

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ОБНИНСКИЙ ИНСТИТУТ АТОМНОЙ ЭНЕРГЕТИКИ – филиал
Федерального государственного автономного образовательного
учреждения высшего профессионального образования
«Национальный исследовательский
ядерный университет «МИФИ»
(ИАТЭ НИЯУ МИФИ)

На правах рукописи

Сарапульцева Елена Игоревна

**ПРЯМЫЕ И ОТДАЛЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ РАДИАЦИОННОГО
ОБЛУЧЕНИЯ У ПРОСТЕЙШИХ И РАКООБРАЗНЫХ**

03.01.01 – Радиобиология

Диссертация на соискание
ученой степени доктора биологических наук

Обнинск – 2015

СОДЕРЖАНИЕ

Список условных обозначений.....	5
Введение.....	6
Глава 1 Биологические эффекты радиационного и химического загрязнения водной среды у низших гидробионтов.....	16
1.1 Действие физических и химических факторов на простейших и ракообразных.....	16
1.2 Особенности строения, размножения и функционирования ветвистоусых рачков дафний, используемые в экотоксикологии, радиобиологии и радиоэкологии.....	23
1.3 Эффекты радиационного воздействия на ракообразных.....	28
1.3.1 Радиационно-индуцированные мутации у ракообразных.....	28
1.3.2 Радиационно-индуцированный эффект изменения плодовитости у ракообразных.....	32
1.3.3 Радиационно-индуцированный эффект изменения выживаемости у ракообразных.....	34
1.3.4 Влияние радиации на заболеваемость у ракообразных.....	36
1.3.4.1 Действие радиации на процессы роста и дыхания у ракообразных.....	36
1.3.4.2 Действие радиации на изменение морфологических показателей и поведения у ракообразных.....	38
1.4 Особенности строения, размножения и функционирования простейших, используемые в экотоксикологии, радиобиологии и радиоэкологии.....	40
1.5 Поведенческая активность у простейших.....	47
Глава 2 Место биотестирования в системе радиационного мониторинга водной среды.....	54
Глава 3 Биологические эффекты и механизмы низкоинтенсивного неионизирующего излучения.....	60
Заключение к обзору литературы.....	72

Глава 4 Материалы и методы, используемые в работе	76
4.1 Описание тест-культур и методик культивирования.....	76
4.1.1 Модель одноклеточного организма инфузории <i>Spirostomum ambiguum</i>	76
4.1.2 Модель многоклеточного организма низшего ракообразного <i>Daphnia magna</i>	77
4.2 Схема экспериментов	79
4.2.1 Установки для облучения γ -квантами. Дозиметрический контроль	79
4.2.2 Схема облучения γ -квантами	81
4.2.3 Генераторные установки низкоинтенсивного радиочастотного поля. Дозиметрический контроль.....	82
4.2.4 Схема низкоинтенсивного радиочастотного облучения.....	89
4.3 Методы анализа функциональных изменений у простейших и ракообразных.....	91
4.3.1 Исследования на инфузориях.....	91
4.3.2 Исследования на ракообразных	95
4.4 Методы биохимического анализа на ракообразных	100
4.4.1 Анализ нарушения метаболизма МТТ-методом	100
4.4.2 Анализ изменения уровня свободных радикалов методом привитой сополимеризации.....	102
4.4.3 Анализ изменения уровня метилирования ДНК методом жидкостной хроматографии.....	103
Глава 5 Результаты экспериментов и их обсуждение	108
5.1 Биологические эффекты γ -излучения у инфузорий и ракообразных.....	108
5.1.1 Прямые и отдаленные радиационно-индуцированные эффекты у инфузорий.....	108
5.1.1.1 Влияние радиации на жизнеспособность инфузорий в нескольких поколениях	108

5.1.1.2 Влияние радиации на изменение поведенческой активности инфузорий в нескольких поколениях	114
5.1.1.3 Радиационно-индуцированные морфометрические изменения у инфузорий в нескольких поколениях.....	121
5.1.2 Прямые и отдаленные радиационно-индуцированные эффекты у ракообразных	124
5.1.2.1 Радиационно-индуцированный эффект изменения выживаемости ракообразных в нескольких поколениях	124
5.1.2.2 Радиационно-индуцированный эффект изменения продолжительности жизни у ракообразных в нескольких поколениях	131
5.1.2.3 Влияние радиации на изменение плодовитости у ракообразных в нескольких поколениях	137
5.2 Прямые и отдаленные эффекты радиочастотного излучения у инфузорий <i>S. ambiguum</i>	148
5.2.1 Радиационно-индуцированные изменение двигательной активности.....	148
5.2.2 Морфометрические изменения у простейших	159
5.3. Анализ прямых и отдаленных радиационно-индуцированных биохимических эффектов у ракообразных	164
5.3.1 Изменения биохимических процессов у ракообразных в нескольких поколениях	165
5.3.2 Изменения свободнорадикальных процессов у ракообразных в нескольких поколениях	169
5.3.3 Эпигенетические изменения у ракообразных в нескольких поколениях	172
Заключение	176
Выводы.....	181
Список используемых источников	183

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

ЛД₅₀ (*LD*₅₀) – полумлетальная доза при оценке выживаемости

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромид

НИ РЧ – низкоинтенсивное радиочастотное (поле)

ОП – оптическая плотность

ПДК – предельно допустимая концентрация

ПДУ – предельно-допустимый уровень

ППЭ – плотность потока энергии

СР – свободные радикалы

ЭМИ – электромагнитное излучение

ЭМП – электромагнитное поле

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Комплекс факторов окружающей среды природного и антропогенного происхождения, способных оказывать влияние на биологические системы, включает широкий спектр химических и физических агентов. Среди радиационных факторов значимыми в практическом отношении являются γ -излучение и радиоволны. Широкое использование ядерной энергии позволило достичь значительных успехов во многих отраслях науки и техники. При этом невозможно исключить попадание источников излучения в окружающую среду в связи с авариями на атомных объектах, захоронением радиоактивных отходов, использованием ядерных технологий в медицине, сельском хозяйстве и промышленности. В настоящее время создается система оценки действия ионизирующей радиации на компоненты природной среды [ICRP, 2008, 2009]. Развитие беспроводных технологий радиосвязи (мобильная сотовая связь, WiFi, GPS и проч.) обуславливает усиление электромагнитного загрязнения среды радиоволнами низкой интенсивности. При этом вопрос об оценке допустимых уровней радиочастотного излучения на природные экосистемы в нормативных документах не рассматривается.

Оценка биологического действия ионизирующего излучения на биоту была определена в качестве необходимого подхода к защите и смягчению последствий возможных радиоактивных выбросов в окружающую среду международными директивами (например, ERICA и PROTECT [Howard et al., 2008; 2010]). Однако, несмотря на то, что необходимость радиационной защиты окружающей среды уже давно установлена, отсутствие научного консенсуса относительно диапазона доз, при которых происходят значимые биологические эффекты у разных представителей биоты, и согласованных данных разных лабораторий мира затрудняет оценку риска радиоактивного загрязнения

окружающей среды [Beresford, Copplestone, 2011; Garnier-Laplace et al., 2013]. Для химического загрязнения антропогенного происхождения концепция защиты (т.е., понятие оценки экологического риска) хорошо разработана [Bréchignac, 2003].

В диссертационной работе предложена разработка принципов построения биомониторинга на простейших и ракообразных для обеспечения более детального анализа последствий радиоактивного загрязнения окружающей среды. Акцент сделан на приоритетность научных исследований на ракообразных, группе организмов, которые определены в качестве ключевой модели для разработки экологических основ радиационной защиты [ICRP, 2009].

Цель и задачи исследования. Цель работы заключалась в оценке радиационных эффектов ионизирующего и неионизирующего излучения на субклеточном и организменном уровнях у облученных инфузорий *Spirostomum ambiguum* и ракообразных *Daphnia magna* и их потомства в нескольких пострадиационных поколениях и в разработке на этой основе принципов биологического мониторинга радиоактивно-го загрязнения гидросферы.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие **задачи**.

1. Установить закономерности формирования прямых радиационно-индуцированных биологических эффектов от источников ионизирующего излучения в широком диапазоне доз у простейших *Spirostomum ambiguum* и ракообразных *Daphnia magna* по изменению показателей выживаемости, продолжительности жизни и плодовитости и оценить возможность использования этих тест-организмов и тест-функций в качестве модели для радиационных исследований.

2. Установить закономерности формирования отдаленных радиационно-индуцированных биологических эффектов от источников ионизирующего излучения в широком диапазоне доз в нескольких пострадиационных поколениях у простейших *S. ambiguum* и ракообразных *D. magna* при вегетативном и партеногенетическом размножении.

3. Выявить закономерности формирования прямых и отдаленных биологических эффектов от разных источников ионизирующего и неионизирующего излучения у *S. ambiguum* по морфофункциональным критериям (поведенческая активность и морфология) и оценить возможность использования этих тест-функций в качестве показателя радиационного стресса.

4. Проанализировать биохимические радиационно-индуцированные эффекты: вклад свободнорадикальных реакций в формирование прямых и отдаленных эффектов облучения, изменение метаболической активности и эпигенетические нарушения у *D. magna* в нескольких поколениях.

5. Разработать принципы биологического мониторинга действия на гидробионтов радиационного фактора на основе анализа прямых и отдаленных эффектов у простейших *S. ambiguum* и ракообразных *D. magna* при надфоновых уровнях облучения.

Научная новизна. Впервые на единой методологической основе проведен всесторонний анализ прямых и отдаленных (в нескольких пострадиационных поколениях) эффектов облучения у представителей двух филогенетических групп низших гидробионтов: инфузорий *Spirostomum ambiguum* и ракообразных *Daphnia magna*, по изменениям ряда биологических показателей, вызванным ионизирующим и неионизирующим излучением в широком диапазоне доз, включая низкие и средние их уровни.

Впервые выявлены диапазоны доз острого γ -облучения, вызывающие изменение продолжительности жизни и плодовитости у непосредственно облученных *S. ambiguum* и *D. magna* и их потомства в ряду вегетативных и партеногенетических поколений.

Впервые описан нелинейный характер кривой «доза – эффект» по изменению поведенческой активности простейших *S. ambiguum* при радиационном воздействии.

Впервые описан процесс восстановления жизнеспособности ракообразных *D. magna* во втором пострадиационном поколении после острого γ -облучения исходной выборки.

Впервые описаны закономерности формирования прямых и отдаленных эффектов облучения в электромагнитном поле сотовой связи у инфузорий *S. ambiguum*. Показана возможность применения поведенческого критерия для оценки радиационного стресса.

Впервые разработана система построения биологического мониторинга для оценки радиационных эффектов острого облучения на простейших и ракообразных. Принцип биологического мониторинга основан на анализе радиационно-индуцированных эффектов в нескольких пострадиационных поколениях. Подчеркнута значимость исследований на ракообразных *Daphnia magna* в качестве тест-объекта. Они хорошо изучены, являются одним из важных звеньев пищевой цепи водных экосистем и широко применяются в экотоксикологических исследованиях степени загрязнения гидросферы. Применяемый в лабораторных условиях анализ партеногенетических поколений дафний дает возможность изучить дозовый и временной интервал, при которых происходит восстановление популяции.

Практическая значимость. Доказана биологическая значимость радиационных воздействий в низких и средних дозах от разных источ-

ников излучения как фактора окружающей среды, требующего контроля в рамках экологического мониторинга.

Доказана эффективность использования инфузорий *S. ambiguum* и ракообразных *D. magna* для исследования прямых и отдаленных эффектов действия ионизирующих и неионизирующих излучений на организм, что позволяет не только ускорить получение результатов оценки, но и сделать такие исследования более экономичными и гуманными.

Предложено и экспериментально обосновано введение в практику радиационного контроля окружающей среды инфузорий *S. ambiguum* и ракообразных *D. magna* как доступных универсальных тест-объектов, пригодных для оперативных оценок.

Разработанная система биологического мониторинга на простейших и ракообразных внедрена в учебный процесс подготовки научных кадров всех уровней высшего профессионального образования (бакалавров, магистров и аспирантов) по направлениям «Биология» и «Экология и природопользование» в Обнинском институте атомной энергетики – филиале национального исследовательского ядерного университета «МИФИ».

Материалы диссертации включены в учебник «Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование», получившего рекомендательный Гриф Министерства образования и науки РФ в качестве учебного пособия для студентов вузов.

Положения, выносимые на защиту.

1. Ракообразные *Daphnia magna* могут быть предложены в качестве референтного вида в биологическом мониторинге радиоактивного загрязнения гидросферы, построенном на анализе прямых и отдаленных радиационно-индуцированных эффектов в нескольких поколениях.

Плодовитость *D. magna* является более чувствительным критерием радиационного облучения, чем выживаемость.

2. Прямые и отдаленные биологические эффекты от разных источников ионизирующего и неионизирующего излучения у инфузорий *Spirostomum ambiguum* и ракообразных *D. magna* имеют нелинейную зависимость от дозы с порогом в области низких и средних доз и выходом на плато, высокую чувствительность к этим дозам и способность сохраняться в ряду пострадиационных поколений. Восстановление продолжительности жизни и плодовитости *D. magna* происходит во втором пострадиационном поколении.

Апробация работы. Работа апробирована на расширенном заседании кафедры «Биология» ИАТЭ НИЯУ МИФИ. Работа также представлена на заседаниях кафедры гидробиологии и научном семинаре кафедр биофизики и радиоэкологии и экотоксикологии МГУ им. М.В. Ломоносова.

Работа апробирована на заседаниях кафедры гидробиологии и научном семинаре кафедр биофизики и радиоэкологии и экотоксикологии. МГУ им. М.В. Ломоносова

Основные положения диссертационной работы и результаты исследований доложены на международных симпозиумах по биоиндикаторам (Сыктывкар, 2001; Москва, 2009, 2013); международных экологических симпозиумах (Екатеринбург, 2001; Москва, 2002, 2004; Рим, 2003; Архангельск, 2004; Борок, 2005, 2007, 2008; Оренбург, 2006; Астрахань, 2007; Минск, 2008, 2009; Алушта, 2011); международных конференциях и конгрессах по радиационной защите (Монако, 2002; Хельсинки, 2010; Гамильтон, 2011; Глазго, 2012; Плимут, 2012; Барселона, 2014); по неионизирующим излучениям (Калуга, 2005, 2008; Санкт-Петербург, 2009, 2012, 2015); по радиационным исследованиям (Антверпен, 2002; Москва, 2001, 2006, 2010, 2014; Ереван, 2005; Сык-

тивкар, 2009; Варшава, 2011; Лондон, 2012; Стокгольм 2013; Дублин 2013; Оксфорд, 2014).

Результаты диссертационной работе получены при выполнении НИР в рамках целевой программы сотрудничества Министерства образования РФ и Министерства РФ по атомной энергии по направлению «Научно-инновационное сотрудничество» в 2002–2004 гг.; тем-планам НИР Обнинского государственного технического университета атомной энергетики, проводимых по заданию Федерального агентства по образованию (2005-2011 гг.); по Федеральной Целевой Программе «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг. Госконтракт № П968 (2010-2012 гг.); а так же по грантам РФФИ № 12-08-97540 (2012-2013 гг.) и № 14-48-03002 (2014-2016 гг.).

Результаты, полученные в диссертационной работе, внедрены в образовательный процесс ИАТЭ НИЯУ МИФИ подготовки научных кадров всех уровней высшего образования (бакалавриат, магистратура и аспирантура) по направлениям «Биология» и «Экология и природопользование».

Личный вклад автора. Автор лично участвовал в постановке проблемы, формулировке цели и задач, планировании и проведении экспериментальных исследований, обосновании методологических подходов, разработке методов исследования, их проведении и анализе полученных экспериментальных данных, интерпретации результатов, формулировке выводов, подготовке отчетов и публикаций. Под руководством автора в рамках грантов ФЦП и РФФИ работала научная группа, состоящая из студентов, аспирантов и молодых ученых. Под руководством автора в заявленном направлении защищены две кандидатские диссертации и 11 дипломных работ, результаты которых обобщены в данной работе.

Публикации. По материалам исследования опубликованы 116 работ. Из них пять статей в международных изданиях, 28 статей в рецензируемых журналах из перечня ВАК, в том числе четыре в переводных изданиях. Опубликовано два учебника с Грифами Минобрнауки РФ и УМО по классическому университетскому образованию и 12 учебных пособий для студентов вузов.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 218 с., содержит 33 рисунка и 23 таблицы. Список литературы включает в себя 316 источников, из них 229 на иностранном языке.

Благодарности. Автор выражает искреннюю признательность д.б.н. профессорам МГУ Н.А. Тушмаловой и О.Ф. Филенко за поддержку и консультации в период подготовки диссертационного исследования к защите, профессору Всероссийского центра экстренной и радиационной медицины из Санкт-Петербурга д.б.н. профессору И.Б. Бычковой за многолетний совместный труд, ряд научных идей и помощь в их развитии, профессору ВНИИСХРАЭ Россельхозакадемии д.б.н. С.А. Гераськину за ценные замечания по тексту диссертации и интерпретации данных. Искренне признательна президенту Российского национального комитета по защите от неионизирующих излучений д.м.н., профессору Ю.Г. Григорьеву за обсуждение результатов исследования эффектов неионизирующего излучения, поддержку в развитии научных идей и добрые отношения. Автор благодарит профессора Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН д.б.н. И.И. Пелевину и профессора Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН д.б.н. А.В. Рубановича за внимательное прочтение диссертационной работы и ценные замечания по ряду положений.

Самые теплые слова благодарности своей научной группе – к.б.н. Н.Н. Павловой, к.б.н. Ю.В. Иголкиной, аспирантам Д.В. Ускаловой, Ю.Ю. Малиной, сотрудникам кафедры «Биология» ИАТЭ НИЯУ МИФИ Е.Р. Ляпуновой, Л.М. Походун, Ю.В. Кулиш, к.б.н. М.М. Барановой за профессионализм в выполнении исследований и обсуждении полученных результатов, легших в основу диссертации.

Автор благодарна д.б.н. профессору Б.И. Сынзынысу, к.б.н. Г.В. Козьмину, к.т.н. А.В. Литовченко, к.т.н. Г.К. Игнатенко и другим сотрудникам кафедры «Экология» ИАТЭ НИЯУ МИФИ за помощь в организации и проведении экспериментов по радиочастотному облучению и полезные дискуссии по полученным результатам.

Автор выражает благодарность с.н.с. МРНЦ Минздрава РФ к.т.н. А.И. Горскому за анализ радиационных рисков и обсуждение полученных данных. Признательна профессорам из МРНЦ д.б.н. Н.И. Рябченко и Б.П. Иваннику за обсуждение результатов молекулярно-биохимических исследований, А.И. Бровину, Т.В. Колесниковой и другим коллегам за организацию дозиметрического контроля и проведение облучения тест-организмов γ -квантами, к.т.н., снс ВНИИСХРАЭ В.Н. Тихонову за дозиметрию неионизирующих излучений и обсуждение полученных результатов, коллегам из МГУ д.б.н. Мелеховой О.П., к.б.н. Коссовой Г.В. и др., а так же коллегам из других научных организаций, совместная работа с которыми в разные годы и заинтересованное обсуждение полученных результатов оказали неоценимое влияние на видение исследуемых в диссертации биологических закономерностей.

Автор благодарит профессора Лестерского университета д.б.н. Ю.Е. Дуброву за полезные дискуссии, которые в значительной степени сформировали научный взгляд на проблему, поднятую в диссертации, а так же за помощь в статистической оценке полученных результатов

и неоценимый опыт написания статей и выступлений на международных конференциях.

Автор признательна профессорам МРНЦ и коллегам по кафедре «Биология» д.б.н. И.А. Замулаевой, д.м.н. Л.П. Жаворонкову, д.б.н. Б.П. Суринову и другим за моральную поддержку и помощь при подготовке диссертации к защите. Автор свято чтит память и глубоко признательна директору МРНЦ Минздрава РФ, многие годы бывшему заведующим кафедрой «Биология» ИАТЭ НИЯУ МИФИ академику РАМН А.Ф.Цыбу, а так же профессору А.С. Саенко.

Автор выражает свою благодарность всем студентам, среди которых проходит профессиональная деятельность, и особенно своим дипломникам.

Автор признательна родным, близким друзьям и, конечно, мужу и детям, которые не только терпели постоянную занятость, но и всячески поддерживали и верили в успех.

Глава 1 Биологические эффекты радиационного и химического загрязнения водной среды у низших гидробионтов

1.1 Действие физических и химических факторов на простейших и ракообразных

Возобновление интереса к ядерной энергетике как источнику энергии с низким выбросом углерода в сочетании с обеспокоенностью относительно прошлых и возможных ядерных аварий требует детального изучения эффектов радиации на окружающую среду. Традиционные подходы к радиационной защите окружающей среды основаны на предположениях, что норм экологического контроля, необходимых для защиты человека, достаточно, чтобы защитить другие биологические виды [Coplestone et al., 2004; ICRP, 1977]. Однако этот антропоцентрический подход больше не принимается в связи с недостатком информации о воздействии ионизирующего излучения на других представителей биоты и существовании среды обитания, в которой организмы могут быть подвержены дозам, выше допустимых пределов для человека [Pentreath et al., 2009; Coplestone et al., 2001; Hagger et al., 2005]. Оценка биологического действия ионизирующего излучения на биоту была определена в качестве необходимого подхода к защите и смягчению последствий возможных радиоактивных выбросов в окружающую среду международными директивами (например, ERICA и PROTECT [Howard et al., 2010; Larsson, 2008]).

Ионизирующее излучение в окружающей среде имеет естественные и антропогенные источники. Естественные (или природные) источники включают в себя космическое излучение и радионуклиды, поступающие в Земную атмосферу в результате космических процессов. Большинство антропогенных радионуклидов в окружающей среде яв-

ляется производными от трех основных источников: испытания ядерного оружия, ядерных катастроф и разрешенных сбросов переработанных ядерных отходов. Водная среда представляет собой важный резервуар для радионуклидов, так как большинство радиоактивных отходов находится в жидкой форме, и в водную экосистему поступает примерно в два раза больше радионуклидов, чем в наземные системы [Smith, Beresford, 2005].

Допустимые сбросы переработанных ядерных отходов представляют собой значительный источник антропогенных радионуклидов в мировом океане. Например, Селлафилдский завод по переработке отработавшего ядерного топлива, расположенный в Камбрии, Великобритания, производил сброс жидких радиоактивных стоков, содержащих бета- и гамма-излучатели (с активностью $6,649 \times 10^5$ ГБк) в течение четырех лет с 1995 по 1999 г. [European Commission, 2001]. Такие очаги, обнаруживаемые в районах северной Атлантики и Северного Ледовитого океана, представляют значительную часть радиоактивного загрязнения [Kershaw, Baxter, 1995]. Основные катастрофы, такие как аварии на Чернобыльской АЭС и на Фукусиме, привели к увеличению масштабов радиоактивного загрязнения окружающей среды [Buessler et al., 2012]. По оценке экспертов, общее содержание ^{137}Cs в Мировом океане, как следствие Чернобыльской аварии, составило 15 – 20 ПБк [Aarkrog et al., 2003]. Использование радиоизотопов в медицинских, промышленных и научных учреждениях приводит к загрязнению водной среды обычно на порядки ниже, чем от других крупных источников [Aarkrog et al., 2003].

В последнее время стали появляться работы по действию на водных беспозвоночных важных групп радионуклидов, попадающих в окружающую среду. Однако, среди гидробионтов, имеющих высокую экологическую значимость, есть такие, для которых абсолютно отсутствуют данные об их чувствительности к ионизирующим излучениям

(например, плоские черви *Porifera*, головоногие моллюски *Asteroidea* и *Holothuroidea*). Большая часть статей, опубликованных по действию ионизирующего излучения на водных беспозвоночных, описывает эффекты у морских организмов. Использование пресноводных животных представлено лишь в 1/3 статей. Среди *Crustacea* доминируют в исследованиях два наиболее хорошо изученных рода – артемии и дафнии, которые традиционно широко используются в экотоксикологическом мониторинге и имеют, безусловно, практические преимущества. Однако лабораторная культура дафний, выбранная из-за высокой репродуктивной функции, может, как следствие, быть устойчивой к разным стрессовым воздействиям [Barata, Baird, Mitchell et al., 2002]. Поэтому, как считают авторы [Dallas, Keith-Roach, Lyons et al., 2012], будущая работа по исследованию эффектов радиации выиграет, если будет проведен тщательный анализ тест-объектов среди представителей разных филогенетических групп водных беспозвоночных.

В классических экотоксикологических исследованиях в последние годы наблюдается переход к использованию нескольких видов тест-организмов, или «батареи тестов». Этот подход имеет много преимуществ, т.к. охватывает несколько трофических уровней (например, хищники, травоядные) и учитывает различия в физиологии [Canty, Hutchinson, Brown et al., 2009; Cheung, Depledge, Jha, 2004; Jha, Hagger, Hill, 2000], получая более широкую картину воздействия на окружающую среду. Изучение токсичности загрязняющих веществ у нескольких видов позволяет проводить сравнения между группами и предоставляет альтернативу для исследования, когда классические тест-организмы не присутствуют на загрязненной территории [Jha, 2008].

В большинстве исследований для сравнения радиобиологических эффектов применяют показатель полуметальной дозы (LD_{50}), определенный по критерию выживаемости. В некоторых исследованиях

предлагают значение LD_{50} использовать лишь для грубой оценки радиочувствительности видов, т.к. по данному показателю нельзя объединять близкие филогенетические группы [Copplesstone, Bielby, Jones et al., 2001]. Например, среди ракообразных обнаружены одновременно самый радиорезистентный (*Palaemonetes pugio*) и самый радиочувствительный (*Artemia salina*) представитель водной биоты [Dallas, Keith-Roach, Lyons et al., 2012]. $LD_{50/30}$ для *Daphnia* составляет примерно 50 Гр [Сахаров, 2006]. По имеющимся на данный момент сведениям, LD_{50} для водных беспозвоночных варьирует в диапазоне от 2,1 до 2780 Гр [Dallas, Keith-Roach, Lyons et al., 2012]. Эти цифры, однако, обеспечивают важную радиобиологическую информацию о том, что водные беспозвоночные по показателю выживаемости более радиорезистентные, чем млекопитающие, для которых LD_{50} составляет от 1 до 15 Гр [Copplesstone, Bielby, Jones et al., 2001], и рыбы (LD_{50} 7 – 60 Гр [Woodhead, 2000]). Однако, как считают авторы статьи [Dallas, Keith-Roach, Lyons et al., 2012], несмотря на ряд ограничений, анализ значений LD_{50} по показателю выживаемости водных беспозвоночных позволит решить целый ряд вопросов, в том числе экологического нормирования.

Еще одним важным биологическим эффектом радиационного воздействия является плодовитость и репродуктивный успех популяции, т.к. длительное выживание вида зависит от плодовитости особей и качества потомства. Изменения в репродуктивных процессах классифицируются как одно из наиболее значимых последствий загрязнения [Jha, 2008]. В радиобиологии водных беспозвоночных для изучения плодовитости используют разные критерии. Например, у *Daphnia magna* после облучения ^{137}Cs с мощностью 0,38 мГр/ч в течение 23 дней обнаружено снижение выживаемости [Alonzo, Gilbin, Zeman et al., 2008] и размера пометов [Gilbin, Alonzo, Garnier-Laplace, 2008]. Эти показатели могут представлять ценную информацию для оценки биоло-

гических последствий облучения на организменном уровне. Некоторые авторы анализируют и другие экологически значимые показатели плодовитости. Например, в работе [Hagger, Atienzar, Jha, 2005] обнаружено, что у личинок мидии при облучении в дозе 0,3 мГр увеличилась частота развития аномалий. Если такие нарушения являются сублетальными, то они снижают качество потомства. Если такие нарушения смертельны, то они могут привести к сокращению численности популяции. Если развитие значительно задерживается, как, например, у эмбрионов морских ежей при воздействии рентгеновских лучей, беспозвоночное больше времени остается на более уязвимых стадиях развития – яйца или личинки, и может погибнуть от хищника [Cripe, McKenney, Hoglund et al., 2003]. В работе [Tsytsugina, Polikarpov, 2003] обнаружены изменения в репродуктивном режиме (т.е. увеличение или уменьшение частоты бесполого и полового размножения) у трех видов олигохет (*Dero obtusa*, *Nais pseudobtusa* и *Nais pardalis*), которые были облучены с мощностью 14 мГр/ч комбинированно γ - и β -частицами. Если эти явления будут происходить в природных популяциях, то общий репродуктивный выход, структура популяции и генетическое разнообразие будущих поколений могут серьезно пострадать. Альтернативные репродуктивным эффекты могут произойти при дозах ниже, чем те, которые вызывают прямое снижение плодовитости. Например, в работе [Alonzo, Gilbin, Bourrachot et al., 2006] обнаружено снижение биомассы яиц у *D. magna* при облучении с мощностью дозы 20 мГр/ч (^{241}Am). Эти исследования показывают, что эффекты, которые не снижают плодовитость популяции, все же могут иметь для нее серьезные последствия.

Имеющиеся данные показывают, что репродуктивный потенциал у рыб (LD_{50} 7 – 60 Гр [Woodhead, 2000]) менее чувствителен к ионизирующей радиации, чем у водных беспозвоночных (LD_{50} от 2,1 Гр [Dallas, Keith-Roach, Lyons et al., 2012]). Так, снижение веса семенников у

камбалы (*Pleuronectes platessa*) были зарегистрированы в результате облучения с мощностью 240 мГр/ч [Knowles, 1999], а полное бесплодие потомства, при облучении с мощностью 7700 мГр/ч [NCRP, 1991]. В отчете Национального комитета по радиационной защите (НКРЗ) [NCRP, 1991] сообщается, что значительные негативные репродуктивные эффекты у рыб вряд ли можно обнаружить при облучении с мощностью дозы ниже 1000 мГр/ч. Однако, например, в Чернобыльском водоеме-охладителе у белого толстолобика (*Hypophthalmochthys molitrix*) были обнаружены репродуктивные эффекты при более низкой мощности дозы в 100 мГр/ч [Kryshev и др., 2005]. По мнению авторов статьи [Copplesstone, Bielby, Jones et al., 2001] эффект может быть связан со взаимодействием с другими загрязняющими веществами. При детальном сопоставлении данных на водных беспозвоночных и рыбах можно заключить, что ионизирующее излучение вызывает репродуктивные эффекты у тех и других при близких дозах. Однако в большинстве цитируемых статей анализируемые параметры не согласуются, что подчеркивает важность разработки единых и сопоставимых критериев для сравнительных исследований в целях биологического мониторинга радиоактивного загрязнения гидросферы.

В настоящее время в водной токсикологии, несмотря на громадное количество работ по оценке токсичности загрязняющих веществ, отсутствует система сравнительно-экотоксикологического анализа, которая позволила бы не только оценить действие вредных веществ на гидробионтов разных систематических групп, но и выявить среди них объекты, наиболее чувствительные и удобные для целей биотестирования. Обнаружение и количественное определение содержания загрязняющих веществ в окружающей среде не достаточно для экологического мониторинга. Необходимо также определить их опасность для биологических систем, которые являются конечными получателями токсикант-индуцированного повреждения [Jha, 2004; Jha, Cheung,

Foulkes et al., 2000]. Для этого в системе биологического мониторинга используют ответные реакции экологически значимых видов как индикаторов ущерба экосистемам [Moore, Depledge, Readman et al., 2004; Jha, 2008]. В публикациях МКРЗ в настоящее время уделяется серьезное внимание разработке системы «референтных видов» – гипотетических объектов, имеющих анатомические, физиологические, поведенческие базовые характеристики животного или растения определенного типа [ICRP, 2009]. Требования к референтным видам установлены следующие: вид должен быть значимым звеном в трофической цепи в конкретной экосистеме, широко распространенным, изученным в радиобиологическом плане, радиочувствительным, давать возможность оценки доз в разных радиоэкологических ситуациях. Важным моментом в выборе референтных видов является их принадлежность к разным уровням филогенеза – от простейших до высших организмов, от одноклеточных до многоклеточных. Таким образом, исследования на низших гидробионтах (простейших и ракообразных) могут решать многие важные радиобиологические и экологические задачи. Однако, несмотря на экологическую значимость беспозвоночных и простейших, для создания существующих баз данных о чувствительности разных представителей биоты к ионизирующему излучению, например, [FREDERICA, 2006], эти представители гидробионтов не использованы или проанализированы в незначительном объеме.

Ниже приведен обзор эффектов действия ионизирующей радиации и ряда химических поллютантов на простейших одноклеточных организмов и на многоклеточных беспозвоночных. Диссертационная работа предлагает конкретный подход для обеспечения более детального анализа последствий радионуклидного загрязнения окружающей среды. Акцент сделан на приоритетность научных исследований на ракообразных, группе организмов, которые определены в качестве

ключевой модели для разработки экологических основ радиационной защиты [ICRP, 2008].

1.2 Особенности строение, размножения и функционирования ветвистоусых рачков дафний, используемые в экотоксикологии, радиобиологии и радиоэкологии

Представители подтипа ракообразных являются одним из доминирующих компонентов глобальных водных экосистем. Подтип включает в себя более чем 66,000 видов [LeBlanc, 2007]. Эти организмы используются как непосредственно для потребления человеком, так и в качестве источника питания для коммерчески важных видов рыб [Benzie, 2009]. Из-за повсеместного распространения в водных средах и хорошо изученной биологии представитель семейства *Cancriidae* краб был выбран в качестве одного из референтных видов животных для целей радиационного мониторинга водной среды [ICRP, 2008]. Референтные организмы используются в качестве основы для разработки мер по радиационной защите окружающей среды и считаются экологическими представителями определенной группы растений или животных с биологическими характеристиками, поддающимися изучению [ICRP, 2008].

Другим повсеместно распространенным видом с хорошо изученной биологией является ветвистоусый рачок рода *Daphnia magna* Straus. Метод биотестирования с использованием дафний широко применяется у нас в стране и за рубежом как для тестирования сточных и природных вод, так и в целях выявления биологических эффектов и механизмов негативного действия антропогенных факторов в экотоксикологических исследованиях. Дафниевый тест входит в стандарты ISO и ГОСТ [OCDE, 2011; МУ 2.1.4.783-99; ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06]. *D. magna* имеет целый ряд характеристик, который позволяет

рассматривать этот вид дафний как потенциальный референтный вид для анализа радиационных эффектов. Дафнии, культивируемые в лабораторных условиях, имеют короткий жизненный цикл, который редко превышает 2 – 3 месяца (рис. 1).

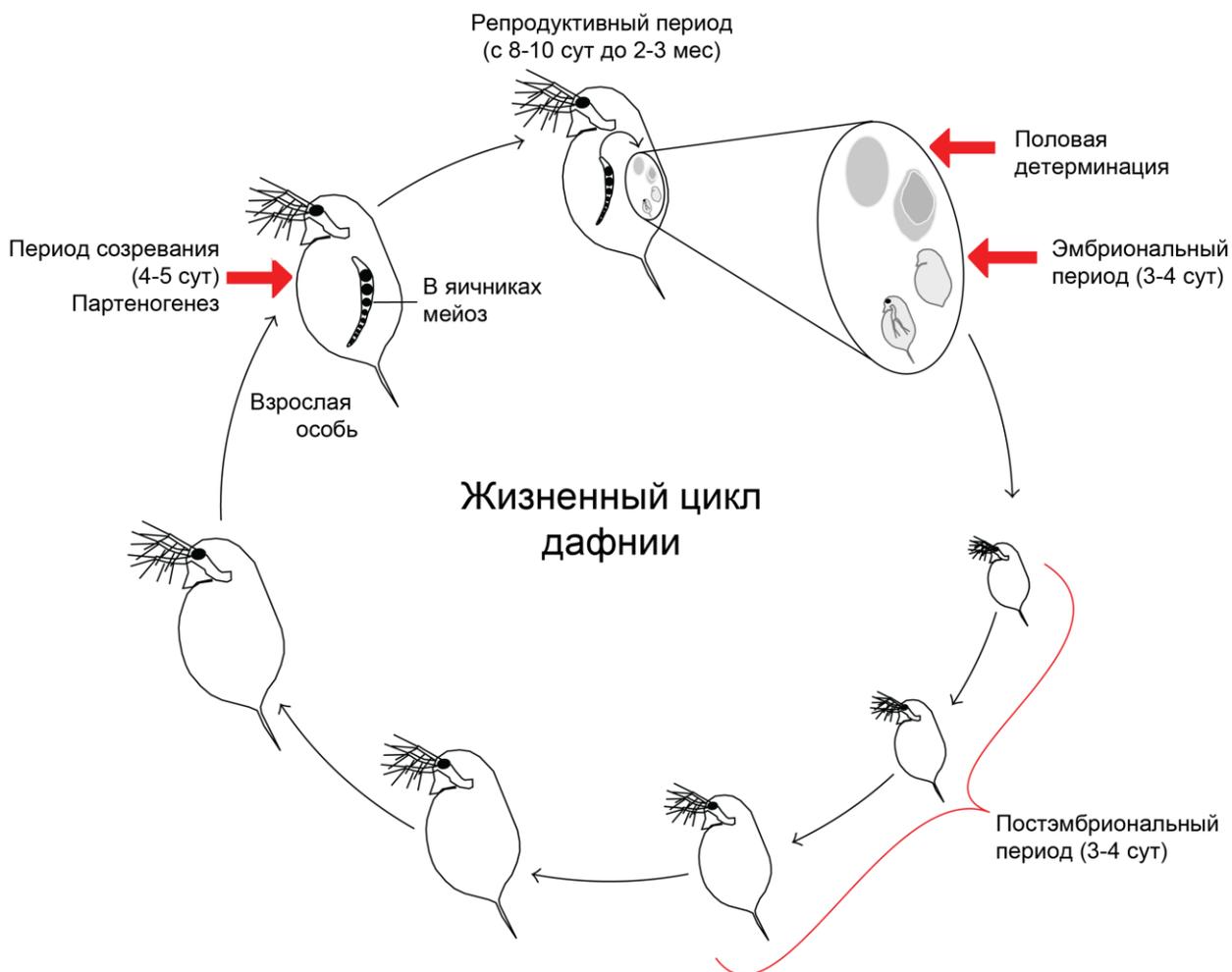


Рис. 1 – Иллюстрация жизненного цикла дафний. Заимствовано из [Harris, Bartlett, Lloyd, 2012]

При температуре около 20⁰ С дафния производит партеногенетические (амейотические) яйца. Партеногенетические ооциты подвергаются только митотическому делению мейоза, остаются диплоидными и эмбриогенез происходит без оплодотворения. Одно из главных биологических преимуществ партеногенеза заключается в ускорении темпа размножения вида, так как все особи способны оставить потомство. Часто партеногенетические виды являются полиплоидными и возни-

кают в результате отдалённой гибридизации, обнаруживая в связи с этим гетерозис и высокую жизнеспособность. Для большинства дафний (как и других ветвистоусых) характерен циклический партеногенез. Поскольку партеногенез у дафний амеиотический, их размножение клональное (популяции состоят из клонов – потомства отдельных самок). Ранний эмбриогенез начинается, когда яйцо созревает на пути к выводковой сумке. Выход эмбрионов из яиц происходит примерно через день, однако, они остаются в выводковой сумке дафнии еще около трех дней. Затем новорожденная молодь попадают в воду, и, пройдя через четыре – шесть линек, в течение 10 сут достигает половозрелого возраста. В оптимальных климатических условиях (освещение, температура, рН, растворенный в воде кислород) взрослая самка большую часть репродуктивного периода каждые трое – четверо сут производит партеногенетические яйца и вымет молодки.

Переход к двуполому размножению обычно требует действия двух стимулов – понижения температуры и уменьшения длины светового дня. Предполагается, что эти и другие стимулы действуют через снижение потребления пищи самкой. Самцы дафний имеют более мелкие размеры, существенно отличаются от самок по строению первых антенн и грудных ног. Они плавают быстрее самок и спариваются с ними, прикрепившись к заднему краю раковинки. Оплодотворение у дафний внутреннее.

Ветвистоусые рачки *D. magna* имеют крупные размеры (новорожденная молодь 0,7 – 0,9 мм в длину, к моменту половозрелости – 2,2 – 2,4 мм). Партеногенетическое размножение дафний в лабораторных условиях обеспечивает генетическую однородность исследуемых выборок [Ebert, 2005]. Кроме того, дафнии являются экологически важным организмом, они хорошо изучены с точки зрения эволюции, экологии, экотоксикологии [Stollewerk, 2010]. Геном *D. magna* пока не исследован, но уже хорошо известно, что геном другого представителя

микроракообразных *Daphnia pulex* состоит из 200 Мб и содержит, по крайней мере, 30,9 тыс. генов (в геноме человека, около 20 – 25 тысяч генов). Геному дафнии свойственен высокий темп генных дупликаций, что привело к созданию многочисленных генных кластеров. Более 1/3 генов дафнии не имеют гомологов ни в одном из известных протеомов и являются специфическими для дафний [Colbourne, Pfrender, Gilbert et al., 2011].

Для целей биотестирования применяют разные показатели физиологического состояния дафний. Помимо описанных выше показателей выживаемости и плодовитости анализируют метаболический критерий [Мелехова, 2010], который дает возможность оценить окислительный стресс, возникающий в организме дафний при реакции на токсичность среды по изменениям уровня интермедиатов окислительно-восстановительных реакций – свободных радикалов. По замедлению ритма сердцебиения проанализированы биоэффекты действия террагерцового электромагнитного поля [Усанов и др., 2005]. Одним из методов оценки токсичности водной среды является измерение интенсивности флуоресценции микроводорослей, которыми питаются дафнии [Мелехова и др., 2010]. В исследованиях состояния водной среды на дафниях в качестве критериев так же используют: изменение окраски тела, кишечника, жирового тела, гонад, степень наполнения кишечника пищей, образование абортированных яиц, дистрофию рачков, вымет мертвой молоди, снижение выживаемости и плодовитости, изменение поведения дафний, которое проявляется в реакциях избегания загрязняющего вещества в градиенте его концентрации [Брагинский, 2005; Филенко, 2007].

Таким образом, дафнии, размножаясь партеногенетически, являются хорошей моделью для анализа механизмов негативного действия факторов окружающей среды. При этом действие экологических факторов на материнский организм может проявиться у потомства че-

рез повреждения, полученные половыми клетками, которые дают начало эмбриону (истинный трансгенерационный эффект), либо путем действия повреждающих факторов на соматические клетки зародыша внутриутробно [Harris, Bartlett, Lloyd, 2012]. Поэтому, чтобы исключить непосредственное действие фактора на потомство в данной диссертационной работе будут изучены механизмы и проанализированы отдаленные эффекты острого воздействия на дафний в нескольких пострадиационных поколениях.

В последнее время достаточно активно изучают эпигенетические изменения у ракообразных. Молекулярным ПЦР-методом было показано, что многие химикаты вызывают метилирование ДНК у дафний. В работе [Vandeghechuchte, Lemiere, Vanhaecke, Vanden, 2010] воздействие винклозолином на родительское поколение вызвало значимое снижение метилирования ДНК у *D. magna* в поколениях F_0 и F_1 и нивелирования эффекта в поколении F_2 . В качестве объяснения данного феномена авторы предлагают адаптационный механизм. Роль эпигенетических механизмов, таких как метилирование ДНК, модификация гистонов и РНК-интерференция в нормальном развитии дафний пока плохо изучена. Несмотря на то, что метилирование ДНК обнаруживается практически у всех эукариот, количество метилированных участков и их организация в геноме резко отличаются у разных видов и стадий развития [Vandeghechuchte, Janssen, 2011]. При этом метилирование ДНК дополняется другими эпигенетическими процессами [Fuks, 2005]. Эпигенетические изменения могут передаваться в поколениях путем митоза [Agarawal et al, 2009] и мейоза [Vandeghechuchte, Janssen, 2011]. Такое трансгенерационное наследование зарегистрировано в ответ на действие химических факторов у *Arabidopsis* [Johannes, Porcher, Teixeira et al., 2009], мышей [Cropley, Suter, Beckman, Martin, 2006], дрозофилы [Xing, Shi, Le et al., 2007], человека [Youngson, Whitelaw, 2008; Morgan, Whitelaw, 2008], а так же у дафний, развиваю-

щихся половым путем [Agarawal et al., 2009]. Механизмы, лежащие в основе передачи эпигенетических изменений у млекопитающих и ракообразных, различаются. Например, у млекопитающих, генистеин вызывает глобальное гипометилирование ДНК [Fang, Chen, Sun et al., 2005], а у *D. magna* – гиперметилирование ДНК [Vandegheuchte, Lemiere, Vanhaecke et al., 2010]. Несоответствие эффектов связано с различиями в геномной организации между млекопитающими и дафниями [Colbourne, Pfrender, Gilbert, et al., 2011]. Эти особенности необходимо учитывать при интерпретации результатов радиационного воздействия у дафний.

Учитывая все вышесказанное, следует признать, что партеногенетически размножающиеся ракообразные *Daphnia magna* представляют собой полезную и очень чувствительную экспериментальную модель для тестирования негативных факторов среды.

1.3 Эффекты радиационного воздействия на ракообразных

Исследование радиационных эффектов на ракообразных проводят по четырем биологическим показателям, наиболее релевантным к задаче радиационной защиты биоты: мутации, плодовитость, выживаемость и заболеваемость [Copplestone et al., 2008; Real et al., 2004; база данных FREDERICA, доступ на <http://www.frederica-online.org>].

1.3.1 Радиационно-индуцированные мутации у ракообразных

В данной главе рассматривается класс мутаций, приводящих к изменениям в хромосомах или генах клетки, которые могут повлиять на структуру и развитие потомства. Как показано во многих исследованиях хромосомные нарушения могут иметь значительные экологи-

ческие последствия на более высоких уровнях биологической организации [Jha, 2008].

Несмотря на то, что кластогенный и мутагенный эффекты ионизирующего излучения показаны на многих водных организмах, включая рыб [Anbumani, Mohan Kumar, 2012] и моллюсков [AlAmri et al., 2012], в литературе практически отсутствует информация в отношении ракообразных. Так, база данных FREDERICA, содержащая более 30000 записей радиационных эффектов, взятых из ряда международных директив, не содержит данных о мутациях у ракообразных при хроническом или остром облучении в диапазоне 0 – 10000 мкГр/ч⁻¹ [Coppstone et al., 2008]. В Публикации МКРЗ (2008), в которой введено понятие референтных животных и растений, не содержится сведений о хромосомных эффектах у референтного вида краба, что подтверждает отсутствие исследований в этой области [ICRP, 2008]. Имеющиеся немногочисленные сведения показывают, что мутация может быть чувствительным параметром радиационно-индуцированных эффектов у ракообразных. Например, Florou et al., (2004) оценивал уровень хромосомных aberrаций у микрофауны, собранной из геотермальных районов на острове Икария, Греция, где максимальные мощности дозы естественных радионуклидов в отложениях составляют 9,6 мГр / год (~0,001 мГр / ч). Эти значения существенно выше среднего уровня 0,07 мГр / год (Гр ~0,008 / ч) для прибрежных отложений в Греции [Florou et al., 2004]. В популяциях ракообразных *Melita palmata*, собранных в этом районе, был обнаружен повышенный уровень клеток с хромосомными aberrациями (3,8 %) по сравнению с аналогичным показателем на контрольных участках (1,5 – 1,7 %). Авторы [Florou et al., 2004] объясняют этот эффект гамма-излучением и естественным α -излучением, которое было также выше природного фона в данном регионе (14 – 26 Бк / л ²²²Rn по сравнению с 1,3 – 7 Бк/л на контрольных участках). Эти значения доз значительно

ниже существующих допустимых уровней воздействия на окружающую среду, предусмотренных рядом организаций, предполагая тем самым возможность индукции значимых биологических эффектов при облучении в дозах, ниже тех, которые считаются безопасными на уровне популяции. Биота, обитающая в геотермальных источниках, обычно имеет бедный видовой состав и подвержена нескольким стрессовым факторам, таким как повышенная температура в зимний период [Florou et al., 2004], экстремальные pH и химические токсиканты [Duggan et al., 2007]. Возможно, цитогенетический эффект связан с комплексом факторов, а не только с прямым действием ионизирующего излучения. Такие наблюдения в природных условиях подчеркивают трудности радиоэкологических исследований [Salbu, 2009] и важность количественной оценки индивидуального вклада стрессоров в средах, где абиотическое воздействие может приводить к синергическому эффекту [Dallas et al., 2012]. В вышеупомянутых статьях было проведено изучение только природных популяций ракообразных с использованием мутации в качестве единственного показателя стресса. Поэтому нельзя сделать вывод о радиационно-индуцированном цитогенетическом эффекте в данном случае.

Лабораторные исследования радиационно-индуцированных мутаций у ракообразных, как правило, посвящены оценке эффектов острого воздействия в высоких дозах, которые не характерны для природных сред. Такие исследования, однако, продемонстрировали способность ионизирующего излучения вызывать хромосомные aberrации у ракообразных. Т. Tsytsugina (2003) облучал эмбрионы двух видов ракообразных, *Idotea baltica* и *Gammarus olivii*, в дозах 0,5 – 5 Гр радионуклидами и химическими мутагенами (ацетатом свинца и хлорфенолом) и анализировал хромосомные аномалии. Среднее количество клеток с хромосомными aberrациями увеличивалось с дозой облучения. Кроме того, автор описывает характерные для каждого токсикан-

та типы aberrаций, которые могут быть использованы для дифференцировки эффектов от индивидуальных стрессоров. Было показано, что ионизирующее излучение вызывает повреждения хромосом в виде одинарных и двойных фрагментов, в то время как одиночные и двойные мосты чаще наблюдаются у эмбрионов, подвергшихся воздействию химических токсикантов.

Современным подходом к оценке радиационно-индуцированной генотоксичности у водных беспозвоночных является мониторинг уровня экспрессии генов, которые участвуют в репарации повреждения ДНК. Han et al. (2014) облучал культуру рачка *Tigriopus japonicus* гамма-квантами ^{137}Cs в дозе 200 Гр и изучал экспрессию трех генов репарации двойных разрывов ДНК (ДР): Ku70 (Xrcc6), Ku80 (Xrcc5) и ДНК-ПК. Экспрессия генов была значительно повышена по сравнению с контролем, что предполагает индукцию ДР при этих уровнях дозы. Потенциал этого подхода в качестве биомаркера для оценки генотоксичности у ракообразных отмечен и в работе [Won, Lee, 2014], где было обнаружено зависимое от дозы увеличение экспрессии этих генов у другого вида ракообразных *Paracyclopsina nana*. Тем не менее, в обоих этих исследованиях изучались уровни дозы, значительно превышающие те, которые встречаются в радиоактивно загрязненных средах (за исключением, возможно, в ближайшее время после крупной ядерной аварии). В исследовании [Han et al., 2014] был проведен контроль экспрессии генов при облучении в дозах 150 и 200 Гр, несмотря на индукцию значительного снижения плодовитости у *T. japonicus* при уровнях доз в три раза более низких (50 Гр). Согласно сведениям из литературы, изменения в паттернах экспрессии генов и эффекты на молекулярном уровне у водных беспозвоночных являются чувствительными показателями загрязнения [Lee et al., 2006]. Недавнее исследование полиморфной ДНК методом ПЦР на *D. magna* показало существенные изменения в ДНК при воздействии на рачка ^{137}Cs с мощностью

дозы $0,007 \text{ мГр/ч}^{-1}$ [Parisot et al., 2015]. Эффекты на молекулярном уровне были очевидны как при длительном, так и при кратком облучении в низких дозах по сравнению с другими ярко выраженными эффектами – смертность, жизнеспособность и плодовитость.

1.3.2 Радиационно-индуцированный эффект изменения плодовитости у ракообразных

Показатель плодовитости часто применяется в исследовании экотоксикологических и экологических оценок риска, так как изменения в плодовитости может повлиять на долгосрочную выживаемость вида и, следовательно, изменить динамику экосистем [Dallas et al., 2012]. Имеется большое количество публикаций о радиационно-индуцированном нарушении репродуктивных параметров у водных беспозвоночных. Такие исследования проводят и на ракообразных. Например, Alonso и соавт. (2008 а, б) обнаружил задержку производства молоди у *D. magna* при хроническом облучении с мощностью 15 мГр/ч^{-1} в течение 23-дневного периода (общая доза $0,345 \text{ Гр}$). Задержку репродуктивного периода у морского рачка *Paracyclopsina nana* вызвало облучение в дозе 10 Гр [Won, Lee, 2014]. Как показал анализ публикаций, различия в продолжительности экспозиции, конкретных радионуклидах и анализируемых показателях не позволяют пока однозначно установить «пороговую (предельную) дозу», вызывающую нарушение репродуктивной функции у ракообразных.

Одним из приоритетных направлений в области радиоэкологии является исследование эффектов в нескольких поколениях. Это направление определено Стратегией союза радиоэкологов (STAR) сделано заключение, что трансгенерационные эффекты выявлены и активно изучаются в радиобиологии человека и в эпидемиологических исследованиях, но до сих пор игнорируются у представителей биоты

[Hinton et al., 2013]. Анализ радиационных изменений репродуктивных параметров в нескольких поколениях ракообразных может быть особенно актуален, поскольку такие изменения могут привести к нарушению динамики численности и качественных характеристик потомства, обеспечивающих их адаптационный потенциал к стрессам в окружающей среде [Alonzo et al., 2008 b].

В имеющейся литературе по подтипу ракообразных описаны радиационно-индуцированные эффекты хронического облучения в нескольких поколениях. Alonzo и соавт. (2008 a) и Massarin и др. (2010) обнаружили негативный эффект у *D.magna*, подвергающихся хроническому α -облучению, по изменению жизнеспособности и плодовитости особей поколения F_2 . Parisot et al. (2015) обнаружил восстановление численности дафний и снижение плодовитости в поколении F_1 по сравнению с исходным поколением. Использование метода ПЦР позволило обнаружить передачу повреждения ДНК от взрослых дафний потомству из поколения в поколение [Parisot et al., 2015; Plaire et al., 2013]. Такой эффект может быть объяснен эпигенетическим механизмом, как это было объяснено при трансгенерационной передаче эффектов у *D.magna* при воздействии ряда химических токсикантов [Vandegheuchte др., 2010 a, b, c], вызывающих изменения в экспрессии генов из поколения в поколение. Для выяснения этого механизма необходимы дальнейшие молекулярные исследования. Учитывая имеющиеся данные о негативных эффектах хронического облучения на репродуктивный потенциал дафний [Alonzo et al., 2008 a, b], наблюдаемых на протяжении нескольких поколений, специалисты сходятся во мнении, что следует продолжать исследования эффектов в нескольких поколениях, поскольку изучение лишь одного поколения может недооценивать экологический риск [Massarin et al., 2010].

