

**УДК 577.353:57.04:537.868**

## **ВПЛИВ СЛАБКИХ НИЗЬКОЧАСТОТНИХ ЕЛЕКТРОМАГНІТНИХ ПОЛІВ НА ВНУТРІШНЬОКЛІТИННУ КОНЦЕНТРАЦІЮ КАЛЬЦІЮ ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН**

*Мельник М.І., Артеменко О.Ю., Мартинюк В.С.*

*ННЦ «Інститут біології» Київський національний університет імені Тараса Шевченка,  
Київ, Україна  
E-mail: gribovamari@gmail.com*

Досліджували вплив слабких (25 мкТл) наднизькочастотних (1-100 Гц) електромагнітних полів на зміну внутрішньоклітинної концентрації кальцію в суспензії гладеньком'язових клітин шлунку щурів. Показали, що певні частотні діапазони проявляють активуючу дію на гладеньком'язові клітини (15-16, 35, 45, 50-51, 67, 78, 81, 91, 95 і т.д.), а певні – інгібуючу (19-21, 26-28, 60-61, 97 і т.д.). Виявили, що біоефективні електромагнітні поля викликають зміну концентрації внутрішньоклітинного кальцію до 400 нМ/л.

**Ключові слова:** слабкі наднизькочастотні електромагнітні поля, гладеньком'язові клітини, внутрішньоклітинний кальцій.

### **ВСТУП**

Скорочення гладеньких м'язів лежить в основі функціонування багатьох внутрішніх органів. Як відомо, головним пусковим механізмом в цьому процесі є збільшення концентрації іонів кальцію в гладеньком'язових клітинах. Концентрація внутрішньоклітинного кальцію збільшується за рахунок надходження його ззовні через канали плазматичної мембрани та виходу його з внутрішньоклітинних кальцієвих депо. Зменшення рівня кальцію всередині гладеньком'язових клітин відбувається зворотнім шляхом. Регуляція зміни внутрішньоклітинної концентрації кальцію в гладеньком'язових клітинах відбувається різними шляхами, багато з яких на сьогоднішній день є дослідженими [1, 2]. З'ясування механізмів регуляції концентрації кальцію, а також дослідження зовнішніх факторів, що можуть впливати на неї представляють велику цікавість для вчених.

Одним з потенційних факторів, що може певним чином впливати на живі клітини є електромагнітне поле. Існують дані щодо впливу слабких (до 50 мкТл) низькочастотних (до 100 Гц) електромагнітних полів на живі організми, а зокрема на кальцій-залежні процеси в клітинах [3]. На цей час існує ряд теорій, що пояснюють механізм дії електромагнітних полів на клітини [3, 4], але єдиних загальноприйнятих уявлень поки що немає. Найбільш поширеною теорією магнітобіології є теорія параметричного резонансу [5]. Згідно з цією теорією, слабе магнітне поле, що налаштоване на параметричний резонанс для іонів кальцію та

ряду інших іонів, викликає біологічні ефекти, впливаючи на взаємодію іонів з білками та іншими молекулами в клітині. У зв'язку з цим може спостерігатись цілий спектр біологічних ефектів [6]. Виходячи з того, що іони кальцію відіграють ключову роль в функціонуванні гладеньких м'язів, клітини цієї тканини можуть бути потенційно чутливими до електромагнітних впливів. Дослідження впливу електромагнітних полів на гладеньком'язові клітини є цікавим та актуальним, оскільки на сьогоднішній день існує досить мало даних з цього приводу. Враховуючи вищесказане, ми поставили за мету експерименту знайти біоефективні частоти слабких електромагнітних полів наднизьких частот (ЕМП ННЧ) в діапазоні від 1 до 100 Гц для гладеньком'язових клітин шлунок щурів.

## **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ**

В експериментах використовувались нелінійні білі щури з віваріуму ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Тварини утримувались в нормальних однакових умовах. Для експерименту брали тварин вагою близько 250 г. Щурів декапітували та вилучали шлунок для подальших досліджень. Вся робота проводилась відповідно до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях.

