

ПРООКСИДАНТНЫЙ И АНТИОКСИДАНТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МОНОНУКЛЕАРОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ОСЛАБЛЕННОГО ГЕОМАГНИТНОГО ПОЛЯ.

С.К. Орумбаева, О.В. Сорокин, К.Г. Коротков, В.Ю.Куликов

г. Новосибирск

ГУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН

Новосибирский государственный медицинский университет (кафедра нормальной физиологии)

Введение:

В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что некоторые показатели системы крови являются очень чувствительными индикаторами космофизических воздействий, что определяет их участие в реализации типовых патологических процессов в различных регионах в целом и регионах Крайнего Севера в частности (Казначеев В.П., и др., 1985). Имеют место систематические изменения год от года числа форменных элементов крови, в основном сопряжённые с 11-летним циклом активности. В годы максимума солнечной активности число лейкоцитов снижается в 1,5-1,7 раза по сравнению с годами минимума, одновременно лейкоцитарное равновесие сдвигается в сторону лимфоцитов. Магнитные поля, едва отличающиеся от нормального ГМП, демонстрируют биологическую активность, даже более высокую, чем магнитные поля высоких напряженностей (Куликов В.Ю., Воронин А.Ю., и др., 2005). Подтверждением этому являются данные Ю.Г. Григорьева о том, что ослабленное геомагнитное поле (ГМП), регистрируемое в экранированных сооружениях, является серьезным фактором риска потенцирующим течение хронических заболеваний внутренних органов воспалительной и не воспалительной природы (Григорьев Ю.Г.). В зависимости от степени ослабления ГМП и длительности пребывания в этой среде могут развиваться адаптационные, стрессорные и компенсаторные реакции или необратимые патологические изменения. Критическими системами при воздействии ГМП являются нервная и иммунная системы.

Поскольку мононуклеары являются основой антимикробной защиты организма, в своих исследованиях мы изучали их реактивность в условиях ослабленного геомагнитного поля. Оценивалась интенсивность реакций свободнорадикального окисления, в основе которой лежит наработка активных форм кислорода, обладающих микробицидными свойствами. Активные формы кислорода токсичны как для микроорганизма, так и для самой клетки. Но благодаря тому, что они локализованы в фагоцитарной вакуоли, поражение других компартментов клетки незначительно. Усиление процессов свободно-радикального окисления и накопление их токсических продуктов в тканях и органах приводит к нарушению функционально-структурной целостности мембран. В норме процессы свободно-радикального окисления уравновешены противодействием антиоксидантной системы организма. Система антиоксидантной защиты организма противостоит процессу запуска и развития свободнорадикальных реакций ПОЛ(?), предотвращая свободнорадикальную дегградацию липопротеинов плазмы крови и липидной составляющей клеточных мембран (Куликов В.Ю., 1997). При нарушении баланса реакций свободно-радикального окисления и активности антиоксидантной системы в сторону преобладания окислительных реакций, происходит повреждение внутриклеточных структур за счёт реакций ПОЛ, разрыва цепей ДНК, снижения интенсивности гликолиза, уменьшения пула АТФ, увеличение концентрационного

содержания внутриклеточного Ca^{2+} , деполимеризации актина, морфологические изменения клеточной мембраны. Поскольку эти процессы становятся необратимыми при дефиците антиоксидантной системы, то гибель клетки в большинстве случаев становится неминуема (Владимиров Ю.А. и др., 1991, Клебанов Г.И., и др., 1999).

Есть основания считать, что одним из важных механизмов влияния электромагнитных полей на биологические системы является их воздействие на реактивность мононуклеаров крови, что реализуется в изменении баланса между «оксидантным - прооксидантным потенциалом» клетки.

Цель исследования. Изучить прооксидантный и антиоксидантный потенциал мононуклеаров крови человека и мышей линии (СВА*С57BL/6)F1 в условиях ослабленного гипогеомагнитного поля.

Объект исследования. В качестве объекта исследования использовали мононуклеары периферической крови 18 здоровых лиц в возрасте 19 лет, а также перитонеальные макрофаги и клетки костного мозга мышей. Исследование регламентировано письменным информированным согласием доноров и одобрено комитетом по биоэтике ГУ НЦ КЭМ СО РАМН.

После выделения клеток производилась их сепарация на градиенте плотности фиколла-верографина (плотностью 1760), для получения мононуклеаров. Кроме того, данная процедура позволяла отделить живые клетки от нежизнеспособных и повреждённых клеток, что позволило в дальнейшем связать особенности оптико-электронной эмиссии именно с наличием в среде жизнеспособного клеточного материала.

