



Check for updates

Экспериментальные статьи

УДК 57.04

EDN АМЕККЕ

<https://doi.org/10.33910/2687-1270-2023-4-3-367-372>

Распределение супероксиддисмутазы-1 в мозге медоносной пчелы при действии электромагнитного излучения 2,4 ГГц

Т. Г. Зачепило ^{✉1}, А. К. Прибышина ¹

¹ Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

Сведения об авторах

Татьяна Геннадьевна Зачепило, SPIN-код: [7746-2208](https://orcid.org/0000-0001-6350-7050), Scopus AuthorID: [6506211770](https://orcid.org/6506211770), ORCID: [0000-0001-6350-7050](https://orcid.org/0000-0001-6350-7050), e-mail: polosataya2@mail.ru

Алиса Кирилловна Прибышина, e-mail: alisa_pribyshina@mail.ru

Для цитирования: Зачепило, Т. Г., Прибышина, А. К. (2023) Распределение супероксиддисмутазы-1 в мозге медоносной пчелы при действии электромагнитного излучения 2,4 ГГц. *Интегративная физиология*, т. 4, № 3, с. 367–372. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2023-4-3-367-372> EDN АМЕККЕ

Получена 19 июля 2023; прошла рецензирование 22 сентября 2023; принята 16 октября 2023.

Финансирование: Исследование было выполнено в рамках государственного задания Института физиологии им. И. П. Павлова РАН при поддержке Государственной программы РФ 47 ГП «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019–2030) (тема 0134-2019-0004) с привлечением ресурсов ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем» и «Конфокальная микроскопия».

Права: © Т. Г. Зачепило, А. К. Прибышина (2023). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии [CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Аннотация. Одним из возможных путей негативного влияния высокочастотных электромагнитных излучений может быть окислительный стресс. В данной статье рассматривается влияние электромагнитного излучения Wi-Fi роутера 2,4 ГГц на цитоплазматический антиоксидантный фермент супероксиддисмутазу-1 в головном мозге медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.). Пчела — основной опылитель сельскохозяйственных культур — особо чувствительна к действию электромагнитных излучений в связи с необходимостью их использования в естественной среде обитания в процессе жизнедеятельности. Облучение проводили в течение одного часа. Контролем служили пчелы, не подвергавшиеся облучению. Далее мозг извлекали и с помощью иммуногистохимического окрашивания и флюоресцентной микроскопии оценивали распределение и содержание супероксиддисмутазы-1 на срезах мозга пчелы в области грибовидных тел — структуры, отвечающей за обучение и память. Обнаружено, что после одночасового воздействия происходит снижение содержания супероксиддисмутазы-1 по сравнению с контрольной группой. Полученные результаты указывают на возможное нарушение антиоксидантной защиты в нервной ткани пчел при воздействии высокочастотного электромагнитного излучения частотой 2,4 ГГц. Для более полного понимания механизмов влияния электромагнитных излучений на ЦНС пчелы необходимы дальнейшие исследования.

Ключевые слова: медоносная пчела, электромагнитное излучение, мозг, окислительный стресс, супероксиддисмутазы-1

Distribution of superoxide dismutase 1 in the honeybee brain under the action of electromagnetic radiation of 2.4 GHz

T. G. Zachepilo ¹, A. K. Pribyshina¹

¹ Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

Authors

Tatiana G. Zachepilo, SPIN: [7746-2208](https://orcid.org/0000-0001-6350-7050), Scopus AuthorID: [6506211770](https://orcid.org/6506211770), ORCID: [0000-0001-6350-7050](https://orcid.org/0000-0001-6350-7050), e-mail: polosataya2@mail.ru

Alisa K. Pribyshina, e-mail: alisa_pribyshina@mail.ru

For citation: Zachepilo, T. G., Pribyshina, A. K. (2023) Distribution of superoxide dismutase 1 in the honeybee brain under the action of electromagnetic radiation of 2.4 GHz. *Integrative Physiology*, vol. 4, no. 3, pp. 367–372. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2023-4-3-367-372> EDN [AMEKKE](https://orcid.org/AMEKKE)

Received 19 July 2023; reviewed 22 September 2023; accepted 16 October 2023.