Шлунок розтинали по великій кривизні, промивали в розчині нормального Кребсу та відчищали від сполучних тканин. Відчищену гладеньком'язову тканину в розчині безкальцієвого Кребсу нарізали на дрібні шматочки розміром близько 3x3 мм. Потім поміщали їх в бюкс з 2 мл розчину ферментів та варили при температурі 37 °С впродовж 22 хв. Після варки зливали розчин ферментів та заливали 2 мл безкальцієвого Кребсу. За допомогою сеплера з надплавленим носиком проводили механічне подрібнення зварених шматочків тканини, вилучаючи з них клітинну суспензію. Надосадний розчин (суспензію) збирали в центрифужну пробірку. Знову в бюкс з тканиною заливали 2 мл безкальцієвого Кребсу та проводили цю процедуру до тих пір, поки не відбувалось висолювання висхідного розчину. Отриману суспензію центрифугували 2 хв при 1000 g. Після центрифугування зливали надосадний розчин, а в осад клітин додавали безкальцієвий Кребс доводячи об'єм до 1 мл.

Далі суспензію завантажували флуоресцентним кальцієвим зондом індо-1 [7] (на 1 мл суспензії 5 мкл індо-1 та 5 мкл флуороніка) та залишали її в темряві на 40 хв. Після завантажування суспензію із зондом центрифугували знову 2 хв при 1000 g. Зливали надосадний розчин та в осад додавали нормальний Кребс.

В експерименті використовували нормальний розчин Кребса (мМ): 135 NaCl, 5,9 KCl, 1,2 MgCl<sub>2</sub>, 11,5 глюкози, 2,5 CaCl<sub>2</sub>, 11,6 HEPES; безкальцієвий розчин Кребса (аналогічний нормальному, але без CaCl<sub>2</sub>); розчин ферментів (мг на 1 мл безкальцієвого Кребсу): 1 колагенази 1А, 1 соєвого інгібітору трипсину, 1 САБ, 0,5 протеази.

Для реєстрації змін концентрації кальцію суспензію гладеньком'язових клітин піддавали впливу імпульсного (меандр) електромагнітного поля наднизької частоти від 1 до 100 Гц впродовж 32 хвилин. Протягом експозиції кожні 4 хвилини вимірювали концентрацію кальцію спектрофлуориметричним методом [7] за

допомогою спектрофлуориметра СДЛ-2 (ЛОМО). У зв'язку з тим, що фонові концентрації іонів кальцію варіювали в різних експериментальних зразках в межах до 50 нМ/л, її значення в кожній часовій точці з 4-хвилинним інтервалом нормалізували відносно початкового значення, що відповідає нульовому часовому підрахунку і, відповідно, нульовому значенню зміни концентрації (рис. 1).

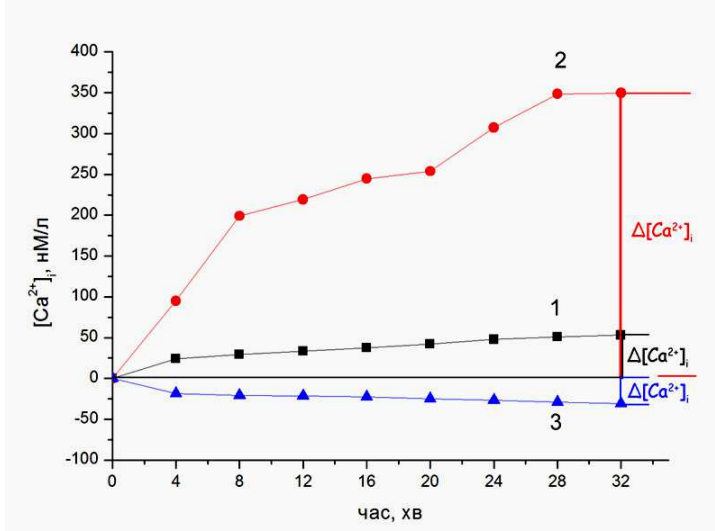


Рис. 1. Методика вираховування відносної зміни концентрації кальцію відносно початку експерименту.  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  – зміна концентрації внутрішньоклітинного кальцію. Примітки: «0» - початкова внутрішньоклітинна концентрація кальцію; лінії 1, 2 і 3 – зміна концентрації кальцію в часі в контрольних зразках (1) і при дії електромагнітного поля наднизьких частот (2,3).

