

Д.С. Песня, А.В. Романовский, И.М. Прохорова

Разработка методики для оценки влияния УВЧ-излучения сотовых телефонов и других приборов с ЭМИ РЧ на организмы *in vivo*

Исследовано влияние УВЧ-излучения сотового телефона на живые клетки. Оценка мутагенного эффекта проводилась по частоте мутаций в меристеме *Allium* сера. Применялись ана-телофазный и микроядерный тесты. Показано, что действие сотового телефона индуцирует грубые хромосомные нарушения. Степень повреждения зависит от продолжительности облучения. Предложен метод оценки хромосомных aberrаций для изучения мутагенности ЭМИ УВЧ.

Ключевые слова: микроядра, тест на луке, ана-телофазный метод, микроядерный тест, меристематические клетки, хромосомные aberrации, ЭМИ, сотовый телефон, облучение, *Allium* сера, *Allium* test, мутации.

D.S. Pesnya, A.V. Romanovsky, I.M. Prokhorova

Working out Technique for Estimating the Influence of UHF-Radiation of Cell Telephones and Other Devices with EMR RF on Organisms *in vivo*

This study was conducted in order to estimate the effects of mobile phone UHF-radiation on the living cells. For studying mutagenic effect was chosen *Allium* test. The ana-telophase chromosome aberration assay and the micronucleus test were used. The received results showed that mobile phone irradiation causes damages of a DNA. Degree of influence depends on duration of mobile phone exposure. Was proposed the evaluation method of chromosomal aberrations to study mutagenicity of EMR UHF.

Key words: micronuclei, *Allium* test, ana-telophase assay, micronucleus test, meristematic cells, chromosome aberrations, EMR, cell phone, irradiation, *in vivo*, *Allium* sulfur, mutations.

Введение

Проблема влияния на живые объекты ЭМП (электромагнитных полей) и ЭМИ (электромагнитных излучений), в том числе РЧ (радиочастотного) диапазона как фактора производственной среды и среды обитания, не только продолжает сохранять свою актуальность, но и приобретает особую значимость по мере дальнейшего развития научно-технической революции [5].

При вступлении нашей цивилизации в третье тысячелетие сотовые телефоны стали одним из важнейших факторов внешней среды, воздействующих на человека. Влияние ЭМИ УВЧ (ультра высокой частоты) сотовых телефонов нельзя недооценивать. Такое воздействие может не только негативно сказаться на функциях органов, но и вызывать генетические изменения в клетках [7, 14, 18]. Следовательно, излучение сотового телефона является физическим мутагеном – фактором, способным вызывать нарушения ДНК – мутации [7, 11, 12].

Следует отметить, что УВЧ-излучение повреждает генетический материал не только в соматических клетках, но и в половых, значит, нару-

шения будут передаваться следующему поколению и проявляться в виде наследственных и онкологических болезней, преждевременного старения клеток [14, 18, 11, 7]. Генный аппарат устроен сходным образом у всех эукариот, поэтому неионизирующее излучение влияет на хромосомы разных групп организмов сходным образом [5, 6, 7, 11, 14].

Согласно данным литературы, повреждение генетического материала может происходить путем активации УВЧ-излучением ряда процессов: образование свободных радикалов (окислительный стресс), микротермальные эффекты в клеточных структурах (экспрессия генов теплового шока), воздействие на ДНК-репарационные механизмы и др. [6, 8, 9, 12, 15].

Широкое исследование влияния сотовых телефонов проводится за рубежом, однако результаты противоречивые [11, 12, 15, 19, 20]. При этом применяемые методики основаны на использовании различных, зачастую специфических тест-объектах, которые варьируют по чувствительности, и результаты поэтому оказываются несопоставимыми [15]. В России это направле-

ние не развито, работы отечественных ученых единичны и представлены в зарубежных изданиях [20]. Поэтому представляется актуальным вести изучение по данной тематике.

Целью нашего исследования являлась разработка методики оценки последствий воздействия ЭМИ УВЧ на корневые меристемы лука вида *Allium cepa L.*

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлась меристема проростков корешков лука посевного – *Allium cepa* сорта Штутгартен, который впервые предложен Шведской Королевской Академией Наук как стандартный тест-объект, хорошо зарекомендовавший себя в течение длительного применения и известный как *Allium test* [16].

