

EXPERIMENTAL STUDY OF A COMBINED AC AND DC MAGNETIC FIELD EFFECTS ON ION CURRENT OF CELL CHANNELS

STUDIMI EKSPERIMENTAL I EFEKTEVE TË NJË KOMBINIMI TË FUSHËS MAGNETIKE DC DHE TË NJË FUSHE AC MBI RRYMAT JONIKE TË KANALEVE QELIZORE

ENTELE GAVOÇI^a, DHURATA KUQI^b, MARGARITA KUQALI^b

^aDepartamenti i Fizikës, Universiteti i Shkodrës, Sheshi "2 Prilli", Shkodër, SHQIPËRI

^bDepartamenti i Inxhinierisë Fizike, Universiteti Politeknik i Tiranës, Rruga "Muhamet Gjollësia" Tiranë, SHQIPËRI

Email: entelagavoci@yahoo.com

AKTET IV, 3: 372 - 376, 2011

PERMBLEDHJE

Në vitet e fundit janë bërë një sërë eksperimentesh në lidhje me bashkëveprimin e fushave magnetike të intensiteteve dhe frekuencave të ulëta (0-300Hz) me biosistemet, por akoma nuk ka një shpjegim të saktë në lidhje me mekanizmin e bashkëveprimit. Një ndër modelet më të diskutueshme në literaturën bashkëkohore, është edhe i ashtuquajtur 'modeli i rezonancës parametrike jonike', i cili u propozua nga Blanchard dhe Blackman në vitin 1994. Qëllimi i këtij punimi ishte studimi eksperimental i efekteve biologjike të një kombinimi të fushave magnetike DC dhe AC me parametra sipas modelit të sipërpërmendur. Ndikimi i këtyre fushave është studuar nëpërmjet ekspozimit të qelizave nervore dhe matjes së rrymës së joneve të kaliumit që lëvizin nëpër kanalet e membranës qelizore. Duke u mbështetur në rezultatet e eksperimenteve, nuk është gjetur ndonjë ndryshim statistiki domethënës ndërmjet grupit të kontrollit dhe grupit të qelizave të ekspozuara.

Fjalë kyçe: efektet biologjike, fushat magnetike, patch clamp.

SUMMARY

In the last years, there are a lot of experimental results concerning the interactions between extremely low frequency magnetic fields (0-300Hz) and bio-systems, but the mechanism of this interaction is still unknown. One of the most controversial model proposed is the so-called 'ion parametric resonance model' proposed by Blanchard dhe Blackman 1994. The aim of the present work was the experimental study of the biological effects of a combination of a DC and a AC magnetic field with parameters according to the prediction of the mention model. This work was designed to test one possible site of interaction: K⁺ channels in the cell membrane. According to our experimental results no statistically difference was found between the control and exposure groups.

HYRJE

Në literaturën bashkëkohore ekzistojnë të dhëna eksperimentale në lidhje me bashkëveprimin e fushave magnetike (FM) të intensiteteve (0-500 μ T) dhe frekuencave të ulëta (ELF, 0-300Hz) me biosistemet, duke përfshirë efekte mbi proliferimin dhe ndarjen e qelizave, riparimin e indeve, sintesën e proteinave dhe ADN [1,8,15]. Megjithë numrin e madh të këtyre të dhënave,

akoma nuk ka një shpjegim unik dhe të pranueshëm nga të gjithë studiuesit për mekanizmin e bashkëveprimit të këtyre fushave me biosistemet. Ekzistojnë disa modele teorike në lidhje me mekanizmat biofizikë të bashkëveprimit të fushave ELF me biosistemet, ku shpesh konsiderohet membrana qelizore dhe aktiviteti i saj elektrofizilogjik si hapi i parë i bashkëveprimit [4]. Një ndër modelet më të

debatuara vitet e fundit kanë qenë të ashtuquajturat 'hipotezat e rezonancës jonike' (në tre versione: sipas Liboff, 1985 [13]; Lednev 1991 [11] dhe Blanchard and Blackman, 1994 [6]).

