

УТИЦАЈ ЕЛЕКТРОМАГНЕТНОГ ЗРАЧЕЊА НА α -ЋЕЛИЈЕ ПАНКРЕАСА КОД ПАЦОВА

Смиљана Параш, Милица Матавуљ, Весна Коко

Природно-математички факултет, Универзитет у Бања Луци, др Младена Стојановића
2, Бања Лука

Природно-математички факултет, Департман за Биологију и екологију, Универзитет у
Новом Саду, Трг Доситеја Обрадовића 2, Нови Сад

Биолошки факултет, Универзитет у Београду, Студентски Трг 16, Београд

Abstract

PARAŠ, Smiljana, Milica MATAVULJ, Vesna KOKO: Influence of the electromegnetic radiation to the α -cell on rats pancreas. *Skup 3*: 21-27. [Faculty of Natural Sciences and Matematics, 78000 Banja Luka, 2 dr Mladena Stojanovića Street, Faculty of Natural Sciences and Matematics, Departman of Biology and Ecology, 21000 Novi Sad, 2 Dositej Obradović Square, Biological Faculty, 11000 Beograd, 16 Students Square].

The trial conducted in this study aimed to determine whether there was an influence of the electromagnetic fields of precisely determined characteristics to the α -cells on endocrine pancreas. The experimental animals were rat males of the Wistar spp. and were submitted to the electromagnetic field of 50Hz frequency, 500 μ T induction and 10 V/m of intensity in the period of five months. After sacrificing, pancreases of the rats were submitted to the standard procedure for the light microscopy and DAKO/LSAB⁺HRP immunocytochemical method for α -cells. For presentation of the results and conclusions the stereological analyses were performed, while statistical significance of the differences was estimated by analyzing variable for one characteristic (ANOVA). The significance of differences in arithmetic means between the groups was estimated by Tukey's test.

Key words: pancreas, α -cells, electromagnetig radiation

Сажетак

Испитивање спроведено у овом раду има за циљ да одреди да ли постоји утицај електромагнетних поља тачно одређених карактеристика на α -ћелије ендокриног панкреаса. Експерименталне животиње су биле мужјаци пацова Wistar соја и излагане су електромегнетном пољу фреквенције 50 Hz, индукције од 500 μ T и јачине од 10 V/m у трајању од пет месеци. После жртвовања панкреси су проведени кроз стандардну процедуру за светлосну микроскопију и DAKO/LSAB⁺HRP имуноцитохемијску методу за алфа ћелије. За приказивање резултата и извођење закључака примењене су стереолошке анализе а статистичка значајност разлика је процењивана анализом варијансе за једно обележје (ANOVA). Значајност разлика аритметичких средина између група процењена је Tukey-овим тестом.

Кључне ријечи: панкреас, алфа-ћелије, електромагнетно зрачење

УВОД

Истраживања заснована на утицају електромегнетних поља различитих карактеристика на органске системе дају веома разнолике и контрадикторне резултате. Многобројни научни радови указују на негативан утицај електромагнетних поља на живе организме у исто време када се ова поља користе у дијагностичке и терапијске сврхе лечења оболелих (Gosset et al., 2004). Ова проблематика се усложњава са

чињеницом да је савремени човек окружен животним простором који је све више засићен вештачким електромагнетним пољима. Урбанизација и боравак људи у радном окружењу које је непрестано под утицајем споменутих поља изазива многе болести савременог човека а међу њима и дијабетес (Loweth, Hosker, 2004).

Панкреас има велику моћ регенерације, реорганизације и акомодације после хируршких захвата, блажих некроза и цистичних стања (Andren, Dervenis, 2004). Кад се говори о панкреасу мисли се и на његову егзокрину и ендокрину компоненту. У овом раду акценат је дат на алфа ћелије које се налазе у ендокрином панкреасу, тј. у Лангерхансовим острвцима. Промене изазване електромагнетним пољима на ендокрини панкреас на морфолошком нивоу су мале и незнатне, док су на физиолошко стање острваца промене реверзибилне (Laitl-Kobierska et al., 2002). Предпоставља се да је за ове незнатне промене разлог позиција панкреаса у тијелу јер је он окружен цревима и желуцем. За разлику од других посматраних жлезда чији је анатомски положај специфичан као што су кожа или тиреоидна жлезда па је и утицај поља већи (Rajković i sar., 2003., Matavulj i sar 2001). Поред тога важан детерминатор ефекта електромагнетних поља је и степен васкуларизације органа, будући да је показано да ова поља остварују значајан утицај на циркулаторни систем (Lažetić, 2004). С' обзиром да је панкреас жлезда са изузетно добром прокрвљеношћу и великом брзином протока крви по граму ткива ова чињеница има велики значај (Graham et al., 1996).

