутствует и значимое взаимодействие между двумя факторами ($p=0,58$). Таким образом, излучение не вызывает увеличения частоты рецессивных летальных мутаций в X-хромосоме. Обращает на себя внимание, что доля самцов и в опыте, и в контроле выше 0,5. Это объясняется сниженной, по сравнению с самцами, выживаемостью самок, которые несут в составе сцепленного X-хромосомом рецессивные видимые мутации.

Излучение могло вызвать и доминантные летальные мутации. При возникновении доминантных летальных мутаций в аутосомах (неполовых хромосомах) в потомстве должна наблюдаться повышенная смертность и самцов, и самок в опыте по сравнению с контролем. Доля выживших самцов и самок от общего числа яиц представлена на Рис. 4 и 5, а результаты двухфакторного дисперсионного анализа в табл. 2 и 3. И для самцов, и для самок значимой оказалась зависимость от номера бруда. Наименьшая выживаемость наблюдалась в третьем бруде, показывая что ранние сперматиды и поздние сперматоциты более чувствительны к действию каких-то факторов, вызывающих доминантные летальные мутации. Однако КВЧ-облучение к этим факторам не относится, поскольку дисперсионный анализ не обнаруживает достоверного влияния ни самого облучения, ни его взаимодействия с номером бруда.

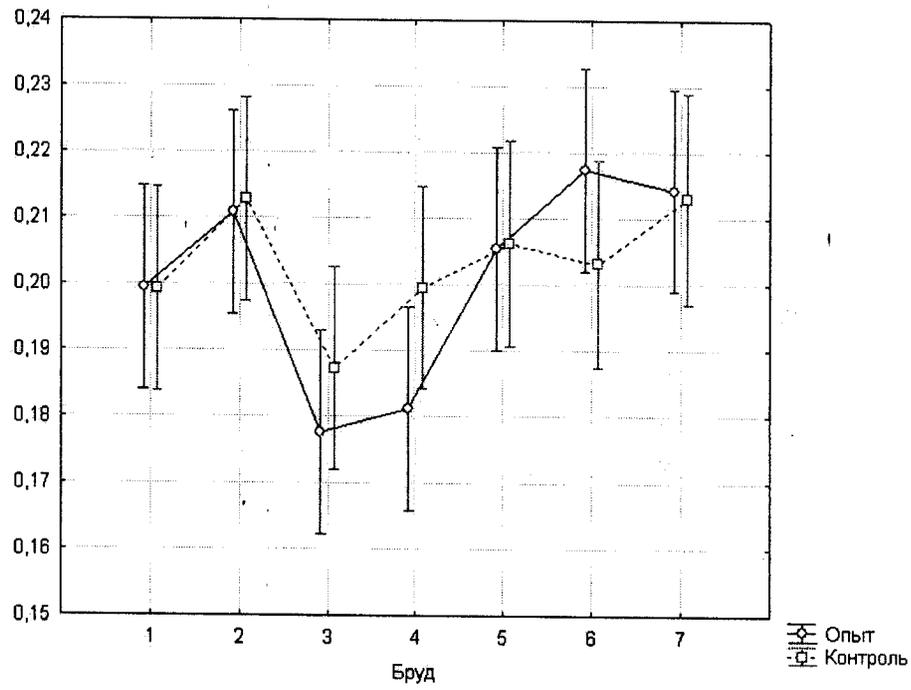


Рис. 4. Доля выживших самцов от общего числа яиц.