Однако, исследования на ракообразных в какой-то степени односторонни, поскольку оценка ведется на партеногенетических популя-

циях, характеризующих женскую плодовитость по таким критериям как производство яиц [Won, Lee, 2014], их масса [Alonzo et al., 2006, 2008a] и время вымета молоди [Gilbin et al., 2008]. В данных исследованиях радиационные воздействия на мужскую фертильность не исследуются. Хотя известно, что сперма чувствительна к ионизирующему излучению [Lewis, Ford, 2012; Marques et al., 2014]. Это связано с отсутствием антиоксидантных ферментов и репарации ДНК, имеющих у других биологических систем [Trapp et al., 2014]. Поэтому, беря во внимание экологическую значимость нарушений параметров сперматогенеза и чувствительность спермы к облучению, следует признать ограниченность анализа эффектов облучения на партеногенетически размножающихся ракообразных. Однако такой способ размножения позволит проанализировать некоторые еще неизвестные механизмы радиационного воздействия на организм.

1.3.3 Радиационно-индуцированный эффект изменения выживаемости у ракообразных

В имеющейся литературе по радиационным эффектам у ракообразных доминируют исследования, основанные на оценке выживаемости. Полученные данные часто используют для расчета полулетальной дозы (LD_{50}), чтобы составить иерархию радиочувствительности для разных таксономических групп [Dallas et al., 2012]. LD_{50} традиционно применяют в экотоксикологических исследованиях для определения экологического риска [Stark et al., 2004], а также, чтобы определить не вызывающую эффект концентрацию или дозу [Garnier-Laplace et al., 2006] для обеспечения нормативной базы. Тем не менее, во многих исследованиях обнаружена большая чувствительность и экологическая значимость репродуктивных показателей по сравнению с показателем выживаемости [Garnier-Laplace et al., 2006; Jones et al.,

2003; UNSCEAR, 2008]. Как известно, смертность меняет возрастное распределение и плотность популяции. Определение значений LD_{50} необходимо для выяснения чувствительности вида к данному типу радиации и определению соответствующих уровней доз для лабораторных исследований. Это подтверждает важность изучения выживаемости в качестве одного из значимых радиобиологических показателей.

У разных представителей типа ракообразных летальная доза сильно варьирует [Dallas et al., 2012]. Недавние исследования на циклопе *Tigriopus japonicus* продемонстрировали высокую устойчивость этого вида ракообразных к внешнему гамма-излучению в дозах до 600 Гр. Смертность наступала только через 5 сут после прекращения воздействия [Han et al., 2014]. Эта доза имеет тот же порядок, что и летальная доза для некоторых видов бактерий и простейших, рассматриваемых среди самых радиорезистентных организмов [Copplesstone др., 2001]. В радиационных исследованиях по критерию выживаемости существует недостаток стандартизации методик в отношении длительности проявления эффекта, используемой для расчета летальной дозы. Время регистрации эффекта варьирует от 4 сут [Han et al., 2014] до 40 сут [Engel, 1973]. Для химических токсикантов этот параметр был стандартизирован в опубликованных руководящих принципах для испытаний с использованием дафний [OECD, 2004], что позволяет проводить сравнения значений LD_{50} при воздействии разных токсикантов. По мнению авторов статьи [Fuller et al., 2015], радиобиологические исследования выиграют, если будет принят единый методический подход.

Результатов исследования как хронического, так и острого облучения ракообразных, анализируемых по критерию выживаемости, достаточно мало. LD_{50} для дафний составляет около 50 Гр. В работе [Marshall, 1966] *D. pulex* облучали γ -квантами в течение 55 недель по

18,5 ч в сут с мощностью дозы от 0 до 5,1 Гр/сут⁻¹. При мощности облучения от 4,36 Гр/сут⁻¹ дафнии погибали. Другой контролируемый параметр, процент абортированных яиц, возрастал при дозах ниже тех, которые привели к гибели, показав тем самым высокую чувствительность репродуктивного показателя по сравнению со смертностью. В исследовании [Parisot et al., 2015] был подтвержден этот вывод. Авторы наблюдали небольшое статистически не значимое увеличение смертности при хроническом облучении *D. magna* ¹³⁷Cs с мощностью дозы 35,4 мГр/ч⁻¹, а снижение плодовитости обнаружено при значительно меньших мощностях дозы 0,007 мГр/ч⁻¹.

1.3.4 Влияние радиации на заболеваемость у ракообразных

Понятие «заболеваемость» у ракообразных можно определить как «потеря функциональных возможностей», которая проявляется в снижении конкурентоспособности и повешении восприимчивости к стрессам, тем самым уменьшая продолжительность жизни [Copplesstone et al., 2008]. Определение термина заболеваемость варьирует у разных авторов и охватывает огромное количество измеряемых параметров, включая нарушение темпов роста, поведенческие изменения и воздействия на иммунную систему [Copplesstone et al., 2004]. У ракообразных заболеваемость оценивается по большому количеству показателей, таким, например, как нарушение процессов роста, дыхания, морфометрии, поведения и т.п.

1.3.4.1 Действие радиации на процессы роста и дыхания у ракообразных

В исследовании влияния хронического внутреннего облучения α -излучающих радионуклидов на динамику роста *D. magna* было об-

наружено снижение биомассы и длины тела у облученных в дозах $\sim 1,5$ мГр/ч⁻¹ особей в поколении (F_0) и значительные негативные последствия в последующих поколениях [Alonzo et al., 2006, 2008 a]. У особей поколения F_2 наблюдали уменьшение биомассы на 15% при облучении исходной выборки в дозе 0,3 мГр/ч⁻¹. В недавнем исследовании показано снижение до 5 и 13% скорости роста дафний в поколении F_2 при хроническом γ -облучении исходной выборки с мощностью дозы 4,7 и 35,4 мГр/ч⁻¹ соответственно [Parisot et al., 2015]. Проведённые исследования показали, что взрослые особи дафний более конкурентоспособны по сравнению с новорожденной молодью, что приводит к более высокой смертности облученной молодежи и понижению воспроизводимости облученной на ранних сроках популяции. Тот факт, что действие радионуклидов может нарушить динамику роста, имеет важные последствия для динамики развития популяции ракообразных в условиях радиационного загрязнения водоема.

В исследовании [Alonzo et al., 2008 a] был обнаружен повышенный уровень потребления кислорода *D. magna* при радиационном воздействии, что свидетельствует об увеличении метаболической активности рачков, вызванной радиационным стрессом. Возможно, действие на организм стрессовых факторов приводит к перераспределению энергии обменных процессов у родительских особей и снижению уровня подачи энергии на воспроизводство [Baillieul et al., 2005]. Возможно, этим объясняется снижение устойчивости к голоду у новорожденных дафний, родители которых были хронически облучены в репродуктивный период с мощностью дозы от 0,02 до 0,4 мГр/ч⁻¹ [Alonzo et al., 2006]. В другом исследовании приведены данные о снижении потребления кислорода дафниями при хроническом облучении ²⁴¹Am (α -излучение) с увеличением дозы [Gilbin et al., 2008].

1.3.4.2 Действие радиации на изменение морфологических показателей и поведения у ракообразных

В ряде экспериментов было продемонстрировано, что ионизирующее излучение может вызвать изменение в поведении некоторых видов ракообразных, таких как краб [Engel, 1967], креветки [Stalin et al., 2013 a] и раки [Rodriguez, Kimeldorf, 1976]. Анализ нарушений в поведенческих паттернах является основополагающим в оценке экологического риска, т.к. как эти нарушения могут возникать адаптивный механизм хронического загрязнения и изменить межвидовые взаимодействия [Dell'Омо, 2002]. В литературе об изменении поведения у ракообразных имеются описания, главным образом, эффектов острого облучения в высоких дозах [Engel, 1967; Rodriguez, Kimeldorf, 1976], при этом величина изменения поведения коррелирует с уровнем дозы. Исследовано, например, влияние острого и хронического облучения на поведение голубого краба *Callinectes sapidus*, высоко агрессивного вида-каннибала [Bushman, 1999]. При облучении ^{60}Co дозах от 40 до 640 Гр наблюдали снижение агрессивности вплоть до перехода в бессознательное состояние. Хроническое облучение с мощностью 0,72, 1,64 и 6,53 Гр/сут⁻¹ в течение 70 сут индуцировало аномальное поведение, не свойственное нормальной боевой природе *C. sapidus*. Несмотря на то, что дозы облучения были несколько выше, чем дозы внешнего облучения, зафиксированные сразу после аварии на Чернобыльской АЭС в пресноводных экосистемах [(4,2 – 8,3 мГр/ч⁻¹ для донных отложений) Kruschev et al., 2005], необходимо учитывать факт, что длительное воздействие может вызвать изменение модели поведения. Кроме того имеются ограниченные данные об индукции поведенческих эффектов при более низких, экологически значимых дозах. Так, Stalin et al. (2013 a) обнаружил изменения в плавательном пове-

дении гигантской пресноводной креветки *Macrobrachium rosenbergii* при остром γ -облучении в дозе 3 мГр.

В нескольких исследованиях рассматривается воздействие ионизирующей радиации на морфологические и гистологические параметры у ракообразных. Stalin и др. (2013 а, б) обнаружил опухоли и некрозы в жабрах, деформацию уропод и изменение окраски брюшка у *M. rosenbergii* после облучения в диапазоне доз 3 – 3000 мГр [Stalin et al., 2013a]. Iwasaki (1973) обнаружил дозозависимое увеличение клеток с пикнотическим ядром (деградация клеток, характеризующаяся конденсацией хроматина) в овогониях и ооцитах артемии *Artemia salina* при γ -облучении ^{60}Co в диапазоне доз 250 – 3000 Гр. Кроме того, Mothersill et al. (2001) обнаружила изменение гемопоэтических структур у норвежского омара после γ -облучения в дозе 0,5 Гр. Деформация заключалась в аномалиях шероховатой эндоплазматической сети при облучении в дозе 0,5 Гр и в полном распаде цитоплазмы при дозе 5 Гр. Структурные изменения в жаберных пластинах ракообразных были выявлены в ответ на ряд токсикантов [Li et al., 2007; Saravana, Bhavan, Geraldine, 2000], что в конечном итоге ухудшало их функционирование и приводило к асфиксии. Радиационно-индуцированное снижение гепатосоматического индекса, обнаруженное у *M. rosenbergii* [Stalin et al., 2013 b], является дополнительным доказательством того, что излучение может вызвать изменение энергетического баланса, т.к. этот показатель отражает уровень мобилизации и использования энергетических запасов [Sánchez-Paz et al., 2007].

Во всех цитируемых статья анализ поведенческих характеристик у ракообразных, подвергшихся воздействию ионизирующего излучения, был основан на визуальных наблюдениях в течение некоторого периода времени. Авторы, применившие поведенческий подход на ракообразных, пришли к выводу, что метод имеет ряд ограничений, таких как отсутствие стандартов испытаний и некоторый субъективизм сужде-

ний. В этой связи обращает на себя внимание количественный метод, разработанный проф. МГУ Н.А. Тушмаловой на простейших, который будет описан ниже.

1.4 Особенности строения, размножения и функционирования простейших, используемые в экотоксикологии, радиобиологии и радиозэкологии

Во многих исследованиях биологического действия антропогенных факторов в качестве тест-объектов широко используют простейших. Ответной реакцией этих одноклеточных организмов на изменение, например, химического состава среды является раздражение, приводящее к изменениям двигательной реакции, скорости размножения, характера питания и других физиолого-биохимических параметров [Тушмалова, Егорова, 2004]. Простейшие как тест-объект удобны во многих отношениях: они легко культивируются в лабораторных условиях; имеют короткий цикл размножения (в среднем 2–3 сут). Эти особенности позволяют, во-первых, быстро достигать высокой численности популяции и иметь необходимое количество тест-объектов для получения статистически достоверных и воспроизводимых данных и, во-вторых, за достаточно короткий срок проследить эффект на исследуемые факторы среды в ряду поколений.

Известно, что чем ниже стоит животное на эволюционной лестнице, тем меньшим числом адаптационных механизмов оно обладает и тем больше его чувствительность ко многим факторам среды. Английский ученый Л. Проссер (1978) считает, что чувствительность биотестов на простейших часто значительно превышает таковую на высших животных.

Инфузории (Infusoria) – класс наиболее высокоразвитых простейших животных (Protozoa). Класс инфузории включает около 6000 видов (относящихся к 400 родам) и делится на 5 подклассов: равноресничные инфузории (Holotricha), спиральноресничные инфузории (Spirotricha), кругоресничные инфузории (Peritricha), воронкоресничные инфузории, или хонотрихи (Chonotricha), и сосущие инфузории (Suctoria). Инфузории в равной мере обитают в пресной и морской воде; входят в состав планктона и бентоса; обитают также в почве, во влажных мхах, на песчаной литорали. Распространению инфузорий способствует их способность образовывать при высыхании водоёмов защитные цисты, переносимые ветром. Инфузории произошли, вероятно, от примитивных бесцветных гетеротрофных жгутиконосцев.

В биологических экспериментах используют такие высокочувствительные к загрязнению окружающей среды виды, как тетрахимены (род *Tetrahymena*, вид *Tetrahymena pyriformis*), парамеции (род *Paramecium*, вид *Paramecium caudatum*) и спиростомы (род *Spirostomum*, вид *Spirostomum ambiguum*). За последнее время на инфузориях проведено множество исследований в экспериментальной медицине и биологии. Ряд исследователей считает, что результаты, полученные на инфузориях, сопоставимы с результатами на мышах, крысах и других животных [Серегина и др., 2000; Тушмалова, Бурлакова и др., 1998].

Основные признаки класса: наличие ресничек (для движения и питания), два типа ядер (полиплоидный макронуклеус и диплоидный микронуклеус, которые различаются по структуре и функции), половой процесс в форме конъюгации (контакта и слияния особей, а не гамет). Тело инфузории состоит из плотной оболочки – кортекса (пелликула и слой эктоплазмы, иногда со стрекающими нитями – трихоцистами) и желеобразной эндоплазмы с ядрами, вакуолями и гранулами разного типа (митохондриями, секреторными тельцами). Основания (базаль-

ные тельца) ресничек лежат под пелликулой; реснички собраны в ряды, местами соединены в мембраны, мембранеллы и цирри. Хорошо развиты фибриллярные системы кортекса: опорные, скелетные, мускульные. Большинство инфузорий питается, заглатывая мелкие водоросли, грибы, бактерии. Пища переваривается в пищеварительных вакуолях, периодически отрывающихся от глотки и погружающихся в эндоплазму; непереваренные частицы удаляются через порошицу. Большинство инфузорий имеет одну или несколько сократительных вакуолей, регулирующих осмотическое давление в клетке. Размножение только бесполое путём деления надвое, повторного деления (стробилияции) или одновременного множественного деления (палинтомии). Деление клеток происходит раз в 2 – 3 сут [Wichterman, 1986]. Через несколько поколений в жизненном цикле инфузорий происходит половой процесс, который называют конъюгацией. Половой процесс видоизменён и уже не связан с размножением: это – временный контакт, слияние двух особей для обмена продуктами деления микронуклеусов и замены старого ядерного аппарата новым. Две инфузории подходят друг к другу брюшными сторонами, оболочка в месте их соприкосновения растворяется, и между ними образуется цитоплазматический мостик. Макронуклеусы при этом разрушаются, а микронуклеусы делятся мейозом на четыре ядра, три из которых разрушаются, а четвертое делится пополам митозом. В результате в каждой инфузории образуются мужское (мигрирующее) и женское (стационарное) ядра. Затем между особями происходит обмен мигрирующими ядрами с последующим слиянием стационарного и мигрирующего ядер, образуя диплоидное ядро – синкарион, после чего особи расходятся. При делении синкариона образуется два ядра. Одно из них становится диплоидным микронуклеусом, а второе превращается в полиплоидный макронуклеус. Таким образом, при половом процессе число инфузорий не увеличивается, а обновляются наследственные

свойства макронуклеуса и возникают новые комбинации генетической информации.

Веретенообразное тело спиростом достигает в длину 1 мм и более, отношение длины тела к ширине 10 : 1. Относительно крупные размеры спиростом значительно облегчают наблюдение за ними в бинокулярную лупу типа МБС-10. Этот вид инфузорий характеризуется спиральной сократимостью. Перистомальная впадина образует левозакрученную спираль и тянется от переднего конца до 1/3 длины тела спиростомы [Астахова и др., 1975]. В конце XX в. инфузории *S. ambiguum* стали объектом изучения физиологов, занимающихся исследованием филогенеза научения и памятного следа. Ядерный аппарат *S. ambiguum* представлен четковидным макронуклеусом, занимающим большую часть клетки, и множеством микронуклеусов, число которых достигает 100 и более [Астахова и др., 1975]. Несмотря на значительное разнообразие в развитии зачатков макронуклеуса у разных видов инфузорий, выделяют четыре главные стадии их развития, которые наблюдаются у большинства известных видов, в том числе, у спиростом. На первой стадии в зачатках появляются хромосомы; на второй они испытывают эндомитотическую редупликацию (или иногда политенизацию); на третьей хромосомы деспирализуются; на четвертой полиплоидизация возобновляется, появляются нуклеолы и зачаток преобразуется во взрослый макронуклеус. Полиплоидизация сопровождается интенсивным синтезом ДНК и многократной редупликацией хромосом, либо путем политенизации последних.

Таким образом, макронуклеус представляет собой высокополиплоидное ядро [Райков, 1967]. Макронуклеус богат РНК и белками. Генотипически одинаков с микронуклеусом, разница в активации генов. Возникает из генеративного ядра, но дифференцировано и не может снова стать таковым. Размер достигает 2 мм и больше. Обладает высокой метаболической активностью. Имеет следующие компоненты:

ядерную оболочку, кариолимфу, хроматин (занимает почти все ядро) и нуклеолы. Оболочка двухслойная, пронизана порами, проницаема для рибонуклеазы. Хроматин плотно упакован, содержится в виде нитей. Белковые компоненты – гистоны. Нуклеолы содержат РНК и белки негистонового типа. Деление макронуклеуса – равное деление надвое. Макронуклеус содержит гены, контролирующие фенотип, тип спаривания, диапазон антигенных типов и состав цитоплазмы. Генотип макронуклеуса не изменяется при длительном культивировании клонов.

В макронуклеусе *S. ambiguum* выделяют три типа телец [Астахова и др., 1975]. Самые крупные из них диаметром от 0,2 до 0,6 мкм, имеющие округлую или овальную форму, идентифицируют с нуклеолами. Эти образования имеют зернистую структуру. Тела средних размеров, около 0,07 мкм в диаметре, также имеют зернистую структуру. Считают, что это перерезанные пучки хроматиновых нитей [Астахова и др., 1975]. Самые мелкие тельца в электронный микроскоп выглядят точками и занимают оставшееся пространство кариоплазмы. Содержимое макронуклеуса *S. ambiguum*, достигавшего 1 – 1,5 мкм в диаметре, разделяют на два типа. Тельца размером 0,07 мкм имеют зернистое строение и очень сходны с тельцами тех же размеров в макронуклеусе и, как считают авторы, представляют собой перерезанные хроматиновые тяжи. Остальное пространство, как и в макронуклеусе, занимает кариоплазма с мельчайшими зернышками, которые выглядят точками. Ядра обоих типов окружены ободком хроматина и двойной мембраной, при этом наружная мембрана переходит в мембраны эндоплазматического ретикулюма. Данные электрон-микроскопического исследования свидетельствуют о чрезвычайно сложной морфологической организации протозойной клетки инфузории *S. ambiguum*, что, в свою очередь, отражает ее полифункциональность. В функциональном отношении наиболее активными являются поверхностные слои, о

чем свидетельствует сложность их строения и высокая концентрация митохондрий [Астахова и др., 1975; Тушмалова, Егорова, 2004].

Хорошо известна способность макронуклиуса регенерировать из небольшого фрагмента. Предположительно, макронуклиус содержит большое количество диплоидных субнуклиусов, способных к автономному размножению внутри макронуклиуса, т.е. является полигеномным ядром. Соотношение ДНК в макронуклеусе к количеству ДНК в микронуклеусе у инфузории *S. ambiguum*, оцененное методом окрашивания по Фельгену, составляет 5700 – 11400, а средняя степень плоидности макронуклеуса – 13150 [Райков, 1967]. Таким образом, у спиростомы имеется достаточно крупная по размеру мишень для γ -квантов.

Геномы некоторых видов инфузорий (*Paramecium tetraurelia*, *Oxytricha trifallax*) полностью расшифрованы. Как было установлено, например, геном *P. tetraurelia* содержит около 40 тыс. кодирующих белки генов (примерно в полтора раза больше, чем человеческий). Показано, что число генов увеличилось в результате трех последовательных дупликаций исходного генома, последняя из которых произошла в период возникновения видов-двойников *P. tetraurelia*. Генетический код у парамеций отличается от универсального генетического кода тем, что у них есть только один кодон, обозначающий конец синтеза полипептидной цепи (стоп-кодон) (в отличие от обычного их числа три). Недавние исследования показали необычные особенности организации геномов микро- и макронуклеусов у *O. trifallax* [Swart et al., 2013]. Геном микронуклеуса (генеративный геном) содержит множество транспозонов и других некодирующих участков (IES – *internally eliminated sequences*), кроме того, его гены значительно перемешаны; из-за этого он находится в нерабочем состоянии и служит только для передачи наследственной информации потомству. Геном макронуклеуса, напротив, содержит почти исключительно кодирующие участки (т.

е. гены), и именно он участвует в поддержании жизнедеятельности клетки. Геном макронуклеуса почти в 20 раз превышает по размеру геном микронуклеуса. В 2013 г. был полностью расшифрован макронуклеарный геном *O. trifallax*. Оказалось, что его размер составляет около 50 миллионов пар оснований, а сам он состоит из приблизительно 16 тыс. *нанохромосом* – хромосом, содержащих всего один ген и теломеры (размер одной нанохромосомы составляет от 500 до 66 тысяч пар нуклеотидов). После конъюгации геном макронуклеуса строится на основе генома микронуклеуса, подвергаясь при этом значительным перестройкам: 95 – 96 % генома микронуклеуса при образовании генома макронуклеуса удаляется, а оставшиеся «чистые» гены (MDS – *macronuclear destined sequences*), лишённые разных некодирующих элементов, собираются из перемешанного состояния в правильном порядке. Стоит отметить, что интроны при такой перестройке не удаляются, а входят в состав сохраняемых фрагментов. Показано, что при формировании хромосомы фрагменты ДНК могут вырезаться и соединяться по-разному, что приводит к образованию разных изоформ примерно у 10 % нанохромосом. В некоторых случаях существует связь между количеством копий хромосомы и уровнем её экспрессии, однако эта закономерность не является правилом. По-видимому, число копий нанохромосомы вообще не регулируется, и при делении они расходятся по дочерним клеткам случайным образом [Swart et al., 2013].

В экологических экспериментах в качестве тест-объектов часто используют ресничных инфузорий рода *Spirostomum* (отряд *Heterotricha*). Исследования показывают, что это очень удобный тест-объект для оценки токсичности водной среды [Тушмалова, Егорова, 2004; Nalecz-Jawecki, Sawicki, 2002; Серегина и др., 2000; Buonanno et al, 2012].

1.5 Поведенческая активность у простейших

В качестве показателей состояния *S. ambiguum* помимо выживаемости, изучают разные функции: изменение темпа деления, скорости формирования пищеварительных вакуолей, скорости движения и др. Темп деления дает возможность судить о состоянии клетки в пределах относительно больших интервалов времени. Для учета формирования пищеварительных вакуолей требуется иммобилизация инфузорий. Это значительно затрудняет и ограничивает его использование. Хорошим критерием функционального состояния инфузорий является подвижность. Поступательное движение этих простейших происходит за счет биения ресничек, расположенных по всему телу. Для количественного определения скорости их движения существуют разные методы. В 1907 г. Нагаи предложил метод с использованием гальванотаксиса. Помещая инфузорию в камеру с неполяризуемыми электродами на противоположных концах, автор заставлял их двигаться приблизительно прямолинейно [Тушмалова, Егорова, 2004]. Регистрируя время и определяя длину пути по шкале из миллиметровой бумаги, автор определял быстроту движения инфузорий. Недостатком метода Нагаи является то, что, измеряя скорость движения при разных воздействиях, трудно решить, зависит ли полученный результат от изменения самой подвижности или от влияния агента на гальванотаксис. Известен более простой способ регистрации подвижности. Инфузорию помещают в каплю на предметном стекле и подкладывают под него бумагу с миллиметровой сеткой. Подсчитывают под лупой количество квадратиков, пройденных инфузорией за определенный период времени [Тушмалова, Егорова, 2004]. Однако, учитывая кривизну пути инфузории, плавающей в капле, трудно признать этот метод точным. Известным российским зоологом В.А. Александровым был предложен более точный метод измерения скорости движения инфузорий

[Александров, 1958]. Спиростомы поодиночно помещались на предметное стекло с неглубокой лункой, куда наливалась культуральная среда. Диаметр лунки составлял 14 мм, и она целиком помещалась в поле зрения восьмикратного увеличения бинокулярной лупы. В соответствии с данными автора, через 2 – 3 мин после помещения инфузории в каплю среды движения их становились равномерными. Инфузория в капле плавала по кругу, недалеко от периферии. Для определения скорости движения на один тубус бинокля надевался зеркальный рисовальный аппарат и в течение некоторого времени, засекаемого секундомером, зарисовывался путь движения инфузории. Длину зарисованного пути, независимо от сложности его изгибов, с большой точностью можно было определить курвиметром. Так как глубина капли мала, то отклонения от плоскости проекции пути не было сколько-нибудь существенным. Таким образом, было выяснено, что с помощью продольного ряда мелких ресничек инфузории *S. ambigum* плавают примерно со скоростью 2,5 мм/с [Александров, 1958]. Прикосновение инфузорий к разным препятствиям вызывает реверсию биения ресничек, что приводит к остановке или попятному движению. Количественное изучение подвижности спиростом в конце XX в стали осуществлять методом, аналогичным методу «открытого поля», изначально предложенного К. Холлом (Hall C.S.) в 1934 году для изучения физиологии высшей нервной деятельности. Метод «открытого поля» был модифицирован и с успехом применён на донервных простейших организмов *S. ambigum* профессором МГУ Н.А. Тушмаловой [Тушмалова и др., 2000]. В качестве показателя токсичности воды используются значимые различия в двигательной активности у спиростом, помещенных в тестируемую среду и культуральную воду (специальную среду для культивирования или дехлорированную водопроводную воду). При этом действие исследуемой воды может проявляться в ряде нарушений в состоянии инфузорий в зависимости от степени токсич-

ности. При невысокой токсичности нередко наблюдается «фаза стимуляции», когда внешний вид контактных спиростом не отличается от контроля, а двигательная активность повышена. Более выраженная интоксикация характеризуется наступлением «фазы депрессии». Двигательная активность значительно снижена, иногда фиксируется полная неподвижность. Внешний вид инфузорий может не изменяться. При высоком уровне токсичности, помимо тяжелых функциональных нарушений, выражающихся в полном или почти полном отсутствии двигательной активности, наблюдаются резкие морфологические изменения у подопытных инфузорий. Такие изменения, если они развиваются, оказываются необратимыми и неизбежно ведут к гибели инфузорий, даже если их поместить в чистую среду. Еще более высокая степень интоксикации приводит к быстрой гибели и лизису инфузорий, либо в течение первых же минут после помещения в исследуемую воду, либо к исходу 24 ч наблюдения [Тушмалова, Егорова, 2004].

Изменение поведенческой реакции тест-объектов является одним из диагностических показателей стресса. Поведение является эволюционно-обусловленным показателем физиологического состояния животных. Как считают физиологи, возникшие на заре эволюции закономерности проявления поведения у простейших, сохраняются и у более развитых животных [Флеров, 1989]. На основании изменений в поведенческих феноменах одного вида животных можно прогнозировать нарушения поведения вообще. Следует отметить, что при выборе тест-функции важна возможность оценить не только значительные и, как правило, уже необратимые изменения в среде, но и первоначальные незначительные отклонения, когда еще возможно вернуть систему в прежнее нормальное состояние.

Вопрос о роли поведения в иерархии индикационных показателей состояния окружающей среды связан с именами таких известных ученых как Н.С. Строганов; А.Д. Слоним, Б.А. Флеров; Л.П. Брагинский;

Н.А. Тушмалова. В своих работах они показали, что степень отклонения от стандартных поведенческих реакций животных может служить одним из первичных, на визуальном уровне регистрируемых сигналов изменений в окружающей среде. Несомненно, что в системе иерархии биологических критериев качества среды поведение может быть отнесено к реакциям «первого ранга».

В современных природоохранных и экотоксикологических исследованиях изменения в поведении животных по-прежнему привлекают внимание широкого круга специалистов, занимающихся наблюдением, оценкой и прогнозированием состояния экосистем в условиях постоянно возрастающего антропогенного воздействия. Следует подчеркнуть, что подавляющее число работ выполнено на позвоночных животных. Использование поведения беспозвоночных в качестве критерия оценки факторов среды – явление более редкое. Наибольший интерес представляют врожденные формы поведения, относящиеся к эволюционно-универсальным реакциям, свойственным всем эукариотам, включая человека. К таким феноменам относится спонтанная двигательная активность в виде реакций избегания или поискового поведения. Физиологами определены ключевые стимулы и врожденный разрешающий механизм такого поведения. Все действия, связанные с перемещением животного в пространстве, являются локомоторной формой поведения. Однако в большинстве поведенческих тестов учитываются еще и изгибы тела, предпочтительные зоны расположения в экспериментальном поле, чередование активного движения и пауз. Поэтому в биотестировании рассматривают двигательную активность как целое.

Основателем экологической физиологии А.Д. Слонимом указаны биологически значимые функции поведения беспозвоночных и позвоночных животных. Он предложил критерий видовой специфичности как таксономический аспект поведения. В качестве адаптационного

аспекта представлена структура приспособления к измененным условиям среды, не вредящим виду. Индикация антропогенного влияния окружающей среды на живой организм включена в природоохранный аспект. В 1936 г. А.Д.Слоним писал: «Установление пластичности поведения, в той же мере, что и пластичности регуляций физиологических функций, наряду с определением так называемых предельно-допустимых концентраций (ПДК) загрязняющих и токсичных веществ и является той научной основой мероприятий по охране природы, которая должна объединить усилия как экологов, так и физиологов».

В фундаментальных эволюционно-физиологических исследованиях под руководством профессора МГУ Н.А.Тушмаловой определено, что возникшие на заре эволюции закономерности проявления врожденных форм поведения у простейших донервных эукариот сохраняются и у более высоко организованных беспозвоночных, имеющих зачатки цефализации или развитую нервную систему и дифференцированный мозг [Тушмалова, Егорова, 2004].

Природоохранный аспект изучения врожденного поведения низших гидробионтов позволяет использовать специфические характеристики, выявленные физиологами, а также молекулярные и ультраструктурные закономерности проявления поведенческих реакций в ответ на антропогенное загрязнение окружающей среды. Ссылаясь на найденные физиологами корреляции, и благодаря эволюционным закономерностям изменений в поведенческих феноменах одного вида животных под влиянием антропогенных факторов среды возможно прогнозирование «глубины» нарушений поведения вообще [Тушмалова, Егорова, 2004]. Физиологический, в частности, поведенческий подход в биотестировании качества водной среды позволяет определить критерии врожденного поведения животных разного уровня филогенеза, которые наиболее чутко реагируют на малые дозы и концентрации физических и химических неблагоприятных факторов окружающей

среды, оценка биологического действия которых представляет наибольший интерес в настоящее время.

В опытах на спиростомах показателями исходного функционального состояния служат разработанные профессором Н.А. Тушмаловой объективно регистрируемые реакции: спонтанная двигательная активность, уровень спонтанных сокращений, уровень пищевой возбудимости и состояние ядерного аппарата простейших. Эксперименты продемонстрировали применимость основных физиологических показателей, используемых в опытах на позвоночных животных, для определения функционального состояния инфузорий рода *Spirostomum* [Тушмалова, Бурлакова, Лебедева и др., 1998].

Динамика двигательной активности у инфузорий спиростом достаточно подробно изучена. Показаны индивидуальные отличия подвижности у отдельных инфузорий из однородной культуры [Тушмалова, 1986], выявлена чувствительность этой функции к малым и сверхмалым дозам химических токсикантов [Тушмалова, Лебедева, 2002]. Анализ изменения двигательная активность дал положительные результаты при тестировании ультрамалых доз пестицидов [Лебедева и др., 2004], при определении уровня биогенных и химических примесей в природных водах [Лебедева и др., 2000]. Известно о снижении двигательной активности спиростом при действии *альфа*- и *бета*-облучения [Цеплин и др., 2005].

Н.А.Тушмаловой исследованы условия содержания культуры спиростом, которые характеризовались наиболее стабильными показателями функционального состояния этих простейших организмов в эксперименте [Тушмалова, Егорова, 2004]. Рекомендовано их кормление сухими дрожжами и пересев в отстоянную дехлорированную воду один раз в неделю. Было установлено, что в условиях лаборатории при температуре 18 – 22° С инфузории делятся один раз в 48 ч, что определялось по плотности животных в 1 мл чистой культуры на фо-

токолориметре. Уровень спонтанной двигательной активности по числу пересечений визира окуляра отличался у отдельных инфузорий, но существенно не изменялся в течение 25 – 30 мин.

С применением Spirotox-теста, который заключается в оценке морфологических изменений тела спиростом, таких как сокращение и изгибы тела, а также летальная сферическая деформация и автолиз, показана чувствительность инфузорий *S. ambiguum* к 78 химическим соединениям [Nałeczcz-Jawecki, Sawicki, 2002]. Чувствительность Spirotox-теста авторы сравнили с четырьмя биотестами, которые являются общепринятыми во всем мире экотоксикологическими тестами: тест на *Tetrahymena pyriformis*, Microtox-тест, тесты на *Daphnia magna* и *Pimephales promelas*. Данные о токсичности анализируемых химических соединений, полученные на простейших *T. pyriformis* и *S. ambiguum*, были идентичными. Несмотря на то, что microtox-тест и тесты на *D. magna* и *P. promelas* оказались в шесть-восемь раз более чувствительными, чем Spirotox-тест, авторы указывают на высокую чувствительность инфузорий *S. ambiguum* к большинству химических соединений разных классов [Nałeczcz-Jawecki, Sawicki, 2002].

Инфузорий рода *Spirstomum* легко культивировать в лабораторных условиях, они имеют достаточно крупные для простейших размеры и обладают рядом особенностей строения, размножения и функционирования, что делает их удобным тест-объектом для экотоксикологических исследований. Наличие полиплоидного, с высоким содержанием ДНК, макронуклеуса, имеющего главенствующее значение при бесполом размножении спиростом, делает этих инфузорий удобным объектом для изучения наследуемых повреждений.

Глава 2 Место биотестирования в системе радиационного мониторинга водной среды

Оценка биологического состояния водной среды является ключевой задачей любых мероприятий в области экологии и рационального природопользования. До недавнего времени методы оценки базировались на определении предельно допустимых концентраций (ПДК) отдельных веществ и санитарно-гигиенических показателей. Однако такой подход не обеспечивал сохранения экологического благополучия водных объектов, т.к. соблюдение величин ПДК не всегда создает оптимальные условия для существования гидробионтов. Для прогноза результатов влияния антропогенных факторов как на экосистемы, так и на здоровье людей, необходимо было учитывать показатели, характеризующие реакцию отдельных организмов и экосистемы в целом на техногенное воздействие. Хорошо известно, что реакции живых систем на химические и физические факторы и их сочетания характеризуются интегральностью и кумулятивностью множества воздействий, нелинейными эффектами низких доз, наличием цепных процессов и отдаленных последствий локальных влияний на разные уровни сложноорганизованных экосистем. Экологическую опасность следует оценивать с учетом не только характера и силы антропогенного воздействия, но и биологических свойств реагирующей системы [Мелехова и др., 2010].

Современные физико-химические методы (газожидкостная хроматография, масс-спектрометрия и др.) позволяют определить минимальное количество токсического соединения в образце. Однако даже этим методам присущи существенные недостатки: высокая стоимость анализа (например, определение только тяжелых металлов в пробе превышает стоимость биотестирования в 10 – 15 раз), принципиальная невозможность проведения анализа всех токсикантов (особенно,

смеси веществ неизвестной природы). Эти методы не могут дать ответ на основной вопрос – насколько опасно количество токсических соединений в пробе для жизнедеятельности организмов. К тому же синтез значительного количества ранее неизвестных химических веществ, появление продуктов метаболизма долгоживущих соединений затрудняют выбор методики оценки содержания в окружающей среде нового поллютанта [Егорова, Сынзыныс, 2003].

Всего этого позволяют избежать методы биологического контроля среды, дающие интегральную оценку ее качества. Биотестирование является наиболее эффективным методом биологической оценки качества экосистем и водной среды в частности. По чувствительности, оперативности и экономичности оно существенно превосходит все известные методы аналогичного назначения [Филенко, Михеева, 2007; Мелехова и др., 2010]. Биологические методы не требуют предварительной идентификации конкретных химических соединений или физических воздействий, они достаточно просты в исполнении и позволяют вести контроль качества среды в непрерывном режиме. В отличие от физико-химических методов, биологические тест-системы реагируют на токсические соединения самой разнообразной химической природы. Всё это даёт возможность быстрой и ранней диагностики качества среды.

Примеры применения методов биотестирования в практике экологической экспертизы природных водоемов и питьевых водоисточников демонстрируют, что пороговые концентрации химических поллютантов, нарушающие жизнедеятельность организмов-биотестов, находятся ниже принятых значений ПДК. Постоянное присутствие поллютантов даже в низких концентрациях приводит к снижению видового разнообразия гидробионтов за счет исчезновения наиболее чувствительных к качеству воды видов [Мелехова и др., 2010].

В прикладных целях для биотестирования используют стандартизованные тест-объекты и тест-реакции живых организмов, для исследовательских задач список возможных организмов и тест-функций практически является неограниченным. В зависимости от целей и задач биотестирования в качестве тест-объектов применяется широкий круг организмов: высшие и низшие растения, бактерии, водоросли, водные и наземные беспозвоночные, млекопитающие. При выборе тест-объектов предпочтение отдается видам, которые широко распространены в природе и легко культивируются в лабораторных условиях. В Российской Федерации в качестве стандартных приняты тесты с ракообразными, водорослями, инфузориями, светящимися бактериями [Пашков, Фомин, Красный, 1997].

Большое значение в методике биотестирования имеет тест-функция – жизненная функция или критерий токсичности, используемые для характеристики отклика тест-объекта на повреждающее действие среды. В качестве показателей биотестирования для разных объектов может быть использован широкий круг показателей [Мелехова и др., 2010]. Приведем здесь лишь некоторые из них: выживаемость (смертность) тест-организмов – для инфузорий, ракообразных, эмбриональных стадий моллюсков, рыб, насекомых, растений; плодовитость, появление аномальных отклонений в раннем эмбриональном развитии организма, степень синхронности дробления яйцеклеток – для ракообразных, рыб, моллюсков; гибель клеток, изменение (прирост или убыль) численности клеток в культуре, коэффициент деления клеток, средняя скорость роста, суточный прирост культуры – для культур одноклеточных водорослей и инфузорий; энергия прорастания семян, длина первичного корня и др. – для растений.

Основной принцип биологического тестирования сводится к оценке достоверных различий между опытом (среда, содержащая токсикант) и контролем (чистая среда) по какому-либо параметру, указыва-

ющему на полное или частичное угнетение жизненных функций тест-организма под влиянием испытываемой среды (воды, почвы, воздуха) или индивидуальных токсикантов в определенных концентрациях. Важное условие правильного проведения биотестирования в производственных условиях – использование генетически однородных лабораторных культур, которые проходят проверки чувствительности, содержатся в специальных, оговоренных стандартами лабораторных условиях, обеспечивающих необходимую воспроизводимость результатов, а также максимальную чувствительность к токсическим веществам.

Одним из наиболее развитых направлений биомониторинга является биологическое тестирование водной среды [Majer, Grummt, Uhletal, 2005; Jha, 2004], основы которого в российской науке были заложены Н.С. Строгановым и получили развитие в работах Б.А. Флорова, О.Ф. Филенко, Л.П. Брагинского и др. Как правило, в результате процедуры лабораторного биотестирования устанавливается остролетальная концентрация вещества (или кратность разбавления исследуемой воды) или доза облучения, при которой наступает 50%-ная гибель тест-организмов и безвредная (недействующая) концентрация вещества, или безвредная кратность разбавления исследуемой воды, при которой гибель организмов не превышает таковую в контроле. Данные о хронической токсичности получают в длительном эксперименте, в котором также может устанавливаться безвредное разбавление. При использовании разных методов биотестирования, в которых приняты разные тест-реакции (выживаемость, продуктивность, иммобилизация) и тест-объекты (дафнии, бактерии, инфузории), показатель безвредного разбавления чрезвычайно важен, так как позволяет легко сопоставить полученные результаты. По результатам апробации методов биотестирования, организованной в начале 80-х гг. XX в. в СССР, в числе приоритетных тест-объектов были указаны планктонные рачки *D. magna* и водоросли [Филенко, Михеева, 2007; Филенко,

2007; Капков, 2003]. Классический дафниевый тест, в котором критерием служит выживаемость и репродуктивная функция тест-объектов, чаще всего применяется для анализа уже сформировавшихся эффектов на загрязнение. При осуществлении государственного экотоксикологического контроля допускается использование методик биотестирования, которые внесены или планируются к внесению в Государственный реестр. Среди них, кроме тестов на выживаемость дафний и цериодафний, для тестирования вод, почв, донных осадков и промышленных отходов пригодны использование хемотаксической реакции инфузорий, изменение численности одноклеточных водорослей *Scenedesmus quadricauda* и *Chlorella vulgaris* Beijer, подавление свечения люминесцентных бактерий и др. [МУ, 1990; Пашков, Фомин, Красный, 1997].

В последнее время для биотестирования используют не отдельные биотесты, а систему (батарею) тестов, включающую тест-организмы разных трофических уровней и разные тест-функции. Для оценки токсичности сточных вод предлагается использование фито-гидробионтов (одноклеточных зеленых водорослей *Scenedesmus quadricauda*, высшее растение – ряска *Lemna minor*), зоогидробионтов (инфузории *Tetrahymena pyriformis*, низших ракообразных – дафнии *Daphnia magna*, плоских червей – турбеллярия, планария *Dugesia lugubris*) [Мелехова и др., 2010]. Оптимальный набор тест-организмов должен включать представителей разных трофических уровней: водоросли, коловратки и/или ракообразные, бактерии и простейшие. Результаты биотестирования позволяют выявить критические ситуации и являются необходимыми для получения объективной информации в целях разработки мероприятий по уменьшению влияния загрязнения на окружающую среду. В случае определения факта малой токсичности пробы или ее не токсичности дальнейшее исследование другими методами не требуется. Биологические тест-системы показывают об-

щий индекс токсичности образца и позволяют быстро ответить на вопрос: присутствуют ли в среде токсические агенты в опасной для живого организма концентрации. Главная фундаментальная идея всех без исключения методов биологического мониторинга заключается в использовании широкого спектра показателей, которые характеризуют эффективность гомеостатических механизмов экосистем. Биологические методы оценки качества природных вод основаны на учете реакции живых организмов на загрязнение среды их обитания.

Возрастающий интерес ученых разных профилей к изучению феноменов, отражающих эффект малых и сверхмалых воздействий на живые организмы, обусловлен для биологов прежде всего поиском способов минимизации их действия на окружающую среду. Эта общебиологическая проблема отражает один из подходов в аспекте охраны природы в целом от неблагоприятных антропогенных условий. Поэтому актуальным является поиск чувствительных тест-объектов и критериев для оценки, в том числе, низких уровней радиационного фактора.

В настоящее время в водной токсикологии, несмотря на громадное количество работ по оценке токсичности загрязняющих веществ, отсутствует система сравнительно-экотоксикологического анализа, которая позволила бы не только оценить действие вредных веществ на гидробионтов разных систематических групп, но и выявить среди них объекты, наиболее чувствительные и удобные для целей биотестирования. Обнаружение и количественное определение содержания загрязняющих веществ в окружающей среде не достаточно для экологического мониторинга. Необходимо также определить их опасность для биологических систем, которые являются конечными получателями токсикант-индуцированного повреждения [Jha, 2004; Jha, Cheung, Foulkes et al., 2000]. Для этого в системе биологического мониторинга используют ответные реакции экологически значимых видов как инди-

каторов ущерба экосистемам [Moore, Depledge, Readman et al., 2004; Jha, 2008]. В публикациях МКРЗ в настоящее время уделяется серьезное внимание разработке системы «референтных видов» – гипотетических объектов, имеющих анатомические, физиологические, поведенческие базовые характеристики животного или растения определенного типа [ICRP, 2009]. Требования к референтным видам установлены следующие: вид должен быть значимым звеном в трофической цепи в конкретной экосистеме, широко распространенным, изученным в радиобиологическом плане, радиочувствительным, давать возможность оценки доз в разных радиэкологических ситуациях. Важным моментом в выборе референтных видов является их принадлежность к разным уровням филогенеза – от простейших до высших организмов и от одноклеточных до многоклеточных. Однако, несмотря на экологическую значимость беспозвоночных и простейших, для создания существующих баз данных о чувствительности разных представителей биоты к ионизирующему излучению, например, [FREDERICA, 2006], эти представители гидробионтов не использованы или проанализированы в незначительном объеме.

Глава 3 Биологические эффекты и механизмы низкоинтенсивного неионизирующего излучения

За последние 50 лет произошел резкий скачок напряженности и мощности электромагнитных излучений (ЭМИ) радиочастотного диапазона (РЧ). В биосфере появились техногенные электромагнитные поля (ЭМП) с характеристиками, отличными от естественных. Их параметры обеспечивают решение важнейших задач научно-технического прогресса. Однако, как это происходило со многими другими факторами, способствующими развитию цивилизации, внедрение

новейших технологий не сопровождается всесторонней оценкой их воздействия на человека и, тем более, на природную среду. Это во многом связано с необходимостью скорейшего развития и освоения электротехнических и радиоэлектронных информационных комплексов, используемых во всех сферах человеческой деятельности. ЭМИ РЧ, применяемые в новых технологиях, имеют длину волны в диапазоне 0,001 – 10 м. Их относят к сверхслабым излучениям [Кудряшов, Перов, Рубин, 2008]. Однако именно к ним организм оказался наиболее чувствителен, вероятно, потому что по мощности они сопоставимы с эндогенными излучениями [Казаков и др., 2009]. ЭМИ состоит из электрической и магнитной составляющих. Электрическая часть производится за счет градиента напряжения. Магнитная часть порождается любым протеканием тока и пропорционально току течет далее по линиям электропередач, мощность которых зависит от потребительского спроса. Оба типа полей вызывают биологические эффекты. Однако, магнитное поле более разрушительно, так как оно легко проникает в живые ткани [Goldsworthy, 2007]. При очень низких частотах электрические и магнитные поля разделяются. На высоких частотах они не разделены и называются электромагнитными полями [Carlos, 2006; Johansson, 2009; Петин, 2006].

Несмотря на многочисленные исследования, до настоящего времени достоверно не определены не только основные механизмы не-теплого действия ЭМИ на биологические объекты, но и наличие самих биологических эффектов. Как известно, энергии неионизирующих излучений недостаточно для ионизации и разрушения связей молекулярных структур. Однако этот тип излучения может вызывать поляризационные процессы [Куклев, 2001]. В последнее время появились теоретические разработки и отдельные, правда, еще не бесспорные, гипотезы о том, что ЭМИ не только является фоном, на котором разворачиваются основные биологические процессы, но и может выпол-

нять решающую роль во многих процессах обмена веществ. По сложившемуся мнению, процессы взаимодействия электромагнитных полей с живыми организмами определяются как параметрами самого излучения (частотой и длиной волны, когерентностью и поляризацией, интенсивностью и др.), так и свойствами биосистемы как среды распространения ЭМП (диэлектрической проницаемостью, электрической проводимостью, собственной биоэлектрической активностью ткани и т.д.) [Григорьев, Бичелдей, Меркулов, 2003; Григорьев, 2004; Григорьев и др., 2005; Гапеев, 2014]. Важная роль в реализации коммуникационных связей в организме отводится низкоинтенсивным когерентным излучениям, представляющим собой продукт жизнедеятельности клетки [Пресман, 1968; Фрелих, 1977]. Значительный экспериментальный и теоретический материал, накопленный к настоящему времени, свидетельствует, что в биологических тканях под влиянием НИ ЭМИ реализуются многие известные в физике эффекты, связанные с поляризацией, прямой и отрицательной проводимостью биологических структур, генерацией собственных ЭМ-колебаний, пьезоэффектами, фотопроводимостью и др. [Казаков, Орлов, Чурмасов, 2009]. На клеточном уровне обсуждаются мембранная, ионная, полевая (нехимическая) и другие теории взаимодействия ЭМП с клеточными структурами. Внешнее поле играет роль управляющего сигнала для живой системы [Бецкий, Кислов, Лебедева, 2004; Бецкий, Кислов, Яременко, 2005]. Слабый сигнал на «входе» при определённых условиях приводит к существенным, долговременным, и к тому же весьма маловероятным с точки зрения классических представлений перестройкам в системе, которые невозможно объяснить просто добавкой малой энергии. По некоторой точке зрения тонкий слой воды (2,4 см для 1 ГГц, 0,34 см для 10 ГГц и 0,043 см для 100 ГГц) является защитным экраном от ЭМИ [Петин, 2006]. Условным энергетическим порогом в диапазоне радиочастот порядка 1 ГГц, выше которого можно говорить о тепловых эффектах воздействия РЧ ЭМИ, предлагают

считать для человека плотность потока энергии (ППЭ) $50 - 100 \text{ Вт/м}^2$, для животных средних размеров (обезьяна, кошка, кролик) – $25 - 50 \text{ Вт/м}^2$ и для мелких животных (крыса, мышь, морская свинка) – $5 - 10 \text{ Вт/м}^2$ [Казаков, Орлов, Чурмасов, 2009], что, примерно, соответствует энергии kT при температуре 300K , т.е. «тепловым шумам» при обычных условиях. В соответствии с классическими представлениями, основной механизм действия ЭМИ на биосистемы связан с тепловыми эффектами, поэтому электромагнитные излучения меньшей мощности не должны оказывать заметного влияния на биологические объекты [Мартынюк, Нижельская, 2009]. В области ниже этих значений тепловой эффект не наблюдается, и такие излучения относят к низкоинтенсивным (НИ). Сложилось мнение, что биологические эффекты НИ РЧ ЭМИ, обусловленные этими взаимодействиями, зависят не от количества энергии, вносимой в ту или иную систему, а от ее информационного содержания (модуляционно-временных параметров) и состояния самой биологической системы. При информационном характере действия ЭМП с определенной вероятностью может изменять характер и скорость передачи информации в организме, процесс формирования условных рефлексов, содержание ключевых ферментов энергетического обмена и др. [Казаков, Орлов, Чурмасов, 2009].

Нынешняя среда обитания организмов, отличающаяся измененными человеком электромагнитными параметрами, уже вызывает изменения свойств воды и почвы. Вполне возможно, что антропогенные электромагнитные поля способны оказать негативное влияние на функциональное состояние биоты. Однако эти эффекты часто приписывают к воздействию более привычных и изученных факторов. При анализе эффектов сантиметрового диапазона, особое внимание обращают на себя экологические изменения в условиях хронического радиочастотного воздействия на агробиоценозы с нетепловыми уровнями (ППЭ от $0,05 \text{ Вт/м}^2$ до $0,1 \text{ Вт/м}^2$), которые в недалеком будущем

могут характеризовать среду обитания живых организмов на нашей планете в целом [Козьмин, Егорова, 2006]. Важнейшей составной частью агроценозов является биосистема свободно живущих в почве микроорганизмов, деятельность которых, в конечном счете, определяет плодородие почв и доступность питательных веществ. Из факторов физической природы (ионизирующее излучение, УФ-излучение, радиоволны СВЧ-диапазона) микроорганизмы наиболее чувствительны к УФ-излучению в коротковолновой части спектра ($\lambda < 320$ нм) и наиболее устойчивы по сравнению с другими организмами (растениями, животными) к ионизирующему излучению [Иголкина и др., 2004; Радиационные технологии..., 2015]. В работе [Иголкина и др., 2004] проанализирована выживаемость клеток дикого штамма *E.coli* WP₂ и мутантного штамма *E.coli hcr⁻ exr⁻*. Показано достоверное на 50% снижение выживаемости мутанта при экспозиции 150 мин на частоте 10,14 ГГц в отличие от дикого штамма. По всей видимости, у дикого штамма *E.coli* системы репарации не нарушены и при наличии повреждений они активируются за счет ускорения процессов метаболизма. Одним из объектов исследований была одноклеточная водоросль *Chlorella vulgares* – широко распространенный организм водной среды и, в силу своих физиологических особенностей, высокочувствительный к изменениям внешней среды. При 4-часовой экспозиции культуры хлореллы в ЭМП с частотой излучения от 8,8 до 10,4 ГГц с ППЭ 2 Вт/м² наблюдали снижение общей численности клеток, повышение числа мертвых «гигантских» клеток и уменьшение первичной биомассы [Егорова, 2005]. В исследовании [Chen, Lu, Chiang et al., 2012] 6-часовая экспозиция дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в ЭМП с частотой мобильной связи 1,8 ГГц и SAR 4,7 Вт/кг привела к изменению экспрессии генов. ПЦР-анализом были выделены два гена, экспрессия которых значительно изменилась.

В ряде исследований сообщается об эффектах воздействия ЭМП на растения. В работах [Tkalec, Malaric, Pavlica et al., 2009; Пяткова, Корнеев, Симакова и др., 2005; Пяткова, Литовченко, Козьмин, 2005; Pesnya, Romanovsky, 2013] эффект НИ РЧ ЭМП анализировали на клетках лука. При экспозиции лука в НИ РЧ ЭМП обнаружено нарушение митотической активности, образование гигантских хромосом, подавление анафаз и формирование хромосомных фрагментов. Выявленные цитогенетические изменения сохранялись несколько дней после облучения [Tkalec, Malaric, Pavlica et al, 2009]. Авторы считают, что обнаруженные ими генетические эффекты хорошо коррелируют с результатами тестов на животных.