Sipas këtyrë tre versioneve fushat magnetike ELF do të prodhojnë efekte biologjike vetëm për kombinime të caktuara të një FM statike (DC) dhe një FM alternative (AC) me frekuencë të caktuar të cilat u quajtën frekuenca rezonance f_c dhe jepen me formulën:

$$f_c = (1/2\pi)(q/m)B_0 = \Omega_c/2\pi$$

ku q është ngarkesa elektrike e jonit të pranishëm në sistemin biologjik, m masa e tij dhe B_0 intensiteti i FM statike. Në versionin e Liboff 1985 si B_0 merret intensiteti i fushës gjeomagnetike dhe si hap i parë i bashkëveprimit konsiderohen kanalet e membranës qelizore. Lednev në versionin e tij të vitit 1991, konsideron

kompleksin jon-proteinë (si p.sh kalmodulina) si një oshilator harmonik dhe aplikimi i një kombinimi të FM-ELF me frekuencë rezonance, shkakton modifikimin e niveleve energjetike të këtij oshilatori, duke çuar në efekte biologjike. Këtë model e përpunuan më tej Blanchard and Blackman në vitin 1994 duke e quajtur 'modeli i rezonancës parametrike jonike' (MRPI). Në këtë model propabiliteti i kalimeve energjetike të 'oshilatorit' jon-proteinë rritet me madhësinë $J_n(2nB_1/B_0)$ ku J_n janë funksionet e Bessel të rendit n , B_1 është intensiteti i një FM alternative me frekuencë f_c , dhe B_0 intensiteti i një FM statike, paralele me të parën. Për të testuar hipotezat e rezonancës janë kryer disa eksperimente, disa nga të cilët e mbështetën hipotezën [2,5,14,19], disa të tjerë e kundërshtuan atë [7,9,10,16] dhe disa dhanë mbështetje të pjesshme [17,20].

Group no.	DC magnetic field B_0 (μ T)			AC magnetic field B_1 (μ T)[rms]			Freq. f_c (Hz)	Bessel function $J_1(B_1/B_0)$
	$B_0(x)$	$B_0(y)$	$B_0(z)$	$B_1(x)$	$B_1(y)$	$B_1(z)$		
1 Kontroll	5	9.5	42	0	0	0	-	-
2	0	0	20	0	0	13	8	MAX
3	0	0	20	0	0	38	8	MIN

Tabela 1. Grupet e eksperimentale dhe parametrat e ekspozimit

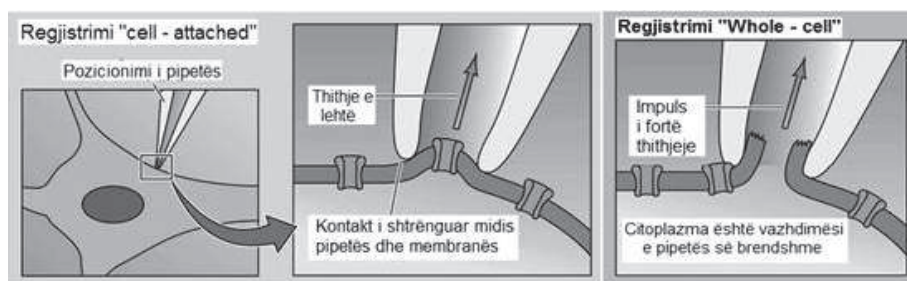


Fig.1. Diagramë skematike e arritjes së konfigurimit 'whole cell' të teknikës patch clamp

Në këtë punim është MRPI është testuar duke përdorur teknikën patch clamp për të matur rrymën totale të joneve kalium të membranës së qelizave nervore të ekspozuara në një kombinim të FM -DC dhe AC me parametra në përputhje me MRPI.

MATERIALET DHE METODAT

Në këtë punim është përdorur teknika patch clamp në konfigurimin 'whole cell' e cila lejon matjen e rrymës elektrike të të gjitha kanaleve jonike të membranës qelizore (Fig.1). Si model biologjik janë marrë qelizat neuronale

neuroblastoma njerëzore SK-N-BE (2) të cilat diferencohen në një fenotip neuronal pasi trajtohen me acid retinoid [3]. Në gjithë ekperimentet rrymat e joneve të kaliumit janë matur në temperaturën e ambientit 22°C. Pasi është arritur konfiguracioni 'whole cell', është zbatuar një protokoll pulsesh përmes elektrodës së rregjistrimit. Protokoll i pulseve konsiston në aplikimin e potencialeve me hap prej 10 mV dhe që zgjasin 200 ms duke filluar nga -90mV deri në +80 mV. Në Fig. 2 është paraqitur një rregjistrim tipik i këtyre rrymave pas aplikimit të një protokollit impulsesh. Rrymat e kaliumit janë matur gjatë 2 minutave para ekspozimit në FM (PRE), 2 minutave gjatë ekspozimit (EXP) dhe gjatë 2 minutave pas ekspozimit në FM (POST). Për çdo qelizë janë aplikuar gjithsej 15 protokolle impulsesh dhe janë rregjistruar po aq gjurmë.

