

**ВЛИЯНИЕ МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК
БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА****Научно-исследовательский институт биологии****Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина (г. Харьков)****fildomik@mail.ru**

Данная работа является фрагментом НИР «Дія електромагнітного випромінювання на молекулярні процеси, властивості клітин і процеси запліднення та ембріогенезу», № госрегистрации 0112U008334.

Вступление. Эффекты воздействия низкоинтенсивных статических и низкочастотных магнитных полей на организм обсуждаются ввиду их возможного негативного влияния на здоровье, а также применения в медицине. Например, обнаружена связь между воздействием низкочастотных магнитных полей и случаями острого лимфобластического лейкоза у детей [10]. Существуют ограничения на использование высокоинтенсивного магнитного поля в медицинских приложениях, например, в магниторезонансной томографии [9]. С другой стороны, статические и низкочастотные магнитные поля используются в терапевтических целях [12]. Многие исследования показывают эффект низкоинтенсивных магнитных полей (НМП) на организмы и клетки. Воздействие НМП может вызывать увеличение активности, концентрации и времени жизни парамагнитных свободных радикалов, генетические мутации и/или апоптоз [8]. Умеренные дозы НМП специфически действуют на различные клетки. Например, при действии на человеческие лимфоциты, тимоциты и культуры клеток 3DO, Y937, HeLa, HerG2 FRTL-5 НМП с магнитной индукцией 6 мТл обнаружено влияние поля на процесс апоптоза, в зависимости от типа клеток. Для одних клеток было выявлено падение уровня апоптоза, для других этот уровень возрос примерно на 20% после 24 часов постоянного воздействия. Индукция апоптоза в последнем случае, скорее всего, была вызвана благодаря повышению концентрации Ca^{2+} в результате воздействия. Пролиферация клеток изменялась очень незначительно. Кроме того, на интенсивность эффектов влияет также и время воздействия [7]. Наиболее часто эффект воздействия постоянным магнитным полем выражается в увеличении частоты апоптоза или деления клеток, но не некроза или изменения формы клеток. Также наблюдается увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . В случае комбинирования введения вызывающих апоптоз веществ и облучения постоянным МП количество случаев апоптоза во всех типах клеток была снижена относительно воздействия только химикатами, кроме 3DO. В клетках 3DO уровень апоптоза значительно возрос под воздействием статического МП и веществ, вызывающих апоптоз [17].

Биологические эффекты постоянного магнитного поля (ПМП) и низкочастотного ЭМП, на первый взгляд, выглядят парадоксальными из-за отсутствия электромагнитных квантов, энергия которых могла бы сравниться с энергией теплового движения молекул. ПМП вообще не может иметь никакого термического эффекта. Считается правдоподобным, что эффекты постоянного магнитного поля базируются на ином механизме взаимодействия и могут накапливаться на каком-либо биологическом уровне, минуя уровень тепловых колебаний молекул [11].

В предыдущих исследованиях нашего института была показана стрессовая реакция на ПМП с индукцией 25 мТл. Процентное отношение поврежденных клеток, выявляемое окрашиванием акридиновым оранжевым и бромистым этидием, показало увеличение числа поврежденных клеток после экспозиции. Также ПМП вызвало конденсацию хроматина (гетерохроматизацию) в клетках буккального эпителия человека пропорционально времени облучения [16].

Цели исследования:

1. Исследовать влияние магнитного поля на жизнеспособность клеток человека. Жизнеспособность предполагается оценивать с помощью исследования проницаемости клеточных мембран для бромистого этидия и индигокармина.

2. Исследовать влияние магнитного поля на появление реакции стресса на уровне клетки. Уровень стресса предполагается оценивать с помощью подсчета уровня конденсации гетерохроматина в ядрах клеток после окрашивания раствором орсеина.

Объект и методы исследования. Для проведения экспериментов были использованы клетки буккального эпителия двух доноров: донор А (24 года) и донор Б (23 года). Клетки были получены путем соскоба с внутренней стороны щеки донора и помещены в буферный раствор (3,03 мМ фосфатный буфер, pH 7,0 с добавлением 2,89 мМ $CaCl_2$) [14]. Постоянное магнитное поле с индукцией 25 мТл было получено с помощью постоянного магнита. Воздействие на образцы проводилось в течение различных временных промежутков (1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 минут).