Оценка прооксидантной и антиоксидантной активности проводилась в условиях контроля и опыта (гипогеомагнитное экранирование).

Методы исследования. Оценку прооксидантной и антиоксидантной активности проводили с помощью биохемилюминесцентного анализатора (БЛМ 360 БМ).

Для этого к 0,7 мл. раствора Хенкса без фенолового красного, добавлялся 0,1 мл. гепаринизированной крови и 0,1 мл. 10^{-2} М люминола. После термостатирования в течении 5 минут в кювету вносился 0,1 мл. зимозана и сразу регистрировалась хемилюминесценцию при 37 С.

Гипогеомагнитное экранирование. Геомагнитное поле низкой напряженности было получено в ферромагнитной камере. Гипомагнитные экраны описанной конструкции позволяют экранировать геомагнитное поле в 10^5 раз. (В.Ю. Куликов, А.Ю. Воронин, К.В. Гайдунь, В.М. Колмаков 2005).

Для регистрации параметров оптико-электронной эмиссии клеток мышей использована технология оценки характеристик газового разряда вокруг капли [Korotkov K., Korotkin D., 2001] заданного объёма (10 мкл), находящейся на капилляре одноразового инсулинового шприца с насадкой, получаемой путём её нанесения вариационной пипеткой. Производилась запись 10 капель из различных проб (клетки до и после экспозиции в гипомагнитной камере) с частотой 20 кадров в секунду и продолжительностью воздействия электромагнитного поля 5 секунд. Дефектные видеозаписи сигнала подвергались визуальной выбраковке (Сорокин О.В., 2006).

Результаты. Было показано, что после нахождения клеток в условиях ферромагнитного экрана наблюдается достоверное снижение антиоксидантной активности, по сравнению с контролем ($p=0,001$). В то же время их прооксидантная активность практически не изменялась. Антиоксидантная активность супернатанта снижалась, а его прооксидантная активность повышалась. Антиоксидантная активность супернатанта по сравнению с антиоксидантной активностью клеток в экранируемом пространстве (минус поле) достоверно снижалась ($p=0,01$). Таблица 1.

Таблица 1.

Антиоксидантная и прооксидантная активность клеток и супернатанта М+т (n=18).

	Контроль	Опыт	p
АОА к. I	9.53 ± 1.68	7.73 ± 2.19	
АОА к. T	0.46 ± 0.29*	0.11 ± 0.06	< 0,01
АОА с-т. I	2.26 ± 0.37	2.00 ± 0.33	
АОА с-т. T	0.73 ± 0.07	0.74 ± 0.07	
ПОА к.	187.45 ± 47.80	183.43 ± 58.47	
ПОА с-т.	75.58 ± 28.44*	119.19 ± 87.05	< 0,01

Примечание: АОА к – антиоксидантная активность клеток; АОА с-т – антиоксидантная активность супернатанта; ПОА к – прооксидантная активность клеток; ПОА с-т – прооксидантная активность супернатанта. I тах-количество ХЛ импульсов на максимуме свечения; T тах-время регистрации импульсов в сек.

P*-достоверные отличия между контролем и опытом при P<0,01.

Таким образом, данные таблицы №1 свидетельствуют о сдвиге системы Антиоксиданты/прооксиданты в сторону прооксиданты. С использованием методов регрессионного анализа графически оценивалась взаимосвязь между антиоксидантной активностью мононуклеаров крови и их прооксидантной активностью. Полученные данные представлены на рис. 1 и 2.

