



УДК 537

А. П. Бурлака, О. С. Цибулін, Є. П. Сидорик, С. М. Лукін,
В. М. Поліщук, С. І. Цехмістренко, І. Л. Якименко

Окисно-індуковані пошкодження у клітинах ембріонів Japanese Quail при дії радіовипромінювання стандарту GSM 900 МГц

(Представлено академіком НАН України В. Ф. Чехуном)

*Радіовипромінювання низької інтенсивності ($0,25 \text{ мкВт/см}^2$) стандарту GSM 900 МГц чинить виражений прооксидантний ефект на клітини ембріонів Japanese Quail. Дія випромінювання впродовж 158–360 год на ембріони *in ovo* (імпульси по 48 с щохвилини) призводила до вірогідного зростання швидкості генерування супероксидних радикалів та оксиду азоту, рівнів перекисів ліпідів та 8-оксогуанозину в клітинах ембріонів. При цьому активність супероксиддисмутази та каталази у тканинах опромінених ембріонів виявилася достовірно пригніченою.*

Стрімке поширення систем мобільного зв'язку викликало закономірну насторогу науковців та громадськості щодо можливих негативних наслідків нових джерел радіовипромінювання для здоров'я людини. Епідеміологічні дослідження останніх років підтвердили, що довготривале та інтенсивне використання мобільного зв'язку може спричиняти значні ризики для здоров'я людини внаслідок надмірного радіоопромінення. Так, виявлено достовірне зростання ризиків розвитку гліом, менінгітом, невриноом слухового нерву, пухлин білявушних слинних залоз, головного болю, відчуття фізичного дискомфорту у користувачів мобільним зв'язком при багаторічному (5–10 років) інтенсивному користуванні мобільними телефонами [1]. У той же час упродовж останніх років виявлено стійку динаміку зростання відсотка електрогіперчутливих людей серед загального населення розвинених країн (від сотих процента на початку 1990-х років до дев'яти–одинадцяти відсотків у різних країнах після 2005 р.) [2].

Характерними симптомами гіперчутливості людей до тривалого опромінення неіонізуючим електромагнітним випромінюванням є симптом хронічної втоми, підвищена збудливість, головні болі, шум у вухах, подразнення шкіри, гормональні дисбаланси [3].

© А. П. Бурлака, О. С. Цибулін, Є. П. Сидорик, С. М. Лукін, В. М. Поліщук, С. І. Цехмістренко,
І. Л. Якименко, 2013

Серед найбільш значимих біологічних ефектів низькоінтенсивного радіовипромінювання на клітинному рівні є виражена прооксидантна та мутагенна дія певних режимів опромінення [4, 5]. При цьому біологічні ефекти опромінення виявляються при інтенсивностях, значно менших за міжнародні норми електромагнітної безпеки. Проте ефективність радіоопромінення істотно залежить як від параметрів опромінення, так і від біологічної моделі, використаної в тому або іншому дослідженні.

Раніше нами [6] на моделі ембріону Japanese Quail (перепела японського) було продемонстровано виражений дозозалежний мутагенний ефект радіовипромінювання стандарту GSM 900 МГц при інтенсивностях, які були на три порядки нижчими за рекомендації Міжнародної комісії із захисту від неіонізуючого випромінювання. Для з'ясування причин таких впливів у даній роботі нами на цій же біологічній моделі досліджено ефекти наднизьких інтенсивностей радіовипромінювання стандарту GSM 900 МГц щодо показників оксидативного стресу у живих клітинах.

