

Jolanta Jajte¹
Marek Zmyślony²
Elżbieta Rajkowska²

OCHRONNY WPŁYW MELATONINY I WITAMINY E W PROOKSYDACYJNYM DZIAŁANIU JONÓW ŻELAZA ORAZ STAŁEGO POLA MAGNETYCZNEGO*

PROTECTIVE EFFECT OF MELATONIN AND VITAMIN E AGAINST PROOXIDATIVE ACTION OF IRON IONS AND STATIC MAGNETIC FIELD

¹ Z Zakładu Toksykologii

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Kierownik zakładu: prof. dr hab. A. Sapota

² Z Zakładu Zagrożeń Fizycznych

Instytutu Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi

Kierownik zakładu: prof. dr hab. med. M. Śliwińska-Kowalska

STRESZCZENIE Celem pracy było zbadanie działania melatoniny i witaminy E (troloksu) w procesie peroksydacji lipidów w limfocytach krwi obwodowej szczura po 3 h ekspozycji *in vitro* na jony żelaza i 7 mT stałe pole magnetyczne (SMF). Proces peroksydacji lipidów zostały wybrany ze względu na fakt, iż może być wskaźnikiem mechanizmu wolnorodnikowego działania SMF na komórki. Podczas preinkubacji do części komórek dodano (0,5 mM) melatoniny lub (0,1 mM) witaminy E (troloksu). W czasie ekspozycji na SMF, pomiędzy cewkami Helmholtza, część prób była inkubowana z chlorkiem żelazawym (10 mg/ml or 20 mg/ml), a pozostałe stanowiły kontrolę.

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano istotny wzrost końcowych produktów peroksydacji lipidów (4-HNE+MDA) w limfocytach szczura eksponowanych jednocześnie na 7 mT (SMF) i jony żelaza (w stosunku do prób kontrolnych i eksponowanych jedynie na SMF). Natomiast, dla komórek, które wcześniej poddane były działaniu melatoniny lub troloksu i następnie eksponowane na 7 mT SMF i jony żelaza poziom peroksydacji lipidów był istotnie niższy. Wyniki wskazały również, że melatonina jest mniej efektywna od witaminy E (troloksu) w inhibicji peroksydacji lipidów w warunkach eksperymentu. *Med. Pr.* 2003; 54 (1): 23–28

SŁOWA KLUCZOWE: melatonina, witamina E (troloks), pole magnetyczne, peroksydacja lipidów.

ABSTRACT The purpose of this study was to examine the effect of melatonin and vitamin E (trolox) on the level of lipid peroxidation in rat blood lymphocytes after *in vitro* (3 h) exposure to iron ions and/or 7mT static magnetic field (SMF). The lipid peroxidation process was chosen as a marker of free radical mechanism of SMF in cells. The cells were supplemented with (0.5 mM) melatonin or (0.1 mM) vitamin E (trolox) in preincubation. During SMF exposure in Helmholtz coils some samples were treated with ferrous chloride (10 mg/ml or 20 mg/ml), while the rest served as controls.

There is a significant increase in the amount of lipid peroxidation end-products (4-HNE+MDA) in rat lymphocytes after simultaneous exposure to 7 mT SMF and iron ions (versus control samples and those exposed to SMF alone). Instead, when the cells were treated with melatonin or trolox and then exposed to iron ions and 7 mT SMF, the level of lipid peroxidation was significantly reduced. The results also indicated that melatonin is less effective than vitamin E (trolox) in inhibiting lipid peroxidation under the experimental conditions used. *Med Pr* 2003; 54 (1): 23–28

KEY WORDS: melatonin, vitamin E (trolox), magnetic field, lipid peroxidation

Otrzymano: 30.10.2002

Zatwierdzono: 6.01.2003

Adres I autora: Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź

WSTĘP

W środowisku życia człowieka występują powszechnie zarówno naturalne pola elektromagnetyczne (PEM) (kula ziemiska, promieniowanie kosmiczne) jak i sztuczne (wytwarzane przez urządzenia generujące pole w trakcie pracy oraz jako efekt uboczny działania wielu urządzeń). W drugiej połowie XX wieku gwałtowny wzrost uprzemysłowienia wraz z rozbudową trójfazowej elektrycznej, rozwojem telekomunikacji oraz coraz większą dostępnością nowych urządzeń elektrycznych w gospodarstwach domowych spowodował, iż nastąpił niekontrolowany wzrost ekspozycji ludzi na sztuczne PEM, głównie w środowisku komunalnym oraz w środowisku pracy (tzw. smog elektromagnetyczny).