Исследование проводилось в соответствии с общепринятыми биоэтическими нормами с соблюдением соответствующих принципов Хельсинкской декларации прав человека, Конвенции Совета Евро-

пы о правах человека и биомедицине и соответствующих законов Украины относительно проведения экспериментальных и клинических исследований.

Оценка жизнеспособности клеток проводилась на основании окрашивания красителями Hoechst 33342 (10 мг/л) и бромистым этидием (5 мг/л). Hoechst 33342 является витальным красителем, окрашивающим живые клетки, в то время как бромистый этидий окрашивает только клетки с поврежденной мембраной, пропускающей краситель внутрь клетки. Для оценки жизнеспособности было обработано по 1200 клеток в каждом варианте эксперимента (три повтора эксперимента по 400 клеток). В каждом эксперименте подсчитывался процент клеток, окрашенных бромистым этидием [13].

Оценка стресса, которому подвергались клетки в результате воздействия постоянного магнитного поля, проводилась на основании подсчета количества гранул гетерохроматина в ядрах клеток [13,15]. Для визуализации гранул гетерохроматина был использован 2% раствор красителя орсеина в 45% уксусной кислоте. Всего было обработано по 300 клеток в каждом варианте эксперимента (три повторности по 100 клеток).

Для оценки изменения проницаемости мембран было использовано окрашивание 4 мМ раствором индигокармина, приготовленного на буферном растворе для хранения клеток, описанном выше. Клетки с нормальной функциональностью мембраны оставались неокрашенными, клетки, мембраны которых были повреждены, окрашивались. Было обработано по 1200 клеток на каждый вариант эксперимента (три повтора эксперимента по 400 клеток). Подсчитывалось количество неокрашенных, слабоокрашенных и полностью окрашенных клеток после контакта образца и красителя в течение 5 мин (проводилась фотосъемка образца также не более 5 мин на образец).

Во всех трех случаях определялось значение стандартной погрешности и достоверность отклонения по методу Стьюдента. Вычисления проводились в программе STATISTICA 8.

Результаты исследований. Окрашивание Hoechst 33342 и бромистым этидием не выявили значительного отклонения количества поврежденных клеток от контроля в случае с воздействием магнитного

поля с индукцией 25 мТл (рис. 1, 2). Отклонение можно наблюдать только при значительном времени воздействия (20 мин).

Окрашивание индигокармином также не выявило достоверного изменения проницаемости мембран клеток после воздействия (рис. 3, 4). Только при увеличении времени воздействия до 30 мин удалось обнаружить достоверное увеличение проницаемости мембран клеток донора А (рис. 3).

Подсчет количества гранул гетерохроматина в ядрах клеток, подверженных воздействию постоянного магнитного поля с индукцией 25 мТл выявил повышение количества гранул. При повышении времени воздействия этот показатель увеличивался (рис. 5, 6). Достоверное повышение количества гранул гетерохроматина было выявлено после воздействия в течение 3 мин (донор Б) или 5 мин (донор А). Дальнейшее увеличение времени воздействия до 15 мин не приводило к значительному увеличению количества гранул гетерохроматина для донора А (рис. 5). Для клеток донора Б (рис. 6) достоверное увеличение количества гранул гетерохроматина зарегистрировано после времени облучения 3, 15, 20 мин.

Обсуждение. Из данных, приведенных на рисунках 1-2, видно, что воздействие низкоинтенсивного постоянного магнитного поля не приводит к достоверным изменениям в проницаемости мембран клеток для бромистого этидия, кроме двух случаев: у донора А после воздействия в течение 1 мин,

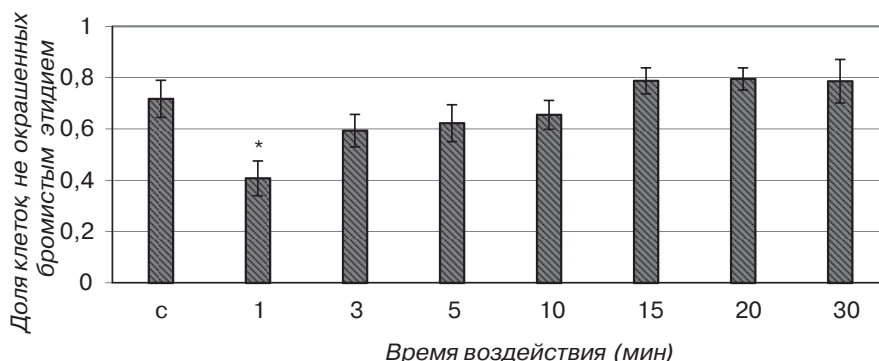


Рис. 1. Зависимость проницаемости мембран клеток донора А для бромистого этидия от времени воздействия магнитного поля. Здесь и ниже указаны средние величины и величины стандартной ошибки.

