УДК 577.35:577.25.5 + 577.17.02

ЗМІНИ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦІАЛУ У ЗАРОДКІВ ШПОРЦЕВОЇ ЖАБИ (*XENOPUS LAEVIS*) ПІСЛЯ ВПЛИВУ ЕЛЕКТРОМАГНІТНИХ ТАПОСТІЙНИХ МАГНІТНИХ ПОЛІВ

О. С. Яремкевич, Д. І. Санагурський

Національного університету «Львівська політехніка»
Львівський національний університет імені Івана Франка

Досліджено вплив різних видів магнітних полів — електромагнітного поля (ЕМП) різних потужностей (20 Вт, 40 Вт, 60 Вт) та ультрависокої частоти (27, 14 МГц), змінного електромагнітного поля (З МП) частотою 50 Гц від соленоїда та постійного магнітного поля (ПМП) напруженістю 2000 Ерс. на зміни електрофізіологічних параметрів зародкових клітин у шпорцевої жаби (Xenopus laevis)на ранніх етапах розвитку та їх виживання після омагнічення.

Проведена оцінка впливу цих полів на зміни мембранного потенціалу плазматичних мембран зародків шпорцевої жаби протягом періоду синхронного дроблення бластомерів (2–32 бластомери) у ранньому періоді розвитку і встановлено, що після впливу ЕМП спостерігається чітка її залежність від потужності наведеного поля, що проявляється як в гіперполяризації мембрани, так і в таких параметрах коливань МП як амплітуда та період. Крива динаміки коливання МП при дії ЗМП мало відрізняється від контролю, лише проявляється в крутизні наростання МП, яка значно перевищує таку в контролі. ПМП сприяли зниженню рівня МП (~ на 20 мВ) і збільшенню періоду (~ на 33 %) та амплітуди (~ на 46 %) коливань рівня МП під час поділу бластомерів.

Ключові слова*:* ПЛАЗМАТИЧНА МЕМБРАНА, ЗАРОДКИ, ПОДІЛ БЛАСТОМЕРІВ, ЕЛЕКТРОМАГНІТНІ ПОЛЯ, ЗМІННІ МАГНІТНІ ПОЛЯ ТА ПОСТІЙНІ МАГНІТНІ ПОЛЯ.

Відомо, що всі форми життя на Землі піддаються впливу різноманітних електричних і магнітних полів природного і техногенного походження, що зумовило певну чутливість біологічних об’єктів до їх впливу [1]. Тому, останні роки характеризуються інтенсивним розвитком досліджень біологічної дії неіонізуючих електромагнітних випромінювань, як природного, так і техногенного походження, в результаті чого встановлено, що вони володіють біологічною активністю в широкому частотно-амплітудному діапазоні [2, 3]. Більшість абіотичних факторів зовнішнього середовища, що відіграють важливу роль в процесах життєдіяльності організмів, мають електромагнітну природу, а деякі з них добре відомі та давно використовуються в промисловості, клінічній практиці, побуті, зокрема, інфрачервоні та ультрафіолетове опромінення. Електромагнітні випромінювання ЕМВ (радіочастотні) використовуються як носії різноманітної інформації в біосфері, а змінні магнітні поля (ЗМП), особливо низької частоти (ОНЧ) природного походження, можуть бути датчиками часу в широкому діапазоні періодів [4, 5] та характеризуються високою проникливою здатністю і біологічною активністю [6, 7].

Біологічні ефекти дії ЕМП зумовлені, за даними одних авторів [8, 9], впливом на молекули води і проникливість мембран [10, 11] та на швидкість окисно-відновних реакцій [12]. У роботі [13] показано негативний вплив змінного магнітного поля на клітинні мембрани, що проявляється в дестабілізації антиоксидантної системи організму, змінами ліпідів мембран та збільшення їх проникності. Аналогічні зміни спостерігалися і при одноразовій дії змінного магнітного поля з частотою 50 Гц на організм людини [14]. Під впливом такого поля збільшується проникність гістогематичного бар’єру тканин нирок і селезінки, а також проникність цитоплазматичної мембрани еритроцитів. Імпульсне магнітне

поле (тривалість імпульсу 0,02 с) з індукцією 8,5–9,5 млТ) збільшує проникність рогової оболонки ока, а також посилює сорбційні властивості кришталика, сітківки та судинної оболонки [15].

Інші автори [16] припускають, що рецепцію електромагнітних випромінювань в живих клітинах може забезпечувати біогенний магнетит Fe_3O_4, який є феромагнетиком і добрим провідником електрики. Екранування біологічних об'єктів від зовнішнього геомагнітного поля також приводить до змін в їхньому метаболізмі [17]. Зокрема, висунута гіпотеза про вплив постійного магнітного поля на швидкість білкового синтезу, що дозволяє описувати (на клітинному рівні) механізм магнітотерапії [18].

Однак, незважаючи на значну поширеність ЕМП, тонкі механізми їх впливу на організм досі мало з'ясовані. На особливу увагу заслуговує дослідження дії ЕМП на початкових етапах розвитку тварин, тому метою даної роботи було вивчити реакції мембран зародків амфібій на вказані поля.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на зародках шпорцевих жаб (*Xenopus laevis*). Зародки отримували після попередньої стимуляції дорослих самок хоріогонічним гонадотропіном (500 одиниць на особину). Через 18 год після ін'єкції відбирали запліднену ікру в чашки Петрі з відстояною водою й інкубували зародки при температурі 20...21 °С.