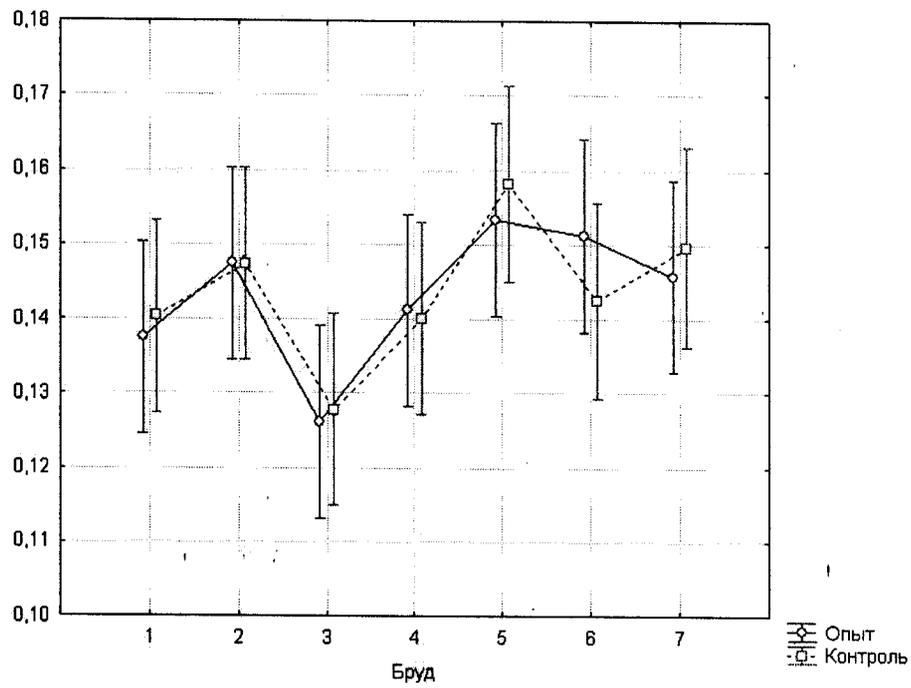


Рис. 5. Доля выживших самок от общего числа яиц.

Таблица 2. Двухфакторный дисперсионный анализ для доли выживших самцов от общего числа яиц

Фактор	SS	df	MS	F	p
Точка отсчета (отличие от нуля)	14,10517	1	14,10517	9260,599	0,000000
Облучение	0,00040	1	0,00040	0,260	0,610379
Бруд	0,04161	6	0,00693	4,553	0,000187
Взаимодействие	0,00748	6	0,00125	0,819	0,555761
Ошибка	0,50568	332	0,00152		

Таблица 3. Двухфакторный дисперсионный анализ для доли выживших самок от общего числа яиц

Фактор	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Точка отсчета (отличие от нуля)	7,116113	1	7,116113	6606,175	0,000000
Облучение	0,000019	1	0,000019	0,018	0,893525
Бруд	0,024638	6	0,004106	3,812	0,001090
Взаимодействие	0,001527	6	0,000254	0,236	0,964458
Ошибка	0,357627	332	0,001077		

Таблица 4. Двухфакторный дисперсионный анализ для доли выживших самцов от общего числа куколок

Фактор	SS	df	MS	F	p
Точка отсчета (отличие от нуля)	74,68847	1	74,68847	18246,30	0,000000
Облучение	0,00029	1	0,00029	0,07	0,790205
Бруд	0,22714	6	0,03786	9,25	0,000000
Взаимодействие	0,05647	6	0,00941	2,30	0,034483
Ошибка	1,35899	332	0,00409		

Таблица 5. Двухфакторный дисперсионный анализ для доли выживших самок от общего числа куколок

Фактор	SS	df	MS	F	p
Точка отсчета (отличие от нуля)	37,43962	1	37,43962	13695,59	0,000000
Облучение	0,00010	1	0,00010	0,04	0,845167
Бруд	0,10935	6	0,01822	6,67	0,000001
Взаимодействие	0,04096	6	0,00683	2,50	0,022346
Ошибка	0,90759	332	0,00273		