Najważniejszym naturalnym polem magnetycznym, które w decydujący sposób wpływa na środowisko komunalne jest stałe pole magnetyczne Ziemi. Źródłem sztucznego stałego pola magnetycznego, które może w istotny sposób spowodować podwyższenie ekspozycji komunalnej są m.in. linie energetyczne prądu stałego. Znaczna ekspozycja na stałe pole magnetyczne występuje w pociągach elektrycznych. Wykazano, że w zależności od rodzaju pociągu i zajmowanego w nim miejsca wielkość pola działającego na pasażerów może osiągać 0,2 mT (1). W przemyśle najsilniejsze stałe pola magnetyczne wytwarzane są na stanowiskach pracy związanych z procesami elektrolitycznymi, gdzie średnie wartości indukcji magnetycznej wynoszą 2–15 mT. Ekspozycja na bardzo silne stałe pole magnetyczne (do 2 T) występuje w obrazowaniu magnetycznym rezonansem jądrowym stosowanym w badaniach lekarskich. W niektórych urządzeniach powszechnego użytku takich jak: lodówki, kuchenki

* Praca częściowo wykonana w ramach zadania finansowanego z dotacji na działalność statutową, nr IMP 18.7 pt. „Wpływ słabego pola magnetycznego stałego i/lub o częstotliwości sieciowej (50 Hz) na proces apoptozy w limfocytach: Ochronna rola antyoksydantów”. Kierownik zadania: dr J. Jajte

mikrofalowe, głośniki zestawów audio, wartości stałego pola magnetycznego wynoszą kilka mT (2).

Z badań epidemiologicznych wynika, że zanieczyszczenie środowiska sztucznymi polami elektromagnetycznymi może powodować negatywne skutki zdrowotne: w układzie krążenia, w ośrodkowym układzie nerwowym, w układzie immunologicznym, a nawet wystąpienie chorób nowotworowych, głównie u pracowników tzw. zawodów elektrycznych (2,3). Dlatego też, w ostatnich latach obok intensywnych badań efektów biologicznych ekspozycji na pola magnetyczne prowadzone są prace eksperymentalne mające na celu zarówno wyjaśnienie podłoża (mechanizmów) sugerowanych szkodliwych skutków zdrowotnych, jak i opracowanie sposobów zapobiegania ich powstaniu.

Wyniki prac doświadczalnych z ostatnich lat potwierdziły, że jednym z głównych mechanizmów molekularnych działania stałych pól magnetycznych na objekty materialne jest ich wpływ na stany spinowe cząsteczek paramagnetycznych (4). Wykazano, że zewnętrzne pola magnetyczne o wartościach kilku militesli mogą zmieniać wzajemną orientację spinów elektronów walencyjnych, wpływając w ten sposób na wynik reakcji (zmieniając proporcję jej produktów, np. zwiększając w czasie liczbę rodników tlenu (ROS)). Nadmierna produkcja rodników tlenowych w komórce może spowodować różnego rodzaju zaburzenia: funkcjonalne i morfologiczne. Zgodnie z definicją, stres oksydacyjny jest to takie zaburzenie równowagi pomiędzy stanem prooksydacyjnym a antyoksydacyjnym, w którym przewagę mają procesy związane z reakcjami utleniania (5). Wolne rodniki tlenowe mogą uszkadzać komórkę poprzez modyfikację białek, lipidów, węglowodanów i kwasów nukleinowych. Stres oksydacyjny może prowadzić również do zmian morfologicznych powierzchni komórki. Częstym miejscem ataku ROS są także błony biologiczne. Występujące w błonach wielonienasycone kwasy tłuszczowe ulegają nadtlenu w procesie peroksydacji lipidów. Peroksydacja lipidów jest procesem lawinowym, w którym związki rodnikowe (wodoronadtlenki lipidowe oraz rodniki tlenowe) wytwarzają następne nowe rodniki w wyniku oddziaływania z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi (5,6). Głównymi związkami, które przyjmuje się za wskaźniki procesu peroksydacji lipidów są: dialdehyd malonowy (MDA) oraz 4-hydroksynonenal (4-HNE) (7).

W Instytucie Medycyny Pracy w Łodzi od 1998 r. prowadzone były badania dotyczące wpływu, *in vitro*, jednoczesnego działania stałego słabego pola magnetycznego i jonów żelaza na różne procesy zachodzące w limfocytach krwi obwodowej szczura, powiązane z mechanizmem rodnikotwórczym. W poprzednich publikacjach wykazano, że słabe stałe pole magnetyczne, *in vitro* w limfocytach, w warunkach dodatkowej stymulacji jonami żelaza, powoduje: 1) wzrost uszkodzeń DNA, 2) nasilenie peroksydacji lipidów, 3) wpływa na procesy związane ze śmiercią komórek (apoptozę i nekrozę) oraz 4), że podanie melatoniny istotnie zmniejsza wielkość uszkodzeń DNA wywołanych przez to pole (8-11).