Как известно, специфичность нетеплового действия радиочастотного излучения определяется резонансным характером энергетической и информационной природы. Первичное действие реализуется на клеточном уровне и связано с элементами цитоплазматических мембран, в частности, молекулами белков и ферментов, обладающих значительным электрическим дипольным моментом. Для объяснения нетермических эффектов часто привлекают теорию Фрелиха [Фрелих, 1977], согласно которой при воздействии ЭМ энергии может произойти полярная перестройка биомолекул, способная дать на резонансной частоте колебания большой амплитуды за счет перекачки энергии. Также обращают внимание на возможность механохимических реакций гомолитического распада молекул воды с появлением радикалов атомарного водорода и гидроксид-радикала [Пяткова, Литовченко, Козьмин, 2005]. Вода становится нестабильной полимерной системой. Причем эффекты диссоциации наблюдаются при поглощении водой электромагнитной энергии только малой интенсивности. Радикалы, гидратируясь, могут существовать значительное время и вступать в многообразные реакции с присутствующими в водных растворах природными веществами, например, структурными элементами клеток

про- и эукариот. Ключевым этапом в процессах образования активных форм кислорода (АФК) под действием неионизирующих факторов является переход кислорода из триплетного в синглетное состояние и восстановление до супероксид анион-радикала, протонированная форма которого дисмутирует с образованием перекиси водорода [Гудков, Иванов, Карп и др., 2014].

Среди выявленных разными авторами эффектов и механизмов РЧ излучения нетепловой интенсивности можно выделить следующие: влияние на течение биохимических реакций внутриклеточного метаболизма (в частности, на процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях) [Lerchl, Kruger, Niehaus et al., 2008; Moustafa, Moustafa, Belacy, Abou-El-Ela, Ali, 2001; Zmyslony, Politanski, Rajkowska et al., 2004; Meral, Mert, Mert, Deger et al., 2007]; изменение ферментативной активности белков ацетилхолина и бутилхолинэстеразы в структурах головного мозга, моноаминоксидазы печени и головного мозга [Barteri, Pala, Rotella, 2004; Paulraj, Behari, 2002]; резонансное поглощение ЭМИ белковыми молекулами, их конформационная перестройка [Kwee, Raskmark, Velizarov, 2001] воздействие (прямое или косвенное через Са-зависимые реакции и участие циклических нуклеотидов) на процессы передачи генетической информации – транскрипцию и трансляцию [Tkalec, Malari, Pavlica et al., 2009]; изменение проницаемости мембран для ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} с модификацией функции рецепторов и ионных каналов [Maskey, Kim, Aryal et al., 2010]; воздействие на функции центральной нервной системы – снижение чувствительности к другим раздражителям, изменение электрической активности мозга, процессов формирования навыков и хранения информации; изменение динамики иммунного ответа [Hung, Anderson, Horne, McEvoy, 2007; Divan, Kheifets, Obel, Olsen, 2008; Sage, Carpenter, 2009], снижение качества спермы и связанное с этим мужское бесплодие [Desai, Kesari, Agarwal, 2009], повреждения внутреннего уха при длительном использовании сотового телефона [Panda, Jain,

Bakshi, Munjal, 2010]. ЭМИ может повлиять на биологические системы за счет повышения уровня свободных радикалов, накопление которых в клетке способствует перекисному окислению липидов (ПОЛ) и, путем изменения антиоксидантной активности, приводит к окислительному стрессу [De Iuliis, Newey, King, Aitken, 2009; Panagopoulos, 2011]. Прямые эффекты ПОЛ в мембранах клеток включают потерю текучести, уменьшение электрического сопротивления, подвижности белков в мембране и увеличение обмена фосфолипидами между бислоями мембраны [Spiteller, 2002]. Косвенное воздействие ПОЛ может оказывать через биологически активные альдегиды. В ряде работ наблюдали значительное увеличение малонового диальдегида (МДА) при уменьшении антиоксидантной активности в клетках мозга, печени и почек крыс [Ragy, 2014; Meral, Mert, et al., 2007; Sokolovic, Djindjic, Nikolic et al., 2008; Kesari, Kumar, Behari, 2011; Nabarawy, Desouky, 2011; Ozguner, Oktem, Ayata et al., 2005] и в сыворотке крови кроликов [Irmak, Fadillioglu, Gulec et al., 2002], подвергшихся воздействию ЭМИ на частоте мобильной связи 0,9 ГГц с ППЭ 25 Вт/м². Как было показано в [Koюu, Gokalp, Ozguner et al., 2005], МДА способствует разрушению мембранных белков.

Считается, что продолжительность действия ЭМИ является существенным фактором. Это подтверждают эксперименты, в которых животных подвергали воздействию на частоте 0,95 ГГц в течение 14 сут и не обнаружили изменения биохимических показателей [Sarookhani, Rezaei, Safari et al., 2011], а после облучения в течение 50 сут (долгосрочная экспозиция), гормональная активность резко возростала [Aghdam et al., 2008]. В работе [Tkales, Malari, Pavlica et al., 2009] в аллиум-тесте обнаружена высокая частота генетических нарушений в корневой меристеме лука после НИ ЭМИ на частоте 10-21 МГц. Авторы связывают генетические эффекты с нарушением гомеостаза ионов кальция в клетках.

Важным физическим параметром ЭМИ является интенсивность (или плотность потока энергии, ППЭ). Особенностью биологических нетепловых эффектов является их существование при крайне низких ППЭ и наличие S-образной зависимости от ППЭ [Belyaev, 2010]. На клеточном уровне показано, что эффект изменения функциональной активности нейтрофилов имеет S-образную зависимость от ППЭ: половина величины эффекта достигалась при ППЭ ~ 1 мкВт/см², а начиная с ППЭ ~ 10 мкВт/см², эффект слабо меняется с увеличением интенсивности излучения на три порядка вплоть до тепловых значений [Гапеев, 2014]. Важной особенностью проявления биологического эффекта ЭМИ нетеплового уровня является то, что эффект носит кумулятивный характер и начинает проявляться только через некоторое время после облучения – в среднем от 15 – 20 мин до 1 ч [Гапеев, 2014].

В обзоре [Verschaeve, Juutilainen, Lagroyeet al., 2010] проанализированы исследования генетических эффектов (микроядра, хромосомные aberrации и др.) на широком спектре тест-объектов: клетках крови человека и животных, клетках прокариот *Salmonella typhimurium* и *E. coli* (изменение плазмидных генов, деградация ДНК) и растений *Allium cepa* и *Tradescantia* (микроядерный тест, хромосомные aberrации), а также на беспозвоночном *Drosophila melanogaster*. Авторы обзора согласны, что *in vitro* исследования не могут полностью воспроизвести условия *in situ*. Однако они могут прогнозировать токсический риск, а также дают возможность оценить механизмы действия повреждающего фактора. Анализ исследований показал, что эффекты, обнаруженные *in vitro*, хорошо воспроизводятся *in vivo*. Авторы [Verschaeve, Juutilainen, Lagroyeet al., 2010] проанализировали 184 работы и считают, что положительные результаты цитогенетических тестов НИ РЧ ЭМИ можно, скорее, отнести к гипертермии и/или методологическим недостаткам. Большинство исследователей, как сообщается в

обзоре, некорректно характеризуют контроль – условно подверженный облучению, положительный и/или слепой, что тоже может сказаться на выводах. Авторы обзора акцентируют внимание на крайне слабой статистике многих научных исследований. Вместе с тем, по их подсчетам, преобладают выводы, что воздействие радиочастот низкой интенсивности не является генотоксичным фактором, однако, это мнение не разделяется всеми авторами анализируемых статей.

В ряде работ описано наличие порога действия радиочастотного ЭМИ при малых мощностях по цитогенетическим показателям *in vitro* [Tice, Hook, Donner et al., 2002; Mashevich, Folkman, Kesar et al., 2003]. В некоторых статьях поднят и нуждается в дальнейшем изучении вопрос о совместном действии мутагенов и канцерогенов в окружающей среде, что может, например, повлиять на механизмы репарации ДНК, стимулируя образование свободных радикалов, и приводить к синергическим эффектам повреждающего действия на ДНК [Oktem, Ozguner, Mollaoglu, Koyu et al., 2005; Yao, Wu, Wang et al., 2008]. Активно обсуждается механизм появления одиночных и двойных разрывов ДНК, связанный с образованием свободных радикалов. Известно, что свободно-радикальные процессы нарушают метаболизм ДНК, вызывая генные мутации, индуцируя хромосомные и геномные нарушения, воздействуя на кинетохоры [Мелехова, 2010; Мелехова и др., 2012]. Возможно, что снижение митотической активности и увеличение числа аберрантных клеток связано с нарушением комплементарности структуры ДНК при разрушении водородных связей.

Использование простейших и беспозвоночных животных в исследованиях биоэффектов ЭМП все активнее занимает одно из значимых позиций. Анализируются возможные механизмы, лежащие в основе апоптической гибели клеток [Manta, Stravopodis, Papassideri, Margaritis, 2013] и снижения плодовитости дрозофилы, вызванные неионизирующим излучением, [Margaritis, Manta, Kokkaliaris et al., 2013]. Авторами

обнаружено двукратное увеличение уровня АФК в яичниках половозрелых мух после 6-часового воздействия беспроводной системой DECT (Digital Enhanced Cordless Telephone) с частотой излучения 1,88 – 1,90 ГГц. Интенсивность электрического поля была 2,7 В/м, SAR составляла 0,9 Вт/кг. При этом увеличение времени экспозиции до 24 и 96 ч приводило лишь к незначительному повышению уровня АФК. После прекращения излучения происходило восстановление уровня свободных радикалов, которое авторы связывают с активизацией антиоксидантной системы организма [Margaritis, Manta, Kokkaliaris et al., 2013]. В литературе имеются сведения о снижении плодовитости ракообразных *Daphnia magna* в 5 раз после нахождения в ЭМП с частотой 50 Гц [Асабаев, Бончковская, 1973], о замедлении ритма сердцебиения здоровой дафнии при 15-минутном нахождении в ЭМП с частотой 129 ГГц [Усанов, Креницкий, Майбородин и др., 2005].

В работе [Гапеев, Чемерис, Фесенко и др., 1994] показано, что низкоинтенсивное (100 мкВт/см^2) импульсно-модулированное ЭМИ крайне высоких частот (42,0...42,5 ГГц, частота модуляции 0,1 Гц) ингибировало двигательную активность инфузорий *Paramecium caudatum*. Авторы предположили, что действие излучения на простейших обусловлено изменением баланса Ca^{2+} за счет синхронизации модулированным ЭМИ осцилляций Ca^{2+} и/или потоков Ca^{2+} из цитоплазмы клеток в ресничную аксонему.

В литературе указывается, что определяющую роль в действии ЭМИ на биологические объекты играет вода [Пяткова, Корнеев, Симанова и др., 2005; Бецкий, Лебедева, Костровская, 2003; Вода – космическое явление, 2004]. Эта проблема связана с изучением механизмов первичной рецепции излучения. Как известно, вода является самым сильным поглотителем ЭМИ. Глубина проникновения ЭМИ с частотой, например, 1 ГГц в ткани с высоким содержанием жидкости составляет 2,5 см [Петин, 2006]. При облучении водных организмов ми-

шенью являются в первую очередь молекулы воды. В работе [Мартынюк, Нижельская, 2009] при локальном облучении слоя воды в НИ РЧ ЭМП, содержащей концентрированный раствор красителя, в чашках Петри возникали разного типа упорядоченные диссипативные структуры. Быстрые динамические изменения в жидкости происходили в течение минут, а затем структуры стабилизировались.

Чувствительным инструментом для обнаружения структурных дефектов воды являются измерения относительной диэлектрической проницаемости и тангенса угла диэлектрических потерь. Проведенные измерения показали наличие экстремумов диэлектрической проницаемости, особенно заметных на частотах 9,5 и 10,5 ГГц [Козьмин, Егорова, 2006]. Следует отметить, что данные измерения произведены волноводным мостовым методом при ППЭ в волноводе около 5 Вт/м^2 . Вполне возможно, что при этих значениях ППЭ уже происходят изменения свойств воды, и данный метод, следовательно, не может отразить свойства объекта при изучении биологического действия ЭМИ низкой интенсивности. В связи с этим обстоятельством существенно затрудняется анализ состояния воды и биологических сред. Более адекватной оценкой являются показатели биологического действия, полученные в процессе облучения или после его завершения методами, исключающими дополнительное воздействие физических полей и, может быть, ряда химических реагентов. Поэтому особый интерес представляют исследования воздействия ЭМИ на гидробиологические объекты, жизнедеятельность которых во многом определяется состоянием водной среды.

Итак, имеющиеся в литературе данные о нетепловом действии ЭМИ на биоту свидетельствуют о высокой чувствительности ее представителей к этому физическому фактору. По всей видимости, многие живые организмы обладают большей чувствительностью к ЭМП по сравнению с человеком. Существующие оценки риска ЭМП в значи-

тельной степени полагаются на результаты многочисленных *in vivo* и *in vitro* исследований на млекопитающих или крупномасштабных эпидемиологических наблюдениях. Хотя эти исследования предоставляют важную информацию о биологических эффектах ЭМП, часто они очень трудоемки. Учитывая тот факт, что низкоинтенсивные ЭМП в последнее время вызывают особую озабоченность специалистов и населения, становится необходимым разрабатывать более чувствительные экспериментальные методы и модели для оценки эффектов радиочастотного излучения.

Представленные в обзоре литературы результаты исследований демонстрируют необходимость учета особенностей нетеплового действия электромагнитных излучений на биоту, т.к. эти излучения способны оказывать негативное влияние на разных иерархических уровнях в природных биогеоценозах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ

Несмотря на многочисленные международные директивы и десятилетия исследований биологических эффектов излучения, остаются значительные проблемы в наших знаниях о прямых и отдаленных радиационно-индуцированных эффектах у представителей биоты. По источникам литературы видно, что увеличилось число исследований экологически значимых экспозиций и источников излучения. В базе данных FREDERICA собраны результатов исследований острого и хронического воздействия на биоту в соотношении 64 / 36 %. Имеющиеся данные представлены, в основном, эффектами на рыбах, млекопитающих и наземных растениях, и практически отсутствуют эффекты на представителях подтипа ракообразных [Coppelstone et al., 2008].

Суммируя имеющиеся данные по эффектам хронического воздействия на ракообразных можно составить иерархию радиочувствитель-

ности по четырем анализируемым показателям: мутации > плодовитость > заболеваемость > выживаемость. Несмотря на то, что иерархия основана на крайне ограниченных данных, можно предположить, что плодовитость является наиболее чувствительным показателем радиационного воздействия на биоту. Ответы на молекулярном уровне, т.е., изменения в экспрессии генов, возможно, так же являются чувствительными индикаторами воздействия токсиканта на организм. Хотя в последнее время исследования на ракообразных на молекулярном уровне стали проводиться достаточно широко, использование экотоксикогенетического подхода (интеграции молекулярно-генетических и экотоксикологических методов для оценки стрессового воздействия на окружающую среду) остается в центре внимания специалистов. Несмотря на чувствительность мутационного показателя к радиационному воздействию, прослеживается необходимость использования более дешевых и доступных методов анализа с целью подтверждения полезности анализа мутаций в качестве инструментов радиобиологии и радиоэкологии. Можно отметить, что поиск связи между экспрессией генов и показателями на более высоких уровнях биологической организации, такими как плодовитость, выживаемость и жизнеспособность, по-прежнему остается серьезной проблемой экотоксикологии применительно к оценке экологических рисков. Кроме того, генетические изменения не обязательно вызывают биологический эффект у организма. Поэтому, пока не будут получены четкие экспериментальные данные, связывающие изменения в экспрессии генов и эффекты на более высоких уровнях биологической организации, такие показатели экотоксикологического подхода как плодовитость, выживаемость, жизнеспособность, останутся важными в биологическом мониторинге загрязнения окружающей среды. Разработка принципов системы построения биологического мониторинга с использованием референтных видов биоты на основе анализа показателей их жизнеспособности

способности в условиях радиационного загрязнения окружающей среды является одной из задач экологической науки в настоящее время.

В последнее время стали широко исследоваться закономерности действия радиации на беспозвоночных экспериментальных моделях, таких как дождевые черви, нематоды, ракообразные и насекомые. Особенно чувствительны к облучению периоды эмбрионального и раннего постэмбрионального развития организма. К ключевым отдаленным последствиям на организменном уровне относят изменение продолжительности жизни и репродуктивного потенциала облученных популяций.

Анализ литературы показал, что беспозвоночные рода *Daphnia* представляют собой полезную экспериментальную модель. Дафнии широко используются не только в экотоксикологических исследованиях, но и при анализе эффектов хронического облучения и электромагнитных полей промышленной частоты. Важно отметить, что ракообразные являются одними из ключевых звеньев водных экосистем, важным источником пищи промысловых видов рыб и составляют примерно 90% зоопланктона Мирового океана, а водная среда охватывает более 70% поверхности планеты [Lonsdale, Cerrato, Holland et al., 2009]. Другой, обсуждаемый в обзоре литературы объект биологического мониторинга – *Spirostomum ambiguum*, одна из широко распространенных в пресноводных экосистемах ресничных инфузорий. Возможность круглогодичного ведения лабораторной культуры, крупные размеры и чувствительность к действию загрязняющих веществ делают инфузорию подходящим объектом для биотестирования. В практическом плане особый интерес представляет экспресс-метод определения токсичности водных сред, предложенный профессором МГУ Н.А. Тушмаловой. Метод, основанный на количественной оценке двигательной активности спиростом, позволяет получать результаты о токсичности водной среды в течение 1–2 часов. В цитируемых в обзо-

ре литературы работах показана высокая чувствительность поведенческой активности инфузорий *S. ambigua* к негативным внешним воздействиям. Что же касается токсического действия радиации, то этот вопрос до сих пор оставался не изученным.

Несмотря на то, что в последнее десятилетие наблюдается рост числа исследований эффектов излучения на разных представителях биоты, полученных результатов недостаточно для обоснования закономерностей и механизмов их действия на организменном и популяционном уровнях. Большинство исследований сосредоточены на отдельных этапах жизненных циклов организмов и лишь на одном поколении. В то же время известно, что загрязняющие вещества, действующие как на выживание, так и на размножение, могут вызвать изменения в организме, передающиеся из поколения в поколение.

Обзор литературы по радиационно-индуцированным эффектам у ракообразных показал, что эффекты наблюдаются в широком диапазоне доз и от разных источников излучения, и, вероятно, могут иметь экологические последствия для водной экосистемы. Однако анализ литературы подчеркнул недостаток данных по экотоксикологическим показателям. Эта пробела должна быть решена, чтобы повысить эффективность подтипа ракообразных в качестве референтного вида для оптимизации и развития основ экологической радиационной защиты.

ГЛАВА 4 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В РАБОТЕ

4.1 Описание тест-культур и методик культивирования

4.1.1 Модель одноклеточного организма инфузории

Spirostomum ambiguum

Использованные в работе инфузории *Spirostomum ambiguum* Ehrbg имеют вытянутое в длину тело размером до 1 мм и до 50 мкм в ширину (рис. 2).



Рис. 2 – Инфузория *Spirostomum ambiguum*

Относительно большие размеры позволяют анализировать многие морфо-функциональные характеристики этих простейших, наблюдая за ними в микроскоп типа МБС-10 с увеличением $\times 2$. Спиростомы широко распространены в природных водоемах и хорошо размножаются в лабораторных условиях.

Лабораторный штамм *S. ambiguum*, используемый в наших экспериментах, был получен на кафедре ВНД московского государственного университета им. М.В. Ломоносова и успешно содержался в нашей лаборатории последние 14 лет.

S. ambiguum культивировали вдали от солнечного света при температуре $20 \pm 2^\circ \text{C}$ в виде массовой культуры с плотностью посадки 30

– 50 особей/мл в биологических пробирках с 15 мл водопроводной дехлорированной воды (рН 7.5 – 8.2, O₂ ~10.0 мг/л; жесткость ~ 6.8 мг/л, соотношение Са:Mg 4:1, Fe менее 0,3 мг/л, Mn 0,1 мг/л, хлоридов – до 12 мг/мл, фосфатов – менее 0,05 мг/мл, сульфатов около 44 – 50 мг/мл, взвешенных веществ – менее 3 мг/мл). Вода была отстояна не менее трех суток и отфильтрована дважды через обеззоленный фильтр. Питание осуществляли суспензией пищевых дрожжей в концентрации 0,5 мг/мл один раз в неделю. Культуру простейших поддерживали в логарифмической фазе роста путем еженедельных разбавлений суспензии водой 1:1 [Мелехова, и др., 2010]. Спиростомы размножаются вегетативно делением на две дочерние клетки раз в 2–3 сут [Wichterman, 1986, Тушмалова, Егорова, 2004].

4.1.2 Модель многоклеточного организма низшего ракообразного

Daphnia magna

Род *Daphnia* (класс *Crustacea*, отряд *Cladocera*) включает в себя 50 видов и имеет повсеместное распространение. Лабораторный штамм рачков вида *Daphnia magna* Straus, используемый в экспериментах, был получен на кафедре гидробиологии московского государственного университета им. М.В. Ломоносова и успешно культивировался в нашей лаборатории последние 7 лет (рис. 3). Культивировали дафний в аквариумах объемом до 30 л. Далее, как описано в методических рекомендациях [Методические указания, 1990], готовили для экспериментов партеногенетические поколения.

Во время эксперимента дафний культивировали по 5 особей в лабораторных стаканах объемом 150 мл со 100 мл отстоянной водопроводной дехлорированной воды (рН 7.5 – 8.2, O₂ ~10.0 мг/л; жесткость ~ 6.8 мг/л, соотношение Са:Mg 4:1, Fe менее 0,3 мг/л, Mn 0,1 мг/л, хлоридов – до 12 мг/мл, фосфатов – менее 0,05 мг/мл, сульфа-

тов около 44 – 50 мг/мл, взвешенных веществ – менее 3 мг/мл) или по 1 особи в лабораторных стаканах с 50 мл воды в климатостате марки Р2 (Спецкомплектресурс, Россия) в режиме свет-тьма 12:12 ч при оптимальной температуре $20 \pm 2^{\circ} \text{C}$, поддерживаемой терморегулятором.



Рис. 3 – *Daphnia magna* (размер половозрелой особи 2,5 – 6 мм, размер односуточной новорожденной молоди 0,2 мм)

Кормили через сутки суспензией водорослей *Chlorella vulgares* из расчета 0,1 мл (плотность 600 – 1000 тыс. кл/мл) на 100 мл воды. Хлорелла изначально была получена на кафедре гидробиологии МГУ и длительно культивировалась в нашей лаборатории на среде Тамия [Исакова, Колосова, 1988; Мелехова др., 2010]. Рачков еженедельно пересаживали в свежую культуральную воду, отбирая пластиковой пипеткой с шириной носика 0,8 мм.

Для достижения высокой воспроизводимости результатов в экспериментах с использованием дафний раз в месяц проводили тест на чувствительность культуры в соответствии с требованиями методических указаний [Методические указания, 1999]. Для этого ставили острый опыт на односуточных особях с бихроматом калия. Средние значения концентрации, вызывающей 50% гибель дафний через 24 ч инкубации в бихромате калия находились в интервале 0,9 – 2,0 мг/л, что

соответствовало ИСО 6341-82 и РД 64-085-89 [Методические указания, 1990].

4.2 Схема экспериментов

4.2.1 Установки для облучения γ -квантами.

Дозиметрический контроль

Облучение γ -квантами проводили на трех установках на базе Медицинского радиологического научного центра (ФГБУ МРНЦ Минздрава РФ, г. Обнинск): « γ -Cell» (Канада, ^{60}Co), терапевтической установке «Луч-1» (Латвэнерго, Латвия, ^{60}Co) и «Исследователь» (Россия, ^{60}Co). Дозиметрический контроль и облучение тест-объектов осуществляли специалисты лаборатории медицинской радиационной физики с группой радиационной техники экспериментального сектора МРНЦ.

При расчете мощности дозы на установке « γ -Cell» учитывали время изготовления источников (апрель 1962 г.). В период проведения каждого эксперимента определяли активности распада ^{60}Co по соответствующей таблице. Например, если активность составляла 5200 Ки, то доза облучения объекта теоретически составляла 0,915 – 1,018 сГр за время спуск/подъем. Это было подтверждено методами химической дозиметрии, т.к. прямые измерения аппаратурой невозможны из-за конструктивных особенностей установки.

При расчете необходимой мощности дозы на γ -терапевтической установке «Луч-1» учитывали следующие факторы: паспортные данные на радиоактивный источник, время, прошедшее со дня изготовления источника до дня его использования; требования экспериментатора к коллимации излучения, влияние отраженного излучения; желаемая мощность дозы облучения для снижения значимости временного фактора нахождения объекта под излучением. Для проведения эксперимента на γ -терапевтической установке «Луч-1» были использованы:

1. Источник ^{60}Co типа ГИК-8-4. По паспорту измеренное значение мощности экспозиционной дозы – МЭД (в терминах 1999 г.), на расстоянии 1 м. от рабочей поверхности источника (дно) составляло $3,21 \cdot 10^{-4}$ А/кг.

2. Доверительные границы суммарной погрешности результата измерения МЭД при доверительной вероятности 0,95 % составляли ± 10 ;

3. Активность ^{60}Co в источнике 4270 Ки ($1,6 \cdot 10^{14}$ Бк);

4. Размер источника в мм: $\Phi = 23,0$; $H = 22,5$.

На время проведения каждого эксперимента в соответствии с таблицей распада изотопа ^{60}Co учитывали коэффициент снижения активности нуклида. Если, например, он составил 0,314, это позволяло создать мощность дозы 10 мГр за время 15 – 16 с на расстоянии 171,8 см от источника. Теоретические расчеты были подтверждены прямыми дозиметрическими измерениями клиническим дозиметром типа 27012 с камерой 1 см^3 и универсальным дозиметром ДКС-101 (свидетельство о поверке № 41150.6.Д1235).

Установка «Исследователь» устроена аналогично установке « γ -Cell» (Gamma-cell). Объем камеры для облучения составляет 3 л. В состав установки входят 27 источников типа ГИК-7-2, общей активностью $14,6 \cdot 10^{13}$ Бк, создающих в камере для облучения мощность дозы на январь 2012 г. 24,8 Гр/мин. При этом спуск-подъем защитной камеры в область облучения и возврат давал на период исследования дополнительно 8,49 Гр. Источники ГИК-7м-2, выпуска 21.12.1999, имеют размеры: $\Phi = 11,0 \pm 0,2$ мм; высота $H = 81,6_{-1,0}^{+0,5}$. Измеренное значение мощности экспозиционной дозы на расстоянии 1 м от рабочей поверхности каждого источника составляло $4,18 \cdot 10^{-5}$ А/кг; Доверительные границы суммарной погрешности результата измерения мощности экспозиционной дозы источника при доверительной вероятности 0,95 составляет $\pm 10\%$. Дозиметрия по определению мощности дозы (МД) при спуске/подъеме камеры для облучения к источнику и

общем облучении проводилась методом ТЛД с помощью химических дозиметров, имеющих точность $\pm 7\%$.

4.2.2 Схема облучения γ -квантами

Инфузорий *Sp. ambiguum* облучали в пластиковых пробирках (BD Falcon, Нидерланды) в массовой культуре в 10 мл водопроводной культуральной воды согласно схеме, приведенной в табл. 1. Образцы дважды шифровали – перед облучением и перед анализом.

Плотность посадки простейших составляла 30 – 50 особей/мл. Облучение γ -квантами проводили на установках, описанных в гл. 4.2.1. Контроль всегда находился в тех же условиях, но облучению не подвергался. ЛД_{50/30} для инфузорий составляет 1000 и более Грей [Choppin, Rydberg, Liljenzin, 1995].

Таблица 1 – Дозы и мощности доз облучения спиростом γ -квантами

Доза, Гр (мГр)	Мощность дозы, сГр/мин	Установка γ -квантов
0,01 (10)	2,8	« γ -Cell» (Канада) и/или «Луч-1» (Латвэнегро, Латвия)
0,1 (100)	15-20	
1 (1000)	94-102	
	Мощность дозы, Гр/мин	
20	19-48	«Исследователь» (Россия)
50	спуск-подъем камеры: 8-19 Гр	
100		
200		
500		
850		
1000		
1500		

Односуточных новорожденных *D.magna* случайным образом отбирали пластиковой пипеткой и по 10 особей помещали в пластиковые пробирки (BD Falcon, Нидерланды) с 10 мл культуральной воды. Облучение γ -квантами проводили на установках, описанных в гл. 4.2.1, согласно схеме, представленной в табл. 2. Образцы дважды шифровали.

Таблица 2 – Дозы и мощности доз облучения дафний γ -квантами

Доза, Гр (мГр)	Мощность дозы, сГр/мин	Установка γ -квантов
0,01 (10)	2,8	« γ -Cell» (Канада) и/или «Луч-1» (Латвэнегро, Латвия)
0,1 (100)	15-20	
1 (1 000)	94-102	
10 (10 000)		
	Мощность дозы, Гр/мин	
20	19-48	«Исследователь» (Россия)
100	спуск-подъем	
250	камеры: 8-19 Гр	
600		

В одной серии опытов анализировали от 15 до 40 особей в каждой экспериментальной и контрольной группах. Контрольные группы всегда находились в тех же условиях, что и опытные, только облучению не подвергались. LD₅₀ для ракообразных составляет порядка 50 – 80 Гр [Сахаров, 2006].

4.2.3 Генераторные установки низкоинтенсивного радиочастотного поля. Дозиметрический контроль

В исследовании анализировали биологические эффекты радиочастотного диапазона электромагнитного поля низкой интенсивности (нетепловые эффекты). Для этого были использованы установки, ге-

нерирующие ЭМИ с частотой 1 ГГц (диапазон излучения мобильной связи) и 10 ГГц (диапазон излучения радаров и спутникового телевидения). Исследуемые плотности потока энергии (ППЭ) составляли 0,05, 0,10 и 0,50 Вт/м² и лежали в диапазоне принятых в РФ норм радиационной защиты от электромагнитного излучения для населения с предельно допустимым уровнем (ПДУ) для 0,1 Вт/м² на частоте 900 МГц для поглощенной всем телом мощности потока энергии (SAR) 44 МВт/кг [СанПиН, 2003]. Следует отметить, что вышеуказанные значения ППЭ существенно ниже, чем те, которые допустимы в Европе [European Committee for Electrotechnical Standardization (CENELEC). 2010] и на международном уровне [Repacholi et al., 2012].

В табл.3 приведены основные характеристики установок. Дозиметрический контроль и расчет доз осуществляли специалисты кафедры «Экология» ИАТЭ НИЯУ МИФИ [Литовченко и др., 2011].

Таблица 3 – Характеристики установок для облучения мелких биологических объектов в низкоинтенсивном радиочастотном поле

Рабочая частота, ГГц	Максимальная плотность потока энергии (ППЭ), Вт/м ²	Расстояние между антенной и образцом, см	Тип генератора	Тип антенн, размер апертуры (раскрыва) антенны
10	0,05 0,1 0,5	25	Г4-109	Пирамидальный рупор с фокусирующей линзой, 14,5x14,5 см
1	0,05 0,1 0,5	5	Р2-52	Плоская спираль диаметром 11 см

Установки для облучения образцов были расположены в лабораторном помещении, электромагнитный фон в котором на расстоянии 1 м от установок во всех измеряемых точках не превышал $0,0015 \text{ Вт/м}^2$. Напряженность электрического поля была 3 В/м, магнитного поля – 0,08 мкТл. Измерения проводили миллигаусовым магнитометром АТТ-8701 DC/AC (Tektronix, Inc., USA, Oregon).

В установках применяли серийно выпускаемые лабораторные генераторы, максимальная выходная мощность которых составляла несколько милливатт. Антенна, работающая в диапазоне 10 ГГц (длина волны 3 см), была выполнена в виде пирамидального рупора с квадратной апертурой (раскрывом) (Тетрон, Москва) и испускала электромагнитную волну с линейной поляризацией. Антенна, работающая в диапазоне 1 ГГц (длина волны 30 см), выполнена в виде плоской спирали, расположенной на листе диэлектрика, который закрывал открытый конец короткозамкнутого четвертьволнового отрезка коаксиальной линии. Центральным проводом служил коаксиальный кабель, подводящий энергию к спирали (Приборэлектро, Москва). Электромагнитная волна имела левостороннюю круговую поляризацию (коэффициент эллиптичности превышал 0,7). Вектор электрического поля E был направлен перпендикулярно направлению энергии и распространению волны и вращался вокруг своей оси с частотой излучения.

Расчёты мощности антенн были выполнены по методикам, изложенным в [Драбкин, Зузенко, 1961; Драбкин, Коренберг, 1992.; Дорохов, 1960; Шпиндлер, 1989]. Антенны были установлены на лабораторном столе таким образом, чтобы излучение шло вертикально вниз. Под ними располагали лист из поглощающего материала размерами в два-три раза больше апертуры антенны. Установки были размещены на расстоянии 1,5 м друг от друга. Во время экспериментов контрольные образцы находились в том же помещении на расстоянии не ближе одного метра от каждой установки.

Плотность потока энергии контролировали измерительным приёмником ПЗ-18 (Риал, Нижний Новгород) согласно известной методике [Методические указания, 2002] и технической документации. Чувствительность прибора составляла $3 \cdot 10^{-6}$ Вт/м², ошибка измерения 12 %. Для калибровочных измерений устанавливали исследуемую антенну и антенну измерительного приёмника ПЗ-18 на штативах соосно и выполняли измерения ППЭ в зависимости от расстояния между антеннами при постоянной выходной мощности генератора ЭМП. На калибровочном графике, полученном при тестировании антенны, работающей на частоте 10 ГГц (длина волны 3 см), хорошо просматривается стоячая волна с периодом 1.5 см, что соответствует половине длины волны [Литовченко и др., 2011]. Одновременно происходит снижение среднего значения ППЭ и относительной амплитуды стоячей волны по мере увеличения расстояния между антеннами. На расстоянии 10 длин волн картина стоячих волн полностью исчезает [Литовченко и др., 2011]. Это согласуется с теорией антенн [Дорохов, 1960], поскольку рупор – антенна с узкой диаграммой направленности (ДН). На рис. 4 показаны результаты измерений ППЭ спиральной антенны установки, излучающей на частоте 1 ГГц (длина волны 30 см) (табл. 3). Благодаря особенностям строения плоской спиральной круговой антенны картина «стоячих волн» не наблюдается на любом удалении от нее [Литовченко и др., 2011].

Регулировка выходной мощности лабораторного генератора Г4-109 (частота 10 ГГц) осуществлялась автоматически встроенным аттенуатором. Для всех используемых в работе ППЭ расстояние от источника до антенны было 10 см. Регулировку выходной мощности генератора Р2-52 (частота 1 ГГц) осуществляли за счёт изменения расстояния между антенной и образцом 30, 18 и 3,5 см соответственно для ППЭ 0,05, 0,1 и 0,5 Вт/м². Лабораторные серийные генераторы ЭМП радиочастотного диапазона характеризуются высокой долговре-

менной стабильностью выходной мощности, поэтому калибровочные измерения выполняли раз в месяц. Датчики ЭМП служили для контроля работоспособности генератора.

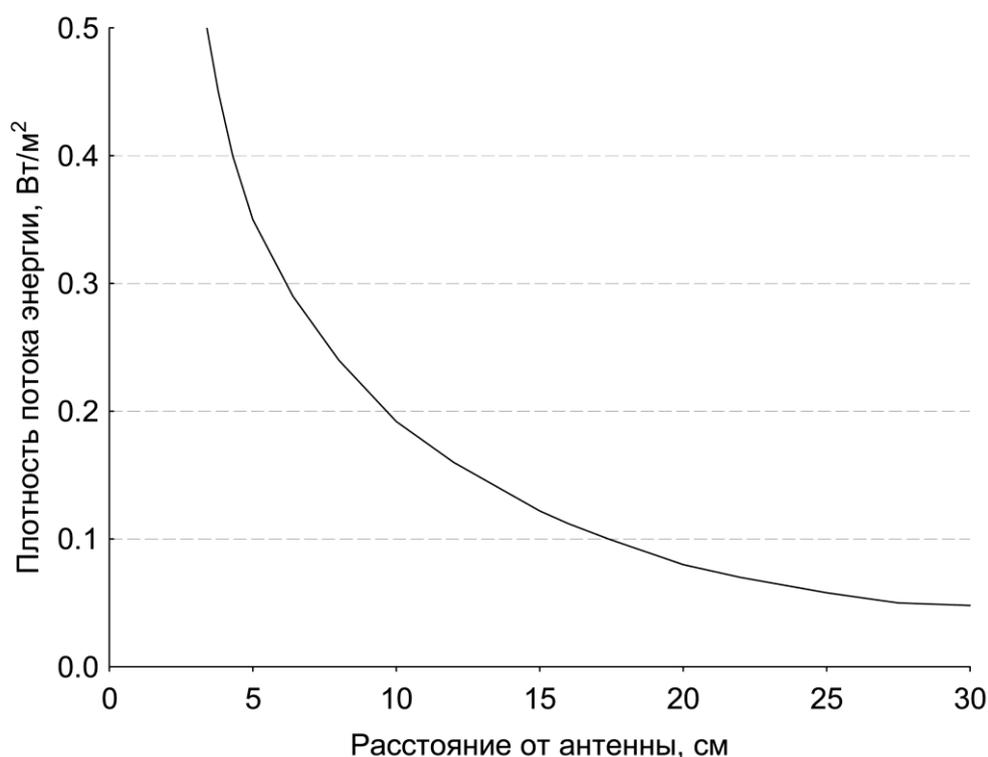


Рис. 4 – Зависимость измеренной приёмником ПЗ-18 плотности потока энергии от расстояния до спиральной антенны установки, излучающей с частотой 1 ГГц

После помещения образца в зону облучения показания датчика свидетельствовали о том, что электромагнитная энергия не поглотилась в образце. При этом в рассчитанных границах площадки для облучения, в пределах которой уровень ППЭ снижался не более чем на 10% от максимума (на оси антенны) линейные размеры апертуры антенны уменьшались не более чем на 15%. Здесь следует заметить, что по существующим нормативным документам, облучение организмов в ближней зоне некорректно, поскольку электромагнитная волна «не сформирована» [International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection, 1998]. Однако смысловое содержание этого термина не

раскрыто. Анализируя литературу, мы обнаружили ряд работ, в которых рассматриваются особенности фронта электромагнитной волны в плоскости апертуры рупора [Дорохов, 1960; Драбкин, Зузенко, 1961; Никулин, Пенской, Радченко и др., 2010]. Авторами показано, что в рупоре распространяется волна того же типа, что и в питающем рупор волноводе. В работе [Дорохов, 1960] это положение полностью обосновано теоретически. Причём, если в волноводе фазовая скорость волны превышает световую, то в плоскости апертуры рупора фазовая скорость волны равна скорости света в свободном пространстве [Драбкин, Зузенко, 1961]. Следовательно, из-за неравенства хода лучей в центре и на периферии рупора возникает несинфазность фронта волны в плоскости апертуры. На выходе пирамидального остроконечного рупора фазовый фронт волны не является сферическим, и преобразование его в сферический происходит в так называемой «ближней зоне». При этом поляризация векторов E и H сохраняется неизменной (какой она была в питающем волноводе) и, естественно, ориентация этих векторов на всей площади апертуры рупора постоянна. А поскольку модуль вектора Пойнтинга (плотность потока энергии, или ППЭ) является непрерывной функцией в пространстве, то, по мнению авторов [Литовченко и др., 2011], никакие резкие колебания ППЭ излучаемой рупором волны вдоль распространения электромагнитной волны невозможны. Появление таких неравномерностей при измерении поля в ближней зоне с помощью зонда обусловлено лишь возникновением стоячей волны из-за переотражений между зондом (приёмная антенна с её эффективной площадью, соединительный кабель, поглощающее покрытие кабеля) и апертурой рупора. Это подтверждает и график на рис. 3, на котором представлена зависимость ППЭ от расстояния между антенной, излучающей на частоте 1 ГГц (длина волны 30 см).

Следует обратить внимание на то, что при вертикальном расположении осей антенн вектор E поляризован в горизонтальной плоскости. Однако, как показано в статье [Литовченко и др., 2011], в области нетепловых уровней ППЭ ориентация вектора E относительно облучаемых образцов не имеет значения. Во-первых, отсутствуют резонансные тепловые эффекты. Во-вторых, инфузории и дафнии перемещаются (и ориентируются) относительно поля ЭМИ хаотически. В-третьих, если и имеют место какие-то неоднородности ЭМП в области расположения образца, например, из-за переотражений, то, как показывают измерения, отклонения уровня ППЭ от среднего значения составляют менее 10% по амплитуде.

Итак, в данной главе показано, что использованный нами комплект установок для исследования влияния ЭМИ в диапазоне радиочастот и малой мощности излучения на биологические объекты позволяет проводить измерения параметров потока электромагнитного поля в зоне исследуемого пространства, контролировать его воспроизводимость, идентифицировать реакцию биологического объекта и проводить метрологическую поверку элементов измерительного комплекса.

Температуру контролировали с помощью инфракрасного термометра (Precision Mastech Enterprises, Китай) с точностью $\pm 0.1^\circ \text{C}$ каждые 15 мин в течение первого часа экспозиции, а затем каждый час до окончания эксперимента. В каждом эксперименте измеряли температуру во всех облученных и контрольных суспензиях спиростом. Она оставалась практически неизменной ($\pm 0.2^\circ \text{C}$) до 10 ч облучения в ЭМП.

4.2.4 Схема низкоинтенсивного радиочастотного облучения

Инфузорий *Sp. ambiguum* для эксперимента брали из массовой культуры на разные сроки после кормления. Для этого 4 мл суспензии простейших с плотностью примерно 30 – 50 особей в миллилитре осторожно с помощью мерного цилиндра переливали в пластиковые чашки Петри диаметром 3.5 см. Высота столба суспензии простейших не превышала 0.5 см. Облучение проводили на вышеописанных установках ЭМП с экспозицией от нескольких минут до 10 ч для разных ППЭ (табл. 4).

Таблица 4 – Схема облучения спиростом в радиочастотном поле

Частота облучения, ГГц	Плотность потока энергии (ППЭ), Вт/м ²	Время экспозиции, ч
1	0,05	5; 7, 8, 9, 10
	0,10	0,25; 0,50; 0,75; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 10
	0,50	0,05; 0,08; 0,17; 0,33; 0,5; 0,75; 1
10	0,05	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7, 8, 9, 10
	0,10	0,25; 0,50; 0,75; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 10
	0,50	0,05; 0,08; 0,17; 0,33; 0,5; 0,75; 1

Дозу электромагнитного излучения выражали в Дж/м² и рассчитывали по формуле:

$$Э_{\text{доза}} (\text{Дж/м}^2) = \text{ППЭ} (\text{Вт/м}^2) \cdot t (\text{ч}) \cdot 3600, \quad (1)$$

$$\text{т.к. } 1 \text{ Дж} = 1 \text{ Вт/с} = \text{Вт/ч} \cdot 3600.$$

Чашки Петри с суспензией исследуемых спиростом шифровали и одновременно для всех экспозиций с одной из ППЭ устанавливали на

предметный столик под антенной на рассчитанной и оконтуренной площадке, где мощность электромагнитной волны не отклонялась более чем на 10%. По истечении срока экспозиции чашки по одной удаляли из зоны облучения, снова шифровали и приступали к анализу подвижности простейших. Контрольная культура находилась в том же помещении на расстоянии 1 м от установки, где уровень электрической и магнитной компоненты поля соответствовал фону (см. гл.4.2.3).

Перед началом каждой серии экспериментов проводили наблюдения за изменением двигательной активности спиростом в контрольной группе. Для этого измеряли подвижность спиростом через каждые 5 – 10 минут, затем через каждый час в течение нескольких дней. Статистический анализ полученных данных показал, что функция движения у необлученных спиростом значительно не меняется [Иголкина, 2011]. Это позволило не проводить контрольные измерения в каждой точке эксперимента, а оценивать двигательную активность спиростом в контроле в отдельно взятом эксперименте в начальный момент времени и по окончании экспозиций, а затем усреднять полученные значения в каждой контрольной группе. Контрольные образцы дважды шифровали и измерения проводили одновременно с опытными образцами.

Для анализа отдаленных последствий облучения спиростом из контрольных и облученных в разных дозах групп осторожно переливали в стеклянные биологические пробирки, доливали отстоянную водопроводную воду до 15 мл, кормили суспензией дрожжей и далее культивировали в течение 30 сут, как описано выше.

4.3 Методы анализа функциональных изменений у простейших и ракообразных

4.3.1 Исследования на инфузориях

Для исследований жизнеспособности *S. ambigua* после γ -облучения в широком диапазоне доз инфузорий в количестве от 12 до 60 особей из контрольной и облученных групп произвольно отбирали капилляром под контролем микроскопа МБС-10 и поштучно помещали в 96-луночные планшеты. Далее, как описано в [Бычковская, Очинская, 1978], на протяжении 30 сут их вели в виде одиночных культур, или «индивидуальных линий». Индивидуальные линии представляли собой «усеченные» клоны, потому что в случае клеточного деления всегда оставляли в лунке только одну особь. В случае гибели спиростомы (ее лизиса) линию («клон») считали «погибшей». При анализе динамики вымирания линий получали информацию о частоте гибели особей в популяциях – чем чаще гибли спиростомы, тем чаще регистрировали обрыв существования индивидуальных линий. В работах [Бычковская, 1986; Бычковская, Очинская, 1978] при периодическом возобновлении индивидуальных линий из сестринских клеток («субклонировании») было доказано, что при относительно низких дозах радиации ускоренное вымирание подопытных линий по сравнению с контрольными отражает устойчивое наследуемое повышение вероятности гибели клеток. Поэтому массовые культуры, в отличие от индивидуальных, сохранялись достаточно долгие сроки, когда возникали более выраженные летальные эффекты (предположительно летальное секторирование [Бычковская, 1986]).

Изучение двигательной активности у инфузорий *S. ambigua* проводили как сразу после облучения, так и в отдаленные сроки. Для этого, в соответствии с имеющимися методическими разработками

[Данильченко, Тушмалова, 1983], суспензию спиростом переливали на часовое стекло, под контролем микроскопа МБС-10 случайным образом отбирали капилляром и помещали по 1 – 2 особи в специальную пластиковую камеру с лунками размером 5 мм в диаметре и 1 – 2 мм в глубину (рис. 5).

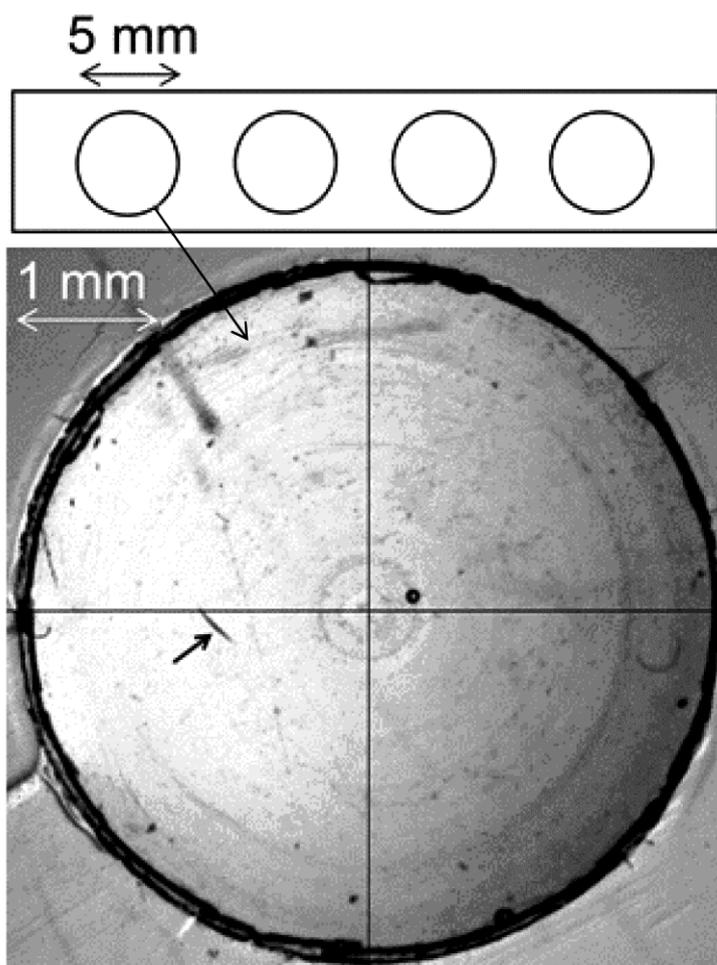


Рис. 5 – Метод открытого поля для анализа двигательной активности инфузорий *Sp. ambiguum* в специальной пластиковой камере

Использовали разработанный профессором МГУ Н.А. Тушмаловой метод, аналогичный методу «открытого поля», который изначально был предложен К. Холлом [Hall, 1936] для изучения высшей нервной деятельности. В норме инфузории *S. ambiguum* после 2 – 5 минутного привыкания к камере для тестирования, начинали относительно равномерно двигаться по периметру со скоростью около

2,5 см/мин [Александров, 1958]. Наблюдение за каждой инфузорией проводили под микроскопом МБС-10, на окуляр которого были нанесены две взаимно-перпендикулярные линии (визеры). Количественной мерой двигательной активности служило число пересечений каждой инфузорией визиров окуляра микроскопа в течение 1 мин. В каждой группе индивидуально анализировали не менее 20 инфузорий.

Для анализа морфофункциональных изменений у *S.ambiguum* применяли метод прижизненной компьютерной морфометрии. Для фиксирования морфометрических нарушений у инфузорий использовали систему видеонаблюдения, состоящую из цифровой камеры MYscope 300 M 3 Mpix, USB 2.0 (WEBBERS), вмонтированной на окуляр микроскопа МБС-10. Метод широко используют для анализа активности регенерации планарий [Тирас, Сахарова, 1984], измерения скорости их движения [Демцун, Темурьянц, Баранова, 2009], а также функциональной активности клеток крови [Махонина, 2007]. В наших исследованиях метод был модифицирован для анализа биологических эффектов у простейших [Ускалова и др., 2013]. Согласно разработанной методике 2 – 3 мл суспензии спиростом с плотностью посадки 30 – 50 особей/мл из контрольных или опытных групп переносили на часовое стекло (или в пластиковую чашку Петри $d = 3.5$ см) и фиксировали их изображение на мониторе компьютера Pentium 1.5G в программе ScorePhoto. Фотосъемку проводили сканирующим методом минимум в 10-ти полях зрения в каждой чашке. Обработку видеоизображения осуществляли с помощью пакета программного обеспечения «Морфометр «Image-Pro» (Media Cybernetics) по следующим параметрам формы тела инфузории: отношение минимального и максимального диаметров (Aspect), диаметр, периметр и близость к окружности (Roundness). Согласно разработанной нами методике [Ускалова и др., 2013], исследуемые параметры в норме изменялись в следующих диапазонах: Aspect – 8 – 14 усл. ед., диаметр – 0.30 – 0.55 усл. ед.,

периметр ≥ 0.7 усл. ед. и Roundness – 3.5 – 6.0 усл. ед. Для анализа произвольно отбирали фиксированные на экране монитора изображения 50 особей из каждой контрольной и опытной групп. Учитывали процент инфузорий в исследуемой выборке с морфометрическими отклонениями от нормы. На рис. 6 представлены фотографии инфузорий *S. ambigua*, полученные с монитора компьютера.

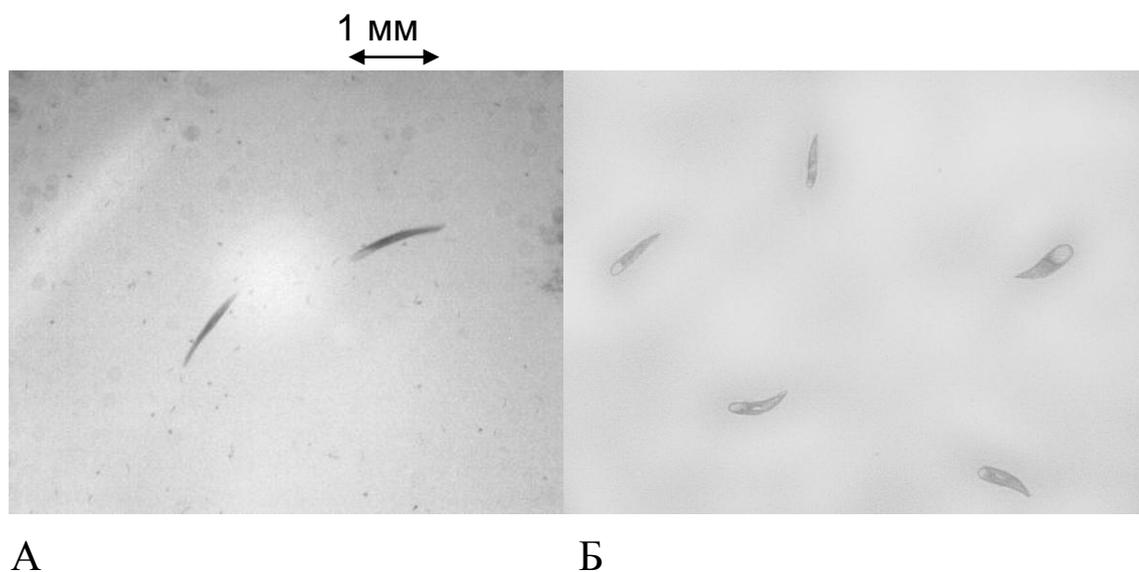


Рис. 6 – Форма тела инфузории *S.ambigua* – физиологическая норма (А) и сжатия в «каплю» (Б) (увеличение $\times 7$)

Для исследования отдаленных последствий радиационного воздействия на простейших, суспензии облученных и контрольных инфузорий *S. ambigua* помещали в биологические пробирки, довели объем воды до 15 мл и таким образом культивировали каждую дозовую группу в виде массовой культуры в течение 30 сут, обновляя воду и добавляя корм еженедельно.