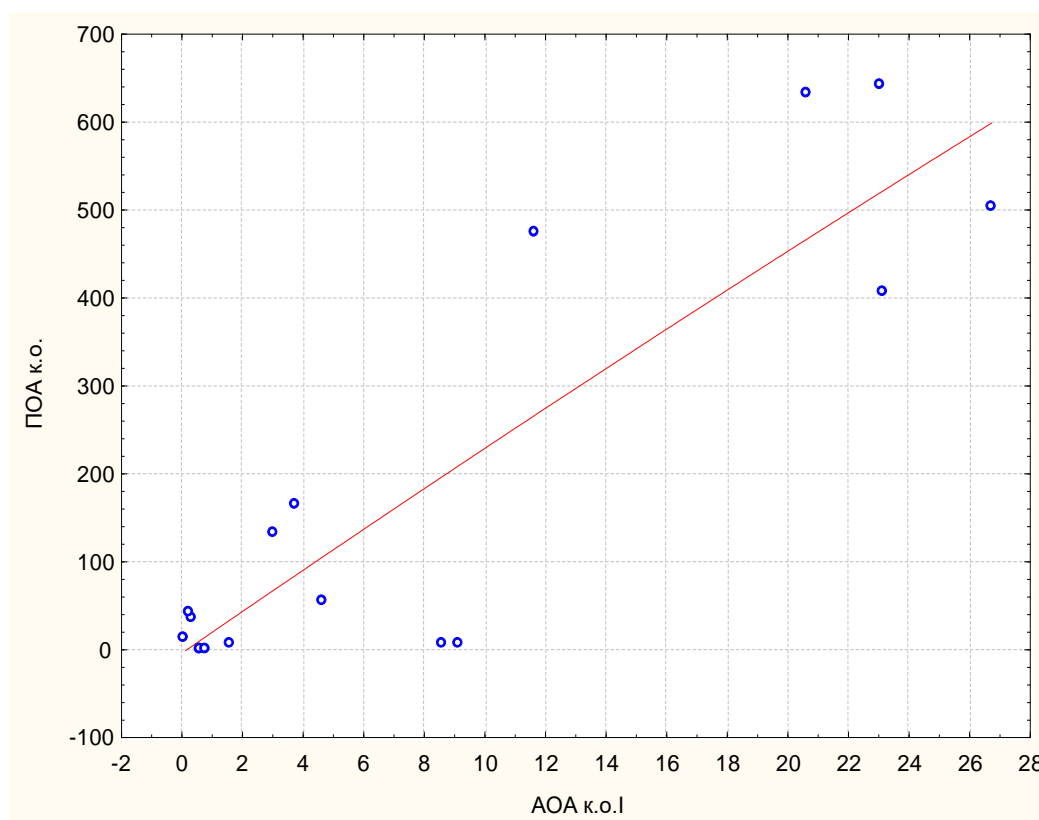


Рис.1 Взаимосвязь прооксидантной и антиоксидантной активности клеток в условиях гипوماгнитной камеры.

Как видно из рис.1, в условиях ослабленного геомагнитного поля наблюдается практически линейная зависимость между про- и антиоксидантным потенциалом клеток в

достаточно большом диапазоне показателей, т.е. чем больше в клетках генерируется активных форм кислорода, тем больше величина антиокислительной активности. В контроле, что видно из рис. 2, зависимость носит иной характер. В условиях повышенной наработки активных кислородных метаболитов величина антиокислительной активности начинает резко снижаться, свидетельствуя о развитии неконтролируемого окислительного стресса. На основании полученных данных делается вывод о том, что в условиях ослабленного геомагнитного поля в мононуклеарах создаются условия, (очевидно за счет дестабилизации генома), для ускорения процессов индукции супероксиддисмутазы, как фермента, являющегося основным звеном регуляции содержания активных кислородных метаболитов в клетке.

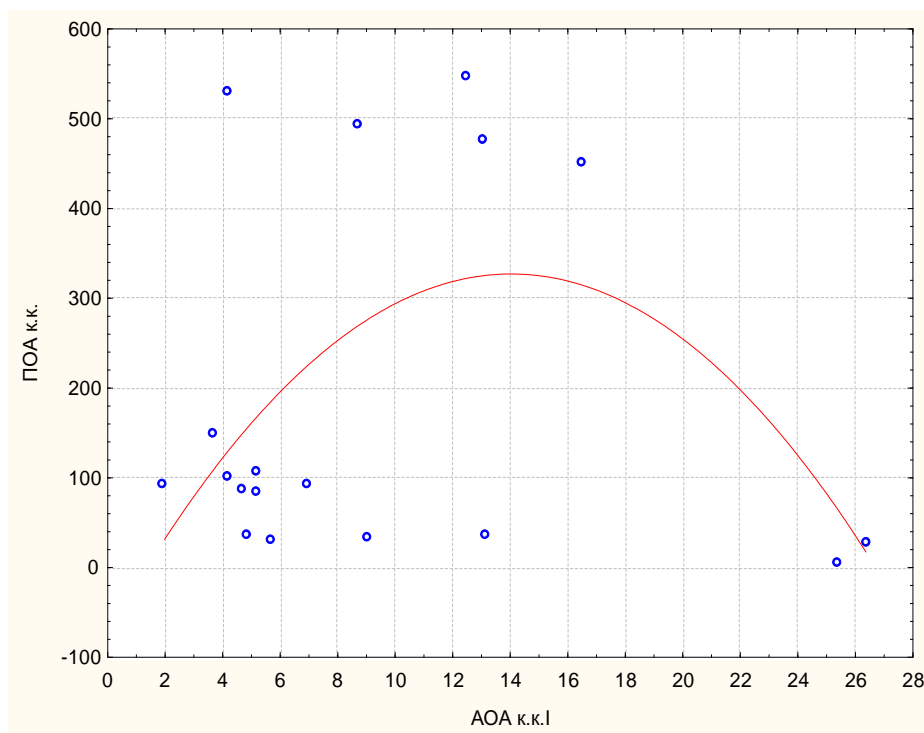


Рис.2 Взаимосвязь прооксидантной и антиоксидантной активности клеток в условиях опыта.