Први кораци у морфолошкој и биохемијској оцени активности ћелија ендокриног панкреаса пацова на електромагнетна поља дати су у радовима у којима су описане промене настале једнократним деловањем променљивог електромагнетног поља јачине 200 mT и фреквенције 50 Hz у временском интервалу од 6,5 или 24 часа. Промене које настају на ћелијама ендокриног панкреаса су поремећаји хемодинамике у њима и деструкцији Лангерхансових острваца (Belusov, Kolesova, 1986).

Најистраженије ћелије ендокриног панкреаса у односу на утицај електромагнетних поља су бета ћелије, међутим најинтересантније су алфа ћелије. Неминовно је повезивање функције алфа ћелија у односу на бета ћелије, пошто је познато да су оне непосредно једне поред других у Лангерхансовим острвцима. Алфа ћелије утичу на сазревање и формирање нових бета ћелија, као и на њихову прокрвљеност. У Лангерхансовим острвцима бета ћелије имају централни положај док су алфа ћелије у виду прстена око њих на периферији (Weir et al., 1990). Испитивања острвског крвотока пружила су доказе за постојање паралелне и серијске (инсуло-ацинусне) ангиоархитектуре. Истраживања су показала да постоји сложен интерпанкреатски портални систем, који крвљу прво снабдева спољашњи слој алфа ћелија, одакле се грана на већи број капилара и опскрбљује централно језгро у којем су бета ћелије. Алфа ћелије поред тога што синтетишу веома важан хормон, глукагон који је антагонист инсулину, веома активно утичу и на функционисање свих врста ћелија у Лангерхансовим острвима (Weir et al., 1990). Стимулација синтезе глукагона од стране инсулина зависи од нивоа глукозе у циркулацији пацова. У феталном панкреасу пацова на спољашњим мембранама бета ћелија нађени су рецептори за глукагон, што указује на регулаторну функцију глукагона на инсулинске ћелије. Глукагон излучен у култури изолованих феталних острвских ћелија, након уноса аминокиселина, може паракриним утицајем да стимулише лучење инсулина и тако изазове бета ћелијску репликацију (Vragić i sar., 1992).

Испитивање спроведено у овом раду има за циљ да одреди да ли постоји утицај електромагнетних поља тачно одређених карактеристика на α -ћелије ендокриног панкреаса.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Испитивање утицаја електромагнетних поља ниске фреквенције на алфа ћелије панкреаса извршено је на мужјацима пацова соја Wistar. Животиње су биле подељене у две групе: контролна група је имала десет животиња док је група излагана електромагнетном зрачењу имала девет животиња. Услови смештаја за обе групе животиња су били исти, што значи да су све животиње биле подвргнуте природном дневно-ноћном ритму светлости и мрака и температури ваздуха од око 22 °C. Обе групе животиња су храњене стандардном палетираном храном за лабораторијске животиње а воду која је била истог квалитета за обе групе, узимале су по потреби. Током експеримента животиње су биле смештене по пет или шест у једном кавезу у просторијама Завода за физиологију Медицинског факултета у Новом Саду. Контролне животиње су држане у одвојеној просторији где није било никакве могућности да буду изложене утицају електромагнетног зрачења коришћеног у експерименту. Цео поступак постављања експеримента и извођења је пратио Етички Комитет за експерименталне животиње Универзитета у Новим Саду.

Апаратура помоћу које је добијено електромагнетно поље сачињавао је калем од жице дебљине 2,5 mm намотане у 1320 намотаја на дрвене рамове, конструисала је Фабрика електричних намотаја „Novkabel“, Нови Сад, Србија. Карактеристике електромагнетних поља које је калем стварао и којем су биле животиње излагане биле су: фреквенција од 50 Hz, индукција од 500 μ T и јачина од 10 V/m. Дужина излагања животног пољима споменутих карактеристика била је пет месеци.

