

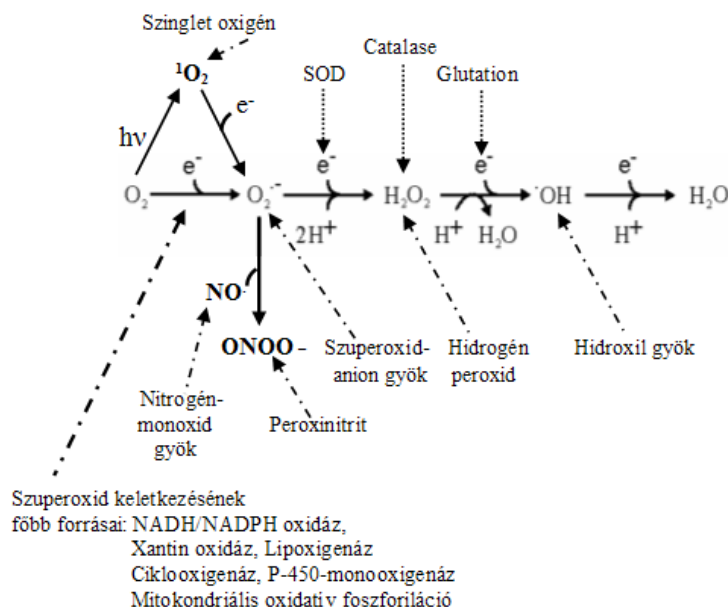
# Szabadgyökök, mint szignál molekulák és a mágneses terápia

Bókkon István

Aligha van olyan betegség, patobiokémiai mechanizmus, amelyet ne hoztak volna összefüggésbe a szabadgyökökkel. Az utóbbi két évtized kutatásai szerint a szabadgyökök keletkezésének esszenciális szerepe van a fiziológiás és patológias szignálfolyamatok részvételében és irányításában. Valószínű, hogy a szabadgyökök által okozott oxidatív lipid/fehérje/DNS károsító hatás már a hibás szabályozásoknak köszönhető. A fejezet a sejtek redoxfolyamatait, mint a nem ionizáló kis frekvenciájú gyenge elektromágneses terek (ELF EMF) illetve a statikus mágneses terek (DC MF) egyik valószínű célpontját is vázolja.

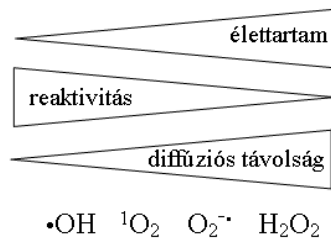
## Szabadgyökök

A szabadgyökök kémiaiailag nagyon reaktív atomok vagy molekulák, amelyek külső elektronhéjukon párosítatlan elektront tartalmaznak (mágneses momentummal rendelkeznek), párképződésre hajlamosak, a társ molekulától elektront vonnak el. Normál körülmények között az oxigénnek két módosulata létezik, a dioxid formá (O<sub>2</sub>) és az ózon, vagy trioxid (O<sub>3</sub>). A molekuláris dioxid legalacsonyabb energiájú állapota triplet (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>), amely két párosítatlan elektront tartalmazó gyök (paramágneses). A molekuláris oxigén kevésbé reaktív és nem annyira toxikus. A molekuláris oxigénből redukcióval (elektronfelvétel) képződő szabad oxigén gyökök és reaktív származékok azonban már nagyon reakció képesek [1] (1. ábra). (megjegyzés: egyes reaktív származék nem szabadgyökök, például a gerjesztett szinglet oxigén, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a peroxinitrit stb., de ezek is erősen reaktív molekulák, valamint szabadgyök-prekurzorok).



1. ábra Fontosabb reaktív származékok

A szabadgyökök átlagos élettartama  $10^{-9} - 10^{-6}$  s, bár vannak jóval hosszabb életidejű reaktív származékok is pl.: hidrogén peroxid  $H_2O_2$ , nitrogén monoxid NO, peroxinitrit  $ONOO^-$ , egyes reaktív lipid származékok stb. A szabadgyökök átlagos élettartama számos paramétertől függ: pH, hőmérséklet, oxigén nyomás, más szabadgyökök jelenléte, különböző biomolekulák elektromos és geometriai tulajdonságai, antioxidánsok jelenléte stb. A szabadgyökök élettartama fiziológias körülmények között a szövetekben, sejtekben és a sejtek körül, ahol az oxigén koncentráció  $\approx 10-25 \mu M$ , sokkal hosszabb lehet, mint in vitro kísérleteknél, ahol a levegő oxigén telítettsége esetén az oxigén koncentráció  $\approx 220 \mu M$  [2]. In vivo esetben a reaktív származékok életideje 1-2 nagyságrenddel nagyobb lehet, mint in vitro, ez lehetővé teszi, hogy egyes reaktív származékok nagyobb távolságú jelként is működjenek a sejtekben és a sejtek között (2. ábra).

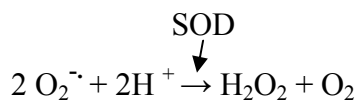


**2. ábra** A reaktív oxigén származékok élettartamának, reaktivitásának és diffúziós távolságának összehasonlítása

## Reaktív oxigén (ROS) és nitrogén (RNS) származékok keletkezése, enzimatis és nem enzimatis szabályozásuk

A triplet ( $^3O_2$ ) alapállapotú molekuláris oxigén egy vegyértékű redukciójával kapjuk a szuperoxid anion gyököt (röviden szuperoxid)  $O_2^{\cdot-}$ . Szuperoxid gyökök keletkezhetnek enzimatisan a NADH/NADPH oxidáz, xantinoxidáz, lipoxigenáz, ciklooxigennáz, P-450 monooxigenáz stb. működése során vagy nem enzimatisan például a mitokondriális oxidatív foszforiláció révén [1,3].

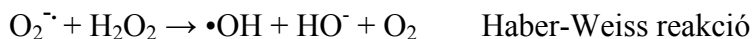
A mitokondriumokban és a mikroszómákban állandóan keletkező szuperoxid semlegesítését a szuperoxid-dizmutázok (SOD) végzik. Az ősbibb típusú Mn-tartalmú szuperoxid-dizmutáz a prokariótákban és az eukarióták mitokondriumában található. Az eukarióta sejtek citoszoljában a Cu-Zn szuperoxid-dizmutáz mutatható ki.



$Fe^{2+}$  ionok (vagy  $Cu^{2+}$ ) jelenlétében  $H_2O_2$ -ből rendkívül agresszív,  $10^{-9}$  s reakciósebességű  $\bullet OH$  hidroxilgyökök keletkeznek, amelyek ellen közvetlen enzimatis védekezés nincs.  $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH$  Fenton reakció

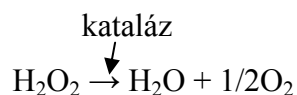
Ez olyan ciklusreakció, ahol az oxidált ionok redukáló formájukat a szuperoxiddal ( $O_2^{\cdot-}$ ) való reakció útján visszanyerik.  $Fe^{3+} + O_2^{\cdot-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$

Hidroxilgyökök a szuperoxid és  $H_2O_2$  direkt reakciójából is keletkezhetnek.

