

Wpływ pola magnetycznego niskiej częstotliwości na stres oksydacyjny w tkance mięśniowej szczura

Influence of the low frequency magnetic field on the parameters of oxidative stress in rat's muscles

Elżbieta Ciejka^{1, 2}, Beata Skibska³, Anna Gorąca³

¹ Wojewódzki Ośrodek Medycyny Pracy, Centrum Profilaktyczno-Lecznicze, Zakład Rehabilitacji Leczniczej, Łódź, ul. Aleksandrowska 61/63, tel. +48 (42) 272 18 41, e-mail: e.ciejka@wompepl.eu

² Wyższa Szkoła Kosmetologii i Ochrony Zdrowia w Białymstoku, Katedra Fizjoterapii, ul. Krakowska 9, Białystok

³ Katedra Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej, Zakład Fizjologii Układu Krążenia, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8

Streszczenie

Wolne rodniki (WR) to atomy lub cząsteczki, posiadające wolne niesparowane elektrony. Ich nadmiar prowadzi do rozwoju stresu oksydacyjnego – przyczyny wielu chorób nowotworowych, neurodegeneracyjnych, zapalnych oraz starzenia się organizmu. Głównymi egzogennymi źródłami wolnych rodników są m.in.: zanieczyszczenia przemysłowe, dym tytoniowy, promieniowanie jonizujące oraz pola magnetyczne.

Cel. Celem pracy jest ocena działania pola magnetycznego niskiej częstotliwości na proces peroksydacji lipidów w tkance mięśniowej zwierząt doświadczalnych.

Materiał i metody. Materiał badawczy stanowiły dorosłe szczury, samce rasy Sprague-Dawley w wieku 3-4 miesięcy. Zwierzęta podzielono na 3 grupy badawcze: I – grupa kontrolna; II grupa poddana działaniu pola magnetycznego o następujących parametrach: 7 mT, 40 Hz, 30 min/dzień, 2 tyg.; III grupa – poddana działaniu pola magnetycznego o parametrach: 7 mT, 40 Hz, 60 min/dzień, 2 tyg. U badanych zwierząt wykonano pomiar stężenia produktów peroksydacji lipidów (TBARS_[h1]) w homogenatach tkanki mięśniowej po zakończeniu ekspozycji na działanie pola magnetycznego.

Wyniki. Po działaniu zmiennego pola magnetycznego o częstotliwości 40 Hz, indukcji 7 mT, w czasie 30, 60 min/dzień przez 2 tygodnie zaobserwowano wzrost stężenia TBARS w tkance mięśniowej szczura.

Wnioski. Pole magnetyczne niskiej częstotliwości (*Low Frequency Magnetic Field – LFMF*) o parametrach stosowanych w magnetoterapii wywołuje istotne zmiany w procesie generacji reaktywnych form tlenu.

Słowa kluczowe: pole magnetyczne niskiej częstotliwości, stres oksydacyjny

Abstract

Free radicals (FR) are atoms or molecules with unpaired electrons. They may lead to the development of the oxidative stress, which is a cause of many neoplastic, neurodegenerative, inflammatory diseases and aging of the organism. The main exogenous sources of free radicals are among others: industrial pollution, tobacco smoke, ionizing radiation, and magnetic field.

Goal: The aim of this study was to evaluate the influence of the low magnetic field on the parameters of the oxidative stress (TBARS_[h2]) in rat's muscles.

Materials and methods. Thirty male rats, weight of 280-300 g were randomly divided into three experimental groups: control I and treatment II i III (Low Frequency Magnetic Field LFMF). Animals in the group II were exposed to the LFMF of the following parameters: frequency 40 Hz, induction 7 mT for 0.5 h/day for 14 days (this kind of the LFMF is mostly used in magnetotherapy), while the group III was subjected to the field: 40 Hz, 7 mT for 1h/day for 14 days. Control rats were kept in the separate room and were not exposed to the to LFMF. Immediately, after the last exposure, the part of muscles was taken under pentobarbital anaesthesia. The effects of the exposure to the LFMF on the oxidative states were assessed by the measurements of concentration of TBARS in muscles homogenates.