Дисекцијом свих 19 животиња, контролне и зрачене, извађени су панкреаси и фиксирани у Буеновом раствору. Фиксација је трајала 48 сати, после чега су панкреаси били испирани и прослеђени кроз стандардну процедуру за дехидратацију, просветљавање и калупљење у парафину. Добијени калупи су сечени на Reichert-овом клизећем микротому у серијске пресеке дебљине 4 μ m. Резови су бојени стандардном методом хематоксилин-еозин, трихромном хистохемијском техником Викторија плаво 8GX-флоксин-светло зелено, као и специјалним бојењем Mallory-Azan и Masson, после чега су пресеци монтирани у канада балзаму. За приказивање и локализацију свих ћелија па тако и алфа ћелија у Лангерхансовим острвцима коришћена је DAKO LSAB⁺/HRP техника у којој је стрептавидин обележен пероксидазом и обележени стрептавидин биотин високо рафинира све ћелије које стварају хормоне у Лангерхансовим острвцима. За алфа ћелије користио се обележени стрептавидин биотин који се везивао за глукагон.

Стереолошка анализа свих ћелија а посебно алфа ћелија ендокриног панкреаса вршена је употребом Weibel-овог многонаменског тестног система са 42 тестне тачке и 21 тестном линијом. Одређивана је волуменска густина, број, процентуално учешће и површине алфа ћелија у односу на Лангерхансово острвце и у односу на остале ћелије острваца.

РЕЗУЛТАТИ

Имуноцитохемијска анализа свих ћелија панкреасних острваца животиња које су зрачене и које су биле контрола омогућила је њихову детекцију и локализацију. У табели бр. 1 представљени су сумарни подаци посматраних параметара за све врсте ћелија: алфа, бета, Д и ПП Лангерхансових острваца.

Имуноцитохемијска бојења алфа ћелија осетљивих на глукагон (слике 1, 2, 3 и 4), као и осталих ћелија осетљивих на инсулин, соматостатин и панкреасни полипептид показала су дистрибуцију и број појединих ендокриних ћелија у острвцима контроле и

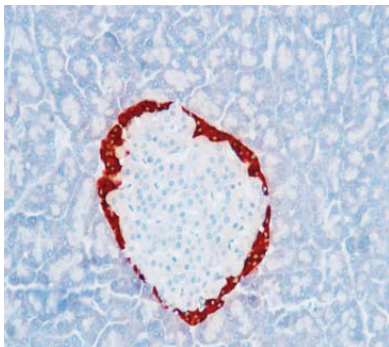
зрачене групе животиња. Веома је битно за одређивање дистрибуције алфа ћелија одредити и дистрибуцију свих осталих ћелија острваца. Овим бојењем је било омогућено да се сагледа учесталост појединих типова ендокриних ћелија у укупном броју ендокриних ћелија унутар острваца.

α-ћелије

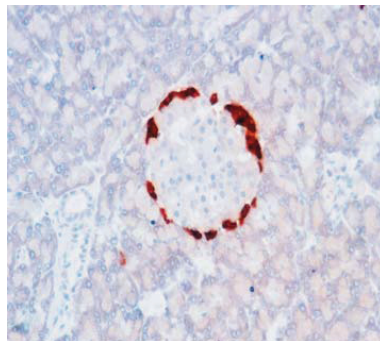
Таб. 1. Сумарна табела свих стереолошких параметара за све врсте ћелија у панкреасним острвцима контролне групе животиња и зрачене групе животиња.

	контрола	зрачена група	значајност	
			F - test	p
волуменска густина ендокриних ћелија:				
α	0.33 ± 0.042	0.35 ± 0.073	6.71	<0.01
β	0.48 ± 0.00034	0.48 ± 0.0058	0.12	n. s.
D	0.07 ± 0.011	0.04 ± 0.0014	1.63	n. s.
PP	0.13 ± 0.011	0.13 ± 0.0014	0.99	n. s.
број ендокриних ћелија:				
α	17.3 ± 0.65	21.0 ± 1.38	5.71	<0.05
β	23.5 ± 1.48	41.8 ± 3.87	10.68	<0.01
D	5.4 ± 0.18	5.2 ± 0.73	9.42	<0.01
PP	5.8 ± 0.51	6.8 ± 0.58	0.49	n. s.
процентуално учешће ендокриних ћелија:				
α	33.3	28.1	1.398	n. s.
β	45.2	55.9	5.795	<0.05
D	10.4	6.9	5.694	<0.05
PP	11.1	9.1	2.683	n. s.
површине ендокриних ћелија:				
α	142 ± 7.78	185 ± 3.24	8.74	<0.01
β	256 ± 9.78	246 ± 5.35	0.51	n. s.
D	160 ± 5.26	147 ± 3.31	1.71	n. s.
PP	184 ± 5.27	186 ± 5.71	0.45	n. s.