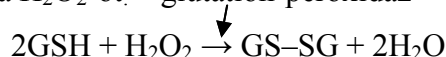


A szervezet úgy védekezik a hidroxilgyökök  $\cdot OH$  ellen, hogy prekursorát, a hidrogén-peroxidot  $H_2O_2$  a kataláz vagy a glutation-peroxidázzal semlegesíti, ezáltal csökkenti a  $\cdot OH$  gyökök képződését.

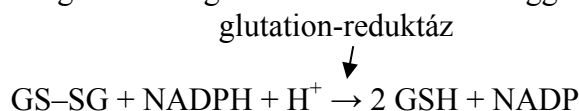
A mikroszómákban, a sejtmagban és a peroxiszómákban a (vas) hemtartalmú kataláz enzim végzi a  $H_2O_2$  semlegesítését:



A citoszolban és a mitokondrium mátrixban a szelénfüggő tetramer szerkezetű glutation-peroxidázok semlegesítik a  $H_2O_2$ -ot:

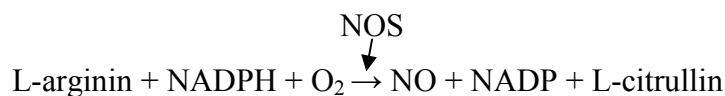


Az oxidált glutation regenerálását a NADPH-függő glutation-reduktáz végzi:



A glutation-peroxidázok másik csoportját alkotják a dimer szerkezetű glutation-S-transzferázok (GST), amelyek csupán szerves hidroperoxidokkal reagálnak. GST-nek fontos szerepe van a mérgező anyagokat eltávolításában. Kinetikájukra jellemző, hogy a katalizált reakció sebessége sokkal kisebb, mint a szelénfüggő enzimeké.

A NO (nitrogén-oxid gyök  $NO\cdot$ ) a magasabb szintű organizmusokban az L-arginin oxidációjával képződik, amit a nitrogén-oxid szintáz (NOS) katalizál.



A  $NO\cdot$  a mikrokoznyezettől függően különféle reaktív nitrogén származékokká alakulhat át, mint a nitrozónium kation ( $NO^+$ ), nitroxil anion ( $NO^-$ ) vagy peroxinitrit ( $ONOO^-$ ). A NOS enzimnek háromféle izoformája létezik [4,5]. A neuronális nNOS (centrális és perifériális neuronokban) és az endoteliális eNOS (főként az endotél sejtekben),

amelyek folyamatosan kifejeződő kalcium és kalmodulin függő enzimek. Az indukálható iNOS az immunsejtekben és számos egyéb sejttypusban fejeződik ki. Az iNOS transzkripció aktivációját okozhatják endogén mediátorok (kemokinek, citokinek stb.) vagy exogén faktorok (bakteriális toxinok, vírusfertőzések, allergének, ózon, hipoxia, tumorok stb.). Az említett

Gyakran a különböző reaktív származékok együtt léteznek a reaktív környezetben, ami megnehezíti az adott biológiai hatásért felelős származék azonosítását.

Amint láttuk, az elsődleges antioxidáns védelmet enzimek látják el (szuperoxid-dizmutáz, kataláz, glutation-peroxidáz, glutation-reduktáz stb.). Az enzimatis szabályozás mellett nagyszámú nem enzimatis endogén és exogén (táplálék útján juthatunk hozzá) antioxidáns is létezik [3,6,7].

Endogén nem enzimatis antioxidánsok például a redukált glutation tripeptid (GHS), a mitokondriális koenzim-Q, a liponsav stb. Az extracelluláris térben a  $\text{Cu}^{2+}$  kötő cöruoplazmin, a  $\text{Fe}^{2+}$  kötő transferrin, az albumin, a piruvát, a purinanyagcsere lebontási végterméke a húgysav, a hemoglobin lebontásából a bilirubinnak stb. van jelentős antioxidáns hatása.

Exogén antioxidánsok a vitaminok (C, E, A), az A-vitamin provitaminja, a bétakarotin, néhány aminosav például az erős kéntartalmú antioxidáns a metionin, flavonoidok, fenolsavak és származékaik. Az ásványi anyagok és nyomelemek (pl. Mg, Se, Zn, Mn, Cu) maguk nem antioxidánsok, ám nélkülözhetetlenek az antioxidáns enzimek működéséhez.

### **Mitokondrium és a sejtek redox állapota**

A mitokondriumoknak központi szerepe van a sejt redox állapotának és a különböző szignálutjainak integrálásában, az apoptózistól kezdve, a sejtosztódáson át a sejtek  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázisának fenntartásáig. A mitokondrium elsődlegesen szuperoxidot ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) termel a légzési lánc komplex I és komplex III egysége által [8]. A keletkezett szuperoxid spontán dizmutációval vagy SOD enzim által hidrogén peroxiddá alakul. A másik jelentős mitokondriális reaktív származék forrása az NO-ot termelő (feszültség függő és indukálható) mitokondriális nitrogén-oxid szintáz (mtNOS). Az NO reverzibilisen képes szabályozni az ATP termelést és a mitokondrium működését a légzési láncban lévő citokróm oxidáz gátlása révén.

A mitokondriális ROS termelésben a legfontosabb feltételezett molekulák/faktorok a megnövekedett  $\Delta\psi$  (mitokondriális belső membrán potenciál), a  $\text{Ca}^{2+}$ , az NO, az oxigén tenzió

és a tápanyag elérhetőség. Természetesen, az említett főbb tényezők kölcsönösen szabályozzák egymást.

Az oxigén több mint 90%-át a mitokondriumok légzési lánc (terminális oxidáció) használja fel, ahol az oxigén, mint végső elektron akceptor működik az aerob glükóz lebontás során, miközben ATP képződik. A sejt mitokondriális hálózatának központi szerepe van az oxigén tenzió folyamatos érzékelésében és szabályozásában. Hipoxiás körülmények között, a megnövekedett mitokondriális ROS nélkülözhetetlen a hipoxia-indukálható transzkripciós faktor (HIF-1) aktiválásához [9].