Funding: The study was carried out as part of the state-commissioned assignment of the Pavlov Institute of Physiology RAS. It was supported by Government Program of the Russian Federation 47 GP Scientific and Technological Development of the Russian Federation (2019-2030) (theme 0134-2019-0004). The research team made use of the resources of the centers for collective use “Biocollection of the IF RAS for the Study of Integrative Mechanisms of Nervous and Visceral Systems” and “Confocal Microscopy”.

Copyright: © T. G. Zachepilo, A. K. Pribyshina (2023). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under [CC BY-NC License 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Abstract. Oxidative stress is one of the possible negative effects of high frequency electromagnetic fields. The reported study, in particular, investigates the effect of 2.4 GHz Wi-Fi router electromagnetic radiation on the cytoplasmic antioxidant enzyme superoxide dismutase 1 in the brain of the honeybee (*Apis mellifera* L.). The honeybee, the main pollinator of agricultural crops, is especially sensitive to electromagnetic fields due to the need to use it in its in the natural conditions in the process of life. The honeybees were exposed to radiation for 1 hour. The control honeybees were not exposed to radiation. Next, the brain was removed and, using immunohistochemical staining and fluorescence microscopy, the distribution and content of superoxide dismutase 1 were assessed on sections of the honeybee brain in the region of mushroom bodies — a structures responsible for learning and memory. It was found that after 1 hour exposure there is a decrease in the content of superoxide dismutase-1 level compared to the control group.

The obtained results point at a possible disturbance of antioxidant protection in the nervous tissue of bees under the influence of 2.4 GHz high-frequency electromagnetic radiation. For a more complete understanding of the mechanisms of the influence of electromagnetic radiation on the honeybee central nervous system, further research is needed.

Keywords: honeybee, electromagnetic radiation, brain, oxidative stress, superoxide dismutase 1

Введение

По мере развития и расширения разнообразных беспроводных средств коммуникации изменяется электромагнитный фон в окружающей среде. Ряд исследований продемонстрировал негативные эффекты действия высокочастотных электромагнитных излучений (ЭМИ) на представителей животного и растительного мира (Valmori 2021; Cucurachi et al. 2013; Saliev et al. 2018). Одним из таких организмов является медоносная пчела *Apis mellifera* L. — важнейший опылитель сельскохозяйственных культур. Ранее показано, что низко- и высокочастотные ЭМИ ухудшают репродукцию в пчелиных семьях и влияют на поведение (Favre 2011; Halabi et al. 2013; Kumar et al. 2011). В частности, показано негативное влияние ЭМИ 2,4 ГГц на пищевую возбудимость и кратко-

временную память медоносной пчелы (Lorantina et al. 2019). Однако до сих пор неизвестно, какие изменения на клеточном уровне приводят к таким последствиям.

Возможным последствием воздействия ЭМИ на организм может быть окислительный стресс. ЭМИ может вызывать генерацию свободных радикалов, изменяя окислительно-восстановительное состояние компонентов клетки (например, активность митохондрий и некоторых ферментов) и/или формирование ион-радикальных пар в белках-криптохромах; или опосредованно через потенциал-чувствительные каналы, кальций-зависимые белки и др. Окислительные стрессовые эффекты ЭМИ рассмотрены в обзоре (Schuermann, Mevissen 2021). Защиту от него обеспечивают антиоксидантные системы: ферментативные (супероксиддисмутаза, пероксидаза, каталаза, глутатионредуктаза,

глутатионпероксидаза) и неферментативные (глутатион, витамины С и Е, тиолы и др.). Основным механизмом антиоксидантной защиты в нормальных условиях являются ферменты супероксиддисмутазы (СОД), катализирующие реакцию дисмутации супероксидных анион-радикалов.