Results. Exposure to the LFMF with the following parameters: 40 Hz, 7 mT, 30 and 60min/day for 2 weeks caused significant increase in TBARS concentration in the muscles homogenates.

Conclusion. Low magnetic field used in magnetotherapy causes the significant changes of the process of generation of the reactive forms of oxygen in the muscles.

Key words: low frequency magnetic field, oxidative stress

Wstęp

Tlen jest niezbędnym pierwiastkiem w procesach metabolicznych organizmów tlenowych. Produktami końcowymi są reaktywne formy tlenu (RFT). Wpływ RFT na komórki zależy od ich stężenia oraz czasu działania. RFT w niskich stężeniach spełniają funkcje fizjologiczne, natomiast w wyższych mogą być przyczyną wielu chorób – nowotworowych, neurodegeneracyjnych, zapalnych, a także starzenia się organizmu [1-3]. Wolne rodniki tlenowe, powstające w procesie peroksydacji lipidów, zmieniają właściwości fizyczne błon komórkowych i powodują tym samym zahamowanie aktywności enzymów błonowych oraz białek transportujących [4]. W warunkach fizjologicznych działanie wolnych rodników tlenowych jest równoważone przez systemy antyoksydacyjne organizmu [5].

Głównym zewnętrznym źródłem wolnych rodników jest dym tytoniowy, zanieczyszczone powietrze, promieniowanie jonizujące, ultradźwięki, jak również pole elektromagnetyczne czy magnetyczne.

Pole magnetyczne niskiej częstotliwości o parametrach indukcji do 20 mT, częstotliwości do 100 Hz, jest powszechnie stosowaną formą terapeutyczną w medycynie fizykalnej. Dawki uzależnione są od rodzaju schorzenia, jak również od

okresu choroby [6-11]. W badaniach zaobserwowano, że zaindukowane w tkankach zmienne pole elektryczne wywołuje efekty biologiczne, np.: przyspiesza proces gojenia się ran i zrastanie kości, nasila procesy różnicowania neurytów wzdłuż linii sił pola magnetycznego, może zwiększać obszar pobudzenia tkanki nerwowej i zmianę potencjału błonowego, a także wykazuje działanie przeciwbólowe [10-13]. Działanie pól magnetycznych na organizmy żywe zależy od ich właściwości magnetycznych, wynikających z obecności jonów pierwiastków magnetycznych oraz z występowania prądów jonowych w układach przewodzących: układzie nerwowym, naczyniowym, w mięśniach, sercu i mózgu.

Mechanizm oddziaływania tych pól na organizmy żywe nadal pozostaje w sferze badań. W literaturze spotkać można teorie o indukowaniu zmiennych pól elektrycznych w strukturach organicznych eksponowanych w zmiennym polu magnetycznym [14], jak również wskazuje się na mechanizm rezonansowy [15]. Ma on związek ze ściśle określoną częstotliwością pola magnetycznego mającą wpływ na przepuszczalność błonową komórek umieszczonych w danym polu. Obserwowane zjawiska noszą nazwę jonowego cyklotronu rezonansowego – energia jest absorbowana przez tkankę wówczas, gdy częstotliwość zmiennego pola magnetycznego nakładająca się na pole magnetyczne ziemskie jest zgodna z częstotliwością rezonansową jonu [16]. Wśród hipotez dotyczących fizycznych mechanizmów oddziaływania pól magnetycznych wymienia się także mechanizm rodnikowy [17]. Wpływ pola magnetycznego na generację wolnych rodników tlenowych wykazano w wielu doświadczeniach. Lupke i wsp., Lantov i wsp. wykazali, że wydzielanie WRT pod wpływem pola magnetycznego o niskiej częstotliwości (50 Hz) związane jest z aktywacją oksydazy NADPH w monocytach [8, 18]. Zwirska-Korczala i wsp. wykazali, że pole elektromagnetyczne o niskiej częstotliwości (poniżej 200-300 Hz) powoduje generację reaktywnych form tlenu poprzez hamowanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych i wzrost lipidowej peroksydacji w komórkach 3T-L1 [19]. Ci sami autorzy wykazali, że pole magnetyczne o ekstremalnie niskiej częstotliwości zmniejsza antyoksydacyjne działanie melatoniny [20].