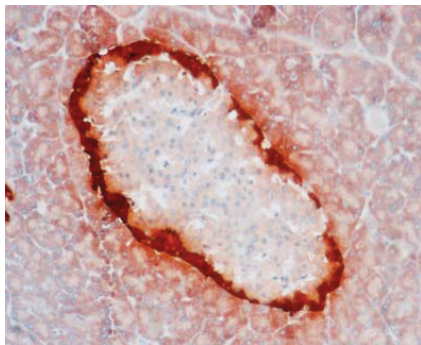
Велика острвца (слике 1 и 2) су показала јаку имунореакцију на глукагон. Имунореакција је више изражена код животиња које су боравиле у електромагнетном пољу у односу на контролну групу животиња. Мала острвца (слике 3 и 4) су такође показала још јачу имунореакцију на глукагон у односу на велика острвца. Код малих острваца имунореакција је више изражена код животиња које су биле излагане електромагнетном пољу у односу на контролу. Волуменске густине алфа ћелија су биле значајно увећане код животиња које су биле у електромагнетном пољу. Статистички резултати показују да је електромагнетно зрачење имало значајно дејство на алфа ћелије (Таб. 1). Резултати у табели бр. 1 нашег истраживања показују да је електромагнетно зрачење деловало на повећање броја алфа ћелија у односу на контролну групу животиња. Анализом варијансе за једно обележје утврђено је да је број ћелија био статистички значајно увећан код зрачених животиња. Добијени резултати за процентуално учешће појединих ендокриних ћелија показују да је постојала тенденција смањења учесталости алфа ћелија у укупном броју ћелија острваца код животиња које су биле у електромагнетном пољу у односу на контролу. Резултати тенденције смањења учесталости алфа ћелија не показују статистичку значајност. Испитивања су показала да је површина алфа ћелија била увећана због дејства електромагнетног зрачења и да је ово увећање било статистички значајно у односу на контролну групу.



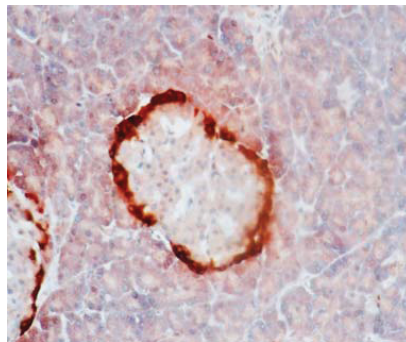
Слика 1. Контрола, Имуноцитохемија, x40



Слика 3. Контрола, Имуноцитохемија, x40



Слика 2. Зрачена група, Имуноцитохемија, x40



Слика 4. Зрачена група, Имуноцитохемија, x40

ДИСКУСИЈА

Алфа ћелије синтетишу глукагон који подиже ниво глукозе у крви подстицањем гликогенолизе у хепатоцитима. Алфа ћелије су антагонисти бета ћелијама. Стимулација синтезе глукагона од стране инсулина зависи од нивоа глукозе у циркулацији. Повећање инсулинске секреције доводи и до повећања глукагонске синтезе и излучивања, што је последица комуницирања алфа и бета ћелија преко пукотинастих веза код људи (Orci et al., 1975a) и пацова (Orci et al., 1975b). Регулација глукагонске секреције је такође под паракриним дејством бета и Д ћелија Лангерхансових острваца (Sejvan et al., 2003; Franklin et al., 2005). Последњи литературни подаци показују да је базална глукагонска секреција супримирана активирањем бета ћелија (Takahashi et al., 2006). Наведене студије су показале да су инсулин (Greenbaum et al., 1991; Banarer et al., 2002; Ravier, Rutter, 2005), цинк (Ishihara et al., 2003; Franklin et al., 2005) и GABA (Wendt et al., 2004), супстанце излучене из бета ћелија, које инхибирају глукагонску секрецију код пацова. Дуготрајно излагање пацова дејству ЕМЗ довело је до значајних промена на алфа ћелијама. Значајно увећање волуменских густина алфа ћелија узорковано је истовременим значајним увећањем броја и површина ових ћелија код пацова који су излагани пољима. Увећањем броја и површина алфа ћелија може указивати на њихову повећану активност у синтези и излучивању глукагона што би било у складу са ранијим подацима о повећању нивоа глукозе у крви као последица ЕМЗ (Kolesova et al., 1981). Имуноцитохемијска испитивања су показала јачу имунореакцију у алфа ћелијама малих острваца пацова зрачене групе за разлику од исте реакције код контроле. Значајна експанзија алфа