Для дальнейшего анализа инфузорий из биологических пробирок переносили на 4, 14, 21 и 30 сут в камеры для подсчета и индивидуально оценивали изменения двигательной активности в случайной выборке из 20 особей в каждой контрольной и дозовой группах. Морфометрические изменения оценивали на 4 и 7 сут. Известно, что кле-

точный цикл спиростом составляет 2 – 3 сут [Wichterman, 1986]. Таким образом, нами была оценены изменения в двигательной активности инфузорий не менее чем в 10 – 15 поколениях вегетативно размножающихся простейших, а морфофункциональные изменения в 2 – 3 поколениях.

Проведено от трех до десяти независимых серий экспериментов для каждого метода. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью U-критерия, теста Крускала-Уоллиса для количественных признаков и теста χ^2 для качественных признаков в программе «Statstica 6.4» и «SYSTAT 13».

4.3.2 Исследования на ракообразных

Для исследования выживаемости дафний после экспозиции в РЧ поле или облучения γ -квантами рачков пересаживали по 5 особей в стеклянные лабораторные стаканы объемом 150 мл в 100 мл дехлорированной водопроводной воды или по 1 особи в стеклянные лабораторные стаканы с 50 мл воды. Культивировали, как описано в гл. 4.1.2 в климатостате марки P2 (Спецкомплектресурс, Россия) с освещением лампой дневного света в режиме (12:12) часов день-ночь и оптимальной температуре $20 \pm 1^{\circ}$ С. Ежедневно вели наблюдения за выживаемостью и плодовитостью дафний в течение 21 – 30 сут после облучения. Воду в стаканах обновляли еженедельно, пересаживая дафний пластиковой пипеткой с шириной носика 0,8 см. Погибших и новорожденных дафний учитывали и удаляли. Дафнию считали погибшей, если она лежала на дне лабораторного стакана и не всплывала в течение нескольких секунд при его покачивании. Из произвольной выборки новорожденной односуточной молодежи 2 – 3-го пометов

формировали первое поколение необлученных дафний. В каждом эксперименте в выборке было от 15 до 40 дафний.

Для анализа продолжительности жизни наблюдение за облучёнными и контрольными дафниями проводили до 30 – 60 сут. В одном из опытов после облучения γ -квантами наблюдения продолжили до полного вымирания особей – в данном случае до 90 сут. Для анализа полученных результатов применяли метод Каплана-Мейера [Rothman, Greenland, 1998]. Согласно методике, весь период наблюдения M был разбит на k временных интервалов ($k = 1$ сут). Предположили, что для облученных и необлученных особей имеется вероятность s_k пройти k -ый интервал времени и не погибнуть. Число умерших дафний в период времени t_k было равно A_k . Число выживших рачков в этот период времени равно B_k . Число наблюдаемых дафний в период времени t_k равно $N_k = A_k + B_k$.

Вероятность выжить S_M за весь период M составляла:

$$S_M = \prod_k s_k = \prod_k \frac{B_k}{N_k}. \quad (2)$$

Следовательно, риск смерти (R_M) в момент времени M был равен:

$$R_M = 1 - S_M. \quad (3)$$

Дисперсия V , необходимая для определения доверительных интервалов вероятности выживания дафний в момент времени M для логарифма отношения шансов $\log it(S) = \ln\left(\frac{S_M}{R_M}\right)$ и для $\log it(R) = \ln\left(\frac{R_M}{S_M}\right)$ была равна:

$$V = Var(\log it(S_M)) = Var\left(\ln\left(\frac{S_M}{R_M}\right)\right) = \frac{1}{R_M^2} \cdot \sum_{k=1}^M \left(\frac{1}{B_k} - \frac{1}{N_k}\right). \quad (4)$$

Верхний и нижний доверительные пределы (+/-) вероятности избежать гибель в момент времени M были определены как:

$$S_{low}^{up} = \exp it(\log it(S_M)) \pm Z \cdot Var(\log it(S_M))^{0,5}, \quad (5)$$

где $Z=1,645$ для 90 % доверительного предела, или 1,96 для 95 % доверительного предела, *expit* – обратное преобразование *logit*:

$$\text{expit}(a) = \frac{1}{1 + \exp(-a)}. \quad (6)$$

Оценку выживаемости проводили до момента времени, когда A было больше или равно 5, согласно рекомендациям [Rothman, Greenland, 1998].

Для сравнения выживаемости дафний в облучённых и необлучённой популяциях использовали оценку разности рисков гибели и среднюю продолжительность жизни (TM), рассчитанную на 1 дафнию по формуле:

$$TM = \frac{1}{40} \cdot \sum_{k=1}^M S_k \cdot t_k, \quad (7)$$

где 40 – количество дафний в каждой популяции.

Приближённая дисперсия для разности рисков смерти $R_1 - R_0$ была равна:

$$\text{Var}(R_1 - R_0) = R_1^2 \cdot S_1^2 \cdot V_1 + R_0^2 \cdot S_0^2 \cdot V_0. \quad (8)$$

В формуле (7) индекс 0 относится к необлученной популяции.

Для логарифма отношения рисков:

$$\text{Var}(\ln(\frac{R_1}{R_0})) = S_1^2 \cdot V_1 + S_0^2 \cdot V_0 \quad (9)$$

Продолжительность жизни оценивали как:

$$T = \sum_{k=1}^K (S_{k-1} - S_k) \cdot t_k + S_M \cdot t_{end} \quad (10)$$

где S_k и S_M вероятность выжить за период t_k ($k = 1$ сутки) и за весь период наблюдения, соответственно.

Для анализа плодовитости и репродуктивного потенциала популяции дафний применяли метод расчета [Breslow, Day, 1987]. Репродуктивный период у контрольных и облученных рачков начинался в среднем с 11-суточного возраста, что соответствовало норме для лабораторных популяций дафний [Исакова, Колосова, 1988; Ebert,

2005]. Показатели, использованные для анализа плодовитости дафний, приведены в табл. 5. Случайной величиной при расчетах было число дафний, у которых фиксировали рождение молоди. Эта величина имела нецентральное гипергеометрическое распределение (НГР).

Таблица 5 – Показатели, использованные для анализа плодовитости дафний в каждый момент времени (сут)

Экспериментальные группы дафний	Облученные	Контрольные
Число родивших дафний, n_1	a	b
Число нерожавших дафний, n_0	c	d
Число половозрелых дафний, выживших в данный момент времени, N_T	m_1	m_0

$$* m_1 = a + c, m_0 = b + d, n_1 = a + b, n_0 = c + d.$$

Вероятность pr появления a событий при фиксированных n_1, n_0, m_1, m_0 рассчитывали по формуле (11) согласно [Breslow, Day, 1987]:

$$pr(a|n_1, n_0, m_1, m_0; \psi) = \frac{\binom{n_1}{a} \cdot \binom{n_0}{m_1 - a} \cdot \psi^a}{\sum_u \binom{n_1}{u} \cdot \binom{n_0}{m_1 - u} \cdot \psi^u} \quad (11)$$

где $\binom{n_1}{a}$ – число сочетаний из n_1 по a , $\psi = a \cdot d / b \cdot c$ – отношение шансов реализации интересующего события в облученной и необлученной группах, u – число возможных конфигураций при фиксированных граничных значениях, при ограничениях $0, m_1 - n_0 \leq u \leq m_1, n_1$.

Т.к. наблюдения за период T (с 11-х по 30-е сут) проводили для нескольких контрольных и дозовых групп, то логарифм функции правдоподобия для данной выборки можно рассчитать как:

$$L(\psi, T) = \sum_i pr(a_i | n_{1i}, n_{0i}, m_{1i}, m_{0i}, \psi) \quad (12)$$

где значение ψ определяется из максимума функционала (12).

Доверительные пределы для ψ определяли с использованием асимптотических свойств функции правдоподобия из уравнения (13):

$$-2 \cdot (L(x) - L(\psi)) - \alpha = 0 \quad (13)$$

где величина α – квантиль распределения хи-квадрат с одной степенью свободы. Соответственно, для 95% доверительного интервала $\alpha=5.02$, для 90% – 3.82.

Для численных оценок ψ и доверительных пределов использован лицензионный пакет MathCad 14.

Для анализа **количества пометов и новорожденной молодежи** на дафнию, а также шансов выжить и дать потомство у облученных и контрольных дафний, использовали формулы (11) – (13), соответственно изменяя переменные величины в табл. 6. Статистический анализ проводили методом Крускала-Уоллиса (Kruskal-Wallis Test Statistic).

Для изучения отдаленных последствий облучения 1-суточную новорожденную молодежь из третьего помета облученных дафний исходной выборки (F_0) произвольно отбирали пластиковой пипеткой, переносили в стеклянные лабораторные стаканы, формируя первое поколение (F_1), которое не облучали. Культивировали, как описано в гл. 4.1.2. Контрольную выборку первого поколения получали из необлученного контроля. Для получения второго поколения дафний (F_2) отбирали 1-суточную новорожденную молодежь из третьего помета поколения F_1 . Соответственно, для формирования третьего поколения (F_3) – молодежь из поколения F_2 . Таким образом, поколения F_1 – F_3 являлись отдаленным потомством облученной исходной выборки дафний (F_0).

4.4 Методы биохимического анализа на ракообразных

4.4.1 Анализ нарушения метаболизма МТТ-методом

Для оценки нарушения метаболизма у облученных дафний и их потомства использовали водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) [Caminada, Escher, Fent, 2006]. Метод основан на способности митохондриальных сукцинатдегидрогеназ восстанавливать проникающий в клетки МТТ с образованием нерастворимого фармазона [Qing-xia, Cheng-yan, Zhi-an, 2001; Шпакова, Павлова, Булычева, 2000]. Во цитируемых работах показана высокая чувствительность МТТ-теста для оценки *in vitro* цитотоксичности противоопухолевых лекарственных препаратов.

В нашей работе МТТ-тест впервые использован для биотестирования *in vivo* радиационных эффектов. МТТ-тест выполнен по методике, описанной в [Мицкевич, Космачева, Ибрагимова и др., 2003; Van Meerloo, Kaspers, Cloos, 2011] с небольшими модификациями.

Односуточных рачков *D.magna* облучали на установке «Луч-1» в дозах 10, 100, 1 000 и 10 000 мГр (см. гл. 4.2.2). Затем переносили в стеклянные стаканы и оставляли в оптимальных условиях лаборатории до 4-суточного возраста, после чего проводили МТТ-тест. Для этого по 50 особей на образец переносили в микропробирки типа Эппендорф, удаляли воду, добавляли по 100 мкл растворенного в 0,9% NaCl МТТ с концентрацией 0,5 мг/мл и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте. По окончании инкубации супернатант осторожно удаляли, добавляли в каждую микропробирку по 200 мкл ДМСО (Gaylord Chemical Company, Slidell, шт. Луизиана, США). Через 10 мин содержимое микропробирок гомогенизировали с помощью пестика. После растворения гранул фармазона и, при необходимости, краткого центрифугирования, супернатант переносили в лунки 96-луночного планшета (Corning, Нью-Йорк, США). Для получения фоно-

вых образцов 50 особей необлученных 4-суточных дафний гомогенизировали в 200 мкл ДМСО. МТТ не добавляли. Супернатант перенесли в лунки 96-луночного планшета.

Измерения оптической плотности окрашенных образцов проводили на планшетном иммуноферментном анализаторе StatFax 2100 (Awareness Technology, США, VIS-модель) при длине волны 492 нм. Отсекающая длина волны была 630 нм. Оптическая плотность образцов пропорциональна количеству фармазана, образованного при восстановлении МТТ дегидрогеназами. Этот показатель характеризует нарушение метаболической активности у облученных дафний, суммируя изменение соотношения в организме нормальных и поврежденных клеток, а также подавление общей дегидрогеназной активности. Эффективности (\mathcal{E}) действия ионизирующего излучения на дафнии рассчитывали по формуле:

$$\mathcal{E} = 1 - [(ОП_о - ОП_ф)/(ОП_к - ОП_ф)] \cdot 100\%, \quad (14)$$

где $ОП_о$ – оптическая плотность в облученном образце, $ОП_ф$ – средняя оптическая плотность фоновых проб, $ОП_к$ – оптическая плотность в необлученном контроле.

Аналогичным образом проводили анализ образцов с дафниями из поколения F_1 и F_2 , которые не облучали.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ Statistic. Гомогенность внутри групп оценивали с помощью теста Крускала-Уоллеса, значимость отличий от контроля оценивали непараметрическим критерием Манна-Уитни [Hosmer, Lemeshow, May, 2008].

4.4.2 Анализ изменения уровня свободных радикалов методом привитой сополимеризации

Четырехсуточных рачков *D. magna* облучали на установке «Луч-1» в дозах 100 и 1000 мГр (см. гл. 4.2.2) в пластиковых пробирках (BD Falcon, Нидерланды) в объеме 15 мл воды по 20 особей. Контроль находился в тех же условиях, но не облучался. Через ~5 ч после облучения начинали анализ свободно-радикальных реакций на оборудовании кафедры биофизики биофака МГУ им. М.В. Ломоносова.

Анализ проводили радиоиндикаторным методом привитой радикальной сополимеризации [Мелехова, 2010]. Суть метода заключается в том, что если в биологический объект, содержащий СР, ввести какой-либо мономер, способный к радикальной полимеризации, то процесс полимеризации развивается пропорционально имеющемуся в тканях количеству СР. При введении в объект меченого мономера наличие реакционно-способных СР можно зарегистрировать по концентрации меченых сополимеров, т.е. радиоактивности образцов методом радиометрии. В качестве мономера в данной работе был использован меченный по углероду акриламид ($AA-^{14}C$) [Козлов, 1970]. Активность рабочего раствора $AA-^{14}C$ была 1 мкКи/мл при удельной активности препарата 100 мкКи/мл. Концентрация и активность меченого вещества составляла 0,01% $AA-^{14}C$.

Для анализа СР-реакций дафний помещали по 20 особей в лунки 12-луночного планшета (SPL Lifesciences, Республика Корея) в 1 мл рабочего раствора акриламида на 1,5 ч. После инкубации дафний трижды отмывали в дистиллированной воде в пластиковых чашках Петри (Nuova Aptaca, Канелли, Италия), обсушивали на фильтровальной бумаге и помещали во флаконы для сцинтилляционного счета (Sarstedt, Сарштедт, Германия). К каждой пробе добавляли по 0,4 мл концентрированной $HClO_4$ и ставили в термостат на 10 – 15 ч при тем-

пературе 56⁰ С до полного растворения пробы. Затем к каждой пробе добавляли по 1 мл 1,5 М триса и по 10 мл сцинтилляционного раствора Брея. Истинную радиоактивность опытных и контрольных образцов (ДРМ, т.е. количество (доля) распадов в минуту), измеряли методом жидкостной сцинтилляции сотрудники кафедры биофизики МГУ, учитывая, что радиоактивность пропорциональна уровню радикальной полимеризации и, соответственно, уровню свободных радикалов.

Аналогичным образом проводили анализ в образцах дафний поколения F_1 , которых не облучали.

Проведено по три серии опытов для поколений F_0 и F_1 . Результаты обработаны статистически с использованием тестов Крускала-Уоллиса и χ^2 [Hosmer, Lemeshow, May, 2008].

4.4.3 Анализ изменения уровня метилирования ДНК методом жидкостной хроматографии

1-суточных дафний облучали в дозах 0,01; 0,1; 1,0 и 50 Гр по схеме, описанной в гл. 4.2.2. Затем культивировали до 4-х суточного возраста в лабораторных стаканах как описано в гл. 4.1.2.

Биоматериал. В пробирки типа «Эппендорф» (ООО «Компания «Биоком», Москва) объемом 1,5 мл отбирали по 50 дафний в возрасте 4 сут на одну повторность из каждой опытной и контрольной групп. Пробирки с образцами шифровали, закрывали и помещали в контейнер с сухим льдом до добавления лизирующего буфера.

Реактивы для выделения ДНК. Для приготовления лизирующего буфера по 50 мМ ТРИС (PANREAC QUIMICA SA, Испания) и 50 мМ ЭДТА (Трилон Б) (Лабтех, Россия) были смешаны и доведены до pH = 8. Далее были приготовлены растворы А: 0,5% додецил сульфат натрия (SDS) (Лабтех, Россия) и Б: 150 мМ NaCl (или 0,9% изотонический р-р) (Лабтех, Россия). ТЕ-буфер готовили на стерильной дистил-

лированной воде, смешав 10 мМ ТРИС (PANREAC QUIMICA SA, Испания) и 1 мМ ЭДТА (Лабтех, Россия). Раствор довели до pH =7.0 – 8.0. Приготовили рабочие водные растворы РНК-азы (SIGMA ALDRICH CHEMIE, USA) в концентрации 5 мг/мл и протеиназы К (SIGMA ALDRICH CHEMIE, USA) в концентрации 25 мг/мл. Протеиназу К хранили маленькими порциями при -20⁰ С, используя каждую порцию на один эксперимент. Фенол-хлороформный буфер готовили в соотношении фенол (Лабтех, Россия) к хлороформу (Лабтех, Россия) 1:1.

Лизис клеток. Избегая контаминации образцов, в каждую пробу с замороженными дафниями добавляли по 300 мкл лизирующего буфера и гомогенизировали пестиком (ООО Компания БИОКОМ, Россия). Использовали автоматические пипетки (Ленпипет, Россия) объемом 1 – 5 мкл, 40 – 200 мкл, 200 – 1000 мкл с одноразовыми дозаторами.

После каждой операции образцы снова помещали на лед. Лизат инкубировали в термостате (ООО Компания БИОКОМ, Россия) при 65⁰ С в течение 15 мин. Спустя 5, а потом 10 мин эппендорфы с образцами встряхивали на вортексе (ООО Компания БИОКОМ, Россия) и оставляли в термостате при 37⁰ С до остывания.

Обработка РНК-азой. В каждый образец добавляли по 3 мкл рабочего раствора РНК-азы и 4,5 мкл протеиназы К. Инкубировали 2 ч при 65⁰ С. Содержимое эппендорфа перемешивали, и снова инкубировали в термостате при 37⁰ С в течение 10 мин.

Осаждение белков. Образцы опускали в лед на 5 мин. Добавляли по 300 мкл фенол-хлороформный буфер. Перемешивали на вортексе 30 сек. Центрифугировали (ООО Компания БИОКОМ, Россия) при 10000 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Если на дне эппендорфа не образовывался шарик (осадок), операцию повторяли еще 3 раза, а потом центрифугировали с хлороформом еще 5 мин.

Осаждение ДНК. Отбирали верхнюю водную фазу с ДНК в чистый эппендорф. Добавляли по 500 мкл изопропанола (Лабтех, Россия). Переворачивали эппендорфы 30 – 40 раз. Отстаивали 15 мин. Затем центрифугировали 10 мин при 10 000 g при 4⁰ С на микроцентрифуге. Осторожно сливали изопропанол, чтобы не удалить осадок ДНК. Добавляли по 500 мкл 75% этанола (Лабтех, Россия) и переворачивали эппендорфы несколько раз для промывания осадка. Если осадок случайно смешивался, кратко центрифугировали на вортексе.

Контроль качества экстрагированной ДНК. Чтобы визуально контролировать качество экстрагированной ДНК, образцы (примерно по 200 нг) наносили на 1,5% агарозный гель. Геномная ДНК должна дать четкие группы. В образце не должно быть слишком много РНК, потому что в этом случае результаты OD Nanodrop не дадут реальной концентрации ДНК. РНК дает мазок в низкомолекулярных регионах (см. рис. 7 и 8).



Рис. 7 – Чрезмерное присутствие РНК (в круге) в экстракте ДНК

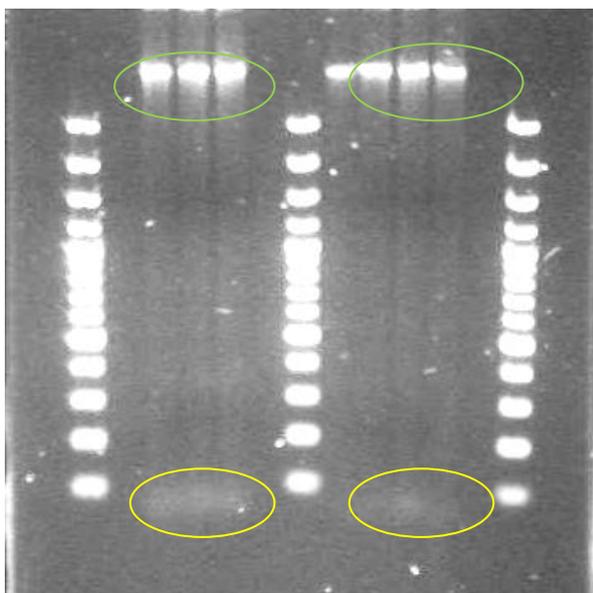


Рис. 8 – Хороший экстракт ДНК с геномной ДНК (верхние кружки) и практически без РНК (нижние кружки).

Помимо визуального контроля выделения ДНК проводили определение концентрации ДНК на бескуветном спектрофотометре NanoDrop-2000 (labMET, США) в соответствии с рекомендациями [Биссвангер, 2013]. Для дальнейшего анализа были отобраны образцы с концентрацией ДНК не менее 200 нг/мл.

Для оценки степени метилирования ДНК были подготовлены следующие образцы:

Доза, Гр	0 (Контроль)	0,01	0,1	1,0	50
Поколение F ₀					
Количество образцов, <i>n</i>	5	4	4	6	4
Поколение F ₁					
Количество образцов, <i>n</i>	3	4	3	3	0

Транспортировка эппендорфов с образцами ДНК. Образцы ДНК дафний (в виде осадка в 500 мкл этанола) переправляли при комнатной температуре в тщательно закрытых и маркированных эп-

пендорфах в лабораторию экотоксикологии и водной экологии университета г. Гент (Бельгия) (Laboratory of Environmental Toxicology and Aquatic Ecology, Ghent University).

Дальнейшие этапы анализа уровня метилирования ДНК у облученных дафний и их потомства первого поколения были проведены в университете г. Гента д-ром Michiel B. Vandeghechuchte. Методом жидкостной хроматографии высокого разрешения (Waters Acquity Ultra Performance LiquidChromatography, UPLC) [Vandeghechuchte, Lemière, Janssen, 2009 b] был проведен тотальный анализ метилирования ДНК *D. magna* из поколений F_0 и F_1 с исходной дозой облучения 10 – 50 000 мГр и оценено геномное содержание цитозин-гуанина.

ГЛАВА 5 РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

5.1 Биологические эффекты γ -излучения у инфузорий и ракообразных

5.1.1 Прямые и отдаленные радиационно-индуцированные эффекты у инфузорий

5.1.1.1 Влияние радиации на жизнеспособность инфузорий в нескольких поколениях

В табл. 6 представлены результаты ежедневных наблюдений за 12 контрольными индивидуальными линиями инфузорий *S.ambiguum* и 12 подопытными, которые были сформированы из особей, подвергнутых облучению в дозе 0,1 Гр. Эти параллельные наблюдения вели на протяжении 30 сут. Цифрами в таблице обозначено число инфузорий, обнаруженных ежедневно в каждой лунке (1 – инфузория не делилась, 2 – инфузория проделала одно деление, 4 – проделала два деления). Крестом обозначена гибель особи, а, следовательно, и индивидуальной линии.

Видно, что как в опыте, так и в контроле после сравнительно не продолжительного периода отсутствия деления, связанного с переходом на индивидуальное культивирование (лаг-фаза), большинство особей начинает активно делиться, причем примерно с одинаковой частотой. При этом в опыте имеется более интенсивная гибель линий (и соответственно одноклеточных организмов). Так, если в контроле за 30 сут в данной выборке завершили свое существование две линии, то в опыте пять. Средний темп деления спиростом в опыте и в контроле не изменялся и составлял в среднем 2 – 3 сут, как было ранее показано в [Wichterman, 1986].

Таблица 6 – Гибель инфузорий *Spirostomum ambiguum* в индивидуальных линиях в контрольных условиях и после облучения в дозе 0,1 Гр (протокольные данные)

Время после облучения, Сут	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Номер линии																							
	Контроль												Облучение											
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	2	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1
4	2	1	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	2	1	2	1	1	1	2	2	1	2	1	2	1	2	2	2	1	1	1	2	2	1	2
6	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2	1
7	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
9	2	1	2	1	2	2	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2
10	1	1	1	2	4	1	1	2	1	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	2	2	4	1	2	2	1	2	1	1	2	2	1	2	1	2	2	1	1	1	2	1	1	1
12	1	2	4	2	1	1	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	2
13	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	3	1	1	2	2	1	2	1	1	4	2	2
14	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2
15	2	1	1	2	1	2	2	1	2	2	2	2	1	1	1	2	1	1	+	1	1	1	1	2
16	1	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	1	2	2	1	1	2		+	2	1	2	1
17	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2	1	1			1	2	1	1
18	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2	1	1	1	2	1	1	1			2	1	2	1
19	+	2	1	1	2	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	+	1			1	1	1	2
20		1	1	1	1	2	1	2	2	2	1	1	1	2	1	2		+			1	2	1	1
21		1	+	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					2	1	1	1
22		1		2	2	1	1	1	2	2	1	2	2	1	1	1					1	1	1	2
23		2		2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	1					1	1	2	4
24		2		2	1	1	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2					2	1	1	1
25		2		2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2					2	1	1	1
26		2		2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	1					1	2	1	1
27		1		2	2	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	2					1	1	2	1
28		2		2	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2					+	1	2	2
29		2		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2						2	2	2
30		1		1	1	1	2	2	1	1	2	1	1	2	1	1						1	1	1

Из табл. 6 видно, что гибель подопытных инфузорий в линиях происходила не сразу после облучения, а после двух и более клеточных делений. Расчеты показали, что в течение 30 сут произошла смена 10 – 15-и поколений. При облучении в дозах от 0,01 до 500 Гр темп деления нарушен не был (табл. 7). Статистически значимые нарушения обнаружены только после облучения в дозах более 850 Гр.

Таблица 7 – Изменение темпа деления инфузорий *S. ambiguum* при культивировании в индивидуальных линиях после γ -облучения в дозах 0,01 – 1500 Гр к 30-м сут

Доза, Гр	Число линий, <i>N</i>	Темп деления, <i>M</i> \pm <i>SE</i>
0	84	13,5 \pm 3,0
0,01	36	12,0 \pm 2,7
0,1	60	12,2 \pm 2,7
1,0	60	14,0 \pm 2,9
20	12	10,8 \pm 4,2
50	12	11,6 \pm 5,3
100	36	11,8 \pm 5,9
200	36	8,0 \pm 4,7
500	48	10,7 \pm 6,3
850	24	4,8 \pm 2,0*
1000	24	2,5 \pm 0,9*
1500	24	1,4 \pm 0,6*

* $p \leq 0,5$

Для оценки радиационного-индуцированных эффектов изменения выживаемости инфузорий рассмотрим рис. 9, на котором графически представлена динамика вымирания индивидуальных линий, сформированных из контрольных особей и особей-родоначальниц, облученных в дозах 0,01 – 1500 Гр. Количество исследованных линий в этом опыте составляло: 12 – при дозах 20 и 50 Гр, 24 – при дозах 850, 1000 и 1500 Гр, 36 – при дозах 0,01, 100 и 200 Гр, 48 – при 500 Гр и 60 – при 0,1 и 1 Гр и 84 – в контроле.

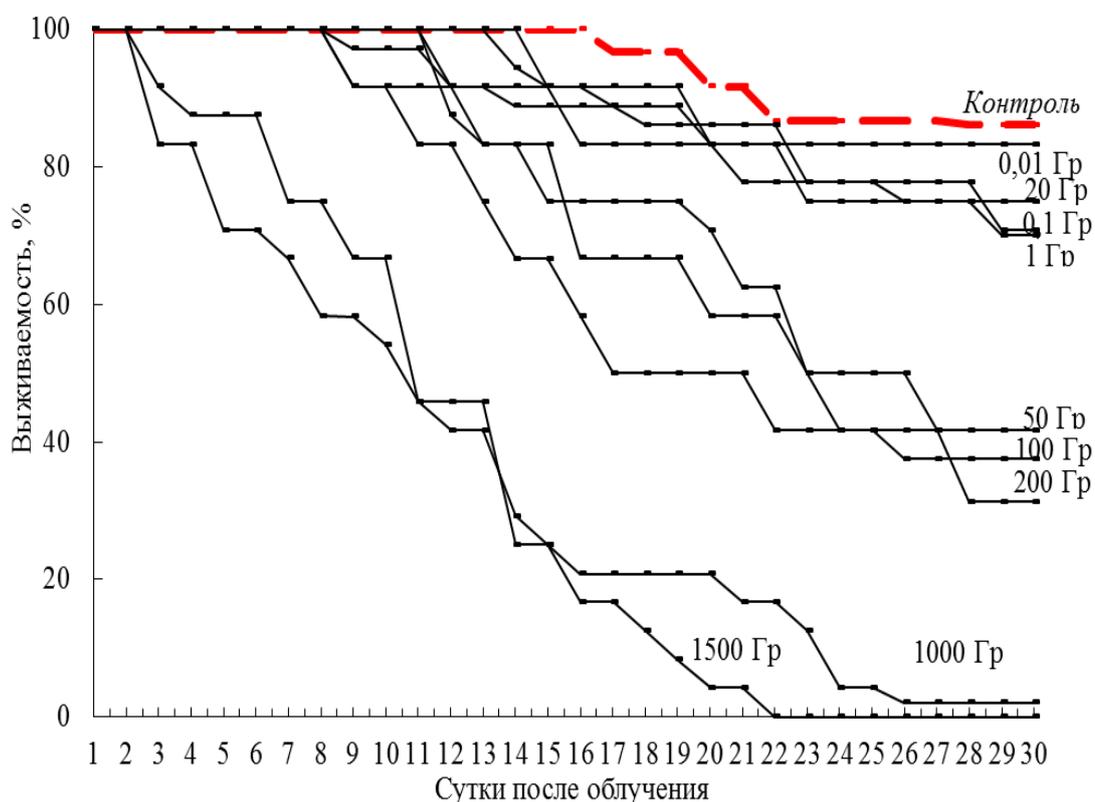
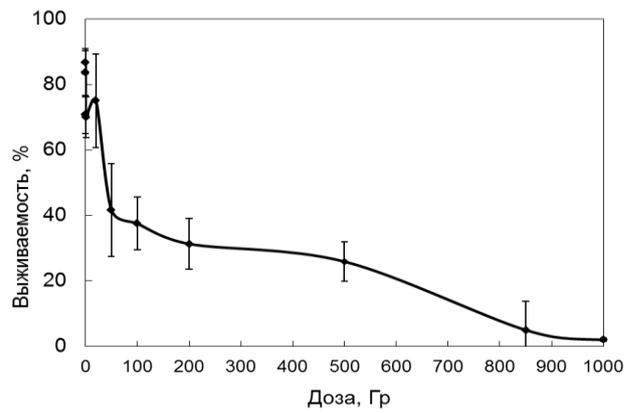


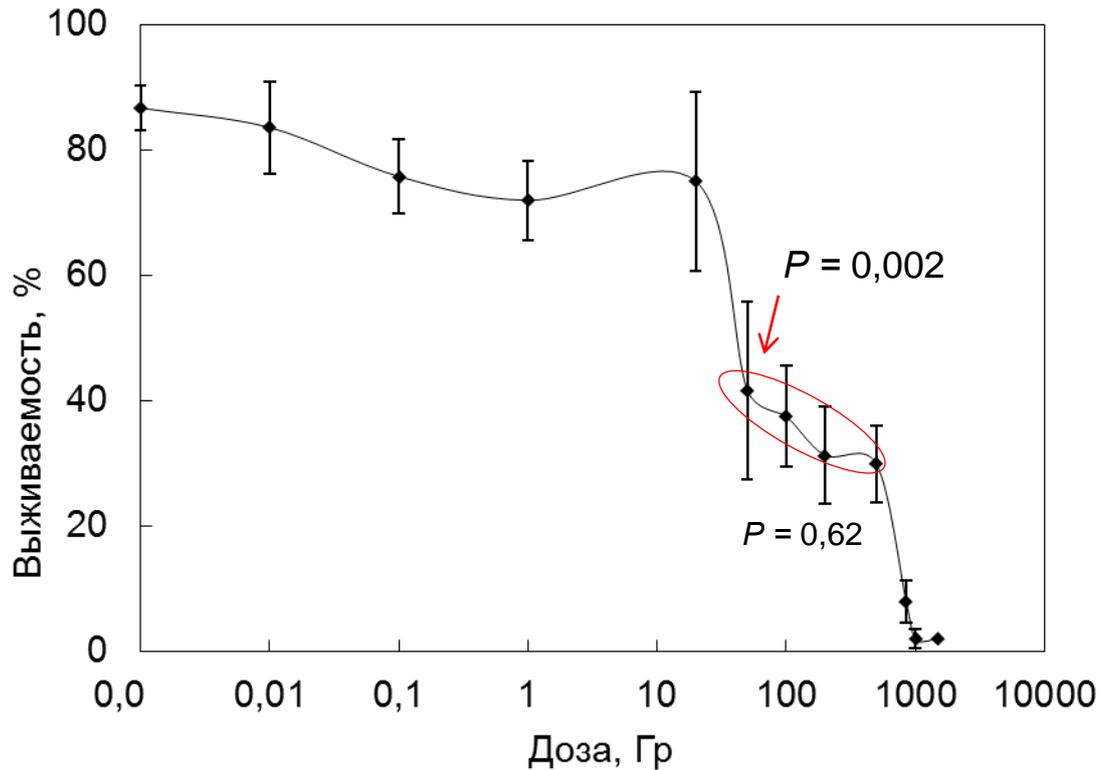
Рис. 9 – Выживаемость индивидуальных линий инфузорий *S. ambigua* в контроле и после γ -облучения в дозах: 0,01 – 1500 Гр

На графике видно, что в каждой совокупности подопытных линий происходит более интенсивное их вымирание, чем в контроле. Ускоренное вымирание подопытных линий во всех случаях растянуто во времени, благодаря чему разница с контролем нарастала к концу срока наблюдения. При этом речь идет о сохраняющемся в поколениях эффекте, который проявляется, в том числе, у отдаленного потомства облученных особей.

Для дальнейшего анализа пострadiационных изменений жизнеспособности инфузорий, оцениваемых по судьбе индивидуальных линий, была описана зависимость «доза – эффект», анализу которой в радиобиологии придается первостепенное значение. Эту зависимость, представленную на рис. 10, описали в период максимального в опыте расхождения дозовых и контрольных кривых на 30-е сут наблюдения.



А



Б

Рис. 10 – Кривая «доза – эффект» для выживаемости индивидуальных линий к 30 сут после облучения инфузорий *S. ambigua* в дозах 0,01 – 1500 Гр в % по сравнению с соответствующим контролем со стандартными ошибками для процентных величин: А – в линейном масштабе, Б – в полулогарифмическом масштабе

Количество исследованных линий: 12 – при дозах 20 и 50 Гр, 24 – при дозах 850, 1000 и 1500 Гр, 36 – при дозах 0,01, 100 и 200 Гр, 48 – при дозе 500 Гр и 60 – при дозах 0,1 и 1 Гр и 84 в контроле

На этой временной точке выживаемость подопытных линий выражали в % по сравнению с контролем. Мы видим, что выживаемость значимо не изменяется при облучении простейших в дозах от 0,01 Гр до 20 Гр. Далее при дозе 50 Гр и выше на кривой регистрируется не зависимый от дозы диапазон, когда выживаемость значимо не изменяется. При дозах более 500 Гр наблюдается четкий дозозависимый эффект снижения жизнеспособности инфузорий, что связано, скорее всего, с линейным усилением эффекта с дозой. В таблице 8 приведены данные по выживаемости для всех анализируемых индивидуальных линий инфузорий.

Таблице 8 – Выживаемость инфузорий *S. ambiguum* в индивидуальных линиях после острого γ -облучения

Доза, Гр	Погибших, <i>n</i>	Анализируемая выборка, <i>N</i>	Частота погибших	Частота выживших	Отношение к контролю	Вероятность, <i>P</i>
0	7	60	0,12	0,88	-	-
0,01	6	36	0,17	0,83	1,43	0,69
0,1	13	60	0,22	0,78	1,86	0,11
1	17	60	0,28	0,72	2,43	0,05
20	4	12	0,33	0,67	2,86	0,16
50	7	12	0,58	0,42	5,00	0,002
200	23	36	0,64	0,36	5,48	2,79x10⁻⁷
500	26	36	0,72	0,28	6,19	3,58x10⁻⁹

Из таблицы видно, что статистически значимые изменения наблюдаются, начиная с 50 Гр. При этом эффект при дозах γ -облучения 50 – 500 Гр имеет нелинейный характер (рис. 11, значение теста на гомогенность $P = 0,62$). Полученные результаты согласуются с данными по выживаемости инфузорий других видов, а так же

амеб, клеток дрожжей и млекопитающих [Бычковская, 2013; Бычковская и др., 2005]. Радиационные наследуемые эффекты авторы наблюдали при дозах от 4 Гр.

5.1.1.2 Влияние радиации на изменение поведенческой активности инфузорий в нескольких поколениях

На рис. 11 представлены протокольные данные, полученные в одной из серий опытов по анализу изменения двигательной активности инфузорий *S. ambigua*, облученных в дозе 0,1 Гр.

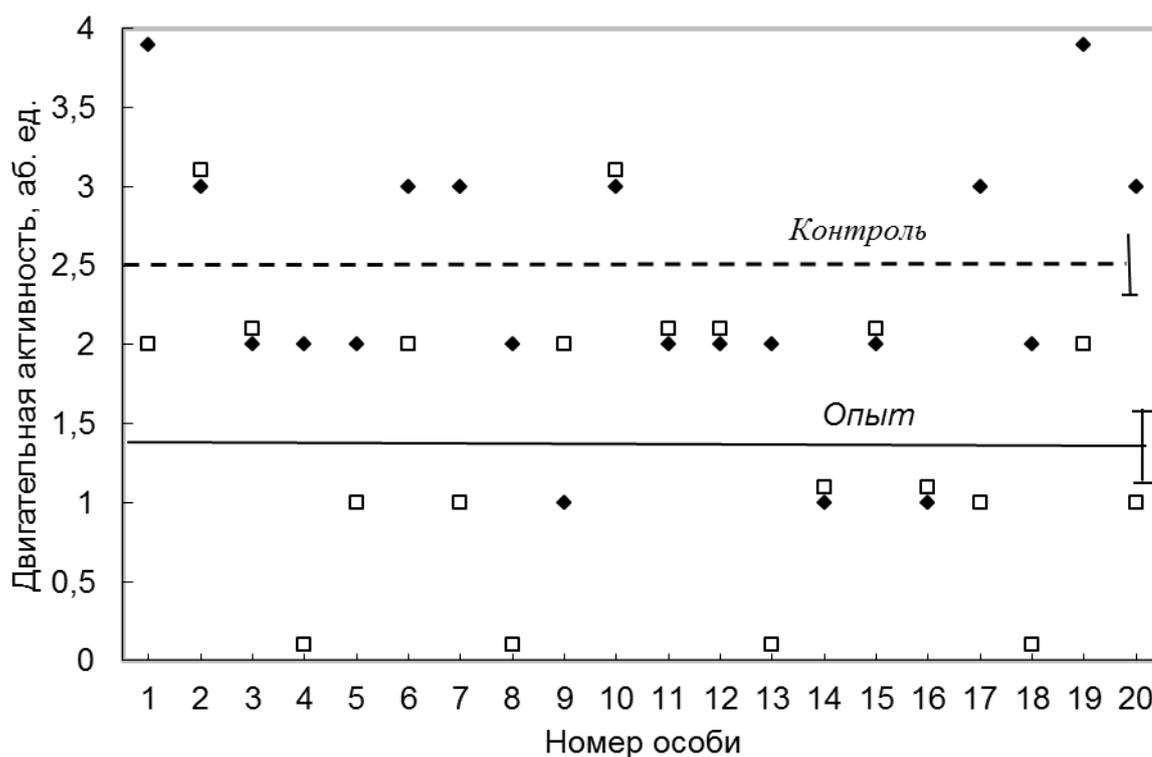


Рис. 11 – Изменение двигательной активности у инфузорий *S.ambigua* в контроле (♦) и сразу после облучения в дозе 0,1 Гр (□) (протокольные данные, абсолютные ед.)

----- – средние показатели двигательной активности в контроле

_____ – средние показатели двигательной активности после облучения

Несмотря на индивидуальные различия в абсолютных значениях двигательной активности инфузорий, выраженных в ед. количества пересечений визира окуляра микроскопа за 1 мин, средние показатели подвижности у облученных инфузорий значимо ниже, чем в контроле. Они составляют $1,4 \pm 0,3$ и $2,5 \pm 0,3$ соответственно.

Подобные результаты были получены в других сериях опытов с этой дозой. Из табл. 9 видно, что различия с контролем хорошо воспроизводятся. В среднем для всех серий они составляют около 35%. При этом эффект обнаружен практически сразу после воздействия. Его регистрировали у еще неподелившихся особей.

Таблица 9 – Средние показатели подвижности *S. ambiguum* в контроле и сразу после облучения в дозе 0,1 Гр в трех сериях опытов

№ серии	Контроль, $M_k \pm SE$	Опыт, $M_o \pm SE$	%, $\frac{M_o}{M_k} \cdot 100$
1	$2,1 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,2$	$71,4 \pm 9,2^*$
2	$2,5 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,3$	$52,0 \pm 15,2^*$
3	$1,8 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,2$	$72,2 \pm 10,3^*$
Среднее	$2,1 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$65,2 \pm 14,1^*$

$M \pm SE$ – средние значения величин со стандартной ошибкой, $n=20$,
* $p < 0,05$

В последующих экспериментах исследовали зависимость обнаруженного эффекта от дозы облучения. В табл. 10 представлены суммарные данные по трем сериям опытов с дозами 0,1; 1,0; 20; 100; 250; 500; 850; 1000 и 1500 Гр.

Таблица 10 – Изменение подвижности инфузорий *S. ambiguum* после облучения в дозах 0,1 – 1500 Гр

Доза, Гр	*N	Подвижность, <i>M</i> ± <i>SE</i> , абсол. ед.	Подвижность, <i>M</i> ± <i>SE</i> , % относительно контроля
0 (Контроль)	60 (3)	2,1 ± 0,1	100,0 ± 3,4
0,1	60 (3)	1,4 ± 0,1	66,7 ± 7,1**
1,0	60 (3)	1,5 ± 0,2	71,4 ± 7,1
20,0	60 (3)	1,1 ± 0,4	52,4 ± 6,7*
100,0	60 (3)	1,3 ± 0,2	61,9 ± 4,8
250,0	60 (3)	1,1 ± 0,2	52,4 ± 6,1*
500	60 (3)	1,3 ± 0,4	61,9 ± 7,3
850	60 (3)	1,3 ± 0,3	61,9 ± 5,9*
1000	60 (3)	0,5 ± 0,1	23,8 ± 3,8*
1500	60 (3)	0,6 ± 0,2	28,6 ± 4,4*

M ± *SE* – средние значения величин со стандартной ошибкой

*количество независимых серий опытов, ** $p < 0,05$,

Измерения двигательной активности и в этих опытах производили вслед за облучением у еще неподелившихся особей. Видно, что в диапазоне доз 0,1 – 850 Гр отличия опыта от контроля статистически значимы и практически одинаковы. Эффект, вызываемый облучением в дозе 0,1 Гр, не увеличивался при возрастании дозы на несколько порядков (по тесту Крускала-Уоллиса гомогенность анализируемой выборки составляет $P = 0,0686$ для диапазона доз 0,1 – 100 Гр и $P = 0,1258$ для 0,1 – 850 Гр). Дальнейшее увеличение дозы до 1000 – 1500 Гр приводило к линейному усилению эффекта.

Обнаруженная нелинейная зависимость биологического эффекта облучения инфузорий в дозах от 0,1 до 850 Гр представлена на рис. 13. Рисунок подчеркивает эффективность низких и средних доз облу-

чения (рис. 12 А), а также дозозависимость в широком дозовом интервале (рис. 12 Б).

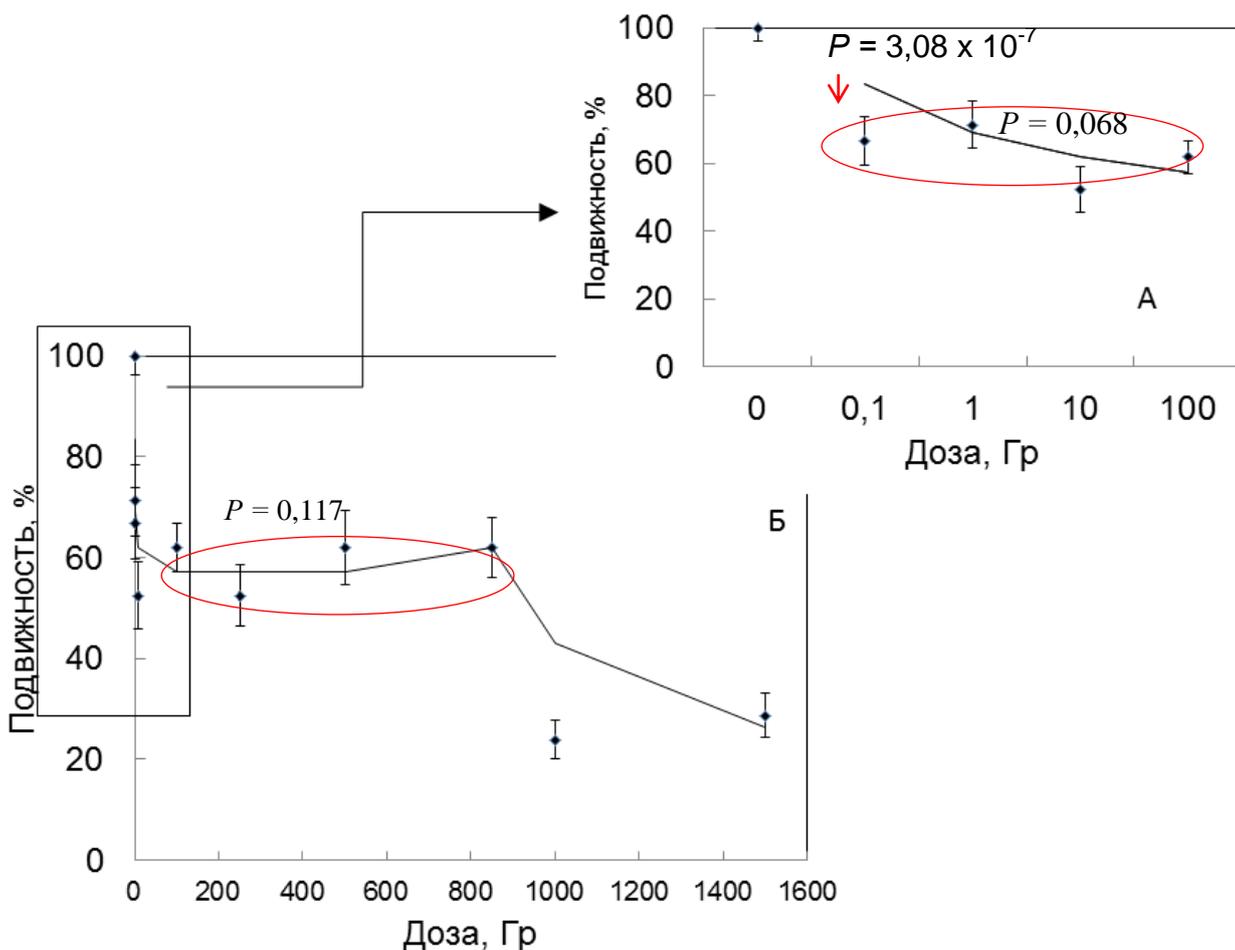


Рис. 12 – Зависимость изменения двигательной активности у инфузорий *S.ambigua* (в % относительно контроля) от величины дозы облучения в диапазоне 0,1 – 100 Гр в полулогарифмическом масштабе (А) и от 0,1 до 1500 Гр в линейном масштабе (Б)

Таким образом, в данном исследовании продемонстрирована высокая чувствительность поведенческой активности инфузорий *S. ambigua* к радиационному воздействию в широком диапазоне доз, включая низкие и средние уровни. Анализ радиационно-индуцированного эффекта выявил нелинейную зависимость от дозы облучения, что характерно для немишенного механизма действия об-

лучения на клетку. При сравнении полученных данных по выживаемости (рис. 10) и двигательной активности (рис. 12) инфузорий видно, что протяженность дозозависимого плато по критерию выживаемости значительно меньше, чем по изменению двигательной активности.

Это связано с тем, что у исследуемых простейших уже при дозе около 50 Гр проявляются более сильно выраженные дозозависимые летальные эффекты, которые маскируют изучаемые изменения в подвижности инфузорий.

При изучении выживаемости в индивидуальных линиях обнаружено повышение частоты гибели простейших в течение всего времени наблюдения (до 30 сут). Простейшие в «линиях» делились только вегетативным путем, накапливая повреждения в макронуклеусе, который активно транскрибировался. В массовой культуре инфузории могут переходить на половой процесс размножения путем конъюгации. При этом, как известно, особь может избавиться от генетического груза, накопленного макронуклеусом (при конъюгации от 30 % у *Tetrahimena* и *Paramecium* до 95% у *Oxytricha* макронуклеуса разрушается) и строить новое вегетативное ядро на «очищенном» генетическом материале [Билич, Крыжановский, 2002]. На «выброс» идут мобильные генетические элементы и некодирующие последовательности. В нашем случае инфузории, культивируемые в массовой культуре в лабораторных условиях, не погибали даже после облучения в дозах 1000 и 1500 Гр, когда возникали выраженные летальные эффекты при индивидуальном культивировании (предположительно, летальное секторирование, когда репродуктивную способность теряют не все особи [Бычковская и др., 2006]). Это показывает, что диапазон доз, при которых регистрируются немишенные эффекты, может быть сколько угодно широким. При этом повреждение может проявляться не только в виде повышения вероятности гибели организма, но и в виде функциональных расстройств – нарушения поведенческой активности.

На рис. 13 представлено изменение двигательной активности инфузорий *S. ambigua* на 4, 14, 21 и 30 сут, т.е. у необлученного потомства примерно в 10 – 15 поколениях.

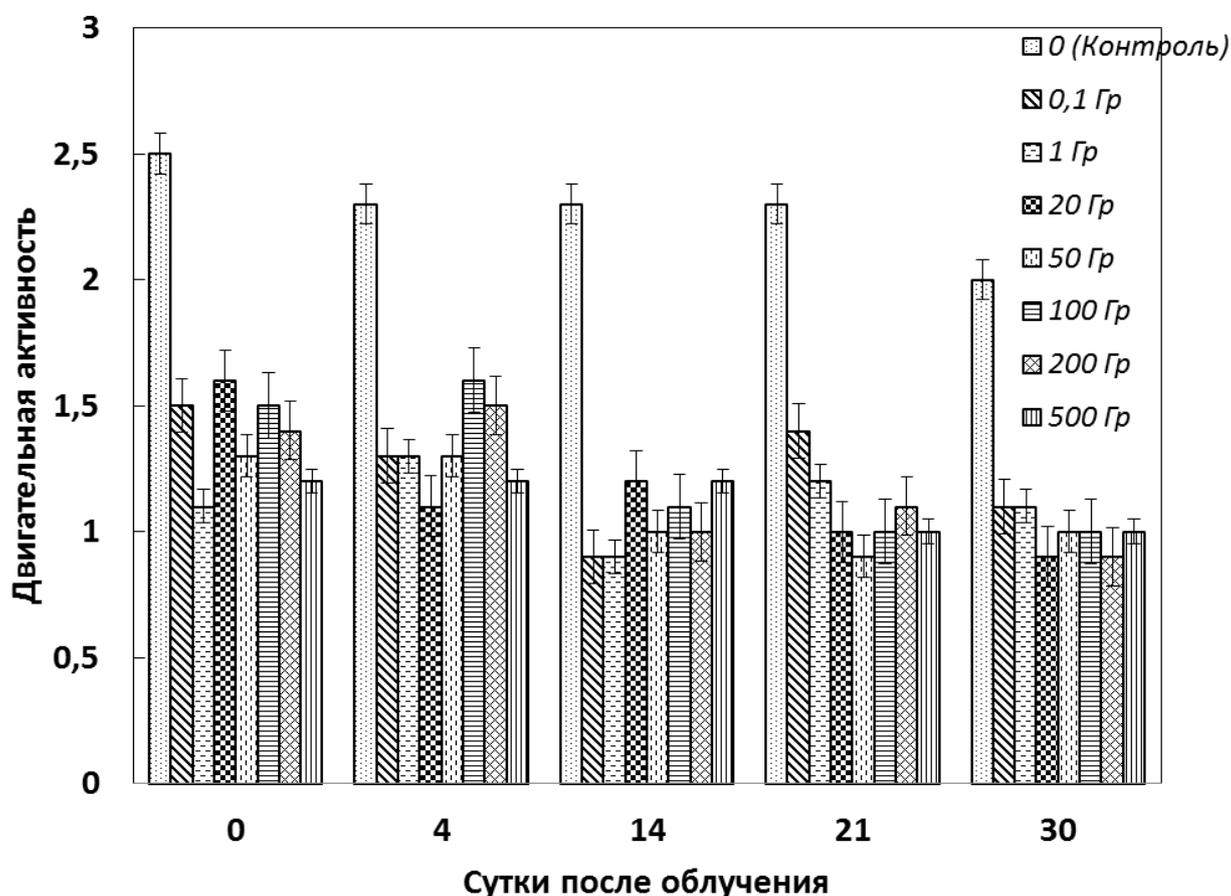


Рис. 13 – Зависимость изменения двигательной активности инфузорий *S. ambigua* от величины дозы γ -облучения в диапазоне 0,1 – 500 Гр сразу и на 4, 14, 21 и 30 сут после облучения со стандартной ошибкой

Клеточный цикл *S. ambigua* составляет 2 – 3 суток. Исходная выборка простейших была облучена в дозах от 0,1 до 500 Гр. На рисунке видно, что на всех сроках наблюдения у потомства особей, облученных в дозе 0.1 Гр, наблюдается угнетение двигательной активности, степень которого не возрастает с ростом дозы на несколько порядков (до максимальной из использованных в настоящей работе дозы – 500 Гр). Видно, что дозозависимое плато сохраняется на каждом пострадиационном сроке, причем степень изменения значимо не

меняется со временем (по тесту на гомогенность Крускала-Уоллиса $0,08 < P < 0,65$). Эффект регистрировали даже через 30 сут после воздействия, за время которых, как обнаружено при исследовании выживаемости в индивидуальных линиях и показано в табл. 6, произошла смена в среднем 10 – 15 поколений простейших.

