

УДК 577.3

ВПЛИВ МАГНІТНОГО ПОЛЯ НАДНИЗЬКОЇ ЧАСТОТИ НА ЗМІНУ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ ІОНІВ КАЛЬЦІЮ В ТИМОЦИТАХ ЩУРА ЗА УМОВ ПЕРОКСИД-ІНДУКОВАНОГО УШКОДЖЕННЯ

Собко В.М., Мартинюк В.С. Артеменко О.Ю.

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології»,
Київ, Україна
E-mail: svitya@ua.fm*

На ранніх та пізніх стадіях апоптозу спостерігається підвищення рівня внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію, які в свою чергу вважаються активаторами JNK та CaMKII, важливих медіаторів апоптичних процесів. JNK сигнальний шлях є ключовим модулятором загибелі клітин, опосередкованої активними формами кисню та азоту. Тому для того, щоб охарактеризувати модулюючий вплив електромагнітного поля наднизької частоти на дію перекису водню, ми визначали концентрацію цитоплазматичного кальцію у тимоцитах щура. Для оцінки зміни внутрішньоклітинної концентрації кальцію $[Ca^{2+}]$, було використано двохвильовий метод реєстрації зміни флуорисценції індо-1.

На кінетичних кривих зміни двохвильового параметра R можна побачити, що вплив магнітного поля наднизької частоти на суспензію тимоцитів щура спричинює значне зростання параметру R, який прямо пропорційно відображає збільшення внутрішньоклітинної концентрації кальцію, як в контролі, так і при пероксид-індукованому ушкодженні.

Ключові слова: апоптоз, магнітне поле наднизької частоти, іони кальцію, пероксид водню.

ВСТУП

В сучасному світі ми постійно контактуємо з електромагнітними полями наднизької частоти, а тому дослідження даного питання є як ніколи актуальним. Вплив електромагнітних полів так званих «промислових частот» (50-60 Гц), як правило стосується людей, котрі по роду своєї діяльності постійно знаходилися під вищевказаним впливом, і, як наслідок, у них розвиваються різні захворювання, в основі патогенезу яких лежить порушення гомеостазу іонів кальцію. Під дією електромагнітних полів змінюється концентрація кальцію в крові, серцевому м'язі, міжклітинній рідині, відбуваються зрушення в процесах згортання й фібринолізу. У цих умовах істотно зростає частота гіпертонічних кризів й інших серцево-судинних ускладнень [1]. Відомо, що кальцій (Ca^{2+}) є вторинним посередником а також універсальним іоном сигналізації, що регулює різноманітні клітинні функції та є одним із ключових елементів апоптичних сигнальних шляхів. Під час ранніх та пізніх стадій апоптозу спостерігається підвищення рівня внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію, які в свою чергу вважаються активаторами JNK та CaMKII, важливих медіаторів апоптичних процесів. JNK сигнальний шлях є

ключовим модулятором загибелі клітин, опосередкованої активними формами кисню та азоту [2, 3].

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Моделлю для дослідження впливу МП ННЧ на процеси, спричинені дією пероксиду водню (0,1 мМ), обрано суспензію свіжоізольованих тимоцитів. Тимоцити отримували з тимусу щурів лінії Вістар масою 120-150 г., котрі утримувались на стандартному раціоні віварію. 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 (50×10^6 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.

Отриману суспензію тимоцитів навантажували індо-1\AM (вихідний розчин індо-1 1мМ в ДМСО). Кінцева концентрація індо-1\AM в середовищі навантаження становила 5 мкМ. Також додавався Pluronic F-127 (0,05% в середовищі навантаження) для покращення розчинення індо-1\AM. Клітини навантажувались індо-1 протягом 30 хв. при температурі 37°C. Після навантаження клітин центрифугуванням (3 рази), тимоцити відмивались від зовнішнього індо-1.

Реєстрація спектрів кальцієвих зондів індо-1 в суспензії тимоцитів записувались на спектрофлуориметрі СДЛ-2. Флуоресценцію індо-1 збуджували при довжині хвилі $\lambda_{36} = 350$ нм та реєстрували під кутом 90° до променя збуджуючого світла з 1см кювети в спектральному інтервалі від 360 нм до 600 нм з кроком 0,5 нм на монохроматорі флуоресценції. Концентрація індо-1 в розчинах мала величину 5 мкМ. Спектри записувались та зберігались в ASCII кодах з можливістю подальшої обробки за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення.