Опромінення ембріонів Japanese Quail *in ovo* здійснювали за допомогою комерційної моделі мобільного телефону (Nokia 3120) стандарту GSM 900 МГц, максимально наблизивши параметри випромінювання до того, що діє на реальних користувачів мобільним зв'язком. Активація телефону була реалізована за допомогою програми автодозвону (Autoringup, Росія). Дзвінок тривав близько 48 с, пауза між дзвінками — близько 12 с. Таким чином, режим опромінення був переривчастий: 48 с — опромінення та 12 с — пауза. Під час дзвінка телефон генерував радіовипромінювання з частотою 890–915 МГц та частотою зміни каналу 217 Гц. Телефон був розміщений на пластиковій підставці на відстані 3 см від поверхні інкубаційних яєць дослідної групи. Середня інтенсивність радіовипромінювання на поверхні інкубаційного яйця під час дзвінка становила 0,25 мкВт/см². Ембріони дослідної групи піддавалися як мінімум 158-годинному опроміненню. Цей час включав 120 год (5 діб) опромінення ембріонів *in ovo* при кімнатній температурі перед закладкою на інкубацію на 38 год; 120 год (5 діб) або 240 год (10 діб) опромінення після початку інкубації (залежно від строку аналізу). Дослідні й контрольні групи впродовж усього експерименту були екрановані кількома шарами алюмінієвої фольги й розміщені на відстані 10 сантиметрів одна від одної. Фонове радіовипромінювання в лабораторії становило 0,001 мкВт/см², у зоні знаходження контрольних ембріонів — 0,002 мкВт/см².

Стан прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в клітинах ембріонів оцінювався за швидкістю генерування супероксидних радикалів (O₂⁻) та оксиду азоту (NO), рівнем перекисів ліпідів та 8-гідрокси-2'-дезоксигуанозину (8-оксогуанозин, 8-охо-dG) та активністю ферментів антиоксидантного захисту — супероксиддисмутази (СОД), каталази та церулоплазміну.

Кількісне визначення швидкості генерування супероксидних радикалів в мітохондріях клітин ембріона проводилося методом електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) на комп'ютеризованому спектрометрі ЕПР PE-1307 із застосуванням спінового уловлювача — 1-гідрокси-4-диметиламіно-2,2,6,6-тетраметил-піперидин дигідрохлориду, який внаслідок взаємодії з супероксидними радикалами відновлюється до стабільного нітроксильного радикала. Концентрація спінового уловлювача в досліджуваній пробі становила 0,5 мМ. Реєстрація спектрів ЕПР проводилася при кімнатній температурі тричі через кожні 2 хв. Швидкість генерування супероксидних радикалів у зразках розраховували за динамікою інтенсивності ЕПР сигналу нітроксильного радикала.

Швидкість генерації оксиду азоту в ембріональних клітинах визначалася методом ЕПР при застосуванні спінового уловлювача диетилдитіокарбамату (Sigma). Реєстрація спектрів

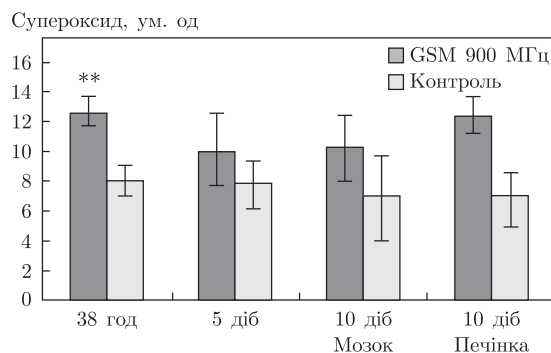


Рис. 1. Швидкість генерування супероксидного радикала у клітинах ембріонів Japanese Quail при дії низькоінтенсивного ($0,25 \text{ мкВт/см}^2$) радіовипромінювання стандарту GSM 900 МГц ($n = 5-7$; $M \pm m$; ум. од.)

ЕПР проводилася при температурі рідкого азоту (77 К) після 5 хв інкубації зразків у присутності спінового уловлювача. Накопичення оксиду азоту в зразках оцінювалося за динамікою інтенсивності сигналу ЕПР з $g = 2,03$.

Рівень перекисного окислення ліпідів у тканинах визначався за стандартною методикою у реакції з тіобарбітуровою кислотою [7].

Рівень молекулярного маркера окисного ушкодження ДНК — 8-оксогуанозина в клітинах визначався шляхом твердофазної екстракції із тканин ембріонів [8].

Ідентифікацію і визначення вмісту 8-охо-dG проводили спектрофотометрично при довжині хвилі 260 нм.