A HIF-1 heterodimer komplex két protein alegységből áll. A HIF-1 $\beta$ -ből, amely folyamatosan kifejeződik, és a HIF-1 $\alpha$ -ból, amely folyamatosan szintetizálódik és degradálódik. Normoxiás körülmények között, a molekuláris oxigén felhasználásával, a HIF-1 $\alpha$  hidroxilálódik a prolin hidroxiláz által. A tumor szupresszor von Hippel-Lindau protein specifikusan kötődik a hidroxilált HIF-1 $\alpha$ -hez elősegítve a HIF-1 $\alpha$  ubiquitinációját és proteozómás degradációját. Hipoxia esetén a HIF-1 $\alpha$  nem hidroxilálódik és így elkerüli a proteozómális lebontást. A stabilizálódott HIF-1 $\alpha$  a magba kerül, ahol kapcsolódik a HIF-1 $\beta$ -hoz és létrejön a HIF-1 heterodimer komplex, amely számos gén transzkripciós aktivitását megnöveli, létrehozva az adaptív választ a csökkent oxigén tartalmú környezethez. A részletesebb mechanizmus, amint a hipoxiás ROS szignál részt vesz a vázolt folyamatokban nem ismert, bár valószínű, hogy a transzkripciós faktorok és protein kinázok/foszfatazok reverzibilis oxidációjú módosítása által szabályozott intracelluláris szignálutaknak fontos szerepe van ebben [10].

### **Szabadgyökök és reaktív származékaik, mint esszenciális szignálok a sejtekben**

Amint a bevezetésben már említettük, az utóbbi két évtized kutatásai rávilágítottak arra, hogy a reaktív oxigén származékok (ROS) és a reaktív nitrogén származékok (RNS) fontos szignálrendszer az intra- és intercelluláris kommunikációs folyamatokban és a redox-homeosztázis fenntartásában [1,6]. Ironikusnak tűnhet, hogy a ROS és RNS által szabályozott folyamatok védik a sejteket a ROS és RNS indukált oxidatív stressztől, helyreállítva a redox-homeosztázist. Ámbár, ha belegondolunk, ez teljesen ésszerű az élő, főként aerob rendszerek szempontjából. Az élő sejtek, mint elektromos rendszerek, folyamatosan létrehoznak és fenntartanak egy extrém komplex térbeli elektromos, azaz redox mintázatot. Ennek a térbeli redox mintázatnak egyik leghatékonyabb és gyors fiziológiás (és patológiás) szabályozását a reaktív oxigén és nitrogén származékok végzik. Az aerob sejtekben az összehangolt mitokondriális hálózat fogyasztja el a felhasznált oxigén 90 %-át, biztosítva az ATP energiát a

sejtfolyamatok számára. Ez a dinamikus mitokondriális energia és redox hálózat pillanatról pillanatra változik az intra- és extracelluláris jelek függvényében. Amikor a sejt pillanatnyi energiaigényéhez képest kevés az oxigén (csökkent oxigén ellátás vagy megnövekedett energia igény) a sejtet átszövő és összehangolt mitokondriális hálózat hipoxiás redox szignált bocsát ki a megnövekedett ROS kieresztéssel. A ROS kibocsátott növekedése, mint egy másodlagos messenger rendszer, egy összehangolt komplex választ indukál a redox-szenzitív faktorokkal és molekulákkal.

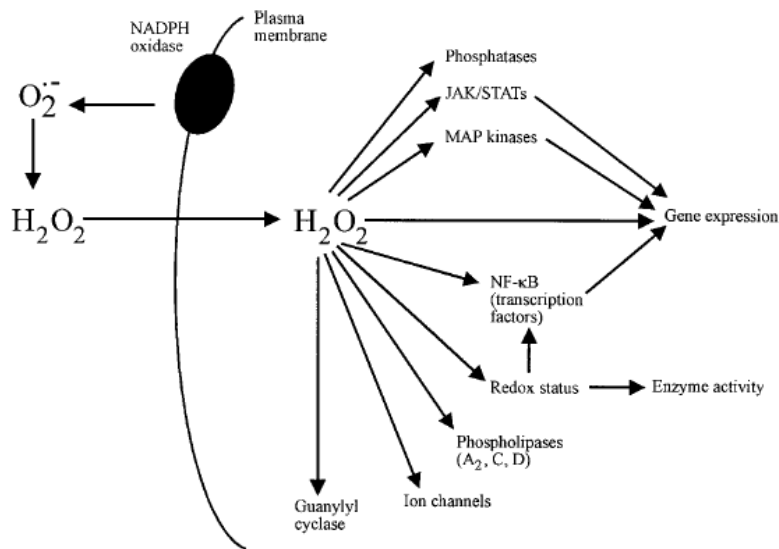
Ez a ROS/RNS által indukált és szabályozott válasz képes befolyásolni a gén expressziót, az apoptózist, a sejt növekedést, a sejt adhéziót, a kemotaxist, a protein–protein interakciókat és enzimatikus funkciókat, az angiogenezist, immunfolyamatokat, a gyulladásozó folyamatokat, a  $Ca^{2+}$  homeosztázist, az ion csatornákat és számos egyéb folyamatot [1,6,11,12].

A reaktív oxigén származékok keletkezése sejtspecifikus hatást mutat. Például az IL-1béta stimuláció hatására a limfoid sejtek az 5-lipoxigenáz révén ROS-t generálnak, ami szükséges az I $\kappa$ B-alfa (az I $\kappa$ B alfa és béta proteinek az NF  $\kappa$ B aktivitásának fő szabályozói) degradációjához és a NF  $\kappa$ B (nukleáris faktor, az oxidatív stresszre adott sejtszintű válasz egyik legfontosabb transzkripciós faktora) aktiválásához [13]. Ugyanakkor, a monocita sejteknél, az IL-1béta stimuláció indukálta ROS szükséges a NF  $\kappa$ B aktiválásához, de a ROS forrása ebben az esetben a NADPH oxidáz. Végül, az epiteliális sejtek az IL-1béta stimuláció hatására nem generálnak ROS-t és így aktiválják a NF  $\kappa$ B-át.

### **NADPH oxidáz működése, mint kitűnő példa a ROS funkcionális szerepére**

A NADPH oxidázt a neutrofil sejtekben fedezték fel, amely a mikrobák fagocitózisa közben egy nem specifikus védelmet képvisel (oxidatív killing más néven respiratory burst) a szuperoxid  $O_2^-$  termelés által. Később a legtöbb nem fagocita sejtben is azonosították a fagocitákban felfedezett NADPH oxidáz további homológjait [14]. A nem fagocita sejt típusú NADPH oxidáz strukturálisan rokon a fagocita sejtek NADPH oxidázával, bár funkcionálisan eltér azoktól. A főbb különbségek az alacsony szintű és folyamatos szuperoxid termelés, valamint a termelt ROS alapvetően intracelluláris (szemben a fagocitózissal, ahol szuperoxid termelés az extracelluláris fagoszóma kompartmentekben történik). A nem fagocita sejtek NADPH oxidázának további tulajdonsága, hogy az enzim saját maga által termelt ROS-al szabályozható (feedback mechanizmus) [15].

Különböző citokinek (Ang II, thrombin, PDGF, TNF- $\alpha$ ), hormonok, mechanikus stressz stb. hatására a NADPH oxidáz megnöveli az intracelluláris tér felé a szuperoxid és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelést, amely aktiválja az intracelluláris szignálmolekulákat (protein tirozin kinázok, szerin/treonin kinázok, foszfolipázok) és a Ca<sup>2+</sup>-függő utakat. A NADPH oxidáz működése kitűnő példa a fiziológiás körülmények között zajló funkcionális és esszenciális ROS termelésére [16] (3. Ábra). Természetesen patológiás esetben a megnövekedett NADPH oxidáz által termelt ROS már oxidatív stressz forrásként is működik.



