

Stručni rad

DJELOVANJE RADIOFREKVENCIJSKOG POJASA NEIONIZIRAJUĆEG ELEKTROMAGNETSKOG ZRAČENJA NA RAZINI STANICE

Ivančica TROŠIĆ¹, Ivan PAVIČIĆ¹, Ivana BUŠLJETA², Mirjana MATAUŠIĆ-PIŠL¹
i Sanja MILKOVIĆ-KRAUS¹

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada¹, Belupo d. d.², Zagreb, Hrvatska

Primljeno u svibnju 2010.

Prihvaćeno u rujnu 2010.

Svrha rada je procjena biološkog djelovanja zračenja radiofrekvencijskog (RF) pojasa visokih frekvencija niskog intenziteta na stanične makromolekularne strukture; DNA te mikrotubularna, aktinska i vimentinska vlakna citoskeleta u kontroliranim uvjetima. U istraživanju su korištena dva pokusna modela, životinjski i stanice u kulturi. Štakori (n=40) podijeljeni su u 4 podskupine kako bi svaka za sebe bila zračena. Prva podskupina zračena je 4 h, druga 16 h, treća 30 h i četvrta 60 h. Životinje su žrtvovane 2., 8., 15. i 30. dana pokusa. U istraživanje je bila uključena i kontrolna skupina (n=24). Štakori su podvrgnuti RF zračenju frekvencije 2450 MHz i prosječne gustoće snage elektromagnetskog zračenja $7,5 \text{ mW cm}^{-2}$ (specifične apsorbirana snaga – SAR = $1,25 \text{ W kg}^{-1}$). Stanični uzorci linije V79 izlagani su 1 h, 2 h i 3 h RF zračenju frekvencije 915 MHz, jakosti električnog polja 10 V m^{-1} (SAR = $0,2 \text{ W kg}^{-1}$). U istraživanju je proveden mikronukleusni test na stanicama *in vivo* i *in vitro*. U prvoj fazi istraživanja *in vivo* nađeno je značajno povišenje broja polikromatskih eritrocita s mikronukleusom (MN) u perifernoj krvi štakora nakon osam tretmana zračenja po dva sata svaki. Genotoksičnost RF zračenja istražena je izlaganjem trajne kulture V79 stanica kontroliranim uvjetima zračenja u istom RF pojasu elektromagnetskog spektra. *In vitro* studija je pokazala da je značajno povišenje broja stanica s MN i oštećenje polarnih proteinskih vlakana mikrotubula i aktina povezano s duljinom izloženosti zračenju ($p < 0,05$). Naša su istraživanja potvrdila i u *in vivo* i u *in vitro* pokusnim uvjetima mogućnost nepoželjnih učinaka radiofrekvencijskih polja na razini polarnih makromolekularnih struktura u stanicama.

KLJUČNE RIJEČI: *in vivo, in vitro, niski intenzitet, RF pojas, visoke frekvencije, zračenje*

Svjedoci smo pojave brojnih ljudskom rukom stvorenih izvora neionizirajućih elektromagnetskih (EM) zračenja koji se rabe za osobne, industrijske i komercijalne svrhe; od električnih postrojenja niskog i visokog napona, tramvaja, mobilne telefonije - mobitela i odašiljača, mikrovalnih pećnica do televizije, radija, radara i druge opreme koja se rabi u industriji, medicini i trgovini. Od izvanredne komercijalne važnosti su EM polja u frekvencijskom rasponu od 300 kHz do 300 GHz koja pripadaju radiofrekvencijskom pojasu

(RF) budući da gotovo sve nove tehnologije mahom rabe ovaj frekvencijski pojas. Posebnu pozornost pak treba usmjeriti na moguće posljedice dugotrajne izloženosti ljudi i ostalih živih organizama EM poljima visokih frekvencija niskog intenziteta kakva emitiraju sve brojniji telekomunikacijski uređaji. Zbog potrebe što kvalitetnijeg prijenosa signala uvode se i rabe rasponi sve viših frekvencija. Prijedlog vodeće ustanove za pitanja informatičke i komunikacijske tehnologije Međunarodnoga telekomunikacijskog saveza (ITU)