Активність СОД, каталази та вміст церулоплазміну визначали за стандартними методиками за спектрофотометричною оцінкою кінцевих продуктів реакцій [9–11].

Дія радіовипромінювання стандарту GSM 900 МГц з інтенсивністю $0,25 \text{ мкВт/см}^2$ на перепелині ембріони призвела до вираженого прооксидантного ефекту у тканинах ембріонів упродовж усього періоду аналізу (38 год–10 діб розвитку).

Так, інтенсивність генерування супероксидних радикалів у гомогенатах тканин опромінених ембріонів зроста порівняно з контролем на 38-му годину та 5-ту добу інкубації, відповідно, на 57,5% ($p < 0,01$) та 29,5%. (рис. 1). У тканинах печінки 10-добових ембріонів рівень супероксидного радикала зріс внаслідок опромінення на 78,6% ($p < 0,05$), у тканинах мозку — на 51,5% порівняно з контролем.

Рівень оксиду азоту зріс у гомогенатах тканин опромінених ембріонів на 80% ($p < 0,001$) на 38-му годину розвитку та на 56,8% ($p < 0,001$) на 5-ту добу розвитку порівняно з контролем (рис. 2). У печінці опромінених 10-добових ембріонів рівень NO виявився на 38% ($p < 0,05$), і у тканинах мозку — на 64,5% ($p < 0,05$) вищим, ніж у контролі.

Рівень перекисів ліпідів також виявився істотно підвищеним у тканинах ембріонів, що зазнали впливу радіовипромінювання стандарту GSM 900 МГц: на 38-му годину — на 32,2%, на 5-ту добу — на 14,5% ($p < 0,01$), на 10-ту добу у тканинах серця — на 32,1% ($p < 0,01$), у тканинах печінки — на 25%, і тканинах мозку — на 22,6% порівняно із контролем (рис. 3).

Радіоопромінення перепелиних ембріонів призвело до вираженого зростання рівнів 8-охо-dG у клітинах. Так, рівень 8-охо-dG у клітинах опромінених 38-годинних ембріонів зріс на 128% ($p < 0,001$) і у клітинах опромінених 5-добових ембріонів — на 229% ($p < 0,001$) порівняно з контролем. Тобто при використаному режимі радіоопромінення окисне ушкодження ДНК, а саме, окиснення гуаніну, в ембріональних клітинах мало виражений та стійкий характер.

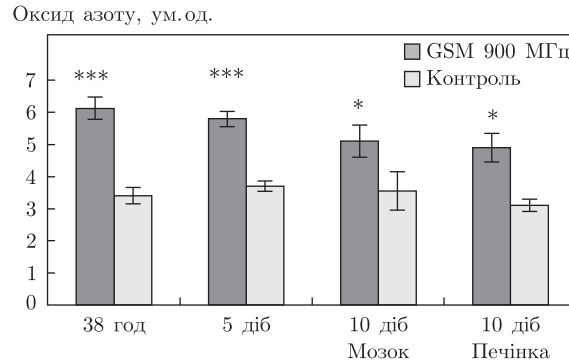


Рис. 2. Швидкість генерування оксиду азоту у клітинах ембріонів Japanese Quail при дії низькоінтенсивного (0,25 мкВт/см²) радіовипромінювання стандарту GSM 900 МГц ($n = 5-7$; $M \pm m$; ум. од.)

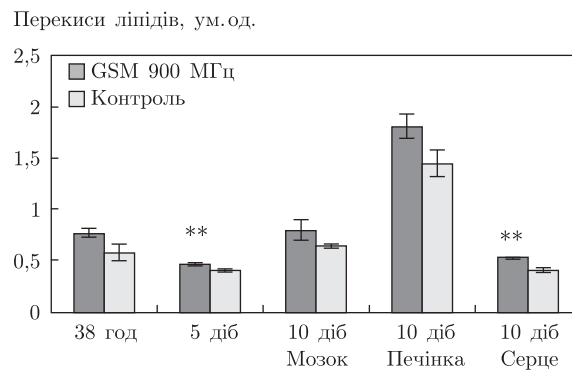


Рис. 3. Рівень перекисів ліпідів у клітинах ембріонів Japanese Quail при дії низькоінтенсивного (0,25 мкВт/см²) радіовипромінювання стандарту GSM 900 МГц ($n = 5-7$; $M \pm m$; ум. од.)