Выбранный тест на растительном организме экономичен, так как на нем (в отличие от микроорганизмов) можно регистрировать все типы генетических повреждений: геномные, хромосомные, генные. Позволяет выявлять как мутагены, непосредственно повреждающие ДНК, так и промутагены, т.е. факторы генетически безопасные, но приобретающие мутагенную активность в процессе метаболизма в организме [1, 2, 11, 16].

Allium test рекомендован экспертами ВОЗ как стандарт в цитогенетическом мониторинге окружающей среды, т.к. результаты, полученные на данном тесте, показывают корреляцию с тестами на других организмах: водорослях, растениях, насекомых, в том числе и млекопитающих [10, 16, 17].

Чувствительность данного тест-объекта сходна с чувствительностью клеток китайского хомька и клеток лимфоцитов человека – аналогичными тест-объектами для оценки факторов окружающей среды [16].

Для создания фактора электромагнитного излучения в нашем исследовании использовались персональные сотовые телефоны компании Motorola, модели C115 и C650 с определенными характеристиками излучения радиосигнала. Производителем заявлено, что максимальный удельный коэффициент поглощения (SAR) для C115 составляет 0,88 Вт/кг, а для C650 - 1,4 Вт/кг.

Были проведены опыты с различными параметрами мощности излучения, времени экспозиции. Всего поставлено четыре варианта опыта. В каждом опыте луковицы помещались в стаканчики с дистиллированной водой для проращива-

ния корешков на 24 часа. Затем корневые меристемы луковиц помещались на расстояние 1 см как от задней, так и от передней панели телефона и подвергались облучению в режиме связи. Луковицы проращивались еще 3 дня. После облучения корни фиксировались по методике [2].

Первый вариант: экспозиция шести луковиц подвергалась облучению по несколько часов каждый день, время облучения варьировалось (суммарно 17 часов). Использовался телефон Motorola C 115 и применялся ана-телофазный анализ препаратов.

Второй вариант: экспозиция шести луковиц подвергалась облучению по 1 часу в день (суммарно 3 часа). Использовался телефон Motorola C 115 и применялся ана-телофазный анализ препаратов.

Третий вариант: экспозиция шести луковиц подвергалась облучению по 1 часу в день (суммарно 3 часа). Использовался телефон Motorola C 650 и применялись ана-телофазный и микроядерный анализы препаратов.

Четвертый вариант: экспозиция шести луковиц подвергалась облучению по 3 часа в день (суммарно 9 часов). Использовался телефон Motorola C 650 и применялись ана-телофазный и микроядерный анализы препаратов.

Каждый опыт сопровождался интактным контролем из 5 луковиц (всего 20).

Готовили препараты ($\Sigma n=243$; не менее 30 препаратов для каждого варианта опыта и соответствующего контроля) давленных корневых меристем согласно методике [2].

Повреждения в клетках оценивали под микроскопом с использованием ана-телофазного метода и микроядерного анализа [2, 3, 4]. Ана-телофазный метод является экономичным и достаточно чувствительным для определения, мутагенен или не мутагенен фактор. Ана-телофазный метод позволяет изучать частоту мутаций путем учета суммы хромосомных aberrаций (XA) и отставаний хромосом (отс.) на стадиях анафазы и телофазы к общей сумме ана-телофаз на препарате ($\Sigma \text{отс.} + \text{XA}$, %) [2]. Хромосомные aberrации – это нарушения структуры хромосом, включают в себя мосты и фрагменты, являющиеся следствием делеций и транслокаций. Отставания хромосом связаны с повреждением веретена деления или с нарушением поведения хромосом на веретене деления [1].

Так же одним из надежных методов выявления мутагенных факторов является микроядерный тест, который служит для установления час-

тоты микроядер в интерфазных клетках. При этом ведется учет микроядер в интерфазных клетках к общей сумме интерфаз на препарате (Мя, %) [3, 4]. Микроядра состоят главным образом из ацентрических фрагментов, но могут быть образованы и целой хромосомой в результате не расхождения, вызванного дефектом веретена деления. Микроядра могут образовываться в результате деструкции интерфазного хроматина, то есть еще до деления клеток [3]. Микроядерный тест позволяет расширить диапазон изучаемых клеток, что делает метод еще более экспрессным и экономичным. Показана применимость микроядерного анализа для исследования ионизирующих и неионизирующих излучений [3, 4, 12].