Известно, что генерация активных кислородных метаболитов в мононуклеарах осуществляется оксидазным комплексом (НАДФН-оксидаза), локализованном на мембране (Fidelius R.K., 1988). Изменение конформации мембраны или её заряда способствует генерации активных форм кислорода. В этих реакциях используется восстанавливающий агент НАДФН, стимуляторами их являются глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа и другие ферменты гексозомонофосфатного шунта. В результате, клетка генерирует супероксид (O_2^-) и перекись водорода (H_2O_2), которые выделяются в фагосому для уничтожения бактерий (Frank J., Biesalski H.K.et.al.,2000). С учетом того, что НАДФН-оксидаза является мембранолокализованным ферментом, мы изучали изменение мембранного потенциала мононуклеаров в условиях ослабленного геомагнитного поля с целью выявления его мембранотропных свойств.

Изменения мембранного потенциала оценивали методом проточной цитофлуориметрии, по характеру эмиссии потенциалзависимого зонда ДСМ до и после нахождения клеток в условиях ферромагнитного экрана с коэффициентом экранирования 10^{-2} .

Оценка мембранного потенциала осуществлялась с помощью зонда ДСМ, накопление которого в премембранном пространстве зависит от величины электрического заряда. Для этого гепаринизированную кровь, смешивали в соотношении 1:10 с 10% желатином, инкубировали 40 минут при $37^\circ C$. Полученную лейковзвесь отмывали с помощью отмывающего раствора, затем производили подсчет абсолютного числа лейкоцитов в

камере Горяева. Из расчёта цитоза на 1000 мононуклеаров в 1 мкл, добавляли 1 мл. раствора RPMI и 2,5 мкл зонда ДСМ. После 20 мин. экспозиции при 37° С проводили оценку характера и степень эмиссии флюоресцирующего зонда на проточном цитофлуориметре. Показано, что после нахождения клеток крови в условиях ферромагнитного экрана наблюдается достоверное снижение, по сравнению с контролем, заряда как на митохондриальной, так и цитоплазматической мембранах.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в условиях экранируемого пространства (минус поле) наблюдается снижение мембранного потенциала мононуклеаров крови человека, запуская каскад внутриклеточных процессов, сопровождающихся повышенной наработкой активных кислородных метаболитов и изменением баланса между системами генерации и ингибиции активных форм кислорода.

Задачей следующего этапа было фиксация с помощью ГРВ-метода особенностей оптикоэлектронной эмиссии клеток костного мозга и перитонеальных макрофагов крыс в условиях экспозиции в гипомагнитной камере.

Показано, что площадь оптико-электронной эмиссии клеток костного мозга, находящихся в гипомагнитной среде в течение 1 часа, достоверно уменьшается в сравнении контролем (рис3).