o frekvencijskome rasporedu za izvedbu zemaljske komponente međunarodne mobilne komunikacije jesu rasponi od 806 MHz do 960 MHz, od 1710 MHz do 2025 MHz, od 2110 MHz do 2200 MHz i od 2500 MHz do 2690 MHz (1). Zbog opširnosti uporabe RF pojasa i pojave visokih razina elektromagnetskog smoga u okolišu, mogućnost štetnog utjecaja neionizirajućeg zračenja na žive sustave ne smije se isključiti. Pri tome valja pretpostaviti da su osim poznatih termalnih štetni i manje poznati netermalni učinci, odnosno oni koji nisu povezani sa zagrijavanjem. Procijenjeno je da visokofrekventna EM polja velikog intenziteta koja ostvaruju apsorpciju energije (SAR) u vrijednosti od 1 W kg^{-1} do 4 W kg^{-1} tjelesne mase u vremenu od 30 min dovode do zagrijavanja mekih tkiva manjeg od $1 \text{ }^\circ\text{C}$ u odraslih zdravih ljudi. Vrijednosti SAR-a iznad tog raspona izazivaju promjene temperature koje nadmašuju tjelesne termoregulacijske mehanizme, pa se te razine zračenja smatraju termogenima, a biološki učinci termalnim. Suprotno, pri izloženosti radiofrekventnom ili mikrovalnom zračenju niskog intenziteta aktivirani termoregulacijski procesi mogu održati toplinsku homeostazu na razini fizioloških vrijednosti. Tjelesna temperatura može rasti do $1 \text{ }^\circ\text{C}$, a da prilikom toga ne dođe do njezine akumulacije (2). Ipak, pitanje posljedica dugotrajne izloženosti zračenju niskog intenziteta koja bez sumnje uzrokuju fiziološki stres ostaje otvoreno za znanost. Početkom stoljeća često su se mogla naći oprečna izvješća o rezultatima studija kako u *in vitro* tako i *in vivo* uvjetima zračenja. No sve je jasnije da su tomu uvelike pridonijeli interesi multinacionalnih društava koja ujedinjuju proizvodnju i prodaju telekomunikacijskih uređaja (3). U novije vrijeme ipak se može reći da netermogene razine EM zračenja mogu uzrokovati tzv. netermalne biološke učinke na staničnoj razini (4-6). Međunarodna udruga za zaštitu od neionizirajućeg zračenja (ICNIRP) toj vrsti zračenja pripisuje "suspektno štetan biološki učinak" (7), pa preporučuje znanstvenoj zajednici da se osobito pomno istražuju i prate učinci s genotoksičnim predznakom. U našim istraživanjima bioloških pokazatelja osjetljivosti, izloženosti i netermalnih učinaka RF zračenja u prvoj fazi korišten je *in vivo*, a u drugoj *in vitro* pristup. Svrha je ovog rada procjena biološkog djelovanja RF zračenja visoke frekvencije niskog intenziteta na stanične makromolekularne strukture, DNA, mikrotubularna, aktinska i intermedijarna vlakna citoskeleta u kontroliranim uvjetima.

MATERIJAL I METODE

Pokusni životinjski model

Wistar štakori (mužjaci u dobi od 12 tjedana, prosječne mase 350 g) korišteni su u ovom istraživanju. Sa životinjama se postupalo u skladu s nacionalnim pravilima propisanim Zakonom o zaštiti životinja (NN 135/2006) i Rješenjem Uprave za veterinarstvo, Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja RH. Životinje su prošle period prilagođavanja na uvjete pokusa prije početka izlaganja zračenju. Tijekom pokusa životinje su imale slobodan pristup vodi i hrani te su držane u stalnim uvjetima okoliša (22 ± 1) $^\circ\text{C}$ i s 12-satnim ciklusom izmjene svjetla i tame.

Ustrojene su dvije skupine životinja od kojih je jedna kontrolna ($n=24$), a druga zračena ($n=40$). Obje skupine životinja držane su u istim uvjetima, osim što u slučaju kontrolne izvor zračenja nije bio aktivan. Skupine su podijeljene u 4 podskupine.

Izloženost zračenju trajala je 2 h na dan. Ukupno vrijeme izloženosti zračenju za prvu ozračenu podskupinu iznosilo je 4 h, za drugu 16 h, za treću 30 h i za četvrtu 60 h, što znači da su životinje žrtvovane 2., 8., 15. i 30. dana pokusa. Kako bi se izbjegli nepredviđeni termalni učinci, mjerena je rektalna temperatura neposredno prije i poslije izlaganja zračenju s pomoću termometra (ThermoScan thermometer, Braun GmbH, Njemačka). U odnosu na rezultate mjerenja temperature u kontrolnoj skupini i one dobivene u životinja prije zračenja nije nađena promjena temperature neposredno nakon zračenja. Srednja vrijednost apsorbirane energije (SAR) za cijelo tijelo bila je procijenjena prema standardnom postupku (8). Odabrana prosječna gustoća snage elektromagnetskog zračenja od $7,5 \text{ mW cm}^{-2}$ odgovara prosječnoj vrijednosti SAR-a od $1,25 \text{ W kg}^{-1}$ za štakora srednje veličine. SAR procijenjen u ovom rasponu isključuje termalni stres te ne utječe na tjelesnu temperaturu štakora.