Одновременное использование двух тестов на одном препарате позволяет анализировать всю совокупность клеток, что повышает разрешающую способность каждого метода, а следовательно, снижает вероятность получения ложноотрицательных результатов.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного пакета «Statistica». За уровень значимых принимали значения при $p < 0,05$.

Результаты вариантов опытов № 1 и 2:

Мутагенный эффект оценивался по ВМЭ (выраженность мутагенного эффекта). ВМЭ показывает, во сколько раз частота хромосомных aberrаций в опытных вариантах превышает контрольный уровень [1, 2]. Результат изучения хромосомных aberrаций вариантов опытов №1 и №2 в образцах *A.sepa*, разделенных на три группы «0 часов», «3 часа» и «17 часов» - по времени влияния ЭМИ УВЧ телефона, приведен на рис. 1 и в табл. 1.

Таблица 1

Данные по частоте хромосомных aberrаций и отставаний ($\Sigma\text{отс.}+\text{ХА},\%$) и выраженность мутагенного эффекта (ВМЭ) при 3 и 17-часовом облучении

Вариант опыта	$\Sigma\text{отс.}+\text{ХА},\%$ ($X \pm m$)	ВМЭ, балл
0 часов	0,3 ± 0,19	
3 часа	1,8 ± 0,50	6
17 часов	3,2 ± 1,18	10

Установлено, что уровень мутаций для 3-часового облучения в 6 раз превышает контрольный уровень. При 17-часовом облучении частота мутаций достигла уже 10-кратного превышения контрольного значения. Все варианты опыта достоверно отличаются друг от друга – рис. 1 и табл. 1.

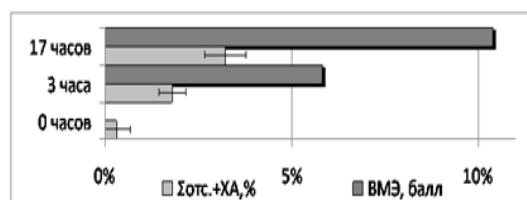


Рис.1 Сравнение уровня мутаций ($\Sigma\text{отс.}+\text{ХА},\%$) и выраженность мутагенного эффекта (ВМЭ) при 3- и 17- часовом облучении

Результаты вариантов опытов № 3 и 4:

Результат изучения микроядер в образцах препаратов *A.sepa*, разделенных на три группы («контроль», «3 часа» и «9 часов»), по времени влияния излучения приведен на рис. 2 и табл. 2.

Таблица 2

Данные по частоте возникновения микроядер (Мя,%) в опытных группах, облучавшихся 3 и 9 часов, и в контроле

Вариант опыта	Мя, % ($X \pm m$)
0 часов	0,01 ± 0,013
3 часа	0,18 ± 0,045
9 часов	0,20 ± 0,066

На диаграмме рис. 2 явно прослеживается закономерность возрастания частоты микроядер с увеличением продолжительности воздействия ЭМИ на живой организм. По сравнению с контрольной группой в опытных группах, облучавшихся суммарно 3 и 9 часов, частота возникновения микроядер возросла соответственно в 13 и 15 раз. Таким образом, чем дольше и чаще происходит воздействие, тем более выраженными будут генетические изменения. Частота микроядер при 3 и 9 часах облучения статистически значимо превалирует над контрольным уровнем.

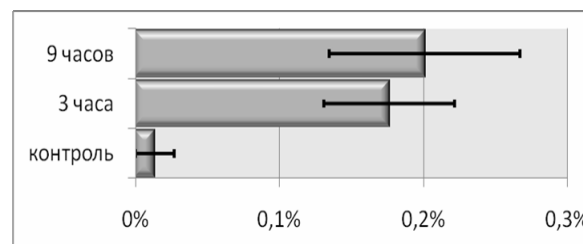


Рис. 2. Сравнение частоты возникновения микроядер (Мя,%) в опытных группах, облучавшихся 3 и 9 часов, и в контроле.

Результаты изучения хромосомных aberrаций вариантов опытов №3 и №4 в образцах *A.sepa*, разделенных на три группы («контроль», «3 часа» и «9 часов») по времени влияния УВЧ-излучения телефона приведен на рис. 3 и в табл. 3.

