

# INVESTIGATION OF MICRONUCLEI IN RATS' BONE MARROW UNDER JOINT EXPOSURE OF ENDOGENIC NITROSAMINES AND ELECTROMAGNETIC FIELD OF INDUSTRIAL FREQUENCY (50 HZ)

Chernychenko I.O., Dumanskyi Yu.D., Balenko N.V., Sovertkova L.S., Babyi V.F., Kondratenko O.Ye., Lytvychenko O.M., Serdiuk Ye.A., Nikitina N.G.

## ДОСЛІДЖЕННЯ МІКРОЯДЕР У КІСТКОВОМУ МОЗКУ ЩУРІВ ЗА ПОЄДНАНОЇ ДІЇ ЕНДОГЕННИХ НІТРОЗАМІНІВ ТА ЕЛЕКТРОМАГНІТНОГО ПОЛЯ ПРОМИСЛОВОЇ ЧАСТОТИ (50 ГЦ)

**Е**КОЛОГІЧНА СИТУАЦІЯ, ЩО СФОРМУВАЛАСЯ НИНІ, ХАРАКТЕРИЗУЄТЬСЯ ГЛОБАЛЬНИМ ЗАБРУДНЕННЯМ ДОВКІЛЛЯ КОМПЛЕКСОМ ХІМІЧНИХ І ФІЗИЧНИХ ПАТОГЕНІВ АНТРОПОГЕННОГО ПОХОДЖЕННЯ ТА ЇХНІМ СТАБІЛЬНИМ ВПЛИВОМ НА ЗДОРОВ'Я НАСЕЛЕННЯ.

**ЧЕРНИЧЕНКО І.О.,  
ДУМАНСЬКИЙ Ю.Д.,  
БАЛЕНКО Н.В.,  
СОВЕРТКОВА Л.С.,  
БАБІЙ В.Ф.,  
КОНДРАТЕНКО О.Є.,  
ЛИТВИЧЕНКО О.М.,  
СЕРДЮК Є.А.,  
НИКІТИНА Н.Г.**

ДУ «Інститут громадського здоров'я ім. О.М. Марзєєва НАМН України», м. Київ, Україна

УДК 613.648.2 : 537.531 : 547.414 : 576.385.5

**Ключові слова:** нітрозаміни, електромагнітні поля промислової частоти (50 Гц), поєднана дія, щури, генотоксичність, мікроядра, кістковий мозок.

До складу комплексу належать, зокрема, електромагнітні поля низькочастотного діапазону (НЧ ЕМП), у тому числі промислової частоти (50 Гц), та канцерогенні сполуки класу нітрозамінів (НА). Небезпека останніх пов'язана з легкістю синтезу не тільки екзогенно, а й в організмі живих істот, включаючи людину, із широко розповсюджених в об'єктах навколишнього середовища (повітрі, ґрунті, воді, харчових продуктах, лікарських препаратах) азотвмісних попередників (нітрати/нітри, аміни, аміди

тощо). Обидва фактори визнані канцерогенами Міжнародним агентством з вивчення раку: НЧ ЕМП класифіковано як можливо канцерогенні (група 2В), НА – як ймовірно канцерогенні (група 2А) для людини [1, 2]. Їм властива генотоксичність, яка, згідно з сучасними уявленнями, є невід'ємною ознакою канцерогенезу і використовується як ранній біомаркер для ідентифікації канцерогенів і оцінки активності їхніх доз [3-5].

Наведені обставини, з одного боку, а також відсутність інформації щодо сумісної дії НЧ ЕМП і НА, необхідної для оцінки реальної небезпеки їхнього впливу на здоров'я населення – з іншого, стали передумовою для виконання цих досліджень.

**Метою роботи** було експериментальне вивчення гено-

токсичності.

**ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОЯДЕР В КОСТНОМ МОЗГЕ КРЫС ПРИ СОЧЕТАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭНДОГЕННЫХ НИТРОЗАМИНОВ И ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ ПРОМЫШЛЕННОЙ ЧАСТОТЫ (50 Гц)**

**Черниченко И.А., Думанский Ю.Д., Баленко Н.В., Соверткова Л.С., Бабий В.Ф., Кондратенко О.Е., Литвиченко О.Н., Сердюк Е.А., Никитина Н.Г.**  
ГУ «Институт общественного здоровья им. А.Н. Марзеева НАМН Украины», г. Киев

**Цель** – изучить генотоксичность сочетанного воздействия эндогенных нитрозаминов и электромагнитного поля промышленной частоты (50 Гц).

**Материалы и методы.** Эксперимент проведен на 160 белых беспородных крысах-самках весом 140-154 г в возрасте 6-8 недель, разделенных на 4 группы: интактный контроль; введение предшественников синтеза нитрозаминов (ПНА) – нитрит натрия, 100 мг/кг, тетрациклин 20 мг/кг веса тела; облучение электромагнитным полем промышленной частоты (ЭМП ПЧ) 50 Гц, 90 мкТл; совместное воздействие ПНА и ЭМП ПЧ. Предшественники давали 1 раз в сутки 5 дней в неделю на протяжении 90 дней. Облучение ЭМП осуществляли в те же сроки по 7 часов в сутки. Эндогенный синтез контролировали хроматографическим определением содержания нитрозаминов в печени и почках

крыс. Генотоксичность определяли путем анализа микроядер в полихроматофильных эритроцитах (МЯ ПХЭ) костного мозга бедренных костей, взятых через сутки после последнего введения. Подсчет МЯ ПХЭ осуществляли в 3 мазках от каждого животного и определяли индивидуальные и групповые показатели частоты МЯ (%) на 2000 ПХЭ. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента. **Результаты.** При изолированном введении ПНА отмечено достоверное увеличение (0,13%) частоты МЯ ( $p < 0,05$ ) по сравнению с интактным контролем (0,08%). У облученных ЭМП крыс выявлена тенденция к увеличению частоты МЯ (0,12%,  $p > 0,05$ ). В то же время сочетанное влияние факторов вызвало достоверное усиление эффекта (0,18%,  $p < 0,001$ ) по сравнению с интактным контролем, а также и с изолированным действием ПНА ( $p < 0,01$ ) и ЭМП ( $p < 0,05$ ). **Выводы.** Установлено достоверное усиление генотоксического эффекта при сочетанном действии исследованных факторов по сравнению с изолированным их влиянием, что свидетельствует об опасности совместного воздействия канцерогенных веществ (НА) и ЭМП промышленной частоты.

**Ключевые слова:** нитрозамины, электромагнитные поля, сочетанное действие, крысы, генотоксичность, микроядра, костный мозг.

© Черниченко І.О., Думанський Ю.Д., Баленко Н.В., Соверткова Л.С., Бабій В.Ф., Кондратенко О.Є., Литвиченко О.М., Сердюк Є.А., Нікітіна Н.Г. СТАТТЯ, 2017.

токсичного ефекту за поєднаного впливу канцерогенних НА, що утворюються ендогенно, і ЕМП промислової частоти (50 Гц).

**Матеріали та методи.** Дослід проведено на білих нелінійних щурах, враховуючи чутливість цих тварин до досліджуваних факторів і часте використання їх при вивченні ізолюваного впливу на організм ЕМП та НА.

Як відомо, екзогенний та ендогенний синтез НА можливий за обов'язкової участі двох компонентів – хімічних попередників синтезу (ПНА): нітрозуючої сполуки, що є носієм нітрогрупи, та речовини, що нітрузується і містить аміни чи аміди.

У нашому досліді як нітрозуючу сполуку взято нітрит натрію (НН), а компонент, що нітрузується – антибіотик тетрациклін (ТЦ).

Загалом у досліді задіяно 160 білих безпородних щурів-самців вагою 140,0-154,0 г віком 6-8 тижнів. Тварин було розподілено на 4 групи: інтактний контроль (1 група); тварини, що отримували окремо ПНА (2 група) або опромінення ЕМП (3 група), та сумісно (4 група).