Похожие закономерности были обнаружены в работах [Бычковская, Степанов, Федорцева, 2002 а, б, в; Бычковская, Федорцева, Антонов и др., 2006], где у разных объектов, в том числе инфузорий других видов (*Paramecium caudatum* и *Climacostomum virens*) помимо цитогенетических изменений, возрастающих с ростом дозы, обнаружили особые массовые дозозависимые (нестохастические) эффекты, которые индуцировались уже низкими для объектов дозами радиации 4 Гр. Данные эффекты были выявлены по признаку снижения жизнеспособности клеток в популяциях – повышению вероятности их гибели. При этом было показано, что указанные нарушения имели место не только в ранние, но и в отдаленные сроки после облучения. Они сохранялись на протяжении неопределенно большого ряда клеточных поколений – наследовались [Бычковская и др., 2006]. Эффективность низких и средних доз облучения, независимость эффектов от дозы в широком интервале и массовость появления эффектов в поколениях исключают возможность мутационной природы этих изменений.

Выводы, сделанные нами в отношении влияния радиации на изменение двигательной активности инфузорий *S. ambiguum*, позволяют считать, что прямые и отдаленные радиационно-индуцированные эффекты можно оценивать не только по выживаемости клетки или организма, но и по изменению поведенческих характеристик.

Оценка изменения двигательной активности у инфузорий *S. ambiguum* методом, предложенным проф. Н.А. Тушмаловой, занимает короткое время. Полученные нами результаты могут быть положены в основу экспресс-анализа уровня радиационного загрязнения гидро-

сферы. Это не только обогатит представления о биологическом действии радиации, но и откроет новые возможности для нормирования на биоту.

5.1.1.3 Радиационно-индуцированные морфометрические изменения у инфузорий в нескольких поколениях

Обнаруженные нами радиационно-индуцированные эффекты проявлялись не только в снижении подвижности облученных инфузорий *S. ambiguum*, но и в появлении таких ярко выраженных функциональных расстройств как реакции-«предвестники гибели» [Тушмалова, Егорова, 2004] – судорожные сжатия тела, изменение характера движения от «прямолинейного» (рис. 14 А) до «верчения» (рис. 14 Б), пятные движения или полная неподвижность инфузорий, которые были зарегистрированы с применением метода прижизненной компьютерной морфометрии и разработанными нами методическими приемами, описанными в гл. 4.3.1 для простейших.

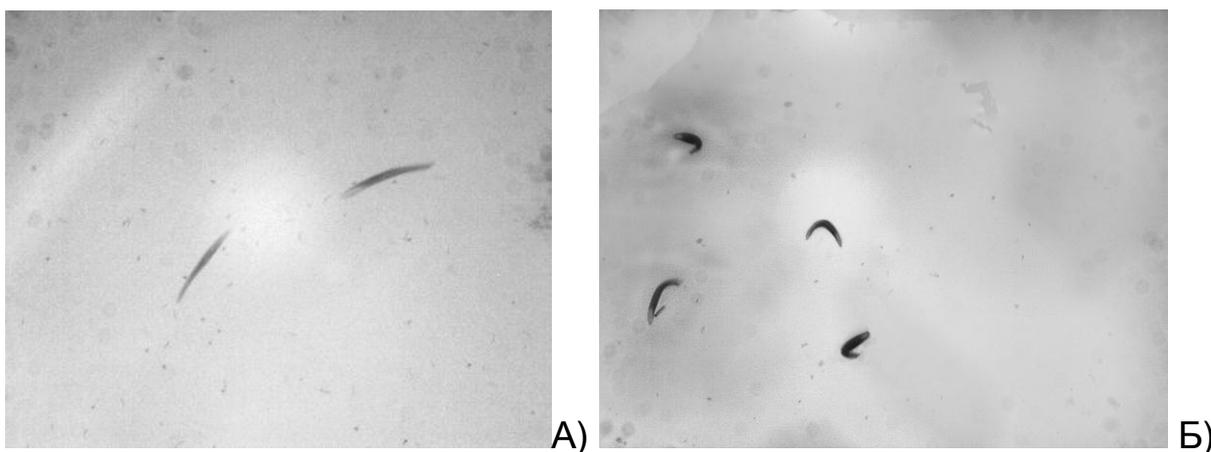


Рис. 14 – Физиологическая норма (А) и «вертячки» (Б) у спиростом (увеличение в 7 раз) (фотография с монитора компьютера, полученная с использованием системы видеонаблюдения, описанной в гл. 4.3.1)

На рис. 15 приведены результаты количественного учета случаев морфометрических отклонений у подопытных особей сразу и в отдаленные сроки (до 7 сут) после γ -облучения в дозах 0,1 – 1000 Гр.

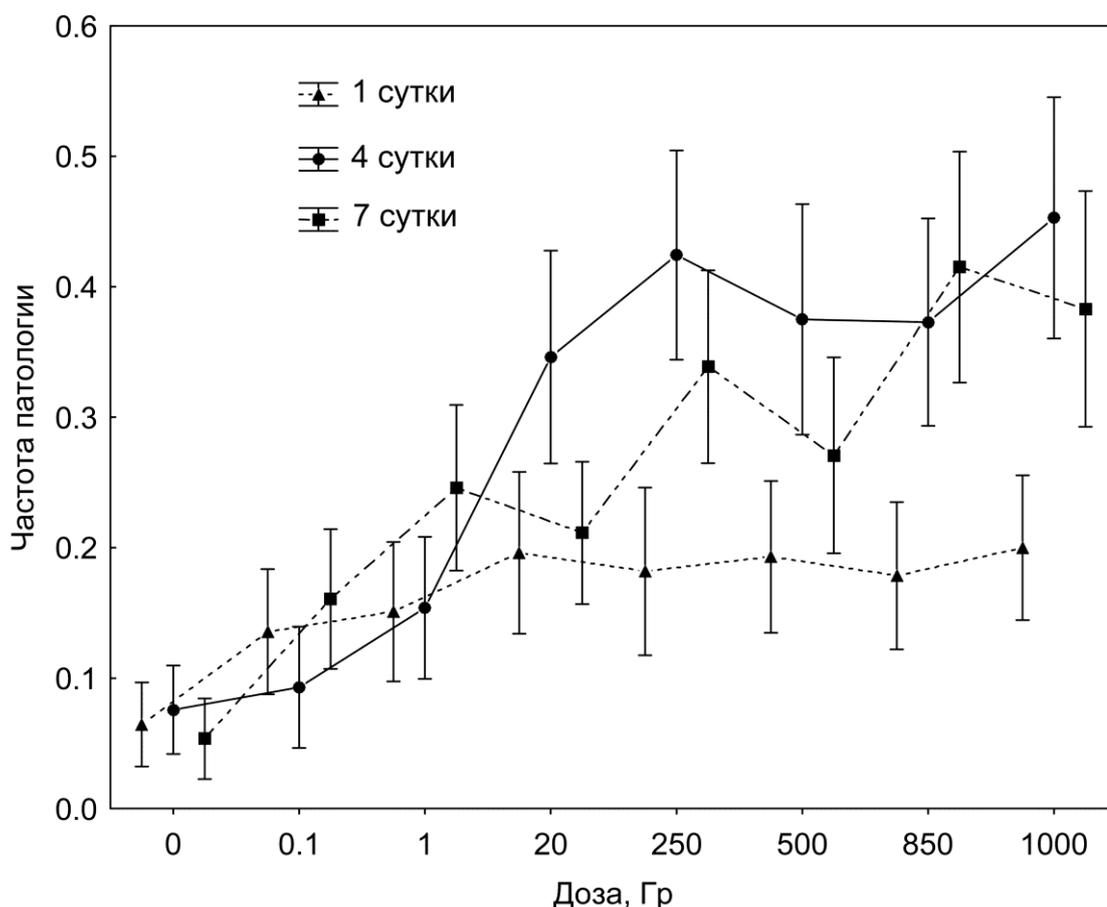


Рис. 15 – Динамика морфометрических нарушений¹ у инфузорий *S. ambigua* после γ -облучения в дозах от 0,1 до 1000 Гр на разные сроки после воздействия

¹ $M \pm m$ – средняя частота встречаемости инфузорий с нарушениями формы тела относительно общего количества проанализированных в каждой выборке простейших ($n =$ от 44 до 71) со стандартной ошибкой

Видно, что в контрольных группах морфометрические изменения минимальные. Однако, они появляются сразу после γ -облучения простейших и постепенно увеличиваются в течение всего периода наблюдения (как минимум до 7 сут). Известно, что такие изменения, если они развиваются, оказываются необратимыми и неизбежно ведут

к гибели инфузорий, даже если их поместить в чистую среду [Тушмалова, Данильченко, Бресткина, 1988].

С использованием двухстороннего факториального критерия Фишера был выполнен анализ значимости отличий наблюдаемого биоэффекта в дозовых группах относительно изменений в контрольных выборках. Анализ показал, что на первые сутки достоверных отличий нет. Затем, начиная с дозы 20 Гр (4 сут, $P = 0,0005$) и 1 Гр (7 сут, $P = 0,0069$) число особей с морфофункциональными изменениями значимо возрастает. Данные приведены в табл. 11.

Таблица 11 – Частота встречаемости инфузорий *S.ambiguum* с морфометрическими отклонениями на разные сроки после γ -облучения

Доза, Гр	Количество особей с патологией, n	Выборка, N	Частота встречаемости	Отношение к контролю	Вероятность, P
1 сутки					
0	4	62	0.06	-	-
0,1	8	59	0.14	2.10	0.32
1	8	53	0.15	2.34	0.23
20	10	51	0.20	3.04	0.07
250	8	44	0.18	2.81	0.12
500	11	57	0.19	2.99	0.07
850	10	56	0.18	2.77	0.10
1000	13	65	0.20	3.10	0.04
4 сутки					
0	5	66	0.08	-	-
0,1	4	43	0.09	1.23	1.00
1	8	52	0.15	2.03	0.29
20	18	52	0.35	4.57	0.0005
250	28	66	0.42	5.60	4.93x10⁻⁶
500	18	48	0.38	4.95	0.0002
850	22	59	0.37	4.62	9.98 x 10⁻⁵
1000	24	53	0.45	5.98	3.61 x 10⁻⁶

Продолжение табл. 11					
7 сутки					
0	3	56	0.05	-	-
0,1	9	56	0.16	3.00	0.12
1	15	61	0.25	4.59	0.007
20	15	71	0.21	3.94	0.019
250	21	62	0.34	6.32	0.0002
500	13	48	0.27	5.06	0.0046
850	22	53	0.42	7.75	9.85 x 10⁻⁶
1000	18	47	0.38	7.15	6.77 x 10⁻⁵

Итак действие γ -излучения вызывает у инфузорий морфометрические расстройства, которые можно зафиксировать по изменению формы тела облученных простейших. Изменения сохраняются длительное время, нарушая функциональную активность инфузорий и являются «предвестниками гибели». В проведенном исследовании получены данные, демонстрирующие высокую чувствительность инфузорий *S. ambigua* как по признаку снижения двигательной активности, так и по увеличению частоты морфометрических нарушений. Таким образом, морфометрический показатель является дополнительным биомаркером функциональных нарушений у облученных простейших.

5.1.2 Прямые и отдаленные радиационно-индуцированные эффекты у ракообразных

5.1.2.1 Радиационно-индуцированный эффект изменения выживаемости ракообразных в нескольких поколениях

На рис. 16 представлена динамика выживаемости контрольных и подопытных дафний в течение 30 сут после облучения γ -квантами в больших дозах.

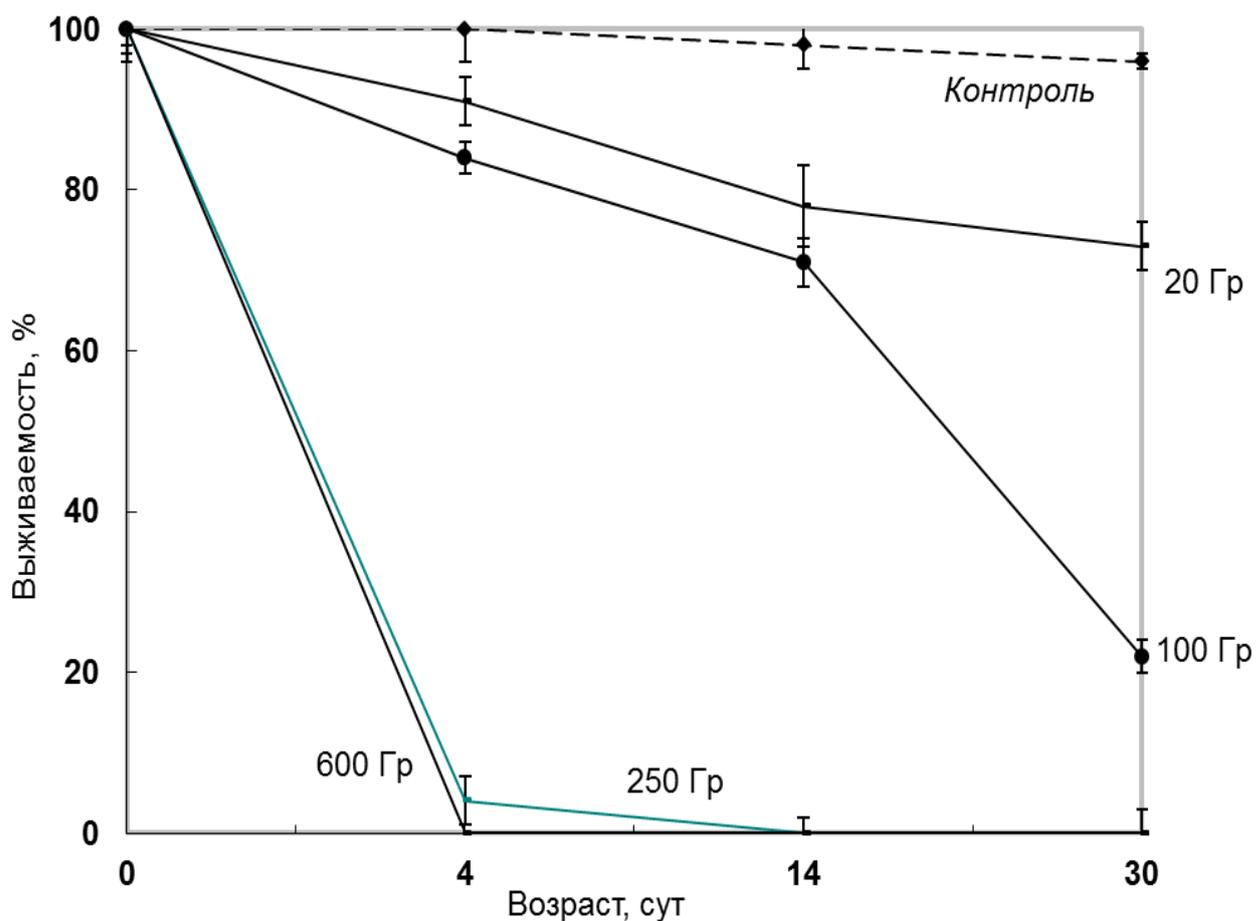


Рис. 16 – Выживаемость дафний в контроле и после γ -облучения в дозах от 20 до 600 Гр в % относительно исходного количества ($n=45$)

Согласно полученным данным, выживаемость дафний, облученных в дозе 20 Гр, значительно снижается. Воздействие в более высокой дозе 100 Гр усиливает величину радиационного эффекта, в то время как дозы 250 и 600 Гр следует рассматривать как летальные. По нашим оценкам, уровень полуметальной дозы для дафний лежит между 50 и 80 Гр, что подтверждено сведениями из литературы [Сахаров, 2006]. Далее мы исследовали, как изменится выживаемость дафний после облучения в дозах менее 20 Гр. На рис. 17 представлена динамика выживаемости дафний в течение 60 сут ежедневных наблюдений после γ -облучения в дозах 10, 100 и 1000 мГр. На рисунке видно постепенное снижение выживаемости дафний в необлучен-

ном контроле за счет смертности небольшого числа особей (спонтанная смертность).

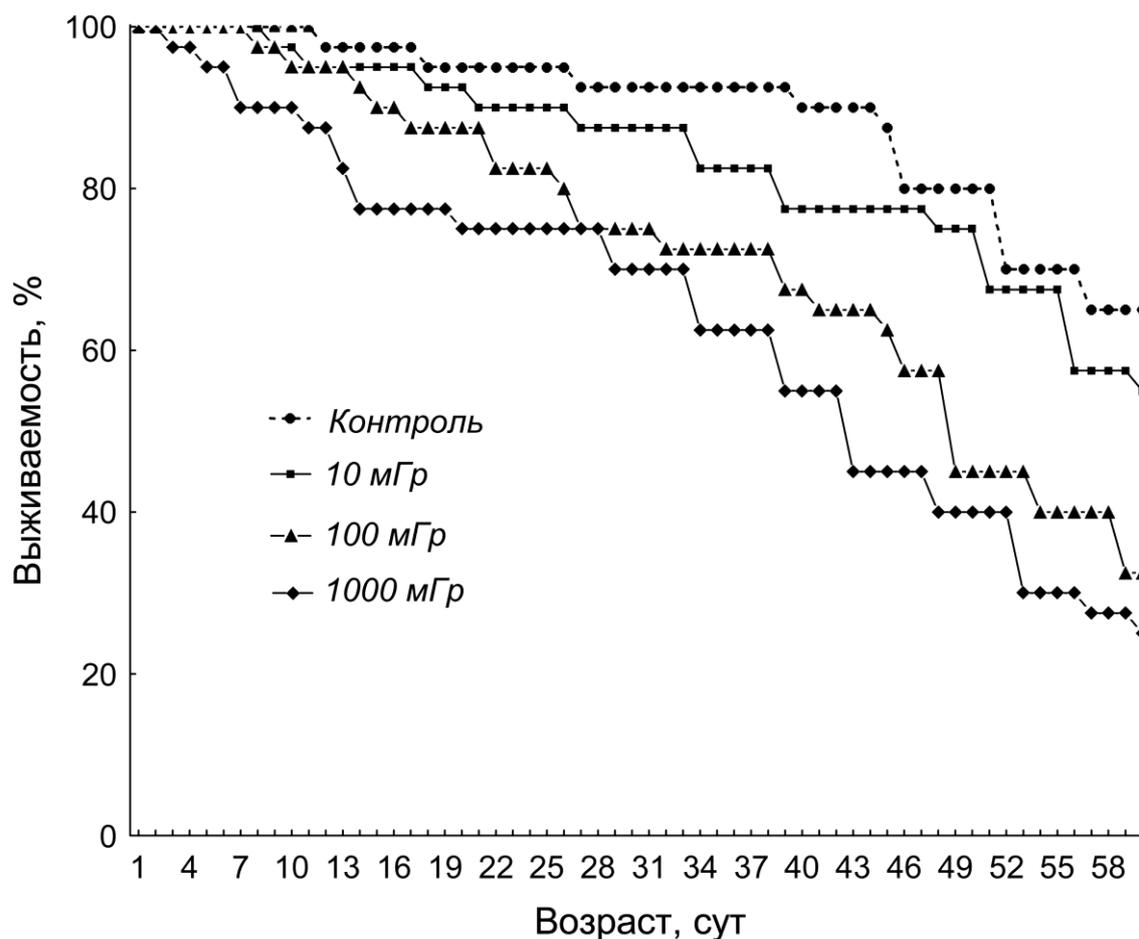


Рис. 17 – Выживаемость дафний в контроле и после облучения в дозах 10, 100 и 1000 мГр в % к исходному количеству дафний в каждой выборке ($N=40$)

Для облученных популяций характерна другая форма кривых. Если при облучении в дозе 10 мГр эффект был не значим ($P = 0,0749$), то после облучения в дозах 100 и 1000 мГр наблюдали более высокий, чем в контроле, уровень смертности дафний ($P < 10^{-5}$). Эти изменения приходятся на период созревания, характерный для индивидуального развития дафний (см. рис. 1), когда происходит формирование и закладка яиц [Ebert, 2005]. На рисунке также видно, что к 60-м сут наблюдения в эксперименте было потеряно более половины исходной выборки дафний, а в контрольной – только ее третья часть.

Таким образом, нами показано, что динамика выживаемости дафний при низких и средних дозах облучения осуществляется по качественно иному сценарию, чем при больших дозах.

На рисунке 18 представлена объединенная по всем независимым экспериментам кривая «доза-эффект» выживаемости дафний к 30-м сут после острого γ -облучения в дозах от 0,01 до 600 Гр.

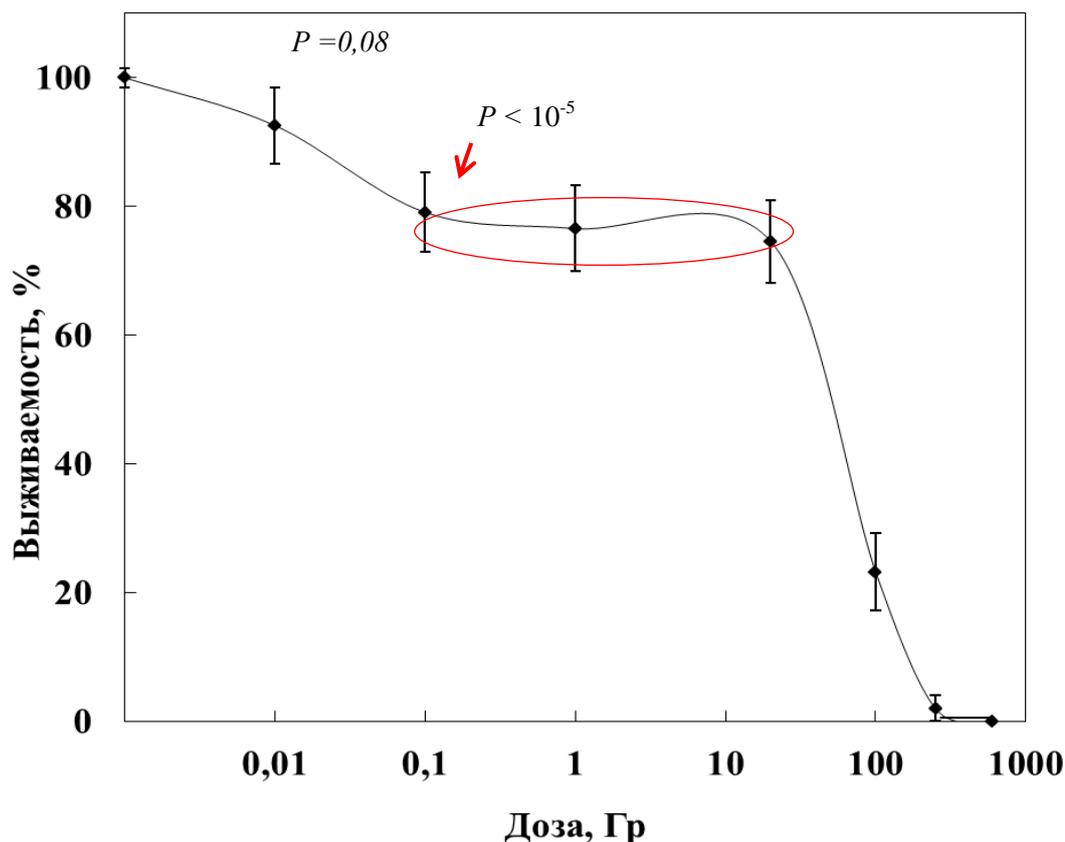


Рис. 18 – Кривая «доза-эффект» для выживаемости дафний к 30-м сутки после острого облучения в дозах 0,01 – 600 Гр в % к соответствующему контролю

На рисунке видно, что при облучении в дозе 0,01 Гр эффект изменения выживаемости не обнаружен, а при облучении в дозе 0,1 Гр происходит значимое снижение выживаемости ракообразных. Далее наблюдается дозозависимый участок протяженностью до 20 Гр, в пределах которого достоверные различия по выживаемости не обнаружены ($P = 0,63$). При более высоких дозах (100, 250 и 600 Гр) имеет

место переход к линейной зависимости гибели животных с увеличением дозы облучения.

Таким образом, результаты проведенного исследования указывают на высокую чувствительность ракообразных к γ -облучению. В диапазоне низких и средних дозах радиационно-индуцированный эффект имеет характеристики немишенного действия радиации на клетку. Регистрируется дозозависимое плато и скачкообразный переход в новое устойчивое состояние при достижении пороговой дозы в 100 мГр.

На рисунке 19 показана динамика выживаемости дафний в поколении F_1 в 30-суточном эксперименте для контрольной группы и группы особей, которые были получены от облученных в дозах 100 и 1000 мГр дафний исходной выборки.

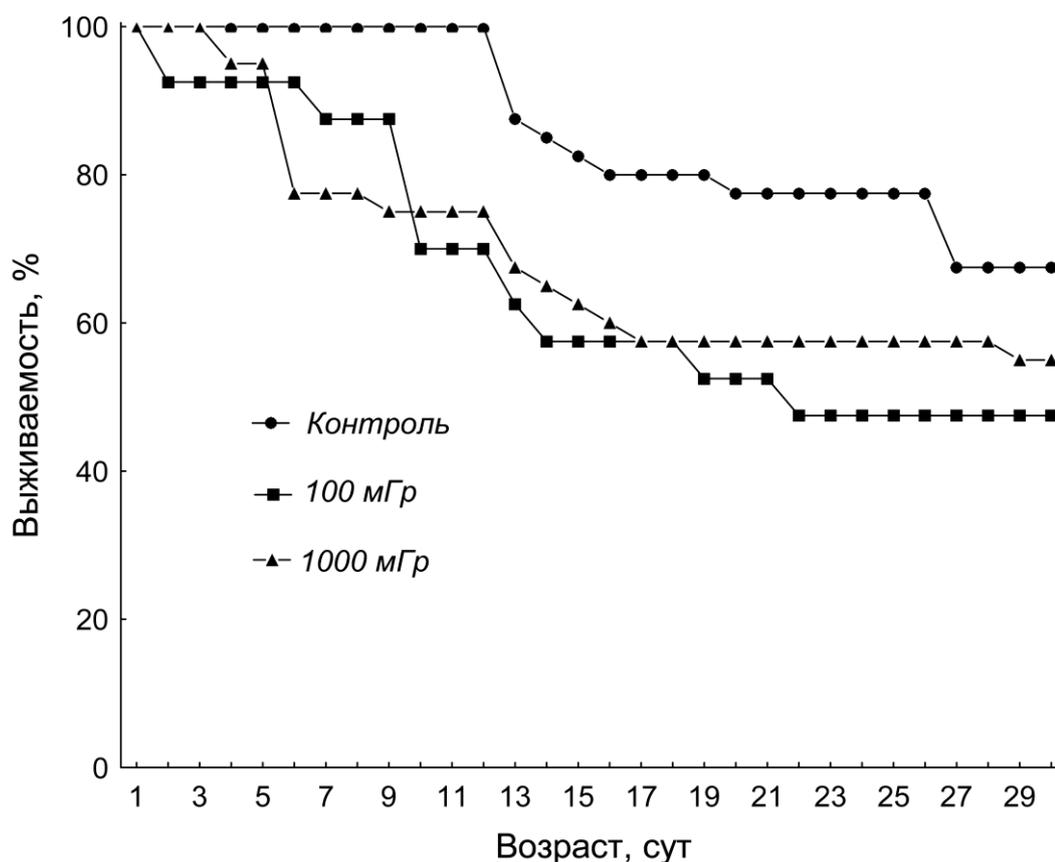


Рис. 19 – Выживаемость в первом поколении дафний в контроле и в необлученных выборках, родившихся от облученных в дозах 100 и 1000 мГр дафний в % относительно исходного количества особей в каждой выборке ($N=40$)

На рисунке видно, что зависимость выживаемости дафний в первом поколении, которое непосредственно не облучали, аналогична таковой в поколении облученных дафний исходной выборки. Это можно объяснить повреждением генетического материала в половых клетках, формирующих первое поколение. У потомства дафний, облученных в дозах 100 и 1000 мГр, количество летальных событий увеличивается уже в ранние сроки, и происходит значительно интенсивней, чем в контроле ($P = 0,04$). Как и в опытах с одноклеточными простейшими, у облученных дафний и их потомства величина эффекта не изменяется с повышением дозы облучения на порядок (от 100 до 1000 мГр). Таким образом, потомство первого поколения проявляет качественно те же реакции, что и особи из облученной выборки (рис. 20).

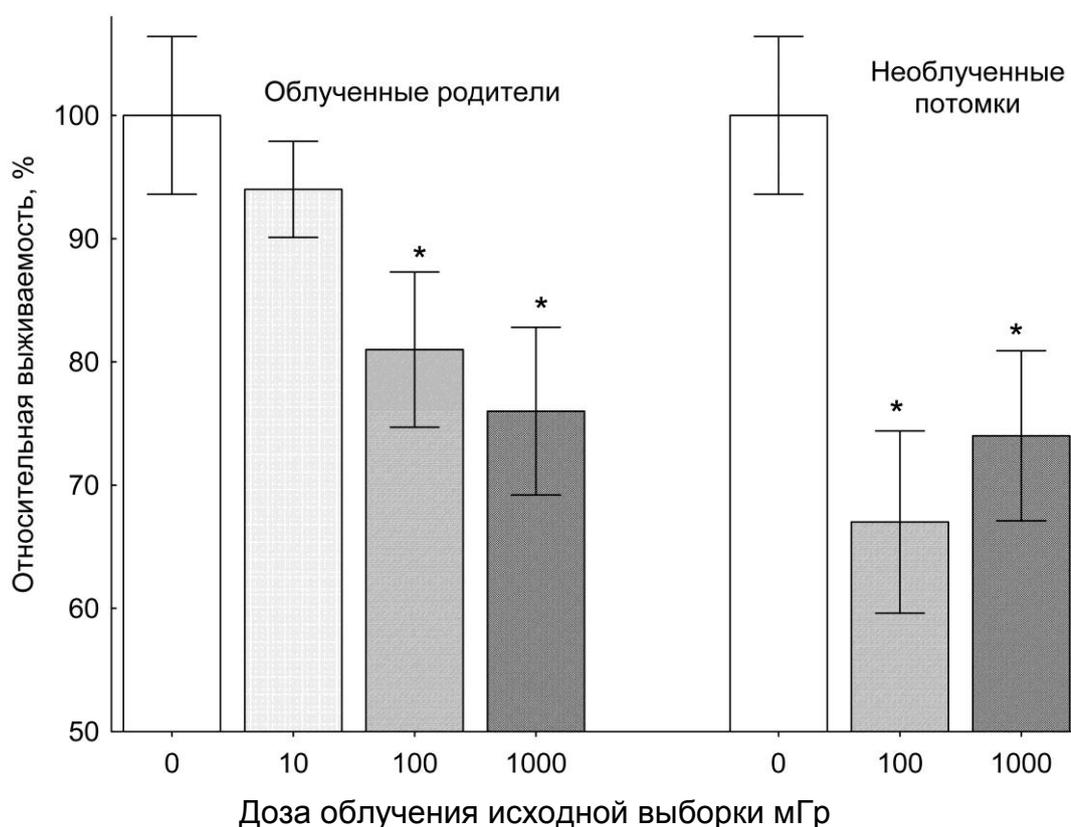


Рис. 20 – Снижение выживаемости *D. magna* из исходного поколения и их потомства за 30 сут. в % по отношению к контролю

* $P < 0,05$

Сравнивая полученные данные с результатами экспериментов острого облучения разных представителей биоты, приведенных в литературе, мы обнаружили сведения о наличии порога на кривой «доза – эффект» по критерию снижения выживаемости клеток селезенки и активности ферментов окислительного стресса у радужной форели после γ -облучения *in vivo* в дозе 100 мГр [O'Dowd, Mothersill, Cairns et al., 2009]. Облучение ячменя в дозе 50 мГр вызывало появление цитогенетических повреждений в клетках корневой меристемы [Geras'kin, Oudalova, Kim et al., 2007]. В молекулярно-генетических исследованиях на мышах острое облучение в дозе 1000 мГр вызывало трансгенерационный эффект [Barber, Hardwick, Shanks et al., 2009]. Таким образом, анализ литературы показывает существование общих закономерностей радиационно-индуцированных биологических эффектов у разных представителей биоты при радиационном облучении.

В следующей серии опытов мы оценили выживаемость у более отдаленного потомства облученных дафний. На рисунке 21 представлены данные по выживаемости потомства ракообразных *D. magna* из поколения F_2 и F_3 , полученных от облученных в дозах 100 и 1000 мГр дафний исходной выборки (F_0). Из рисунка видно, что эффект снижения выживаемости, обнаруженный у непосредственно облученных дафний и первого пострадиационного поколения, не сохраняется в более отдаленных поколениях дафний F_2 и F_3 . Полученные нами на ракообразных данным свидетельствуют о возможности трансмиссии в соматические клетки потомства геномной нестабильности, возникающей у особей облученной выборки и о постепенном затухании этих изменений в последующих генерациях.

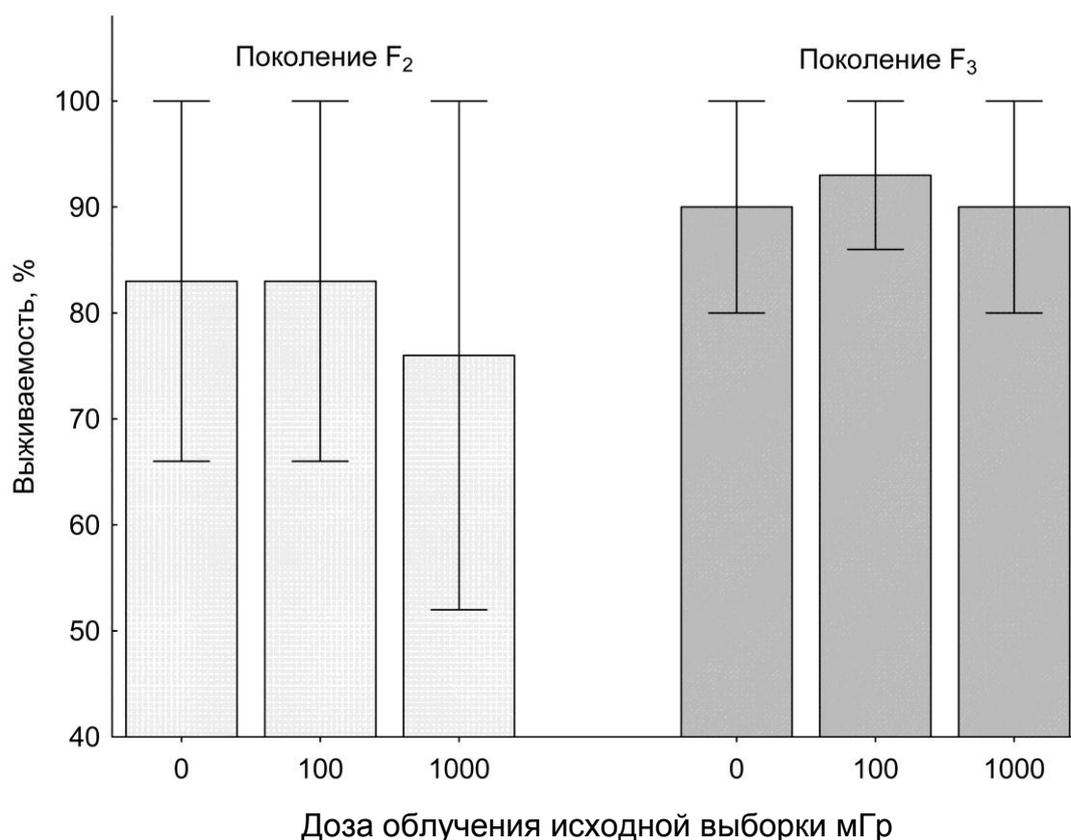


Рис. 21 – Эффект облучения исходной выборки дафний в дозах 100 и 1000 мГр на выживаемость необлученного потомства из второго (F_2) и третьего (F_3) поколений к 30-суточному возрасту ($N=20$ для каждой выборки)

5.1.2.2 Радиационно-индуцированный эффект изменения продолжительности жизни у ракообразных в нескольких поколениях

Вопрос о влиянии радиационного воздействия на продолжительность жизни в настоящее время далёк от разрешения. Прежде всего, это связано с требованием больших объёмов наблюдений для получения достаточной статистической мощности эксперимента. Требуемые объёмы можно достичь, увеличивая численность популяции или время наблюдения, что, в свою очередь, связано с техническими и финансовыми проблемами, например, при анализе радиационно-индуцированных изменений продолжительности жизни в популяциях

животных или человека. Используя дафний в качестве тест-модели с относительно коротким жизненным циклом, мы получили возможность оценить изменение продолжительности жизни многоклеточного организма в нескольких поколениях после острого γ -облучения в низких и средних дозах.

На рисунке 22 представлены кривые выживаемости контрольной и облучённых в дозах 10; 100 и 1000 мГр дафний, прослеженные до полного вымирания особей и рассчитанные с использованием уравнения (7) (см. гл. 4.3.2). На рисунке видно, что в облучённых группах дафний смертность более интенсивна.

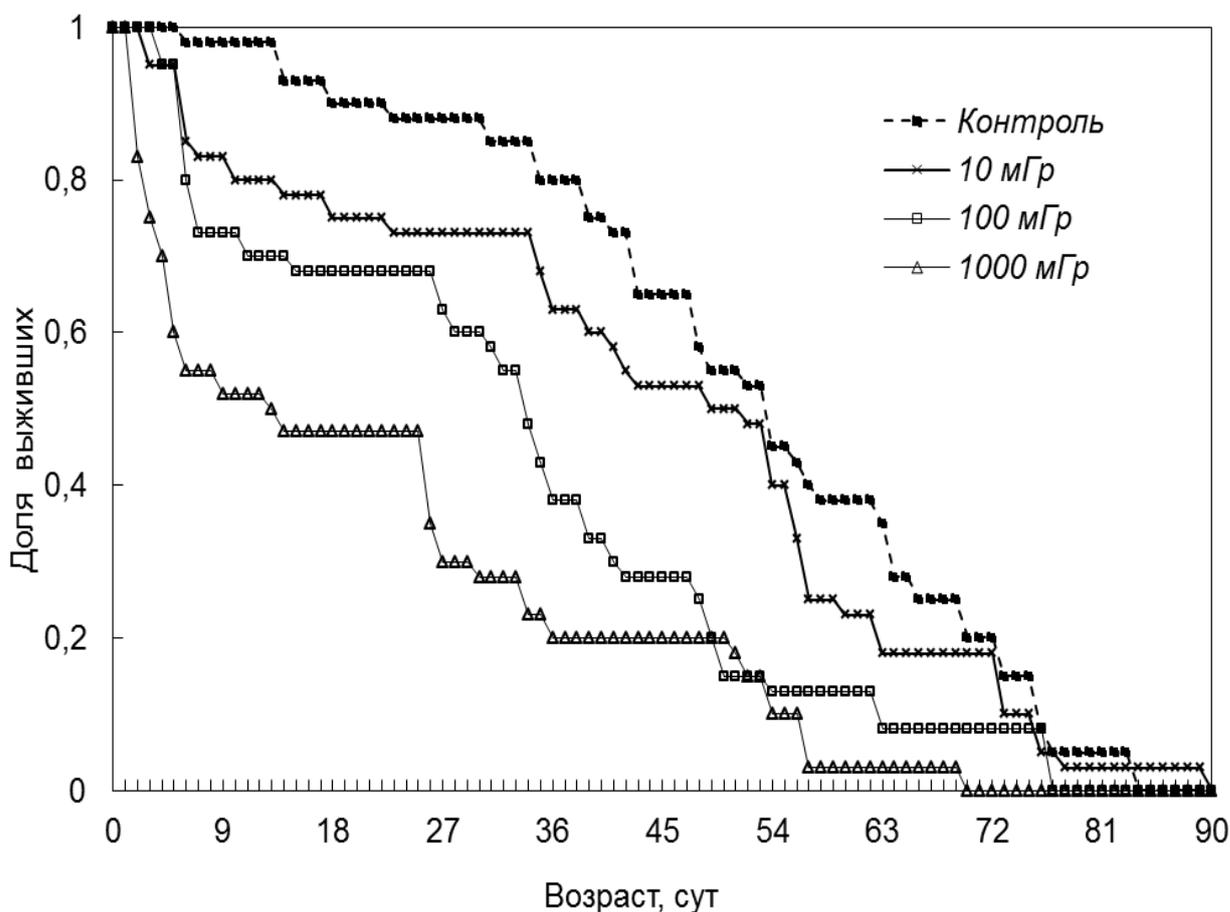


Рис. 22 – Динамика выживаемости контрольных и облучённых дафний за весь период жизни в условиях модельного эксперимента. За единицу принято исходное количество дафний в каждой выборке ($N=40$)

Достоверность и значимость отличия от контроля проиллюстрированы на рис. 23 для контрольной и облучённой в дозе 100 мГр выборки дафний с 95 % доверительными пределами, рассчитанными по уравнению (3) (гл.4.3.2).

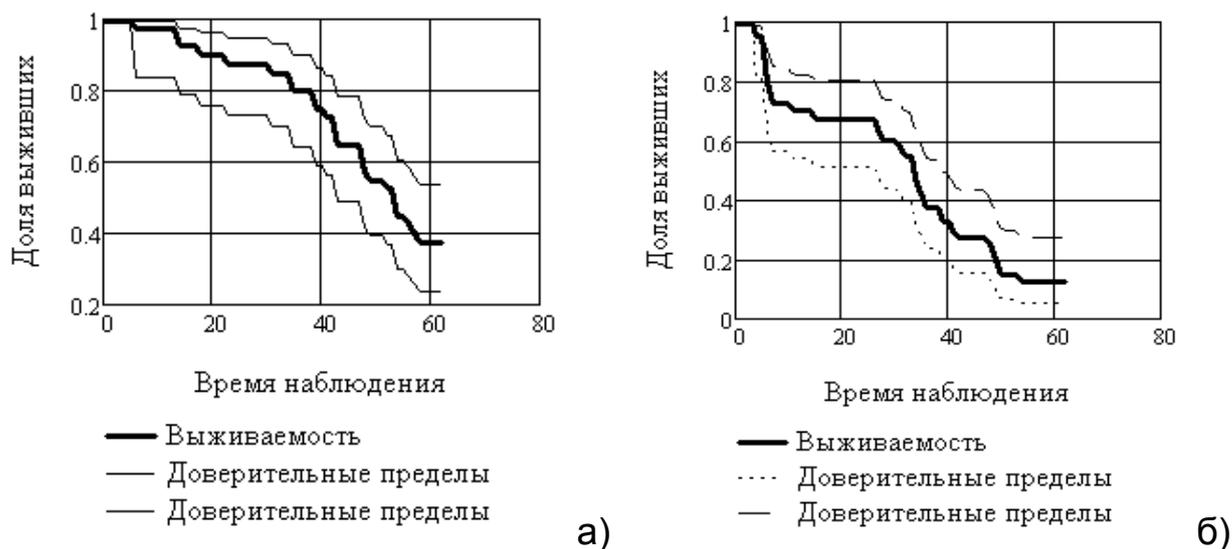


Рис. 23 – Кривая выживаемости для контрольной (а) и облучённой в дозе 100 мГр (б) выборки дафний с доверительными пределами

По нашим данным и сведениям из литературы [Сахаров, 2006], ЛД₅₀ для дафний составляет 50 Гр. Как видно из рисунка, доверительные пределы выживаемости для контроля и дозовой группы в некоторые моменты времени (20, 60 сут) пересекаются, а в другие (40 сут) – нет. Поэтому на основании данного критерия нельзя говорить о значимости влияния облучения в исследуемых дозах на выживаемость рачков. Ответ может дать только сравнение разности или отношения рисков смерти в облучённой и контрольной популяциях за весь период наблюдения.

В табл. 12 приведены объединённые расчёты по двум независимым сериям экспериментов. Средняя продолжительность жизни в контрольной и облучённых выборках дафний рассчитана по уравнению (7) (см. гл.4.3.2), риски смерти – по уравнению (3), разности рис-

ков смерти – по уравнению (8) и их доверительные пределы (нижний и верхний) – по уравнению (5).

Таблица 12 – Средняя продолжительность жизни и риск смертности в контрольной и облученных выборках дафний ($n=80$)

Дозы (мГр)	Контроль	10	100	1000
Время (период) наблюдения, сут	60	60	60	60
Средняя продолжительность жизни, сут	54.5	50.6	43.6	38.5
Риск смертности в облученной популяции	0.41	0.54	0.78	0.86
Нижний 95% доверительный предел разности рисков		-0,08	0,06	0,18
Верхний 95% доверительный предел разности рисков		0,33	0,44	0,57
Отношение показателей продолжительности жизни после облучения и в контроле	–	0.93	0.80	0.71
Z^*	–	1.44	4.03	5.35
Вероятность	–	0.08	<0.01	<0.01

* Z – LogRank статистика, характеризующая отличия между продолжительностью жизни в контроле и облученными дафниями, если $Z > z_{\alpha}$, где z_{α} верхний α кванталь ($z_{\alpha} = 1,96$) стандартного нормального распределения.

Из таблицы видно статистически значимое снижение средней продолжительности жизни и увеличение риска смертности с увеличением дозы облучения от 100 до 1000 мГр. При облучении в дозе 10 мГр снижение выживаемости не значимо. При этом разница между риском смертности дафний, облученных в дозах 10 – 100 мГр и 100 –

1000 мГр, тоже статистически не значима. Следовательно, на кривой выживаемости появляется дозозависимое плато.

Следующее исследование демонстрирует сохранение радиационно-индуцированного эффекта снижения продолжительности жизни в первом поколении дафний. В табл. 13 приведены те же параметры, что и в табл. 12, только для дафний из поколения F_1 , полученного от облученных в дозах 100 и 1000 мГр дафний исходной выборки.

Таблица 13 – Средняя продолжительность жизни и риск смертности в контроле и в первом поколении необлученных дафний, которые родились от облученных в дозах 100 и 1000 мГр дафний исходной выборки ($N=40$ для каждой выборки)

Доза (мГр)	Контроль	100	1000
Время (период) наблюдения (сут)	30	30	30
Средняя продолжительность жизни (сут) (облученные)	26,5	20,2	21,2
Риск смерти	0,32	0,52	0,45
Разность рисков смерти в облученной и контрольной популяциях		0,20	0,12
Отношение показателя продолжительности жизни после облучения к таковому в контроле		0,76	0,80
Z^*		2,45	1,70
Вероятность		<0,01	<0,05

* Z – LogRank статистика, характеризующая отличия между продолжительностью жизни в контроле и облученными дафниями, если $Z > z_\alpha$, где z_α верхний α кванталь ($z_\alpha = 1,96$) стандартного нормального распределения

Как видно из табл. 13, потомство дафний первого поколения, полученное от облученных в дозах 100 и 1000 мГр дафний исходной выборки, имеет потенциально более короткую продолжительность жизни, чем дафнии из группы контроля.

Таким образом, исследование показывает, что доза 100 мГр острого γ -облучения является наименьшей (или близкой к ней) дозой, вызывающей статистически значимый эффект снижения выживаемости и продолжительности жизни дафний. Различие рисков смертности в выборках ракообразных, облученных в дозах 100 и 1000 мГр, статистически не значимо, следовательно, величина радиационного эффекта не изменилась при увеличении дозы облучения в 10 раз.

Обнаруженные нами изменения показателей выживаемости и продолжительности жизни у ракообразных *D. magna* не противоречат данным, описанным в литературе на других видах биоты. Например, сокращение продолжительности жизни обнаружено при остром облучении мышей в дозе 400 мГр [Oghiso, Tanaka, Tanaka, Sato, 2008]. Однако, при низкоинтенсивном хроническом γ -облучении в описанных в литературе опытах наблюдали увеличение продолжительности жизни. Например, в исследованиях на дрозофилах такой феномен был объяснен повреждением функций гонад, что по теории «распределения сомы» способно увеличивать продолжительность жизни [Зайнуллин и др., 2006]. В литературе обсуждается так же роль апоптоза в радиационно-индуцированном сокращении продолжительности жизни [Зайнуллин и др., 1999]. Показано, что ряд генов, участвующих в контроле апоптоза у растительных и животных клеток, претерпевает возрастзависимое изменение экспрессии. Неоднозначность биологических эффектов облучения в низких дозах авторы объясняют индуцированием генетической нестабильности, на фоне которой возможна реализация разнообразных радиобиологических реакций, приводящих как к стимуляции, так и к значимому угнетению жизненно важных функций

клетки или организма в целом [Зайнуллин и др., 2006]. По последним сведениям, в процессах сокращения продолжительности жизни существенную роль играет оксидативный стресс. Свободные радикалы повреждают митохондриальную и ядерную ДНК, а также мембраны и белки клетки. Эти процессы приводят к ускоренному старению и сокращению продолжительности жизни [Анисимов, Бакеева, Егормин и др., 2008; Skulachev, Antonenko, Bakeeva et al., 2009].

5.1.2.3 Влияние радиации на изменение плодовитости у ракообразных в нескольких поколениях

В эксперименте, направленном на анализ радиационно-индуцированных эффектов изменения плодовитости ракообразных *D. magna* в непосредственно облученном поколении F_0 и в поколениях F_1 и F_2 , которые не облучали, дафнии начинали производить потомство в среднем с 9-суточного возраста, что соответствует биологической норме [Ebert, 2005]. Дафний исходных выборок остро облучали в дозах 10, 100, 1000 и 10 000 мГр. Опыты проводили при ежедневном анализе выживаемости особей в 21-суточном эксперименте в каждом поколении (рис. 24).

Исходное количество дафний, использованное в эксперименте в трех поколениях, составило 396 особей. Количество дафний, выживших во всех дозовых группах и в контроле к концу опыта – 357 особей. Таким образом, общая выживаемость дафний составила 90,15%.

В табл. 14 представлены данные по выживаемости и средней продолжительности жизни дафний в контроле и дозовых группах в трех поколениях. Приведены статистические различия с показателями в контрольных выборках дафний.

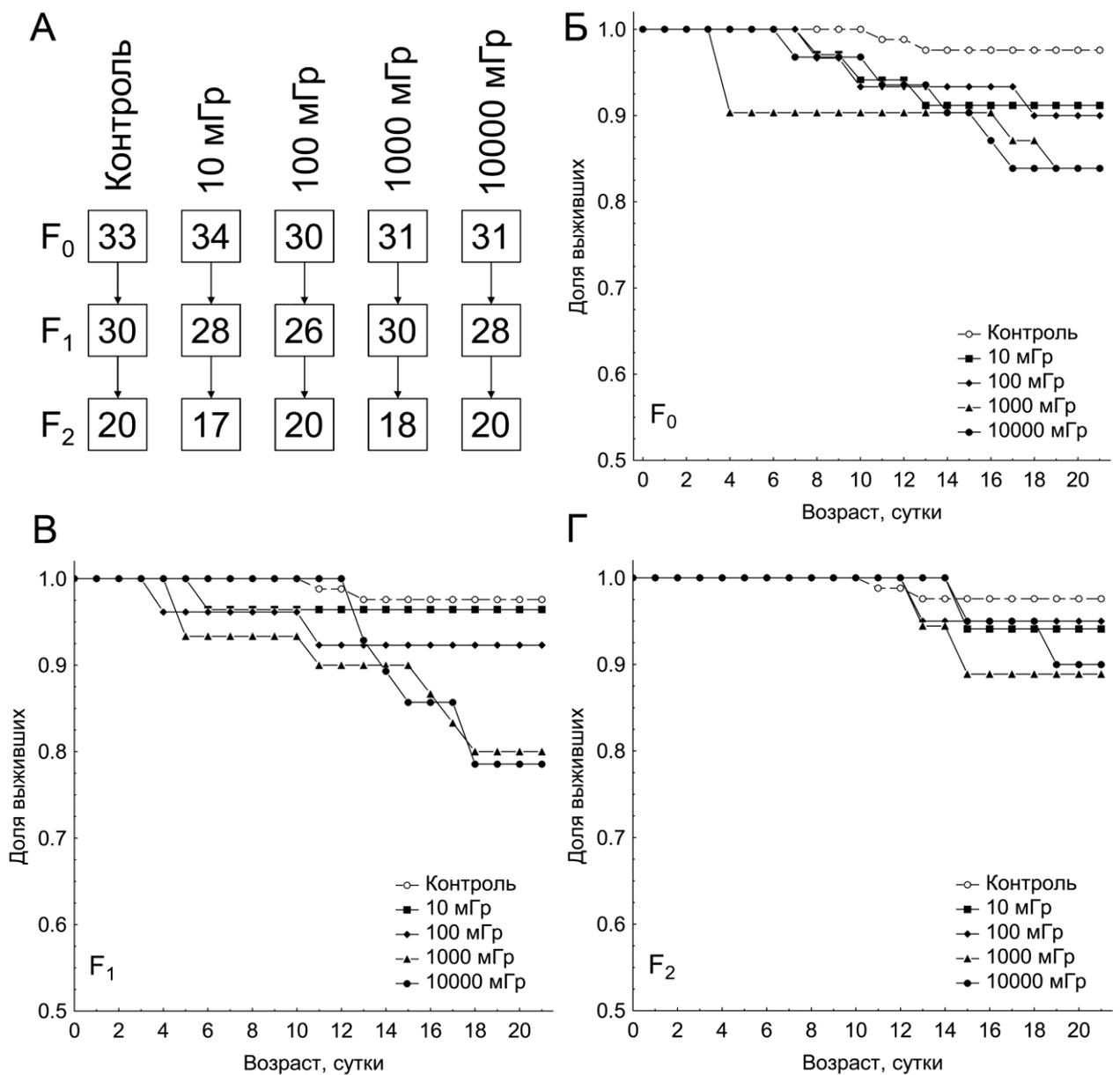


Рис. 24 – Схема эксперимента с указанием количества ракообразных *D. magna* в опыте (А) и динамика выживаемости в непосредственно облученном γ -квантами в дозах 10, 100, 1000 и 10 000 мГр поколении F_0 (Б) и в двух пострadiaционных поколениях F_1 (В) и F_2 (Г), которые не облучали

Таблица 14 – Радиационно-индуцированный эффект изменения выживаемости и продолжительности жизни *D.magna* в трех поколениях

Доза, мГр	10	100	1000	10000
Контроль: $N_0=83$, $N_T=81$, Средняя продолжительность жизни 20,77 сут				
Поколение F_0				
Анализируемая выборка дафний, N_0	34	30	31	31
Число выживших особей, N_T	31	27	26	26
Ср. продолжительность жизни, сут	19.98	20.02	18.98	19.58
Z^*	1.58	1.75	2.74	2.72
p^\dagger	0.46	0.32	0.02	0.03
Поколение F_1				
Анализируемая выборка дафний, N_0	28	26	30	28
Число выживших особей, N_T	27	24	24	22
Ср. продолжительность жизни, сут	20.43	19.89	19.01	19.51
Z^*	0.34	1.27	3.23	3.35
p^\dagger	1	0.82	0.004	0.003
Поколение F_2				
Анализируемая выборка дафний, N_0	17	20	18	20
Число выживших особей, N_T	16	19	16	18
Ср. продолжительность жизни, сут	20.57	20.56	20.05	20.49
Z^*	0.74	0.60	1.69	1.54
p^\dagger	1	1	0.37	0.49

* Лог-ранк тест для оценки значимых отличий между облученными и контрольными выборками *Daphnia*.