W celu potwierdzenia hipotezy o prooksydacyjnym działaniu stałego słabego pola magnetycznego na komórki,

a dokładniej wpływie pól magnetycznych na procesy z udziałem wolnych rodników zachodzące w układach biologicznych, postanowiono w obecnej pracy, na przykładzie peroksydacji lipidów, ocenić zmiany, jakie mogą w tym działaniu spowodować wybrane antyoksydanty. Ze względu na charakter działania i przedmiot badania (pole magnetyczne) wybrano melatoninę oraz, powszechnie stosowany na świecie w pracach doświadczalnych związanych z procesem peroksydacji lipidów α -tokoferol - witaminę E - tu jako troloks, czyli syntetyczny analog rozpuszczalny w wodzie.

MATERIAŁ I METODY

Opis modelu badawczego

Badania przeprowadzono na szczurach szczepu Wistar (outbred IMP:WIST), młodych (2 mies.) samcach, ważących ok. 200 g., karmionych standardową paszą granulowaną (muri-gran) i pojonych wodą *ad libitum*. Do każdego eksperymentu od kilku (6-10) szczurów pobierano krew z żyły udowej do probówek z heparyną. Limfocyty izolowano poprzez zawieszenie 5 ml krwi na 4 ml Histopaque 1077 (Sigma). Następnie wirowano całość przy 2000 rpm przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Warstwę limfocytów zawartą pomiędzy plazmą a Histopaque przemywano dwukrotnie medium RPMI 1640. Przemyte limfocyty zawieszano w medium RPMI 1640 z L-glutaminą. Do doświadczeń stosowano zawiesinę komórek zawierającą ok. $2 \cdot 10^6$ limfocytów w 5 ml medium komórkowym. Jako modelowy czynnik dla oceny procesów oksydacyjnych zastosowano jony żelaza w postaci $FeCl_2$ (10 μ g/ml). Do każdej właściwej próby (tj. prób kontrolnych oraz prób eksponowanych) dodawano $FeCl_2$ bezpośrednio przed rozpoczęciem ekspozycji na pole magnetyczne.

Żywotność komórek oznaczano poprzez barwienie błękitem trypanu (0,1%). Żywotność limfocytów początkowa, tj. przed przystąpieniem do ekspozycji na pole magnetyczne, wynosiła ok. 95%.

Układ ekspozycyjny

Ekspozycja na pole magnetyczne miała miejsce pomiędzy cewkami Helmholtza (promień cewek $R = 0,175$ m, liczba zwojów w każdej z cewek ($n = 1600$)). Wielkość pola była mierzona przy użyciu teslomierza firmy F.W. Bell model 9500 A wyposażonego w sondę poprzeczną STF 99-0404. Zestaw ten pozwala na pomiar stałego pola magnetycznego o indukcji od 3 μ T do 30 T z dokładnością 0,1%. Badania przeprowadzono stosując wytwarzane przez cewki pole magnetyczne o indukcji magnetycznej 7 mT. Probówki z zawiesiną limfocytów w odpowiednim medium komórkowym umieszczano w łaźni wodnej o temperaturze $37^\circ C \pm 0,5^\circ C$. Probówki w statywie rozmieszczano pomiędzy cewkami tak, aby materiał biologiczny znajdował się w polu o dużym stopniu jednorodności ($\pm 5\%$). Temperaturę dodatkowo kontrolowano za pomocą cyfrowego termometru kwarcowego typ PTK-1 firmy ZOPAN (Polska). Próby kontrolne znajdowały się w łaźni

wodnej umieszczonej poza układem ekspozycyjnym (w polu magnetycznym naturalnym 50 μ T). Ekspozycja limfocytów na stałe pole magnetyczne trwała 3 godziny.

Ocena działania antyoksydacyjnego melatoniny i witaminy E (troloksu) w procesie peroksydacji lipidów w komórkach