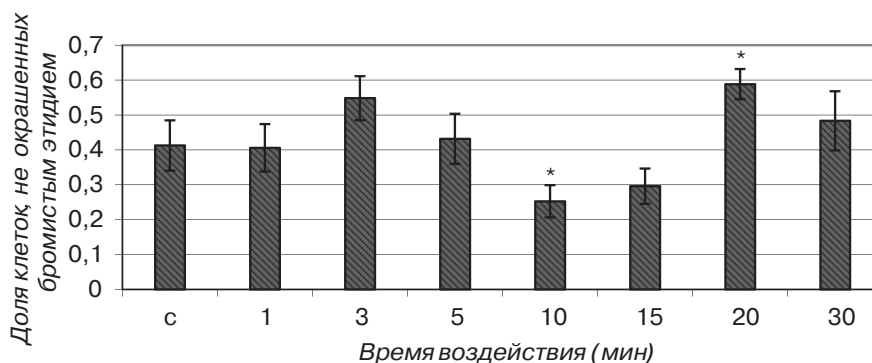


Рис. 2. Зависимость проницаемости мембран клеток донора Б для бромистого этидия от времени воздействия магнитного поля.

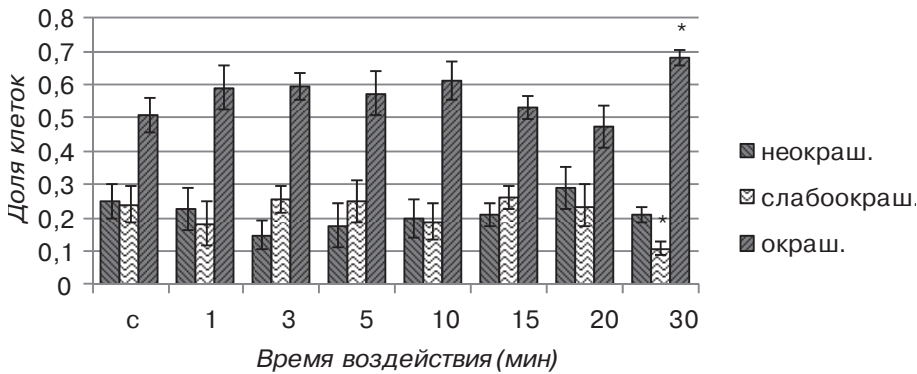


Рис. 3. Доля клеток донора А, неокрашенных, слабоокрашенных и интенсивно окрашенных индигокармином, при различном времени воздействия магнитного поля.

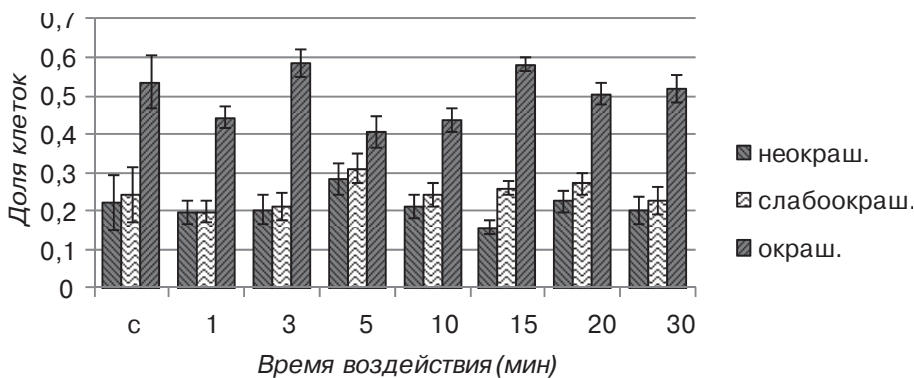


Рис. 4. Доля клеток донора Б, неокрашенных, слабоокрашенных и интенсивно окрашенных индигокармином, при различном времени воздействия магнитного поля.