З огляду на певні недоліки у спектрофлуориметрі СДЛ-2 (нереалізований контроль за стабільністю роботи лампи ДКСШ-150, відсутність можливості зміни спектрів випромінювання за допомогою опорного каналу, застаріле програмне забезпечення) виникла необхідність використовувати, раніше розроблені Семеновим Ю.І. та іншими, удосконалену апаратно-програмну частину спектрофлуориметра та цифровий метод зменшення впливу флуктуацій збуджуючого випромінювання, який є модифікацією методів усереднення фотоструму [4].

Метод полягає в автономному регулюванні тривалості часових інтервалів інтегрування фотоструму відповідно до змін інтенсивності збуджуючого випромінювання. Реєстрація спектрів флуоресценції зондів здійснюється шляхом перетворення величини інтенсивності кожної поточної спектральної складової у відповідний цифровий код, який реєструється за допомогою цифрового реєструючого пристрою. При цьому кванти флуоресценції за допомогою фотоелектронного помножувача (ФЕП) перетворюються в схоластичну

послідовність одноелектронних імпульсів, які підсилюються та нормалізуються по амплітуді.

Зв'язування іонів Ca^{2+} флуоресцентними зондами (індо-1) значно змінює їхні спектри флуоресценції, що дозволяє за допомогою спеціальних флуоресцентних установок визначити концентрацію $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Для цього використовується двоххвильовий метод реєстрації. Реєструється двоххвильовий параметр $R=I_1/I_2$, де I_1 та I_2 – інтенсивність флуоресценції на двох довжинах хвиль λ_1 та λ_2 відповідно. У традиційних установках реєстрації Ca^{2+} -сигналів нервових чи м'язових клітин проводиться через вимірювання параметру R , коли по черзі світло флуоресценції проходить через два світлофільтри з λ_1 та λ_2 , які розміщені на диску, що швидко обертається.

Клітинні суспензії піддавали впливу МП ННЧ, 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 [5,6]. Вектор індукції створюваного магнітного поля був паралельним вектору геомагнітного поля. Досліджувані зразки поміщували в кільця Гельмгольца. Контрольні проби знаходились в умовах фонових значень електромагнітного поля наднизьких частот, 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.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Щоб охарактеризувати вплив МП ННЧ та дію пероксиду водню, ми визначали концентрацію цитоплазматичного кальцію у тимоцитах щура. Для оцінки зміни внутрішньоклітинної концентрації кальцію $[\text{Ca}^{2+}]_i$ було використано двоххвильовий метод реєстрації зміни флуоресценції індо-1.

На кінетичних кривих зміни двоххвильового параметра R , що прямо пропорційно залежить від концентрації вільних іонів кальцію, можна побачити, що вплив МП ННЧ на суспензію тимоцитів щура спричинює достовірне зростання параметру R (Рис.1.), що свідчить про достовірне збільшення внутрішньоклітинної концентрації кальцію на 62% ($p<0,05$).

Потрібно відмітити, що рН є одним з найважливіших параметрів, які суттєво впливають на біологічні процеси. рН нижче 7,4 як правило, є стресуючим фактором, а як відомо, МП посилюють клітинну відповідь в умовах ненормального середовища (простого розчину хлориду натрія) [7].

Провівши ці ж дослідження при значенні рН 7,0, що є неприродним середовищем для тимоцитів, ми спостерігали подібні ефекти МП ННЧ, як і при рН=7,4, але процеси відбувалися з різною динамікою. Добре видно, що потрапляння тимоцитів в більш кисле середовище спричиняє повільну спонтанну кальцієву відповідь, чого не спостерігається при рН 7.4. Водночас з цим, на кінетичних кривих двоххвильового параметра R можна побачити, що вплив МП ННЧ на

суспензію тимоцитів щура спричинює значне зростання параметру R на 13 % ($p < 0,05$), приблизно після шести хвилин впливу, та виходить на плато приблизно на дванадцятій хвилині. (Рис.2.)