ћелија и смањење фракције бета ћелија нађено је у хуманој Корејској популацији код дијабетичара (Yoon et al., 2003) што би могло да се повеже са појавом дијабетеса изазваног ЕМЗ (Yamaguchi et al., 2001). У раду ових аутора указује се на повећан однос између алфа и бета ћелија као значајан параметар који указује на могућност појаве дијабетеса. У нашем експерименту однос алфа и бета ћелија је био повећан и износио 0.75 за зрачену групу животиња, док је код контролне групе овај однос био 0.55. Заправо наши резултати су показали да су најбурније реаговале алфа ћелије на излагање ЕМЗ.

ЗАКЉУЧЦИ

На основу хистолошке, имунохистохемијске, стереолошке и морфометријске анализе Лангерхансових острваца у првом реду алфа ћелија панкреаса белих лабораторијских пацова соја Wistar, који су пет месеци били излагани деловању ЕМП, фреквенције 50 Hz и јачине 500 μ T одговарајућом контролном групом животиња, могу се извести следећи закључци:

1. Алфа ћелије су показале највеће од свих врста ћелија и значајно увећање волуменске густине код зрачене групе у односу на контролну групу животиња.
2. Код експерименталних животиња које су зрачене, алфа ћелије су показале и повећање броја и површина ћелија у односу на контролну групу животиња.
3. Налази рада указују на повећану активност алфа ћелија у синтези излучивању глукагона код зрачене групе у односу на контролну групу.
4. Имунореакција на глукагон је била јача у алфа ћелијама великих а још јаче у малим острвацама зрачених животиња у односу на контролу.
5. Под дејством електромагнетних поља дошло је до повећања односа алфа и бета ћелија у зраченој групи животиња у односу на контролну групу.
6. Под дејством електромагнетних поља дошло је до повећања односа алфа и бета ћелија у зраченој групи животиња у односу на контролну групу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Andren, A.S., C. Dervenis: *Pancreatic Pseudocysts in the 21st Century*. JOP. J Pancreas 2004; 5(1):8-24, 2004.
2. Banarer, S., V. P. McGregor, P. E. Cryer: Intraislet hyperinsulinemia prevents the glucagon response to hypoglycemia despite an intraislet autonomic response. *Diabetes*, 51: 958-965. 2002.
3. Belusov, D., O. E. Kolesova: **Magnetometria and biomagnetizam in alteration of biological parameters**. Moskva, Science, 1986.
4. Gosset, J., J. Deviere, C. Matos: Magnetic Resonance Imaging of Acute pancreatitis, *JOP. J. Pancreas*, 5(1):48-50. 2004.
5. Greenbaum, C. J., P. J. Havel, G. J. Jr. Tabor sky, L. J. Klaff: Intra-islet insulin permits glucose to directly suppress pancreatic A cell function. *J. Clin. Invest.*, 88: 767-773. 1991.
6. Graham, C., M. R. Cook, M. Gibertini, D. W. Riffle, M. M. Ger kovich: EMF effects on melatonin, hormones and immunity in men. **Eighteenth Annual Meeting og BEMS, Victoria. Abstract Book**, p. 3. 1996.
7. Cejvan, K., D. H. Coy., S. Efendić: Intra- islet somatostatin regulates glucagons release via type 2 somatostatin receptors in rats. *Diabetes*, 52: 1176-1181. 2003.
8. Franklin, I., J. Gromada, A. Gjinovci, S. Theander, C. B. Wollheim: β -cells secretory products activate α -cell ATP- dependent potassium chanel s to inhibit glucagon release. *Diabetes*, 54: 1808-1815. 2005.