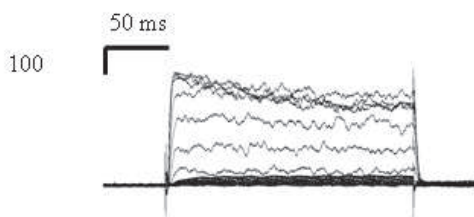


Fig. 2 Një gjurmë tipike e një rregjistrimi të rrymave totale të kaliumit

Sistemi i ekspozimit është ndërtuar posaçërisht për rregjistrimet elektrofiziologjike patch clamp [18] në mënyrë që të lejojë një manipulim të lehtë të qelizave në Petri dish që vëzhgohen nën mikroskop. Ai përbëhet nga 3 çifte bobinash kuadratike që rrethojnë instrumentet e rregjistrimit të patch clamp dhe kanë boshte pingule, në këtë mënyrë mund të prodhohet FM si DC ashtu AC në të tre drejtimet ortogonale të hapësirës.

Duke u bazuar në modelin e Blanchard and Blackman 1994 u zgjedh harmonika e parë e funksionit të Bessel meqë në këtë harmonikë janë vërejtur pjesa më e madhe e efekteve [17,20]. Si fillim u zgjedh FM statike me intensitet $B_0=20.38 \mu\text{T}$ meqë janë vëzhguar efekte në këtë vlerë të fushës [14] dhe më pas në bazë të relacionit: $f_c=qB_0/2\pi m$, u llogarit frekuenca e FM

alternative 8Hz .Vlera e intensitetit të FM alternative u llogarit në bazë të funksionit të Bessel $J_1(B_1/B_0)$ duke zgjedhur vlerat që kanë propabilitet maksimal që të merren efekte biologjike. Vlerat e gjetura të parametrave për të gjitha komponentet e FM janë paraqitur në Tabelen 1. Komponentet 0 të FM janë arritur duke anuluar fushën gjeomagnetike me anën e kompensimit të saj me një FM të kundërt të gjeneruar nga sistemi ekspozimit.

Grupi i parë eksperimental është ai i kontrollit, d.m.th sistemi ekspozitiv nuk është ndezur dhe qelizat kanë qenë të ekspozuara vetëm në kushtet e FM natyrale. Grupet e ekspozuara 1 dhe 2 ndryshojnë nga njëri-tjetri vetëm nga vlera e intensitetit e FM alternative.

REZULTATET E MATJEVE, PËRPUNIMI DHE DISKUTIMI I TYRE

Për të analizuar të dhënat nga 15 gjurmët e rregjistruara për çdo qelizë, janë marrë mesataret e vlerave të çdo rryme që i përgjigjet potencialit përkatës të aplikuar. Për secilën kohëzgjatje PRE, EXP dhe POST gjurmët e rregjistruara janë mesatarizuar dhe janë paraqitur me gabimin e tyre standart (Fig. 3). Në të gjitha rastet kanalet e kaliumit hapen për tensionin + 20mV dhe desiteti i rrymës arrin maksimumin për + 80mV .

Për analiza të mëtejshme janë zgjedhur vlerat e densitetit të rrymës së kaliumit që i korrespondojnë potencialit +80mV. Për të shmangur variabilitetin në sjelljen e qelizave është ndërmarrë një procedurë normalizimi, të gjitha gjurmët janë normalizuar mbi 5 gjurmët të marra gjatë kohës PRE. Në Fig.4 është paraqitur densiteti i rrymës mesatare dhe i normalizuar për çdo kohë PRE, EXP, POST dhe për çdo grup eksperimental. Për të testuar këto grupe të dhënash për ndonjë ndryshim statistikiqsh domethënës është përdorur testi statistikor ANOVA.

Nga analiza e të dhënave nuk u gjet asnjë diferencë statistikiqsh domethënëse ndërmjet grupeve të ndryshme eksperimentale, d.m.th ndërmjet grupit të kontrollit dhe grupeve të ekspozuara në FM dhe as ndërmjet gjurmëve të njëjti grup para, gjatë apo pas ekspozimit në FM.

Rezultate të tilla arrihën edhe Höjevik et al.1995 [10], Obo et al.2002[16] por për kanalet e Ca^{++} .