**3. Ábra** NADPH oxidáz a ROS közvetítette szignálfolyamatokban. **Forrás:** Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical Society Transactions* 2001 29: 345-350.

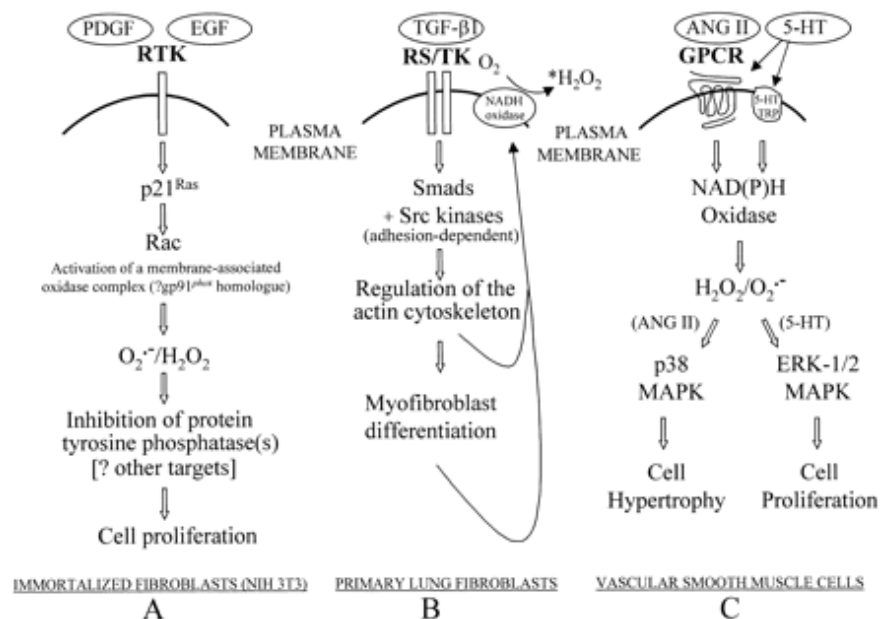
### ROS szignálok és a proteinek

Azt, hogy evolúciós szempontból mennyire ésszerű a ROS/RNS szignál rendszer a proteinek és aminosavak kapcsán érzékelhetjük. Kevésbé hangsúlyozott, hogy a klasszikus antioxidánsok mellett a szabad aminosavak és proteinek is rendelkeznek kis hatékonyságú ROS befogó képességgel [1]. Bár a szabad aminosavak és proteinek ROS befogó képessége kicsi, celluláris koncentrációjuk (>0.1 M) nagy, így a szabad aminosavak is képviselnek egy jelentős ROS védekező kapacitást. A reaktív származékok oxidáció révén módosíthatják a proteinek funkcióját, kémiai fragmentációját, megnövelik a proteolitikus támadásokkal szembeni érzékenységüket. A különböző proteinek oxidatív érzékenysége nagymértékben eltér. A natív egészséges proteinek jóval kevésbé érzékenyek az oxidációra, mint a rosszul feltekeredett szerkezetűek [1]. Ugyanakkor a hibás szerkezetű proteineknek nagyobb a ROS befogó képessége szemben az egészségesekkel. Más szóval, a proteinek oxidációja és a proteolitikus degradációja szintén rendelkezik egy nettó ROS befogó kapacitással. Röviden: a

hibás szerkezetű proteinek a redox folyamatok által is fokozzák saját maguk degradációját és ezzel együtt egy ROS elleni megnövelt védelmet.

Amíg a „klasszikus” szignálutakon (tirozin, treonin, szerin foszforilálása/defoszforilálása) már számos enzimet és molekuláris célpontot ismerünk, addig a redox szignál folyamatok esetén a kulcsszereplők és mechanizmusok még lényegében nem ismertek. A (de)foszforilációs szignálutakon, ahol az elsődleges átalakítók nagyméretű protein kinázok vagy foszfatázok, a redox szignálrendszerben kis redox aktív molekulák dolgoznak. Szemben a (de)foszforilációs szignálutakkal, még nem tudjuk, hogy igaz-e, hogy a ROS/RNS proteinmódosítások mindegyike szabályozó funkciót tölt-e be. A kísérletek szerint a klasszikus (de)foszforilációs szignálutak és a ROS/RNS redox szignálrendszer között együttműködés van (4. ábra) [10]. Számos esetben a klasszikus receptorok ligálása reaktív oxigén származékok képződését indukálja. A képződött ROS általában serkenti a klasszikus kinázok működését és gátolja a klasszikus foszfatázokat.

Egy érdekes analógia fedezhető fel a klasszikus (de)foszforilációs szignálutak és a ROS/RNS redox szignálrendszer között. A triptofán, a tirozin, a hisztidin és a cisztein különösen érzékeny a reaktív származékokra. Cisztein esetében a redukáló utak (glutaredoxin, tiredoxin) és a kapcsolódó enzimek képesek megfordítani a reaktív származék függő tiolok oxidatív módosítását. Vagyis, az enzimátikus folyamatok a proteinekben lévő aminosavak oxidatív módosításával nem csak hogy regulálhatóak, de a folyamat reverzibilis is lehet [10].



4. Ábra A klasszikus (de)foszforilációs szignálutak és a ROS/redox szignálrendszer közötti feltételezett kapcsolatok. **Forrás:** Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000 279: L1005-L1028.

## Oxidált lipidek, mint szignálok

A lipidperoxidáció szabályozott körülmények között a foszfolipid-turnover része. Oxidált foszfolipidek enzimatikusan és nem enzimatikusan is keletkezhetnek. A foszfolipázok hatására a membrán foszfolipidekből kiengedett telítetlen (PUFA: többszörösen telítetlen zsírsavak pl.: arachidonsav AA, dokozahexaénsav DHA) zsírsavak szubsztrátként szolgálhatnak a ciklooxygenázok (COX), a lipoxigenázok (LOX) és a citokróm P450 monooxygenázok (CYP) számára, amelyek enzimatikusan oxidált biológiailag aktív zsírsavakat termelnek [17,18]. A legtöbb biológiailag aktív termék az arachidonsavból keletkezik (arachidonsav kaszkád → prosztanglandinok, leukotriének, tromboxánok). Az enzimatikusan keletkezett oxidált lipidek stabilak, a sejtől ki diffundálhatnak, és számos ismert autokrin és parakrin szabályozásban vehetnek részt.

