

ВПЛИВ ЕЛЕКТРОМАГНІТНОГО ПОЛЯ ЧАСТОТОЮ 8 ГЦ НА КЛІТИННІ УШКОДЖЕННЯ ТА ЗАПРОГРАМОВАНУ КЛІТИННУ ЗАГИБЕЛЬ

Методом подвійного прижиттєвого фарбування клітин за допомогою флуоресцентних барвників – Hoechst-33258 та пропідіум йодид, – досліджували вміст живих, некротичних та апоптуючих клітин, а також їх морфологічні особливості у суспензії ізольованих тимоцитів щурів після годинної та трьохгодинної інкубації з 0,1 мМ перексидом водню та при впливі електромагнітного поля, як при окремому, так і комбінованому впливі. Виявлено апоптогенний ефект перексиду водню, як моно впливу, так і в поєднанні з дією 8 Гц, встановлена динаміка некротичних та апоптичних процесів, зокрема динаміка конденсації хроматину, фрагментації ядра та утворення апоптичних тілець. Знайдено, що вплив електромагнітного поля частотою 8 Гц у комбінації з дією перексиду водню на суспензію тимоцитів призводить до збільшення загальної кількості апоптуючих клітин в основному за рахунок клітин з конденсованим хроматином. Зроблено припущення, що вплив 8 Гц в певній мірі активує запуск механізмів апоптозу, але як захисну відповідь на перекисне пошкодження.

Using the method of double cell staining by fluorescent dyes (Hoechst-33258 and propidium iodide) content of alive, apoptic and necrotic cells in suspension of isolated rat thymocytes and also their morphological features after one and three hour of incubation with 0.1 mM hydrogen peroxide and exposure to electromagnetic fields, considering both individual and combined effects, were studied. The apoptic effect of hydrogen peroxide as the monoinfluence and in combination with the action of 8 Hz was detected; the dynamics of apoptic and necrotic processes were installed, including the dynamics of chromatin condensation, nucleus fragmentation and formation of apoptic bodies. It was found that the exposure of the suspension of thymocytes to electromagnetic fields with frequency of 8 Hz combined with the action of hydrogen peroxide led to the increased number of apoptic cells mainly due to cells with condensed chromatin. It was supposed that the influence of 8 Hz in some way activates apoptosis execution mechanisms, but as a protective response to peroxide damage.

Вступ. Тривалий час увагу дослідників привертають електромагнітні поля низьких частот, що обумовлено декількома причинами. По-перше, виявлена їхня екологічна важливість, в тому числі природних геомагнітних варіацій, які присутні в біосфері з початку її існування, які, без сумніву, відіграють важливу роль при розвитку онтогенезі. Ще в 50-х роках німецьким вченим Уінфредом Отто Шуманом визначена резонансна частота Землі – 7,83 Гц, яка пізніше була названа резонансом Шумана [8]. Електромагнітні коливання на цій частоті постійно існують в навколишньому середовищі і модулюються космічною і земною погодою [3]. По-друге, в процесі розвитку цивілізації людина все більше ізолює себе від природного низькочастотного електромагнітного впливу, перебуваючи в бетонних спорудах, автомобілях, літаках та інших екрануючих об'єктах, та, використовуючи електронні пристрої, людство піддає себе дуже широкому спектру електромагнітних впливів, штучного походження, що може впливати на фізіологічні процеси та гомеостаз організму, еволюційно сформованого при впливі постійного природного електромагнітного фону Землі. По-третє, одним з актуальних питань сучасної біофізики є оцінка можливості електромагнітних полів низьких частот індукувати і модулювати (модифікувати) загибель клітин, зокрема апоптоз. Оскільки апоптоз являє собою активну форму клітинної загибелі, яка є фізіологічним механізмом усунення надлишкових та (чи) фізіологічно неповноцінних клітин, то дослідження впливу електромагнітних хвиль низькочастотного діапазону на апоптоз має велике значення як для розробки нових методів, як в експериментальній біології і біотехнології, так і в медицині. Це питання є також важливим для вирішення проблем екології людини. Аналіз літератури показує, що це дискусійне питання, однак підставою для дослідження проблеми є окремі результати, які свідчать саме про такий вплив [9].