Celem pracy jest ocena działania pola magnetycznego niskiej częstotliwości, na proces peroksydacji lipidów w tkance mięśniowej zwierząt doświadczalnych.

Metody i materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiły zwierzęta – szczury (samice) rasy Sprague-Dawley, w wieku 3-4 miesięcy, wyhodowane w zwierzętarni Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Masa zwierząt wynosiła od 300 gramów do 350 gramów. Zwierzęta przebywały w warunkach standardowych, tj. 14 godzin sztuczne oświetlenie i 10 godzin ciemności, temperatura pokojowa. Szczury przebywały w typowych klatkach po 5 sztuk, karmione były paszą granulowaną dla gryzoni Murigran i wodą *ad libidum*. Badania przeprowadzono za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Łodzi, nr 40/LB368/2007.

Zwierzęta losowo podzielono na trzy grupy badawcze: I grupa kontrolna, niepoddana działaniu pola magnetycznego niskiej częstotliwości, II grupa – zwierzęta poddane działaniu pola magnetycznego o parametrach: częstotliwość 40 Hz, indukcja 7 mT, czas ekspozycji 30 min/dzień przez 2 tygodnie; III grupa – zwierzęta poddane działaniu pola magnetycznego o parametrach: częstotliwość 40 Hz, indukcja 7 mT, czas ekspozycji 60 min/dzień przez 2 tygodnie. Zwierzęta poddawane były działaniu pola magnetycznego zawsze o tej samej porze dnia, w godzinach 7.00-9.00, z zachowaniem tej samej kolejności ekspozycji. Zwierzęta umieszczane były w plastikowych pojemnikach, nieograniczających poruszania się. Zastosowano aparat MAGNETRONIC MF-10 (Elektronika i Elektromedy-

cyna Otwock). Wybrane parametry pola magnetycznego odpowiadają parametrom najczęściej stosowanym w magnetoterapii [10].

Oznaczenie peroksydacji lipidów w homogenatach tkanki mięśniowej

W badaniach mierzono stężenie produktów reagujących z kwasem tiobarbiturowym. Odczynniki wykorzystywane w doświadczeniu: 1,15% chlorku potasu (1,15%NaCl); 15% kwas trichlorooctowy (15%TCA); 0,25M kwasu solnego (0,025M HCl); 0,375% kwasu tiobarbiturowego (0,375%TBA); 0,015% diizobutylo-4-hydroksytoluenu (0,015% BHT), L-Butanol; tetrametoksypropan. Wykonanie oznaczenia przebiegało następująco.

1. Przygotowano 50 mg skrawków tkanki mięśniowej szkieletowego szczura, które następnie homogenizowano w 2 ml 1,15% KCl.
2. 1 ml homogenatu przeniesiono do szklanych probówek, do których dodano 2 ml mieszaniny reakcyjnej, zawierającej 0,25M kwasu solnego, 15% TCA, 0,375% TBA, 0,015% BHT. Jako kontroli użyto 1 ml 1,15% KCl.
3. Po wymieszaniu próbki inkubowano 20 min w 100 °C.
4. Po schłodzeniu zimną wodą do każdej z probówek dodano 2,5 ml L-butanolu, intensywnie wstrząsnęto i odwirowano (10 min, 3800 obr/min, 25 °C).
5. Fluorescencję supernatantu mierzono za pomocą spektrofлуorymetru Perkin Elmer Luminescence Spectrometr LS 50B, przy długości fali emisyjnej 546 nm, po wzbudzeniu falą 515 nm.
6. Odczytany wynik w jednostkach arbitralnych przeliczono, wykorzystując równanie regresji.