9. Ishihara, H., P. Maechler, A. Gjinovci, P L. Herrera, C.B. Wollheim: Islet β -cells secretion determines glucagon secretion from the neighboring α -cells. *Nat. Cell Biol.*, 5: 330-335. 2003.
10. Kolesova, N. I., E. I. Vološina, V. N. Avdienko: Effects electromagnetic fields on function insuline on pancreas. *Bioelectromagnetics*, 5: 37-38. 1991.
11. Lažetić, B.: **Osnovi magnetobiologije, Monografija: 66.** Medicinski fakultet Novi Sad, Novi Sad, 2004.
12. Laitl-Kobierska, A., G. Cieslar, A. Sieron, H. Grzбек: Influence of alternating extremely low frequency ELF electromagnetic fields on structure and function of pancreas in rats. *Bioelectromagnetics*, 23(1): 49-58, 2002.
13. Loweth, A.C., B. Hosker: **The regulation of apoptosis and beta cell destruction in type 1 diabetes mellitus, Control of Apoptosis.** London, 2004.
14. Matavulj, M., V. Rajković, I. Grahek: Extremely low frequency electromagnetic field as health risk factor. **Environmental protection of urban and suburban settlements Novi Sad**, pp. 171-176. 2001.
15. Orci, L., F. Malaisse-Lagae, M. Amherdt, M. Ravazzola, A. Weisswange, R. Dobbs, A. Perrelet, R. Unger: Cell contact in human islets of Langerhans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 41: 841-844, 1975a.
16. Orci, L., F. Malaisse-Lagae, M. Ravazzola, D. Rouiller, A. E. Renold, A. Perrelet, R. Unger: A morphological basis for intercellular communication between α - and β -cells in the endocrine pancreas. *J. Clin. Invest.*, 56: 1066-1070. 1975b.
17. Ravier, M. A., G.A. Rutter: Glucose or insulin, but not zinc ions, inhibit glucagons secretion from mouse pancreatic α -cells. *Diabetes*, 54: 1789-1797. 2005.
18. Rajković, V., M. Matavulj, D. Gledić, B. Lažetić: Evaluation of rat thyroid gland morphophysiological status after three months exposure to 50 Hz electromagnetic field, *Tissue & Cell*, 35: 223-231. 2003.
19. Takahashi, R., H. Ishihara, A. Tamura, S. Yamaguchi, T. Yamada, D. Takei, H. Katagiri, H. Endou, Y. Oka: Cell type-specific activation of metabolism reveals that β -cells secretion suppresses glucagon release from α -cell in rat pancreatic islets. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 290: E308-E316. 2006.
20. Varagić, J., V. Koko, V. Todorović, V. Lačković, G. Adanja-Grujić: Difuzni endokrini sistem gastrointestinalnog trakta. *Arch. Gastroenterohepatol*, 11: 151-156, 1992.
21. Weir, G.C., S. Bonner-Weir, J. L. Leahy: Islet mass and function in diabetes and transplantation. *Diabetes*, 39:401-405. 1990.
22. Wendt, A., B. Birnir, K. Buschard, J. Gromada, A. Salehi, S. Sewing, P. Rorsman, M. Braun: Glucose inhibition of glucagons secretion from rat α -cells is mediated by GABA released from neighboring β -cells. *Diabetes*, 53: 1038-1045. 2004.
23. Yamaguchi, N., Y. Fukushima: *PACAP enhances stimulation- induced norepi- nephrine release in canine pancreas in vivo.* *Can J. Physiol Pharmacol*, 76: 788-797. 2001.
24. Yoon, K. H., S. H. Ko, J. H. Cho, J. M. Lee, Y. B. Ahn, K. H. Song, S. J. Yoo, M. I. Kang, B. Y. Cha, K. W. Lee, H. Y. Son, S. K. Kang, H. S. Kim, I. K. Lee, S. Bonner-Weir: Selective β -cell loss and α -cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J. Clin. Endocrin. Metabol.*, 88: 23000-2308. 2003.

Примљено: 13.5.2010.

Одобрено: 19.5.2011.