Отримані дані представили у вигляді графіків залежності змін концентрації внутрішньоклітинного кальцію на 4-й, 8-й, 12-й, 16-й, 20-й, 24-й, 28-й та 32-й хвилині вимірювання від частоти електромагнітного поля (рис. 2). Важливим моментом такого методичного підходу було те, що в контрольних зразках практично завжди відбувалось повільне спонтанне зростання внутрішньоклітинної концентрації кальцію, тоді як вплив електромагнітного поля призводив до прискорення або пригнічення цього процесу, що фіксувалось графічно (рис. 1, 2).

Імпульсне електромагнітне поле окремих частот створювали за допомогою кілець Гельмгольца. Генератором сигналів був серійний генератор Гб-28, який дозволяє створювати магнітні поля встановлених частот і амплітуд. Імпульси МП були прямокутної форми зі змінною полярністю за один період коливань. Індукцію МП ННЧ контролювали мікротесламетром Г-79 і магнітометром, в якому сенсором магнітного поля був датчик Хола. Величина індукції МП була 25 мкТл. Магнітні поля такої інтенсивності відносять до категорії дуже слабких, вони характеризуються низькими значеннями енергії і їх дія не призводить до теплових ефектів при взаємодії з речовиною. Слід відмітити, що електромагнітний фон в лабораторії під час проведення експериментів не перевищував рівня 80 нТл, що в

середньому на декілька порядків менше інтенсивності ЕМП, яка створювалась в експерименті.

Статистичний аналіз проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Оцінку достовірності різниці між статистичними вибірками проводили на основі t-критерію Ст'юдента.

### **РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ**

Встановлено, що слабкі (25 мкТл) змінні низькочастотні електромагнітні поля в діапазоні від 1 до 100 Гц впливають в певній мірі на концентрацію внутрішньоклітинного кальцію в гладеньком'язових клітинах шлунку щурів (рис. 2). Такі невеликі зміни (до 400 нМ/л) тим не менш можуть бути важливими для функціонування гладеньких м'язів, модулюючи пороги збудження та силу тонічних скорочень.

На рис. 2 помітно, що достовірні зміни концентрації внутрішньоклітинного кальцію, порівняно з контрольними зразками, мають місце при дії електромагнітного поля певних частот (рис. 2). При цьому спостерігається як підвищення рівню кальцію (найбільш ефективні частоти: 15-16, 35, 45, 50-51, 65, 67, 69, 78, 81, 84, 86-87, 91-92, 95 Гц), так і зменшення (найбільш ефективні частоти: 1-3, 19-21, 26-28, 60-61, 68, 96-97, 100 Гц). До того ж, видно, що біологічна відповідь гладеньком'язових клітин на електромагнітне поле розвивається впродовж 12-16 хвилин, а далі значних змін внутрішньоклітинної концентрації кальцію не спостерігається.

У попередньому розділі «Матеріали і методи» було акцентовано увагу на той факт, що по мірі інкубації клітин, рівень внутрішньоклітинного кальцію зростає. В контрольних зразках він зростав приблизно в середньому на 50 нМ/л, але при впливі електромагнітних полів міг збільшуватись на 300-400 нМ/л. Це можна пояснити тим, що інкубація виділених гладеньком'язових клітин у штучному середовищі є певним слабким подразником, тому із різних причин з часом збільшується концентрація кальцію. Вплив електромагнітного поля в залежності від частоти посилює або пригнічує цей процес. Таким чином можна умовно говорити про активуючу і інгібуючу дію ЕМП ННЧ (табл.1). Цей факт відкриває можливість використання ЕМП ННЧ для терапевтичних впливів, які ставлять за мету активацію або пригнічення функцій тканин і органів, в діяльності яких важливу роль відіграють гладенькі м'язи (серцево-судинна система, шлунково-кишковий тракт та ін.).