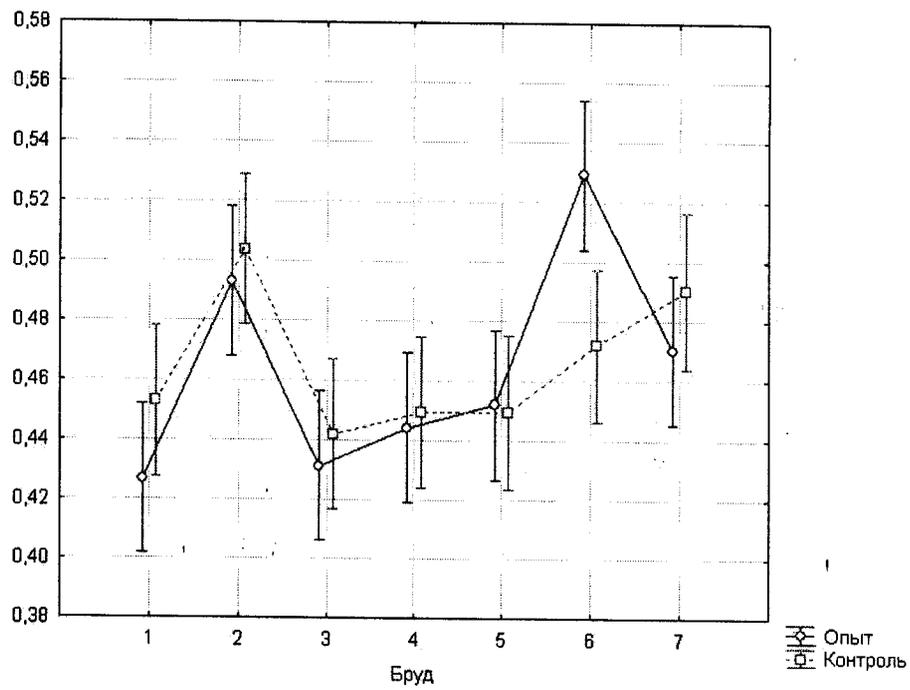


Рис. 6. Доля выживших самцов от общего числа куколок.

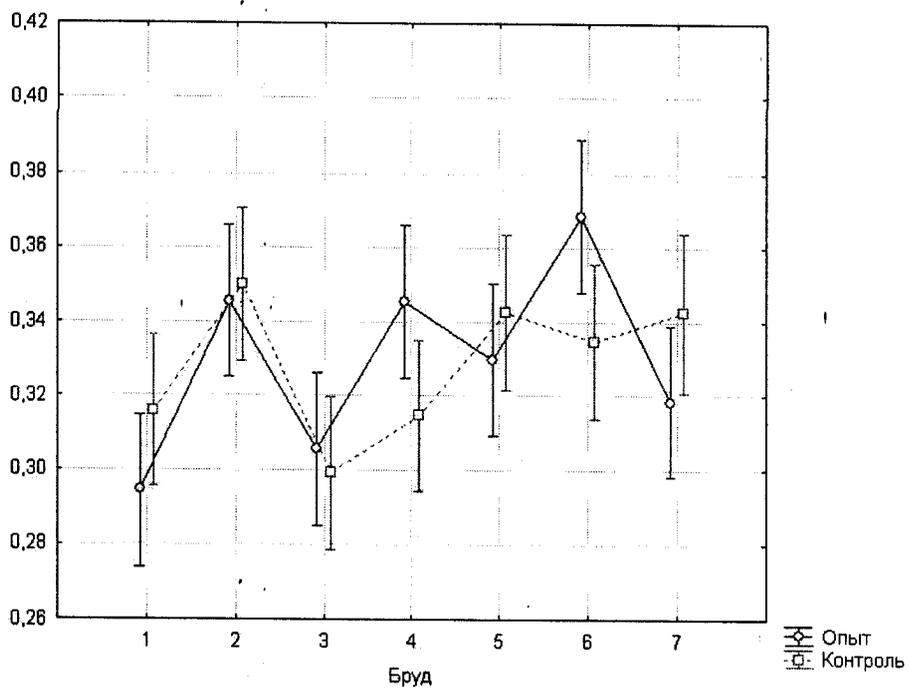


Рис. 7. Доля выживших самок от общего числа куколок.