У медоносных пчел показано наличие генов для различных антиоксидантных систем, в том числе цитоплазматической супероксиддисмутазы-1 (*sod1*) и митохондриальной супероксиддисмутазы-2 (*sod2*) (Corona, Robinson 2006). Активность и экспрессия СОД различается в нормальных условиях в зависимости от возраста и касты пчелиной особи. В семье пчел уровень пероксидов-ионов и перекиси водорода выше у часто летающих особей вследствие увеличения потребления кислорода и усиления метаболизма при полете, хотя уровень супероксиддисмутазы не различается (Margotta et al. 2018). Кроме того, наблюдается относительно высокая экспрессия цитоплазматической супероксиддисмутазы *sod1* у рабочих пчел по сравнению с матками (Kramer et al. 2021). При действии внешних неблагоприятных факторов разнонаправленно изменяется активность антиоксидантных систем в ЦНС пчел. Так, обнаружено понижение уровня супероксиддисмутазы-1 и других антиоксидантных ферментов в протеоме головы пчел в ответ на действие пестицидов, что свидетельствует о протекающем окислительном стрессе (Zaluski et al. 2020). Выявлено дозозависимое повышение активности СОД в гомогенате мозга пчел в ответ на облучение гамма-лучами (Gagnaire et al. 2019).

Целью нашего исследования было изучение распределения и содержания фермента супероксиддисмутазы-1 в мозге пчел после однократного воздействия ЭМИ 2,4 ГГц.

Материал и методы

Материал

10–30-суточные рабочие особи медоносной пчелы краинской расы *Apis mellifera carnica* Pollm (отряд перепончатокрылые *Hymenoptera*). Источник — пасека Института физиологии им. И. П. Павлова РАН (ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем»).

Условия содержания

Пчел содержали в наблюдательном улье, состоявшем по величине $\frac{1}{4}$ часть нормального

улья, в условиях свободного доступа к пище и воде, при постоянной температуре 30 °С. Использовали стандартный световой режим (12 ч:12 ч), независимо от времени года.

Группы пчел

В экспериментах изучены две группы: контрольная (пчелы, не подвергавшиеся облучению) и опытная (пчелы, находившиеся 1 час под излучающим роутером с частотой ЭМИ 2,4 ГГц).

Экспозиция ЭМИ

Источник излучения — Wi-Fi роутер Linksys E1200EE (частота — 2,4 ГГц, мощность — 16,5 dBm, две внутренние антенны, коэффициент усиления — dBi: 4 dBi, стандарт Wi-Fi — 802,11 b/g/n). Излучение этой модели роутера, аналогично другим бытовым Wi-Fi устройствам, может распространяться на десятки метров за пределы здания. Роутер размещали на фанерной полке в клетке Фарадея. Пробирку с пчелами — под полкой с роутером на расстоянии 30 см. Напряженность электромагнитного поля (ЭМП) в месте размещения пробирок с пчелами составляла 20 мВ/м. Облучение проводили в течение часа.

Приготовление парафиновых срезов

Насекомых подвергали холодовому наркозу. Охлажденным пчелам вскрывали головную капсулу и выделяли мозг. Далее фиксировали в 4% формалине 3 часа при комнатной температуре. После фиксации препарат промывали в фосфатном буфере (PBS, pH = 7,5) в течение 1 часа. Проводили через серию спиртов (по 30 мин в каждом из спиртов) возрастающей концентрации (40% — 70% — 96%). Промывали препарат в абсолютном спирте 2 раза по 15 минут. Переносили препарат в ксилол и оставляли на ночь при комнатной температуре. Переносили препарат в смесь ксилола и парафина (50:50) и инкубировали в течение 1 часа при 65 °С. Инкубировали препарат в парафине-1 и парафине-2 в течение 1 часа и 2 часов соответственно при 65 °С. Заливали в парафиновые блоки. Далее готовили парафиновые срезы по стандартной методике на желатинизированном стекле. Количество срезов на каждом стекле — не менее 15. Толщина срезов — 7 мкм.