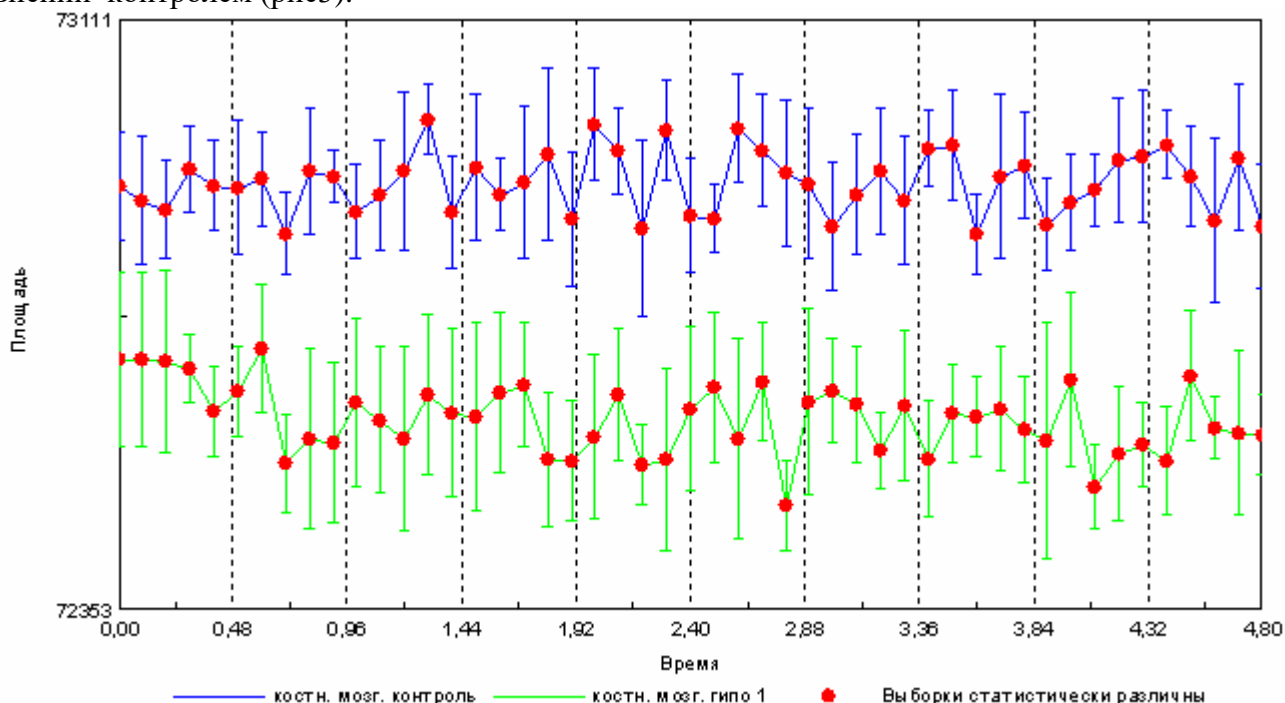


Рис 3. Площадь оптико-электронной эмиссии суспензии клеток в условиях контроля и гипомагнитной экспозиции в течение 1 часа. По шкале абсцисс отложено время (мс) в течение которого проводилась видеозапись газового разряда

Причём, данная зависимость имеет дозозависимый характер от времени экспозиции. В частности, при двух часовой экспозиции различия между контрольным и опытным образцами становятся более значимыми (рис. 4)

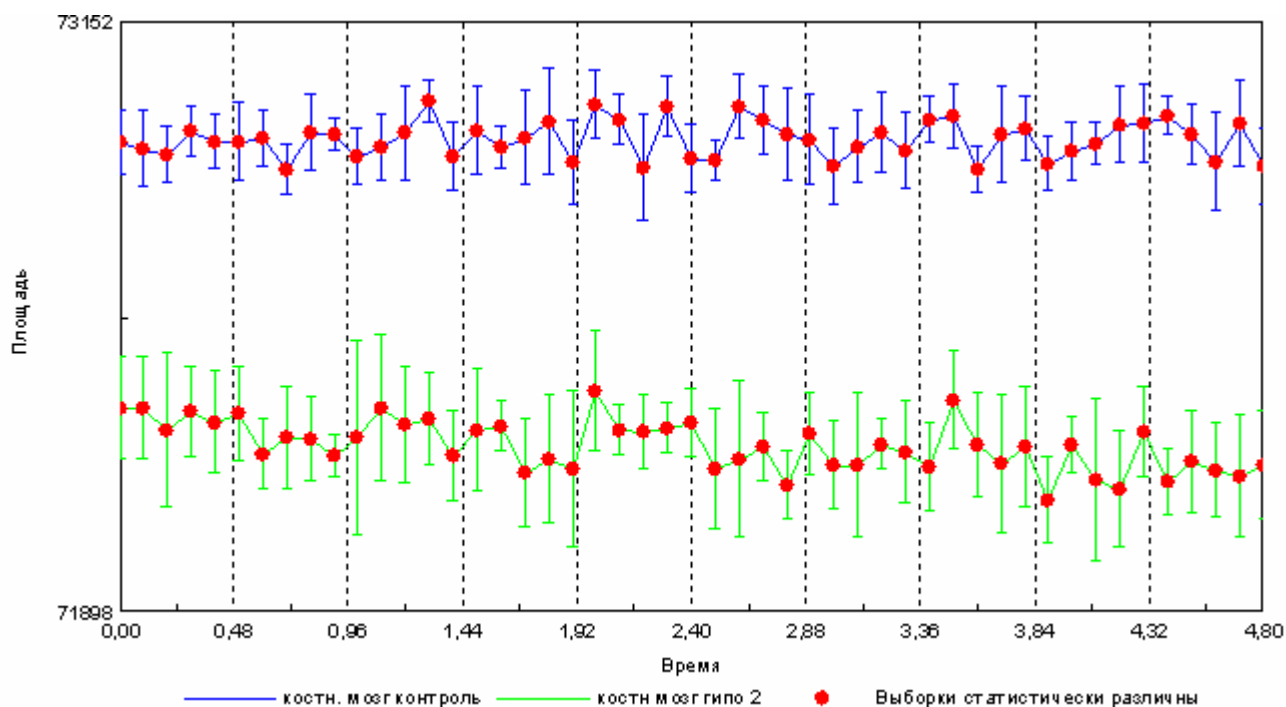


Рис.4 Площадь опико-электронной эмиссии суспензии клеток в условиях контроля и гипомангнитной экспозиции в течение 2 часов. По шкале абсцисс отложено время (мс) в течение которого проводилась видеозапись газового разряда