у донора Б – после воздействия в течение 10 мин и 20 мин.

На рисунке 3 показано, что только длительное воздействие (30 минут) вызвало достоверное повышение проницаемости мембран по отношению к контролю при окрашивании индигокармином.

Таким образом, можно заключить, что в наших экспериментах реакция мембран по показателю проницаемости для бромистого этидия у облучаемых магнитным полем клеток буккального эпителия человека выражена сильнее, чем реакция мембран на это воздействие, регистрируемая с помощью проницаемости мембран для индигокармина. В работе [5] было показано достоверное увеличение проницаемости мембран для индигокармина при воздействии в течение 10 и 20 минут как для вращающегося, так и для постоянного магнитного поля с индукцией 25 мТл. При этом увеличение проницаемости при воздействии постоянного магнитного поля наступало после воздействия в течение 10 минут.

В то же время, реакция конденсации хроматина проявляется достоверно после относительно небольшом времени воздействия (3 мин у донора Б и 5 мин у донора А). Это означает, что воздействие магнитного поля на клетки буккального эпителия имеет место и клетки отвечают на данное воздействие стрессовой реакцией [14]. Различие по чувствительности клеток к воздействию постоянного

магнитного поля может быть вызвано индивидуальными свойствами клеток разных доноров. При воздействии дополнительным (по отношению к земному) магнитным полем (причем значительно большей величины: 25 мТл по сравнению с ~50 мкТл для земного) клетка реагирует на повышенное магнитное поле как на изменение внешних условий [2]. Изменения в жизнедеятельности обнаружены у растений, находящихся под действием дополнительного магнитного поля [2] и у грибов, помещенных в условия магнитной изоляции [3]. У планарий наблюдается изменение способности к регенерации при воздействии дополнительного магнитного поля, в зависимости от взаимной ориентации земного и дополнительного полей [10]. В наших предыдущих экспериментах также было показано увеличение количества

гранул гетерохроматина при воздействии постоянным магнитным полем индукцией 25 мТл в течение 5 минут [4].

Слабые постоянные магнитные поля (около 2 мТл) могут влиять на состояние мембранного потенциала в клетках и на ионную проницаемость клеточных мембран (в основном, влиянию подвергается транспорт ионов Ca^{2+} и Na^+). При этом реакция на магнитное поле достаточно кратковременна (около 60-120 с), после чего показатели проницаемости мембран восстанавливаются [6].

В данном исследовании на клетках донора А обнаружено достоверное повышение доли клеток, окрашенных бромистым этидием, после воздействия постоянного магнитного поля в течение 1 мин. При увеличении времени воздействия через 10 мин для донора Б и через 30 мин для донора А также обнаружено увеличение проницаемости клеточных мембран для бромида этидия и индигокармина (рис. 2-3).

В будущем предполагается провести дополнительные исследования воздействия низкоинтенсивного постоянного магнитного поля на клетках других доноров и при более широком диапазоне величин магнитной индукции.

Выводы

1. Воздействие магнитного поля вызывает достоверное увеличение количества гранул гетерохроматина в клетках буккального эпителия человека.

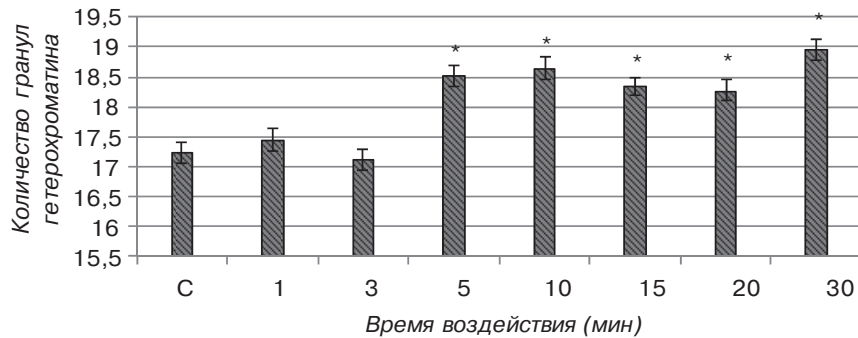


Рис. 5. Количество гранул гетерохроматина в ядрах клеток донора А при различном времени воздействия магнитного поля.