Иммуногистохимическое окрашивание срезов

Депарафинизировали срезы в ксилоле (2 раза по 15 мин) и в спиртах с убывающей концентрацией (96% — 70% — 40% по 10 мин). Депарафинизированные срезы промывали дистиллированной

водой. Производили вскрытие антигенов в течение 10 минут в 0,03 М цитратном буфере (рН = 6) в микроволновой печи (450 Вт). Промывали дистиллированной водой, а затем буфером РВТ (PBS + 0,1% Triton). Производили блокировку срезов в нормальной блокировочной сыворотке (*Normal blocking serum*, Vector) во влажной камере в течение 2 часов при 25 °С. Инкубировали срезы с первичными антителами к SOD1 (Abcam) во влажной камере в течение ночи при +4 °С (разведение 1:200). Промывали РВТ. Инкубировали срезы с вторичными антителами, конъюгированными с ФИТЦ (Santa Cruz) 2 часа во влажной камере при +4 °С (разведение 1:500). После промывания в PBS инкубировали с DAPI 30 минут при комнатной температуре. Промывали PBS. Заключали препараты в глицерин. Полученные постоянные препараты анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии (LSM 710, Carl Zeiss, ЦКП «Конфокальная микроскопия»). Учитывали распределение окраски в грибовидных телах: в нейропиле (каликсах) и внутренних клетках Кеньона (нейроны грибовидных тел, расположенные внутри каликсов).

Обработка данных

Оптическую плотность на микрофотографиях измеряли с помощью программы ImageJ (NCBI). Далее сравнивали оптическую плотность каликсов и нейронов в контрольной и опытной группах. Статистическую обработ-

ку данных проводили с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни в программе Past 4.10.

Результаты и обсуждение

Изучали распределение и содержание супероксиддисмутазы-1 в мозге медоносной пчелы, в частности, в области грибовидных тел — структур, обеспечивающих обучение и формирование памяти у насекомых. Как в контроле, так и в эксперименте наблюдалась флуоресценция по всему срезу. В области грибовидных тел фермент был распределен как в каликсах, так и во внутренних и наружных клетках Кеньона (нейронах, окружающих каликсы грибовидных тел снаружи). Сходная картина распределения фермента наблюдалась в контрольной и опытной группах. Не было обнаружено выраженных различий по содержанию СОД между каликсами и нейронами. Однако после одночасового действия ЭМИ содержание СОД снижалось по сравнению с контрольной группой ($p = 0,0157$). Сходная картина наблюдалась и при сравнении окрашивания во внутренних клетках Кеньона ($p = 0,0404$) (рис. 1).

Увеличение количества свободных радикалов / активных форм кислорода приводит к активации систем антиоксидантной защиты, а также к синтезу их компонентов. Супероксиддисмутазы относятся к ферментам первой линии антиоксидантной защиты. В ходе дисмутации суперок-

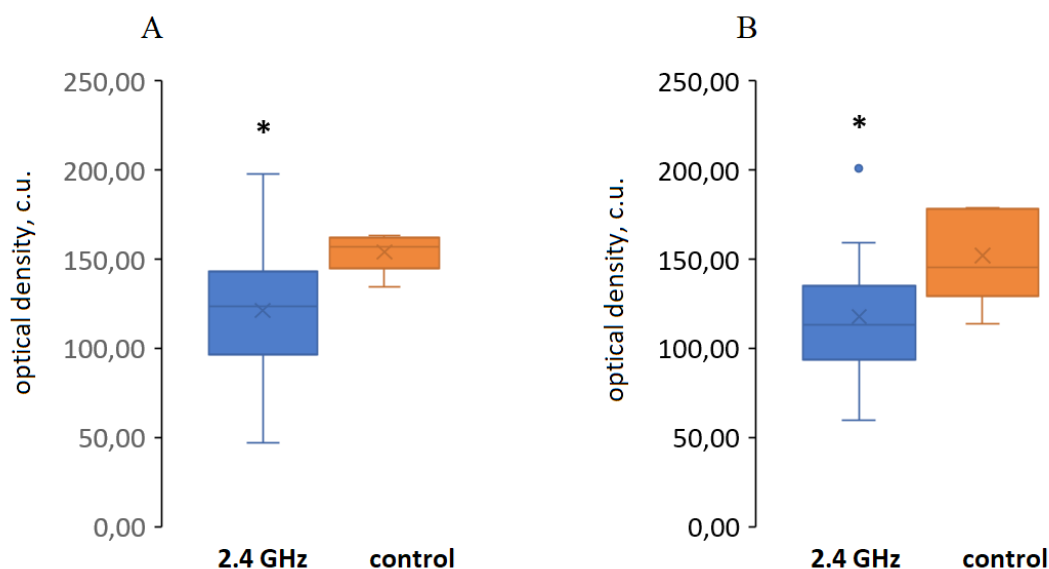


Рис. 1. Влияние ЭМИ 2,4 ГГц на содержание супероксиддисмутазы-1 в каликсах (А) и внутренних клетках Кеньона (В) грибовидных тел. * — $p \leq 0,05$

