

**UNIWERSYTET ROLNICZY
im. HUGONA KOŁŁĄTAJA w KRAKOWIE
WYDZIAŁ HODOWLI I BIOLOGII ZWIERZĄT**



mgr inż. Weronika Kanik-Schaller

**WPLYW DEPRYWACJI POLA GEOMAGNETYCZNEGO NA
WYBRANE PARAMETRY FIZJOLOGICZNE I BEHAWIORALNE
SZCZURA LABORATORYJNEGO (*RATTUS NORVEGICUS*)**

Autoreferat rozprawy doktorskiej wykonanej
w Katedrze Zoologii i Dobrostanu Zwierząt

Promotor:

dr hab. inż. Barbara Tombarkiewicz, prof. URK

Promotor pomocniczy:

dr Adam Roman, IF PAN, Kraków

KRAKÓW 2023

1. Wstęp

Warunki środowiskowe są ważnym elementem kształtującym dobrostan zwierząt, który jest definiowany jako stan zdrowia fizycznego i psychicznego. Ziemia ma wiele cech, które warunkują rozwój i ewolucję życia na planecie. Najbardziej stabilnymi tzw. brzegowymi warunkami naturalnymi Ziemi (choć nie jednolitymi w różnych miejscach naszej planety), są: pole grawitacyjne oraz pole geomagnetyczne [Hart 2023]. Pole magnetyczne Ziemi (PGM) tworzy osłonę zwaną geomagnetosferą, która rozpościera się w przestrzeni kosmicznej i chroni Ziemię przed promieniowaniem kosmicznym i wiatrem słonecznym, który nieustannie wieje w jej kierunku z prędkością sięgającą na granicy atmosfery około 400 km/s. Uważa się, że pole geomagnetyczne nie tylko chroni życie na Ziemi przed silnym promieniowaniem jonizującym z przestrzeni kosmicznej, ale bezpośrednio i pośrednio mogło również przyczynić się do jego powstania. Jego pośrednia rola wiązana jest ze stabilizującym wpływem na środowisko, w którym rozwijało się życie. Dotyczy ono ochrony atmosfery, a tym samym utrzymania w miarę stabilnych parametrów środowiska, m.in. wahań temperatury, składu atmosfery, warstwy ozonowej i utrzymania wody w stanie ciekłym [Erdmann i in. 2021]. Pole geomagnetyczne jest również „wszechobecnym czynnikiem koordynującym w czasie i przestrzeni” [Kopanev i in. 1979], a organizmy żywe, które rozwijały się w stałej obecności pola geomagnetycznego, w trakcie rozwoju filogenetycznego wykształciły mechanizmy detekcji tego pola [Rauscher i Bise 1999; Lohmann i Johnsen 2000] i wykorzystują je jako wskazówkę sensoryczną do migracji, ułożenia ciała lub poszukiwania pożywienia [Chae i in. 2022].

Generalnie przyjmuje się, że PGM w 99% ma charakter pola stałego, a wielkościami, które je charakteryzują jest przede wszystkim indukcja magnetyczna, której wartość zmienia się w zależności od szerokości geograficznej (od około 25 do 65 μT) [Finlay i in. 2010] oraz natężenie pola przybierające wartości od około 24 do 48 A/m. W Polsce przyjmuje się średnie wartości indukcji PGM w granicach 38 – 48 μT , a jego natężenie wynosi ok. 40 A/m [Wojtusiak i Majlert 1992]. Życie powstało w polu magnetycznym Ziemi, a podczas procesu ewolucyjnego trwającego miliony lat żywe organizmy przystosowały się do jego obecności, [Sinčák i Sedlakova-Kadukova 2023] i rozwinęły zdolność wykrywania oraz wykorzystywania tego pola, a także często w zauważalny sposób reagują na jego zaburzenia [Michon i in. 1996; Tombarkiewicz 2010; Binhi i Prato 2017; Sinčák i Sedlakova-Kadukova 2023]. Z dotychczas przeprowadzonych badań wynika, że istnieje ścisły związek pomiędzy zaburzeniami pola magnetycznego a przebiegiem procesów życiowych na Ziemi. Uwidacznia się to w rytmie przebiegu procesów fizjologicznych, biofizycznych i genetycznych [Burch i in. 1999; Zhadin 2001; Babayev i Allahverdiyeva 2007]. Zaburzenia PGM mogą mieć pochodzenie naturalne, związane głównie z aktywnością Słońca i Księżyca (cyklem dobowym, rocznym) [Correia i de Souza 2005], zmianami prądów w jądrze