Щурів піддавали дії факторів 5 днів на тиждень протягом 3 місяців. ПНА давали натще 1 раз на добу: НН з розрахунку 10 мг/кг ваги тіла з питною водою, ТЦ – як домішку до вівсяної каші у дозі 20 мг/кг ваги тіла. Опромінення ЕМП з рівнем навантаження 90 мкТл здійснювали у спеціально обладнаних камерах по 7 годин на добу.

Тварин утримували у стандартних пластикових клітках на стандартному гранульованому кормі з вільним доступом до питної води за температури у приміщенні 18-22°C, вологості повітря 50-60% та природного світового режиму «день-ніч».

Варто зазначити, що обрані рівні факторів, за результатами наших попередніх досліджень, є патогенно активними: ендогенні НА, що утворювалися за введення НН та ТЦ в аналогічних дозах, у хронічному досліді викликали роз-

## ФУНДАМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

виток пухлин, ЕМП – різні біохімічні та імунологічні порушення, функціональні розлади нервової системи [6].

Для підтвердження ендогенного синтезу періодично проводили вимірювання вмісту НА (диметилнітрозаміну і діетилнітрозаміну) у печінці та нирках щурів хроматографічним методом. Генотоксичність визначали мікроядерним методом, враховуючи його переваги порівняно з іншими генотоксичними методами, а також більшу чутливість до дії ЕМП [7-9]. Генотоксичний ефект оцінювали шляхом підрахунку клітин з мікроядрами (МЯ) у поліхроматофільних еритроцитах (ПХЕ) кісткового мозку стегон щурів.

Біоматеріал відбирали наприкінці досліду (за добу після останнього введення ПНА та опромінювання ЕМП) у 6 тварин з кожної групи і виготовляли цитологічні препарати. Процедuru виготовлення препаратів здійснювали згідно з рекомендаціями, а також з урахуванням досвіду особистого та інших авторів [7, 9, 10], включаючи такі етапи: обрізання кінців стегових кісток; вимивання клітин кісткового мозку окремо від кожної тварини середовищем RPMI-1640 (виробник НВП «Пан-Еко», Росія) у центрифужні пробірки; центрифугування клітинної суспензії протягом 5 хв. при 1000 обертів/хв з наступним двократним промиванням буферним розчином PBS (виробник ООО «Агат-мед», Росія) та повторним центрифугуванням у тому ж режимі; виготовлення мазків (по 3 мазки) із клітин кісткового мозку кожної тварини, їх фіксацію метанолом і фарбування після

висушування на повітрі готовим фарбником Романовського-Гімза, розведеним у буферному розчині PBS.

Аналіз МЯ у ПХЕ проводили на зашифрованих препаратах за допомогою мікроскопа «Primo Star» фірми Zeiss за збільшення у 1000 разів з використанням імерсії. Мікроядра підраховували у кожному з трьох мазків на 2000 клітин проаналізованих ПХЕ (6000) з подальшим визначенням середньої величини для кожної тварини (індивідуальний показник) та групи загалом (груповий показник).

Індивідуальні та групові показники частоти МЯ визначали у відсотках відносно 2000 проаналізованих ПХЕ.

Статистичний аналіз даних здійснювали загальноприйнятими методами з використанням коефіцієнта Ст'юдента.

**Результати досліджень.** Мікроскопічне вивчення препаратів показало нерівномірний розподіл клітин з МЯ у мазках щурів усіх груп.

Так, кількість клітин з МЯ у мазках щурів інтактного контролю коливалася від 0 до 3 на 2000 ПХЕ.

За роздільного введення ПНА (2 група) чи опромінення ЕМП (3 група) кількість МЯ ПХЕ у мазках щурів була подібною і дещо більшою, ніж в інтактних тварин, з діапазоном коливання від 1 до 4 на 2000 ПХЕ.

Найбільшу кількість МЯ ПХЕ з розкидом від 1 до 6 виявлено у мазках щурів за сумісної дії ПНА і ЕМП (4 група).

Розраховані на підставі даних аналізу МЯ ПХЕ у мазках індивідуальні та групові показники наведено у таблиці.