† Вероятность p для лог-ранк теста с поправкой Бонферрони на множественное сравнение. Здесь и далее статистически значимые величины выделены жирным шрифтом.

Как видно из таблицы, выживаемость дафний после облучения в дозах 1000 и 10 000 мГр значительно нарушается и снижает выживаемость потомства в поколении F_1 . В то же время, выживаемость в поколении F_2 существенно не отличается от таковой в контрольной группе.

В табл.15 приведены результаты двухфакторного дисперсионного анализа, показывающего вклад радиационного фактора в изменение плодовитости в облученном и двух пострадиационных поколениях.

Таблица 15 – ANOVA анализ радиационно-индуцированного эффекта γ -облучения на изменение плодовитости ракообразных *D. magna*

Факторы	Количество новорожденных на <i>Daphnia</i>		Количество пометов		Размер помета	
	<i>F</i> (df)	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Вся выборка <i>Daphnia</i> , <i>N</i> = 396						
Облучение	13.51 (4, 381)	2.64 x 10⁻¹⁰	6.59	3.89 x 10⁻⁵	6.92	2.17 x 10⁻⁵
Поколение	12.99 (2, 381)	4.52 x 10⁻⁶	12.54	5.30 x 10⁻⁶	4.60	0.0106
Взаимодействие	0.83 (8, 381)	0.6372	1.04	0.4078	1.00	0.4326
Выжившие к концу эксперимента <i>Daphnia</i> , <i>N</i> = 357						
Облучение	10.92 (4, 342)	2.41 x 10⁻⁸	3.90	0.0041	5.00	0.0006
Поколение	13.37 (2, 342)	2.56 x 10⁻⁶	13.72	1.86 x 10⁻⁶	1.70	0.1840
Взаимодействие	1.09 (8, 342)	0.37	1.38	0.2041	1.03	0.41

В таблице приведены данные изменения плодовитости всей выборки дафний и только выживших к концу опыта особей. Видно, что облучение исходной выборки значительно изменяет основные компоненты общей плодовитости (количество новорожденных на дафнию к концу эксперимента) – число пометов и их размер (новорожденных на по-

мет). Снижение этих показателей при анализе всей выборки может быть обусловлено снижением выживаемости дафний, наблюдаемой в поколениях F_0 и F_1 при облучении исходной выборки (F_0) в дозах 1000 и 10000 мГр. Это предположение основано на том, что общая плодовитость определяется как способностью особей выжить на протяжении всего репродуктивного периода, так и их репродуктивным потенциалом. Для того чтобы проверить это предположение, мы проанализировали параметры плодовитости у дафний, которые дожили до конца эксперимента. Обнаруженные при анализе плодовитости всей выборки эффекты сохранились в выборке только выживших дафний. Поэтому далее будут проанализированы параметры плодовитости только выживших особей. Поскольку показатели плодовитости в контрольных выборках дафний из всех поколений были гомогенными, мы объединили их в одну группу. Таким образом, численность особи в контроле составила 81 дафнию.

В табл. 16 приведены количественные характеристики изменения основных компонентов плодовитости дафний во всех поколениях.

Таблица 16 – Радиационно-индуцированный эффект изменения компонентов общей плодовитости у *D. magna* в трех поколениях

Доза, мГр	Поколение F_0		Поколение F_1		Поколение F_2	
	$M \pm SE$	P^*	$M \pm SE$	P^*	$M \pm SE$	P^*
Количество новорожденных на <i>Daphnia</i> : Контроль 48.07 ± 1.20						
10	39.61 ± 2.47	0.0296	43.48 ± 2.24	0.3328	47.50 ± 2.20	1
100	38.37 ± 2.89	0.0024	38.17 ± 2.65	0.0020	47.26 ± 1.86	1
1000	29.58 ± 3.28	$1.86 \cdot 10^{-6}$	40.33 ± 1.84	0.0036	42.31 ± 1.99	0.1440
10000	31.58 ± 2.73	$7.08 \cdot 10^{-7}$	36.41 ± 3.55	0.0032	40.94 ± 1.81	0.0252
Prob [†]	1.39×10^{-9}		0.0001		0.0166	

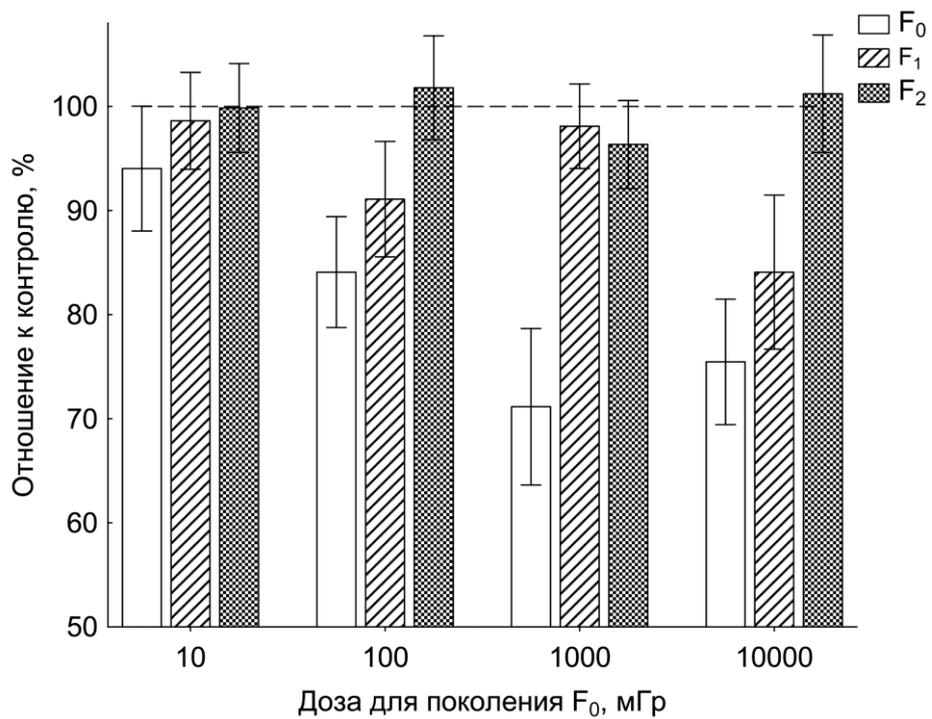
Продолжение таблицы 16						
Количество пометов: Контроль 3.57 ± 0.08						
10	3.35 ± 0.20	1	3.52 ± 0.14	1	3.56 ± 0.13	1
100	3.00 ± 0.18	0.0136	3.25 ± 0.18	0.4912	3.63 ± 0.16	1
1000	2.54 ± 0.26	0.0004	3.50 ± 0.12	1	3.44 ± 0.13	1
10000	2.69 ± 0.21	0.0002	3.00 ± 0.25	0.1712	3.61 ± 0.18	1
Prob [†]	9.56×10^{-6}		0.2095		0.8775	
Количество новорожденных на помет: Контроль 13.74 ± 0.32						
10	11.53 ± 0.63	0.0160	12.50 ± 0.51	0.1780	13.40 ± 0.57	1
100	12.56 ± 0.87	1	11.32 ± 0.70	0.0144	13.40 ± 0.80	1
1000	10.69 ± 1.02	0.0068	11.80 ± 0.60	0.0296	12.42 ± 0.55	0.6692
10000	10.94 ± 0.84	0.0028	11.14 ± 1.00	0.0272	11.62 ± 0.55	0.0062
Prob [†]	0.0009		0.0020		0.0220	

* Вероятность теста Крускала-Уоллиса для сравнения с контрольной группой с поправкой Бонферрони на множественное сравнение.

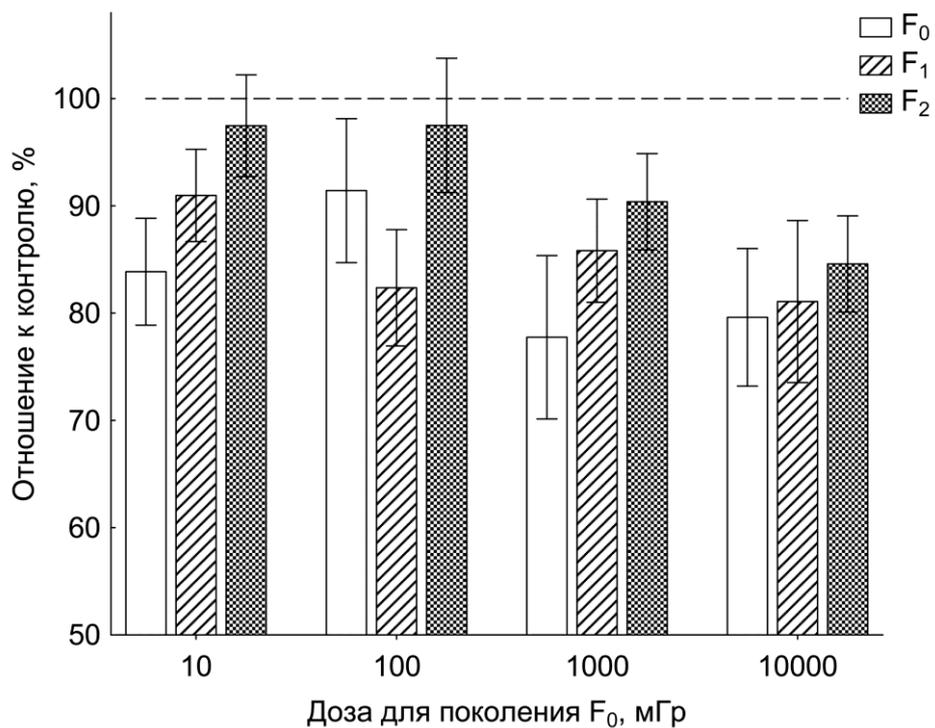
† Вероятность гомогенности всех групп, оцененная тестом Крускала-Уоллиса.

Согласно полученным данным, представленным в табл. 16, γ -облучение в дозе 10 мГр не изменяет общую плодовитость облученных дафний и их потомства F_1 и F_2 . Общее количество новорожденных дафний в поколениях F_0 и F_1 значительно уменьшилось после воздействия на исходную выборку в более высоких дозах 100, 1000 и 10 000 мГр. При этом общая плодовитость в потомстве F_2 не отличалась от плодовитости в контрольной группе. Исключение составляет выборка, полученная из облученных в дозе 10000 мГр дафний поколения F_0 .

Более детальный анализ основных компонентов плодовитости показал, что в нулевом поколении облучение в исследуемых дозах значительно изменяет размер и число пометов (рис. 25). При этом в поколении F_1 число пометов не изменяется, а снижается только их размер.



А



Б

Рис. 25 – Радиационно-индуцированные эффекты γ -облучения у ракообразных *D.magna* в трех поколениях по изменению А – числа пометов на дафнию и Б – среднего размера помета

Объяснить данный феномен можно токсическим эффектом радиации на половые и соматические клетки у непосредственно облученных дафний исходного поколения. Хорошо известно, что в лабораторных условиях дафния размножается партеногенетически (амейотически). Формирования яиц у дафний начинается на 3 – 4 сут жизненного цикла с их продвижения к выводковой сумке, в которой они развиваются в эмбрионы в следующие 4 – 5 сут (см. рис. 1; [Ebert, 2005]). Таким образом, облучая 1-суточных дафний, мы исключили прямое действие радиации на яйца или эмбрионы. При этом облучение соматических клеток дафний в нулевом поколении приводило к постепенному вымиранию части особей, а облучение половых клеток – к снижению числа и размера пометов с новорожденными дафниями.

Данные по выживаемости хорошо согласуются с данными по плодовитости. На рис. 26 представлены значения общей плодовитости в группах опытных и контрольных дафний и средней продолжительности их жизни, которая является наиболее объективно регистрируемой характеристикой выживаемости. Из полученных данных следует, что влияние облучения на плодовитость начинает проявляться при значительно более низких дозах, чем на выживаемость. Это согласуется и данными из литературы. Например, в исследовании [Parisot et al., 2015] наблюдали небольшое увеличение смертности при хроническом облучении *D. magna* ^{137}Cs с мощностью дозы $35,4 \text{ мГр/ч}^{-1}$, при этом плодовитость дафний снижалась при значительно меньшей мощности дозы $0,007 \text{ мГр/ч}^{-1}$. У человека летальная доза составляет 6 Гр, а стерильность наблюдается при дозе острого облучения 0,5 Гр и ниже [Hall, 2000].

Из генетического материала облученных половых клеток в результате партеногенетического деления формировалось поколение F_1 , которое непосредственно не облучали. Поэтому число пометов в поколении F_1 не нарушено, но по-прежнему изменен их размер.

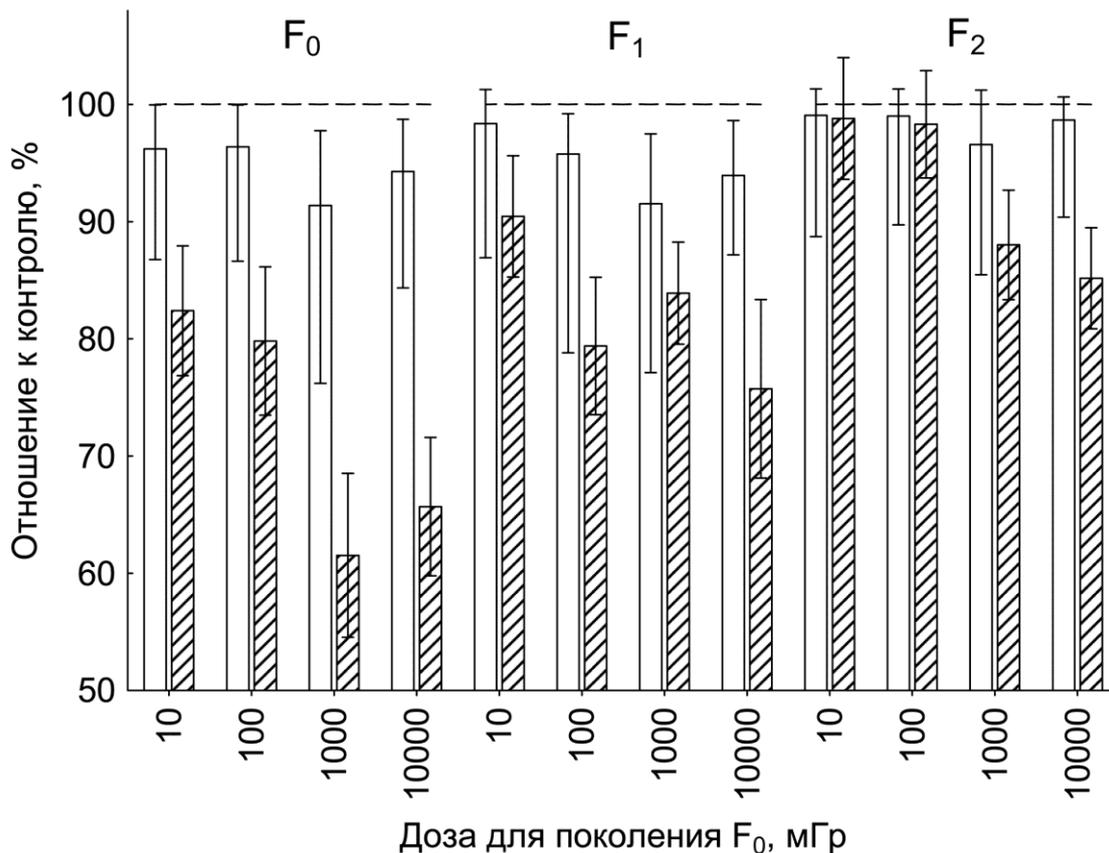


Рис. 26 – Радиационно-индуцированные эффекты изменения продолжительности жизни и плодовитости в трех поколениях *D. magna* относительно значения показателей в контрольных выборках

Светлые столбики – продолжительность жизни, заштрихованные – общая плодовитость

Наблюдаемое в этом поколении снижение выживаемости и плодовитости дафний может быть связано с тем, что особи первого поколения унаследовали определенное число вредных мутаций, индуцированных в половых клетках облученных особей-родительниц. Известны специальные механизмы, которые способны отслеживать и элиминировать организмы с нарушенным геномом, что позволяет сдерживать накопление генетического груза. Эти процессы определяются стиранием вредной для организма информации, тем самым успешно решая проблему реабилитации на более высоком иерархическом уровне – сохраняя в популяции только «здоровый» генофонд.

Получается, что гибель организмов-носителей радиационно-индуцированных повреждений весьма благоприятна для популяции, поскольку удаляются потенциально дефектные единицы. Как мы видим из результатов проведенных экспериментов, период «чистки» может быть достаточно продолжительным – от одного пострадиационного поколения размножающихся партеногенетически дафний до 10 – 15 поколений вегетативно размножающихся инфузорий. В представленном эксперименте восстановление жизнеспособности дафний в поколении F_2 , может быть результатом такого «отсева». Исключение составила группа дафний из F_2 с исходной дозой облучения 10000 мГр, в которой плодовитость оставалась нарушенной.

Проведенное исследование представляет собой одну из первых систематических попыток проанализировать эффекты облучения на плодовитость в мультигенерационных тестах. Согласно полученным данным, острое облучение исходной выборки дафний в дозах 100, 1000 и 10 000 мГр значительно сокращает продолжительность жизни дафний и их потомство поколения F_1 . Наши данные согласуются с результатами, полученными на мышах [Barber, Dubrova, 2006; Dubrova, 2013]. В цитируемых работах сообщается о влиянии облучения отцовской особи на выживание мышей из необлученного поколения F_1 . Эти наблюдения показывают, что острое воздействие на родителей может нарушить жизнеспособность необлученных потомков поколения F_1 и F_2 у млекопитающих.

Проведенный анализ выживаемости и общей плодовитости у дафний показал, что острое облучение исходной выборки в дозах 100 и более мГр значительно снижает выживаемость дафний в непосредственно облученном поколении F_0 и у их потомства в поколении F_1 , в то время как плодовитость облученных дафний значительно снижается уже при облучении в дозе 10 мГр. Однако уже в первом поколении

эффект наблюдается только в группах, исходно облученных в дозах от 100 мГр.

По полученным данным снижение плодовитости невозможно объяснить снижением выживаемости дафний. Анализ результатов проведенного эксперимента показал, что облучение родителей независимо влияет на ключевые показатели особей из поколения F_0 и F_1 – их жизнеспособность и плодовитость. Наши данные согласуются с результатами исследования отдаленных последствий хронического облучения дафний в нескольких поколениях по показателям выживаемости и плодовитости [Alonzo, Gilbin, Zeman, Garnier-Laplace, 2008], и с результатами недавнего исследования изменения плодовитости нематоды *Caenorhabditis elegans* в трех поколениях после облучения исходной выборки ^{137}Cs [Buisset-Goussen, Goussen, Della-Vedova et al., 2014]. В цитируемой работе обнаружено значимое снижение способности откладки яиц в первом и третьем поколениях нематоды, подвергшейся γ -облучению. Авторы объясняют этот эффект сложным сочетанием генетических (мутации) и эпигенетических событий, происходящих в предыдущих поколениях.

Полученные нами данные согласуются с такими характеристиками радиационных эффектов как появление эффекта после облучения в пороговой дозе и сохранение эффекта в ряду пострадиационных поколений. Действительно, продолжительность жизни и плодовитость потомства F_1 в группах, которые получены от выборок дафний, облученных в дозе 10 мГр, не изменяется, в то время как облучение исходной выборки в дозах более 100 мГр одинаково влияет на исследуемые компоненты жизнеспособности дафний в необлученном поколении F_1 .

В целом, результаты исследования продемонстрировали высокую чувствительность репродуктивной функции дафний к облучению в дозе как минимум 100 мГр и выше. Так как долгосрочное выживание ви-

дов сильно зависит от индивидуальной плодовитости и выживаемости их потомства, изменения в репродуктивном процессе необходимо рассматривать как один из наиболее значимых сублетальных последствий загрязнения окружающей.

5.2 Прямые и отдаленные эффекты радиочастотного излучения у инфузорий *S. ambiguum*

5.2.1 Радиационно-индуцированные изменение двигательной активности

В приведенной в данной главе серии экспериментов инфузорий облучали в ЭМП по схеме, описанной в гл. 4.2.3. Для каждой контрольной и опытной групп, подвергшихся воздействию НИ РЧ-ЭМП в разных дозах, сначала оценивали значимость отличий между повторами опытов. Так как во всех группах двигательная активность спиростом существенно не отличалась (критерий Крускала-Уоллиса, $0,09 < P < 0,99$), мы объединили данные, полученные в каждой повторности. Во всех экспериментах подвижность инфузорий в контроле измеряли наряду с облученными инфузориями в начале и в конце каждого опыта (рис. 27). Учитывая, что во всех контрольных группах двигательная активность спиростом существенно не отличалась, мы пришли к выводу, что эффект сопутствующих факторов на подвижность был не значимым.

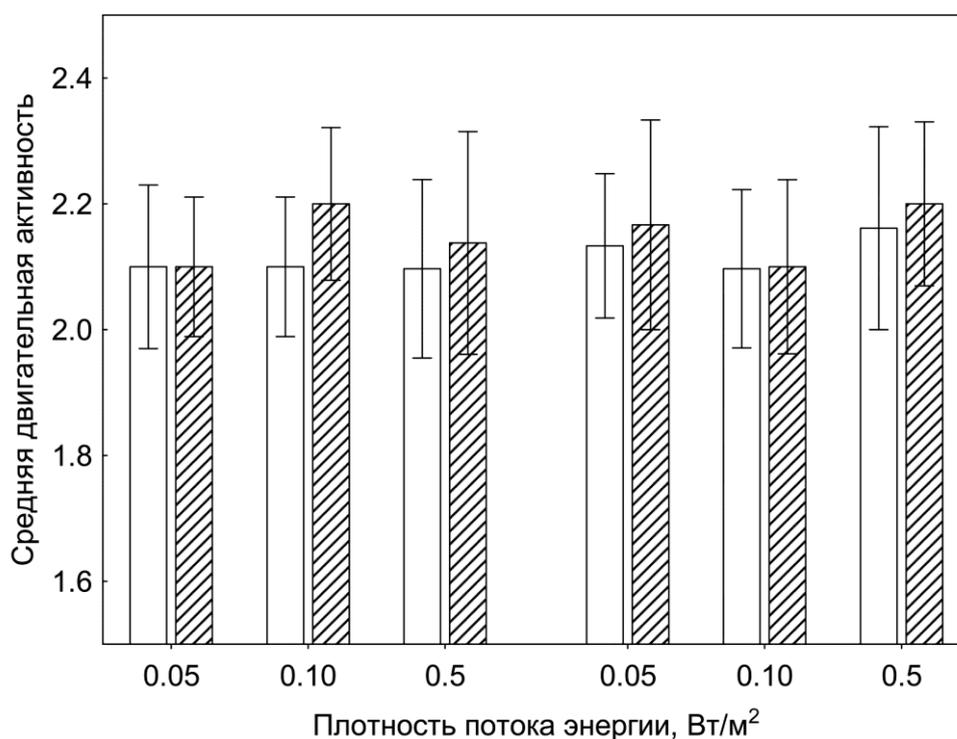


Рис. 27 – Средние значения двигательной активности спиростом в контрольных группах в начале (светлые значки) и в конце (темные значки) экспериментов. Критерий Крускала-Уоллиса для всех сравнений $0,51 < p < 0,98$.

Усы ошибки показывают стандартное отклонение от среднего для трех независимых экспериментов

Биологические эффекты РЧ-ЭМП с частотой 1 ГГц. Здесь мы проанализировали последствия РЧ-облучения с частотой 1 ГГц и тремя разными плотностями потока энергии (ППЭ) на подвижность инфузорий, в том числе $0,1 \text{ Вт/м}^2$, что соответствует максимально допустимому уровню РЧ-воздействия ЭМП в России [СанПин, 2003]. Было обнаружено значимое снижение подвижности инфузорий в результате воздействия при всех плотностях потока энергии (табл. 17).

Таблица 17 – Эффекты действия низкоинтенсивного радиочастотного излучения с частотой 1 ГГц на изменение двигательную активность инфузории *S. ambiguum*

Доза, Дж/м ² (время, ч)	N*	M ± m	p ⁺
0.05 Вт/м²			
0 (контроль)	60 (3)	2.10 ± 0.08	-
900 (5)	60 (3)	1.85 ± 0.11	0.3390
1260 (7)	60 (3)	2.10 ± 0.10	1
1440 (8)	60 (3)	1.20 ± 0.10	3.22 x 10 ⁻⁸
1620 (9)	60 (3)	1.12 ± 0.11	7.64 x 10 ⁻⁹
1800 (10)	60 (3)	1.15 ± 0.11	1.76 x 10 ⁻⁸
0.1 Вт/м²			
0 (контроль)	60 (3)	2.15 ± 0.08	-
90 (0.25)	60 (3)	2.08 ± 0.09	1
180 (0.5)	60 (3)	2.02 ± 0.10	1
270 (0.75)	60 (3)	1.15 ± 0.11	1.78 x 10 ⁻⁹
360 (1)	60 (3)	1.18 ± 0.08	6.07 x 10 ⁻¹¹
720 (2)	60 (3)	1.23 ± 0.11	1.12 x 10 ⁻⁷
1080 (3)	60 (3)	1.15 ± 0.10	1.09 x 10 ⁻⁹
1440 (4)	60 (3)	1.10 ± 0.10	2.22 x 10 ⁻¹⁰
2160 (6)	20 (1)	1.20 ± 0.19	0.0001
2880 (8)	20 (1)	1.25 ± 0.14	4.28 x 10 ⁻⁵
3600 (10)	20 (1)	1.15 ± 0.21	0.0002
0.5 Вт/м²			
0 (контроль)	60 (3)	2.12 ± 0.11	-
90 (0.05)	40 (2)	2.05 ± 0.13	1
150 (0.08)	60 (3)	2.10 ± 0.11	1
300 (0.17)	60 (3)	1.15 ± 0.10	1.15 x 10 ⁻⁷

Продолжение табл. 17			
600 (0.33)	60 (3)	1.10 ± 0.11	3.16 x 10 ⁻⁷
900 (0.5)	60 (3)	1.17 ± 0.11	1.69 x 10 ⁻⁶
1350 (0.75)	20 (1)	1.15 ± 0.22	0.0021
1800 (1)	20 (1)	1.05 ± 0.15	5.92 x 10 ⁻⁵

* Количество независимых серий опытов.

† Вероятность отличий от контроля, тест Манна-Уитни

Анализ кривых доза-эффект (рис. 28 а) показал, что доза примерно 300 Дж/м², поданная с относительно высокой ППЭ (0,1 и 0,5 Вт/м²), привела к значимому снижению двигательной активности спиростом.

Вероятность отличий показателя подвижности от контроля по тесту Манна-Уитни составила $P = 1,78 \cdot 10^{-9}$ и $P = 1,15 \cdot 10^{-7}$ соответственно для ППЭ 0,1 и 0,5 Вт/м². В отличие от этого, действие ЭМП с более низкой ППЭ 0,05 Вт/м² изменяло двигательную активность простейших только при значительно более высокой пороговой дозе 1400 Дж/м² ($P = 3,22 \cdot 10^{-8}$). После достижения пороговой дозы, уровень двигательной активности на кривой «доза-эффект» имел нелинейную зависимость от дозы для всех исследуемых значений ППЭ (критерий Крускала-Уоллиса для всех сравнений $P = 0,1282$).

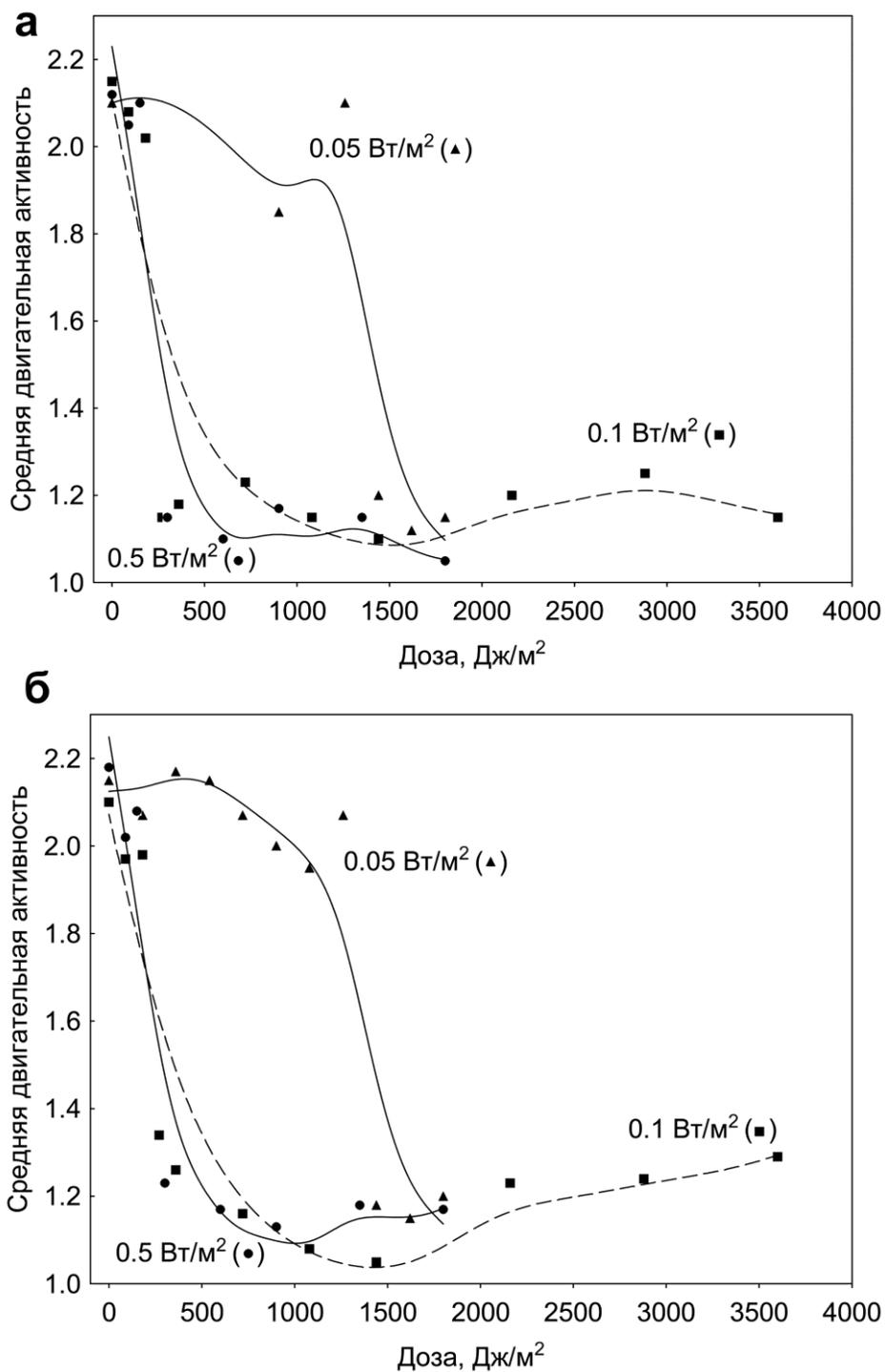


Рис. 28 – Кривые доза-эффект для последствий РЧ-ЭМП с частотой 1 ГГц (а) и 10 ГГц (б) на подвижность инфузорий. Количество спиростом в каждой дозе вместе со значениями стандартной ошибки среднего приведены в табл. 17 и 18

Биологические эффекты действия РЧ-ЭМП с частотой 10 ГГц. Табл. 18 суммирует последствия действия низкоинтенсивного радиочастотного поля с частотой 10 ГГц на двигательную активность инфузорий.

Таблица 18 – Эффекты действия радиочастотного ЭМП с частотой 10 ГГц на изменение двигательной активности *S. ambiguum*

Доза, Дж/м ² (время, ч)	N*	$M \pm m$	p^+
0.05 Вт/м²			
0 (контроль)	60 (3)	2.15 ± 0.10	-
180 (1)	60 (3)	2.07 ± 0.13	1
360 (2)	60 (3)	2.17 ± 0.14	1
540 (3)	60 (3)	2.15 ± 0.11	1
720 (4)	60 (3)	2.07 ± 0.08	1
900 (5)	40 (2)	2.00 ± 0.13	1
1080 (6)	60 (3)	1.95 ± 0.11	1
1260 (7)	40 (2)	2.07 ± 0.15	1
1440 (8)	60 (3)	1.18 ± 0.12	8.42 x 10 ⁻⁷
1620 (9)	60 (3)	1.15 ± 0.10	1.47 x 10 ⁻⁸
1800 (10)	60 (3)	1.20 ± 0.13	4.48 x 10 ⁻⁶
0.1 Вт/м²			
0 (контроль)	61 (3)	2.10 ± 0.09	-
90 (0.25)	61 (3)	1.97 ± 0.10	1
180 (0.5)	61 (3)	1.98 ± 0.08	1
270 (0.75)	61 (3)	1.34 ± 0.08	7.76 x 10 ⁻⁷
360 (1)	61 (3)	1.26 ± 0.08	5.35 x 10 ⁻⁸
720 (2)	61 (3)	1.16 ± 0.10	1.72 x 10 ⁻⁸
1080 (3)	61 (3)	1.08 ± 0.08	1.03 x 10 ⁻¹⁰

Продолжение табл. 18			
1440 (4)	61 (3)	1.05 ± 0.06	2.50 × 10 ⁻¹³
2160 (6)	61 (1)	1.23 ± 0.08	1.35 × 10 ⁻⁸
2880 (8)	61 (1)	1.24 ± 0.09	6.16 × 10 ⁻⁸
3600 (10)	59 (1)	1.29 ± 0.09	4.93 × 10 ⁻⁷
0.5 Вт/м ²			
0 (контроль)	60 (3)	2.18 ± 0.10	-
90 (0.05)	60 (3)	2.02 ± 0.12	1
150 (0.08)	60 (3)	2.08 ± 0.10	1
300 (0.17)	60 (3)	1.23 ± 0.11	3.24 × 10 ⁻⁷
600 (0.33)	60 (3)	1.17 ± 0.10	2.04 × 10 ⁻⁸
900 (0.5)	40 (2)	1.13 ± 0.12	4.23 × 10 ⁻⁷
1350 (0.75)	40 (2)	1.18 ± 0.12	1.39 × 10 ⁻⁶
1800 (1)	60 (3)	1.17 ± 0.13	7.43 × 10 ⁻⁷

* Количество независимых серий экспериментов.

+ вероятность отличия от контроля, Манна-Уитни-тест

Как и при облучении с частотой 1 ГГц, значительное снижение двигательной активности было обнаружено при всех использованных уровнях ППЭ. Полученные кривые доза-эффект (рис. 28 б) также были очень похожи на те, что описывают РЧ-ЭМ воздействие с частотой 1 ГГц. Таким образом, относительно высокая ППЭ (0,1 и 0,5 Вт/м²) с экспозицией до примерно 300 Дж/м² в равной степени снижает подвижность инфузорий, тогда как такое же примерно 50% снижение подвижности после воздействия с ППЭ 0,05 Вт/м² наблюдается при гораздо более высокой дозе. При этом величина снижения двигательной активности простейших была одинаковой в широком диапазоне доз.

Сохранение эффекта действия РЧ-ЭМП с частотой 10 ГГц в поколениях ИНФУЗОРИЙ. Чтобы установить, будут ли эффекты радиочастотного воздействия сохраняться у потомства облученных инфузорий, двигательную активность измеряли на 4, 14, 21 и 30 сут после нахождения исходной выборки в РЧ-ЭМП с ППЭ 0,1 Вт/м² (табл. 19).

Таблица 19 – Радиационно-индуцированный эффект радиочастотного воздействия на исходную выборку инфузорий *S. ambigua* на частоте 10 ГГц с ППЭ 0,1 Вт/м² по изменению двигательной активности

Доза, Дж/м ² (время, ч)	N*	$M \pm m$	p^+
4 сутки			
0 (контроль)	60 (3)	2.10 ± 0.09	-
360 (1)	60 (3)	1.28 ± 0.09	3.16 x 10 ⁻⁷
720 (2)	60 (3)	1.18 ± 0.10	1.60 x 10 ⁻⁷
1080 (3)	60 (3)	1.12 ± 0.10	1.21 x 10 ⁻⁸
1440 (4)	60 (3)	1.10 ± 0.09	6.11 x 10 ⁻⁹
2160 (6)	60 (3)	1.20 ± 0.10	2.94 x 10 ⁻⁷
2880 (8)	60 (3)	1.17 ± 0.08	6.65 x 10 ⁻⁹
3600 (10)	60 (3)	1.15 ± 0.08	5.73 x 10 ⁻⁹
14 сутки			
0 (контроль)	60 (3)	2.07 ± 0.10	-
360 (1)	60 (3)	1.22 ± 0.11	1.37 x 10 ⁻⁵
720 (2)	60 (3)	1.15 ± 0.11	1.06 x 10 ⁻⁶
1080 (3)	60 (3)	1.12 ± 0.12	3.03 x 10 ⁻⁶
1440 (4)	60 (3)	1.12 ± 0.11	9.98 x 10 ⁻⁷
2160 (6)	60 (3)	1.13 ± 0.13	5.69 x 10 ⁻⁶
2880 (8)	60 (3)	1.10 ± 0.12	8.71 x 10 ⁻⁷
3600 (10)	60 (3)	1.18 ± 0.10	1.94 x 10 ⁻⁶

21 сутки			
0 (контроль)	60 (3)	2.13 ± 0.12	
360 (1)	60 (3)	1.20 ± 0.10	4.18 x 10 ⁻⁷
720 (2)	60 (3)	1.05 ± 0.09	4.89 x 10 ⁻⁹
1080 (3)	60 (3)	1.15 ± 0.08	2.54 x 10 ⁻⁸
1440 (4)	60 (3)	1.10 ± 0.09	2.35 x 10 ⁻⁸
2160 (6)	60 (3)	1.30 ± 0.10	3.32 x 10 ⁻⁶
2880 (8)	60 (3)	1.22 ± 0.10	3.71 x 10 ⁻⁷
3600 (10)	60 (3)	1.08 ± 0.09	1.41 x 10 ⁻⁸
30 сутки			
0 (контроль)	60 (3)	2.20 ± 0.09	
360 (1)	60 (3)	1.47 ± 0.10	1.09 x 10 ⁻⁵
720 (2)	60 (3)	1.50 ± 0.11	6.55 x 10 ⁻⁵
1080 (3)	60 (3)	1.37 ± 0.10	5.62 x 10 ⁻⁷
1440 (4)	60 (3)	1.27 ± 0.09	1.51 x 10 ⁻⁸
2160 (6)	60 (3)	1.42 ± 0.12	2.22 x 10 ⁻⁵
2880 (8)	60 (3)	1.40 ± 0.10	1.61 x 10 ⁻⁶
3600 (10)	60 (3)	1.35 ± 0.10	5.36 x 10 ⁻⁷

* Количество независимых экспериментов.

+ Вероятность отличий от контроля, Манна-Уитни-тест

Поскольку продолжительность клеточного цикла у *Spirostomum* приблизительно 2 – 3 сут [Wichterman, 1986], анализировали долгосрочные последствия облучения как минимум в 10 – 15 поколениях (рис. 29). При всех исследуемых дозах эффекты были сходными как у непосредственно облученной выборки инфузорий, так и у их потомства (критерий Крускала-Уоллиса, $0,06 < p < 0,55$). Следовательно,

эффект облучения длительно сохранялся при вегетативном размножении простейших.

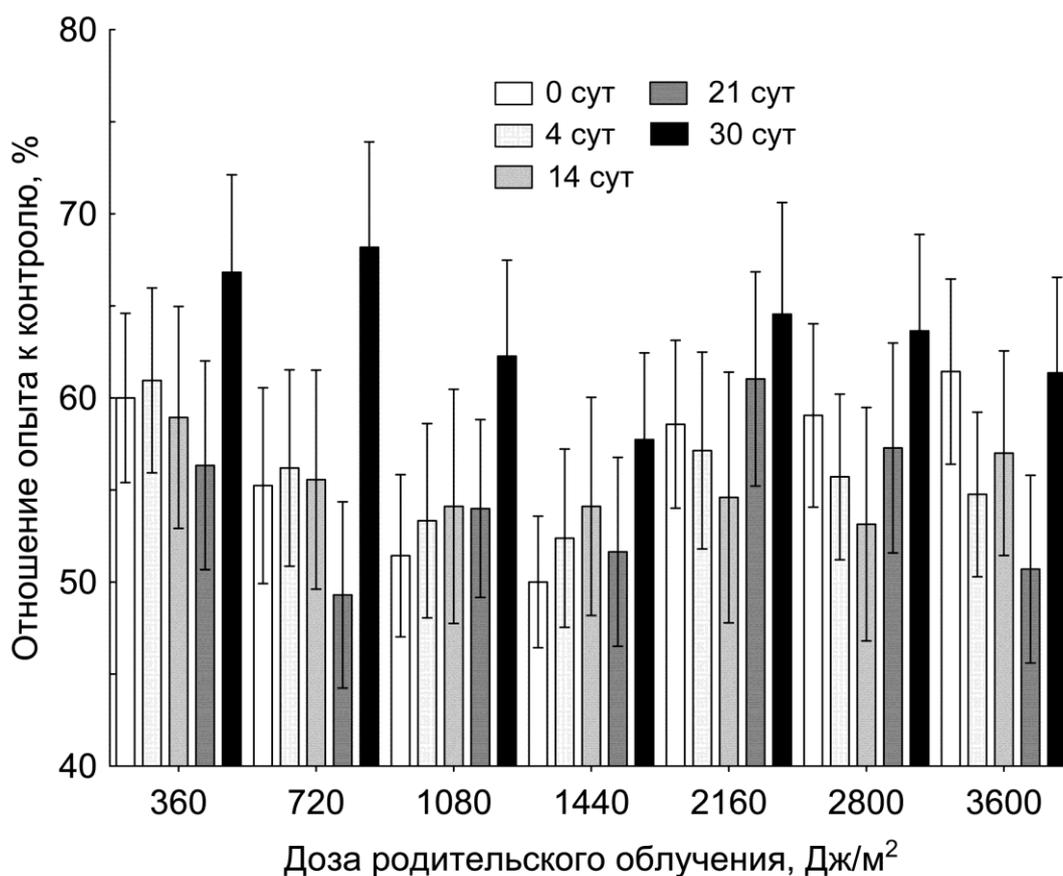


Рис. 29 – Зависимость изменения двигательной активности инфузорий от дозы облучения исходной выборки в электромагнитном поле на частоте 10 ГГц с плотностью потока энергии 0,1 Вт/м². Приведены средние величины в % относительно контроля со стандартными отклонениями, $n = 60$. Отличия между дозовыми группами на всех временных точках $0,06 < P < 0,55$

Анализ изменения двигательной активности показал, что величина функциональных изменений у облученных в низкоинтенсивном радиочастотном поле *Spirostomum* имеет нелинейную зависимость от дозы с порогом в области низких для инфузорий доз и дозозависимым плато. Обнаруженные у непосредственно облученных в радиоча-

стотном поле особей изменения двигательной активности сохраняются у потомства как минимум в 10 – 15 поколениях простейших.

Результаты исследования также показали, что облучение с низкой плотностью потока энергии ($0,05 \text{ Вт/м}^2$) снижает подвижность инфузорий при значительно более высоких дозах (более 1400 Дж/м^2), чем действие ЭМП с более высокими плотностями потока энергии. Это согласуется с данными по хроническому действию излучения. Например, в [Russell, Kelly, 1982] было показано, что γ -облучение с низкой мощностью дозы приводит к образованию меньшего числа мутаций в половых клетках мышей, чем при остром облучении в этих дозах.

Важным выводом из анализа изменения двигательной активности инфузорий в РЧ-ЭМП с ППЭ $0,05$, $0,1$ и $0,5 \text{ Вт/м}^2$ является то, что кривая «доза – эффект» имеет нелинейный характер (рис. 28 и 29). Сходные по характеру проявления эффектов РЧ-воздействия ЭМП в диапазоне исследуемых нами частот описаны в обзоре [Belyaev, 2010] на разных объектах, включая человека. Автор обзора пришел к выводу, что биологические эффекты имеют сигмовидную зависимость и часто достигают плато при пороговых дозах.

Анализ отдаленных эффектов электромагнитного воздействия на инфузорий показал, что подвижность клеток, не подвергавшихся прямому облучению, длительно остается сниженной. Следует отметить, что значимые изменения в подвижности инфузорий были обнаружены нами в результате действия довольно низких доз РЧ-ЭМП с ППЭ $0,05 \text{ Вт/м}^2$, соответствующих значению $\text{SAR} = 22 \text{ мВт/кг}$ для 900 МГц . Поскольку эти значения ППЭ находятся в пределах максимально допустимых уровней воздействия ЭМП на человека, рекомендуемых в России [СанПин, 2003], наши данные, таким образом, показывают, что одноклеточные простейшие инфузории *S. ambigua* представляют собой полезную модель для анализа последствий облучения в РЧ-ЭМП.

Использованный в данной работе экспресс-метод изучения двигательной активности инфузорий *S. ambigum* может быть предложен для целей ранней диагностики радиационного воздействия на организм.

5.2.2 Морфометрические изменения у простейших

Подобно результатам, полученным после γ -облучения, у инфузорий *S. ambiguum*, длительно находящихся в ЭМП с частотой сотовой связи (1 ГГц) и плотностью потока энергии $0,5 \text{ Вт/м}^2$, обнаружены морфометрические нарушения. В табл. 20 представлены данные, проанализированные методом прижизненной компьютерной морфометрии по параметрам Aspect, максимальный диаметр, периметр и Roundness, описанным в гл. 4.3.1, через сутки после облучения инфузорий в ЭМП.

Таблица 20 – Морфометрические изменения у инфузорий *S. ambiguum* после нахождения в низкоинтенсивном электромагнитном поле с частотой 1 ГГц и плотностью потока энергии $0,5 \text{ Вт/м}^2$

Доза облучения, Дж/м ² (экспозиция, ч)	0 (Контроль)	900 (0,5)	1800 (1)	10800 (6)
ASPECT				
Количество инфузорий в выборке, <i>N</i>	50	50	50	50
Среднее значение параметра с <i>SE</i>	7.43±0.59	5.48±0.34	6.67±0.27	6.53±0.34
Значения теста Крускала-Уоллиса	12.2085			
<i>p</i>	0.0067			
Диаметр				
Количество инфузорий в выборке, <i>N</i>	50	50	50	50
Среднее значение параметра с <i>SE</i>	0.44±0.02	0.37±0.02	0.35±0.02	0.35±0.02

Продолжение табл. 20				
Значения теста Крускала-Уоллиса	19.54			
p	0.0002			
Периметр				
Количество инфузорий в выборке, N	50	50	50	50
Среднее значение параметра с SE	1.03±0.03	0.92±0.05	0.83±0.04	0.78±0.04
Значения теста Крускала-Уоллиса	26.91			
p	6.17·10 ⁻⁶			
ROUNDNESS				
Количество инфузорий в выборке, N	50	50	50	50
Среднее значение параметра с SE	4.21±0.22	3.85±0.26	3.62±0.18	3.18±0.12
Значения теста Крускала-Уоллиса	15.11			
p	0.0017			
Фактор 1				
Анализируемая выборка, N	50	50	50	50
Средние значения с SE	-0.92±0.18	-0.18±0.25	0.19±0.20	0.92±0.19
ANOVA, F (3, 196)	13.54			
p	0.00			
Фактор 2				
Анализируемая выборка, N	50	50	50	50
Средние значения с SE	0.57±0.04	0.55±0.06	0.42±0.05	-1.54±0.05
ANOVA, F (3, 196)	441.58			
p	0.00			
Фактор 3				
Анализируемая выборка, N	50	50	50	50
Средние значения с SE	0.15±0.12	-0.04±0.11	-0.05±0.08	-0.05±0.06
ANOVA, F (3, 196)	1.14			
p	0.33			

В соответствии с имеющимися данными [Ускалова и др., 2013], параметр Aspect, который в норме варьирует в диапазоне 7,5 – 14 у. е. и характеризует изменение соотношения максимального и минимального диаметров тела простейших, т.е. оценивает степень «вытянутости» инфузорий. В проведенном исследовании значение этого показателя в контрольных выборках составляло $7,43 \pm 0,59$ у. е., т.е. было в пределах нормы. Согласно полученным данным, после облучения инфузорий в дозе 900 Дж/м^2 , соответствующей 30-минутной экспозиции в ЭМП, этот показатель снизился и оставался значимо ниже значений в контрольной группе при увеличении экспозиции до 60 и 360 мин, что соответствует дозам облучения 1800 и $10\ 800 \text{ Дж/м}^2$. Диаметр в норме варьирует от 0,45 до 0,55 у.е. [Ускалова и др., 2013], что соответствовало значениям этого параметра в данном исследовании ($0,44 \pm 0,02$ у. е.). Как показано в таблице, после облучения в исследуемых дозах, показатель значимо снизился. Периметр у инфузорий в норме составляет величину, превышающую 1,0 у. е. [Ускалова и др., 2013]. После облучения инфузорий, этот показатель значимо снизился. Параметр Roundness, характеризующий степень отклонение формы тела от окружности, в норме изменяется в пределах 4,0 – 4,5 у. е. [Ускалова и др., 2013], после облучения его значения составили $3,85 \pm 0,26$; $3,62 \pm 0,18$ и $3,18 \pm 0,12$ у. е. соответственно для экспозиций 30, 60 и 360 мин. Таким образом, нами обнаружены изменения у облученных инфузорий, проявляющиеся в нарушении формы их тела (рис. 30).

Поскольку между рядом рассматриваемых признаков выявлена сильная корреляция, дальнейший анализ проводился с использованием метода главных компонент. На рис. 31 приведены средние значения проекций изучаемых дозовых групп (экспозиций) на первые три главные компоненты (табл. 20).

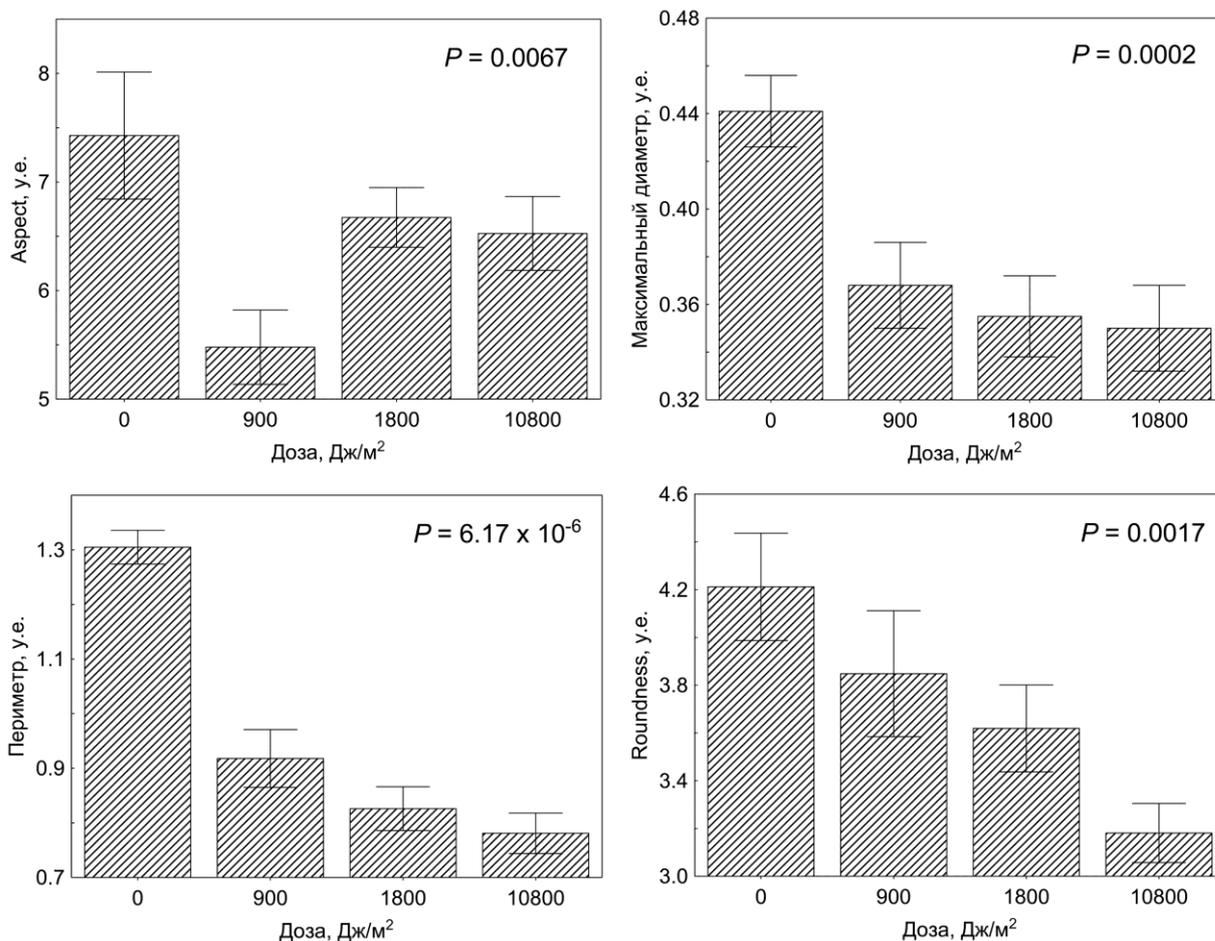


Рис. 30 – Изменения средних значений морфометрических показателей у контрольных и облученных в низкоинтенсивном радиочастотном поле сотовой связи (1 ГГц, 0,5 Вт/м²) *S. ambiguum*. На графиках приведены средние значения со стандартными ошибками и вероятности (P) непараметрического теста Крускала-Уоллиса

На рисунка 31 видно, что имеется четкая дифференциация всех групп облученных инфузорий, что еще раз свидетельствует о достоверном влиянии ЭМП на изученные морфометрические параметры.