При этом интенсивность газового разряда также достоверно уменьшается в образце после гипомангнитной экспозиции в сравнении с контролем, что отражено на графике (рис5).

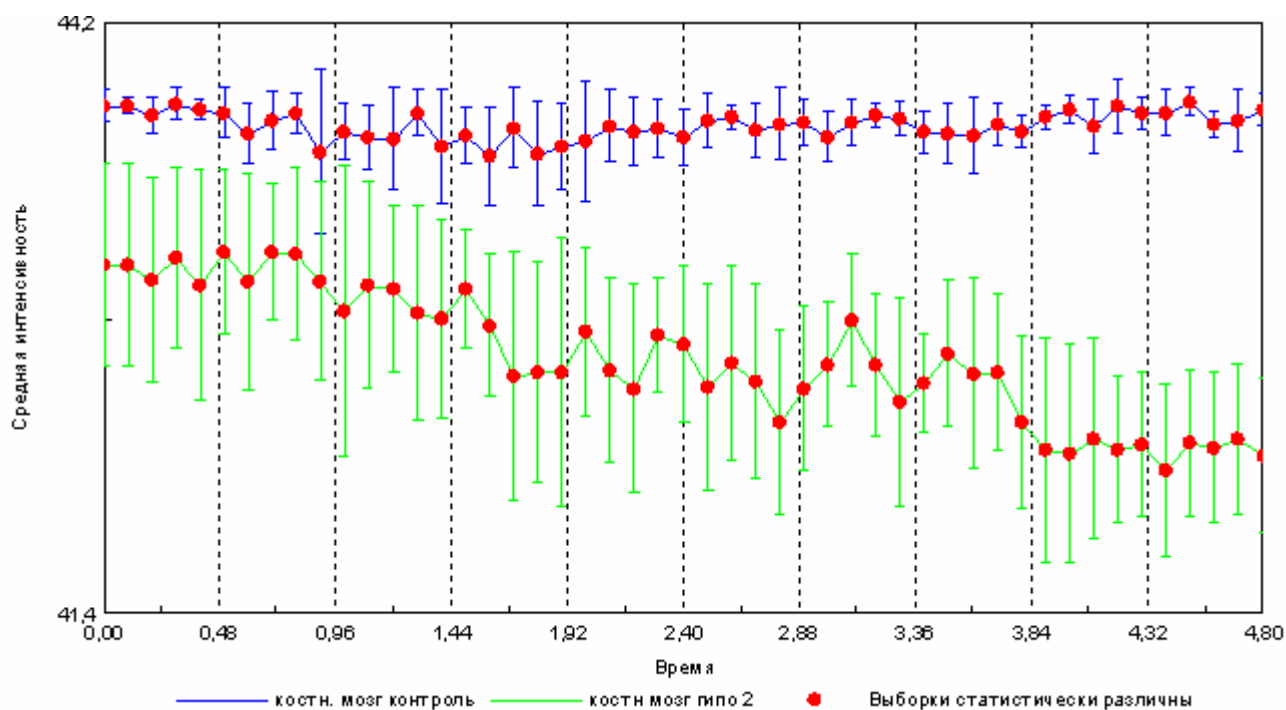


Рис.5 Интенсивность опико-электронной эмиссии клеток в условиях контроля и гипомангнитной экспозиции в течение 2 часов. По шкале абсцисс отложено время (мс) в течение которого проводилась видеозапись газового разряда.

Аналогичные изменения наблюдались и в эксперименте с перитонеальными макрофагами, в частности при экспозиции в гипомангнитной камере уменьшалась площадь эмиссии (рис6), а также снижалась её интенсивность (рис7).