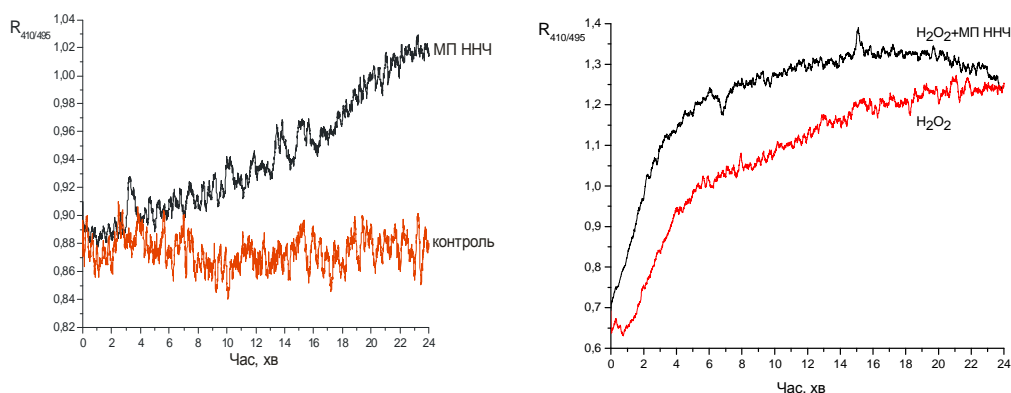


Рис. 1. Динаміка двохвильового параметру R (зонд індо-1) в тимоцитах.
Розчин Кребса (2,5 ммоль/л CaCl_2); $t=22^\circ\text{C}$; $\text{pH}=7,4$.

Як видно з рис. 1., додавання H_2O_2 до суспензії тимоцитів щура спричинює зростання параметру R на 36 % ($p < 0,05$), а в комбінації із впливом МП ННЧ цей ефект значно посилюється ще на 8% ($p < 0,05$).

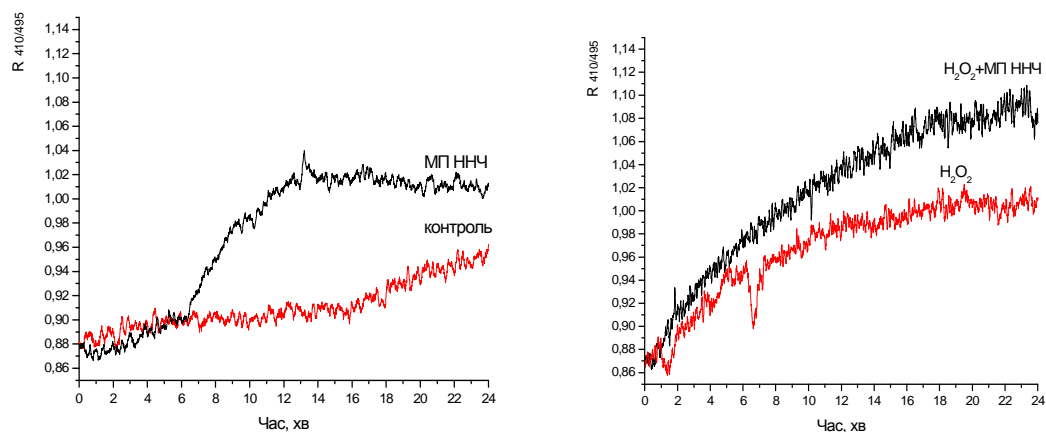


Рис. 2. Динаміка двохвильового параметру R (зонд індо-1) в тимоцитах.
Розчин Кребса (2,5 ммоль/л CaCl_2); $t=22^\circ\text{C}$; $\text{pH}=7,0$.

Кінетичні криві, які виражають зміни двохвильового параметру R при досліджуваних впливах мають вигляд сигмоїдних кривих з плато.

При чому параметр R, що виражає зміни при впливі МП ННЧ досягає свого максимального значення R_{\max} після приблизно 25 хвилин, а параметр R, що виражає зміни при комбінованій дії H_2O_2 з МП ННЧ досягає свого максимального значення R_{\max} після приблизно 16 хвилин.

Як видно з рис. 2., додавання H_2O_2 до суспензії тимоцитів щура призводить до зростання параметру R на 5% ($p < 0,05$), а в комбінації із впливом МП ННЧ цей ефект значно посилюється ще на 7% ($p < 0,05$). Кінетичні криві, які виражають зміни двохвильового параметру R при досліджуваних впливах мають вигляд сигмоїдних кривих з плато. При чому параметр R, що виражає зміни при впливі МП ННЧ досягає свого максимального значення R_{\max} після приблизно 13 хвилин, а параметр R, що виражає зміни при впливі H_2O_2 та комбінованій дії H_2O_2 з МП ННЧ досягає свого максимального значення R_{\max} після приблизно 25 хвилин.