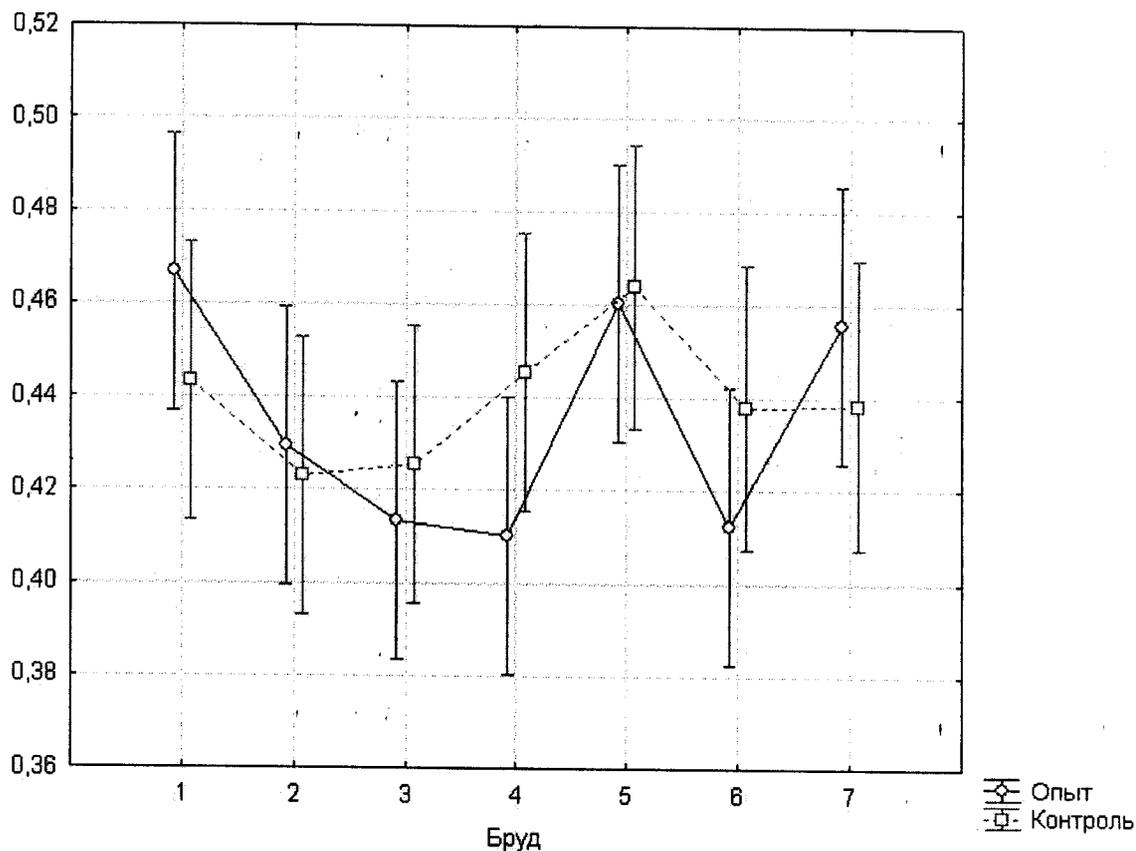


Рис. 8. Доля окуклившихся особей от общего числа яиц.

Таблица 6. Двухфакторный дисперсионный анализ для доли окуклившихся особей от общего числа яиц

Фактор	SS	df	MS	F	p
Точка отсчета (отличие от нуля)	66,17282	1	66,17282	11462,30	0,000000
Облучение	0,00152	1	0,00152	0,26	0,608240
Бруд	0,08416	6	0,01403	2,43	0,025932
Взаимодействие	0,03510	6	0,00585	1,01	0,416349
Ошибка	1,91666	332	0,00577		

При оценке доли выживших особей от общего числа куколок (Рис. 6, 7) опять же влияние КВЧ-облучения было недостоверным, но достоверным оказалось взаимодействие двух факторов (Табл. 4, 5), показывающее, что в разных брудах облучение действует по-разному. Действительно, в отличие от остальных брудов, в шестом бруде наблюдалось достоверное увеличение доли выживших самцов от общего числа куколок в опыте, по сравнению с контролем ($p=0,008331$, двусторонний t -критерий). Для самок достоверных отличий опыта от контроля в пределах каждого бруда не выявлено. Таким образом, единственным обнаруженным достоверным эффектом КВЧ-облучения является