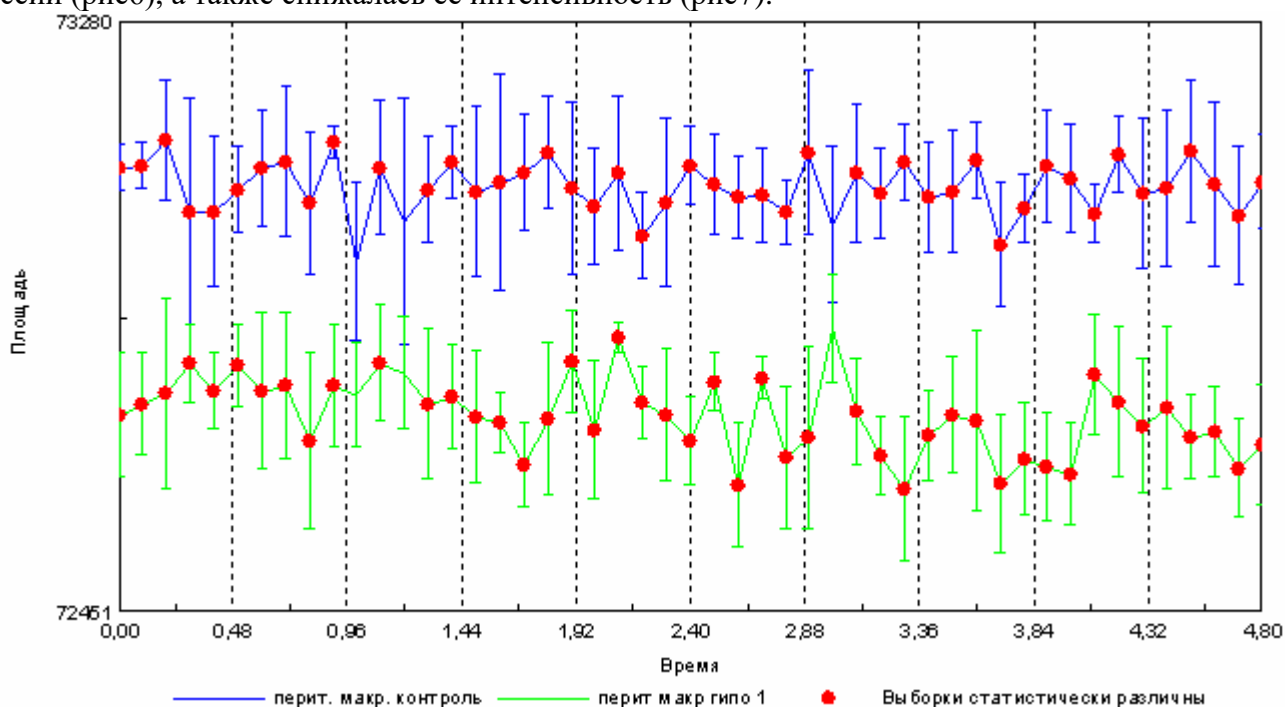


Рис. 6 Площадь опико-электронной эмиссии суспензии перитонеальных макрофагов в контроле и при гипомангнитной экспозиции в течение 1 часа. По шкале абсцисс отложено время (мс) в течение которого проводилась видеозапись газового разряда