A nem enzimátikus, azaz autokatalitikus szabadgyökös lipidoxidáció strukturális szétesést okoz főként a membrán foszfolipidekben és a foszfolipidekből kiengedett telítetlen zsírsavakban, mint az arachidonsav és a dokozahexaénsav (5. ábra) [17]. A keletkező instabil AA- és DHA-gyökök gyorsan izomerizálódnak és kettőskötéseik újrendeződnek. A keletkező konjugált diének további oxidáció hatására lipid hidroperoxidokká alakulnak át. A lipid hidroperoxidok tovább oxidálódnak különféle alkén, aldehid, furán stb. produktumokká. Az újabb kutatások alapján, a többszörösen telítetlen zsírsavak nem enzimatikusan oxidált származékai gátolják a tumoros sejtek proliferációját és elősegítik az apoptózist [17].

Az emlősökben található lipoxigenázok (LOX) katalizálják a membrán foszfolipidek és a koleszterol észterek, valamint a plazma lipoproteinek (low-density lipoprotein LDL, high-density lipoprotein HDL) enzimátikus lipidperoxidációját közvetlen dioxigenáció által. Maguk a lipoxigenázok fontos forrásai a szabadgyök indukált nem enzimátikus lipidperoxidációnak és más oxidatív folyamatoknak. A lipoxigenáz működése révén létrejött metabolitok is aktiválhatják a ROS képzést, ugyanakkor a lipoxigenázok maguk is aktiválhatók a redox folyamatokkal.

A kutatások szerint, az eddig csak kizárólagosan károsnak tartott lipidperoxidációs (például a lipid peroxidációs végtermékek: erős elektrofil malonaldehid MDA vagy 4-hydroxynonenal 4-HNE) termékek is rendelkeznek sejtprotektív hatással [18]. A lipidperoxidációból származó aldehidek csökkentik a tumornövekedést és gátolják a sejtproliferációt. Az  $\alpha,\beta$ -telítetlen 4-HNE (4-Hydroxynonenal) egyik fő végterméke a lipidperoxidációnak. A 4-HNE három reaktív csoportot tartalmaz: egy aldehidet, egy kettőskötést, és egy hidroxil csoportot. A szubletális szintű 4-HNE citoprotektív hatással bír,



szükséges a normál neurális funkcióhoz, mint a hippocampális long term potentiation LTP és a hippocampus-függő memóriaképzés [23]. A kortikális asztrocitákban a szabadgyökök képesek szabályozni a gerjesztő glutamát neurotranszmitterek felvételét a proteinek szulfhidril csoportjainak hosszan fennmaradó oxidációjával [24]. NO egy szabadgyök molekula, amely szabadon diffundálhat a sejtmembránon át, és mint neurotranszmitter, neuromodulátor és szignálmolekula működhet. Az NO képes szabályozni a neurotranszmitter kibocsátást és ezúton a szinaptikus aktivitást, valamint részt vesz a szinaptikus plaszticitás jelenségeiben [25,26,27]. A hidrogén peroxidnak  $H_2O_2$  ugyancsak fontos szerepe van a szinaptikus plaszticitásban [28]. A  $H_2O_2$  az ATP szenzitív  $K^+$  csatornák nyitásának útján képes szabályozni a középagy dopamin neuronjainak gerjeszthetőségét [29]. A hipotalamusz mitokondriumi által termelt ROS képes iniciálni a táplálékfelvétel szükségességét [30]. A ROS mint intracelluláris messenger működik a mitokondriumok és a citoszol között válaszul a tápanyag beáramlására.

### **Neurotranszmitterek, mint antioxidánsok és szabadgyökfogók**

A tirozinból szintetizált katekolaminok, mint a dopamin, noradrenalin és az adrenalin, valamint a triptofánból képződő szerotonin, ismert klasszikus neurotranszmitterek a központi és perifériális idegrendszerben. Ezek a neurotranszmitterek, illetve a metabolikus származékaik a feltételektől függően neurotoxikus vagy neuroprotektív szerepet tölthetnek be. Szemben a katekolaminok neurotoxikus hatásával, számos kísérlet igazolta a katekolaminok és a szerotonin neuroprotektív szerepét. A katekolaminok és a triptofán származékok, köztük a szerotonin és melatonin, szabadgyökfogó és neuroprotektív képességgel rendelkeznek [31-35]. Nagyobb dózisú katekolamin apoptózist indukál, ugyanakkor, mint antioxidáns megelőzi a szabadgyökök közvetítette neurotoxicitást [36]. A katekol szerkezet fontos a katekolaminok antioxidatív működéséhez. A sejtek redox állapota nagymértékben összefügg a vas és a réz szerepével és ezek szabályozásával. A katekolaminok komplex képzés révén kelátot képezhetnek a vassal, a rézzel és egyéb fémekkel, ezáltal képesek gátolni a szabadgyök képződést és szabályozni a redoxpotenciált [34,37]. A dopamin és ennek ötféle receptora diverz szerepet játszik a központi idegrendszerben. A  $D_1$  és  $D_5$  dopamin receptorok aktiválása képes antioxidáns választ indukálni [38,39]. A  $D_5$  antioxidáns válasza, pedig a NADPH oxidáz aktivitásának gátlása révén valósul meg.

A szerotonin és prekursorai erős antioxidáns tulajdonságúak, amelyek csillapítják a szabadgyök indukált neuronális halált anélkül, hogy a szerotonin receptorokkal kapcsolatba kerülnének [40,41]. Kolinerg neuronban a noradrenalin csökkenti a kaszpáz aktivációt és a

ROS képződést, valamint gátolja a lipidperoxidációt [42]. Röviden: a dopamin, a noradrenalin, az adrenalin és a szerotonin működhetnek, mint antioxidánsok és szabadgyökfogók, bár jelenleg ismeretlen, hogy milyen folyamatok állnak annak hátterében, hogy ugyanazon neurotranszmitterek ellentétes hatást produkálnak a sejtek túlélése szempontjából.

### **Mágneses terápia és a sejtek redox állapota**

A Földön az élő organizmusok a természetes geomágneses tér ( $\approx 20\text{--}70 \mu\text{T}$ ) sugárzásában fejlődnek, léteznek. Ez a természetes geomágneses tér szükséges az élő rendszerek működéséhez és térbeli tájékozódásához. Ugyanakkor, a geomágneses viharoknak (geomágneses fluktuációk) jelentős negatív hatása lehet a normál fiziológiás folyamatokra [43,44]. A XX. században a természetes geomágneses terek mellett megjelent és egyre nagyobb mértékű lett az élő rendszerekre károsan ható mesterséges elektromágneses (elektromos háztartási berendezések, mikrohullámú rendszerek, elektromos vezetékek stb.) környezetszennyezés. Ezzel egy időben megnőtt az érdeklődés a gyenge kisfrekvenciájú elektromágneses és a statikus mágneses terek lehetséges terápiás alkalmazására, mint egy nem invazív módszer a különböző betegségek kezelésére.