Зручною моделлю для дослідження апоптозу є суспензія ізольованих тимоцитів – неповністю диференційованих клітин, які характеризуються високою нестабільністю геному, порівняно з іншими клітинами, та низькою активністю систем репарації одноланцюгових розривів ДНК, що полегшує активацію різних шляхів апоптозу за дії різноманітних чинників. Використання ізольованих тимоцитів для дослідження апоптозу *in vitro* дозволяє здійснювати морфологічний контроль стану

тимоцитів і виявляти клітини з фрагментованим хроматином та апоптичні тілця, тоді як *in vivo* останні швидко поглинаються фагоцитами.

Проблема впливу електромагнітних хвиль низькочастотного діапазону на життєдіяльність тимоцитів та інших клітин є мало дослідженою, що потребує ретельного вивчення. Тому метою роботи було дослідити особливості впливу магнітного поля наднизьких частот (МП ННЧ) на морфологічні зміни структури хроматину та оцінити рівень фрагментації ДНК в тимоцитах при їх пошкодженні перексидом водню.

Об'єкт та методи досліджень. Тимоцити отримували з тимусу щурів лінії Вістар масою 120-150 г., котрі утримувалися на стандартному раціоні виварію. Виділений тимус перетирали через ситечко із синтетичного волокна ($\varnothing = 0,1$ мм) в буферному розчині наступного складу (г/л): NaCl – 6,796; KCl – 0,274; CaCl₂ – 0,288; NaHCO₃ – 2,091; KH₂PO₄ – 0,299; MgSO₄ – 0,144; глюкоза – 1,8; (рН 7.4). Кількість клітин підраховували за допомогою світлового мікроскопа у камері Горяєва з використанням барвника (0,4 % р-н трипанового синього).

Інкубацію тимоцитів ($2-4 \times 10^6$ кл/мл) здійснювали у водному термостаті при 37°C в стаціонарному середовищі RPMI-1640 з додаванням 2,05 мМ глутаміну. Інкубація проводилася протягом 3 годин.

Клітини (тимоцити) у вигляді суспензії піддавали дії досліджуваних чинників, після чого спостерігали морфологічні зміни, виявлені методом подвійного прижиттєвого фарбування клітин за допомогою флуоресцентних барвників. Зокрема Hoechst-33258, який вільно проникає через клітинні мембрани, зв'язується в ядрі з ДНК із зовнішнього боку спіралі, зумовлюючи при цьому флуоресценцію в синій (блакитній) області спектра [6]. Пропідіум йодид проникає лише в некротичні клітини та інтеркалює у спіраль ДНК, зумовлюючи флуоресценцію в червоній області спектра [7].

Окисний стрес є одним з типових механізмів пошкодження клітин шляхом індукції некрозу та апоптозу, саме тому було обрано цю робочу модель. Поширеним методологічним підходом дослідження клітин при окисному стресі є вплив на культуру клітин екзогенних активних форм кисню (АФК). В нашому експерименті в ролі такого агенту виступав перексид водню в кінцевій концентрації 0,1 мМ [4].

Зразки піддавали магнітній обробці імпульсним магнітним полем, яке створювали за допомогою кільця Гельмгольца. Імпульси були прямокутної форми та різної полярності. Частота магнітного поля складала 8 Гц, індукція – 25 мкТл. Частота магнітного поля вибрана на основі її екологічної та геофізичної значущості. Вектор індукції створюваного магнітного поля був паралельним вектору геомагнітного поля. Досліджувані зразки поміщували в кільця Гельмгольца. Контрольні проби знаходились в умовах фонових значень МП ННЧ, характерних для даної лабораторії (20-65 нТл). Для оцінки можливого впливу різниць у рівні фонових магнітних полів в місцях розташування дослідних та контрольних зразків проводили експерименти з псевдовпливом магнітного поля. В цьому випадку досліджувані зразки поміщали в кільця Гельмгольца, не піддаючи дії магнітного поля. Для оцінки достовірності впливу МП ННЧ використовували t-критерій Стюдента для незалежних попарно зв'язаних вибірок.

В даному експерименті використовували наступні умови: контрольна суспензія клітин; клітинна суспензія, котра піддавалася впливу електромагнітних хвиль частотою 8 Гц протягом інкубації; з додаванням перексиду водню до кінцевої концентрації 0,1 мМ в інкубаційне середовище; комбінація електромагнітного впливу з перексидом водню в середовищі інкубації.