$$y = 5,2185 \cdot (x - x_0) + 14,491 \quad R^2 = 0,8853$$
gdzie: y – stężenie produktów peroksydacji lipidów,
x – średnia absorpcja badanej próbki,
 x_0 – średnia absorpcji kontroli.

Równanie regresji otrzymano doświadczalnie, wykonując 3 serie kalibracji ze wzrastającymi stężeniami tetrametoksypropanu ($C_7H_{16}O_4$): 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 3; 5; 7,5; 10; 20; 50; 70; 75 $\mu\text{mol/l}$.

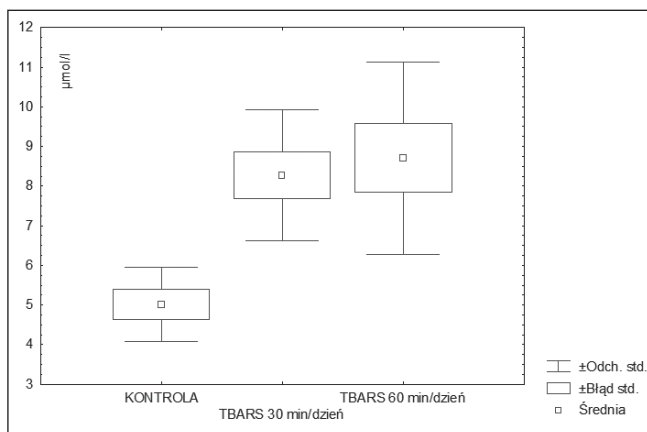
Do analizy statystycznej wykorzystano analizę ANOVA. Wykonano analizę podstawowych statystyk opisowych, testy jednorodności wariancji oraz test t dla prób niezależnych.

Wyniki

Ekspozycja zwierząt w polu magnetycznym niskiej częstotliwości o parametrach 40 Hz, 7 mT, 30 min/dzień przez 2 tygodnie powodowała znamienny wzrost stężenia TBARS w porównaniu z grupą kontrolną (8,27 \pm 1,65 vs 5,02 \pm 0,93), p=0,001. Pole magnetyczne o tych samych parametrach, ale stosowane przez 60 min/dzień, również powodowało wyraźny wzrost stężenia TBARS w porównaniu z grupą kontrolną (8,71 \pm 2,42 vs 5,02 \pm 0,93), p= 0,004 – tabela 1, rys. 1.

Dyskusja

Wśród hipotez, mających na celu wyjaśnienie mechanizmów oddziaływania pól magnetycznych na organizmy żywe, wymienia się mechanizm rodnikowy [7, 21]. Między innymi hipotezę taką przedstawia Zmysłony [21]. W swoich badaniach przeprowadzonych na szczurach wykazał on zmiany koncentracji wolnych rodników w wyniku działania pola magnetycznego o wartościach indukcji zwiększających prawdopodobieństwo zmiany wzajemnej orientacji spinów niesparowanych elektronów pary rodników. W doświadczeniach tych stosowane było między innymi pole magnetyczne sieciowe o częstotliwości 50/60 Hz i indukcji: 40 μT , 7 mT i 10 mT.