a) Ocena peroksydacji lipidów. Ocenę tego procesu w komórkach przeprowadzono wykorzystując metodę opracowaną przez firmę OXIS Int. Inc. (Wlk. Brytania) w teście LPO-586. Podstawą tej metody jest reakcja N-metyl-2-fenylindolu z aldehydem malonowym i 4-hydroksyalkenami w 45°C. W wyniku tej reakcji tworzy się stabilny kompleks dający maksimum absorpcji przy 586 nm. Metoda ta pozwala na oznaczenie ilości MDA w próbce (modyfikacja metody z zastosowaniem 12 N HCl) oraz na oznaczenie ilości 4-HNE i MDA (modyfikacja metody z zastosowaniem 15 M. kwasu metanosulfonowego). Przed dodaniem w.w. reagentów do każdej próby został dodany 0,5 M. BHT (butylohydroksytoluen) w celu uniknięcia dodatkowej oksydacji prób w trakcie przeprowadzania oznaczania. Każda próba zawierała $6-8 \cdot 10^6$ komórek/ml. Dokładną ilość oznaczanych aldehydów wyliczono na podstawie wyznaczonej wstępnie ekstynkcji molowej przy użyciu standardów 4-HNE i MDA. Dalej postępowano zgodnie z procedurą opisaną w teście.

b) Metoda oznaczania białka. Oznaczanie białka przeprowadzono w oparciu o modyfikację metody wg Bradford (M. Bradford, Anal. Biochem. 72, 248, 1976), testem firmy Bio-Rad, dla oznaczeń prób mikro. Do oznaczeń stosuje się barwnik Coomassie Brilliant Blue G-250, który w połączeniu z białkiem tworzy kompleks dający maksimum absorpcji przy 595 nm. Dokładną wartość białka wylicza się na podstawie wyznaczonej wstępnie (przy użyciu standardu; wołowej gamma globuliny lub wołowej albuminy surowicy) krzywej wzorcowej, według dokładnej procedury opracowanej przez firmę Bio-Rad. Metodę tę zastosowano do oznaczeń ilości białka w limfocytach.

c) Sposób postępowania z antyoksydantami. Wybrany czynnik antyoksydacyjny został dodany do komórek podczas 30-minutowej preinkubacji (w łaźni wodnej w 37°C lub w inkubatorze CO₂) przed właściwą ekspozycją limfocytów na pole magnetyczne i/lub jony żelazawe. Ilość (optymalna) dodanego antyoksydanta została ustalona doświadczalnie w badaniach pilotowych (dane nie zostały zamieszczone w publikacji). Do wszystkich badań zastosowano te same ilości antyoksydantów: melatoniny (0,5 mM) i troloksu (0,1 mM).

WYNIKI

W limfocytach inkubowanych przez 3 godziny w medium RPMI 1640 (komórki kontrolne) łączna ilość 4-hydroksynonenu (4-HNE) i dialdehydu malonowego (MDA), końcowych produktów peroksydacji lipidów – uznanych powszechnie za wskaźniki tego procesu – wynosiła około 10 nM/mg białka (dane nie podane w tabelach). Inkubacja limfocytów

z chlorkiem żelazawym (FeCl₂), induktorem peroksydacji lipidów, w stężeniu 10 μ g/ml powodowała istotny statystycznie wzrost ilości badanych aldehydów (4-HNE + MDA = 18,59 \pm 1,00 nM/mg białka). W celu zwiększenia ilości wolnych rodników do badań zastosowano również stężenie wyższe, tj. 20 μ g/ml. W limfocytach inkubowanych w takim stężeniu przez 3 godziny nastąpił istotny wzrost ilości badanych aldehydów zarówno w stosunku do komórek z grupy kontrolnej (medium RPMI 1640) jak i inkubowanych z FeCl₂ w stężeniu 10 μ g/ml, osiągając łączną wartość 26,21 \pm 1,20 nM/mg białka (tab. I i II). Podobne wyniki uzyskali również inni autorzy (12).

W przypadku, gdy limfocyty inkubowane z FeCl₂ w stężeniu 10 μ g/ml jednocześnie poddano 3-godzinnej ekspozycji w stałym polu magnetycznym o indukcji 7 mT nie stwierdzono istotnego wzrostu poziomu aldehydów w stosunku do grupy nieekspozowanej. Natomiast, dla limfocytów ekspozowanych na stałe pole magnetyczne 7 mT i jednocześnie inkubowanych z FeCl₂ w stężeniu 20 μ g/ml ilość oznaczanych aldehydów (4-HNE+MDA) była wyższa, istotnie statystycznie, zarówno w stosunku do komórek z grupy kontrolnej jak i komórek poddanych jedynie działaniu FeCl₂ w stężeniu 20 μ g/ml, osiągając wartość 32,70 \pm 4,04 nM/mg białka. Dane te potwierdzają wcześniejsze obserwacje (9).