Из рис. 28 а и 30 видно, что морфометрические нарушения у инфузорий коррелируют со снижением подвижности у этих простейших при облучении в аналогичном режиме, т.е. отражают индуцированные низкоинтенсивным радиочастотным излучением физиологические изменения у *S. ambiguum*.

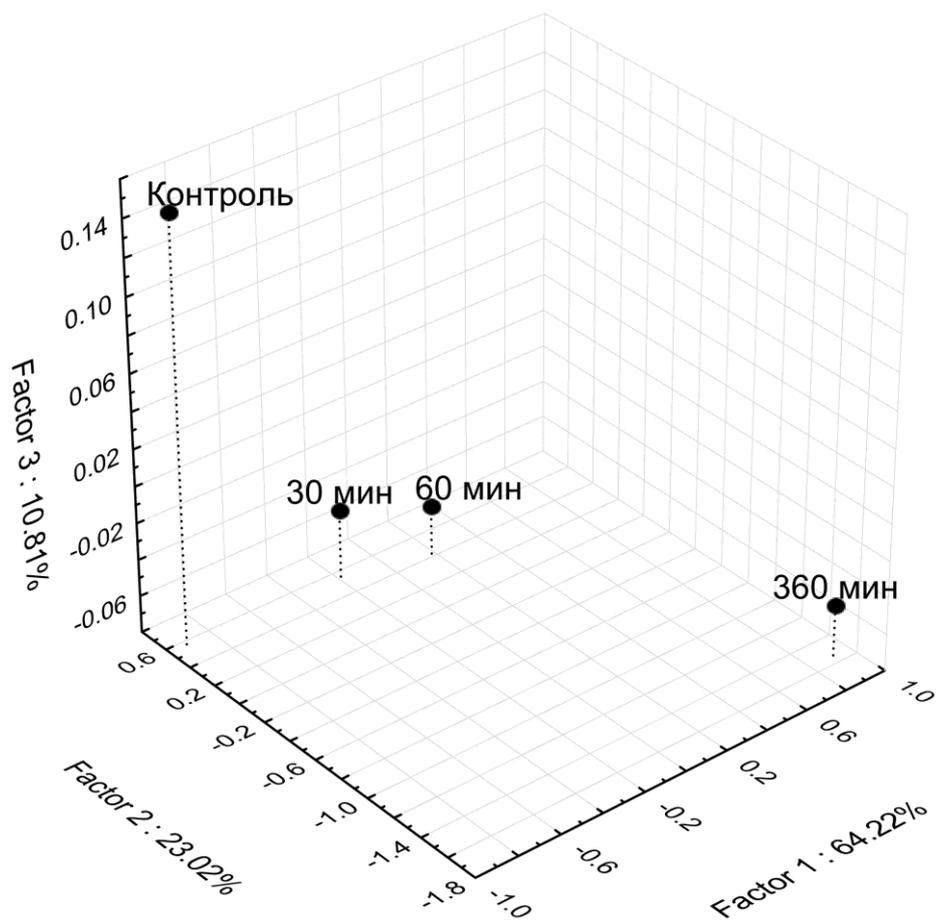


Рис. 31 – Морфофункциональные нарушения у инфузории *S.ambigua* в ЭМП сотовой связи в зависимости от экспозиции, выявленные методом главных компонент

Полученные результаты показывают, что метод прижизненной компьютерной морфометрии на простейших может быть предложен для ранней диагностики повреждающих уровней ЭМИ, которые могут вызвать нарушение морфометрии клеток и, как следствие, снижение их подвижности. Данный показатель может быть применен в биологическом мониторинге в качестве дополнительного биомаркера радиационного воздействия на организм.

5.3. Анализ прямых и отдаленных радиационно-индуцированных биохимических эффектов у ракообразных

Известно, что митохондриальные ДНК и белки электрон-транспортной цепи и цикла Кребса, в первую очередь, митохондриальные дегидрогеназы, являются одними из самых часто повреждаемых макромолекул клетки в условиях нормального метаболизма, т.к. именно в митохондриях генерируется основная масса АТФ. Имеются данные, что накопление повреждений мтДНК и белков и развитие их дисфункций приводит к сокращению продолжительности жизни и преждевременному старению облученных мышей [Loed, Wallace, Martin, 2005]. Образование свободных радикалов, в частности, активных форм кислорода (АФК), является одним из возможных последствий косвенного действия радиации на живой организм. Потенциальная опасность АФК заключается в их способности вызывать перекисное окисление важнейших органических макромолекул – липидов, белков, нуклеиновых кислот. Это приводит к изменению функционирования мембран и других клеточных структур, нарушению экспрессии генов и, как следствие, развитию целого ряда патологий, в том числе, раннему старению. АФК в больших количествах образуются в процессах клеточное дыхание и фотосинтеза. Однако в нормально функционирующих клетках они быстро нейтрализуются компонентами антиоксидантной ферментной системы организма. При интенсивном действии стрессорного фактора уровень АФК значительно повышается и антиоксидантная система организма не справляется.

Применяемые в настоящее время методы тестирования химических препаратов и ряда лекарственных средств дают возможность оценить изменения процессов клеточного метаболизма, в том числе генерации активных форм кислорода (АФК), структуры ДНК, определить жизнеспособность и пролиферативную активность тестируемых

клеток [Iwahashi et al., 2005; Bopp, Lettieri, 2008; Repetto, del Peso, Zurita, 2008; Shaukat, Harald, Michael, 2011]. Из литературы известны методы оценки цитотоксичности радиационного воздействия по изменению проницаемости клеточных мембран к разным красителям, биохимические методы определения активности лактатдегидрогеназы, флуоресцентные методы оценки целостности митохондрий, синтеза АТФ, генерации АФК и радикальных продуктов перекисидации липидов [O'Dowd et al., 2009; Wu, Zhou, 2012].

5.3.1 Изменения биохимических процессов у ракообразных в нескольких поколениях

Для изучения токсического действия радиации был впервые применен клеточный МТТ-тест на ракообразных *D. magna* (гл. 4.4.1). Были проанализированы радиационно-индуцированные эффекты у облученных в дозах 10, 100, 1000 и 10 000 мГр дафний и их необлученного потомства из поколения F_1 и F_2 . Количество исследованных образцов в каждой дозовой и контрольной группах составило от 19 до 87. В каждом образце было по 50 дафний. Проверка значений МТТ-теста в контрольных выборках в трех поколениях показала их гомогенность (тест Крускала-Уоллиса: 3.47, $N=144$, $p=0,06$, χ^2 (1 df). Это позволило в дальнейшем использовать объединенный контроль.

В таблице 21 приведены результаты двухфакторного дисперсионного анализа для оценки вклад фактора облучения и разницы значений МТТ-теста в поколениях F_0 и F_1 в наблюдаемый у дафний биохимический эффект. Из таблицы видно, что γ -облучение оказывает сильный токсический эффект как на исходную выборку, так и на потомство облученных дафний из поколения F_1 .

Таблица 21 – Результаты двухфакторного дисперсионного анализа результатов МТТ–теста у γ -облученных *D. magna* и их потомства

Фактор	F (df) [*]	P [†]
Облучение	50.73 (4, 470)	1.27×10^{-11}
Поколение	3.79 (1, 470)	0.0521
Взаимодействие	4.09 (4, 470)	0.0029

* Значение критерия Фишера и число степеней свободы (df).

† Вероятность.

При этом между эффектами в непосредственно облученном поколении и эффектами, полученными у потомства дафний, также существуют значимые различия.

В таблице 22 приведены данные по изменению оптической плотности в образцах дафний, демонстрирующие нарушение активности митохондриальных дегидрогеназ в клетках *D. magna* в контроле и после облучения γ -квантами в поколениях F_0 , F_1 и F_2 .

Таблица 22 – Изменение оптической плотности в образцах *D. magna* в поколениях F_0 , F_1 и F_2 после острого γ -облучения исходной выборки

Доза, мГр	0	10	100	1000	10000
Поколение F_0					
Анализируемая выборка, N	52	43	53	40	20
$M \pm SE$	$0.23 \pm 0,007$	$0.21 \pm 0,015$	$0.13 \pm 0,008$	$0.12 \pm 0,007$	$0.11 \pm 0,015$
Значения теста Крускала-Уоллиса, $df=4$		$N=208$	80.04	$P=9.99 \times 10^{-16}$	
Значения теста Крускала-Уоллиса, $df=1$					
N		95	105	92	72
† Значения теста Крускала-Уоллиса		1.11	46.86	51.999	33.45
* P		0.2918	$7.64 \cdot 10^{-12}$	$5.55 \cdot 10^{-13}$	$7.33 \cdot 10^{-9}$
Бонферрони		1	$3.06 \cdot 10^{-11}$	$2.22 \cdot 10^{-12}$	$2.93 \cdot 10^{-8}$

Поколение F_1					
N	42	67	43	49	19
$M \pm SE$	0.19±0,006	0.16±0,007	0.14±0,006	0.15±0,007	0.01±0,01
Значения теста Крускала-Уоллиса, $df=4$		$N=220$	75.81	$P=1.33 \cdot 10^{-15}$	
Значения теста Крускала-Уоллиса, $df=1$					
N		109	85	91	61
Значения теста Крускала-Уоллиса		16.94	27.68	21.33	38.62
P		$3.86 \cdot 10^{-5}$	$1.43 \cdot 10^{-7}$	$3.87 \cdot 10^{-6}$	$5.15 \cdot 10^{-10}$
Бонферрони		0.0002	$5.72 \cdot 10^{-7}$	$1.51 \cdot 10^{-5}$	$2.06 \cdot 10^{-9}$
Поколение F_2					
N	44	24	17	13	17
$M \pm SE$	0.22±0,01	0.21±0,01	0.21±0,02	0.17±0,03	0.16±0,02
Значения теста Крускала-Уоллиса, $df=4$		$N=115$	7.05	$P=0.13$	
Значения теста Крускала-Уоллиса, $df=1$					
N		68	61	57	61
Значения теста Крускала-Уоллиса		1.87	0.98	1.24	5.94
P		0.18	0.32	0.27	0.02
Бонферрони		0.691	1	1	0.062

M – среднее значение оптической плотности

SE – стандартная ошибка

N – количество проанализированных образцов

* Вероятность теста Крускала-Уоллиса для сравнения с контрольной группой с поправкой Бонферрони на множественное сравнение.

† Вероятность гомогенности всех групп, оцененная тестом Крускала-Уоллиса.

Из таблицы видно, что в образцах дафний из поколения F_0 наблюдается достоверное влияние облучения на активность митохондриальных дегидрогеназ, начиная с дозы 100 мГр. На рис. 32 показано, что оптическая плотность, отражающая изменения митохондриальной активности, в образцах облученных дафний ниже, чем в кон-

трольных выборках, за исключением выборки, облученной в дозе 10 мГр.

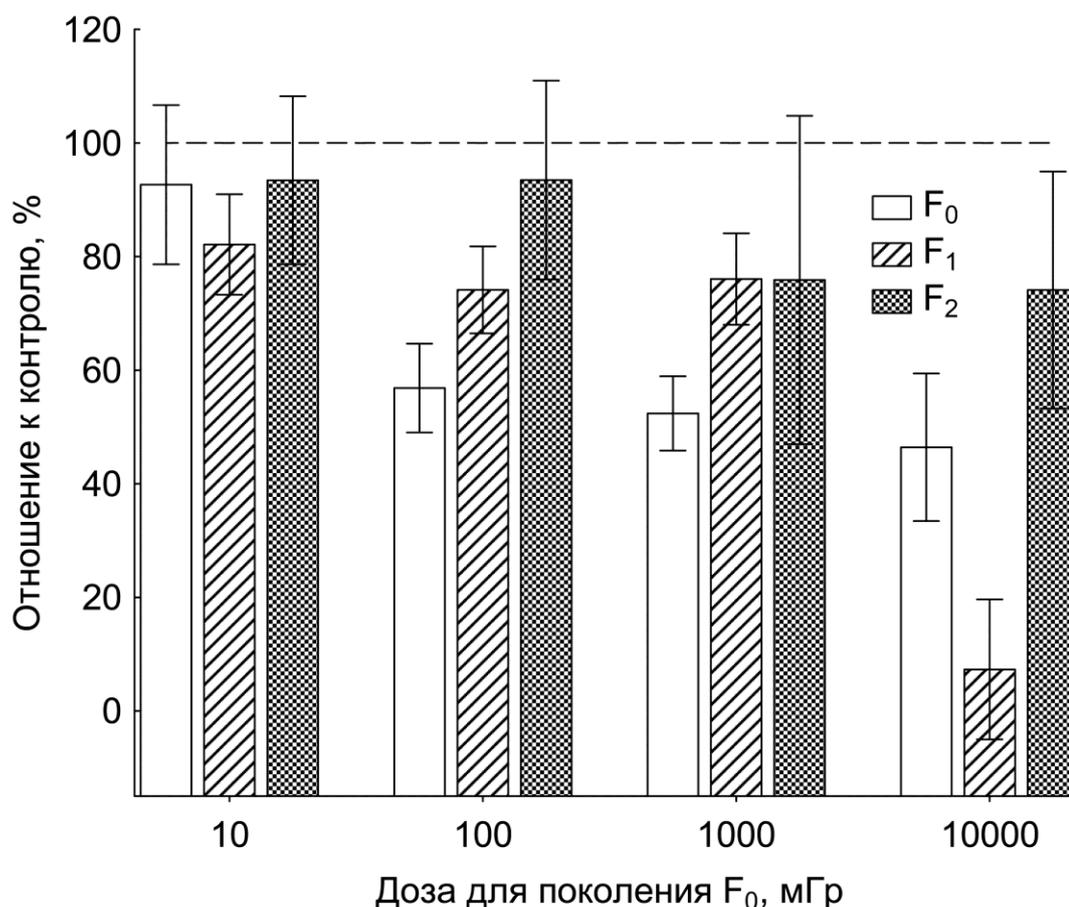


Рис. 32 – Динамика изменения радиационно-индуцированного биохимического эффекта у ракообразных *D. magna* в трех поколениях с увеличением дозы облучения исходной выборки от 10 до 10 000 мГр

В образцах из поколения F_1 , полученного от облученных дафний исходной группы, статистика для всех выборок также указывает на достоверное влияние облучения на биохимическую активность у дафний. Эффект имеет нелинейную зависимость от дозы облучения исходной выборки. В поколении F_2 статистически значимых отличий от контроля не выявлено ни в одной группе дафний.

Таким образом, МТТ-тестом показано, что облучение в дозах 100, 1000 и 10 000 мГр вызывает в клетках непосредственно облученных дафний и их потомства первого необлученного поколения токсический

эффект. При облучении дафний в дозе 10 мГр величина токсического эффекта относительно невелика. Видимо, часть клеток погибает, но на жизнеспособности особи это не отражается. Данное предположение основано на результатах исследования радиационно-индуцированных эффектов выживаемости и плодовитости дафний, проанализированных в гл. 5.1.2. Снижение выживаемости облученных дафний наблюдали лишь после воздействия в дозах 100 и более мГр. Известно, что реакция на облучение может быть связана с увеличением синтеза и расхода АТФ. После облучения в мембранах митохондрий под действием супероксиданион радикалов начинают развиваться деструктивные процессы, что приводит к снижению уровня ферментативной активности, общего уровня окислительного метаболизма, фосфорилирования, а так же общей патологии клеток [Мелехова, 2010; Мелехова и др., 2012] и сокращению продолжительности жизни дрозифилы [Зайнуллин и др., 2001; Москалев, 2013].

Таким образом, в проведенном исследовании обнаружено, что радиация является индуктором, вызывающим нарушение метаболических процессов у облученных дафний и у их потомства из поколения F_1 . Во втором поколении эффект нивелируется. Данные коррелируют с выживаемостью дафний.

5.3.2 Изменения свободнорадикальных процессов у ракообразных в нескольких поколениях

На рисунке 33 показано, что облучение дафний в дозах 100 и 1000 мГр значимо ($P = 0,049$) повышает уровень свободных радикалов (СР) по сравнению со спонтанным уровнем у дафний в контрольных выборках. Проведенный анализ гомогенности измеряемых показателей в каждой из контрольных групп дафний родительского и первого

поколения в разных повторах опытов показал отсутствие статистически достоверной разницы по тесту Крускала-Уоллиса ($0,09 < P < 0,99$).

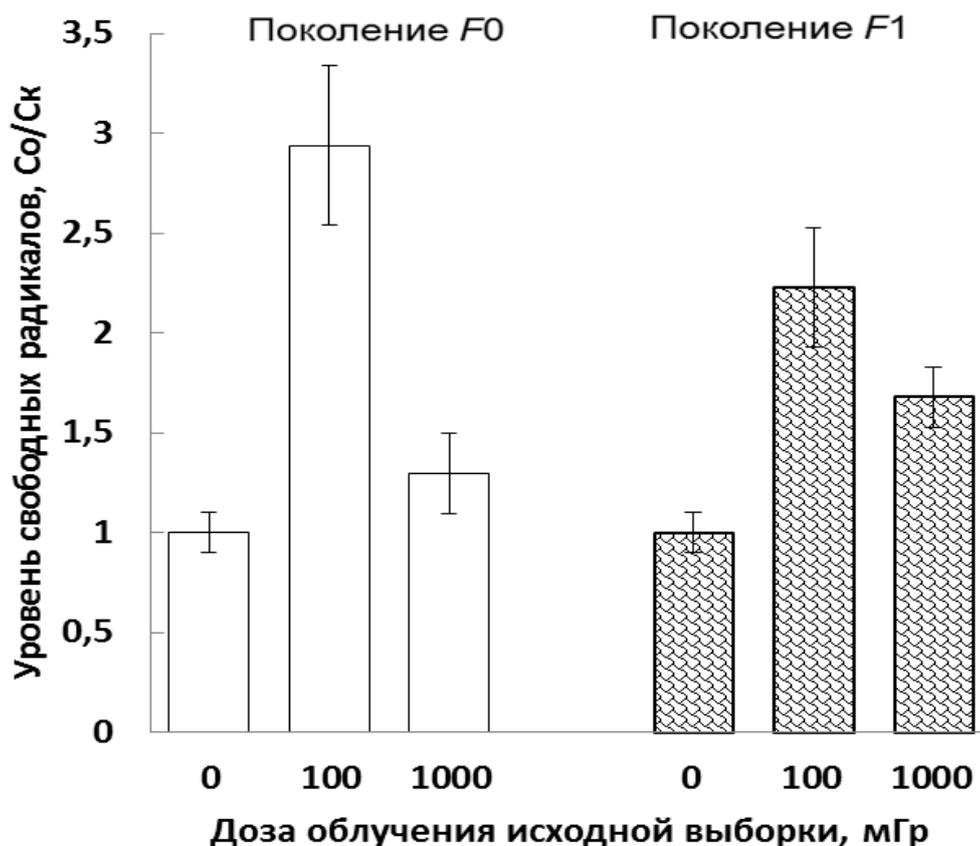


Рис. 33 – Радиационно-индуцированный эффект изменения уровня свободных радикалов в образцах из контрольных и облученных в дозах 100 и 1000 мГр групп дафний поколения F_1 и F_2 .

Это позволило объединить результаты, полученные в контрольных группах. Сравнение эффекта во всех облученных группах дафний обнаружило значимое повышение уровня свободных радикалов ($\chi^2 = 6,02$, $P = 0,05$). Попарные сравнения дозовых групп с контролем показали значимые отличия в группе, облученной в дозе 100 мГр ($\chi^2 = 4,50$, $P = 0,03$). Для дозовой группы 1000 мГр показатель χ^2 составил 2,00, а вероятность 0,16. На рисунке также видно, что в первом поколении, как и у непосредственно облученных дафний, различие с контролем всей выборки значимо ($\chi^2 = 6,71$, $P = 0,02$). Попарные сравнения с контролем обеих групп дафний, полученных от облученных в

дозах 100 и 1000 мГр родителей, показали значимые различия ($\chi^2 = 4,50, P = 0,03$).

В ряде работ показано, что концентрация СР в тканях коррелирует с функциональной активностью организма и является весьма чувствительным показателем различного рода повреждений клеток и тканей [Бурлакова и др., 2001; Бурлакова, Конрадов, Мальцева, 2003; Мелехова, 2010; Мелехова и др., 2012]. Поскольку все регуляторные явления в клетке и в организме в целом связаны с окислительным фосфорилированием, большое значение для выживания облученных дафний имеет тот факт, что стрессовые реакции в клетке/организме идут с образованием АФК, которые инициируют процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран и нарушают внутримембранные потоки энергии, связанные в митохондриях с синтезом АТФ. В нашем исследовании время измерения уровня СР у облученных дафний приходится на первую фазу окислительного стресса. Поэтому при облучении наблюдали повышение уровня СР у непосредственно облученных дафний. При облучении в дозе 1000 мГр уровень окислительного стресса возрастал и его скорость увеличивалась. Известно, что высокие уровни СР способны приводить к нарушению морфологических процессов [Мелехова, 2010], интерфазной гибели клеток [Рябченко и др., 2011] и, вероятно, быть причиной снижения выживаемости дафний.

Итак, исследование показало, что острое γ -облучение в дозах 100 и 1000 мГр вызывает повышение уровня СР у ракообразных *D. magna*. Нарушение СР-процессов, обнаруженное у облученных дафний, сохраняется у потомства поколения F_1 .

5.3.3 Эпигенетические изменения у ракообразных в нескольких поколениях

В обзорах [Jablonka, Lamb, 2003, 2008; Jablonka, Raz, 2009] указано на то, что связывающиеся с ДНК белки или дополнительные химические группы могут влиять на ее активность и изменять экспрессию генов. Одним из типов маркировки ДНК является паттерн метилирования генов. При этом низкий уровень метилирования связан с потенциальной активностью, а высокий – с ее отсутствием. Изменения в паттернах метилирования могут быть индуцированы факторами окружающей среды. Эти измененные паттерны могут устойчиво наследоваться в ряду многих клеточных делений. Эпигенетической наследственности отводится важная роль в эволюции [Jablonka, Raz, 2009; Dauer, Brooks, Hoel et al., 2010; Vandegehuchte, DeConinck, Vanderbrouck et al., 2010c; Merrifield, Kovalchuk, 2013].

В таблице 23 приведены результаты тотального анализа метилирования в образцах ДНК, выделенной у облученных дафний и потомства первого поколения по соотношению метилированных цитозиновых нуклеотидов к неметилированным гуаниновым нуклеотидам в динуклеотидах CpG. Как видно из представленных результатов, значимых отличий в метилировании ДНК не обнаружено ни в одной исследуемой группе.

Известно, что в ходе онтогенеза происходит не только реализация генетической программы развития, но и сложные многоуровневые процессы управления включением и выключением генов. Клетка в результате деления передает дочерним клеткам структурные изменения ДНК, которые определяют экспрессию генов и формирование эффекта [Гераськин, 1995]. Одним из механизмов нарушения экспрессии генов может быть изменение в структуре метилирования ДНК [Ting et al, 2006; Jablonka, Raz, 2009; Dauer, Brooks, Morgan et al., 2010]. Эпигене-

тические модификации представляют собой изменения хроматина, при которых последовательность оснований не затронута, а происходит метилирование ДНК, модификация гистонов и/или нарушение транскрипции за счет участия некодирующих молекул РНК [Яблонка, Лэмб, 2003]. Как известно, значительное количество цитозинов в геноме метилированы. Если такая эпигенетическая модификация происходит в промоторе, она может эффективно изменить экспрессию генов [Ting et al, 2006].

Таблица 23 – Соотношение метилированных цитозин-нуклеотидов (mdC) к неметилированным гуанин-нуклеотидам (dG) в образцах ДНК облученных дафний поколения F_0 и их потомства F_1

Доза, Гр	<i>n</i>	Среднее, % mdC/dG	Ошибка среднего, % mdC/dG
Родительское поколение F_0			
0 (Контроль)	5	0,24	0,11
0,01	4	0,21	0,06
0,1	4	0,25	0,12
1.0	6	0,30	0,14
50	4	0,21	0,03
Первое необлученное поколение F_1			
0 (Контроль)	3	0,21	0,08
0,01	4	0,32	0,05
0,1	3	0,20	0,02
1,0	3	0,28	0,18

В последние годы было показано, что эпигенетические модификации могут быть вызваны факторами окружающей среды

[Vandegehuchte et al., 2010 a, 2011; Mirbahai, Chipman, 2014], в том числе малыми дозами γ -квантов [Wang, Zhang, Xu et al., 2014] и передаваться по наследству [Jablonka, Raz, 2009; Vandegehuchte, De Coninck, Vandenbrouck et al., 2010 c; Daxinger, Whitelaw, 2013; Grossniklaus, Kelly, Ferguson-Smith et al., 2013; Little, Goodhead, Bridges et al., 2013]. Таким образом, если вызванные экологически значимым фактором эпигенетические изменения могут сохраняться в нескольких поколениях, значит, они могут формировать фенотипические реакции у не подвергшегося воздействию потомства, становиться важным источником наследственной изменчивости, и, следовательно, способствовать эволюционным изменениям [Jablonka, Lamb, 2008]. Это предположение имеет большое значение для прогнозирования рисков, в том числе, от радиационных воздействий, так как эпигенетические эффекты даже временных (острых) экспозиций могут повлиять на будущий статус структуры и функционирования экосистемы.

Экологическая геномика является новой сферой в токсикологических исследованиях, в которой для определения предельно допустимой экспозиции фактора в окружающей среде и анализа взаимодействия генотипа и среды изучают экспрессию генов у разных представителей биоты [Jayaraj, Bhattacharjee, Melendez et al., 2010]. В последние годы разработана и широко применяется технология микрочипирования для изучения молекулярных механизмов действия химических веществ на ряд экологически значимых организмов, таких как *D. magna* [Soetaert et al., 2007; Garcia-Reyero et al., 2009; Vandenbrouck et al., 2009, 2010 a]. Как считают в [Van Aggelen, Ankley, Baldwin et al., 2010], молекулярные исследования могут внести весомый вклад в процесс оценки рисков в водной токсикологии.

При анализе тотальной ДНК М. Vandegehuchte и др. (2010 c) обнаружил четыре дополнительных фрагмента сДНК, измененных под действием Zn. Это наблюдение не исключает возможность существо-

вания особых фрагментов в геноме ДНК, которые отвечают за экспрессию генов при радиационном воздействии. Поиск таких специфических фрагментов может стать отдельной задачей радиационно-молекулярных исследований на дафниях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ эффектов радиационного воздействия ионизирующей и неионизирующей природы на простейших и ракообразных выявил ряд закономерностей их формирования и методические возможности для применения инфузорий *Spirostomum ambiguum* и ракообразных *Daphnia magna* в качестве тест-организмов в биологическом мониторинге.

Обнаружено, что прямые и отдаленные радиационно-индуцированные эффекты у исследуемых простейших и ракообразных имеют нелинейную зависимость от дозы излучения, сохраняются в ряду поколений вегетативно делящихся простейших и в одном пострадавшем поколении дафний. Анализ литературы показал, что сопоставимые эффекты были обнаружены разными авторами у других видов простейших, дафний и прочих беспозвоночных гидробионтов. Принимая во внимание сведения из литературы и полученные в диссертации результаты экспериментальных исследований, можно унифицировать методологию биологического мониторинга с использованием *S. ambiguum* и *D. magna* для оценки радиационных эффектов у низших гидробионтов.

Проведенный анализ прямых и отдаленных биологических эффектов у инфузорий и ракообразных показал возможность индукции серьезных изменений в показателях жизнеспособности (выживаемости, продолжительности жизни и плодовитости) при остром воздействии на организм ионизирующего излучения с надфоновыми уровнями. Тем самым показана биологическая значимость радиационных воздействий в низких и средних дозах как фактора окружающей среды, требующего контроля в рамках экологического мониторинга.

Анализируя данные по выживаемости инфузорий *S. ambiguum* в индивидуальных линиях, мы пришли к заключению, что повреждения, полученные исходной выборкой инфузорий при облучении, могут передаваться бесконечно долго при вегетативном делении клеток (особей), вплоть до их гибели от радиационно-индуцированных повреждений. Однако, по всей видимости, не следует преувеличивать опасность облучения в низких дозах на инфузорию. Наблюдая за интенсивностью гибели инфузорий в индивидуальных линиях, мы анализировали динамику этого процесса, моделируя его в стандартных условиях лаборатории и создавая условия только для вегетативного размножения. При этом хорошо известно, что управляет жизнедеятельностью инфузории активно транскрибирующийся макронуклеус. В природных условиях инфузории способны переходить от вегетативного деления (которое длится значительное время существования популяции) к краткосрочному делению путем конъюгации. Это позволяет инфузориям при необходимости избавляться от поврежденного макронуклеуса и строит новое вегетативное ядро на генетическом материале микронуклеуса. При этом на «выброс» идут мобильные генетические элементы и некодирующие последовательности. Для изучения этого процесса на популяционном уровне требуются специальные эксперименты, которые в данном исследовании не проводились. Все вышесказанное подчеркивает фундаментальную значимость исследования выживаемости инфузорий *S. ambiguum* в индивидуальных линиях, но снижает практическую ценность анализа для целей биологического мониторинга радиационного загрязнения.

Однако, на инфузориях *S. ambiguum* прошел в данном исследовании успешную апробацию метод, анализирующий радиационно-индуцированные поведенческие изменения у этого вида простейших. Известные методы анализа изменения поведения, описанные в обзоре литературы, были весьма субъективны и, по мнению авторов этих

исследований, не подходили для однозначных оценок радиационных эффектов. Примененный нами метод «открытого поля», модифицированный для исследования изменения двигательной активности у *S. ambiguum*, позволил обнаружить радиационные эффекты облучения в дозах от 100 мГр. Нарушение двигательной активности коррелировало с морфометрическими изменениями, которые были зафиксированы методом прижизненной компьютерной морфометрии. Компьютерный метод прижизненной морфометрии и метод открытого поля были успешно применены для выявления радиационно-индуцированных эффектов от другого источника радиации – неионизирующего излучения в радиочастотном диапазоне сотовой связи и радаров военно-промышленного комплекса. Таким образом, анализ прямых и отдаленных эффектов изменения поведения и морфометрических показателей у инфузорий *S. ambiguum* может быть использован для ранней диагностики радиационного воздействия на организм.

У партеногенетически размножающихся ракообразных изучение радиационно-индуцированных биологических эффектов по экологически важным популяционным показателям – выживаемости, продолжительности жизни и плодовитости, позволили обнаружить диапазон доз, при которых происходило значимое снижение этих параметров в облученном (нулевом) поколении и в первом поколении, которое не облучали. Радиационно-индуцированный эффект исчезал во втором и третьем пострадиационных поколениях дафний. Эффект был сопоставим с данными по радиационно-индуцированному нарушению плодовитости, и с имеющимися в литературе сведениями о значительно более сильном влиянии γ -облучения на плодовитость, чем на выживаемость особей в хронических опытах.

Более детальный анализ компонентов общей плодовитости позволил заключить, что облучение в низких и средних дозах приводит к гибели половых и соматических клеток, что, в свою очередь, приводит

к повышенной частоте гибели дафний, снижению их плодовитости и нарушению плодовитости в первом поколении. Наблюдаемое во втором поколении F_2 восстановление показателей жизнеспособности в группах, в которых прародительницы были облучены в дозах 100 и 1000 мГр, указывает на возможность устранения из популяции генетических повреждений в течение одного пострадиационного поколения. Однако процесс восстановления у дафний наблюдали не при всех исследуемых дозах облучения. Было обнаружено, что при наибольшей из исследуемых доз 10 Гр, восстановление плодовитости не происходит и во втором поколении. Из полученных результатов можно заключить, что при отсутствии повторного облучения дафний в надфоновых дозах, произойдет восстановление жизнеспособности популяции в поколении F_2 .

Из всего вышесказанного следует, что анализ прямых и отдаленных радиационно-индуцированных эффектов изменения выживаемости, продолжительности жизни и плодовитости у ракообразных *D. magna*, может быть использован для целей биологического мониторинга радиационного воздействия на гидробионтов, а результаты исследования включены в существующие базы данных, например FREDERICA [доступ на <http://www.frederica-online.org>], для обоснования величины приемлемого риска радиационного воздействия на гидросферу.

Выявленные нами радиационно-индуцированные биохимические эффекты у *D. magna* показали, что одним из механизмов формирования прямых и отдаленных последствий радиационного воздействия является изменение метаболических процессов, связанных с нарушением активности митохондриальных дегидрогеназ, направленных на детоксикацию индуцированного радиацией повышенного уровня свободных радикалов. Возможные эпигенетические изменения в анализируемых выборках дафний из поколений F_0 и F_1 в данном исследова-

нии обнаружить не удалось. По всей видимости, это связано с тем, что существуют особые фрагменты в геноме ДНК, которые отвечают за экспрессию генов при радиационном воздействии. Поиск таких генов может стать отдельной задачей радиационно-молекулярных исследований на дафниях.

Итак, в диссертационной работе разработаны принципы построения биологического мониторинга на простейших и ракообразных для обеспечения более детального анализа последствий радиоактивного загрязнения окружающей среды. В основу мониторинга положен анализ прямых и отдаленных радиационно-индуцированных биологических эффектов у инфузорий *S. ambiguum* и ракообразных *D. magna*. Акцент сделан на приоритетность научных исследований на ракообразных, группе организмов, которые определены в качестве ключевой модели для разработки экологических основ радиационной защиты.

Обнаруженные в экспериментах с использованием инфузорий и дафний в качестве модельных тест-объектов закономерности радиационно-индуцированных эффектов станут значимым практическим приложением к решению задач радиационной защиты биоты. Использование в целях биомониторинга низших гидробионтов значительно сократит количество экспериментов с млекопитающими с последующим облегчением этических, моральных и экономических трудностей, которые существуют в области радиационной защиты. Мы убеждены, что инфузории *Spirostomum ambiguum* и особенно низшие ракообразные *Daphnia magna* представляют собой полезные экспериментальные модели, которые позволяют эффективно и быстро анализировать многие еще не известные аспекты действия на водные экосистемы ионизирующего и неионизирующего излучения с надфоновыми уровнями.

ВЫВОДЫ

1. У ракообразных *Daphnia magna* выявлено значимое снижение продолжительности жизни в поколения F_0 после γ -облучения в дозах от 100 мГр. Эффект сохраняется у потомства в необлученном поколении F_1 . Во втором пострадиационном поколении F_2 продолжительность жизни дафний восстанавливается.

2. Плодовитость партеногенетически размножающихся *D. magna* значимо снижается при γ -облучении в дозах от 10 мГр, что связано со снижением числа и размера пометов. В необлученном поколении F_1 плодовитость остается значимо ниже контроля в группах дафний с исходными дозами облучения от 100 мГр. Эффект обусловлен снижением размера пометов. В поколении F_2 плодовитость восстанавливается, за исключением дозовой группы, исходно облученной в дозе 10000 мГр.

3. У вегетативно размножающихся инфузорий *Spirostomum ambiguum* выявлено пролонгированное в 10 – 15 поколениях снижение выживаемости при остром γ -облучении исходных выборок в дозах от 50 Гр.

4. В морфофизиологических тестах обнаружено, что у *S. ambiguum* в ранние сроки после облучения в дозах от 100 мГр ионизирующего излучения, от 300 Дж/м² радиочастотного излучения при плотностях потока энергии 0,1 и 0,5 Вт/м² и от 1400 Дж/м² при плотности потока энергии 0,05 Вт/м² происходит значимое наследуемое снижение поведенческой активности, являющейся эволюционно-обусловленной формой физиологического состояния простейших. Методом прижизненной компьютерной морфометрии выявлены морфологические патологии у 30 – 40 % особей на 4 – 7 сутки после γ -облучения в дозах

от 1000 мГр и от 900 Дж/м² в радиочастотном поле с плотностью потока энергии 0,5 Вт/м².

5. У *D. magna* в поколении F_0 , облученных в дозах от 100 мГр, и у их потомства в необлученном поколении F_1 обнаружено нарушение активности митохондриальных дегидрогеназ, обусловленное повышенным в 1,5 – 3 раза уровнем свободных радикалов. В поколении F_2 токсический эффект радиации не выявлен. Данные биохимического анализа коррелируют с выживаемостью и плодовитостью *D. magna* в трех поколениях.

6. Тотальный анализ метилирования ДНК у *D. magna* не выявил значимых изменений в поколениях F_0 и F_1 после облучения в дозах 10 – 50 000 мГр. Необходим анализ уровня метилирования ДНК кандидатных генов для выявления возможных эпигенетических изменений при радиационном воздействии на *D. magna*.

7. Радиационно-индуцированные эффекты от разных источников излучения, выявленные у *S. ambiguum* и *D. magna*, имеют нелинейную зависимость от дозы облучения с порогом в области низких и средних доз и выходом на плато, высокую чувствительность к такому уровню воздействия и способность сохраняться в ряду пострадиационных поколений.

8. Ракообразные *D. magna* могут быть предложены в качестве референтного вида для проведения радиоэкологической экспертизы пресноводных экосистем. Компьютерный анализ морфометрии и двигательной активности инфузорий *S. ambiguum* методом «открытого поля» могут быть использованы в биологическом мониторинге в качестве дополнительного биомаркера радиационного воздействия для ранней диагностики загрязнения гидросферы.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Александров В.Я. Методика измерения скорости движения парамеции // Зоологический журнал. – 1948. – Т.27. Вып.5. – С. 461-495.
2. Анисимов В.Н., Бакеева Л.Е., Егормин П.А., Филенко О.Ф., Исакова Е.Ф., Манских В.Н., Михельсон В.М., Пантелеева А.А., Пасюкова Е.Г., Пилипенко Д.И., Пискунова Т.С., Попович И.Г., Рощина Н.В., Рыбина О.Ю., Сапрунова В.Б., Самойлова Т.А., Семенченко А.В., Скулачев М.В., Спивак И.М., Цыбулько Е.А. и др. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения 5. Skq1 увеличивает продолжительность жизни и предотвращает развитие признаков старения // Биохимия, 2008. Т. 73. № 12. С. 1655-1670
3. Астахова И.Н, Доронин Ю.К., Трофимов С.С., Тушмалова Н.А. Электронно-микроскопическое изучение инфузорий *Spirostomum ambiguum* // Вестник московского ун-та, 1975. – № 3. С. 37-42.
4. Бецкий О.В., Кислов В.В., Лебедева Н.Н. Миллиметровые волны и живые системы. – М.:УРСС, 2004. – 272 с.
5. Бецкий О.В., Кислов В.В., Яременко Ю.Г. Низкоинтенсивные миллиметровые волны в биологии и медицине, их биофизические эффекты и механизмы воздействия // Радиотехника. 2005. – № 8. С.103-110.
6. Билич Г.Л., Крыжановский В.А. Биология. – М.: ООО Издательский дом «ОНИКС 21 век», 2004 – 526 с.
7. Биссвангер Х. Практическая энзимология. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2013. – 328 с.
8. Брагинский Л.П. Некоторые итоги исследований по водной токсикологии в Украине // Актуальные проблемы водной токсикологии. – Бюрок: Инт-т биологии внутренних вод, 2004. – С. 11-33.
9. Бурлакова Е.Б., Михайлов В.Ф., Мазурик В.К. Система окислительно-восстановительного гомеостаза при радиационно-индуцированной не-

- стабильности генома // Радиационная биология. Радиозэкология, 2001. – Т.41. №3. С. 489-499.
10. Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Мальцева Е.Л. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов // Хим. физика. 2003. Т.22. №2. С.8–10.
 11. Бычковская И.Б. Немутагенные немишенные радиационные эффекты. Наследуемое снижение жизнеспособности клеток, индуцированное лучевыми воздействиями в малых дозах // Радиационная биология. Радиозэкология. 2013. Т. 53. № 3. С. 246-262.
 12. Бычковская И.Б., Степанов Р.П., Федорцева Р.Ф. Внешние сигналы могут индуцировать устойчивое повышение частоты гибели клеток в популяциях // Цитология, 2000. Т. 42, № 11. – С. 1082–1093.
 13. Бычковская, И.Б., Комаров Е. И., Федорцева Р.Ф. Особая категория вредных радиационных последствий: альтернативные изменения // Медицинская радиология и радиационная безопасность, 2005. Т.50, N5. – С. 5-15.
 14. Бычковская И.Б., Степанов Р.П., Федорцева Р.Ф. Необычная трансформация клеточных популяций после слабых радиационных и некоторых других воздействий // Цитология, 2002. Т.44. №1. – С. 69-83.
 15. Бычковская И.Б., Степанов Р.П., Федорцева Р.Ф. Особые долговременные изменения клеток при воздействии радиации в малых дозах // Радиационная биология. Радиозэкология, 2002. Т. 42. №1. – С. 20-35.
 16. Бычковская И.Б., Федорцева Р.Ф., Антонов П.В. и др. Особые клеточные эффекты и соматические последствия облучения в малых дозах. – СПб: СПМКС, 2006. – 150 с. (<http://irbb.ucoz.ru>).
 17. Гапеев А.Б. Исследование механизмов биологического действия низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высоких частот: успехи, проблемы и перспективы // Биомедицинская радиоэлектроника, 2014. № 6. С. 20-32.

18. Гераськин С.А. Особенности биологического действия малых доз радиации // Радиационная биология. Радиоэкология, 1995. Т.35, вып.5. – С. 563-580.
19. Григорьев Ю.Г. Биоэффекты при воздействии модулированных электромагнитных полей в острых опытах / Сборник трудов Ежегодника РНКЗНИ 2003 г. – М.: Изд-во АПЛАН, 2004. – С. 16 – 73.
20. Григорьев О.А., Бичелей Е.П., Меркулов А.В. Воздействие антропогенного электромагнитного поля на состояние и функционирование природных экосистем // Радиационная биология. Радиоэкология, 2003. Т.43. №5. – С.544-551.
21. Григорьев Ю.Г., Григорьев О.А. Электромагнитные поля базовых станций подвижной радиосвязи и экология. Оценка опасности электромагнитных полей базовых станций для населения и биоэкосистем // Радиационная биология. Радиоэкология, 2005. Т.45, № 6. – С.726-731.
22. Гудков С.В., Иванов В.Е., Карп О.Э., Черников А.В., Белослудцев К.Н., Бобылёв А.Г., Асташев М.Е., Гапеев А.Б., Брусков В.И. Влияние биологически значимых анионов на образование активных форм кислорода в воде под действием неионизирующих физических факторов // Биофизика, 2014, том 59, вып. 5, с. 862–870.
23. Данильченко О.П., Тушмалова Н.А. Экспресс-метод определения токсичности водной среды по функциональному состоянию инфузорий спиростом / Теоретические вопросы биотестирования. – Волгоград, 1983. – С.130-132.
24. Дорохов А.П. Расчёт и конструирование антенно-фидерных устройств. – Харьков: ХГУ, 1960. – 450 с.
25. Драбкин А.Л., Зузенко В.Л. Антенно-фидерные устройства. – М.: Советское радио, 1961. С.464-500.
26. Драбкин А.Л., Коренберг Е.Н. Антенны. – М.: Радио и связь, 1992. – 144 с.

27. Егорова Е.И. Влияние низкоинтенсивного СВЧ-излучения на изменение численности и биомассы планктонных водорослей // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника, 2005. № 11–12. – С.85-92.
28. Егорова Е.И., Сынзыныс Б.И. Биотестирование объектов окружающей среды. Лабораторный практикум по курсу «Биотестирование» – Обнинск: ИАТЭ, 2003. – 88 с.
29. Зайнуллин В.Г., Москалев А.А. Радиационно-индуцированные изменения продолжительности жизни у лабораторной популяции *Drosophila melanogaster* // Генетика, 2001. Т. 37, №9. – С. 1304-1306.
30. Зайнуллин В.Г., Москалев А.А., Шапошников М.В., Юшкова Е.А., Таскаев А.И. Генетические аспекты облучения в малых дозах лабораторных линий и экспериментальных популяций *Drosophila melanogaster* // Радиационная биология. Радиоэкология, 2006. Т. 46, № 5. С.547-554.
31. Иголкина Ю.В. Биологическое действие радиочастотного электромагнитного излучения по показателю активности движения инфузорий / Диссертация на соискание уч. ст. канд. биол. наук – М.: МГУ, 2011. – 197 с.
32. Иголкина Ю.В., Егорова Е.И., Козьмин Г.В. К проблеме экологического нормирования факторов электромагнитной природы в условиях общего техногенного загрязнения окружающей среды. // Экология человека, 2004. № 4. Т.1. – С. 214–216.
33. Казаков А.В., Орлов Б.Н., Чурмасов А.В. О биологической роли электромагнитных излучений оптического и радиочастотного диапазонов // Сельскохозяйственная биология, 2009, – № 6. С.11-17.
34. Капков В.И. Водоросли как биомаркеры загрязнения тяжелыми металлами морских прибрежных экосистем / Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. – М.: МГУ, 2003.

35. Козьмин Г.В., Егорова Е.И. Устойчивость биоценозов в условиях изменяющихся электромагнитных свойств биосферы // Биомед. технологии и радиоэлектроника, 2006. – № 3. – С. 61-72.
36. Кудряшов Ю.Б., Перов Ю.Ф., Рубин А.Б. Радиационная биофизика: радиочастотные и микроволновые электромагнитные излучения / Учебник. – М.: Физматлит, 2008. – 184 с
37. Куклев Ю.И. Физическая экология. – М., 2001.
38. Лебедева Н.Е., Тушмалова Н.А., Головкина Т.В. Индикация уровня биогенных и химических примесей в природных водоемах, примыкающих и МКАД с помощью количественной оценки функционального состояния гидробионтов / Междунар. конференция «Экополис 2000». – М.: МГУ, 2000. – С. 99-100.
39. Лебедева Н.Е., Горбатова Е.Н., Тушмалова Н.А., Головкина Т.В. Биотестирование ультрамалых концентраций пестицидов по функциональному состоянию гидробионтов/ Научные труды междунар. биотехнологич. центра (к 250-летию МГУ), 2004. – С. 121
40. 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.59-64.
41. Мартынюк В.С., Нижельская А.И. Возникновение диссипативных структур при воздействии эми квч на систему «вода – краситель» // Физика живого, 2009. Т. 17, № 1. – С. 105–111.
42. Махонина М.М Биологическое действие электромагнитного излучения крайне высокой частоты в условиях блокады опиоидных рецепторов. Автореф. на соиск. уч. ст. к.б.н., Симферополь, 2007. – 24с.
43. Мелехова О.П. Свободнорадикальные процессы в эпигеномной регуляции развития. – М.: Наука, 2010. – 324 с.
44. Мелехова О.П., Коссова Г.В., Падалка С.М., Сарапульцева Е.И. Биотехнология экспрессной детекции биологического эффекта слабых

- электромагнитных воздействий / Труды XX Международной конференции «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». Украина. Крым. Ялта-Гурзуф, 5-15 июня 2012 – М.: ООО «Институт новых информационных технологий», 2012. – С.235-236.
45. Мелехова О.П., Сарапульцева Е.И., Евсеева Т.И. и др. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование. Учебное пособие / Под ред. О.П. Мелеховой и Е.И. Сарапульцевой. – М.: Академия, 2010. – С.216-220.
46. Методика определения токсичности воды по смертности и изменению плодовитости дафний. Федеральный реестр ФР.1.39.2001.00285. – М.: Акварос, 2001.
47. Методическое руководство по биотестированию воды. РД-18-02-90. – М.: Госкомприроды СССР. 1991. – 48 с.
48. Методические указания. Методические основы биотестирования и определения генетической опасности отходов, поступающих в окружающую среду. РД 64-085-89. – М.: Министерство медицинской промышленности СССР, 1990.
49. Методические указания (МУ) 2.1.4.783-99. Гигиеническая оценка материалов, реагентов, оборудования, технологий, используемых в системах водоснабжения. – М.: Федеральный центр госэпиднадзора Минздрава РФ, 1999.
50. Методические указания МУК 4.3.1167-02. Минздрав России. Москва, 2002.
51. Мицкевич П.Б., Космачева С.М., Ибрагимова Ж.А., Шман Т.В., Мыслицкий В.Ф. Применение МТТ-Тест для оценки чувствительности лейкозных клеток к цитостатическим препаратам *in vitro* и прогнозирования ответа на химиотерапию при лейкозах. Минск: Минздрав Республики Беларусь, 2003. – 17 с.

52. Москалев А.А. Генетика и эпигенетика старения и долголетия // Экологическая генетика, 2013. Т. XI. № 1. – С. 3-11.
53. Никулин Р.Н., Пенской А.С., Радченко Д.Е., Никулина М.П. Зависимость биологического эффекта воздействия ЭМИ СВЧ на зёрна пшеницы от их расположения в поле секториального рупора. БМРЭ, 2010. №6. – С.26-29.
54. Пашков Е.В., Фомин Г.С., Красный Д.В. Международные стандарты ИСО 14 000. Основы экологического управления. – М.: ИПК Изд. Стандартов, 1997.
55. Петин В.Г. Биофизика неионизирующих физических факторов окружающей среды. – Обнинск: МРНЦ РАМН, 2006. – 265 с.
56. ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06; Т 16.1:2.3:3.9-06. Токсикологические методы анализа. Методика определения острой токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из почвы, осадков сточных вод и отходов по смертности дафний *Daphnia magna* Straus. – М.: ФБУ «ФЦАО», 2006, 2011. – 46 с.
57. Пресман А.С. Электромагнитные поля и живая природа. – М., 1978.
58. Проссер Л.. Сравнительная физиология животных. Пер. с англ. – М., 1977. Т 3. – С. 324-346.
59. Пяткова С.В., Корнеев Н.А., Симакова И.М., Козьмин Г.В., Литовченко А.В. Влияние низкоинтенсивного СВЧ-излучения на цитогенетические характеристики корневой меристемы лука. / Электромагнитные излучения в биологии. Труды 3-й международной конференции. Калуга, 5–7 октября 2005. – Калуга, 2005. – С.231–235.
60. Пяткова С.В., Литовченко А.В., Козьмин Г.В. Влияние низкоинтенсивного СВЧ-излучения на клетки ячменя. / Безопасность АЭС и подготовка кадров. – 9-я междуна. конф., Обнинск, 24–28 октября 2005 г. – С.79–80.

61. Радиационные технологии в сельском хозяйстве и пищевой промышленности / Под общ. редакцией Г.В. Козьмина, С.А. Гераськина, Н.И. Санжаровой. – Обнинск: ВНИИРАЭ, 2015. – 400 с.
62. Радиация и патология: уч. для студ. вузов / Под ред. академика А.Ф. Цыба. – М.: Высшая школа, 2005.
63. Райков И.Б. Кариология простейших. – Л.: Наука, 1967. – 260 с.
64. СанПин 2.2.4.1191-03. Электромагнитные поля в производственных условиях. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2003.
65. Сахаров В.К. Радиоэкология. – СПб.–М.–Краснодар: «Лань», 2006. – 311 с.
66. Серегина О.Б., Леонидов Н.Б. Сравнительная оценка некоторых видов простейших для биологических исследований полиморфных модификаций лекарственных веществ / Тезисы докладов 7-й Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – М., 2000. – С. 545.
67. Скулачев М.В., Скулачев В.П. Новые сведения о запрограммированности старения - медленного фенотоза (обзор) // Биохимия, 2014. № 10. С. 1205-1224.
68. Строганов Н.С. Биологический критерий токсичности в водной токсикологии / В кн.: Критерии токсичности и принципы методик по водной токсикологии. – М.: Из-во МГУ, 1971. – С. 14-26.
69. Степанова Н.Ю., Говоркова Л.К., Анохина О.К., Латыпова В.З. Оценка уровня загрязнения донных отложений Куйбышевского водохранилища в местах / Актуальные проблемы водной токсикологии / Под ред. Проф. Б.А.Флерова. – Борок: Ин-т биологии внутренних вод, 2004. С. 224-242.
70. Тушмалова Н.А., Бурлакова Е.Б., Лебедева Н.Е., Томкевич М.С., Головкина Т.В. Поведение донервных организмов – индикатор эффек-

- та сверхмалых доз // Вестн. моск. ун-та, сер.16, биология, 1998. №4. – С.24-25.
71. Тушмалова Н.А., Данильченко О.П., Бресткина М.Д. Метод биотестирования природных и сточных вод по уровню двигательной активности инфузорий спиростом / Методы биотестирования природных вод. – Черноголовка, 1988. – С.43-47.
72. Тушмалова Н.А., Егорова Е.И. Использование поведенческих реакций гидробионтов в системе оценки качества окружающей среды: Уч. пособие. – Обнинск: ИАТЭ, 2004. – 52 с.
73. Тушмалова Н.А., Лебедева Н.Е. Поведение – компонент оценки качества окружающей среды / Тезисы докладов Международной научной конференции «Новые технологии в защите биоразнообразия в водных экосистемах, Москва, 27–29 мая, 2002. – М.: МГУ, 2002. – С.186.
74. Усанов Д.А., Креницкий А.П., Майборodin А.В. и др. Воздействие излучения терагерцового диапазона частот на функциональное состояние дафний // Биомед. технологии и радиоэлектроника, 2005. № 8. – С. 54–58.
75. Усанов Д.А., Скрипаль А.В., Рязнина А.В., Усанов А.Д. Влияние низкочастотного магнитного поля на выживаемость и плодовитость пресноводного рачка *Daphnia magna* Straus // Биомедицинская радиоэлектроника, 2008. № 5. – С. 51 – 53.
76. Ускалова Д.В., Баранова М.М., Сарапульцева Е.И., Иголкина Ю.В. Применение метода компьютерной морфометрии в исследовании биологического действия низкоинтенсивного радиочастотного излучения на простейших // Биомедицинская радиоэлектроника, 2013. № 3. – С.48-52.
77. Шарова И.Х. Зоология беспозвоночных. М.: ВЛАДОС, 2002. – 280с.
78. Шпакова А.П., Павлова К.С., Булычева Т.И. МТТ-колориметрический метод определения цитотоксической активности естественных кил-

- лерных клеток // Клиническая лабораторная диагностика. 2000. № 2. С. 20-23.
79. Шпиндлер Э. Практические конструкции антенн. – М.: Мир, 1989. 448с.
80. Цеплин В.В., Зенин С.В., Лебедева Н.Е. Механизм воздействия сверхслабых доз ионизирующего излучения на водную среду // Биомед.технологии и радиоэлектроника, 2005. №6. – С. 53–58.
81. Цыцугина В.Г., Поликарпов Г.Г. Критерии идентификации «критических» популяций в водной радиохемозологии // Радиационная биология. Радиозэкология, 2006. Т.46. №2. – С. 200 – 207.
82. Филенко О.Ф. Биологические методы в контроле оценки качества окружающей среды // Экологические системы и приборы, 2007. - № 6. С. 18 – 20.
83. Филенко О.Ф., Михеева И.В. Основы водной токсикологии. Учебное пособие. – М.: Колос, 2007. – 144 с.
84. Флеров Б.А. Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных. – Л.: Наука, 1989. – 142 с.
85. Фрелих Г. Когерентные возбуждения в биологических системах // Биофизика, 1977. № 4. – С. 743-744.
86. Яблонка Е., Лэмб М.Дж. Эпигенетическая наследственность и эволюция // Цитология, 2003. Т.45. №11. – С.1057–1071.
87. Ярмоненко С.П. Радиобиология человека и животных. – М.: Высшая школа, 2004.
88. Aarkrog A. Input of anthropogenic radionuclides into the World Ocean. Deep Sea Res. Part II: Top. Studies Oceanogr., 2003. V. 50, N 17. P. 2597–2606.
89. Agarwal A, Desai NR, Makker K, Varghese A, Mouradi R, et al. Effects of radiofrequency electromagnetic waves (RF-EMW) from cellular phones on human ejaculated semen: an in vitro pilot study // Fertil Steril, 2009.