Для оцінки вмісту життєздатних, некротичних та апоптичних клітин у суспензії застосовували метод подвійного прижиттєвого фарбування клітин флуоресцентними барвниками Hoechst-33258 (фірма SIGMA – Німеччина) та пропідіум йодид (фірма SIGMA – Німеччина) (кінцева концентрація барвників у суспензії 10 мкМ). Від середовища інкубації клітини відмивали буфером, після чого їх фарбували флуоресцентними барвниками протягом 15 хв у темряві при кімнатній температурі. Забарвлені клітини знову відмивали та фіксували в темряві 4% забуференим розчином формаліну (рН 7.4) протягом 5 хв і відмивали від формаліну тим же буфером. Аліквоту клітинної суспензії наносили на предметне скло, робили мазок та висушували у темряві. Морфологічну оцінку стану клітин проводили за допомогою люмінесцентного мікроскопа Leica DM1000 (окуляр×10, об'єктив×100). У кожному зразку аналізували не менше 2000 клітин (4 підрахунку по 500 клітин).

Статистичну обробку результатів проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики, використовуючи t-критерій Стюдента (оцінки достовірності різниць між статистичними вибірками).

Результати та їх обговорення. В результаті проведення серії експериментів було отримано дані щодо кількісної оцінки вмісту живих, некротичних та апоптичних клітин у суспензії тимоцитів у контролі та після дії досліджуваних чинників. Апоптичні клітини було розді-

лено та класифіковано за морфологічними ознаками в результаті прижиттєвого фарбування клітин із застосуванням двох флуоресцентних барвників (рис.1). Така класифікація використовується у дослідженнях процесів апоптозу [1, 6, 8].

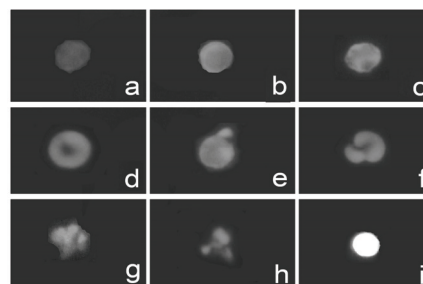


Рис. 1. Ядра тимоцитів за даними флуоресцентної мікроскопії (флуоресцентні барвники Hoechst-33258, пропідіум йодид). а – нормальна клітина; b,c,d – клітини з конденсованим хроматином; e,f,g – клітини з фрагментованим ядром; h – апоптичні тільця; i – некротична клітина

Дані, наведені на рис.2а, свідчать, що після годинної та трьохгодинної експозиції при впливі електромагнітного поля (ЕМП) частотою 8 Гц кількість життєздатних клітин майже не змінюється у порівнянні з контролем. При впливі 0,1 мМ H_2O_2 кількість життєздатних клітин зменшується на 12,1% та 23,9% відповідно у порівнянні з контролем, а при комбінованому впливі з ЕМП кількість життєздатних клітин зменшується відповідно на 15% та 28,4% у порівнянні з контролем. Кількість некротичних клітин суттєво не змінюється відносно контролю як при годинній, так і трьохгодинній експозиції тимоцитів при впливі ЕМП 8 Гц, 0,1 мМ H_2O_2 та при комбінованому впливі (рис.2б). Як видно з даних, представлених на рис.2в, кількість апоптичних клітин при впливі ЕМП 8 Гц як при годинній, так і трьохгодинній експозиції майже не змінюється у порівнянні з контролем, тоді як при впливі 0,1 мМ H_2O_2 та комбінованому впливі 0,1 мМ H_2O_2 й ЕМП 8 Гц кількість апоптичних клітин збільшується на 11% та 14,3% відповідно після годинної експозиції у порівнянні з контролем та на 22,5% і 27,2% відповідно після трьохгодинної експозиції у порівнянні з контролем. Отже, варто звернути увагу на те, що при комбінованому впливі апоптичних клітин достовірно більше, ніж при дії лише перексиду водню, що може вказувати на важливу роль МП ННЧ в ініціації каскадів захисних механізмів клітини, а також на зміну інших фізіологічних функцій, що спричинюється ЕМП 8 Гц саме у відповідь на пошкоджуючі фактори.