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń z antyoksydantami – melatoniną i witaminą E (troloksem) wykazano, że po 3 godzinach ekspozycji na stałe pole magnetyczne (7 mT) zarówno melatonina (0,5 mM) jak i troloks (0,1 mM) istotnie zmniejszają ilość produktów peroksydacji lipidów (4-HNE + MDA) w limfocytach (tab. I i II.). Dla grupy melatonina + FeCl₂ (10 μ g/ml) o około 20% (zarówno dla komórek ekspozowanych na pole jak i nieekspozowanych), w stosunku do odpowiedniej kontroli z FeCl₂ (10 μ g/ml), a dla grupy melatonina + FeCl₂ (20 μ g/ml) o około 40% (zarówno dla komórek ekspozowanych na pole jak i nieekspozowanych), w stosunku do odpowiedniej kontroli z FeCl₂ (tab. I). Podobnie w przypadku troloksu (0,1 mM), dla komórek z FeCl₂ (10 μ g/ml) o ok. 20%, a dla komórek z FeCl₂ (20 μ g/ml) powyżej 40% (tab. II). Uzyskane dane pozwalają również na wyciągnięcie wniosku, że Troloks, analog witaminy E rozpuszczalny w wodzie, wywiera silniejsze antyoksydacyjne działanie od melatoniny w procesie peroksydacji lipidów w komórkach w warunkach doświadczenia, tj. ekspozycji na stałe pole magnetyczne (7 mT) i jony żelaza (tab. I i II).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Uzyskane w przedstawionej pracy wyniki potwierdzają wcześniejsze obserwacje oraz hipotezę o wpływie pól magnetycznych na procesy z udziałem wolnych rodników, zachodzące w układach biologicznych (8,13). Wyniki badań *in vitro* wskazują, że słabe pole magnetyczne, współdziałając z jonami żelaza, może istotnie zwiększyć peroksydację lipidów w limfocytach krwi obwodowej szczura, natomiast

Tabela I. Stopień peroksydacji lipidów (wyrażony jako ilość 4-HNE + MDA w nmolach/mg białka) w limfocytach krwi obwodowej szczura eksponowanych *in vitro* (3 h) na stałe pole magnetyczne (SMF) 7 mT i/lub FeCl₂ i/lub Melatoninę (średnia arytmetyczna ± SD)

Table I. Level of lipid peroxidation (expressed as amount of 4-HNE + MDA in nmol/mg protein) in rat blood lymphocytes exposed *in vitro* (3 h) to the 7 mT static magnetic field (SMF) and/or FeCl₂ and/or Melatonin (mean ± SD)

Ekspozycja Exposure	Stopień peroksydacji lipidów Level of lipid peroxidation nM 4-HNE + MDA/mg białka nM 4-HNE + MDA/mg protein	
	komórki nieekspozowane Unexposed cells	komórki ekspozowane Cells exposed SMF, 7 mT
10 µg/ml FeCl ₂		
Kontrola Control group	18,59 ± 1,00	19,39 ± 1,43
+ Melatonina (0,5 mM) + Melatonin (0.5 mM)	14,70 ± 0,38 ^a	15,40 ± 0,45 ^a
20 µg/ml FeCl ₂		
Kontrola Control group	26,21 ± 1,20	32,70 ± 4,04 ^X
+ Melatonina (0,5 mM) + Melatonin (0.5 mM)	16,10 ± 0,31 ^b	16,20 ± 0,35 ^b

MDA - dialdehyd malonowy, produkt peroksydacji lipidów.

MDA - malondialdehyde, lipid peroxidation product.

4-HNE - 4-hydroksynonenal, produkt peroksydacji lipidów.

4-HNE - 4-hydroxynonenal, lipid peroxidation product,

^{a,b} - odpowiednio dla $p \leq 0,05$; i $p \leq 0,01$, dla grup z melatoniną i FeCl₂ (10 i 20 µg/ml) w stosunku do odpowiedniej kontroli z FeCl₂ i pola magnetycznego z FeCl₂.

^{a,b} - statistically significant compared to cells exposed or unexposed to SMF and incubated with melatonin and FeCl₂ (10 i 20 µg/ml), $p \leq 0,05$, and $p \leq 0,01$.

X - odpowiednio dla $p \leq 0,05$, dla grupy ekspozowanej na pole magnetyczne i FeCl₂ (20 µg/ml) w stosunku do odpowiedniej kontroli z FeCl₂ (20 µg/ml) nie ekspozowanej na pole SMF.

X - statistically significant compared to cells exposed to SMF and incubated with FeCl₂ (20 µg/ml), $p \leq 0,05$.

podanie melatoniny lub witaminy E (troleksu) ochrania komórki przed tym prooksydacyjnym działaniem.