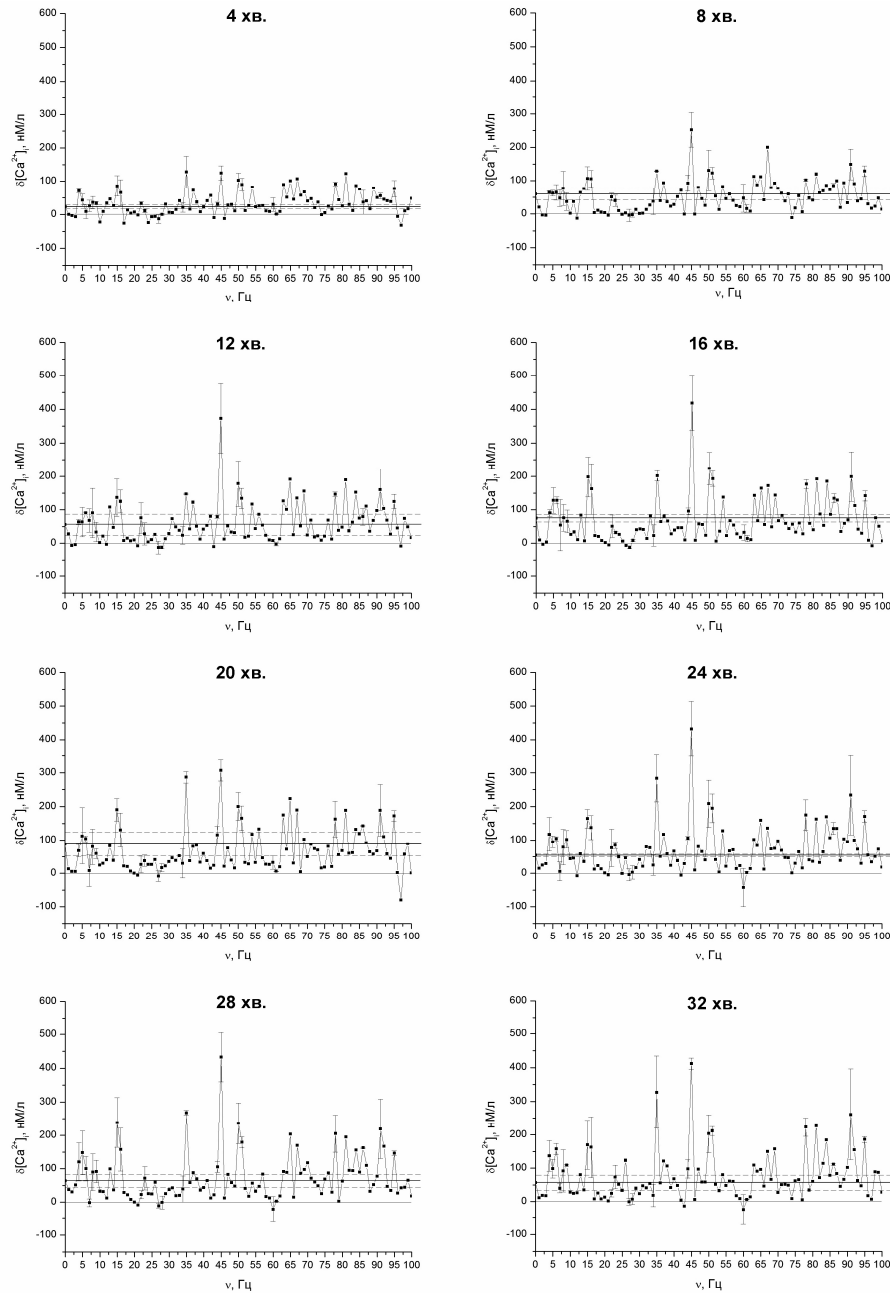


Рис. 2. Вплив електромагнітного поля наднизьких частот на внутрішньоклітинну концентрацію кальцію в гладеньком'язових клітинах шлунку щурів в залежності від часу експозиції (на 4-й, 8-й, 12-й, 16-й, 20-й, 24-й, 28-й та 32-й хв.).

*Примітки:* за «0» прийнято початкове значення внутрішньоклітинної концентрації кальцію; суцільна лінія відповідає середньому значенню змін концентрації кальцію в контрольних зразках, а пунктирні лінії є, відповідно, похибкою цієї середньої величини.

Таблиця 1.