90. Aghdam H., Lotfi A.R., Baho B.M., Karami A.R. Effects of electromagnetic fields of cellular phone on cortisol and testosterone hormones rate in Syrian hamesi // Int. J. Zool. Res., 2008. № 4. P. 230–233.
91. AlAmri O.D., Cundy A.B., Di Y., Jha A.N., Rotchell J.M. Ionising radiation-induced DNA damage response identified in marine mussels, *Mytilus* sp. // Environ. Pollut., 2012. N 168. P. 107–112.
92. Alonzo F., Gilbin R., Bourrachot S., Floriani M., Morello M., Garnier-Laplace J., Effects of chronic internal alpha irradiation on physiology, growth and reproductive success of *Daphnia magna*. Aquat. Toxicol. 2006. V. 80. – P. 228-236.
93. Alonzo, F., Gilbin, R., Zeman, F.A., Garnier-Laplace, J., Increased effects of internal alpha irradiation in *Daphnia magna* after chronic exposure over three successive generations. Aquat. Toxicol., 2008. V. 87. – P.146–156.
94. Alonzo F., Hertel-Aas T., Gilek M., Gilbin R., Oughton D.H., Garnier-Laplace J. Modeling the propagation of effects of chronic exposure to ionising radiation from individuals to populations. Journal of Environmental Radioactivity, 2008. V. 99. – P. 1464-1473.
95. Alonzo F, Gilbin R, Bourrachot S, Floriani M, Morello M, Garnier-Laplace J. Effects of chronic internal alpha irradiation on physiology, growth and reproductive success of *Daphnia magna*. Aquat Toxicol 2006. V. 80. – P. 228–236.
96. Alonzo F, Gilbin R, Zeman FA, Garnier-Laplace J. Increased effects of internal alpha irradiation in *Daphnia magna* after chronic exposure over three successive generations. Aquat Toxicol 2008. V. 87. – P. 146–156.
97. Anbumani S., Mohankumar M.N. Gamma radiation induced micronuclei and erythrocyte cellular abnormalities in the fish *Catla catla* // Aquat. Toxicol., 2012. N 122. P. 125–132.
98. Barata C, Baird DJ, Mitchell SE, Soares AMVM. Among- and within-population variability in tolerance to cadmium stress in natural populations

- of *Daphnia magna*: Implications for ecological risk assessment. *Environ Toxicol Chem* 2002. V. 21. – P.1058–1064.
99. Barber R., Plumb M.A, Boulton E., Roux I., Dubrova Y.E. Elevated mutation rates in the germ line of first- and second-generation offspring of irradiated male mice // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. V.14; N 99(10). – P.36877-36882.
 100. Barber R.C., Dubrova Y.E. The offspring of irradiated parents, are they stable? // *Mutation Research*, 2006. № 98. – P. 50–60.
 101. Barber RC, Hardwick RJ, Shanks ME, Glen CD, Mughal SK, Voutounou M, Dubrova YE. The effects of in uteroirradiation on mutation induction and transgenerational instability in mice. *Mutat Res.*, 2009. V. 664. – P. 6–12.
 102. Barber R.C., Hickenbotham P., Hatch, T., Kelly D., Topchiy N., Almeida G.M., Jones G.D., Johnson G., Parry J., Rothkamm K., Dubrova Y., Radiation-induced transgenerational alterations in genome stability and DNA damage. *Oncogene* 2006. V. 25. – P. 7336-7342.
 103. Barteri M., Pala A., Rotella S. Structural and kinetic effects of mobile phone microwaves on acetylcholinesterase activity // *Biophys. Chem.*, 2004. № 113. – P. 245–253.
 104. Baverstock K, Belyakov OV. Some important questions connected with non-targeted effects. // *Mutat Res*, 2010. V. 687. – P. 84–88.
 105. Belyaev I. Dependence of non-thermal biological effects of microwaves on physical and biological variables: implications for reproducibility and safety standards In: Guiliani L. and Soffritti M, editors. *Non thermal effects and mechanisms of interaction between EMF and living matter*. Bologna: National Institute for the Study and Control of Cancer and Environmental Diseases. 2010. – P. 187-218.
 106. Baillieul M., Smolders R., Blust R. The effect of environmental stress on absolute and mass-specific scope for growth in *Daphnia magna* Strauss // *Comp.Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.*, 2005. V. 140, N 3. P. 364–373.

107. Baverstock K., Rönkkö M. Epigenetic regulation of the mammalian cell // PLoS One, 2008. V. 4, № 3. – P.2290-2298.
108. Benzie J.A. Use and exchange of genetic resources of penaeid shrimps for food and aquaculture // Rev. Aquacult., 2009. V. 1, N 3–4. P. 232–250.
109. Beresford N.A., Copplestone D. Effects of ionising radiation on wild-life: what knowledge have we gained between the Chernobyl and Fukushima accidents? // Integr. Environ. Assess. Manag., 2011. V. 7, N 3. P. 371–373.
110. Breslow N.E., Day N.E. Statistical methods in cancer research. IARC Scientific Publication No 82. - Lyon: IARC, 1987.
111. Bopp S.K., Lettieri T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line // BMC Pharmacology. 2008. V. 8. № 8. – P. 1-11.
112. Bréchignac F. Protection of the environment: how to position radioprotection in an ecological risk assessment perspective // Sci. Total Environ., 2003. V. 307, N 1. P. 35–54.
113. Buessler K.O., Jayne S.R., Fisher N.S., Rypina I.I., Baumann H., Baumann Z., Yoshida S. Fukushima-derived radionuclides in the ocean and biota off Japan // Proc. Natl. Acad. Sci., 2012. V. 109, N 16. P. 5984–5988.
114. Buonanno F, Guella G, Strim C, Ortenzi C. Chemical defense by monoprenyl hydroquinone in a freshwater ciliate *Spirostomum ambiguum*. // Hydrobiologia, 2012. N 684. – P. 97-107.
115. Buisset-Goussen A., Goussen B., Della-Vedova C., Galas S., Adam-Guillermin C., Lecomte-Pradines C. Effects of chronic gamma irradiation: a multigenerational study using *Caenorhabditis elegans*. // J. Environ. Radioact, 2014. V.137. – P. 190-197.
116. Bushmann P.J. Concurrent signals and behavioral plasticity in blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun) courtship // Biol. Bull. 1999. V. 197, N 1. P. 63–71.

117. Caminada D, Escher C, Fent K. Cytotoxicity of pharmaceuticals found in aquatic systems: comparison of PLHC-1 and RTG-2 fish cell lines // *Aquat Toxicol.* 2006. – V. 79. № 2. – P. 114-123.
118. *Cancer Cell Culture. Methods and Protocols.* / Ed.I.A. Cree. Second ed.– Springer New York Dordrecht Heidelberg London: Human Press, 2011. P. 237-244.
119. Canty MN, Hutchinson TH, Brown RJ, Jones MB, Jha AN. Linking genotoxic responses with cytotoxic and behavioural or physiological consequences: Differential sensitivity of echinoderms (*Asterias rubens*) and marine molluscs (*Mytilus edulis*). *Aquat Toxicol* 2009. V. 94. – P. 68–76.
120. Carlos G.S. Basic equations for electromagnetic fields. In: *Electromagnetic Waves*, Chapter 1, 2nd ed. London: CRC press, Taylor & Francis Group., 2006. – P. 1–32.
121. Chen G., Lu D., Chiang H., Leszczynski D. and Xu Z. Using Model Organism *Saccharomyces cerevisiae* to Evaluate the Effects of ELF-MF and RF-EMF Exposure on Global Gene Expression // *Bioelectromagnetics*, 2012.
122. Cheung VV, Depledge MH, Jha AN. An evaluation of the relative sensitivity of two marine bivalve mollusc species using the Comet assay. *Mar Environ Res* 2006. V. 62. – S301–S5.
123. Choppin G., Rydberg J., Liljenzin J.O *Radiochemistry and Nuclear Chemistry.* 2nd Edition Nuclear Chemistry Theory and Application. Butterworth-Heinemann Ltd. – 1995. – PP.473-512.
124. Colbourne J.K., Pfrender M.E., Gilbert D., Thomas W.K., Tucker A., Oakley T.H., Tokishita S., Aerts A., Arnold G.J., M.K. Basu, Bauer D.J., Cáceres C.E., Carme L., Casola C., Choi J.-H., Detter J.C., Dong Q., Dusheyko S., Eads B.D., Fröhlich T., Geiler-Samerotte K.A., Gerlach D., Hatcher P., Jogdeo S., Krijgsveld J., Kriventseva E.V., Kültz D., Laforsch C., Lindquist E., Lopez J., Manak J.R., Muller J., Pangilinan J., Patwardhan R.P., Pitluck S., Pritham E.J., Rechtsteiner A., Rho M., Rogozin I.B., Sa-

- karya O., Salamov A., Schaack S., Shapiro H., Shiga Y., Skalitzky C., Smith Z., Souvorov A., Sung W., Tang Z., Tsuchiya D., Tu H., Vos H., Wang M., Wolf Y.I., Yamagata H., Yamada T., Ye Y., Shaw J.R., Andrews J., Crease T.J., Tang H., Lucas S.M., Robertson H.M., Bork P., Koonin E.V., Zdobnov E.M., Grigoriev I.V., Lynch M., Boore J.L. The Ecoresponsive Genome of *Daphnia pulex* // Science, 2011. V. 331. – P. 555–561.
125. Cannon R., Hooper H.L., Sibly R.M., Lim F.L., Heckmann L.H., Moore D.J., Watanabe H., Soetaert A., Cook K., Maund S.J., Hutchinson T.H., Moggs J., De Coen W., Iguchi T., Callaghan A. Linking molecular and population stress responses in *Daphnia magna* exposed to cadmium. Environ. Sci. Technol. 2008. V. 42. P. – 2181–2188.
126. Cooley J.L. Effects of temperature and chronic irradiation on populations of the aquatic snail (*Physa heterostropha*). In: Nelson DJ, editor. Radionuclides in ecosystems. CONF-710501-P1 P. 585–590. Washington, DC: US Atomic Energy Commission; 1973.
127. Copplestone D, Bielby S, Jones SR, Patton D, Daniel P, Gize I. Impact assessment of ionising radiation on wildlife. R&D Publication 128. Bristol: Environment Agency; 2001.
128. Copplestone D., Howard B.J., Brechignac F. The ecological relevance of current approaches for environmental protection from exposure to ionizing radiation // J. Environ. Radioact., 2004. N 74. P. 31–41.
129. Cripe GM, McKenney CL, Hoglund MD, Harris PS. Effects of fenoxycarb exposure on complete larval development of the xanthid crab, *Rhithropanopeus harrisi*. Environ Pollut., 2003. V. 125. – P. 295–299.
130. Cropley J.E., Suter C.M., Beckman K.B., Martin D.I.K. Germ-line epigenetic modification of the murine Avy allele by nutritional supplementation // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. Vol. 103, No. 46. – Pp. 17308–17312.

131. Dallas L.J., Keith-Roach M., Lyons B.P. and Jha A.N. Assessing the Impact of Ionizing Radiation on Aquatic Invertebrates: A Critical Review. *Radiation research* 2012. V. 177. – P. 693–716.
132. Dauer L.T., Brooks A.L., Morgan W.F. et al. Review and evaluation of updated research on the health effects associated with low-dose ionizing radiation // *Rad. Protection Dosimetry*, 2010. Vol.140, N 2. – P. 103-136.
133. Day T.K., Zeng G., Hooker A.M., Bhat M., Scott B.R., Turner D.R., Sykes P.J. Extremely low priming doses of X radiation induce an adaptive response for chromosomal inversions in pKZ1 mouse prostate // *Radiat. Res.*, 2006. № 166. – P. 757–766.
134. Daxinger L., Whitelaw E. Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals // *Nat Rev Genet.*, 2012. V. 31. No 13(3). – P. 153-162.
135. Deitmer J.W., Machemer H, Martinac B. Motor control in 3 types of ciliary organelles in the ciliate *stylonychia* // *Journal of Comparative Physiology*, 1984. N 154. – P. 113-120.
136. Dell’Omo G., 2002. *Behavioural Ecotoxicology*. In: Chichester. John Wiley & Sons.
137. De Schamphelaere K.A.C., Vandenbrouck T., Muysen B.T.A., Soetaert A., Blust R., De Coen W., Janssen C.R. Integration of molecular with higher-level effects of dietary zinc exposure in *Daphnia magna*. *Comp. Biochem. Physiol. D: Genom. Proteom.* 2008. V. 3. – P. 307–314.
138. Desai N.R., Kesari K.K., Agarwal A. Pathophysiology of cell phone radiation: Oxidative stress and carcinogenesis with focus on male reproductive system // *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2009. № 7. – P.114.
139. Divan H.A., Kheifets L., Obel C., Olsen J. Prenatal and postnatal exposure to cell phone use and behavioral problems in children // *Epidemiology*, 2008. № 19. – P. 523–529.
140. Dubrova Y.E. Genome stability. Transgenerational mutation by radiation // *NATURE*, 2000. V. 405

141. Dubrova Y.E. Radiation-induced transgenerational instability // *Oncogene* 2003. V. 22. – P. 7087–7093.
142. Dubrova Y.E. The transgenerational effects of parental exposure to mutagens in mammals, in: D Mittelman (Ed.), *Stress-Induced Mutagenesis*, Springer, New York, 2013. – P. 243-255.
143. Dubrova YE, Grant G, Chumak AA, Stezhka VA, Karakasian AN. Elevated minisatellite mutation rate in the post-Chernobyl families from Ukraine. *Am J Hum Genet* 2002. V. 71. – P. 801–9.
144. Duggan I.C., Boothroyd I.K.G., Speirs D.A. Factors affecting the distribution of stream macroinvertebrates in geothermal areas: Taupo Volcanic Zone, New Zealand // *Hydrobiologia*, 2007. V. 592. N 1. P. 235–247.
145. Ebert D. *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia*, National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Md, USA, 2005.
146. Elendt B.-P., Bias W.-R., Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. // *Water Res.* 1990. V. 24. – P. 1157–1167.
147. Engel D, Davis EM. An atypical response to radiation by the mud snail, *Nassarius obsoletus*. *Int J Radiat Biol* 1973. V. 24. P. – 199–201.
148. European Commission. *Radioactive effluents from nuclear power stations and nuclear fuel reprocessing plants in the European Union (1995–1999)*. Radiation Protection 127. Luxembourg: European Commission, 2001.
149. European Committee for Electrotechnical Standardization (CENELEC). 2010 . Annual report 2010. Brussels: CENELEC on COM(2010) 245 of 19 May 2010 on «A Digital Agenda for Europe». – 41 p.
150. Fan W.-H., Tang G., Zhao C.-M., Duan Y., Zhang R. Metal accumulation and biomarker responses in *Daphnia magna* following cadmium and zinc exposure // *Environ. Toxicol. Chem*, 2009. N 28. – P. 305–310.

151. Fang M.Z., Chen D., Sun Y., Jin Z., Christman J.K., Yang C.S. Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RAR β , and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy // *Clinical Cancer Research*, 2005. V. 11. – P. 7033–7041.
152. Florou H., Tsytsugina V., Polikarpov G.G., Trabidou G., Gorbenko V., Chaloulou C.H. Field observations of the effects of protracted low levels of ionising radiation on natural aquatic population by using a cytogenetic tool // *J. Environ. Radioact.*, 2004. V. 75, N 3. P. 267–283.
153. FREDERICA Radiation Effects Database [database on the Internet]. 2006 [cited 6/10/10]. Available at <http://87.84.223.229/fred/mainpage.asp>.
154. Fragopoulou A.F., Koussoulakos S.L., Margaritis L.H. Cranial and post-cranial skeletal variations induced in mouse embryos by mobile phone radiation // *Pathophysiology*, 2010. № 17. – P.169–177.
155. Fuks F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes // *Current Opinion in Genetics and Development*, 2005. Vol. 15, No. 5. – P. 490–495.
156. Fuller N., Lerebours A., Smith J.T., Ford A.T. The biological effects of ionising radiation on Crustaceans: A review // *Aquatic Toxicology*, 2015. V.167.P. 55–67.
157. Funk RHW, Monsees T, Ozkucur N. Electromagnetic effects – from cell biology to medicine // *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 2009. N 43. – P. 177-264.
158. Garcia-Reyero N., Poynton H.C., Kennedy A.J., Guan X., Escalon B.L., Chang B., Varshavsky J., Loguinov A.V., Vulpe C.D., Perkins E.J. Biomarker discovery and transcriptomic responses in *Daphnia magna* exposed to munitions constituents // *Environmental Science and Technology*, 2009. V. 43. – P. 4188-4193.
159. Garnier-Laplace J., Della-Vedova C., Copplestone D., Hingston J., Cifroy Ph. First Derivation of Predicted-No-Effect Values for Freshwater and

- Terrestrial Ecosystems Exposed to Radioactive Substances // Environ. Sci. Technol., 2006. N. 40. – P. 6498-6505.
160. Garnier-Laplace J., Geras'kin S., Della-Vedova C., Beaugelin-Seiller K., Hinton T.G., Real A., Oudalova A. Are radiosensitivity data derived from natural field conditions consistent with data from controlled exposures? A case study of Chernobyl wildlife chronically exposed to low dose rates // J. Environ.Radioact., 2013. N 121. P. 12–21.
161. Geras'kin S.A, Oudalova A.A., Kim J.K. et al. Citogenetic effect of low dose γ -radiation in *Hordeumvulgare* seedlings: non-linear dose-effect relationship. Rad. Environ. Biophys., 2007. V. 46. – P. 31-41.
162. Gilbin R, Alonzo F, Garnier-Laplace J. Effects of chronic external gamma irradiation on growth and reproductive success of *Daphnia magna*. J Environ Radiat., 2008. V. 99. – P. 134–145.
163. Goldsworthy A. The biological effects of weak electromagnetic fields / Available from: www.goldsworthy-bio-weak-em-0.7.doc. 2007. – P.1–15.
164. Grossniklaus U., Kelly WG, Ferguson-Smith AC, Pembrey M, Lindquist S. Transgenerational epigenetic inheritance: how important is it? // Nat Rev Genet., 2013. V. 14, No 3. – P. 228-235.
165. Hagger JA, Atienzar FA, Jha AN. Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, *Mytilus edulis* // Aquat Toxicol, 2005. N 74. – P. 205–17.
166. Hall C.S. The relationship between emotionality and ambulatory activity // J. Comp. Psychol., 1936. N 22. – P. 345-452.
167. Hall EJ. Radiobiology for the Radiologist. Fifth Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000, 588 pp.
168. Han J., Won E.J., Lee B.Y., Hwang U.K., Kim I.C., Yim J.H., Lee J.S., Gammarays induce DNA damage and oxidative stress associated with impaired growth and reproduction in the copepod *Tigriopus japonicas* // Aquat. Toxicol., 2014. N152. P. 264–272.

169. Harris K.D.M., Bartlett N.J., Lloyd V.K. *Daphnia* as an Emerging Epigenetic Model Organism // Hindawi Publishing Corporation Genetics Research International. 2012.
170. Hayon, T., Dvilansky, A., Shpilberg, O., Nathan, I. Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity. *Leuk. Lymphoma.*, 2003. V.44. – P. 1957-1962.
171. Heijerick D.G., De Schamphelaere K.A.C., Van Sprang P.A., Janssen C.R. Development of a chronic zinc biotic ligand model for *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2005. V. 62. – P. 1–10.
172. Hertel-Aas T, Oughton DH, Jaworska A, Bjerke H, Salbu B, Brunborg G. Effects of chronic gamma irradiation on reproduction in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Radiat Res.*, 2007. V. 168. – P. 515–526.
173. Hinton T.G., Bedford J.S., Congdon J.C., Whicker F.W. Effects of Radiation on the Environment: A Need to Question Old Paradigms and Enhance Collaboration among Radiation Biologists and Radiation Ecologists // *Radiation Research*, 2004. V. 162. – P. 332–338.
174. Hinton T.G., Garnier-Laplace J., Vandenhove H., Dowdall M., Adam-Guillermin C., Alonzo F., Vives i Batlle J. An invitation to contribute to a strategic research agenda in radioecology // *J. Environ. Radioact.* 2013. N 115. P. 73–82.
175. Hosmer D.W., Lemeshow S., May S. *Applied survival analysis: Regression modelling of time-to-event data*, 2nd ed. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2008.
176. Howard B.J., Larsson C.M. The ERICA Integrated Approach and its contribution to protection of the environment from ionizing radiation // *J. Environ. Radioact.*, 2008. V. 99. P. 1361-1363.
177. Howard B.J., Beresford N.A., Andersson P., Brown J.E., Copplestone D., Beaugelin-Seiller K., Whitehouse P. Protection of the environment from ionising radiation in a regulatory context – an overview of the coordinated action project // *J. Radiol. Prot.*, 2010. V. 30, N 2. P.195.

178. Hung C.S., Anderson C., Horne J.A., McEvoy P. Mobile phone 'talk-mode' signal delays EEG-determined sleep onset // *Neurosci. Lett.*, 2007. N 421. – P. 82–86.
179. International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz) // *Health Physics*, 1998. V. 74. N.4. – P.494-522.
180. ICRU Report 86. Quantification and reporting of low-dose and other heterogeneous exposures. Bethesda: International Commission on Radiation Units and Measurements; 2011.
181. ICRP. Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 26, *Annals of the ICRP I*, 1977. P. 1–53.
182. ICRP Publication 108. Environmental Protection: The Concept and Use of Reference Animals and Plants // *Ann. ICRP*, 2009, 38, No 4-6. P. 1–242.
183. ICRP Publication 118. ICRP statement on tissue reactions/early and late effects of radiation in normal tissues and organs – threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. International Commission on Radiological Protection. Elsevier 2012.
184. Irmak M.K., Fadillioglu E., Gulec M. et al. Effects of electromagnetic radiation from a cellular telephone on the oxidant and antioxidant levels in rabbits // *Cell Biochem. Funct.*, 2002. № 20. – P. 283–289.
185. Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, Noguchi K, Ueda K, Nakatani Y, Ojima T, Ishida K, Naka T, Yamaue H. Individualized adjuvant chemotherapy guided by chemosensitivity test sequential to extended surgery for advanced gastric cancer // *Anticancer Res.* 2005. V. 25. № 5. P. 3453-3459.
186. Iwasaki T. The Differential Radiosensitivity of Oogonia and Oocytes at Different Developmental Stages of the Brine Shrimp, *Artemia salina* // *Biol. Bull.*, 1973. V. 144, N 1. P. 151–161.
187. Jablonka E., Lamb M.J. The epigenome in evolution: beyond the modern synthesis // *Вестник ВОГиС*, 2008. Т.12. №1/2. – С.242–254.

188. Jablonka E., Lamb M.J. Soft inheritance: Challenging the Modern Synthesis // *Genetics and Molecular Biology*, 2008. V.31, No2. – P. 389-395.
189. Jablonka E, Raz G. Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *Q Rev Biol*, 2009. V. 84. – P. 131-176.
190. Jayapal M., Bhattacharjee R.N., Melendez A.J., Hande M.P. Environmental toxicogenomics: a post-genomic approach to analysing biological responses to environmental toxins // *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2010. V.42. – P. 230-240.
191. Jha AN, Hagger JA, Hill SJ, Depledge MH. Genotoxic, cytotoxic and developmental effects of tributyltin oxide (TBTO): an integrated approach to the evaluation of the relative sensitivities of two marine species // *Mar Environ Res.*, 2000. V. 50. – P. 565–73
192. Jha A. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview // *Mutat. Res.*, 2004. V. 552. – P. 1-17.
193. Jha AN. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay // *Mutagenesis*, 2008. V 23. – P. 207–221.
194. Jha AN, Cheung VV, Foulkes ME, Hill SJ, Depledge MH. Detection of genotoxins in the marine environment: adoption and evaluation of an integrated approach using the embryo-larval stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Mutat Res.*, 2000. V. 464. – P. 213–228.
195. Jha AN, Dogra Y, Turner A, Millward GE. Impact of low doses of tritium on the marine mussel, *Mytilus edulis*: Genotoxic effects and tissue-specific bioconcentration // *Mutat Res.*, 2005. No 586. – P. 47–57.
196. Johansson O. Disturbance of the immune system by electromagnetic fields A potentially underlying cause for cellular damage and tissue repair reduction which could lead to disease and impairment // *Pathophysiology*, 2009. No 16. – P. 157–177.

197. Johannes F., Porcher E., Teixeira F.K. et al. Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits // *PLoS Genetics*, 2009. V. 5, No. 6.
198. Jones D., Domotor S., Higley K., Kocher D., Bilyard G. Principles and issues in radiological ecological risk assessment // *J. Environ. Radioact.*, 2003. V. 66, N 1. P. 19–39.
199. Kadhim M., Salomaa S., Wright E., Hildebrandt G., Belyakov O.V., Prise K.M., Little M.P. Non-targeted effects of ionising radiation – Implications for low dose risk // *Mutation Research*, 2012. Vol. 752, N 2. – P. 84–98.
200. Kershaw P., Baxter A. The transfer of reprocessing wastes from north-west Europe to the Arctic. *Deep Sea Res. Part II: Topical Studies Oceanogr.* 1995. V. 42, N 6. P. 1413–1448.
201. Kesari K.K., Kumar S., Behari J. 900-MHz microwave radiation promotes oxidation in rat brain // *Electromagn. Biol. Med.*, 2011. № 30. – P. 219–234.
202. Knowles JF. Long-term irradiation of the marine fish, the plaice *Pleuronectes platessa*: an assessment of the effects on size and composition of the testes and of possible genotoxic changes in peripheral erythrocytes // *Int J Radiat Biol*, 1999. № 75. – P. 773–82.
203. Koyu A., Gokalp O., Ozguner F. et al. The effects of subchronic 1800MHz electromagnetic field exposure on the levels of TSH, T3, T4, cortisol and testosterone hormones // *Genel. Tip. Dergisi.*, 2005. № 15. – P.101–105.
204. Kryshev I.I., Sazykina T.G., Beresford N.A. Effects on wildlife. In: Smith J.T., Beresford N.A. (Eds.), *Chernobyl: Catastrophe and Consequences*. Springer-Praxis, Chichester, 2005. pp. 267–288.
205. Kwee S., Raskmark P., Velizarov S. Changes in cellular proteins due to environmental non-ionizing radiation. I. Heat-shock proteins // *Electro-Magnetobiol.*, 2001. № 20. – P. 141–152.
206. Lea D.E. *Action of Radiations on Living Cells*, 2nd., Cambridge University Press 1962.

207. LeBlanc G.A. Crustacean endocrine toxicology: a review // *Ecotoxicology*, 2007. V. 16, N 1. P. 61–81.
208. Lee K.S., Choi J.S., Hong S.Y. et al. Mobile phone electromagnetic radiation activates MAPK signaling and regulates viability in *Drosophila* // *Bioelectromagnetics*, 2008. № 29. – P. 371–379
209. Lee S.M., Lee S.B., Park C.H., Choi J. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: a potential biomarker of fresh water monitoring // *Chemosphere*, 2006. V. 65, N 6. P. 1074–1081.
210. Lerchl A., Kruger H., Niehaus M. et al. Effects of mobile phone electromagnetic fields at non thermal SAR values on melatonin and body weight of Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*) // *J. Pineal. Res.*, 2008. N 44. – P. 267–272
211. Lewis C., Ford A.T. Infertility in male aquatic invertebrates: a review // *Aquat. Toxicol.*, 2012. N 120, P. 79–89.
212. Li N., Zhao Y., Yang J. Impact of waterborne copper on the structure of gills and hepatopancreas and its impact on the content of metallothionein in juvenile giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea: Decapoda) // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2007. V. 52, N 1. P. 73–79.
213. Little MP., Goodhead DT., Bridges BA., Bouffler SD. Evidence relevant to untargeted and transgenerational effects in the offspring of irradiated parents // *Mutat Res.*, 2013. V.753, № 1. – P. 50-67.
214. Loed L.A., Wallace D.C., Martin G.M. The mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somatic mtDNA mutations // *PNAS*, 2005. – V.102, N 52. – P.18769-18770.
215. Lonsdale DJ, Cerrato RM, Holland R, Mass A, Holt L, Schaffner RA, et al. Influence of suspension-feeding bivalves on the pelagic food webs of shallow, coastal embayments // *Aquatic Biol*, 2009. V. 6. – P.263–279.

216. Majer B.J., Grummt T., Uhl M., Knasmüller S. Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment // Acta hydrochim. Hydrobiol. 2005. V. 33. N.1. – P. 45–55.
217. Manta AK., Stravopodis DJ., Papassideri IS., Margaritis LH. Reactive oxygen species elevation and recovery in *Drosophila* bodies and ovaries following short-term and long-term exposure to DECT base EMF // Electromagn Biol Med, 2013, Early Online: 1–14.
218. Margaritis L.H., Manta A.K., Kokkaliaris C.D. et al. *Drosophila* as a biomarker responding to EMF sources // Electromagn. Biol. Med., 2013.
219. Marshall J.S. Population dynamics of *Daphnia pulex* as modified by chronic radiation stress // Ecology, 1966. P. 561–571.
220. Martin-Creuzburg D., Westerlund S.A., Hoffmann K.H. Ecdysteroid levels in *Daphnia magna* during molt cycle: Determination by radioimmunoassay (RIA) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) // Gen.Comp. Endocrinol, 2007. V. 151. – P. 66–71.
221. Maskey D., Kim M., Aryal B., et al. Effect of 835MHz radiofrequency radiation exposure on calcium binding proteins in the hippocampus of the mouse brain // Brain Res., 2010. V. 1313. – P. 232–241.
222. Massarin S, Alonzo F, Garcia-Sanchez L, Gilbin R, Garnier-Laplace J, Poggiale JC. Effects of chronic uranium exposure on life history and physiology of *Daphnia magna* over three successive generations // Aquat Toxicol., 2010. V. 99. – P. 309–319.
223. Meral I., Mert H., Mert N., Deger Y., Yoruk I., Yetkin A., Keskin S. Effects of 900-MHz electromagnetic field emitted from cellular phone on brain oxidative stress and some vitamin levels of guinea pigs // Brain Res., 2007. № 1169. – P. 120 – 124.
224. Merrifield M., Kovalchuk O. Epigenetics in radiation biology: a new research frontier // Frontiers in genetics, 2013. N 4. – P. 40-44.

225. Mirbahai L., Chipman JK. Epigenetic memory of environmental organisms: a reflection of lifetime stressor exposures // *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.*, 2014. – P.764-765.
226. Moore MN, Depledge MH, Readman JW, Paul Leonard DR. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management // *Mutat Res*, 2004. V. 552. – P. 247–268.
227. Morgan W.F., Bair W.J. Issues in Low Dose Radiation Biology: The Controversy Continues. A Perspective // *Radiation Research*, 2013. V.179, N.5. – P. 501–510.
228. Morgan W.F., Sowa M.B. Non-targeted effects induced by ionizing radiation: Mechanisms and potential impact on radiation induced health effects // *Cancer Letters*, 2015. V. 356. P. 17–21.
229. Morgan D.K., Whitelaw E. The case for transgenerational epigenetic inheritance in humans // *Mammalian Genome*, 2008, V. 19, No. 6. – P.394–397.
230. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods*. 1983. V. 65. № 1-2. – P. 55-63.
231. Mashevich M., Folkman D., Kesar A., Barbul A., Korenstein R., Jerby E., Avivi L. Exposure of human peripheral blood lymphocytes to electromagnetic fields associated with cellular phones leads to chromosomal instability // *Bioelectromagnetics*, 2003. № 24. – P. 82–90.
232. Mothersill C., Lyng F., Mulford A., Seymour C., Cottell D., Lyons M., Austin B. Effect of low doses of ionizing radiation on cells cultured from the hematopoietic tissue of the dublin bay prawn, *Nephrops norvegicus* // *Radiat. Res.*, 2001. V. 156, N 3. P. 241–250.
233. Mothersill C., Seymour C.B. Radiation-induced bystander effects and the DNA paradigm: an out of field perspective // *Mutat. Res.*, 2006. V. 597. – P.5–10.

234. Mothersill C., Seymour C. Communication of ionising radiation signals – a tale of two fish // *Int. J. Radiat. Biol.*, 2009. –V. 85, No. 11. –P. 909–919.
235. Mothersill C, Seymour C. Eco-systems biology. From the gene to the stream // *Mutat Res.*, 2010. V. 687. – P. 63–66.
236. Mothersill C, Seymour C. Changing paradigms in radiobiology // *Mutat Res.*, 2012. V. 750, № 2. – P. 85-95.
237. Mothersill C., Seymour C. Uncomfortable issues in radiation protection posed by low-dose radiobiology // *Radiat Environ Biophys*, 2013. № 52. – P. 293–298.
238. Mothersill C., Seymour C. Implications for human and environmental health of low doses of ionising radiation // *J. of Environmental Radioactivity*, 2014. № 133. – P. 5-9.
239. Moustafa Y.M., Moustafa R.M., Belacy A., Abou-El-Ela S.H., Ali F.M. Effects of acute exposure to the radiofrequency fields of cellular phones on plasma lipid peroxidase and antioxidase activities in human erythrocytes // *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2001. № 26. – P. 605–608.
240. Mahaney B., Meek K., Lees-Miller S. Repair of ionising radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining // *Biochem. J.*, 2009. N 417. P. 639–650.
241. Mughal, S.E., Myazin, A.E., Zhavorokov, L.P., Rubanovich, A.V., Dubrova, Y.E. The dose and dose-rate effects of paternal irradiation on transgenerational instability in mice: A radiotherapy connection. *PLoS ONE.*, 2012. – V. 7. – P. 41300.
242. Muysen B.T.A., Janssen C.R. Importance of acclimation to environmentally relevant zinc concentrations on the sensitivity of *Daphnia magna* toward zinc. // *Environ. Toxicol. Chem.*, 2005. V. 24. – P. 895–901.
243. Nabarawy N.A., Desouky M.A.. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on liver and kidney of rats after exposure to 900 MHz electromagnetic field // *J. Am. Sci.*, 2011. № 7. – P. 937–944.

244. Nakamori T, Kubota Y, Ban-nai T, Fujii Y, YoshidS. Effects of acute gamma irradiation on soil invertebrates in laboratory tests // Radioprotection, 2009. № 44. – P. 421–424.
245. Nalecz-Jawecki G, Sawicki J. A comparison of sensitivity of Spirotox biotest with standard toxicity tests // Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2002. N 42. – P. 389–395.
246. NCRP. Effects of ionizing radiation on aquatic organisms. NCRP Report No. 109. Bethesda, MD: National Council on Radiation Protection and Measurements; 1991.
247. Niks M., Otto M. Towards an optimized MTT assay // J. Immunol. Methods. 1990. V. 130. № 1. – P. 149-151.
248. Ng CY, Pereira S, Cheng SH, Adam-Guillermin C, Garnier-Laplace J, Yu KN. Combined effects of depleted uranium and ionising radiation on zebrafish embryos // Radiat Prot Dosimetry, 2015. Pii: ncv269.
249. Nunes BS, Carvalho FD, Guilhermino LM, Van Stappen G. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. // Environ Pollut, 2006. V. 144. – P.453–62.
250. O'Dowd C, Mothersill CE, Cairns MT, Austin B, McClean B, Lyng FM, Murphy JE. The release of bystander factor(s) from tissue explant cultures of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) after exposure to radiation. // Radiation Research, 2006. V. 166. – P. 611–617.
251. O'Dowd C., Mothersill CE, Cairns MT. et al Gene Expression and Enzyme Activity of Mitochondrial Proteins in Irradiated Rainbow Trout (*Onchorhynchus Mykiss*, Walbaum) Tissues In Vitro.// Rad. Research., 2009. V.171. – P. 464–473.
252. OECD, 2011. Organisation for Economic Co-operation and Development. In: TestNo. 202: Daphnia Sp. Acute Immobilisation Test. OECD Publishing, Paris.

253. Oghiso Y, Tanaka S, Tanaka IB, Sato F. Experimental studies on the biological effects of low-dose-rate and low-dose radiation.// Int J Low Radiat, 2008. V. 5. – P. 55–59.
254. Oktem F., Ozguner F., Mollaoglu H., Koyu A., Uz E. Oxidative damage in the kidney induced by 900-MHz-emitted mobile phone: protection by melatonin // Arch. Med. Res., 2005. V. 36. – P. 350–355.
255. Ozguner F., Oktem F., Ayata A. et al. Comparative analysis of the protective effects of melatonin and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on mobile phone-induced renal impairment in rat // Mol. Cell. Biochem., 2005. V. 276. – P. 31–37.
256. Panagopoulos D.J. Analyzing the health impacts of modern telecommunications microwaves / In: L.V. Berhardt. Advances in Medicine and Biology, 2011. Vol. 17, Ch. 1. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers, Inc. – P. 1–50.
257. Panda N.K., Jain R., Bakshi J., Munjal S. Audiologic disturbances in long-term mobile phone // J. Otolaryngol. Head Neck Surg., 2010. № 39. – P. 5–11.
258. Parisot F., Bourdineaud J.P., Plaire D., Adam-Guillermin C., Alonzo F.. DNA alterations and effects on growth and reproduction in *Daphnia magna* during chronic exposure to gamma radiation over three successive generations // Aquat. Toxicol., 2015. N 163. P. 27–36.
259. Paulraj R., Behari J. The effect of low level continuous 2.45GHz waves on enzymes of developing rat brain // Electro- Magnetobiol., 2002. № 21. – P. 221–231.
260. Pentreath R.J. Radioecology, radiobiology, and radiological protection: frameworks and fractures // J. Environ. Radioact., 2009. V.100, N 12. P. 1019–1026.
261. Pesnya DS, Romanovsky AV. Comparison of cytotoxic and genotoxic effects of plutonium-239 alpha particles and mobile phone GSM 900 radiation in the *Allium cepa* test // Mutat Res., 2013. V. 750, N 1-2. P. 27-33.

262. Poynton H.C., Varshavsky J.R., Chang B., Cavigliolo G., Chan S., Holman P.S., Loguinov A.V., Bauer D.J., Komachi K., Theil E.C., Perkins E.J., Hughes O., Vulpe C.D., *Daphnia magna* ecotoxicogenomics provides mechanistic insights into metal toxicity. // Environ. Sci. Technol., 2007. V.41. – P. 1044–1050.
263. Plaire D., Bourdineaud J.P., Alonzo A., Camilleri V., Garcia-Sanchez L., Adam-Guillermin C., Alonzo F. Transmission of DNA damage and increasing reprotoxic effects over two generations of *Daphnia magna* exposed to uranium. Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol., 2013. V. 158, N 4. P. 231–243.
264. Qing-xia Niu, Cheng-yan Zhao, Zhi-an Jing An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity // J. Immunol. Methods. 2001. V. 251. № 1-2. – P. 11-19.
265. Ragy MM. Effect of exposure and withdrawal of 900-MHz-electromagnetic waves on brain, kidney and liver oxidative stress and some biochemical parameters in male rats // Electromagn Biol Med, 2014, Early Online: 1–6.
266. Repacholi M, Grigoriev Y, Buschmann J, Pioli C. Scientific basis for the Soviet and Russian radiofrequency standards for the general public. // Bioelectromagnetics, 2012. V. 33. – P. 623-633.
267. Real A, Sundell-Bergman S, Knowles JF, Woodhead DS, Zinger I. Effects of ionising radiation exposure on plants, fish and mammals: relevant data for environmental radiation protection. // J Radiol Prot., 2004. V. 24. – A123–37.
268. Repetto G., del Peso A., Zurita J.L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity // Nature protocols. 2008. V. 3. № 7. – P. 1125-1131.

269. Robichaud N.F., Sassine J., Beaton M.J., Lloyd V.K. The Epigenetic Repertoire of *Daphnia magna* Includes Modified Histones // Hindawi Publishing Corporation Genetics Research International. 2012.
270. Rodriguez A., Kimeldorf D.J. Behavioral and electrophysiological studies of radiation detection in a freshwater crustacean // Radiat. Res., 1976. V. 66, N 1. P. 134–146.
271. Sage C., Carpenter D.O. Public health implications of wireless technologies // Pathophysiology, 2009. V. 16. – P. 233–246.
272. Salbu B. Challenges in radioecology // J. Environ. Radioact., 2009. V. 100, N 12. P. 1086–1091.
273. Sánchez-Paz A., García-Carreño F., Hernández-López J., Muhlia-Almazán A., Yepiz-Plascencia G. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 2007. V. 340, N 2. P. 184–193.
274. Saravana Bhavan P., Geraldine P. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan // Aquat. Toxicol., 2000. V. 50, N 4. P. 331–339.
275. Sarookhani M.R., Asiabanha Rezaei M., Safari A. et al. The influence of 950MHz magnetic field (mobile phone radiation) on sex organ and adrenal functions of male rabbits // Afr. J. Biochem. Res., 2011. № 5. – P. 65–68.
276. Shaukat A., Harald G.J. van Mil, Michael K.R. Large-scale assessment of the zebrafish embryo as a possible predictive model in toxicity testing // PLOS ONE, 2011. V. 6. № 6. – P. 1-117.
277. Skulachev V.P., Antonenko Y.N., Bakeeva L.E., Chernyak B.V., Korshunova G.A., Senin I.I., Vyssokikh M.Yu., Yaguzhinsky L.S., Zorov D.B., Anisimov V.N., Elichev V.P., Filenko O.F., Severina I.I., Kalinina N.I., Kapelko V.I., Pisarenko O.I., Ruuge E.K., Kolosova N.G., Kopnin B.P., Lichinitser M.R. et al. An attempt to prevent senescence: a mitochondrial

- approach / Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics, 2009. T. 1787. № 5. C. 437-461
278. Soetaert A., Moens L.N., Van der Ven K., Van Leemput K., Naudts B., Blust R., De Coen W.M. Molecular impact of propiconazole on *Daphnia magna* using a reproduction-related cDNA array. // Comp. Biochem. Physiol., C: Toxicol. Pharmacol., 2006. V. 142. – P. 66–76.
279. Soetaert A., van der Ven K., Moens L.N., Vandebrouck T., van Remortel P., De Coen W.M., *Daphnia magna* and ecotoxicogenomics: gene expression profiles of the anti-ecdysteroidal fungicide fenarimol using energy-, molting- and life stage-related cDNA libraries. // Chemosphere, 2007 a. V. 67. – P. 60–71.
280. Soetaert A., Vandebrouck T., van der Ven K., Maras M., van Remortel P., Blust R., De Coen W.M. Molecular responses during cadmium-induced stress in *Daphnia magna*: integration of differential gene expression with higher-level effects. // Aquat. Toxicol., 2007 b. V. 83. – P. 212–222.
281. Sokolovic D., Djindjic B., Nikolic J., et al. Melatonin reduced oxidative stress induce by chronic exposure of microwave radiation from mobile phone in rat brain // J. Radiat. Res., 2008. № 49. – P. 579–586.
282. Smith J.T., Beresford N.A. Chernobyl. In: Catastrophe and Consequences. Springer-Praxis, Chichester., 2005.
283. Smyth G.K., Michaud J., Scott H.S. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments // Bioinformatics, 2005. V.21. – P. 2067-2075.
284. Stalin A., Broos K.V., Sadiq Bukhari A., Syed Mohamed H.E., Singhal R.K., Venu-babu P. Effects of ⁶⁰Co gamma irradiation on behavior and gillhistoarchitecture of giant fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii* (DEMAN) // Ecotoxicol. Environ. Saf., 2013 a. N 92. P. 155–160.
285. Stalin A., Broos K.V., Sadiq Bukhari A., Syed Mohamed H.E., Singhal R.K., Venu-Babu P. Morphological and histological studies on freshwater-

- prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de man) irradiated with ^{60}Co gamma radiation // *Aquat. Toxicol.*, 2013 b. N 144. P. 36–49.
286. Stark J.D., Banks J.E., Vargas R. How risky is risk assessment: The role that life history strategies play in susceptibility of species to stress // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004. V. 101, N 3. P. 732–736.
287. Stollewerk A. The water flea *Daphnia* – a “new” model system for ecology and evolution? // *Journal of Biology*, 2010. – V.9, № 2.
288. Streffer C. Transgenerational transmission of radiation damage: genomic instability and congenital malformation // *J. Radiat. Res.*, 2006. V. 47. – P.B19-B24.
289. Swart E. C., Bracht J. R., Magrini V., Minx P., Chen X., Zhou Y., Khurana J. S., Goldman A. D., Nowacki M., Schotanus K., Jung S., Fulton R. S., Ly A., McGrath S., Haub K., Wiggins J. L., Storton D., Matese J. C., Parsons L., Chang W. J., Bowen M. S., Stover N. A., Jones T. A., Eddy S. R., Herrick G. A., Doak T. G., Wilson R. K., Mardis E. R., Landweber L. F. The *Oxytricha trifallax* macronuclear genome: a complex eukaryotic genome with 16,000 tiny chromosomes // *Public Library of Science Biology*. – 2013. – Vol. 11. – № 1. – e1001473.
290. Tice R.R., Hook G.G., Donner M., McRee D.I., Guy A.W. Genotoxicity of radiofrequency signals. I. Investigation of DNA damage and micronuclei induction in cultured human blood cells // *Bioelectromagnetics*, 2002. № 23. – P. 113–126.
291. Timofeeff-Ressovsky N.W., Zimmer K.G., Delbruck M. Über die Natur der Genmutation und der Genstruktur // *Nachr. Gess. Wiss. Gottingen*. 1935. N.F.Bd.1. № 13. – S.189–245.
292. Timofeeff-Ressovsky NW, Zimmer KG. *Das Trefferprinzip in der Biologie*, Leipzig: S. Herzel Verlag; Lea DE. 1947. *Actions of radiations on living cells*. – New York: Cambridge University Press.

293. Ting A.H., McGarvey K.M., Baylin S.B. The cancer epigenome – components and functional correlates // *Genes Dev.*, 2006. Vol. 1. No 20(23). – P.3215-3231.
294. Tkalec M., Malaric K., Pavlica M., Pevalek-Kozlina B., Vidakovic-Cifrek Z. Effects of radiofrequency electromagnetic fields on seed germination and root meristematic cells of *Allium cepa* L. // *Mutation Research*, 2009. V.672. – P. 76–81.
295. Tokishita S., Kato Y., Kobayashi T., Nakamura S., Ohta T., Yamagata H. Organization and repression by juvenile hormone of a vitellogenin gene cluster in the crustacean, *Daphnia magna*. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006. V. 345. – P. 362–370.
296. Trapp J., Armengaud J., Pible O., Gaillard J.C., Abbaci K., Habtoul Y., Geffard O. Proteomic investigation of male gammarus fossarum, a freshwater crustacean, in response to endocrine disruptors // *J. Prot. Res.*, 2014. V. 14, N 1. P. 292–303.
297. Tsytsugina VG, Polikarpov GG. Radiological effects on populations of Oligochaeta in the Chernobyl contaminated zone. // *J Environ Radioact*, 2003. V. 66. – P.141–154.
298. Van Aggelen G., Ankley G.T., Baldwin W.S., Bearden D.W., Benson W.H., Chipman J.K., Collette T.W., Craft J.A., Denslow N.D., Embry M.R., Falciani F., George S.G., Helbing C.C., Hoekstra P.F., Iguchi T., Kagami Y., Katsiadaki I., Kille P., Liu L., Lord P.G., McIntyre T., O'Neill A., Osachoff H., Perkins E.J., Santos E.M., Skirrow R.C., Snape J.R., Tyler C.R., Versteeg D., Viant M.R., Volz D.C., Williams T.D., Yu L. Integrating omic technologies into aquatic ecological risk assessment and environmental monitoring: hurdles, achievements, and future outlook // *Environmental Health Perspectives*, 2010. Vol.118. – P.1-5.
299. Vandegheuchte M.B., Janssen C.R. Epigenetics and its implications for ecotoxicology // *Ecotoxicology*, 2011. Vol. 20. – P. 607–624.

300. Vandegehuchte M.B., De Coninck D., Vanderbrouck T., De Coen W.M., Janssen C.R. Gene transcription profiles, global DNA methylation and potential transgenerational epigenetic effects related to Zn exposure history in *Daphnia magna* // Environ Pollut, 2010a. Vol.158. – P. 3323–3329.
301. Vandegehuchte M.B., Kyndt T., Vanholme B., Haegeman, A., Gheysen, G., Janssen, C.R. Occurrence of DNA methylation in *Daphnia magna* and influence of multigeneration Cd exposure // Environ. Int. 2009a. – Vol. 35. – P.700–706.
302. Vandegehuchte M.B., Lemièrè F., Janssen C.R. Quantitative DNA-methylation in *Daphnia magna* and effects of multigeneration Zn exposure // Comp. Biochem. Physiol., Toxicol. Pharmacol. 2009 b. V.150. P.343–348.
303. Vandegehuchte M.B., Lemiere F., Vanhaecke L., Vanden W. Berghe and Janssen C.R. Direct and transgenerational impact on *Daphnia magna* of chemicals with a known effect on DNA methylation // Comparative Biochemistry and Physiology, 2010 b. Vol. 151. – P. 278–285.
304. Vandegehuchte M.B., Vandenbrouck T., De Coninck D., De Coen W.M., Janssen C.R. Can metal stress induce transferable changes in gene transcription in *Daphnia magna*? // Aquatic Toxicology, 2010 c. Vol. 97. – P.188–195.
305. Van Meerloo J., Kaspers G.J.L., Cloos J. Cell sensitivity assays: The MTT assay, in: I.A. Cree (Eds.), Cancer Cell Culture: Methods and Protocols, second ed., Springer Science+Business Media, New York, 2011. – P.237-246.
306. Verschaeve L., Juutilainen J., Lagroye I., Miyakoshi J., Saunders R., de Seze R., Tenforde T., van Rongen E., Veyret B., Xu Z. In vitro and in vivo genotoxicity of radiofrequency fields // Mutation Research 2010. V. 705. – P. 252–268.
307. Yao K., Wu W., Wang K., Ni S., Ye P., Yu Y., Ye J., Sun L. Electromagnetic noise inhibits radiofrequency radiation-induced DNA damage and re-

- active oxygen species increase in human lens epithelial cells // *Mol. Vis.*, 2008. V. 14. – P 964–969.
308. Wang J., Zhang Y., Xu K., Mao X., Xue L., Liu X., Yu H., Chen L., Chu X. Genome-wide screen of DNA methylation changes induced by low dose X-ray radiation in mice // *PLoS One*, 2014. Vol. 10, Is. 9(3). – P.90804.
309. Wichterman R. *The Biology of Paramecium*. – NY: Springer. 1986.
310. Won E.J., Lee J.S. Gamma radiation induces growth retardation, impaired egg production, and oxidative stress in the marine copepod *Paracyclops nana* // *Aquat. Toxicol.*, 2014. N150. P. 17–26.
311. Woodhead DS. *Environmental dosimetry: The current position and the implications for developing a framework for environmental protection*. Bristol, UK: Environment Agency; 2000. 48 p.
312. Wu Y, Zhou Q. Dose- and time-related changes in aerobic metabolism, chorionic disruption, and oxidative stress in embryonic medaka (*Oryzias latipes*): Underlying mechanisms for silver nanoparticle developmental toxicity // *Aquat. Toxicol.* 2012. V. 15. No 124-125. – P.238-246.
313. UNSCEAR. 2008. *Effects of Ionizing Radiation. Annex C. Non-Targeted and Delayed Effects of Exposure to Ionizing Radiation*, United Nations, New York.
314. Zeman FA, Gilbin R, Alonzo F, Lecomte-Pradines C, Garnier-Laplace J, Aliaume C. Effects of waterborne uranium on survival, growth, reproduction and physiological processes of the freshwater cladoceran *Daphnia magna* // *Aquat Toxicol* 2008. Vol. 86. – P. 370–378.
315. Zmyslony M., Politanski P., Rajkowska E., Szymczak W., Jajte J. Acute exposure to 930MHz CW electromagnetic radiation in vitro affects reactive oxygen species level in rat lymphocytes treated by iron ions // *Bioelectromagnetics*, 2004. № 25. – P. 324–328.
316. Xing Y., Shi S., Le L., Lee C.A., Silver-Morse L., Li W.X. Evidence for transgenerational transmission of epigenetic tumor susceptibility in *Drosophila* // *PLoS Genetics*, 2007. Vol. 3, No. 9. – P. 1598–1606.