W warunkach fizjologicznych reaktywne rodniki tlenowe podlegają mechanizmom regulacyjnym w komórce, a stan redoks jest ściśle kontrolowany przez liczne antyoksydanty. Należy przypomnieć, że antyoksydantem jest „każda substancja, która obecna w niskim stężeniu w stosunku do substratu ulegającego utlenieniu, znacząco (istotnie) opóźnia bądź hamuje utlenienie tego substratu” (5). Biorąc pod uwagę budowę chemiczną, właściwości oraz sposób działania tych związków można je podzielić na trzy kategorie 1) związki o działaniu ochronnym (prewencyjnym) (np. transferaza glutationu, białka chelatujące metale), 2) związki, których zadaniem jest przerwanie działania wolnych rodników tlenowych poprzez ich przechwycenie i zneutralizowanie oraz zablokowanie rozprzestrzeniania się, np. w błonach komórkowych: a) antyoksydanty nieenzymatyczne (np. α-tokoferol - witamina E - lub melatonina), b) antyoksydanty enzymatyczne, których głównymi przedstawicielami są: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza i peroksydaza glutationu, 3) związki uczestniczące w procesach naprawczych (m.in. DNA - enzymy reparacyjne, enzymy proteolityczne).

Jednym z głównych endogennych antyoksydantów niezwykle istotnych z punktu widzenia bioelektromagnetyzmu

jest melatonina (2,14). Melatonina reguluje różne procesy fizjologiczne, biochemiczne i behawioralne. Jej podstawową funkcją jest koordynacja rytmów dobowych, okołodobowych i rocznych. Ponadto, w pracach doświadczalnych z ostatnich lat udowodniono, że melatonina jest antyoksydantem i wychwytywaczem (ang. scavengers) wolnych rodników tlenowych (ROS), a głównie rodnika wodorotlenowego (hydroksylowego) HO^o (uznanego za najbardziej reaktywny spośród wszystkich rodników tlenowych) oraz rodnika ponadtlenowego ROO^o (posiadającego istotne znaczenie w procesie peroksydacji lipidów). Wykazano również, że może ona neutralizować tlen singletowy, tlenek azotu i bardzo szkodliwy nadtlenoazotyn (15-17). Te połączone działania melatoniny sprawiają, że jest ona zdolna do znacznej redukcji szkodliwych procesów oksydacyjnych występujących w komórce i co za tym idzie w całym organizmie. I tak wykazano na przykład, że melatonina, w warunkach *in vitro*, jest wysoce efektywna w zabezpieczeniu DNA, białek i lipidów błon komórkowych przed oksydacyjnymi uszkodzeniami (18-24). Należy tu dodać, że melatonina, w odróżnieniu od wielu innych antyoksydantów (np. α-tokoferolu), bardzo łatwo przechodzi przez wszelkie błony biologiczne, w tym przez barierę krew-mózg, stąd też jej działanie ochronne nie ogranicza się do wybranego miejsca, ale jest wszechobecne w us-

Tabela II. Stopień peroksydacji lipidów (wyrażony jako ilość 4-HNE + MDA w nmolach/mg białka) w limfocytach krwi obwodowej szczura eksponowanych *in vitro* (3 h) na stałe pole magnetyczne (SMF) 7 mT i/lub FeCl₂ i/lub α-Tokoferol (Troloks) (średnia arytmetyczna ± SD)

Table II. Level of lipid peroxidation (expressed as amount of 4-HNE + MDA in nmol/mg protein) in rat blood lymphocytes exposed *in vitro* (3 h) to the 7 mT static magnetic field (SMF) and/or FeCl₂ and/or α-Tokopherol (Trolox) (mean ± SD)

Ekspozycja Exposure	Stopień peroksydacji lipidów Level of lipid peroxidation nM 4-HNE + MDA/mg białka nM 4-HNE + MDA/mg protein	
	komórki nieeksponowane Unexposed cells	komórki eksponowane Cells exposed SMF, 7 mT
10 µg/ml FeCl ₂		
Kontrola Control group	18,59 ± 1,00	19,39 ± 1,43
+ α-Tokoferol (Troloks, 0,1 mM) + α-Tocopherol (Trolox, 0.1 mM)	14,30 ± 0,63 ^a	15,20 ± 0,58 ^a
20 µg/ml FeCl ₂		
Kontrola Control group	26,21 ± 1,20	32,70 ± 4,04 ^X
+α-Tokoferol (Troloks, 0,1 mM) + α-Tocopherol (Trolox, 0.1 mM)	18,20 ± 0,62 ^b	17,50 ± 0,88 ^b

MDA - dialdehyd malonowy, produkt peroksydacji lipidów.

MDA - malondialdehyde, lipid peroxidation product.

4-HNE - 4-hydroksynonenal, produkt peroksydacji lipidów.