Важливим залишалось виявити та дослідити можливий механізм активації апоптозу при дії досліджуваних факторів. Ми припустили, що таким механізмом активації апоптозу може бути кальцій-залежний механізм. Кальцій (Ca^{2+}) є універсальною молекулою сигналізації, що регулює різноманітні аспекти клітинних функцій та являється одним із ключових елементів апоптичних сигнальних шляхів. Під час ранніх та пізніх стадій апоптозу спостерігається підвищення рівня внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію, які в свою чергу вважаються активаторами JNK та CaMKII, важливих медіаторів апоптичних процесів. JNK сигнальний шлях є ключовим модулятором загибелі клітин, опосередкованої активними формами кисню та азоту. Тому для того, щоб охарактеризувати модулюючий вплив електромагнітного поля наднизької частоти на дію перекису водню, ми визначали концентрацію цитоплазматичного кальцію у тимоцитах щура. Для оцінки зміни внутрішньоклітинної концентрації кальцію $[Ca^{2+}]_i$ було використано двохвильовий метод реєстрації зміни флуорисценції індо-1.

Таблиця 1
Величина $\Delta [Ca^{2+}]_i$ при дії H_2O_2 та модифікуючому впливі МП ННЧ,
Зміна за весь період часу експозиції.

Фактори впливу	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ (нмоль/л)	
	pH=7,4	pH=7,0
Контроль	193,26 ± 9,47	239,56 ± 8,84
МП ННЧ	312,4 ± 13,29	278 ± 14,62
H_2O_2	465,96 ± 11,93	312,4 ± 12,73
H_2O_2 та МП ННЧ	496,7 ± 23,75	374,18 ± 9,86

На кінетичних кривих зміни двохвильового параметру R можна побачити, що вплив МП ННЧ на суспензію тимоцитів щура спричинює значне зростання

параметру R (Рис.1.), який прямо пропорційно відображає збільшення внутрішньоклітинної концентрації кальцію.

Як видно з рис. 1., додавання H_2O_2 до суспензії тимоцитів щура спричинює зростання параметру R , а в комбінації із впливом електромагнітного поля наднизької частоти цей ефект значно посилюється. Провівши ці ж дослідження при значенні рН 7,0, ми спостерігали такі ж загальні ефекти МП ННЧ, як і при рН=7,4, але процеси відбувалися з різною динамікою.

Використавши вище описані закономірності за отриманими значеннями параметру R було розраховано цитозольний $[Ca^{2+}]_i$ в контрольній суспензії тимоцитів та в тимоцитах при дії досліджуваних факторів, коли параметр досягав максимального значення R_{max} ($[Ca^{2+}]_{i max}$). З отриманих даних обчислювали збільшення концентрації кальцію $\Delta [Ca^{2+}]_i$ при дії H_2O_2 та МП ННЧ, а також при комбінації впливу цих факторів (Таб. 3.2). Як видно з даних таблиці, вплив МП ННЧ спричинює значне зростання концентрації внутрішньоклітинного кальцію, особливо за нормального фізіологічного значення рН. Також варто відмітити, що при комбінованому впливі МП ННЧ та пероксиду водню спостерігається збільшення концентрації кальцію, в порівнянні з впливом лише пероксиду водню, це може свідчити про те, що дія МП ННЧ модифікує ефект, спричинений пероксидом водню.

Важливо відмітити, що використана концентрація пероксиду водню хоча і, можливо, здатна до окиснення ліпідів мембрани, не призводить до зміни проникності цитоплазматичної мембрани для кальцію, а отже зростання концентрації іонів кальцію $[Ca^{2+}]_i$ в цитозолі відбувається не тільки за рахунок дифузії іонів кальцію з позаклітинного простору, а ще також і внаслідок виходу цього іону з внутрішньоклітинних депо, як відповідь на певний фактор впливу. Дослідження зміни флуоресценції індо-1 проводилися протягом 25 хвилин, оскільки за цей час двохвильовий параметр R досягає свого максимального значення [4].