увеличение доли выживших, самцов от общего числа куколок в шестом бруде, что соответствует действию облучения на поздние сперматогонии (Auerbach, 1957; Chandley, Bateman, 1962; Inagaki et al., 1977). Так как этот эффект проявляется только при оценке доли выживших особей относительно числа куколок (Рис. 6), но не яиц (Рис. 4), то можно сделать вывод, что при действии на делящиеся митозом сперматогонии КВЧ-облучение снижает частоту возникновения доминантных летальных мутаций, вызывающих смерть у самцов на стадии метаморфоза (развития куколки). Это подтверждается тем фактом, что дисперсионный анализ для доли окуклившихся особей от числа отложенных яиц не выявляет достоверных эффектов ни облучения, ни его взаимодействия с номером бруда (Рис. 8, табл. 6).

Все первичные данные представлены в прилагаемом файле гармонизатор2.xls.

Заключение

Результаты эксперимента свидетельствуют об отсутствии мутагенного действия КВЧ-излучения. При действии на делящиеся митозом сперматогонии КВЧ-облучение (Гармонизатор «CGI») снижает частоту возникновения доминантных летальных мутаций, вызывающих смерть у самцов на стадии метаморфоза (развития куколки), т.е. оказывает протективное действие.

Литература

Бецкий О.В., Кислов В.В., Лебедева Н.Н. Миллиметровые волны и живые системы. - М, «Сайнс пресс», 2004, - 271 с.

Бецкий О.В., Котровская Т.И., Лебедева Н.Н. Миллиметровые волны в биологии и медицине. Материалы III Всероссийской конференции «Радиолокация и радиосвязь» -ИРЭ РАН, 26-30 октября 2009 г. С. 146-150.

Девятков Н.Д., Голант М.Б., Бецкий О.В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности. М., Радио и связь, 1991, 169 с.

Девятков Н.Д., Голант М.Б., Бецкий О.В. Особенности медико-биологического применения миллиметровых волн. М., ИРЭ РАН.- 1994,-164 с.

Желнина Н.В., Чернова Г.В., Соловьева Т.Е. Рекомбинационные эффекты электромагнитного излучения крайне высокой частоты. Труды второй международной конференции "Неионизирующие электромагнитные излучения в биологии и медицине". Калуга: КГПУ им. Циолковского, 2002. С. 104-110.

Миллиметровые волны в биологии и медицине. Библиография. - М.: ЗАО "МТА-КВЧ". - 2007.-440 с.

Чернова Г.В., Желнина Н.В., Перебоева Е.С. Некоторые результаты изучения рекомбинационной эффективности электромагнитного излучения миллиметрового диапазона длин волн. Труды второй международной конференции "Неионизирующие электромагнитные излучения в биологии и медицине (БИО-ЭМИ-2002)". Калуга, 2002. С. 40-46.

Auerbach C. 1957. The study of chemical mutagens by brood pattern analysis and by the scoring of ratios between visible and lethal mutations. Z. Vererb. Bd. 88: 619-625.

Chandley A.C., Bateman A.J. 1962. Timing of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* using tritiated thymidine, Nature (London). 193: 299-300.

Dardalhon M., Auerbeck D., Berteaud A.J. Studies on possible genetic effects of microwaves in prokaryotic and eukaryotic cells. Radiat. Environ. Biophys. 1981. V. 20. P. 37-51.

Inagaki E., Uchibori M., Miyamoto T., Fujikawa K., Nakao Y. 1977. The frequency pattern of the *dumpy* mutations induced by X-rays in different stages of spermatogenesis of *Drosophila*. Japan J. Genetics. 52 (3): 207-216.

Pakhomov A.G., Akyel Y., Pakhomova O.N., Stuck B.E., Murphy M.R. Current state and implications of research on biological effects of millimeter waves: a review of the literature. Bioelectromagnetics. 1998. V.19, №7. P. 397-413.

Rojavin M.A., Ziskin M.C. Effect of millimeter waves on survival of UVC-exposed *Escherichia coli*. Bioelectromagnetics. 1995. V. 16. P. 188-196.