Як можна бачити, середня кількість МЯ ПХЕ в окремих тварин контрольної групи, що відображає спонтанний рівень для використаного розплоду щурів, варіювала від  $1,33 \pm 0,33$  до  $2,00 \pm 0,58$  на 2000 ПХЕ (індивідуальний показник); груповий показник становив  $5,00 \pm 0,58$  на 2000 ПХЕ. У відсотковому вираженні індивідуальний показник (частота МЯ) коливався від 0,067% до 0,100%, груповий становив 0,08%.

У щурів, які отримували тільки ПНА, аналогічні показники були достовірно вищими ( $p < 0,05$ ), що свідчить про генотоксичний потенціал рівнів НА, які утворилися в організмі за введення попередників їхнього синтезу. Так, індивідуальні показники в абсо-

лютних цифрах коливалися від  $2,33 \pm 0,33$  до  $3,00 \pm 0,58$ , груповий складав  $8,00 \pm 0,58$ . Індивідуальна частота МЯ варіювала у межах від 0,116% до 0,150%, групова становила 0,130%.

За роздільного впливу ЕМП кількість МЯ ПХЕ в окремих тварин суттєво не відрізнялася ( $p > 0,05$ ) від аналогічних показників у щурів за введення ПНА і перебувала у діапазоні ( $1,67 \pm 0,67$ ) – ( $2,67 \pm 0,88$ ), а розкид показника частоти МЯ був на рівнях 0,083-0,134%. Відповідні групові параметри становили  $7,00 \pm 1,00$  та 0,12%. Зіставлення з інтактним контролем показало достовірне збільшення частоти МЯ ( $p < 0,05$ ) за введення ПНА і тенденцію до зростання ( $p > 0,05$ ) за опромінення ЕМП.

Найвищі індивідуальні та групові показники кількості МЯ ПХЕ у кістковому мозку зареєстровано у щурів за поєднаного впливу ЕМП і введених ПНА. Індивідуальні показники варіювали від  $3,33 \pm 0,88$  до  $3,67 \pm 1,20$ , що відповідало частоті 0,167-0,183%. Групові величини склали  $10,67 \pm 0,33$  та 0,18%, відповідно і вдвічі перевищували аналогічні у

щурів інтактного контролю. Усі показники були також достовірно вищими ( $p < 0,001$ ), ніж в інтактному контролі і порівняно з ізолюваним впливом НПА ( $p < 0,01$ ) та ЕМП ( $p < 0,05$ ).

Отже, введення ПНА, що супроводжується ендогенним синтезом цих сполук, у поєднанні з опроміненням ЕМП викликає зростання генотоксичного ефекту порівняно з роздільним впливом кожного з цих факторів, що свідчить також про зростання канцерогенної небезпеки сумісної дії цих факторів.

#### Висновки

Встановлено достовірне підсилення генотоксичного ефекту за поєднаної дії досліджуваних факторів порівняно з ізолюваним впливом кожного з них, що свідчить про небезпеку сумісного впливу канцерогенних НА і ЕМП промислової частоти. Між тим, можна передбачити, що за умов збільшення кількості спостережень індивідуальні та групові показники можуть змінитися.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Non-ionizing Radiation. Part 2: Radiofrequency Electromagnetic Fields. Lyon : IARC, 2013. Vol. 102. P. 143-88.

2. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Chemical Agents and Related Occupations. Lyon : IARC, 2012. Vol. 100. 576 p.

3. Steward B.W., Wild C.P. (eds.) World Cancer Report 2014. Lyon : IARC; WHO. 630 p.

4. Demetriou C.A., Raaschou-Nielsen O., Loft S. et al. Biomarkers of ambient air pollution and lung cancer: a systematic review. *Occup. Environ. Med.* 2012. Vol. 69. P. 619-627.