ВИСНОВКИ

Вплив МП ННЧ призводить до збільшення внутрішньоклітинної концентрації кальцію як при наявності H_2O_2 , посилюючи його ефект на суспензію тимоцитів, так і в розчині без H_2O_2 . Варто відмітити, що така дія, спричинена МП ННЧ, спостерігається при невеликих відхиленнях рН, та процес збільшення внутрішньоклітинної концентрації кальцію відбувається із різною динамікою. Таким чином, отримані дані свідчать, що МП ННЧ спричинює збільшення внутрішньоклітинної концентрації кальцію як самостійно, так і у комплексі із H_2O_2 (де ефект значно посилюється), що в свою чергу може призводити до активації важливих медіаторів апоптичних процесів, таких як СаМКП та JNK, і, таким чином, сприяє запуску апоптозу.

Список літератури

1. Келеджиева Е.В. Кальцієвий гомеостаз і порушення фібринолізу у метеолабільних хворих на гіпертонічну хворобу літнього та старечого віку: Дисертаційна робота на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук: 14.01.11; Захищена 29.09.2008; Затв.12.11.2008. - Сімферополь, 2008. – 131 с.

- Olofsson M.H. Charting calcium-regulated apoptosis pathways using chemical biology: role of calmodulin kinase II / M.H. Olofsson, A.M. Havelka, S. Brnjic [et al.] // BMC Chemical Biology. – 2008. - Vol.8, №2. - P.134-137.
- M.W. Apoptosis and Autophagy: Decoding Calcium Signals that Mediate Life or Death / M.W. Harr, C.W. Distelhorst // Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 2010. - Vol.3, № 1. - P.25-31
- Артеменко А.Ю. Вплив пероксиду водню на концентрацію кальцію в тимоцитах щура: Дисертаційна робота на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук: 03.00.02; Захищена 04.09.2006; Затв.12.11.2006. - Київ, 2006. – 127 с.
- 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.
- Пресман А. С. Электромагнитные поля и живая природа. – М.: Наука, 1968. – 288 с.
- Schlegel K. Weltweite Ortung von Blitzen: 50 Jahre Schumann-Resonanzen / K. Schlegel, M. Füllekrug // Physik in unserer Zeit – 2002. Vol.33, № 6. - P.256-261.

Собко В.М. Влияние магнитного поля сверхнизкой частоты на изменение внутриклеточной концентрации ионов кальция в тимоцитах крысы при пероксид-индуцированном повреждении / Собко В.М., Мартынюк В.С. Артеменко А.Ю. // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2013. – Т. 26 (65), № 4. – С.167-174.

На ранних и поздних стадиях апоптоза наблюдается повышение уровня внутриклеточной концентрации ионов кальция, которые в свою очередь считаются активаторами JNK и CaMKII, важных медиаторов апоптотических процессов. JNK сигнальный путь является ключевым модулятором гибели клеток, опосредованной активными формами кислорода и азота. Поэтому для того, чтобы охарактеризовать модулирующее влияние электромагнитного поля сверхнизкой частоты на действие перекиси водорода, мы определяли концентрацию цитоплазматического кальция в тимоцитах крысы. Для оценки изменения внутриклеточной концентрации кальция $[Ca^{2+}]_i$ было использовано двухволновой метод регистрации изменения флуорисценции индо-1. На кинетических кривых изменения двухволнового параметра R можно увидеть, что влияние магнитного поля сверхнизкой частоты на суспензию тимоцитов крысы вызывает значительный рост параметра R, прямо пропорционально отражает увеличение внутриклеточной концентрации кальция, как в контроле, так и при пероксид-индуцированном повреждении.

Ключевые слова: апоптоз, магнитное поле сверхнизкой частоты, ионы кальция, пероксид водорода.

THE INFLUENCE OF LOW FREQUENCY MAGNETIC FIELD ON THE INTRACELLULAR CALCIUM IONS CONCENTRATION IN RAT THYMOCYTES UNDER PEROXIDE INDUCED DAMAGE

Sobko V.M., Martynuk V.S., Artemenko O.Y.