4-HNE - 4-hydroxynonenal, lipid peroxidation product,

^{a,b} - odpowiednio dla $p \leq 0,05$; $i p \leq 0,01$, dla grup z melatoniną i FeCl₂ (10 i 20 µg/ml) w stosunku do odpowiedniej kontroli z FeCl₂ i pola magnetycznego z FeCl₂.

^{a,b} - statistically significant compared to cells exposed or unexposed to SMF and incubated with melatonin and FeCl₂ (10 i 20 µg/ml), $p \leq 0,05$, and $p \leq 0,01$.

X - odpowiednio dla $p \leq 0,05$, dla grupy eksponowanej na pole magnetyczne i FeCl₂ (20 µg/ml) w stosunku do odpowiedniej kontroli z FeCl₂ (20 µg/ml) nie eksponowanej na pole SMF.

X - statistically significant compared to cells exposed to SMF and incubated with FeCl₂ (20 µg/ml), $p \leq 0,05$.

troju. Wszystkie wymienione wyżej właściwości melatoniny już znalazły lub dopiero czekają na wykorzystanie w leczeniu wielu chorób, bardziej lub mniej powiązanych ze stresem oksydacyjnym. Dotyczy to m.in. chorób centralnego układu nerwowego, chorób nowotworowych czy zaburzeń układu immunologicznego.

W ostatnich latach pojawiły się prace dotyczące szkodliwości promieniowań elektromagnetycznych, w których wykorzystano ochronne działanie melatoniny lub witaminy E, jako antyoksydantów. Pierwsze z tych prac dotyczyły promieniowania jonizującego i cytotoksyczności, w tym uszkodzenia DNA przez to promieniowanie (25–28). Ostatnio także, wyniki prac doświadczalnych badaczy amerykańskich Lai i Singh, oceniających uszkodzenia DNA w komórkach mózgu szczura pod wpływem działania *in vivo* PEM z zakresu radiofal (29) lub o częstotliwości sieciowej (60 Hz) (30) wykazały, że zastosowanie melatoniny ochrania przed uszkodzeniem DNA i, że dotyczy to zarówno jedno- jak i dwuniciowych pęknięć cząsteczki DNA.

Omówione wyżej prace nasze i innych autorów dotyczą efektów biologicznych, pojawiających się w chwili, gdy poszczególne komórki eksponowane są na słabe stałe lub sieciowe pole magnetyczne, a więc tym samym nie oceniają skutków zdrowotnych dla całego organizmu, to jednak jest

wielce prawdopodobne, że antyoksydanty, w tym melatonina lub witamina E, mogą spełniać tu istotną rolę ochronną.

WNIOSKI

Przeprowadzone badania pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Ekspozycja (3 godz.) limfocytów szczura na stałe pole magnetyczne (7 mT) oraz jony żelaza powoduje nasilenie peroksydacji lipidów w komórkach.

2. Dodanie antyoksydantów - melatoniny lub witaminy E (troloksu) - ochrania limfocyty krwi obwodowej szczura przed prooksydacyjnym działaniem, w procesie peroksydacji lipidów, stałego pola magnetycznego (7 mT) i jonów żelaza.

3. Troloks, analog witaminy E rozpuszczalny w wodzie, wywiera silniejsze antyoksydacyjne działanie od melatoniny w procesie peroksydacji lipidów w komórkach w warunkach doświadczenia, tj. ekspozycji na stałe pole magnetyczne (7 mT) i jony żelaza.