Fig. 1. Effect of 2.4 GHz EMR on the superoxide dismutase 1 level in calyxes (A) and internal Kenyon cells (B) of mushroom bodies. * — $p \leq 0,05$

сидного радикала спонтанно образуются кислород и пероксид водорода. Повышение содержания пероксида водорода в среде приводит к ингибированию СОД и далее к ее деградации (Halliwell, Gutteridge 2015). Таким образом, на ранних стадиях оксидативного стресса возможно снижение количества СОД, что мы и наблюдаем после одночасового воздействия. Также возможно, что защита от окислительного стресса в этот период может осуществляться другими антиоксидантами (митохондриальной супероксиддисмутазой-2, пероксидазами, каталазами, глутатионом и др.). Однако в литературе отсутствуют сведения о динамике антиоксидантной защиты у медоносных пчел, что не позволяет однозначно объяснить полученные результаты и сделать вывод о протекании окислительного стресса после одночасового облучения. Согласно источникам, использованный диапазон ЭМИ может влиять на уровень активных форм кислорода. Так, при облучении пчел низкочастотным ЭМП 50 Гц в гемолимфе рабочих пчел уже через 1 час наблюдается повышение активности супероксиддисмутазы и каталазы. По мнению авторов, низкочастотные ЭМИ могут нарушать регуляцию энергетического метаболизма в митохондриях, подобно акарицидам, и усиливать процессы, связанные с перехватом активных форм кислорода и связыванием ионов (Migdał et al. 2020).

На личинках медоносных пчел было изучено влияние радиочастотного диапазона ЭМИ (900 МГц, напряженность 10, 23, 41 и 120 В/м⁻¹ в течение 2 часов) (Vilić et al. 2017). Активность каталазы и уровень перекисного окисления липидов значительно снизились у личинок медоносных пчел, подвергшихся воздействию немодулированного поля при 10 В/м⁻¹, по сравнению с контролем. Активность супероксиддисмутазы и глутатион-S-трансферазы у личинок медоносных пчел, подвергшихся воздействию немодулированных полей, статистически не различалась по сравнению с контролем. Повреждение ДНК значительно увеличилось у личинок медоносных пчел, подвергшихся воздействию модулированного поля при 23 В/м⁻¹ по сравнению с контролем. При этом повышение напряженности поля не вызвало линейной за-

висимости «доза — реакция» ни по одному из измеренных параметров. Модулированное электромагнитное поле вызывало больше отрицательных эффектов, чем немодулированное.

Активация различных систем антиоксидантной защиты при действии ЭМИ с разными параметрами указывает на различные механизмы антиоксидантной защиты и различные повреждающие эффекты. Также ЭМИ с разной частотой имеют различную проникающую способность, что было исследовано у пчел (Thielens et al. 2020).

Таким образом, реакция нервной ткани пчелы на действие электромагнитных излучений может зависеть от параметров ЭМИ и длительности облучения и требует дальнейшего исследования.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального или явного конфликта интересов.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest, either existing or potential.

Вклад авторов

Авторы участвовали в подготовке статьи в равной степени.

Author Contributions

The authors participated in the preparation of the article equally.

Благодарности

Авторы крайне признательны Б. Ф. Щеголеву, С. В. Сурме и В. А. Муровцу за предоставленное оборудование.

Acknowledgements

The authors are very grateful to B. F. Shchegolev, S. V. Surma and V. A. Murovets for the provided equipment.