Rys. 1 Wykres pudełkowy średniej wartości TBARS grupy kontrolnej I, grupy II – 30 min/dzień, grupy III – 60 min/dzień

Tabela 1 Statystyki opisowe badanego parametru TBARS grupy kontrolnej I, grupy II, grupy III

Zmienna	Średnia	Mediana	Odch. std	Test t
grupa kontrolna bez PM	5,021667	5,075	0,934996	
grupa I 30 min/dzień	8,277594	8,263375	1,653749	p=0,001
grupa II 60 min/dzień	8,710844	8,7125	2,429809	p=0,004

W przypadku stosowania pola magnetycznego o indukcji 7 mT występował wzrost poziomu reaktywnych form tlenu RTF w badanych limfocytach. Natomiast dla pozostałych wartości indukcji pola magnetycznego, 40 μ T i 10 mT, dochodziło do spadku poziomu RTF. Zmiany wartości poziomu RTF zależne były od parametrów stosowanego pola magnetycznego. W przeprowadzonym doświadczeniu własnym zaobserwowano, iż pole magnetyczne niskiej częstotliwości o parametrach 40 Hz, 7 mT, czasie działania 30 min i 60 min/dzień przez 2 tygodnie również wywołuje zmiany w zakresie RTF, powodując ich nadprodukcję w tkance mięśniowej zwierząt doświadczalnych. Podobne wyniki w zakresie zmiany wytwarzania wolnych rodników zostały wykazane w badaniach innych autorów, wzrost wydzielania wolnych rodników pod wpływem pola magnetycznego zaobserwowano w wątrobie i w mózgu [22, 23]. Bediz i wsp. w badaniach eksperymentalnych wykazali nasilenie metabolizmu tlenowego neutrofilii u szczurów poddanych działaniu pola magnetycznego o częstotliwości 60 Hz i indukcji 0,1 mT, sugerując także, iż pola te mogą wpływać na procesy uwalniania wolnych rodników [23].

Dotychczasowe doniesienia potwierdzają mechanizm rodnikowy oddziaływania pól magnetycznych stałych i sieciowych na organizmy żywe, wskazując na zależność tego procesu od parametrów działającego pola magnetycznego [21-25]. Dlatego też wydaje się wskazane prowadzenie badań w zakresie wpływu pola magnetycznego niskiej częstotliwości na proces generacji wolnych rodników w organizmach żywych, w celu bezpiecznego wykorzystania tej formy terapii.

Wnioski

1. Pole magnetyczne niskiej częstotliwości o parametrach 7 mT, 40 Hz i czasie oddziaływania 30 i 60 min/dzień powoduje istotne podwyższenie stężenia TBARS w tkance mięśniowej zwierząt doświadczalnych.