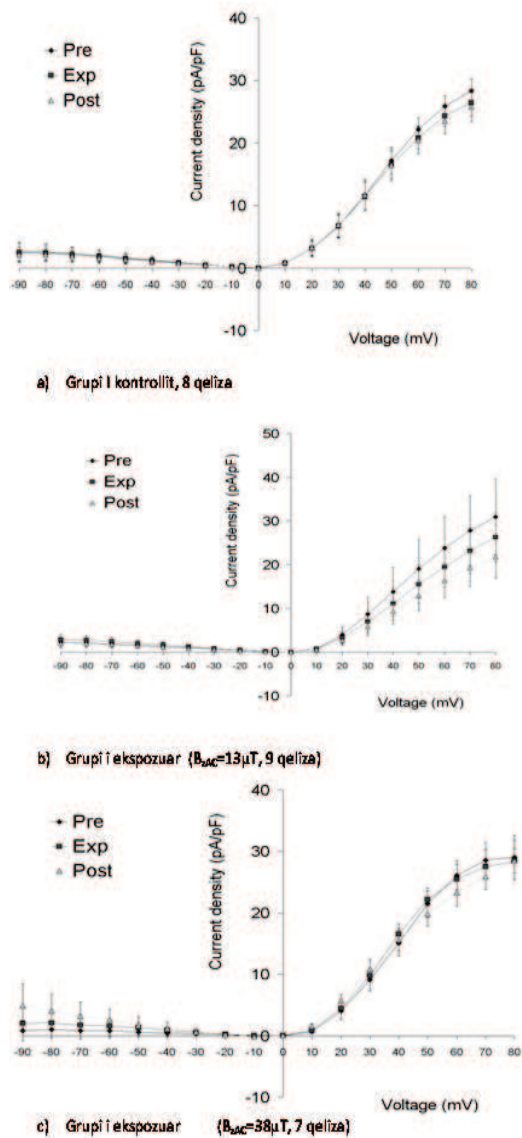


Fig.3 Varësia e densitetit të rrymës nga potenciali i aplikuar

Një nga arsyt pse këto rezultate nuk konfirmojnë MRPI sipas Blanchard and Blackman 1994, mund të jetë se konfigurimi 'whole cell' lejon vetëm studime mbi efektet e FM mbi rrymat jonike totale që kalojnë në membranën qelizore dhe jo efekte të tjera si psh mbi strukturën e proteinës

apo vetive të membranës. Nqs efekti i FM është mbi rrymën e një kanali të vetëm atëherë rryma e tij 'maskohet' nga rryma totale e matur. Gjithashtu nuk mund të thuhet se modeli teorik i Blanchard and Blackman, 1994 është i drejtë sepse edhe ai vetë ka kufizimet e tij si model.

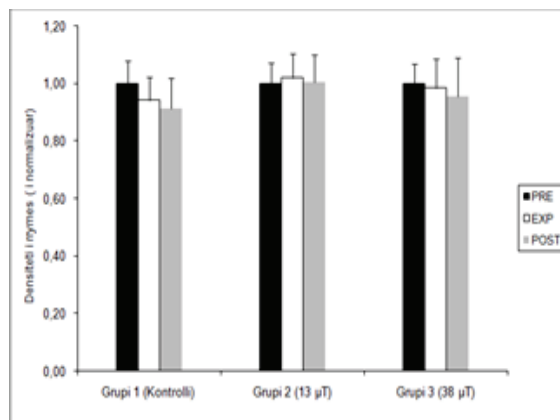


Fig. 4 Densiteti i rrymave mesatare dhe i normalizuar. Të dhënat janë paraqitur si mesatare \pm devijim standard

KONKLUZIONE

Në këtë punim u studian eksperimentalisht efektet e një kombinimi të fushës magnetike DC dhe AC me parametra sipas 'modelit të rezonancës parametrike jonike', të Blanchard dhe Blackman të vitit 1994. Ndikimi i këtyre fushave është studjuar duke matur rrymat e joneve të kaliumit që lëvizin nëpër kanalet e membranës qelizore para dhe pas ekspozimit të qelizës në fushat magnetike. Duke u mbështetur në rezultatet e eksperimenteve, nuk është gjetur ndonjë rezultat statistikisht domethënës në mënyrë që të mbështetet modeli biofizik i studiuar, por kufizimi në numrin e kampionëve nuk na lejon ndonjë konkluzion të qartë përfundimtar për modelin e propozuar të Blanchard dhe Blackman 1994.