Pokusni stanični model

U istraživanjima mehanizma djelovanja neionizirajućeg zračenja rabila se trajna kultura stanica linije V79 (plućni fibroblasti kineskog hrčka). Stanice su kultivirane u hranjivome mediju RPMI 1640 s dodatkom 10 % fetalnoga goveđeg seruma i antibiotika penicilina i streptomcina. Kultura je rasla u optimalnim uvjetima rasta u atmosferi s 5 % CO_2 , $37 \text{ }^\circ\text{C}$ i vlažnosti iznad 80 % u staničnom

inkubatoru (Jouan CO₂ incubateur, Francuska). Osobine kulture su rast u jednom sloju i pojava dodirne inhibicije. Prosjek udvostručenja stanične kulture u standardnim uvjetima je 16 sati (9). Pri izračunu specifične apsorbirane RF energije (SAR) za pojedinačnu stanicu korišten je matematički model procjene vrijednosti dielektričnih osobina staničnih komponenata u skladu s njihovim pojedinačnim volumnim udjelom koji su predložili Steffensen i sur. 1995. godine (10). Prosječan SAR za pojedinačnu stanicu iznosio je 0,2 W kg⁻¹.

Sustav za izlaganje pokusnoga životinjskog modela zračenju

Za pokuse na životinjama izvor RF zračenja bio je generator snage 900 W (micro-Chev Moulinex, Francuska) koji odašilje valove frekvencije 2450 MHz, valne duljine od oko 1,2 m. Generator je bio postavljen na udaljenosti od 1,4 m iznad kaveza od pleksiglasa u kojem su bile smještene pokusne životinje, svaka u zasebnom odjeljku. Prije provođenja 30-dnevnog pokusa određen je intenzitet zračenja u pojedinim odjeljcima kaveza. U svakom odjeljku provelo se mjerenje intenziteta zračenja uređajem EM Radiation Monitor, EMR-20, sondom tipa 8,2 (Wandel&Golterman, SAD). Izabrana je mjerna opcija "average mode", što znači da su rezultati bili izraženi kao srednja vrijednost intenziteta zračenja tijekom 30 sekundi. Temeljem dozimetrijskih podataka životinje su smještene u odjeljke u kojima su bile izložene mikrovalnom zračenju prosječne gustoće snage elektromagnetskog zračenja 7,5 mW cm⁻². Životinje su zračene 2 h na dan, sedam dana u tjednu tijekom 30 dana.

Sustav za izlaganje pokusnoga staničnog modela zračenju

Za ozračivanje staničnih kultura korištena je aparatura sastavljena od tri zasebna uređaja; gigahercna transverzalna elektromagnetska komora (GTEM-komora) (Electro-Mechanics Company, SAD), izvor RF zračenja frekvencije 915 MHz (Anritsu, Japan) i pojačalo signala (model RF 3146 Power Amp Module RF, Micro Devices, SAD). GTEM-komora je valovodna struktura u čijoj se unutrašnjosti generira homogeno RF polje. Izolirana je od okoline tako da ne postoji utjecaj vanjskih elektromagnetskih polja. U GTEM-komori je moguće stvoriti uvjete istovjetne onima koji nastaju u stvarnoj situaciji prilikom korištenja elektronskih

uređaja. Udešena GTEM-komora daje homogeno polje, a snaga polja može se uređivati i nadzirati uporabom standardne opreme. Jednom ustrojeno homogeno EM polje unutar GTEM-komore stabilno je elektromagnetsko okruženje pogodno za provođenje bioloških pokusa. Proizvođač je izmjerio i ovjerio sve bitne fizikalne parametre GTEM-a (Certificate of Test Conformance; report ID: 28936, ETS-Lindgren Quality Assurance, SAD). Temperatura unutar komore održavana je na 37 °C, a stanični su uzorci izlagani jedan, dva i tri sata RF polju frekvencije 915 MHz i jakosti električnog polja 10 V m⁻¹.

Mikronukleusni test in vivo

Zadnjeg dana odabranih perioda zračenja životinje su eutanazirane intraperitonealnom aplikacijom sredstva za anesteziju (Narketan[®], 80 mg kg⁻¹ t.m. + Xylapan[®], 12 mg kg⁻¹ t.m., ip., Vétoquinol, Bern, Švicarska). Osim krvi, uzeti su uzorci koštane srži i pluća za dalje istraživanje. Punkturom srca dobiveni su uzorci krvi u kojima je ispitana učestalost pojave mikronuklearnih eritrocita (11). Preparati razmaza stanica napravljeni su iz kapi krvi te su nakon sušenja i bojenja analizirani s pomoću svjetlosnog mikroskopa (povećanje x1000). Stanični su preparati bojeni May-Grünwaldovom i Giemsinom otopinom. Učestalost pojave MN u polikromatskim eritrocitima (PKE) bila je određena temeljem analize 1000 nezrelih stanica po životinji.