2. Pole magnetyczne o parametrach stosowanych w magnetoterapii wpływa na generację reaktywnych form tlenu. ■

Literatura

1. M. Valko, C.J Rhodes, J. Moncol i in.: *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*, Chemio-Biological Interaction, vol. 160, 2006, s. 1-40.
2. U.N. Das: *A radical approach to cancer*, Med Sci Monit, vol. 8, 2002, s. 79-82.
3. G. Bartosz: *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*, PWN, Warszawa 2004.
4. A. Zabłocka, M. Janus: *Dwa oblicza wolnych rodników tlenowych*, Post Hig Med. Dośw, vol. 62, 2008, s. 118-124.
5. E. Ciejka, A. Gorąca: *Wpływ pola magnetycznego niskiej częstotliwości na proces peroksydacji lipidów*, Pol. Merk. Lek., vol. XXIV, 2008, s. 106-140.
6. W. Droge: *Free radicals in the physiological control of cell function*, Physiological Rev., vol. 82, 2002, s. 47-95.
7. C. Eichwald, J. Walleczek: *Model for magnetic field effects on radical pair recombination in enzyme kinetics*, Biophys J., vol. 71(2), 1999, s. 623-631.
8. M. Lantov, M. Lupke, J. Frahm, M.O. Mattsson, N. Kuster, M. Simko: *Cell activating capacity of 50 Hz magnetic fields to release reactive oxygen intermediates in human umbilical cord blood-derived monocytes and in Mono Mac 6 cells*, Radiat Environ Biophys, vol. 38, 2004, s. 985-993.
9. T. Mika: *Fizykoterapia*, PZWL, Warszawa 2006.
10. A. Sieroń: *Zastosowanie pól magnetycznych w medycynie*, α -medica press, Bielsko-Biała 2002.
11. A. Straburzyńska-Lupa, G. Straburzyński: *Fizjoterapia z elementami klinicznymi*, PZWL, Warszawa 2008.
12. R.A. Aaron, D.M. Ciombor, B.J. Simon: *Treatment of nonunions with electric and electromagnetic fields*, Clin Ortho, vol. 419, 2004, s. 21-29.
13. T. Mert, I. Gunay, C. Gocmen i in.: *Regenerative effects of pulsed magnetic field on injured peripheral nerves*, Alern Ther Health Med., vol. 12(5), 2006, s. 42-49.
14. M. Zahn: *Pole elektromagnetyczne*, PWN, Warszawa 1989.
15. A.R. Liboff: *Search for ion-cyclotron resonance in an Na(+)-transport system*, Bioelectromagnetics, vol. 12(2), 1991, s. 77-83.
16. A.R. Liboff: *Cyclotron resonance in membrane transport, Interactions between electromagnetic fields and cells*, A. Chiabrera, C. Nicolini, H.P. Schwan (red.), Plenum, Londyn 1985, s. 281-296.
17. C. Eichwald, J. Walleczek: *Model for magnetic field effects on radical pair recombination in enzyme kinetics*, J. Biophys, vol. 71(2), 1999, s. 623-631.
18. M. Lupke, J. Rollwitz, M. Simko: *Cell activating capacity of 50 Hz magnetic fields to release reactive oxygen intermediates in human umbilical cord blood-derived monocytes and in Mono Mac 6 cells*, Free Radic Res, vol. 38, 2004, s. 985-993.
19. K. Zwirska-Korczała, J. Jocem, M. Adamczyk-Sowa, P. Sowa, R. Polania, E. Birkner, M. Latocha, K. Plic, R. Suchanek: *Effect of extremely low frequency electromagnetic fields on cell proliferation, antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in 3T3-L1 preadipocytes – an in vitro study*, J Physiol Pharmacol, vol. 56, suppl 6, 2005, s. 101-108.
20. K. Zwirska-Korczała, M. Adamczyk-Sowa, Polania R. i in.: *Influence of extremely-low-frequency magnetic field on antioxidative melatonin properties in AT478 murine squamous cell carcinoma culture*, Biol Trace Elem Res, vol. 102, 2004, s. 227-243.
21. M. Zmyślony: *Działanie stałych i sieciowych pól magnetycznych występujących w środowisku człowieka na układy biologiczne. Mechanizm rodnikowy*, Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera, Łódź 2002, praca habilitacyjna.
22. A.H. Hashish, M.A. El-Missiry, H.I. Abdelkader, R.H. Abou-Saleh: *Assessment of biological changes of continuous whole body exposure to static magnetic field and extremely low frequency electromagnetic fields in mice*, Ecotoxicol Environment Safety, vol. 71, 2008, s. 895-902.
23. C.S. Bediz, A.K. Baltacı, R. Mogulkoc, E. Oztekin: *Zinc supplementation ameliorates electromagnetic field-induced lipid peroxidation in the rat brain*, Tohoku J Exp Med, vol. 208, 2006, s. 133-140.
24. S. Roy, Y. Noda, V. Eckert i in.: *The phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced oxidative burst in rat peritoneal neutrophils is increased by a 0,1 mT (60 Hz) magnetic field*, FEBS Lett vol. 376(3), 1995, s. 164-166.
25. S. Mnaimneh, M. Bizri, B. Veyret: *No effect of exposure to static and sinusoidal magnetic fields on nitric oxide production by macrophages*, Bioelectromagnetics, vol. 17(6), 1996, s. 519-521.

otrzymano / received: 15.01.2010 r.
zaakceptowano / accepted: 17.05.2010 r.