A mesterséges elektromágneses és mágneses terek káros vagy terápiás hatásával kapcsolatos tudományos irodalom hatalmas ugyanakkor az eredmények ellentmondásosak és a kutatások eléggé heterogének. A vizsgált statikus vagy változó mágneses terek intenzitása  $10^{-7}$  Tesla értéktől 10 Tesláig, és a végzett kísérletek az in vitro sejt kultúráktól az in vi vivo humán kísérletekig terjednek [45]. Továbbá, a kísérleteknél és a terápiáknál az elektromágneses vagy statikus mágneses terek legkülönbözőbb (pl. az elektromágneses és statikus mágneses terek együttes) kombinációját, modulációját használják, ami tovább nehezíti a reprodukálható eredmény elérését.

Bár számos elképzelés alakult ki arról, hogy miképpen fejti ki hatását a gyenge külső mágneses sugárzás a sejtek biokémiai folyamatain, jelenleg az élő sejtek működésében betöltött mágnesesség/elektromágnesesség szerepéről és hatásmechanizmusáról keveset tudunk. Néhány hatás modell: Eddy elektromos áramokkal, klasszikus és kvantum oszcillációkkal, ciklotron rezonancia útján, interferencia révén a kötött ionok és elektronok kvantum állapotain, koherens kvantumgerjesztéssel, magnetoszenzitív szabadgyökökkel, biomágnesekkel stb. [46].

A nem ionizáló extrém alacsony frekvenciájú gyenge elektromágneses terek  $< 300\text{Hz}$  (ELF EMF), illetve a statikus mágneses terek (DC MF) energiája nem elég erős ahhoz, hogy

felszakítsa a kémiai kötéseket. Ezért a külső mágneses terek a sejtregulációs folyamatokon fejtik ki hatásukat.

Egyre növekszik azon adatok és kísérletek száma, amely jelzi, hogy az ELF EMF és DC MF hatása elsősorban a sejtek redox állapotán keresztül hat [47-50]. Ugyanakkor, a sejtek redox állapota alapvetően a reaktív oxigén és nitrogén származékoktól (és az antioxidánsok szabályozásától) függ.

A  $\text{Ca}^{2+}$  alapvető szerepet játszik a szabadgyökök képzésének szabályozásában. Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  emelkedés aktiválja a ROS képző enzimeket és növeli a mitokondriális szabadgyökképződést. Másrészt, a ROS is képes az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint növelésére [51,52]. A  $\text{H}_2\text{O}_2$  gyorsítja a feszültségfüggő kalcium csatornák nyitását. A 1,4,5-inozitol-trifoszfát-receptorok redox folyamatokkal szabályozhatók [12]. A  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-ázok és  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  kicserélők intracelluláris redox folyamatokkal modulálhatók. E mellett, a  $\text{Ca}^{2+}$  aktiválhatja az antioxidáns enzimeket is, vagyis a  $\text{Ca}^{2+}$  és a ROS szorosan együttműködő, egymást szabályozó biokémiai szignálrendszerek.

A statikus és a pulzáló elektromágneses terek azonnal és reverzibilisen megnövelik az extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlást, amely megnöveli a ROS képző folyamatokat, és a redox-szenzitív szignálutakon keresztül hat. A kutatások szerint, az elektromágneses és mágneses sugárzás megnövelheti a szabadgyökök élettartamát [53]. Az elektromágneses és mágneses sugárzások  $\text{Ca}^{2+}$  és ROS mechanizmusokon keresztül érvényesülő hatásának elképzelését támogatja az is, hogy az exogén mágneses sugárzások jórészt a membránok mentén fejtik ki hatásukat [54-56]. Vagyis a különféle exogén (elektro)mágneses sugárzások hatásmechanizmusai a membránok (membrán csatornák, membránban lévő redox szenzitív enzimek és receptorok, a lipidek és a lipoproteinek lokális struktúrájára) által érvényesülhet (pl. Mágneses expozíció  $\rightarrow$  membrán NADPH oxidáz  $\rightarrow$  szuperoxide  $\text{O}_2^-$  képzés  $\rightarrow$   $\text{Ca}^{2+}$  csatornák és lipoxigenázok aktiválása  $\rightarrow$  arachidonsav kaszkád és peroxidált lipidek  $\rightarrow$  szignálok intracelluláris kiterjedése).

Amint fentebb láttuk, a sejteket sajátos redox és ROS/RNS mintázat jellemzi, valamint a reaktív oxigén származékok keletkezése sejtspecifikus hatást mutat [13]. Azaz, a különféle sejtek ugyanarra a fiziológiás szignál jelre vagy stressz faktorokra (fizikai, kémiai, biológia), eltérő ROS képző mintázattal válaszolnak. Ennek ismeretében nem csodálkozunk a mágneses expozíciós kísérleteknél tapasztalt ellentmondó eredményeken. Azaz, ugyanazon mágneses expozíciók eltérő redox és szignálutakat aktiválhat a különböző sejtekben [57]. Továbbá, ugyanazon sejten, eltérő időpontokban alkalmazott ugyanazon paraméterekkel rendelkező

mágneses expozíció is eltérő hatást indukálhat, mivel a sejtek redox állapota függ a cirkadián ritmustól [58,59].

Fontos megjegyezni, hogy az elektromágneses expozíció frekvencia specifikus hatást is gyakorolhat a sejtekre. Továbbá, az elektromágneses expozíciók esetén a frekvencia és amplitúdó mellett az alkalmazott hullámformának is döntő szerepe van.

A nem ionizáló extrém alacsony frekvenciájú gyenge elektromágneses és statikus mágneses terek nem mutagének. A genotoxikus hatás vagy az esetenként tapasztalt megnövekedett mutációs arány a mágneses expozíció szignálutakra gyakorolt hatásainak köszönhető (apoptózis gátlás, diszregulált DNS javító folyamatok stb.) [45,49].

A redox regulációs és membránfolyamatokkal megmagyarázható illetve kapcsolatba hozható a mágneses expozíciós kísérleteknél tapasztalt (bár sokszor ellentmondásos) számos hatás [45,49,59-64]:

- $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció növekedése,
- ROS indukció,
- antioxidáns szint változása,
- Hsp70 és egyéb hősokkfehérjék aktiválása, (hősokkfehérjék gátolhatják a szabadgyökképződést, védve a proteineket a destruktív hatástól),
- apoptózis elősegítése vagy gátlása,
- a redox-szenzitív NFkB transzkripciós faktor aktiválása,
- fagocitózis aktivitás növelése,
- melatonin ritmus befolyásolása,
- teratogén hatás,
- genotoxicitás és növekedet DNS törések (főként a hosszabb idejű mágneses expozíció a redox mechanizmusok révén perturbálja a DNS repair folyamatokat),
- MAPK (mitogén-aktivált protein kináz) szignál kaszkád aktiválása, foszfatidil-inozitol-3-kináz aktiválása,
- növekedett c-fos, c-jun, c-myc onkogének és protein kináz C géneszpresszió.