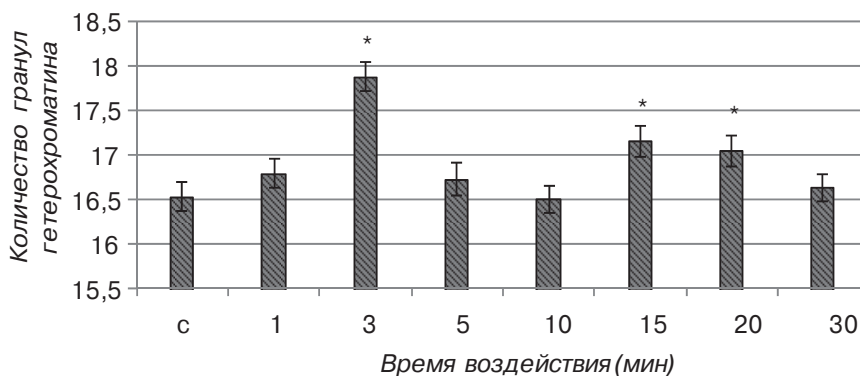


Рис. 6. Количество гранул гетерохроматина в ядрах клеток донора А при различном времени воздействия магнитного поля.

2. Воздействие магнитного поля вызывает увеличение проницаемости клеточных мембран клеток буккального эпителия человека для индигокармина и бромистого этидия.

3. Реакция при воздействии магнитным полем на проницаемость клеточных мембран клеток буккального эпителия человека в нашем опыте более выражена при окрашивании бромистым этидием, чем в случае с окрашиванием индигокармином.

4. Обнаружены значительные индивидуальные различия реакции клеток буккального эпителия доноров на воздействие постоянного низкоинтенсивного магнитного поля.

Перспективы дальнейших исследований. В будущем предполагается провести дополнительные исследования воздействия низкоинтенсивного постоянного магнитного поля на клетках других доноров и при более широком диапазоне величин магнитной индукции.

Предполагается исследование комбинированного эффекта воздействия магнитного поля и токсических веществ на клетки человека. Предметом исследования предполагается попытка обнаружения эффекта гормезиса при комбинации низкоинтенсивного магнитного поля и введения в среду токсического вещества (снижение токсичного эффекта).

Литература

1. Белова Н. А. Первичные мишени во взаимодействии слабых магнитных полей с биологическими системами : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика / Н. А. Белова. – Пушино – 2011.
2. Бинги В. Н. Магнитобиология: эксперименты и модели. Издание второе. / В. Н. Бинги. – Москва «МИЛТА», 2002. – 592 с.
3. Дмитриев С. П. Экспериментальное моделирование воздействия гипомангнитных полей на биологические объекты / С.П. Дмитриев, Н. А. Доватор, Е. В. Богомолова, Л. К. Панина, Ю. М. Гаврилов // Научное приборостроение. – 2012. – Том 22, №1. – С. 68-73.
4. Пасюга О. С. Действие микроволнового излучения и слабого магнитного поля на состояние клеточной мембраны и ядра клеток гороха (*Pisum sativum* L.) / О. С. Пасюга, В. Н. Пасюга, С. С. Рябуха, Ю. Г. Шкорбатов // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія біологія. – 2014. – вип. 2 (32). – С. 38-45.
5. Шкорбатов Ю. Г., Грабина В.А., Пасюга В.Н. Влияние постоянного и вращающегося магнитных полей вихревого типа на проницаемость мембран клеток человека / Ю. Г. Шкорбатов, В. А. Грабина, В. Н. Пасюга // Фотобіологія та фотомедицина. – 2009. – Том 4. – С. 67-73.
6. Bernabo N. Acute exposure to a 2mT static magnetic field affects ionic homeostasis of in vitro grown porcine granulosa cells / N. Bernabo, I. Saponaro, E. Tettamanti, M. Mattioli, B. Barboni // Bioelectromagnetics. – 2014. – vol. 35. – P. 231-234.
7. Dini L. Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures / L. Dini, L. Abbro // Micron. – 2005. – 36(3). – P. 195-217.
8. Ghodbane S. Bioeffects of static magnetic fields: oxidative stress, genotoxic effects, and cancer studies / S. Ghodbane, A. Lahbib, M. Sakly, H. Abdelmelek // BiomedResInt. – 2013. P. 602-987.
9. ICNIRP statement amendment to the ICNIRP "Statement on medical magnetic resonance (MR) procedures: protection of patients" // Health Physics. – 2009. – 97 (3). – P. 259-261.
10. Pelissari D. M. Magnetic fields and acute lymphoblastic leukemia in children: a systematic review of case-control studies / D.M. Pelissari, F. E. Barbieri, V. W. Filho // Cad. Saude Pùblica. – Rio de Janeiro. – 2009. – 25 Sup 3. – P. 441-452.
11. Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields / Ed by C. Polk, E. Postow. – Boca Ration: CRC Press, 1997.
12. Markov Marko S. What need to be known about the therapy with static magnetic fields / S. Markov Marko // Environmentalist. – 2009. – 29. P. 169-176.