Ziemi oraz miejscowymi zaburzeniami występującymi na obszarach aktywności sejsmicznej, cieków wodnych i złóż niektórych minerałów [Hołownia 1993; Alva-Valdivia i in. 2003, oraz pochodzenie antropogenne. Tłumienie pola geomagnetycznego występuje w budynkach ze stalowymi ścianami oraz w budynkach ze stalowym zbrojeniem [Binhi i Prato 2017]. Metalowe elementy konstrukcji oraz wyposażenia budynków mogą osłabiać naturalne, ziemskie pole magnetyczne stukrotnie, a nawet więcej [Tsunomura i Tokumoto 2005]. Skutki deprivacji PGM mogą dotyczyć zarówno ludzi, jak i zwierząt hodowlanych utrzymywanych w systemach przemysłowym i półprzemysłowym, a także zwierząt laboratoryjnych utrzymywanych w polipropylenowych klatkach usytuowanych na metalowych regałach [Tombarkiewicz 2008, 2010; Roman i Tombarkiewicz 2009; Tombarkiewicz i in. 2018]. W świetle powyższego, poznanie zagrożeń spowodowanych zaburzeniami pola geomagnetycznego oraz specyfiki ich oddziaływań na organizmy zwierząt, roślin i mikroorganizmów jest z wielu powodów ważnym i aktualnym zagadnieniem, bowiem dotyczą one zdrowia i produktywności zwierząt (oraz ludzi), a w przypadku zwierząt laboratoryjnych mogą również zaburzać obraz wyników uzyskanych w prowadzonych eksperymentach. Zaburzenie lub ekranowanie PGM jest swoistego rodzaju deprivacją sensoryczną od czynnika normalnie oddziałującego na organizm, dlatego też może naruszać jego homeostazę, zaburzać dobrostan i działać stresogennie. Prawdopodobnie, tak jak i informacja świetlna, PGM wpływa na dobowy rytm funkcjonowania organizmu oraz oddziałuje na centralny układ nerwowy, a to oznacza, że poprzez szyszynkę i autonomiczny układ nerwowy może wpływać na układ neuroendokryny, a tym samym oddziaływać na cały organizm, w tym także na układ odpornościowy.

W dotychczasowych badaniach wykazano m.in. wpływ zaburzeń PGM na gospodarkę mineralną organizmu, zaburzenia rozrodu, wybrane wskaźniki hematologiczne i biochemiczne krwi, zmiany histopatologiczne w wielu tkankach, pojawienie się anatomicznych anomalii we wczesnych stadiach rozwojowych płazów i ssaków, spowolnienie metabolizmu, utrata sierści, choroby przewodu pokarmowego zaburzenia snu, zachowanie zwierząt oraz takie funkcje ludzkiego mózgu, jak uczenie się i zapamiętywanie [Conley 1970; Kopanov i in. 1979; Asashima i in. 1991; Tombarkiewicz 2010, 2018; Fassenko 2010; Binhi i Sarimov 2013; Ding i in. 2019; Erdmann i in. 2021].

Celem badań podjętych w niniejszej pracy było określenie, czy deprivacja pola geomagnetycznego wpływa na homeostazę organizmu zwierzęcego, na przykładzie szczura laboratoryjnego (*Rattus norvegicus*).

Dla zrealizowania postawionego celu sformułowano następujące hipotezy badawcze:

- 1 Deprywacja pola geomagnetycznego wpływa na fizjologiczne parametry krwi oraz behavior szczurów laboratoryjnych.
- 2 Deprywacja pola geomagnetycznego wywiera wpływ na wybrane parametry reaktywności immunologicznej szczura laboratoryjnego
- 3 Pole geomagnetyczne wywiera wpływ na okołodobową cykliczność zmian w organizmie zwierząt