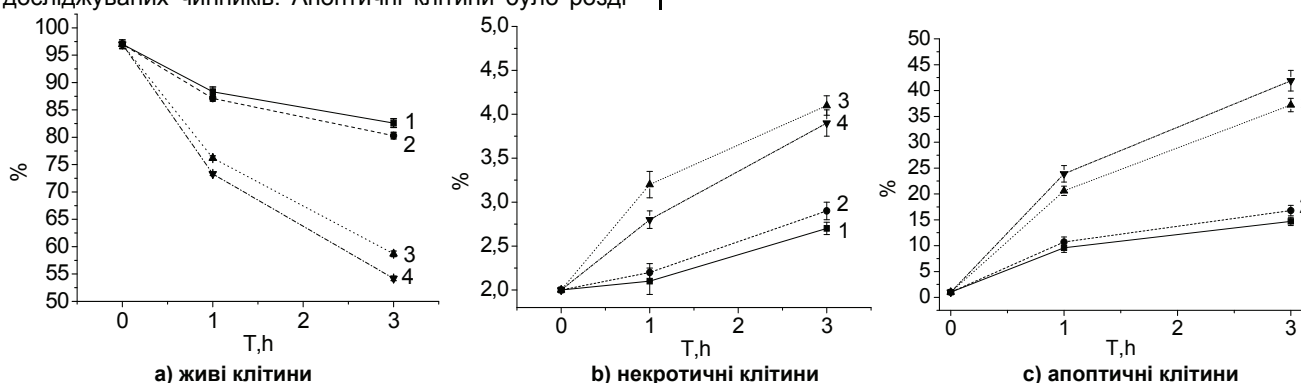


Рис.2. Життєздатність клітин.
1) контроль; 2) 8 Гц; 3) H_2O_2 ; 4) 8 Гц+ H_2O_2

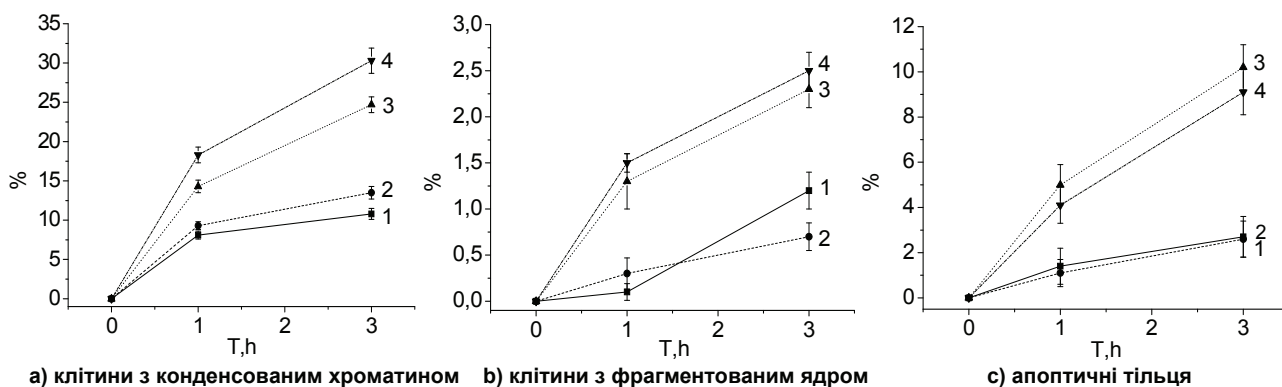


Рис.3. Апоптичні клітини у процентах від загальної кількості клітин.

1) контроль; 2) 8 Гц; 3) H_2O_2 ; 4) 8 Гц+ H_2O_2

Основною морфологічною ознакою апоптозу тимоцитів, спричиненого дією H_2O_2 у відповідній концентрації, є збільшення кількості клітин із конденсованим хроматином. А як відомо, конденсація хроматину – це проміжний етап апоптозу, який у випадку, коли спостерігається значна кількість розривів ДНК, супроводжується її фрагментацією та появою апоптичних тілець [2]. Таку ж тенденцію ми спостерігали і в нашому експерименті, коли кількість апоптичних клітин збільшується в основному за рахунок клітин з конденсованим хроматином (рис. 3а). У зразках, що піддавалися впливу 8 Гц не спостерігалось суттєвого коливання показника апоптичних клітин, тоді як при дії H_2O_2 та комбінованому впливі H_2O_2 й ЕМП 8 Гц кількість апоптичних клітин з конденсованим хроматином достовірно збільшується на 6,5% та 10,7% ($p < 0,05$) відповідно після годинної експозиції у порівнянні з контролем та на 14,4% і 19,9% ($p < 0,05$) відповідно після трьохгодинної експозиції у порівнянні з контролем.