Внаслідок дії радіовипромінювання на ембріони істотних змін зазнала і активність аналізованих ферментів антиоксидантного захисту (табл. 1). Так, активність СОД, ферменту, що знешкоджує супероксид-радикал у клітинах, перетворюючи його на перекис водню, виявилася достовірно пригніченою у тканинах 5-добових ембріонів (на 34,4%; $p < 0,05$) та у тканинах серця 10-добових ембріонів (на 48,3%; $p < 0,05$). Вочевидь, стійке збіль-

Таблиця 1. Активність ферментів антиоксидантного захисту в гомогенатах тканин ембріонів Japanese Quail при дії низькоінтенсивного (0,25 мкВт/см²) радіовипромінювання стандарту GSM 900 МГц ($n = 5-7$; $M \pm m$; ум. од.)

Показники	38-годинні ембріони	5-добові ембріони	10-добові ембріони		
			Мозок	Печінка	Серце
СОД					
контроль	0,299 ± 0,037	0,509 ± 0,03	0,351 ± 0,023	0,505 ± 0,038	0,554 ± 0,036
дослід	0,297 ± 0,023	0,378 ± 0,037*	0,425 ± 0,03	0,543 ± 0,029	0,374 ± 0,056*
Каталаза					
контроль	6,877 ± 0,207	8,08 ± 1,27	4,563 ± 0,0442	33,011 ± 1,996	2,224 ± 0,1388
дослід	5,728 ± 0,317*	12,96 ± 0,77*	4,656 ± 0,0609	26,047 ± 1,71*	2,771 ± 0,2075
Церулоплазмін					
контроль	8,588 ± 0,239	3,563 ± 0,19	4,775 ± 0,199	9,071 ± 0,508	6,763 ± 0,187
дослід	10,719 ± 0,442**	4,638 ± 0,134***	7,613 ± 0,214***	9,377 ± 0,585	5,45 ± 0,227***

Примітка. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ порівняно з контролем.

шення супероксид-радикала у тканинах ембріона внаслідок хронічної дії радіовипромінювання призвело до виснаження першої ланки ферментативної системи антиоксидантного захисту.

Активність каталази, ферменту, що знешкоджує перекис водню у клітинах, також виявилася достовірно зниженою внаслідок радіоопромінювання у тканинах 38-годинних ембріонів та у печінці 10-добових ембріонів (на 20%; $p < 0,05$ та 21%; $p < 0,05$, відповідно). Проте у тканинах опромінених 5-добових ембріонів на фоні достовірного підвищення рівня супероксиду та перекисів ліпідів при пригніченні активності СОД активність каталази виявилась значно, на 60,4% ($p < 0,05$), підвищеною. Значних змін зазнав і вміст церулоплазміну, основного антиоксиданту плазми крові, у тканинах опромінених ембріонів. Зокрема, впродовж усього аналізованого періоду вміст церулоплазміну у гомогенатах опромінених ембріонів був на 24,8–59,4% ($p < 0,001$) вищим, ніж у контролі (за виключенням вірогідного зниження вмісту ферменту у тканинах серця 10-добових ембріонів). При цьому найбільших змін внаслідок опромінювання вміст ферменту зазнав у тканинах мозку 10-добових ембріонів. Підвищений вміст церулоплазміну, як і підвищена активність каталази у тканинах 5-добових ембріонів при дії радіовипромінювання, очевидно, є компенсаторною реакцією ферментної ланки антиоксидантної системи на значне збільшення активних форм кисню в клітинах та пригнічення активності СОД.