Material i metody

Badania przeprowadzono w dwóch etapach, w których materiał biologiczny stanowiło łącznie 96 szczurów laboratoryjnych szczepu Wistar. W każdym etapie badań, po okresie adaptacyjnym, szczury zostały podzielone na dwie równoliczne grupy (po 48 szt.): grupę kontrolną (24 osobniki) – szczury utrzymywano w polipropylenowych klatkach, w standardowych warunkach tj. temperaturze około 21°C, wilgotności względnej około 55%, w cyklu świetlnym 12 godz. światła (L) i 12 godz. ciemności (D); oraz grupę eksperymentalną (24 osobniki), która utrzymywana była w identycznych warunkach bytowych, ale w warunkach deprywacji PGM, które uzyskano poprzez umieszczenie polipropylenowych klatek ze zwierzętami w specjalnie skonstruowanych klatkach ekranujących pole geomagnetyczne (Roman i Tombarkiewicz 2009). Każdą grupę podzielono losowo na dwie równoliczne podgrupy (po 12 szt.): jedną stanowiły szczury, od których krew do badań pobierano w dzień (w godz. 12:00 – 15:00), a drugą szczury, od których krew do analiz pobierano w nocy (w godz. 24:00 – 3:00). W pierwszym dniu eksperymentu każdego etapu szczury zważono oraz pobrano od nich krew (w układzie odpowiednim dla podgrup). Ważenie szczurów oraz pobieranie krwi do analiz hematologicznych i biochemicznych przeprowadzono jeszcze trzykrotnie, w dwutygodniowych odstępach. W fazie ciemnej krew pobierano przy świetle czerwonym. Krew do analiz pobierano z żyły ogonowej szczurów. W celu wykonania podstawowych analiz hematologicznych pobierano około 0,4 ml krwi do probówek z EDTA K₂. We krwi oznaczano następujące parametry: liczba leukocytów (WBC, tys./ μ l), liczba erytrocytów (RBC, mln/ μ l), stężenie hemoglobiny (HGB, g/dl), hematokryt (HCT, %), liczba płytek krwi (PLT, tys./ml), średnia objętość erytrocytów (MCV, fl), średnia masa hemoglobiny w krwince czerwonej (MCH, pg) oraz średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej (MCHC, g/dl). Oznaczenia powyższych parametrów wykonano przy użyciu weterynaryjnego analizatora hematologicznego Abacus Junior Vet firmy Diatron (Węgry). Wykonano również rozmazy krwi obwodowej w celu oszacowania procentowego składu krwinek białych. Analizy obrazu odsetkowego krwinek białych wykonywano metodą manualną. W celu wykonania analiz biochemicznych do probówek z heparyną pobierano około 1,3 ml krwi, którą odwirowywano (3000 g; 20 min.), a w uzyskanym

osoczu metodą radioimmunologiczną oznaczano stężenie kortykosteronu, hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) oraz melatoniny. Ponadto we krwi pełnej oznaczano stężenie glukozy.

W celu określenia wpływu deprivacji pola geomagnetycznego na zachowanie szczurów, dwa dni po ostatnim pobraniu krwi rozpoczęto testy behawioralne. W kolejnych dniach wykonano pięć testów behawioralnych, tj.: test otwartego pola, labirynt Y, test zagrzebywania kulek, test hiperemocjonalności oraz test interakcji socjalnych. Przebieg testów rejestrowano kamerą umieszczoną na statywie w odległości około 1 metra od areny badań, a zarejestrowany materiał analizowano pod kątem wybranych parametrów (szczegółowo opisanych w metodyce pracy). Po zakończeniu testów behawioralnych szczury zostały uśmiercone poprzez dekapitację wykonaną przez przeszkolonego, uprawnionego eksperymentatora. Od zdekapitowanych szczurów pobrane zostały grasice, śledziony i komórki otrzewnowe w celu wykonania analiz immunologicznych oraz nadnercza w celu określenia ich masy. Przy wykonywaniu wszystkich procedur zawsze zachowywano taką samą kolejność zwierząt, z następstwem szczur z grupy kontrolnej - szczur z grupy doświadczalnej.

I Etap doświadczenia wykonywany był w cyklu świetlnym 12 godz. światła/12 godz. ciemności (12L/12D) zgodnym z naturalnym rytmem dnia i nocy, natomiast II Etap doświadczenia przeprowadzany był w cyklu świetlnym odwróconym, gdzie faza jasna w pomieszczeniu pokrywała się z rzeczywistą nocą.