5. Черниченко І.О., Баленко Н.В., Осташ О.М. Обґрунтування критеріальної значущості комплексу генотоксичних та імунологічних показників для експрес-оцінки канцерогенів навколишнього середовища. *Довкілля та здо-*

Таблиця

#### Частота мікроядерних поліхроматофільних еритроцитів у кістковому мозку щурів за впливу попередників синтезу нітрозамінів та електромагнітного поля

Група, фактор, рівень впливу	Кількість щурів	Кількість МЯ ПХЕ/2000 ПХЕ				Статистичні параметри
		Індивідуальні показники		Групові показники		
		абс.	%	абс.	%	
1 – інтактний контроль	3	$1,67 \pm 0,88$	0,083	$5,00 \pm 0,58$	0,08	
		$1,33 \pm 0,33$	0,067			
		$2,00 \pm 0,58$	0,100			
2 – НН 100 мг/кг; ТЦ 20 мг/кг	3	$2,67 \pm 0,33$	0,134	$8,00 \pm 0,58$	0,13	$t = 3,66$ $p < 0,05$
		$2,33 \pm 0,33$	0,116			
		$3,00 \pm 0,58$	0,150			
3 – ЕМП 50 Гц, 90 мкТл	3	$2,67 \pm 0,88$	0,134	$7,00 \pm 1,00$	0,12	$t = 1,73$ $p > 0,05$
		$1,67 \pm 0,67$	0,083			
		$2,67 \pm 0,67$	0,134			
4 – НН; ТЦ; ЕМП, ті самі рівні	3	$3,33 \pm 0,88$	0,167	$10,67 \pm 0,33^*$	0,18	$t = 8,50$ $p < 0,001$
		$3,67 \pm 1,20$	0,183			
		$3,67 \pm 0,88$	0,183			

Примітка: \* – встановлено достовірне зростання частоти МЯ у тварин 4 групи порівняно з 2 ( $p < 0,01$ ) та 3 групою ( $p < 0,05$ ).

INVESTIGATION OF MICRONUCLEI IN RATS' BONE MARROW UNDER JOINT EXPOSURE OF ENDOGENIC NITROSAMINES AND ELECTROMAGNETIC FIELD OF INDUSTRIAL FREQUENCY (50 Hz)

**Chernychenko I.O., Dumanskyi Yu.D., Balenko N.V., Sovertkova L.S., Babyi V.F., Kondratenko O.Ye., Lytvychenko O.M., Serdiuk Ye.A., Nikitina N.G.**

*SI «O.M. Marzeiev Institute for Public Health, NAMSU», Kyiv*

**Objective.** We studied a genotoxicity of joint exposure of endogenous nitrosamines and electromagnetic field of industrial frequency.

**Materials and methods.** The experiment was performed on 160 white outbred female rats of 6-8 weeks age with a weight of 140-154 g, divided into 4 groups: intact control; introduction of nitrosamines' synthesis precursors (NAP) – sodium nitrite, 100 mg/kg; tetracycline, 20 mg/kg; irradiation by electromagnetic field of industrial frequency (EMF IF), 50 Hz, 90  $\mu$ T; joint exposure of NAP and EMF IF. NAPs were introduced once a day, 5 days per week during 90 days. Irradiation by EMF was carried out at the same terms for 7 hours daily. Endogenous synthesis was controlled by the chromatographic determination of nitrosamines' content in liver and kidneys of the rats. Genotoxicity was determined by micronu-

cleus test in bone marrow polychromatic erythrocytes (PCE) of femoral bones in 24 hours after last introduction. Calculation of MN PCE was carried out in 3 smears from each animal. We determined individual and group indices of micronuclei frequency (%) on 2000 PCE. Obtained data were analyzed statistically with the help of Student t-test.

**Results.** The reliable increase of micronuclei frequency (0.13%,  $p < 0.05$ ) was observed under isolated administration of NAP in comparison with intact control (0.08%). A tendency to the increase of MN frequency (0.12%,  $p > 0.05$ ) was observed in the rats irradiated by EMF. At the same time the joint effect of the factors caused the reliable strengthening of the effect (0.18%,  $p < 0.001$ ) both in comparison with intact control and with isolated effect of NAP ( $p < 0.01$ ) and EMF ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions.** We established the reliable strengthening of genotoxic effect under joint exposure of studied factors in comparison with their isolated effect. It suggests the risk of joint effect of carcinogenic nitrosamines and electromagnetic field of industrial frequency (50 Hz).