13. Punt J. A. Negative Selection of CD4 + CD8 + Thymocytes by T Cell Receptor-induced Apoptosis Requires a Costimulatory Signal that Can Be Provided by CD28 / J. A. Punt, B. A. Osborne, Y. Takahama, S. O. Sharrow, A. Singer // Rockefeller University Press-JEM. – 1994. – vol. 179, № 2. – P. 709-713.
14. Shckorbatov Y. G. Cell nucleus and membrane recovery after exposure to microwaves / Y. G. Shckorbatov, V. N. Pasiuga, N. N. Kolchigin [et al.] // Proceedings of the Latvian academy of science. Section B. – 2011. – Vol. 65 № 1/2 (672/673) – P. 13-20. DOI: 10.2478/v10046-011-0013-05.
15. Shckorbatov Y. G. He-Ne laser light induced changes in the state of chromatin in human cells / Y. G. Shckorbatov // Naturwissenschaften. – 1999. – Vol. 86. № 9. – P. 452-453.
16. Stepchenkov E. R. The influence of the static magnetic field on the state of chromatin and viability of human cells / E. R. Stepchenkov, I. V. Saenko, Y. G. Shckorbatov // AMEREM 2014. Book of abstracts, University of New Mexico, Albuquerque, New Mexico, USA. – 2014, July 27-31, ID 111, available at: www.ece.unm.edu/amerem2014.
17. Tenuzzo B. Biological effects of 6 mT static magnetic fields: a comparative study in different cell types / B. Tenuzzo, A. Chionna, E. Panzarini [et al.] // Bioelectromagnetics. – 2006. – 27 (7). – P. 560-577.

УДК: 576:537.632/.636

ВПЛИВ МАГНІТНОГО ПОЛЯ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ КЛІТИН БУКАЛЬНОГО ЕПІТЕЛІЮ ЛЮДИНИ

Мірошник Д. Б., Кузнецов К. А.

Резюме. Досліджено вплив постійного магнітного поля з індукцією 25 мТл протягом 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 хв на конденсацію хроматину в ядрах клітин букального епітелію людини і на проникність мембран значених клітин у розчинах індигокарміну (2 мМ), 10 мг/мл Hoechst 33342 і бромистого етидія (5 мг/мл). Конденсацію хроматину досліджували шляхом підрахунку кількості гранул гетерохроматину в 100 ядрах клітин при забарвлюванні 2% розчином осейну у 45% розчині оцтової кислоти. Проникність клітинних мембран досліджували шляхом підрахунку забарвлених клітин серед 400 при впливі барвника протягом 5 хв. Виявлено достовірне збільшення кількості гранул гетерохроматину після впливу магнітним полем протягом 3 хвилин та більше. Дослідження проникності клітинних мембран для індигокарміну не виявило збільшення кількості забарвлених клітин після впливу протягом 30 хвилин і менше. Проникність для бромистого етидія збільшувалась після впливу поля протягом 1 хвилини та 10 хвилин для клітин різних донорів. Спостерігалось відновлення рівня проникності після впливу протягом 30 хвилин. Виявлені більш виражена реакція клітин по проникності мембрани для бромистого етидія, ніж для індигокарміну, а також індивідуальні відмінності і в реакції клітин різних донорів.

Ключові слова: магнітне поле, клітинна мембрана, хроматин, гетерохроматин, життєздатність, стрес.

УДК: 576:537.632/.636

ВЛИЯНИЕ МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА

Мірошник Д. Б., Кузнецов К. А.