Mikronukleusni test in vitro

Stanična suspenzija u hranjivom mediju koncentracije 2,5x10⁵ mL⁻¹ kultivirana je u komori s CO₂-atmosferom. Nakon faze adaptacije stanice su raspoređene u tri pokusne skupine. Prva skupina od tri odvojena stanična uzorka podvrgnuta je zračenju u GTEM-komori u tri odvojena vremenska perioda od 1 h, 2 h i 3 h. Druga je skupina podvrgnuta istim uvjetima kao i prva, osim što nije zračena pa predstavlja *sham*-kontrolnu skupinu. Treća skupina uzoraka je pozitivna kontrola koja je pod istim uvjetima kao i *sham*-kontrola bila izložena poznatom genotoksičnom agensu antibiotiku mitomicinu C (0,5 µg mL⁻¹, Mitomycin C, Sigma Chemicals, SAD). Dodatkom citohalazina B blokira se citokineza. Stanice se isperu fiziološkom otopinom. Stanični preparati učvrste se fiksirajućom otopinom metanola i octene kiseline u omjeru 9:1 te se učine razmazi. Nakon sušenja i bojenja 10 %-tnom otopinom Giemisine boje analizira se 1000 binuklearnih

stanica po uzorku s pomoću svjetlosnog mikroskopa (povećanje x1000) (12).

Učestalost oštećenja vlakana mikrotubula, aktina i vimentina u V79-stanicama

Nakon faze adaptacije (koncentracija stanica u hranjivom mediju $2,5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$) stanični su uzorci bili raspoređeni u tri pokusne skupine. Prva se skupina u triplikatu zrači u GTEM-komori, druga se kao kontrolna skupina podvrgne *sham*-uvjetima, a treća se kao pozitivno-kontrolna skupina za proučavanje mikrotubula izlaže antimitotskom agensu kolhicinu (Colchicine, Sigma Chemical, SAD). Pozitivnokontrolne stanice za oštećenje aktina izlažu se citohalazinu (Cytohalasine, Sigma Chemical, SAD). Kolhicin se veže na slobodne jedinice tubulina, a citohalazin na slobodne jedinice aktina. Oba agensa sprječavaju polimerizaciju i razaraju, prvi mikrotubule, a drugi aktin. Nakon tretmana stanice se pripreme za dalju obradu prema protokolu za posrednu imunofluorescenciju makromolekularnih struktura citoskeleta (13). Treća skupina proteinskih vlakana citoskeleta, intermedijarna vlakna, odnosno vimentin određeni su metodom posredne imunofluorescencije. Raspršenost vlakana vimentina u citoplazmi interfaznih stanica procijenjena je mikroskopskom analizom u fluorescentnom vidnom polju (povećanje x1000).

Statistička obrada rezultata

Statistička obrada podataka provedena je s pomoću računalnog programa Statistica for Windows 6.0 (StatSoft 2003, package ref. 6). Rezultati su statistički obrađeni s pomoću neparametrijskog Mann-Whitney U testa.

REZULTATI

Mikronukleusni test u krvi štakora

Broj mikronukleusa (MN) na 1000 nezrelih eritrocita nađen za pojedinačnog štakora izloženog RF zračenju bio je od 2,5 do 11,5 (medijan 6,5) te u kontrolnoj skupini od 3,0 do 5,0 (medijan 4,3) osmog dana pokusa, što je pokazalo statističku razliku na razini značajnosti $p < 0,05$. Treba primijetiti da je nađena povišena pojavnost mikronuklearnih stanica za sve periode zračenja, ali nalazi nisu bili statistički značajni (tablica 1).

Mikronukleusni test u kulturi V79-stanica

Pojava MN u kultiviranim V79-stanicama za najdulju izloženost zračenju od 3 sata bila je statistički značajno povišena u odnosu na *sham*-kontrolne uzorke ($p < 0,05$) (tablica 2). Iako nije nađena statistički značajna razlika mikronuklearnih stanica u uzorcima koji su bili zračeni jedan i dva sata, valja istaknuti da su i za te vremenske periode nalazi učestalosti MN bili povišeni u odnosu na odgovarajuće *sham*-kontrolne uzorke. Učestalost pojave MN u ozračenim uzorcima bila je statistički značajno niža u usporedbi s mikronuklearnim stanicama nađenim u pozitivnokontrolnim uzorcima za sve vremenske periode izloženosti ($p < 0,05$).