**Keywords:** nitrosamines, electromagnetic fields of industrial frequency, joint effect, rats, genotoxicity, micronuclei, bone marrow.

ров'я. 2013. № 2. С. 4-8.

6. Думанський В.Ю., Біткін С.В., Думанський Ю.Д., Нікітіна Н.Г. та ін. Гігієнічна оцінка електричного та магнітного поля промислової частоти (50 Гц), що створюється підземними кабельними лініями електропередачі з напругою 110-330 кВ. *Актуальні питання гігієни та екологічної безпеки України* (Х Марзеєвські читання): тези доп. конф. Київ, 2014. С. 20-22.

7. Saleh K., Celikler S., Sarhan M.A.A. Lack of micronuclei formation in bone marrow of rats after oral exposure to thiocyclam insecticide. *Saudi J. of Biological Sciences*. 2010. Vol. 17. P. 311-314.

8. Udroui J., Giuliani L., Jeradi L.A. Genotoxic properties of extremely low frequency electromagnetic fields. *Eur. J. Oncol. Libr*. 2010. №5. P. 123-134.

9. Kovalkovitchova N., Sutiakova I., Legarth J. et al. Induction of micronuclei in rat bone marrow after subchronic inhalation exposure to mixture of benzene, cyclohexanone and cyclohexane. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. 2004. Vol. 48. P. 341-345.

10. Гигиенические крите-

рии состояния окружающей среды № 51. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. Женева : ВОЗ, 1989. 212 с.

#### REFERENCES

1. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Non-ionizing Radiation. Part 2: Radiofrequency Electromagnetic Fields. Lyon : IARC; 2013; 102 : 143-188.
2. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Chemical Agents and Related Occupations. Lyon : IARC; 2012 ; 100 : 576 p.
3. Steward B.W. and Wild C.P. (eds.) World Cancer Report 2014. Lyon : IARC; WHO : 630 p.
4. Demetriou C.A., Raaschou-Nielsen O., Loft S., Muller P., Vermeulen R., Palli D., Chadeau-Hyam M., Xun W.W. and Vineis P. *Occup. Environ. Med.* 2012 ; 69 : 619-627.
5. Chernychenko I.O., Balenko N.V. and Ostash O.M. *Dovkillia ta zdorovia*. 2013; 2 : 4-8 (in Ukrainian).
6. Dumanskyi V.Yu., Bitkin S.V., Dumanskyi Yu.D., Nikitina N.G., Tomashevskaya L.A. and

Medvedev S.V. Hihiiienichna otsinka elektrychnoho ta mahnitnoho polia promyslovoi chastoty (50 Hz), shcho stvoruietsia pidzemnyimi kabelnyimi liniyamy elektroperedachi z napruhoiu 110-330 kW [Hygienic Assessment of Electric and Magnetic Fields of Industrial Frequency (50 Hz) Created by Underground Cable Electric Power Line of 110-130 kW Frequency]. In : *Aktualni pytannia hihiieny ta ekolohichnoi bezpeky Ukrainy* (desiati marzieievski chytannia) : tezy konf. [Topical Issues of Hygiene and Ecological Safety of Ukraine : Abstracts]. Kyiv ; 2014 : 20-22 (in Ukrainian).

7. Saleh K., Celikler S. and Sarhan M.A.A. *Saudi J. of Biological Sciences*. 2010 ; 17 : 311-314.

8. Udroui J., Giuliani L. and Jeradi L.A. *Eur. J. Oncol. Libr*. 2010 ; 5 : 123-134.

9. Kovalkovitchova N., Sutiakova I., Legarth J., Legarth L., Falis M., Pist J. and Kovach G. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. 2004; 48 : 341-345.

10. Environmental Health Criteria №51. Guide to Short-term Tests for Detecting Mutagenic and Carcinogenic Chemicals. Geneva : WHO ; 1989 : 212 p.

Надійшла до редакції 17.06.2017