PIŚMIENNICTWO

1. Chadwick P., Lowes F.: Magnetic fields on British trains. Ann. Occup. Hyg. 1998; 5: 331–335.

2. World Health Organization: Environmental Health Criteria. 35. Magnetic Fields. WHO, Geneva 1987.
3. Savitz D.A.: Overview of occupational exposure to electric and magnetic fields and cancer: Advancements in exposure assessment. *Environ. Health Perspect.* 1995; 103: 69–75.
4. Grissom C.B.: Magnetic field effects in biology: A survey of possible mechanisms with emphasis on radical-pair recommendation. *Chem. Res.* 1995; 95: 324.
5. Sies H.: Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental. Physiol.* 1997; 82: 291–293.
6. Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Wyd. 2. Clarendon Press, Oxford, UK 1989.
7. Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H.: Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.* 1991; 11: 81–128.
8. Zmysłony M., Palus J., Jajte J., Dziubałtowska E., Rajkowska E.: DNA damage in rat lymphocytes treated in vitro with iron cations and exposed to 7 mT magnetic field (static and 50 Hz). *Mutat. Res.* 2000; 453: 89–96.
9. Jajte J., Grzegorzczak J., Zmysłony M., Rajkowska E.: Effect of 7 mT static magnetic field and iron ions on rat lymphocytes: apoptosis, necrosis and free radical processes. *Bioelectrochemistry* 2002; 57: 107–111.
10. Jajte J., Grzegorzczak J., Zmysłony M., Rajkowska E., Śliwińska-Kowalska M., Kowalski M.L.: Influence of a 7 mT static magnetic field and iron ions on apoptosis and necrosis in rat blood lymphocytes. *J. Occup. Health* 2001; 43: 379–381.
11. Jajte J., Zmysłony M., Palus J., Dziubałtowska E., Rajkowska E.: Protective effect of melatonin against in vitro iron ions and 7 mT 50 Hz magnetic field-induced DNA damage in rat lymphocytes. *Mutat. Res.* 2001; 483: 57–64.
12. Siu A.W., Reiter R.J., To C.H.: The efficacy of vitamin E and melatonin as antioxidants against lipid peroxidation in rat retinal homogenates. *J. Pineal. Res.* 1998; 24: 239–244.
13. Zmysłony M., Jajte J.: Udział wolnych rodników w mechanizmie biologicznego działania słabych stałych i sieciowych pól magnetycznych. *Med. Pr.* 1998; 27: 177–182.
14. Jajte J., Zmysłony M.: Rola melatoniny w molekularnym mechanizmie działania słabych, stałych i sieciowych pól magnetycznych. *Med. Pr.* 2000; 1: 51–57.
15. Gilad E., Cuzzocrea S., Zingarelli B., Salzman A.L., Szabo C.: Melatonin is a scavenger of peroxynitrite. *Life Sci.* 1997; 10: 169–174.
16. Pieri C., Marra M., Moroni F., Recchioni R., Marcheselli F.: Melatonin: a peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci.* 1994; 55: 271–276.
17. Reiter R.J., Tan D-X., Kim S.J., Qi W.: Melatonin as a pharmacological agent against oxidative damage to lipids and DNA. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 1998; 41: 229–235.
18. Reiter R.J., Melchiorri D., Sewerynek E., Poeggeler B., Barlow-Walden L.R., Chuang S.H. i wsp.: A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J. Pineal. Res.* 1995; 18: 1–11.
19. Longoni B., Salgo M.G., Pryor W.A., Marchiafava P.L.: Effects of melatonin on lipid peroxidation induced by oxygen radicals. *Life Sci.* 1998; 62: 853–859.
20. Carneiro R.C.G., Reiter R.J.: Melatonin protects against lipid peroxidation induced by δ -Aminolevulinic acid in rat cerebellum, cortex and hippocampus. *Neurosci.* 1998; 82: 293–299.
21. Garcia J.J., Reiter R.J., Guerrero J.M., Escames G., Yu B.P., Oh C.S. i wsp.: Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS Lett.* 1997; 408: 297–300.
22. Marshall K.A., Reiter R.J., Poeggeler B., Aruoma O.I., Halliwell B.: Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Rad. Biol. Med.* 1996; 21: 307–315.
23. Cadenas S., Barja G.: Resveratrol, melatonin, vitamin E, and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO₃. *Free Rad. Biol. Med.* 1999; 26: 1531–1537.
24. Escames G., Guerrero J.M., Reiter R.J., Garcia J.J., Munoz-Hoyos A., Ortiz G.G., i wsp.: Melatonin and vitamin E limit nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Neurosci. Lett.* 1997; 230: 147–150.
25. Vijayalaxmi., Reiter R.J., Meltz M.L.: Melatonin protects human blood lymphocytes from radiation-induced chromosome damage. *Mutat. Res.* 1995; 346: 23–31.
26. Bardak Y., Ozerturk Y., Ozguner F., Durmus M., Delibas N.: Effect of melatonin against oxidative stress in ultraviolet-B exposed rat lens. *Current Eye Res.* 2000; 20: 225–230.
27. Vijayalaxmi., Meltz M.L., Reiter R.J., Herman T.S.: Melatonin: possible mechanisms involved in its 'radioprotective' effect. *Mutat. Res.* 1998; 404: 187–189.
28. Satoh K., Kadofuku T., Sakagami H.: Effect of Trolox, a synthetic analog of α -Tocopherol, on cytotoxicity induced by UV irradiation and antioxidants. *Anticancer Res.* 1997; 17: 2459–2464.
29. Lai H., Singh N.P.: Melatonin and a spin-trap compound block radiofrequency electromagnetic radiation-induced DNA strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics* 1997; 18: 446–454.
30. Lai H., Singh N.P.: Melatonin and N-tert-butyl- α -phenyl-nitrone blocked 60 Hz magnetic field-induced DNA single and double strand breaks in rat cells. *J. Pineal. Res.* 1997; 22: 152–162.