Oštećenje mreže proteinskih vlakana citoskeleta u kulturi V79-stanica

V79-stanice su pokazale osjetljivost na RF zračenje povezanu s integritetom mikrotubula i aktina u odnosu na *sham*-kontrolnu i pozitivnokontrolne uzorke te u odnosu na vrijeme izloženosti (tablica 3). Pojavile su se nepravilnosti u morfološkom obliku stanica i strukturi mikrotubula. Češći nalaz izduženih membranskih citoplazmatskih izbočina i citoplazmatskih mjehurića, osobito u onih stanica koje su bile dulje izložene zračenju smatran je fenotipskom promjenom uzrokovanom zračenjem. U kraćem vremenu izloženosti većina interfaznih mikrotubula bila je normalno razvijena te se nije bitno razlikovala od stanica koje su poslužile kao *sham*-kontrolne (14). Ni raspored mikrotubularnih vlakana nije se bitno razlikovao od onih nađenih u odgovarajućim kontrolnim uzorcima. U staničnim uzorcima izloženim tri sata RF zračenju nađena je značajna razlika u pojavi promjena na mreži tubulinskih vlakana u usporedbi s kontrolnim uzorcima ($p < 0,05$). Već se u stanicama koje su bile zračene dva sata naziru nepravilnosti u strukturi mreže mikrotubula, a nakon trosatnog izlaganja stanica zračenju, struktura mreže mikrotubula postaje krupnozrnata, što govori u prilog značajnom narušavanju stabilnosti organizacije mikrotubularnih vlakana. Nakon trosatne izloženosti zračenju stanice su pokazale izrazite promjene u izgledu i strukturi aktinskih vlakana (tablica 3). Bez obzira na duljinu tretmana, vimentinska su vlakna zadržala fiziološki oblik i strukturu te se vimentinska mreža zračenih stanica nije bitno razlikovala od *sham*-kontrolnih uzoraka (slika 1a i 1b).

Tablica 1 Učestalost pojave mikronukleusa (MN) u krvi kontrolne i zračene skupine životinja). Štakori su podvrgnuti RF zračenju frekvencije 2450 MHz, prosječne gustoće snage elektromagnetskog zračenja $7,5 \text{ mW cm}^{-2}$ (SAR = $1,25 \text{ W kg}^{-1}$)

Podskupina	Vrijeme izloženosti / h	Vrijeme od početka pokusa do uzimanja uzorka / dan	Broj MN / ‰			
			Kontrolna skupina (n=24)		Zračena skupina (n=40)	
			Medijan	Raspon	Medijan	Raspon
1	4	2	4,5	2,5 do 8,0	5,8	3,0 do 9,0
2	16	8	4,3	3,0 do 5,0	6,5*	2,5 do 11,5
3	30	15	5,5	4,0 do 8,0	5,5	4,0 do 8,0
4	60	30	5,3	3,0 do 8,0	4,3	3,0 do 9,5

Broj MN utvrđen je analizom 1000 polikromatskih eritrocita (PKE) po životinji. Tablica prikazuje vrijednosti utvrđene za pojedinačne podskupine.

(* značajna razlika: $p < 0,05$)

Tablica 2 Učestalost pojave mikronukleusa (MN) u V79-stanicama nakon 1 h, 2 h i 3 h RF zračenja (915 MHz , 10 V m^{-1}) u sham-kontrolnim i pozitivnokontrolnim uzorcima (mitomicin C $0,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$)

Vrijeme izloženosti / h	Broj MN / ‰					
	Sham-kontrola		RF zračenje		Pozitivna kontrola	
	Medijan	Raspon	Medijan	Raspon	Medijan	Raspon
1	5,0	3,0 do 6,0	5,0	3,0 do 7,0	8,0	5,0 do 11,0
2	4,0	3,0 do 6,0	5,0	2,0 do 7,0	9,0	5,0 do 11,0
3	5,0	3,0 do 6,0	6,0*	4,0 do 8,0	10,0	8,0 do 13,0

Broj MN utvrđen je analizom 1000 binuklearnih stanica po uzorku.

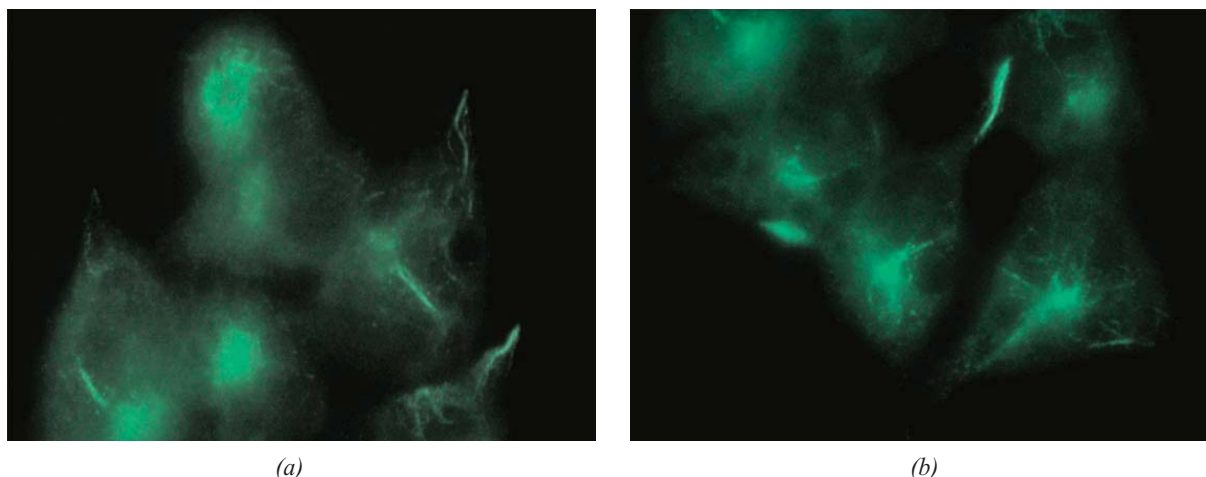
(* značajna razlika: $p < 0,05$ u odnosu na sham-kontrolu)