Таблица 3
Данные по частоте хромосомных aberrаций и отставаний ($\Sigma\text{отс.}+\text{ХА},\%$) в опытных группах, облучавшихся 3 и 9 часов, и в контроле

Вариант опыта	$\Sigma\text{отс.}+\text{ХА},\% (\bar{X}\pm m)$	
0 часов	0,7	$\pm 0,42$
3 часа	5,4	$\pm 1,23$
9 часов	4,6	$\pm 0,81$

На диаграмме рис. 3 видно достоверное возрастание количества генетических нарушений при длительности действия ЭМИ телефона на живой организм при 3 и 9 часах облучения. Максимум мутаций в этом варианте приходится на 3-часовую группу. В 9-часовой группе частота нарушений статистически незначимо уменьшается, по сравнению с 3-часовой. Возможно, здесь просматривается влияние репарирующих и адаптационных механизмов [13, 20]. Следует помнить, что любой адаптационный механизм основан на определенных ресурсах, которые имеют свои границы [3].

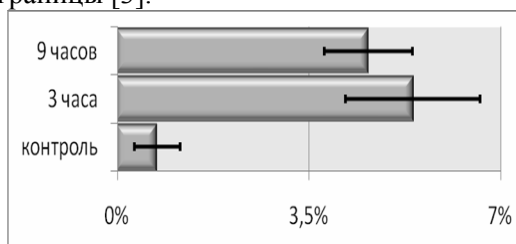


Рис. 3. Сравнение частоты хромосомных aberrаций и отставаний ($\Sigma\text{отс.}+\text{ХА},\%$) в опытных группах, облучавшихся 3 и 9 часов, и в контроле.

На основании полученных результатов были сделаны выводы о возможности использования системы биотестирования *Allium test* по предложенной нами методике для оценки влияния микроволнового излучения малой интенсивности.

Выводы

Проведено исследование неионизирующего излучения сотового телефона на клетки корневой меристемы *Allium cepa*. Во всех вариантах опытов зарегистрирован мутагенный эффект от воздействия сотового телефона.

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

УВЧ-излучение сотового телефона стандарта GSM при времени экспозиции тест-объекта от 3 до 17 часов увеличивает частоту хромосомных aberrаций, которая превышает контрольный уровень в 6-10 раз. Следовательно, УВЧ-излучение сотовых телефонов обладает мутагенным эффектом. Частота нарушений возрастает с увеличением продолжительности воздействия.

УВЧ-излучение сотовых телефонов индуцирует в меристеме *Allium cepa* появление фрагментов и мостов, которые являются следствием грубых структурных нарушений хромосом, а также отставания хромосом, что говорит об изменении поведения хромосом на веретене деления.

УВЧ-излучение сотовых телефонов индуцирует в меристеме *Allium cepa* появление микроядер, которые регистрируются в интерфазных клетках. Это позволяет одновременно вести анализ на одном препарате с использованием двух тестов, что повышает достоверность результатов.

Предложенная нами методика является чувствительной и достаточно экономичной для оценки мутагенного эффекта и может быть рекомендована для оценки воздействия ЭМИ УВЧ на живые объекты.

Библиографический список

1. Прохорова, И.М., Ковалева, М.И., Фомичева, А.Н., Бабаназарова, О.В. Пространственная и временная динамика мутагенной активности воды оз.Неро [Текст] / И.М. Прохорова и др. - Биология внутренних вод; Ин-т биологии внутр. вод им. И.Д. Папанина РАН. - М.: Наука, 2008. - 59 с.
2. Прохорова, И.М., Фомичева, А.Н., Ковалева, М.И. Генетическая токсикология: [Текст]: учеб. Пособие, И.М. Прохорова и др. - ЯрГУ: Ярославль, 2005. - 132 с.
3. Калаев, В.Н. Цитогенетические реакции лиственных древесных растений на стрессовые условия и перспективы их использования для оценки генотоксичности окружающей среды [Текст] / В.Н. Калаев. - Воронеж, 2009. - 414 с.
4. Калаев, В.Н., Карпова, С.С. Цитогенетический мониторинг: методы оценки загрязнения окружающей среды и состояния генетического аппарата организма [Текст] / В.Н. Калаев. - Воронеж, 2004. - 80 стр.
5. Холодов, Ю.А. Шестой незримый океан [Текст] / Ю.А. Холодов. - М.: Знание, 1978. - 112 с.
6. Sharma V.P., Singh H.P., Kohli R.K., Batish D.R. Mobile phone radiation inhibits *Vigna radiata* root growth by inducing oxidative stress [Text] / V.P. Sharma et al. - Sci. Total Environ, V. 407 (21), 2009. - p. 5543 - 5547.
7. Diem E., Schwarz C., Adlkofer F., Jahn O., Rüdiger H. Non-thermal DNA breakage by mobile-phone radiation in human fibroblasts and in GFSH-R17 rat granulosa cells in vitro [Text] / E. Diem et al. - *Mutat. Res.* Vol. 583(2), 2005. - p. 178-83.
8. Toone W.M., Morgan B.A., Jones N. Redox control of AP-1-like factors in yeast and beyond [Text] / W.M. Toone et al. - *Oncogene*. V. 20(19), 2001. - p. 2336-46.
9. Vian A., Roux D., Girard S., Bonnet P., Paladian F., Davies E., Ledoigt G. Microwave Irradiation Affects Gene Expression in Plants [Text] / A. Vian et al. - *Plant Sign Behav.*, V. 1(2), 2006. - p. 67 - 70.