**Біологічна ефективність наднизьких частот ЕМП на моделі внутрішньоклітинної концентрації гладеньком'язових клітин**

Активуєчі частоти		Пригнічуючі частоти	
Частота (частотний діапазон), Гц	Величина максимального ефекту відносно контролю, нМ/л	Частота (частотний діапазон), Гц	Величина максимального ефекту відносно контролю, нМ/л
4-6	53-85	1-3	74-82
8-9	35-52	7	79
13	52	10-12	58-72
15-16	106-175	14	67
35	270	17-18	66-67
37-38	50-67	19-21	81-94
44	52	22-25	50-68
45	378	26-28	71-96
47	40	29-34	43-65
50-51	155-173	36	50
54	73	39-41	36-54
56	45	46	67
63-64	45-86	48-49	49-71
65	140	52-53	59-69
67	141	55	55
69	100	57-59	41-61
70-71	24-54	60-61	82-96
76	24	62	68
78	166	66	57
81	170	68	83
82-83	31-57	72-73	33-37
84	127	74-75	69-72
85	53	77	67
86-87	80-100	79-80	35-60
89-90	45-56	88	40
91	204	93-94	33-45
92	103	96	85
95	130	97	168
99	30	98	36
		100	87

Слід відмітити, що у попередніх дослідженнях було встановлено подібну полімодальну відповідь тучних клітин на дію ЕМП різних частот в діапазоні 2-100 Гц [8], однак дослідники акцентували увагу головним чином тільки на активуючу дію даного фізичного фактора. Тим не менш достовірно зареєстровано інгібуючу

дію ЕМП частотою 32-34 Гц на дегрануляцію тучних клітин. Дегрануляція тучних клітин є кальцій залежним процесом. Через це, цікавим стало співставити дані біологічної активності імпульсних електромагнітних полів наднизьких частот на моделях внутрішньоклітинної концентрації кальцію в гладеньком'язових клітинах і дегрануляції тучних клітин [8]. Порівняльний графік біоефективності наведено на рис. 3.

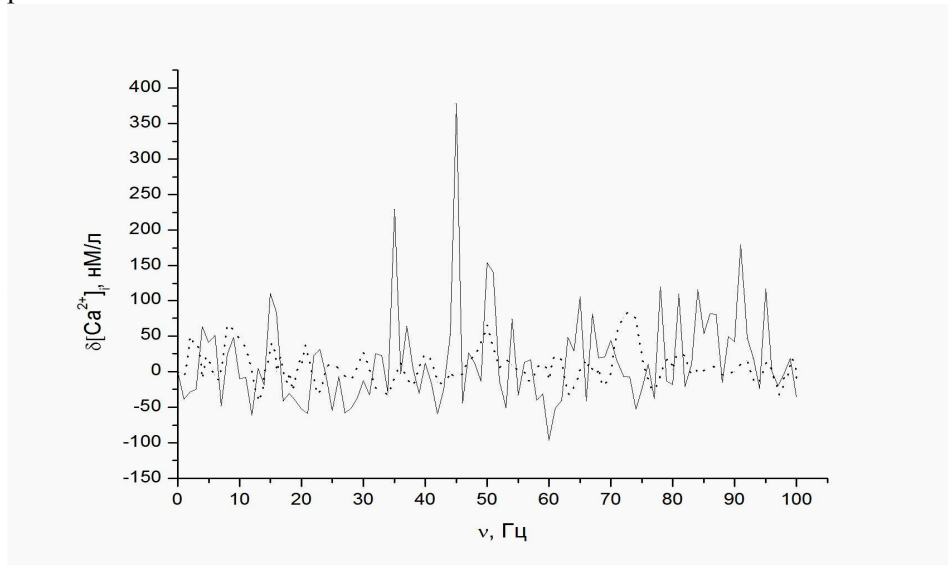


Рис. 3. Співставлення біоефективності електромагнітного поля наднизьких частот на моделях внутрішньоклітинної концентрації кальцію в гладеньком'язових клітинах (суцільна лінія) і дегрануляції тучних клітин (пунктирна лінія).