References

- Balmori, A. (2021) Electromagnetic radiation as an emerging driver factor for the decline of insects. *Science of The Total Environment*, vol. 767, article 144913. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144913> (In English)
- Corona, M., Robinson, G. E. (2006) Genes of the antioxidant system of the honey bee: Annotation and phylogeny. *Insect Molecular Biology*, vol. 15, no. 5, pp. 687–701. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00695.x> (In English)

- Cucurachi, S., Tamis, W. L., Vijver, M. G. et al. (2013) A review of the ecological effects of radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF). *Environment International*, vol. 51, pp. 116–140. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.10.009> (In English)
- Favre, D. (2011) Mobile phone-induced honeybee worker piping. *Apidologie*, vol. 42, no. 3, pp. 270–279. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0016-x> (In English)
- Gagnaire, B., Bonnet, M., Tchamitchian, S. et al. (2019) Physiological effects of gamma irradiation in the honeybee, *Apis mellifera*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 174, pp. 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.031> (In English)
- Halabi, N. E., Achkar, R., Haidar, G. A. (2013) The effect of cell phone radiations on the life cycle of honeybees. In: *2013 IEEE Eurocon conference (1–4 July 2013): In 3 vols. Vol. 1*. Zagreb: IEEE Publ., pp. 529–536. <https://doi.org/10.1109/EUROCON.2013.6625032> (In English)
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (2015) *Free radicals in biology and medicine*. 5th ed. [S. l.]: Oxford University Press. [Online]. Available at: <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001> (accessed 15.10.2023). (In English)
- Kramer, B. H., Nehring, V., Buttstedt, A. et al. (2021) Oxidative stress and senescence in social insects: A significant but inconsistent link? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 376, no. 1823, article 20190732. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0732> (In English)
- Kumar, N. R., Sangwan, S., Badotra, P. (2011) Exposure to cell phone radiations produces biochemical changes in worker honey bees. *Toxicology International*, vol. 18, no. 1, pp. 70–72. (In English)
- Lopatina, N. G., Zachepilo, T. G., Kamyshev, N. G. et al. (2019) Vliyanie neioniziruyushchego elektromagnitnogo izlucheniya na povedenie medonosnoj pchely *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) [Effect of non-ionizing electromagnetic radiation on the honeybee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) behaviour]. *Entomologicheskoe obozrenie*, vol. 98, no. 1, pp. 35–43. <https://doi.org/10.1134/S0367144519010039> (In Russian)
- Margotta, J. W., Roberts, S. P., Elekonich, M. M. (2018) Effects of flight activity and age on oxidative damage in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology*, vol. 221, no. 14, article jeb183228. <https://doi.org/10.1242/jeb.183228> (In English)
- Migdał, P., Roman, A., Strachecka, A. et al. (2020) Changes of selected biochemical parameters of the honeybee under the influence of an electric field at 50 Hz and variable intensities. *Apidologie*, vol. 51, pp. 956–967. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00774-1> (In English)
- Saliev, T., Begimbetova, D., Masoud, A.-R., Matkarimov, B. (2018) Biological effects of non-ionizing electromagnetic fields: Two sides of a coin. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, vol. 141, pp. 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.07.009> (In English)
- Schuermann, D., Mevissen, M. (2021) Manmade electromagnetic fields and oxidative stress — biological effects and consequences for health. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 7, article 3772. <https://doi.org/10.3390/ijms22073772> (In English)
- Thielens, A., Greco, M. K., Verloock, L. et al. (2020) Radio-frequency electromagnetic field exposure of western honey bees. *Scientific Reports*, vol. 10, article 461. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56948-0> (In English)
- Vilić, M., Tlak, G. I., Tucak, P. et al. (2017) Effects of short-term exposure to mobile phone radiofrequency (900 MHz) on the oxidative response and genotoxicity in honey bee larvae. *Journal of Apicultural Research*, vol. 56, no. 4, pp. 430–438. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1329798> (In English)
- Zaluski, R., Bittarello, A. C., Vieira, J. C. S. et al. (2020) Modification of the head proteome of nurse honeybees (*Apis mellifera*) exposed to field-relevant doses of pesticides. *Scientific Reports*, vol. 10, article 2190. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59070-8> (In English)