Analizę statystyczną uzyskanych wyników wykonano przy użyciu pakietu Statistica 13 (Statsoft Tulsa, USA). W analizie mas ciała i przyrostów istotność różnic pomiędzy grupami oceniano jednoczynnikową analizą wariancji (ANOVA) (oddzielnie dla naturalnego i odwróconego cyklu świetlnego). Dane otrzymane w testach behawioralnych i immunologicznych analizowano dwuczynnikową ANOVA z warunkami PGM (grupa kontrolna i doświadczalna) i cyklem świetlnym (naturalny i odwrócony) jako czynnikami, oddzielnie dla fazy jasnej i ciemnej cyklu świetlnego, a do analizy wyników uzyskanych z oznaczeń hematologicznych i fizjologicznych zastosowano trójczynnikową ANOVA z cyklem świetlnym i warunkami PGM (grupą) jako czynnikami międzygrupowymi oraz z czasem pobrania (pomiarem) jako czynnikiem wewnątrzobiektywnym (powtarzanymi pomiarami), oddzielnie dla fazy jasnej i ciemnej cyklu świetlnego. Wartość $p < 0,05$ uznano jako statystycznie znamienne.

3. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań i analizy uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

1. Dwumiesięczna deprywacja pola geomagnetycznego nie wywiera istotnego wpływu na większość parametrów hematologicznych, a zaobserwowane oddziaływania dotyczą:

1.a. wpływu deprywacji PGM na wyraźne, chociaż statystycznie nieistotne, zmniejszenie liczby erytrocytów i obniżenie stężenia hemoglobiny we krwi szczurów w fazie ciemnej naturalnego i odwróconego cyklu świetlnego;

1.b. istotnego zmniejszenia stężenia hemoglobiny w erytrocytach szczurów z grup doświadczalnych, niezależnie od cyklu świetlnego;

1.c. statystycznie istotnego wpływu deprywacji PGM na udział monocytów w obrazie krwinek białych w fazie ciemnej obydwu cykli świetlnych, przy czym oddziaływanie to było zależne od cyklu świetlnego: w cyklu naturalnym zmniejszało, a w cyklu odwróconym zwiększało odsetek monocytów w leukogramie.

2. Stężenie kortykosteronu i ACTH we krwi szczurów utrzymywanych w warunkach osłabionego pola geomagnetycznego wskazuje, że deprywacja PGM jest czynnikiem stresogennym.

3. Kierunek zmian stężenia melatoniny we krwi szczurów zarówno w fazie jasnej, jak i ciemnej odwróconego cyklu świetlnego jest zgodny z naturalnym rytmem dnia i nocy, co sugeruje, że oprócz impulsów świetlnych zwierzęta odbierają również innego rodzaju informacje, które wpływają na okołodobową cykliczność zmian funkcji biologicznych.

Różnice w wartościach i kierunku zmian wybranych parametrów pomiędzy grupami doświadczalnymi i kontrolnymi mogą wskazywać, że czynnikiem tym jest pole geomagnetyczne.

4. W badanych parametrach aktywności układu odpornościowego dominował efekt cyklu świetlnego, a wpływ ekranowania PGM był relatywnie niewielki i zwykle nie osiągał statystycznej znamienności. Jedynie względna masa grasicy była istotnie podwyższona, co może mieć związek z podwyższonym stężeniem melatoniny.

5. W badaniach behawioralnych dominował wpływ cyklu świetlnego, a efekt ekranowania PGM przejawiał się głównie w cyklu odwróconym jako nasilenie skłonności do zachowań socjalnych oraz zmniejszenie ekspresji zachowań stresowych (w tym zmniejszenie liczby defekacji i urynacji). Zmiany te wskazują, że ekranowanie PGM powoduje pewnego rodzaju dysharmonię w środowiskowych informacjach synchronizujących rytm okołodobowy.

6. Uzyskane wyniki dają przesłanki do stwierdzenia wpływu pola geomagnetycznego na okołodobową cykliczność zmian w organizmach szczurów laboratoryjnych.

Dla wyjaśnienia roli oraz mechanizmów oddziaływania pola geomagnetycznego na organizmy zwierząt niezbędne są dalsze badania z wykorzystaniem nowoczesnych metod badawczych, w tym analizy molekularnej.