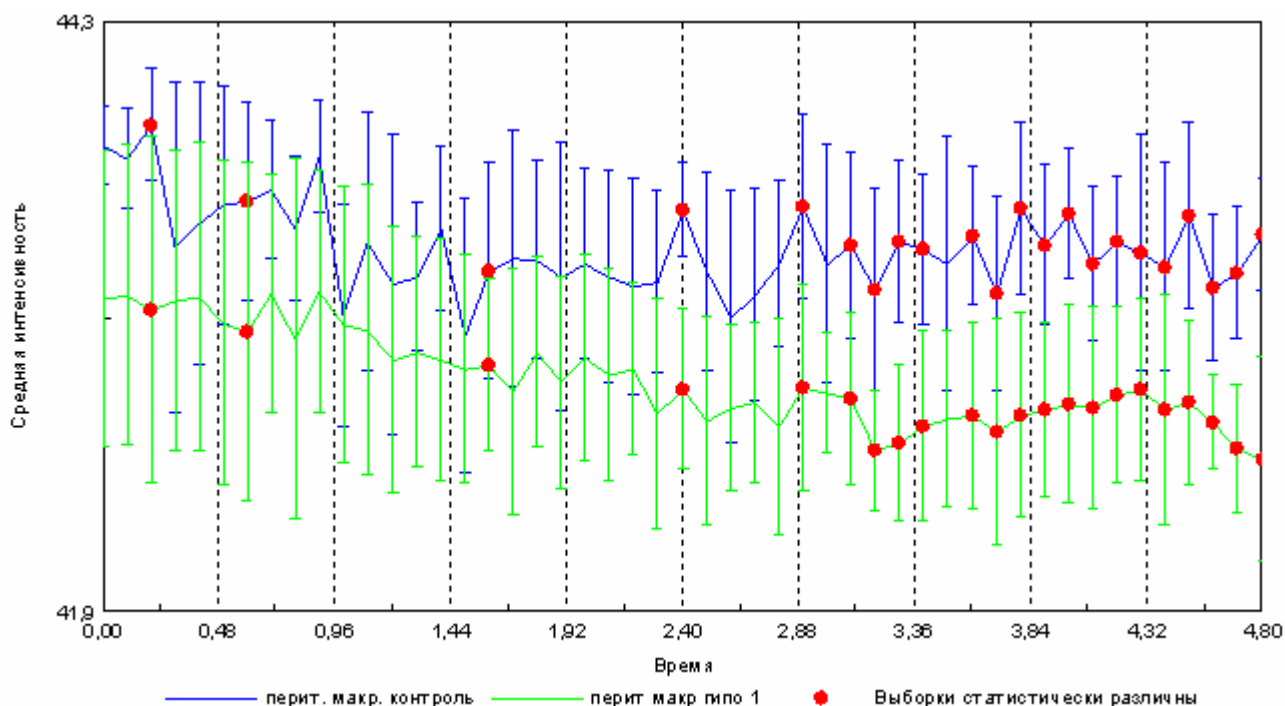


Рис.7 Интенсивность опико-электронной эмиссии суспензии перитонеальных макрофагов в контроле и при гипомангнитной экспозиции в течение 1 часа. По шкале абсцисс отложено время (мс) в течение которого проводилась видеозапись газового разряда

Обнаруженные различия позволяют предположить, что в условиях гипомангнитной депривации изменяется характер электронно-возбуждённых состояний в клеточной суспензии, в результате чего мы наблюдали достоверное снижение площади и интенсивности оптико-электронной эмиссии, напрямую зависящих от количественных характеристик оптико-электронных процессов, возникающих при помещении образца в поле высокой напряжённости.

Учитывая важную роль мононуклеаров крови в регуляции широкого спектра защитных реакций организма (Rubanyi С.М.,1988,Schiffman Fred J.,2000), можно полагать, что выявленная нами закономерность открывает новые перспективы как в понимании молекулярно – клеточных механизмов магниточувствительности и магнитореактивности, так и в построении дифференцированных методов их коррекции в условиях нормы и патологии.

Список литературы:

1. Владимиров Ю.А. и соавт. Свободные радикалы в живых системах // Биофизика. - 1991 г. - Т. 29. – С. 211
2. Гуляева Н.В. Перекисное окисление липидов в мозге при адаптации к стрессу // Дисс...докт. биол. наук М. - 1989 г. - 450 с.
3. Казначеев В.П. и соавт. Биоинформационная функция естественных электромагнитных полей. – Новосибирск.- Наука.- 1985. – 180 с.
4. Клебанов Г.И. и соавт. Антиоксидантная активность сыворотки крови // Вестник РАМН. 1999 г. - № 2. - С. 15 – 22.
5. Куликов В.Ю. Биологические антиоксидантные и адаптогенные свойства жирорастворимых витаминов. // Биоантиоксидант/ Международный симпозиум «Медицины и охраны здоровья». - Тюмень 1997 г. - С. 59 – 60.
6. Куликов В.Ю., Воронин А.Ю., Гайдунь К.В., Колмаков В.М. Биотропные свойства ослабленного геомагнитного поля. Новосибирск. - 2005 г. – 140 с.
7. Korotkov K., Korotkin D. Concentration dependence of gas discharge around drops of inorganic electrolytes. J of Applied Physics, V. 89. N 9, pp. 4732-4737, 2001.
8. Сорокин О.В., Коротков К.Г. Применение метода газоразрядной визуализации в изучении оптико-электронных свойств мононуклеаров мышей. // Тезисы V Международного Конгресса по биоэлектрографии. – СПб. 2006, стр 68-71
9. Fidelius R.K. The generation of oxygen radicals: A positive signal for lymphocyte activation // Cell. Immunol. – 1988. – Vol. 113. – P. 175 – 182.
10. Frank J., Biesalski H.K., Dominici S., Pompella A. The vizualization of oxidative stress in tissue and isolated cells // Histol. Histopathol.-2000.-Vol.- 15(1).- P. 173-184. (Frank J., 2000)
11. Schiffman Fred J. Hematologic pathophysiology. Пер. с англ. – М. – СПб.: «Издательство БИНОМ» - «Невский диалект». 2000. – 448 с.
12. Rubanyi С.М. Vascular effects of oxygen – derived free radicals // Free Radic. Biol. Med. -1988. – Vol. 4. – P. 107 – 121.