10. Constantin M.J., Owens E.T. Introduction and perspectives of plant genetic and cytogenetic assay [Text] / M.J. Constantin et al. – *Mutat. Res.*, M. 99, 1982. – p. 1-12.
11. Tkaleca M., Malarić K., Pavlicac M., Pevalek-Kozlina B., Vidaković-Cifreka Z. Effects of radiofrequency electromagnetic fields on germination and root meristem of *Allium cepa* L. [Text] / M. Tkaleca et al. – *Mutat. Res.* V. 672 (2), 2009. P. 76-81.
12. Ferreira A.R., Knakievicz T., Pasqualia M.A. de B., Gelaina D.P., Dal-Pizzolo F., Fernández C.E.R., Salles A.A. de A., Ferreirab H.B., Moreira J.C.F.. Ultra high frequency-electromagnetic field irradiation during pregnancy leads to an increase in erythrocytes micronuclei [Text] / A.R. Ferreira et al. - *Life Sci.* V. 80 (1), 2006. – P. 43-50.
13. Gatta L., Pinto R., Ubaldo V., Pace L., Galloni P., Lovisolo G.A., Marino C., Pioli C., Effects of in vivo exposure to GSM-modulated radiation on mouse peripheral lymphocytes [Text] / L. Gatta et al. – *Radiat. Res.* V. 160(5), 2003. – p. 600-5.
14. Agarwal A., Nisarg R. Desai, Makker K., Varghese A., Mouradi R., Sabanegh E., Sharma R. Effects of RF-EMW from cellular phones on human ejaculated semen in vitro [Text] / A. Agarwal et al. - *Fertility and Sterility*, V. 92 (4), 2009. – p. 1318-1325.
15. Ruediger H.W. Genotoxic effects of RF electromagnetic fields [Text] / H.W. Ruediger. – *Pathophys.* V. 16 (2-3), 2009. – P. 89-102.
16. Fiskesjo G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring [Text] / G. Fiskesjo. - *Hereditas.* V. 102, 1985. - P. 99-112.
17. WHO. World Health Organization monographs on selected medicinal plants [Text] / WHO. - World Health Organization. Geneva, V. 1, 1999. – p. 289.
18. Dasdag S., Akdag M.Z., Ulukaya E., Uzunlar A.K., Ocak A.R. Effect of mobile phone exposure on apoptotic glial cells and status of oxidative stress in rat brain [Text] / S. Dasdag et al. – *Electromagn. Biol. Med.* V. 28 (4), 2009. – p. 342 – 354.
19. Hintzsche H., Stopper H. Micronucleus frequency in buccal mucosa cells of mobile phone users [Text] / H. Hintzsche et al. - *Pathophys.* V. 16 (2-3), 2009. – p. 89-102.
20. Marková E., Malmgren L. O. G., Belyaev I. Y. Microwaves from Mobile Phones Inhibit 53BP1 Focus Formation in Human Stem Cells More Strongly Than in Differentiated Cells: Possible Mechanistic Link to Cancer Risk [Text] / E. Marková et al. - *Environ. Health. Perspect.* V. 118 (3). 2010. – p. 394–399.