Після годинної та трьохгодинної експозиції тимоцитів при дії трьох варіантів досліджуваних чинників кількість апоптичних клітин з фрагментованим ядром та апоптичними тільцями майже не змінюється відносно контролю, за винятком трьохгодинної експозиції тимоцитів при впливі H_2O_2 та комбінованому впливі H_2O_2 й ЕМП 8 Гц, коли кількість клітин з апоптичними тільцями зростає на 7,5% та 6,4% відповідно у порівнянні з контрольними зразками.

З отриманих результатів можна зробити висновок, що вплив 8 Гц в певній мірі активує запуск механізмів апоптозу, але, ймовірно, як захисну відповідь на перекисне пошкодження. Оскільки після трьохгодинної експозиції тимоцитів при комбінованому впливі 0,1 mM H_2O_2 і ЕМП 8 Гц кількість апоптичних клітин збільшується на 4,7% ($p < 0,05$) у порівнянні з кількістю апоптичних клітин після трьохгодинної експозиції тимоцитів при моно впливі 0,1 mM H_2O_2 .

Загалом треба відмітити, що механізми біологічної дії ЕМП ННЧ вивчені недостатньо, але незважаючи на цей факт, магнітні поля досить ефективно застосовують у сучасній медичній практиці. Зокрема їх використовують для протизапальної терапії, прискорення регенерації тканин та поліпшення мікроциркуляції. Вважа-

ють, що фізичною основою цієї дії є координація руху заряджених частинок [5]. Результатом цієї взаємодії є перш за все зміна мембранного потенціалу та активності процесів перекисного окислення ліпідів. Крім того, магнітне поле впливає на фізико-хімічні властивості води, вільно-радикальні хімічні реакції, макромолекули великих анізотропних діаманітних сполук [5].

Висновки.

1. При дії перекису водню спостерігається збільшення кількості апоптуючих клітин у порівнянні з контролем, а при комбінованому впливі з ЕМП частотою 8 Гц цей ефект посилюється.

2. Збільшення кількості апоптуючих клітин при впливі перекису водню та комбінованому впливі з ЕМП частотою 8 Гц відбувається в основному за рахунок клітин з конденсованим хроматином.

3. Збільшення кількості апоптичних клітин при комбінованому впливі H_2O_2 і ЕМП 8 Гц у порівнянні з моно впливом H_2O_2 , ймовірно, свідчить про посилену активацію механізмів ініціації апоптозу при впливі 8 Гц в присутності перекису водню.

1. Гринюк І.І., Корнійчук Г.М., Капранов О.О. Матишевська О.П. Зміни структурного стану хроматину в тимоцитах на ранньому етапі апоптозу за індукції перекисом водню і радіацією // Укр. біохім. журн. – 2004. – том 76, №5. – С. 90-95. 2. Коваль Т.В., Назарова О.О., Матишевська О.П. Зміна вмісту глутатіону в тимоцитах щурів за індукції апоптозу під впливом H_2O_2 або радіації // Укр. біохім. журн. – 2008. – том 80, №2. – С. 114-119. 3. Мартынюк В.С., Темурьянц Н.А., Владимирский Б.М. У природы нет плохой погоды: космическая погода в нашей жизни. – Киев: Издатель В.С. Мартынюк, 2008. – 179 с. 4. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Часовских Н.Ю., Кайгородова Е.В., Старикова Е.Г., Стариков Ю.В., Радзивил Т.Т., Крат И.В. Роль редокс-зависимых сигнальных систем в регуляции апоптоза при окислительном стрессе // Цитология – 2009. – том 51, №4. – С. 329-334. 5. Холодов Ю.А. Способы использования магнитных полей в медицине и пути воздействия этих полей на организм // Магнитология – 1991. – № 1. – С. 6-11. 6. Hawley R., Hawley T. Flow Cytometry Protocols // Methods in Molecular Biology – 2004. – Vol. 263. – P. 34-37. 7. Moore A., Donahue C., Bauer K., Mather J. Simultaneous measurement of cell cycle and apoptotic cell death // Methods Cell Biol. – 1998. Vol. 57. – P. 265-78. 8. Schlegel K., Füllekrug M. Weltweite Ortung von Blitzen: 50 Jahre Schumann-Resonanzen // Physik in unserer Zeit – 2002. Vol. 33, №6. – P. 256-261. 9. Vysotskii V., Komilova A. Physical Model and Direct Experimental Observation of Water Memory and Biophysical Activity of Magnetic-Activated Water // Journal of Scientific Exploration – 2009. Vol. 23, №4. – P. 500-505.

Надійшла до редколегії 20.09.10