Tablica 3 Učestalost oštećenja vlakana mikrotubula i aktina u V79-stanicama nakon 1 h, 2 h i 3 h izlaganja RF zračenju (915 MHz , 10 V m^{-1}) te pripadajućim sham-kontrolnim i pozitivnokontrolnim uzorcima (mitomicin C $0,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$)

Vrijeme izloženosti / h	Učestalost oštećenja mikrotubula u V79-stanicama / ‰						Učestalost oštećenja aktina u V79-stanicama / ‰					
	Sham-kontrola		RF zračenje		Pozitivna kontrola		Sham-kontrola		RF zračenje		Pozitivna kontrola	
	Medijan	Raspon	Medijan	Raspon	Medijan	Raspon	Medijan	Raspon	Medijan	Raspon	Medijan	Raspon
1	5,6	4,2 do 8,8	6,7	4,2 do 9,2	6,9	5,0 do 10,6	8,3	5,0 do 11,0	8,8	6,2 do 10,0	13,4	11,1 do 15,4
2	6,8	4,2 do 9,2	7,2	5,8 do 9,2	8,2	5,0 do 11,0	8,6	6,0 do 11,0	8,6	5,0 do 10,4	13,5	7,5 do 16,0
3	6,0	3,8 do 8,4	7,2*	6,2 do 9,2	7,8	4,56 do 10,1	9,2	7,0 do 11,0	9,4*	8,0 do 11,6	17,0	15,0 do 18,0

Analizirano je 500 stanica po uzorku.

(* značajna razlika: $p < 0,05$ u odnosu na sham-kontrolu)



Slika 1 Struktura mreže intermedijarnih vlakana vimentina V79-stanica u sham-kontrolnim uzorcima (a) i nakon tri sata izloženosti RF zračenju (b)

RASPRAVA

Mikronukleusni test omogućuje procjenu klas-togenog ili aneugenog učinka nekog čimbenika *in vivo* i *in vitro*, a služi za brzo otkrivanje oštećenja kromosoma ili mitotskog aparata u stanicama (15). U prvoj fazi naših istraživanja nađeno je značajno povišenje broja mikronuklearnih polikromatskih eritrocita u perifernoj krvi štakora nakon osam tretmana zračenja po dva sata svaki. U štakora i ljudi ne dolazi do akumulacije mikronuklearnih polikromatskih eritrocita u perifernoj krvi, nego se one učinkovito odstranjuju putem slezene (16). Čini se da je prilagodbeni proces pokrenut već na samom početku zračenja te je tijekom osam dana postigao zadovoljavajuću razinu učinkovitosti. Stoga na kraju pokusa nalaz stanica s oštećenjima više nije bio značajan. U prilog tomu govori i podatak da je samo osmog dana nađen značajno povišen broj mikronukleusa (tablica 1). Istraživanja su nastavljena izlaganjem trajne kulture stanica kontroliranim uvjetima zračenja u istom RF po-jasu elektromagnetskog spektra. *In vitro* studija je pokazala značajno povišen nalaz stanica s mikro-nukleusom već prema duljini izloženosti (tablica 1), kao i oštećenje polarnih proteinskih vlakana mikro-tubula i aktina ($p < 0,05$). Primijenjeno zračenje nije djelovalo na nepolarnu strukturu intermedijarnih vlakana vimentina (slika 1a i 1b). U dosadašnjoj literaturi nema nijednog opisa koji bi uključio inter-medijarna vlakna kao ciljnu strukturu za djelovanje RF zračenja. Uzimajući u obzir teoretske postavke koherentnosti ili međusobne povezanosti endogenih