Видно, що в діапазоні до 50 Гц біологічні ефекти на обох типах клітин достатньо схожі. Положення максимумів і мінімумів на графіку для гладеньком'язових клітин зсунуті в середньому на 1-2 Гц в більш високочастотну область, порівняно з даними на тучних клітинах. Це може бути пояснено тим, що дослідження проводились в різних географічних широтах. Експеримент на гладеньком'язових клітинах проводили в Києві (географічна широта  $50^{\circ} 27'$ , величина індукції геомагнітного поля 47,5 мкТл), а на тучних клітинах – в Сімферополі (географічна широта  $44^{\circ} 57'$ , величина індукції геомагнітного поля 43 мкТл). Згідно сучасних теоретичних уявлень, що пояснюють первинні механізми впливу ЕМП ННЧ на біологічні об'єкти, індукція постійного геомагнітного поля є важливою для умов резонансної взаємодії ЕМП з різними іонами [3]. Різниця індукції геомагнітного поля для широт Києва і Сімферополя складає 3-4 мкТл, при чому відповідним чином змінюється положення резонансних смуг (табл. 2.), які розраховані за формулою іонного параметричного резонансу  $f = qV/2\pi m$ , де  $q$  - заряд іона,  $V$  - індукція постійного магнітного поля,  $m$  - маса іона. Згідно розрахунків окремі ефекти можна формально зв'язати з окремими біологічно значущими іонами.

З рис. 3 добре видно, що в діапазоні 50-100 Гц відповідь гладеньких м'язів і тучних клітин суттєво відрізняється, особливо в діапазоні 80-100 Гц. Такі відмінності поки важко пояснити. Скоріше за все це основною причиною цієї різниці є відмінності у структурно-функціональній організації клітин та їх іонному складі.

Таблиця 2.

**Теоретичний розрахунок резонансних частот біологічно важливих іонів в геомагнітному полі на широті Києва та Сімферополя**

Іон	Частота резонансу, Гц	
	Київ (47,5 мкТл)	Сімферополь (43 мкТл)
Г	6	5
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	8	7
Cu <sup>+</sup>	11	10
CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	12	11
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	12	11
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	15	14
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	15	14
K <sup>+</sup>	18	17
Se <sup>2-</sup>	18	17
Cl <sup>-</sup>	20	19
Zn <sup>2+</sup>	22	20
Cu <sup>2+</sup>	22	21
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	23	21
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	25	22
Ni <sup>2+</sup>	26	23
Fe <sup>2+</sup>	26	24
Mn <sup>2+</sup>	27	24
Cr <sup>2+</sup>	28	25
Na <sup>+</sup>	32	29
Ca <sup>2+</sup>	37	33
Se <sup>4+</sup>	37	33
Fe <sup>3+</sup>	39	35
Cr <sup>3+</sup>	42	38
OH <sup>-</sup>	43	39
Mo <sup>6+</sup>	47	43
Mn <sup>4+</sup>	53	48
Se <sup>6+</sup>	55	50
Mg <sup>2+</sup>	60	54
Cr <sup>6+</sup>	84	76
H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>	398	360
H <sup>+</sup>	729	660

Примітка: значення резонансів іонів розраховано за формулою  $f = qV/2\pi m$ , де  $q$  - заряд іона,  $V$  - індукція постійного магнітного поля,  $m$  - маса іона.



Співставлення біологічно активних частот ЕМП в таблицях 1 і 2 показує певну формальну відповідність резонансним взаємодіям різних іонів з комбінованим ЕМП, що гіпотетично вказує на потенційну можливість залучення широкого спектру різних іонів в механізми дії ЕМП, а не тільки іонів кальцію. Однак такий формальний підхід не є достатньо коректним для ґрунтового обговорення первинних механізмів впливу ЕМП ННЧ на біологічні процеси. Добре відомо, що активація кальцій-залежних шляхів внутрішньоклітинної сигналізації відбувається у відповідь на дію різноманітних факторів хімічної і фізичної природи, тому цей процес, як правило, не відображає специфіки первинних механізмів впливу. Це означає, що ми реєструємо загальну клітинну відповідь на дію ЕМП. З іншого боку складна частотна залежність біологічних ефектів і достатньо вузькі біоефективні «частотні вікна», які спостерігаються різними дослідниками [8, 9], примушує шукати пояснення первинних механізмів впливу на основі уявлень квантової фізики, де резонансні взаємодії або неможливість їх реалізації є головними умовами для прояву біологічних ефектів.

### ВИСНОВКИ

Слабкі (25 мкТл) низькочастотні (1-100 Гц) електромагнітні поля змінюють базову внутрішньоклітинну концентрацію кальцію в гладеньком'язових клітинах шлунку щурів. Зміни концентрації кальцію досягають максимальних значень вже на 12-16 хвилині експозиції в ЕМП ННЧ, після чого істотних змін не відбувається.