*Kyiv National Taras Shevchenko University, Kyiv, Ukraine
E-mail: svitya@ua.fm*

In today's world we are constantly in contact with electromagnetic fields of extremely low frequency, and therefore the study of this issue is more important than ever. Effects of electromagnetic fields of so-called "industrial frequency " (50-60 Hz) usually applies to people who has been by the nature of the activity under the continuous influence of these electromagnetic fields, and as a result, it could be a cause of various diseases, the pathogenesis of which is a violation of calcium ions homeostasis. The action of electromagnetic fields changes the concentration of calcium in the blood, heart muscle, interstitial fluid; there are changes in clotting and fibrinolysis. Under these conditions the frequency of hypertensive crises and other cardiovascular complications significantly increases.

It is known that calcium (Ca^{2+}) is a secondary messenger and universal signaling ion that regulates diverse cellular functions and is one of the key elements of the apoptotic

signaling pathways. At the early and late stages of apoptosis we observed the increase of the intracellular calcium ion concentration, which are considered to be activators of JNK and CaMKII, the important mediators of apoptotic processes. JNK signaling pathway is a key modulator of cell death mediated by active forms of oxygen and nitrogen. Therefore, in order to characterize the modulating effect of low frequency electromagnetic field on the action of hydrogen peroxide we have identified the cytoplasmic calcium concentration in rat thymocytes. To assess changes of intracellular calcium concentration $[Ca^{2+}]_i$ the dual-wavelength method for detecting changes of fluorescent Indo-1 was used. It can be seen from the kinetic curves of the two-wavelength parameter R that the influence of low frequency magnetic fields on the rat thymocytes suspension causes the considerable increase of the parameter R that proportionally reflects the increase of intracellular calcium concentration both in the control and under the peroxide-induced damage.

It is important to note that the used concentration of hydrogen peroxide although is likely to be capable of lipid membrane oxidation, does not change the permeability of the cytoplasmic membrane to calcium ions and thus, the increase of calcium ions concentration $[Ca^{2+}]_i$ in the cytosol is not only caused by diffusion of calcium ions from extracellular space but also is a result of the ions release from intracellular stores in response to a particular influencing factor. Investigation of the fluorescence changes of Indo -1 were carried out for 25 minutes, because by this time two-wave parameter R reaches its maximum value [4].

Effect of ELF MP increases intracellular calcium concentration both in the presence of H_2O_2 , that enhances its effect on thymocytes suspension, and in solution without H_2O_2 . It should be noted that this effect caused by MP ELF could be observed with slight deviation in pH, and the process of the intracellular calcium concentration augmentation occurs with different dynamics. Thus, these data indicate that MP ELF causes an increase in intracellular calcium concentration, both independently and in combination with H_2O_2 (where the effect is greatly enhanced), which in turn can lead to activation of the important mediators of apoptotic processes such as CaMKII and JNK, and thus promotes apoptosis run.

Keywords: apoptosis, low frequency magnetic field, calcium ions, hydrogen peroxide, peroxide, aqueous.

References

1. Keledjieva E. V., Calcium Homeostasis and Fibrinolysis Disturbance in Meteo-Dependent Patients of Elderly and Senile Age with Hypertonic Disease, *Manuscript*, Simferopol. – 131 p (2008).
2. Olofsson M.H., Charting calcium-regulated apoptosis pathways using chemical biology: role of calmodulin kinase II, *BMC Chemical Biology.*, 8, 2.,134-137 (2008).
3. Harr M.W., Distelhorst C.W., Apoptosis and Autophagy: Decoding Calcium Signals that Mediate Life or Death Cold, *Spring Harbor Laboratory Press.*, 3, 1.,25-31 (2010).
4. Artemenko O.JU., Influence of hydrogen peroxide on calcium concentration in rats thymocytes, *Manuscript*, Kyiv, 127 p (2006).
5. Martynyuk V.S., Temuryants N.A., Vladimirkii B.M., U prirody net plohoi pogodi: kosmicheskaya pogoda v nashey zhizni. *Print by Martynyuk V.S.*, 179 p (2008). [RUS]
6. Presman A.S. Elektromagnitnye polya i zhivaya priroda, *Nauka.*, 288 p (1968). [RUS]
7. Schlegel K., Füllekrug M., Weltweite Ortung von Blitzen: 50 Jahre Schumann-Resonanzen, *Physik in unserer Zeit.*, 33, 6., 256-261 (2002).

Поступила в редакцию 16.11.2013 г.