i egzogenih RF polja, dobiven je rezultat koji je u skladu s prirodnim osobinama intermedijarnih vlakana. Ta su izuzetno čvrsta vlakna rasprostran-jena po citoplazmi životinjskih stanica zadužena za staničnu otpornost na mehanički stres. Otpornost na deformacije bez puknuća osigurana im je struk-turnom organizacijom. Osnova građevne strukture intermedijarnog vlakna je monomer u obliku dugačke proteinske jedinice. Po dva monomera se međusobno omotaju čineći novu strukturu odnosno dimer. Spajanjem dvaju zrcalno okrenutih dimera nastaje tetramer. Nastankom tetramera upravljaju pozitivno i negativno nabijeni dimeri. Budući da u strukturi dimeri zauzmu antiparalelnu poziciju, polarnost vlakna se gubi na razini tetramera. Teoretski, intermedijarna vlakna kojima pripada vimentin elektromagnetski su inertne strukture u kojima nema unutarnjih elektrostatskih sila, a time ni mogućnosti za ostvarivanje koherentnog odnosa s dolazećim RF valovima (17). Koherentno stanje u biološkim sustavima znači da oscilirajuće električno polje male snage može izazvati značajne netermalne biološke promjene. Mehanizam je točan kad u biološkom sustavu postoje komponente s oštrim rezonantnim vibracijskim modovima u frekvencijskom opsegu kakav se rabi u mobilnoj telefoniji (18). Naime, stanica se sastoji od visokog udjela vode, iona i minerala, što predstavlja snažan vodič energije, i dipolnih makromolekula, dijelova tubularnih filamenata – skeletona, i mitohondrija uklopljenih u citoplazmu. U međusobnom dinamičnom odnosu nabijeni sastavni dijelovi zdrave stanice titraju sebi svojstvenim frekvencijama, stvarajući vlastito

endogeno EM polje. Slijedom toga stanica i organizam u cijelosti se smatraju elektrobiološkim jedinkama (19). Ioni, elektroni i ostali pokretni nosači naboja u biostrukтури stvaraju elektromagnetsko polje i određuju joj frekvenciju. Stoga je fenomen "fizične rezonancije" kao odgovor na dolazeće zračenje moguć za te strukture. Pokorny i suradnici (20) su 1999. objavili postojanje diskretnih polarnih vibracijskih modova u mikrotubulima. Vibracijski modovi kreću se u megahercnome frekvencijskom području pa unutarstanično oscilirajuće električno polje odgovara koherentnim odnosom, tj. cikličkim titranjem dvaju valova u odnosu na fazu, s vanjskim EM poljem. Potvrđeno je da polimerne makromolekule i vlaknaste strukture citoskeleta, filamenti tubulina i aktina (alini i nepolarnog vimentina) kojima je svojstven električni dipolni moment zadovoljavaju uvjete za poticanje vibracija i stvaraju interno oscilirajuće električno polje određenoga frekvencijskog područja (21). Razumljivo je da ih utjecaj vanjskih EM polja odgovarajućih frekvencija koherencijom može prigušiti ili pojačati i tako štetiti prirodnoj homeostatskoj ravnoteži organizma. Novonastale sile, naime, uzrokuju promjene orijentacije i translacije nabijenih molekula i utječu na brzinu spiralizacije makromolekularnih struktura u stanicama. U skladu s Fröhlichovom teorijom koherentnosti polja naša su istraživanja potvrdila, kako u *in vivo* tako i u *in vitro* pokusnim uvjetima, mogućnost nepoželjnih učinaka radiofrekvencijskih polja na razini polarnih proteinskih struktura u stanicama.