Знак біологічного ефекту залежить від частоти ЕМП. В певних частотних діапазонах (15-16, 35, 45, 50-51, 65, 67, 69, 78, 81, 84, 86-87, 91-92, 95 Гц) спостерігається збільшення внутрішньоклітинної концентрації кальцію, в інших (1-3, 19-21, 26-28, 60-61, 68, 96-97, 100 Гц) – навпаки зниження.

### Список літератури

1. Calcium: a Matter of Life or Death. edited by J. Krebs and M. Michalak // Elsevier Science, 2007-08-17, Vol. 41, 584.
2. Hideaki Karaki, Hiroshi Ozaki, Masatoshi Hori and other. Calcium Movements, Distribution, and Functions in Smooth Muscle // Pharmacological Reviews. Vol. 49, No.2. 1997
3. Бинги В.Н., Савин А.В. Физические проблемы действия слабых магнитных полей на биологические системы // УФН. – 2003. - Т. 173, № 3. - С. 265–300.
4. Liboff A. R. The electromagnetic field as a biological variable // On the nature of electromagnetic field interactions with biological systems. Eds. Frey A. N., Langes R. J. Co. — Austin, 1994. — P. 59—72.
5. Леднев В.В. Биоэффекты слабых комбинированных, постоянных и переменных магнитных полей // Биофизика. – 1996. – Т. 41, № 1. – С. 224-232.
6. Мартынюк В.С., Цейслер Ю.В., Темуриянц Н.А. Интерференция механизмов влияния слабых электромагнитных полей крайне низких частот на организм человека и животных // Геофизические процессы и биосфера. - 2012. - Т. 11, № 2. - С. 16-39.
7. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. – М., 1986.
8. Мартынюк В.С., Абу Хада Р.Х. Реакция тучных клеток на действие переменных магнитных полей в условиях *in vitro* // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2001. – Т. 14 (53), № 2. – С. 3-7.
9. Богатина Н.И., Шейкина Н.В., Кордюм Е.Л. Изменения гравитропической реакции, вызванные постоянным магнитным полем. // Біофізичний вісник. 2006. - вип. 17(1). – С. 78-82.

**Мельник М.И. Влияние слабых низкочастотных электромагнитных полей на внутриклеточную концентрацию кальция гладкомышечных клеток / М.И. Мельник, А.Ю. Артеменко, В.С. Мартинюк // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2013. – Т. 26 (65), № 2. – С.123-132.**

Исследовали влияние слабых (25 мкТл) сверхнизкочастотных (1-100 Гц) электромагнитных полей на изменение внутриклеточной концентрации кальция в суспензии гладкомышечных клеток желудка крыс. Показали, что определенные частотные диапазоны обладают активирующим воздействием на гладкомышечные клетки (15-16, 35, 45, 50-51, 67, 78, 81, 91, 95 и т.д.), а другие – ингибирующим (19-21, 26-28, 60-61, 97 и т.д.). Определили, что биоэффективные электромагнитные поля вызывают изменение концентрации внутриклеточного кальция до 400 нМ/л.

**Ключевые слова:** слабые сверхнизкочастотные электромагнитные поля, гладкомышечные клетки, внутриклеточный кальций.

**Melnyk M.I. The influence of weak low-frequency electromagnetic fields on intracellular calcium concentration of the smooth muscle cells / M.I. Melnyk, O.Yu. Artemenko, V.S. Martynyuk // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2013. – Vol. 26 (65), No. 2. – P. 123-132.**

It was investigated the influence of weak (25  $\mu$ T) low-frequency (1-100 Hz) electromagnetic fields on intracellular calcium concentration in the suspension of smooth muscle cells of the stomach of rats. We have shown that some frequency ranges activate smooth muscle cells (15-16, 35, 45, 50-51, 67, 78, 81, 91, 95 etc.), and other some frequencies inhibit it (19-21, 26-28, 60-61, 97 etc.). We have determined that bioeffective electromagnetic fields cause change of intracellular calcium concentration up to 400 nmol/L.

**Keywords:** weak low-frequency electromagnetic fields, smooth muscle cells, intracellular calcium.

*Поступила в редакцию 15.05.2013 г.*