Резюме. Исследовано влияние постоянного магнитного поля с индукцией 25 мТл на конденсацию хроматина в ядрах клеток буккального эпителия человека и на проницаемость мембран данных клеток для индигокармина и бромистого этидия. Исследование конденсации хроматина при окрашивании 2% раствором орсеина в 45% растворе уксусной кислоты выявило достоверное увеличение количества гранул гетерохроматина при воздействии магнитного поля в течение 3 минут и более. Исследование проницаемости клеточных мембран для 2 мМ раствора индигокармина не выявило увеличения количества окрашенных клеток при воздействии в течение 30 минут. Исследование проницаемости клеточных мембран для раствора бромистого этидия 5 мг/мл выявило уменьшение проницаемости мембран при воздействии поля в течение 1 минуты и 10 минут с последующим восстановлением уровня проницаемости при воздействии в течение 30 мин. Обнаружена более выраженная реакция клеток по проницаемости мембраны для бромистого этидия, чем для индигокармина, а также индивидуальные различия в реакции клеток различных доноров на облучение магнитным полем.

Ключевые слова: магнитное поле, клеточная мембрана, хроматин, гетерохроматин, жизнеспособность, стресс.

UDC: 576:537.632/.636

MAGNETIC FIELD INFLUENCE ON HUMAN BUCCAL EPITHELIUM CELLS VIABILITY

Miroshnik D. B. Kuznetsov K. A.

Abstract. Effects of low-intensity static and low frequency magnetic fields on the organism are under consideration because of their possible practical application connected with usage in medicine, as well as their negative impact on health. There are restrictions on the use of high magnetic fields in medical applications, such as in magnetic resonance imaging. On the other hand, static and low frequency magnetic fields are used for therapeutic purposes. Many studies have shown the effect of low-intensity magnetic fields on cells and organisms. Its impact may cause increase of activity, lifetime, and the concentration of paramagnetic free radical, genetic mutations and / or apoptosis.

The aim of the current study was to investigate the effect of magnetic field on the viability of human cells, as well as to investigate the effect of magnetic field on the appearance of stress reactions at the cellular level. Viability

is supposed to be evaluated by the study of cell membrane permeability to ethidium bromide and indigo carmine. Stress reaction is supposed to be evaluated by counting granules of heterochromatin in cells nuclei after cells staining by orcein solution.

Buccal epithelium cells for the experiments was taken from two donors: donor A (24) and donor B (23). Cells were obtained by scraping inside of the donor's cheek and placed in buffer (3.03 mM phosphate buffer, pH 7.0, with addition of 2.89 mM CaCl_2). Cells were exposed to a static magnetic field with a magnetic induction of 25 mT. The samples were exposed for different time intervals (1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 minutes).

The effect of static magnetic field on condensation of nuclear chromatin in human buccal epithelium cells and the membrane permeability to the indigo carmine solution (2 mM), or to combination of 10 mg/ml Hoechst 33342 and ethidium bromide (5 mg/ml). Chromatin condensation was investigated in 100 cells stained by orcein 2% solution in 45% acetic acid. The permeability of cell membranes was investigated by calculation the portion of stained cells in 400 after exposure to the dye for 5 minutes.

A significant increase in the amount of heterochromatin granules after magnetic field exposure for 3 minutes or more was found. Staining with indigo carmine showed no increase in the number of stained cells after exposure for 30 minutes or less. Permeability of cell membranes to ethidium bromide increased after cell exposure in the field for 1 minute and 10 minutes for the cells of different donors, correspondently. There were no changes in the level of cell membranes permeability after exposure for 30 minutes. Reaction of cell membrane permeability after cell exposure to magnetic field is expressed only in ethidium bromide test, but not in indigo carmine test. Cell answer to magnetic field revealed to be different to different donors.

Based on the data, we can conclude, that static magnetic field of 25 mT does not have enough influence to cause significant deviations in membrane permeability of human buccal epithelial cells. At the same time, this effect is sufficient enough for induction of the cell stress, resulting in increasing the amount of heterochromatin granules in cells nuclei.

Keywords: magnetic field, the cell membrane, chromatin, heterochromatin, vitality, stress.

Рецензент – проф. Білаш С. М.

Стаття надійшла 02.02.2016 року