LITERATURA

1. International Telecommunication Union (ITU-R M.1036-3). Frequency arrangements for implementation of the terrestrial component of International Mobile Telecommunications-2000 (IMT-2000) in the bands 806-960 MHz, 1 710-2 025 MHz, 2 110-2 200 MHz and 2 500-2 690 MHz. [pristup 17. travnja 2010.]. Dostupno na http://www.itu.int/dms_pubrec/itu-r/rec/m/R-REC-M.1036-3-200707-I!!PDF-E.pdf.
2. World Health Organization (WHO). Electromagnetic Fields (300 Hz to 300 GHz). Environmental Health Criteria 137. Geneva: WHO; 1993.
3. Heynick LN, Johnston SA, Mason PA. Radiofrequency electromagnetic fields: cancer, mutagenesis, and genotoxicity. *Bioelectromagnetics* 2003;Suppl. 6:S74-100.
4. Bušljeta I. Utjecaj radifrekventnog mikrovalnog zračenja na krvotvorno tkivo štakora [magistarski rad]. Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2002.
5. Pavičić I. Biološki pokazatelji učinka zračenja (935 MHz) na V79 stanice u kulturi [magistarski rad]. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2005.
6. Pavičić I. Djelovanje radiofrekvencijskog zračenja na strukture citoskeleta stanica u kulturi [dissertacija]. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2008.
7. Matthes R, Bernhardt JH, McKinlay AF, urednici. Guidelines on Limiting Exposure to Non-Ionizing Radiation. Munich: International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection; 1999.
8. Durney CH, Iskander MF, Massoudy H, Allen BS, Stewart J, Mitchell BS, John C. Radiofrequency Radiation Dosimetry Handbook. 3. izd. Report SAM-TR-80-32. Texas: USAF School of Aerospace Medicine, Brooks Air Force Base; 1980.
9. Freshney RI. Cell lines, Protocol 12.2. U: Freshney RI, urednik. Culture of animal cells: a manual of basic techniques. New York: Wiley-Liss Inc.; 2000. str. 184-8.
10. Steffensen KV, Raskmark P, Penersen GF. FDTD calculations of the EM-field distribution in a microtiter suspension well. U: Proceedings of the COST 244 Workshop: Biomedical Effects of Electromagnetic Fields; 3.-4. rujna 1995. Kuopio, Finska. str. 80-7.
11. Hayashi M, Sofuni JI, Ishidate M. An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat Res* 1983;120:241-7.
12. Fenech M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat Res* 2000;455:81-95.
13. Bell PB, Safiejko-Mroccka B, Bohn W, Albrecht RM, Malecki M, Burdett ID. Improved methods for preserving macromolecular structure and visualizing them by fluorescence and scanning electron microscopy. *Scanning Microsc* 1995;9:843-60.
14. Trošić I, Pavičić I. Disturbance of cell proliferation in response to mobile phone frequency radiation. *Arh Hig Rada Toksikol* 2009;60:109-15.
15. Anđelković M, Savković N. Principi detekcije i evaluacije efekata genotoksičnih agenasa. U: Zimonjić DB, Anđelković M, Sanković N, urednici. Genotoksični agensi. Beograd: Naučna knjiga; 1990. str.158-71.
16. Tucker JD, Preston RJ. Chromosome aberrations, micronucleaneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat Res* 1996;365:147-59.
17. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M. Intermediate filaments. U: Roberts K, Walter P, urednici. Molecular biology of the cell. New York: Garland Publishing; 2002. str. 796-802.
18. Fröhlich H. The biological effects of microwave and related questions. *Adv Electronics Electron Physics* 1980;53:85-92.
19. Trošić I. Biološka aktivnost elektromagnetskog smoga. U: Srb N, urednik. Zbornik radova 16. međunarodnog simpozija "Elektroinženjerski simpozij" EIS 2008; 5.-7. svibnja 2008.; Šibenik. Zagreb: CopyPrint; 2008. str. 39-44.
20. Pokorný J, Jelínek F, Trkal V, Šrobár F. Vibration in microtubules. U: Bersam F, urednik. Electricity and magnetism in biology and medicine. Bologna: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 1999. str. 967-70.
21. Pokorný J, Jelínek F, Trkal V. Electric field around microtubules. *Bioelectrochem Bioenerg* 1998;45:239-45.

Summary

ACTIVITY OF RADIOFREQUENCY RADIATION AT THE CELL LEVEL

The aim was to assess the biological effect of low-intensity, radiofrequency (RF) radiation on cell macromolecular structures, DNA, and cytoskeleton fibres, including the microtubule, actin, and vimentin. The study was performed both *in vivo* (animal model) and *in vitro* (cell culture).

The *in vivo* design included exposed rats (n=40) and unexposed controls (n=24). Both groups were divided in four subgroups. The first exposed subgroup was irradiated with 2450 MHz RF waves and an average power density of 7.5 mW cm^{-2} ($\text{SAR} = 1.25 \text{ W kg}^{-1}$) for 4 h in total, the second for 16 h, the third for 30 h, and the fourth for 60 h. Daily exposure in all groups was 2 h a day. The animals were killed on exposure days 2, 8, 15, and 30.

The *in vitro* design included continuous cell culture of V79 cells exposed to a 915 MHz RF field and 10 V m^{-1} electric field ($\text{SAR} = 0.2 \text{ W kg}^{-1}$) for 1 h, 2 h, and 3 h.

We performed the micronucleus test on polychromatic erythrocytes *in vivo* and V79 cells *in vitro*. The test showed significantly more polychromatic erythrocytes with micronuclei (MN) in rats irradiated for 16 h. The *in vitro* study confirmed the significantly higher occurrence of micronucleated cells as well as damage to polar microtubules and actin filaments, which correlated with the duration of radiation exposure. Our *in vivo* and *in vitro* results confirm the possibility of undesired effects of man-made radiofrequency fields at the cell level.

KEY WORDS: *low-intensity irradiation, micronucleus test, RF band*

CORRESPONDING AUTHOR:

Ivančica Trošić
Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
Ksaverska cesta 2, 10001 Zagreb
E-mail: itrosic@imi.hr