A mágneses terápiák alkalmazásakor az előnyös hatás tekintetében a sugárzási időnek kritikus a szerepe. Rövidebb idejű sugárzások, a redox folyamatok aktiválásán keresztül, potenciórozó hatásuk lehetnek az immunrendszerre és adott sejtfolyamatokra, bár a hosszabb idejű mesterséges mágneses sugárzások a sejtekre nézve káros redox egyensúly eltolódást és az ezzel járó szignálfolyamatok helytelen irányítását okozhatják. Továbbá, számolni kell azzal is, hogy a mesterséges mágneses sugárzások interferálhatnak a természetes geomágneses terekkel.

A nem ionizáló kis frekvenciájú gyenge elektromágneses terek (ELF EMF) illetve a statikus mágneses terek (DC MF) terápiákban leggyakrabban tapasztalt előnyei: gerinceredetű panaszok vagy az izomeredetű fájdalmak csökkenése, az idegek, izmok, inszalagok és

csontok gyulladásoz folyamatainak enyhülése, az izületi duzzadás, az artrózis, csonttörések gyógyulásának elősegítése, a sérült felületek vérellátásának javítása stb. [65-71].

## Irodalom

1. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* 2002 82: 47-95.
2. Inai Y, Takehara Y, Yabuki M, Sato EF, Akiyama J, Yasuda T, Inoue M, Horton AA, Utsumi K. Oxygen-dependent-regulation of Ehrlich ascites tumor cell respiration by nitric oxide. *Cell Struct Funct* 1996 21: 151-157.
3. Blázovics A, Fehér J. Oxidatív stressz és a máj. Fehér J, Lengyel G. *Hepatology 2001 Medicina Könyvkiadó Zrt.*
4. Moncada S, Palmer RMJ, and Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991 43: 109-142.
5. Vallance P, Leiper J. Blocking NO synthesis: how, where and why? *Nat Rev Drug Discov* 2002 1: 939-950.
6. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007 39: 44-84.
7. Németh E, Fehér J, Nagy V, Lengyel G, Fehér J. Antioxidánsok szerepe a prevencióban. *Orvosi Hetilap* 2006 13: 603-607.
8. Jezek P, Hlavatá L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* 2005 37: 2478-2503.
9. Schroedl C, McClintock DS, Budinger GR, Chandel NS. Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1alpha requires mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002 283: L922-L931.
10. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000 279: L1005-L1028.
11. Gordeeva AV, Zvyagilskaya RA, Labas YA. Cross-talk between reactive oxygen species and calcium in living cells. *Biochemistry (Mosc)*. 2003 68: 1077-1080.
12. Touyz RM. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 2005 7: 1302-1314.
13. Bonizzi G, Piette J, Merville MP, Bours V. Cell type-specific role for reactive oxygen species in nuclear factor-kappaB activation by interleukin-1. *Biochem Pharmacol* 2000 59: 7-11.
14. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007 87: 245-313.
15. Li JM, Shah AM. ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003 4(8 Suppl 3): S221-S226.
16. Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical Society Transactions* 2001 29: 345-350.
17. Siddiqui RA, Harvey K, Stillwell W. Anticancer properties of oxidation products of docosahexaenoic acid. *Chem Phys Lipids* 2008 153: 47-56.
18. Bochkov VN, Leitinger N. Anti-inflammatory properties of lipid oxidation products. *J Mol Med* 2003 81: 613-626.
19. Leonarduzzi G, Arkan MC, Bašaga H, Chiarpotto E, Sevanian A, Poli G. Lipid oxidation products in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 2000 28: 1370-1378.
20. Levenon AL, Landar A, Ramachandran A, Ceaser EK, Dickinson DA, Zanoni G, Morrow JD, Darley-Usmar VM. Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem J* 2004 378: 373-382.
21. Kishida KT, Klann E. Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal* 2007 9: 233-244.
22. Knapp LT, Klann E. Role of reactive oxygen species in hippocampal long-term potentiation: contributory or inhibitory? *J Neurosci Res* 2002 70: 1-7.
23. Tejada-Simon MV, Serrano F, Villasana LE, Kanterewicz BI, Wu GY, Quinn MT, Klann E. Synaptic localization of a functional NADPH oxidase in the mouse hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 2005 29: 97-106.
24. Volterra A, Trotti D, Tromba C, Floridi S, Racagni G. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J Neurosci* 1994 14: 2924-2932.
25. Holscher C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 1997 20: 298-303.
26. Hirsch DB, Steiner JP, Dawson TM, Mammen A, Hayek E, Snyder SH. Neurotransmitter release regulated by nitric oxide in PC-12 cells and brain synaptosomes. *1993 Curr Biol* 3: 749-754.
27. Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol* 2001 64: 51-68.