Таким чином, нами виявлено виражені ознаки оксидативного стресу у тканинах перепелиних ембріонів при дії надмалих інтенсивностей радіовипромінювання стандарту GSM 900 МГц. Зміни мали системний характер і включали стійке зростання рівнів продукції супероксидного радикалу, оксиду азоту, інтенсивності перекисного окислення ліпідів та рівня окисного ушкодження ДНК при пригніченні активності ключових ферментів антиоксидантного захисту.

Слід наголосити, що використана в наших досліджах інтенсивність радіовипромінювання стандартної (комерційної) моделі мобільного телефону стандарту GSM була на порядок нижча за національні норми електромагнітної безпеки в Україні і на три порядки нижча за рекомендовані обмеження Міжнародної комісії із захисту від неіонізуючого випромінювання [12].

При цьому раніше в ряді лабораторій на біологічних моделях *in vivo* та *in vitro* було виявлено прооксидантну дію радіовипромінювання стандарту GSM, але при значно вищих інтенсивностях випромінювання [5, 13]. З огляду на отримані нами дані щодо можливості достовірних негативних впливів наднизьких інтенсивностей радіовипромінювання стандарту GSM на перебіг окисних процесів та стан ферментної ланки антиоксидантної системи у живих клітинах, виникає необхідність ретельного моніторингу можливого негативного впливу радіовипромінювання засобів мобільного зв'язку на здоров'я людини. Попри чисельні епідеміологічні дані щодо зростання ризиків розвитку цілого ряду захворювань, включаючи ризики розвитку новоутворень при довготривалому користуванні засобами мобільного зв'язку, і попри рішення ВООЗ про визнання радіовипромінювання можливим канцерогеном [14], механізм таких впливів значною мірою залишався незрозумілим. Враховуючи широкий спектр потенційної небезпеки надлишкової продукції активних форм кисню в клітинах, зокрема, участь АФК в окисному ушкодженні ДНК та потенціюванні пошкоджень, що викликають злоякісну трансформацію клітин [15], наведені нами результати викликають велику насторогу. Показово, що у деяких модельних досліджень *in vivo* було продемонстровано захисну дію екзогенних антиоксидантів щодо негативних впливів радіовипромінювання стандарту GSM.

Отримані нами дані свідчать, що радіовипромінювання стандарту GSM 900 МГц за умови його хронічного впливу на ембріони призводить до виражених змін у метаболізмі мітохондрій ембріональних клітин, що, вочевидь, обумовлене порушенням механізму транспорту електронів в електронтранспортному ланцюзі та активацією систем генерування супероксидних радикалів. Крім того, відбувається виражена активація NO-синтазних систем в ембріональних клітинах, що виражається у стійкому збільшенні рівня продукції NO в клітинах опромінених ембріонів. Результатом активації продукції супероксидного радикала та оксиду азоту в клітинах на фоні зниження активності ключових ферментів антиоксидантного захисту (СОД та каталази) є активація перекисних процесів та значне, більше, ніж у 2–3 рази, зростання рівня окисного ушкодження ДНК у клітинах 38-годинних та 5-добових ембріонів. Важливим є те, що наведений сценарій прооксидантних змін в ембріональних клітинах виявлявся при наднизькій інтенсивності радіовипромінювання GSM стандарту, що відповідає рівням радіовипромінювання найбільш безпечних сучасних моделей мобільних телефонів. Це, в свою чергу, ставить питання про нагальну необхідність широкого впровадження принципу упередження щодо потенційних ризиків для здоров'я людини від надмірного радіоопромінювання засобами мобільного зв'язку.