BIBLIOGRAFIA

1. Bersani F, Ed.(1999) Electricity and Magnetism in Biology and Medicine. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.

2. Belyaev IY, Alipov ED (2001) Frequency-dependent effects of ELF magnetic field on chromatin conformation in *Escherichia coli* cells and human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta*.15;1526(3):269-76.
3. Bierau J, van Gennip AH, Leen R, Caron HN, van Kuilenburg AB (2002) Retinoic acid reduces the cytotoxicity of cyclopentenyl cytosine in neuroblastoma cells. *FEBS Lett*.
4. Bihni VN, Savin AV (2003) Effects of weak magnetic fields on biological systems: physical aspects. *Physics - Uspekhi* 46 (3) 259 – 291
5. Blackman CF, Kinney LS, House DE, Joines WT (1989) Multiple power-density windows and their possible origin. *Bioelectromagnetics*;10(2):115-28. Review
6. Blanchard JP, Blackman CF (1994) Clarification and application of an ion parametric resonance model for magnetic field interactions with biological systems. *Bioelectromagnetics* 15:217–238
7. Clarkson N, Davis MS, Dixey R, (1998) Diatom motility and low frequency electromagnetic fields—a new technique in the search for independent replication of results. *Bioelectromagnetics* 20:94–100
8. Cook CM, Thomas AW, Prato FS (2002) Human electrophysiological and cognitive effects and exposure to ELF magnetic and ELF modulated RF and microwave fields: a review of recent study. *Bioelectromagnetics* 23:144-157
9. Galt S, Sandblom J, Hamnerius Y, Höjevik P, Saalman E, Nordén B (1993b) Experimental search for combined AC and DC magnetic field effects on ion channels. *Bioelectromagnetics*, 14: 315-327
10. Höjevik P, Sandblom J, Galt S, Hamnerius Y (1995) Ca^{2+} ion transport through patch-clamped cells exposed to magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 16:33–40
11. Lednev VV 1991. Possible mechanism for the influence of weak magnetic fields on biological systems. *Bioelectromagnetics*12:71–75.
12. Liboff AR., 1985a. "Geomagnetic cyclotron resonance in living cells". *J Biol Phys* 13:99 102 In: Chiabrera A, Nicolini C., Schwan HP, editors. "Interactions between electromagnetic field and cells". London: Plenum Press, p 281–296.
13. Liboff AR., 1985b. "Cyclotron resonance in membrane transport". In: Chiabrera A, Nicolini C, Schwan HP, editors. "Interactions between electromagnetic field and cells". London: Plenum Press p 281–296.
14. Liboff AR., Rozek RJ., Sherman ML., McLeod BR., Smith SD., 1987. "Ca-45 cyclotron resonance in human lymphocytes". *J Bioelectricity* 8:12–22.
15. Novikov VV, Sheiman IM, Fesenko EE (2008) Effect of weak static and low-frequency alternating magnetic fields on the fission and regeneration of the planarian *Dugesia (Girardia) tigrina*. *Bioelectromagnetics* 29:387–393
16. Obo M., Konishi Sh. , Otaka Y., Kitamura S., 2002. "Effect of Magnetic Field Exposure on Calcium Channel Currents Using Patch Clamp Technique". *Bioelectromagnetics* 23:306-314
17. Prato, FS, Kavaliers M, Thomas AW (2000) Extremely low frequency magnetic fields can either increase or decrease analgesia in the land snail depending on field and light conditions. *Bioelectromagnetics*, No. 21, 287–301
18. Procopio M.G, Gavoci E., Kuqi A., Zironi I., Pietro M., Bersani F (2008). 'Magnetic Field Exposure System for a Patch Clamp set up'. The 5th International Workshop on 'Biological Effects of Electromagnetic Fields', 28/09-2/10/2008, Città del Mare, Terrasini, Palermo-Italia
19. Reinbold KA., Pollack SR., 1997. "Serum plays a critical role in modulating $[Ca^{2+}]$ of primary culture bone cells exposed to weak ion-resonance magnetic fields". *Bioelectromagnetics* 18:203–214
20. Sarimov R., Markova E., Johansson F., Jenssen D., Belyaev I., 2005. "Exposure to ELF magnetic field tuned to Zn inhibits growth of cancer cells". *Bioelectromagnetics*. Dec; 26(8):631-8.