28. Kamsler A, Segal M. Hydrogen peroxide as a diffusible signal molecule in synaptic plasticity. *Mol Neurobiol* 2004 29: 167-178.
29. Avshalumov MV, Chen BT, Koós T, Tepper JM, Rice ME. Endogenous hydrogen peroxide regulates the excitability of midbrain dopamine neurons via ATP-sensitive potassium channels. *J Neurosci* 2005 25: 4222-4231.
30. Benani A, Troy S, Carmona MC, Fioramonti X, Lorsignol A, Leloup C, Casteilla L, Pénicaud L. Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake. *Diabetes*. 2007 56: 152-160.
31. Andorn AC, Pappolla MA. Catecholamines inhibit lipid peroxidation in young, aged and Alzheimer's disease brain. *Free Radic Biol Med* 2001 31: 315-320.
32. Maher P, Schubert D. Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. *Cell Mol Life Sci* 2000 57: 1287-1305.
33. Munoz-Castaneda JR, Montilla P, Padillo FJ, Bujalance I, Munoz MC, Muntane J, Tunez I. Role of serotonin in cerebral oxidative stress in rats. *Acta Neurobiol Exp* 2006 66: 1-6.
34. Pifl C, Zezula J, Spittler A, Kattinger A, Reither H, Caron MG, Ornykiewicz O. Antiproliferative action of dopamine and norepinephrine in neuroblastoma cells expressing the human dopamine transporter. *FASEB J* 2001 15: 1607-1609.
35. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* 200 34: 237-256.
36. Noh JS, Kim EY, Kang JS, Kim HR, Oh YJ, Gwag BJ. Neurotoxic and Neuroprotective Actions of Catecholamines in Cortical Neurons. *Exp Neurology* 1999 159: 217-224.
37. Boggess RK, Martin RB. Copper (II) chelation by dopa, epinephrine, and other catechols. *J Am Chem Soc* 1975 97: 3076-3081.
38. Yasunari K, Kohno M, Kano H, Minami M, Yoshikawa J (2000) Dopamine as a novel antioxidative agent for rat vascular smooth muscle cells through dopamine D<sub>1</sub>-like receptors. *Circulation* 101:2302–2308
39. Yang Z, Asico LD, Yu P, Wang Z, Jones JE, Escano CS, Wang X, Quinn MT, Sibley RS, Romero GG, Felder RA, Jose PA. D5 dopamine receptor regulation of reactive oxygen species production, NADPH oxidase, and blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006 290: R96-R104.
40. Munoz-Castaneda JR, Montilla P, Padillo FJ, Bujalance I, Munoz MC, Muntane J, Tunez I. Role of serotonin in cerebral oxidative stress in rats. *Acta Neurobiol Exp* 2006 66: 1-6.
41. Kang JY, Kang HJ, Chung YK, Gwag BJ, Noh JS 5-Hydroxytryptamine attenuates free radical injury in primary mouse cortical cultures. *Neuroreport* 2001 12: 963-966.
42. The Neurotransmitter Noradrenaline Rescues Septal Cholinergic Neurons in Culture from Degeneration Caused by Low-Level Oxidative Stress. *Mol Pharmacology* 2005 67: 1882-1891.
43. Stoupel E. Cardiac arrhythmia and geomagnetic activity. *Indian Pacing Electrophysiol J* 2006 6: 49-53.
44. Gmitrov J. Geomagnetic field modulates artificial static magnetic field effect on arterial baroreflex and on microcirculation. *Int J Biometeorol* 2007 51: 335-344.
45. Fanelli C, Coppola S, Barone R, Colussi C, Gualandi G, Volpe P, Ghibelli L. *FASEB J*. Magnetic fields increase cell survival by inhibiting apoptosis via modulation of Ca<sup>2+</sup> influx. 1999 13: 95-102.
46. Binhi VN. An analytical survey of theoretical studies in the area of magnetoreception. *Electromagnetic Fields: Biological Effects and Hygienic Standardization* (Eds). Repacholi MH, Rubtsova NB, Muc AM. 1999 World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp: 155-170.
47. Rollwitz J, Lupke M, Simkó M. Fifty-hertz magnetic fields induce free radical formation in mouse bone marrow-derived promonocytes and macrophages. *Biochim Biophys Acta* 2004 1674: 231-238.
48. Hashish AH, El-Missiry MA, Abdelkader HI, Abou-Saleh RH. Assessment of biological changes of continuous whole body exposure to static magnetic field and extremely low frequency electromagnetic fields in mice. *Ecotoxicol Environ Saf* 2007 doi:10.1016/j.ecoenv.2007.10.002
49. Wolf FI, Torsello A, Tedesco B, Fasanella S, Boninsegna A, D'Ascenzo M, Grassi C, Azzena GB, Cittadini A. 50-Hz extremely low frequency electromagnetic fields enhance cell proliferation and DNA damage: possible involvement of a redox mechanism. *Biochim Biophys Acta* 2005 1743: 120-129.
50. Fernie KJ, Bird DM. Evidence of oxidative stress in American kestrels exposed to electromagnetic fields. *Environ Res* 2001 86: 198-207.
51. Yan Y, Wei CL, Zhang WR, Cheng HP, Liu J. Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling. *Acta Pharmacol Sin* 2006 27: 821-826.
52. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004 287: C817-C833.
53. Scaiano JC, Mohtat N, Cozens FL, McLean J, Thansandote A. Application of the radical pair mechanism to free radicals in organized systems: can the effects of 60 Hz be predicted from studies under static fields? *Bioelectromagnetics* 1994 15: 549-554.
54. Bauréus Koch CL, Sommarin M, Persson BR, Salford LG, Eberhardt JL. Interaction between weak low frequency magnetic fields and cell membranes. *Bioelectromagnetics*, 2003 24: 395-402.

55. Rosen AD. Membrane response to static magnetic fields: effect of exposure duration. *Biochim Biophys Acta* 1993 1148: 317-320.
56. Clejan S, Ide C, Walker C, Wolf E, Corb M, Beckman B. Electromagnetic field induced changes in lipid second messengers. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1996 13: 301-324.
57. Simkó M. Cell type specific redox status is responsible for diverse electromagnetic field effects. *Curr Med Chem* 2007 14: 1141-1152.
58. Stritesky Larssen K, Lyberg T. Oxidative status--age- and circadian variations?--a study in leukocytes/plasma. *Neuro Endocrinol Lett* 2006 27: 445-452.
59. Reiter RJ. Static and extremely low frequency electromagnetic field exposure: reported effects on the circadian production of melatonin. *J Cell Biochem* 1993 51: 394-403.
60. Alfieri RR, Bonelli MA, Pedrazzi G, Desenzani S, Ghillani M, Fumarola C, Ghibelli L, Borghetti AF, Petronini PG. Increased levels of inducible HSP70 in cells exposed to electromagnetic fields. *Radiat Res* 2006 165: 95-104.
61. Ke XQ, Sun WJ, Lu DQ, Fu YT, Chiang H. 50-Hz magnetic field induces EGF-receptor clustering and activates RAS. *Int J Radiat Biol* 2008 84: 413-420.
62. Frahm J, Lantow M, Lupke M, Weiss DG, Simkó M. Alteration in cellular functions in mouse macrophages after exposure to 50 Hz magnetic fields. *J Cell Biochem* 2006 99: 168-177.
63. Lin H, Goodman R, Shirley-Henderson A. Specific region of the c-myc promoter is responsive to electric and magnetic fields. *J Cell Biochem* 1994 54: 281-288.
64. Olivares-Bañuelos T, Navarro L, González A, Drucker-Colín R. Differentiation of chromaffin cells elicited by ELF MF modifies gene expression pattern. *Cell Biol Int* 2004 28: 273-279.
65. Selvam R, Ganesan K, Narayana Raju KV, Gangadharan AC, Manohar BM, Puvanakrishnan R. Low frequency and low intensity pulsed electromagnetic field exerts its antiinflammatory effect through restoration of plasma membrane calcium ATPase activity. *Life Sci* 2007 80: 2403-2410.
66. Zhang X, Zhang J, Qu X, Wen J. Effects of different extremely low-frequency electromagnetic fields on osteoblasts. *Electromagn Biol Med* 2007 26: 167-177.
67. Satter Syed A, Islam MS, Rabbani KS, Talukder MS. Pulsed electromagnetic fields for the treatment of bone fractures. *Bangladesh Med Res Counc Bull* 1999 25: 6-10.
68. Markov MS. Expanding use of pulsed electromagnetic field therapies. *Electromagn Biol Med* 2007 26: 257-274.
69. Kumar VS, Kumar DA, Kalaivani K, Gangadharan AC, Raju KV, Thejomoorthy P, Manohar BM, Puvanakrishnan R. Optimization of pulsed electromagnetic field therapy for management of arthritis in rats. *Bioelectromagnetics* 2005 26: 431-439.
70. Hinman MR, Ford J, Heyl H. Effects of static magnets on chronic knee pain and physical function: a double-blind study. *Altern Ther Health Med* 2002 8: 50-55.
71. Trock DH. Electromagnetic fields and magnets. Investigational treatment for musculoskeletal disorders. *Rheum Dis Clin North Am* 2000 26: 51-56.