1. *Yakymenko I., Sidorik E., Kyrylenko S. et al.* Long-term exposure to microwave radiation provokes cancer growth: evidences from radars and mobile communication systems // *Exp. Oncol.* – 2011. – **33**. – P. 62–70.
2. *Hallberg O., Oberfeld G.* Letter to the editor: will we all become electrosensitive? // *Electromagn. Biol. Med.* – 2006. – **25**. – P. 189–191.
3. *Johansson O.* Electrohypersensitivity: state-of-the-art of a functional impairment // *Ibid.* – 2006. – **25**. – P. 245–258.
4. *Ruediger H. W.* Genotoxic effects of radiofrequency electromagnetic fields // *Pathophysiology.* – 2009. – **16**. – P. 89–102.
5. *Friedman J., Kraus S., Hauptman Y. et al.* Mechanism of short-term ERK activation by electromagnetic fields at mobile phone frequencies // *Biochem J.* – 2007. – **405**. – P. 559–568.
6. *Цибулін О. С., Сидорук Є. П., Бреева О. В. та ін.* Дозозалежний мутагенний ефект мікрохвильового випромінювання // *Доп. НАН України.* – 2013. – № 1. – P. 169–176.
7. *Андреева Л. И., Кожесмякин Л. А., Кишкун А. А.* Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // *Лаб. дело.* – 1988. – **11**. – P. 41–43.
8. *Shigenaga M. K., Gimeno C. J., Ames B. N.* Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage // *Proc. of the Nat. Acad. of Sci. USA.* – 1989. – **86**. – P. 9697–9701.
9. *Тен Э. В.* Экспресс-метод определения содержания церулоплазмينا в сыворотке крови // *Лаб. дело.* – 1981. – **5**. – С. 334–335.
10. *Чавари С., Чаба И., Секуй И.* Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // *Там же.* – 1985. – **11** – P. 678–681.
11. *Корольок М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. и др.* Метод определения активности каталазы // *Там же.* – 1988. – **1**. – P. 16–19.
12. *ICNIRP: Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic and electromagnetic fields (up to 300 GHz)* // *Health Phys.* – 1998. – **74**. – P. 494–522.
13. *De Iulius G. N., Newey R. J., King B. V.* Mobile phone radiation induces reactive oxygen species production and DNA damage in human spermatozoa in vitro // *PLoS One.* – 2009. – **4**. – P. e6446.
14. *Baan R., Grosse Y., Lauby-Secretan B. et al.* Carcinogenicity of radiofrequency electromagnetic fields // *The Lancet Oncology.* – 2011. – **12**. – P. 624–626.
15. *Valko M., Rhodes C. J., Moncol J. et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer // *Chem. Biol. Interact.* – 2006. – **160**. – P. 1–40.

*Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького
НАН України, Київ
Білоцерківський національний аграрний університет*

Надійшло до редакції 10.04.2013

А. П. Бурлака, А. С. Цыбулин, Е. П. Сидорик, С. Н. Лукин,
В. М. Полищук, С. И. Цехмистренко, И. Л. Якименко

Окислительные повреждения в клетках эмбрионов Japanese Quail при действии радиоизлучения стандарта GSM 900 МГц

Радиоизлучение низкой интенсивности ($0,25 \text{ мкВт/см}^2$) стандарта GSM 900 МГц оказывает выраженный прооксидантный эффект на эмбриональные клетки Japanese Quail. Действие излучения в течение 158–360 ч на эмбрионы in ovo (импульсы по 48 с ежеминутно) приводило к достоверному возрастанию уровней супероксидного радикала, оксида азота, перекисей липидов и 8-оксогуанозина в клетках эмбрионов. Активность супероксиддисмутазы и каталазы оказалась достоверно угнетенной в тканях облученных эмбрионов.

A. P. Burlaka, O. S. Tsybulin, E. P. Sidorik, S. N. Lukin, V. M. Polishuk,
S. I. Tsehmistrenko, I. L. Yakymenko

Oxidative-induced damages in embryo cells of Japanese Quail under the exposure to radiofrequency radiation of GSM 900 MHz

The low-intensity radiofrequency radiation ($0.25 \text{ }\mu\text{W/cm}^2$) of GSM 900 MHz induces a chronic oxidative stress in embryo cells of Japanese Quail. The exposure of embryos in ovo during 158–360 h (discontinuously) led to a significant increase of the levels of superoxide, nitrogen oxide, lipid peroxides, and 8-oxo-dG in embryo cells. Activities of superoxide dismutase and catalase were significantly decreased in embryonic cells.