У дослідах використовували три типи магнітних полів: постійне магнітне поле (ПМП), створене магнітною системою із сплаву «ніомакс», що давало у зазорі 20 мм напруженість 2000 Ерст; змінне електромагнітне поле частотою 50 Гц (ЗМП) від соленоїда й електромагнітне поле (ЕМП) ультрависокої частоти (27,14 МГц) різної потужності (20, 40 та 60 Вт).

Зародки жаб на ранніх стадіях розвитку (2–4 бластомери) піддавали дії вказаних полів за такою часовою схемою: ПМП — 30 хв, ЗМП — 20 хв, ЕМП потужністю 20 Вт — 10 хв, ЕМП 40 Вт — 10 хв, ЕМП 60 Вт 7 хв. Різна тривалість впливу цих полів підбиралась за принципом «більша потужність — менша тривалість впливу».

Усі виміри електрофізіологічних параметрів клітин зародків у період дроблення проводили на спеціально зібраній установці, блок-схема якої приведена на рис.1

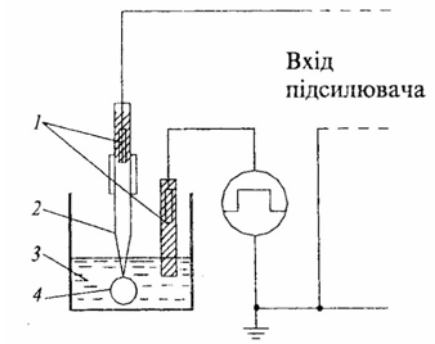

Рис. 1. Блок-схема установки:
1 — сольові містки – 3М розчин КСІ;
2 — скляний пірексовий мікроелектрод;
3— розчин Гольтфретера;
4 — зародок.

Для проведення досліджень зародки шпорцевої жаби, вивільнені від оболонок, переносили в камери з оргскла (об'єм 0,5 мл), конструкція яких дає змогу змінювати розчини зі швидкістю 0,2 мл/хв при довготривалих дослідах. Пізніше за допомогою механічних мікроманіпулярів контролювали під мікроскопом МБС-2 введення у зародок мікроелектрода, виготовленого із скла «Пірекс» і заповненого 3М розчином КСІ, опір якого не перевищував 10 МОм.

Реєстрацію рівня мембранного потенціалу (МП) проводили за допомогою монолитного операційного підсилювача типу OPA128 (рис. 2), в якому використовується особлива

геометрія діелектрично ізольованих польових транзисторів, що забезпечує вищі параметри, ніж в гібридних операційних підсилювачах. Цей підсилювач біопотенціалів вимірює потенціал в діапазоні ±100 мВ з внутрішнім опором порядку 100 кОм. Для зменшення впливу вхідного опору підсилювача на результат вимірювання, бажано забезпечити його роботу на рівні 10 ГОм. Такий великий вхідний опір можуть забезпечити лише операційні підсилювачі (ОП) з польовими транзисторами на вході.

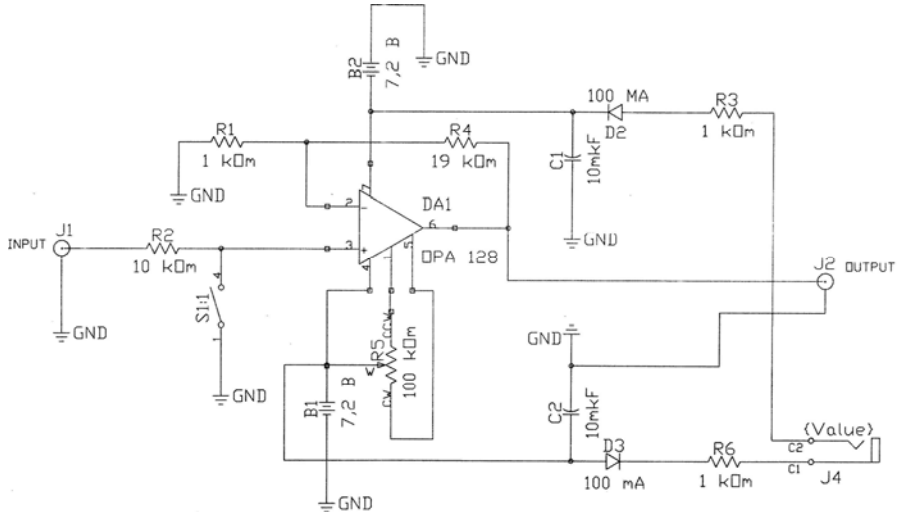

Рис. 2. Схема підсилювача

Результати й обговорення

При неперервній реєстрації МП у момент раннього розвитку зародків шпорцевої жаби в розчині Гольтфретера спостерігались періодичні зміни його рівня, які були синхронні з циклами клітинного поділу. Гіперполяризація мембрани зародків шпорцевої жаби припадала на інтерфазу клітинного циклу, деполяризація — на мітоз [19]. Максимальне значення МП спостерігалося в прометафазі. У цей час під мікроскопом добре видно початок закладки борозни наступного поділу. Період та амплітуда коливань мембранного потенціалу в контролі протягом всього часу дроблення бластомерів є приблизо однаковою і становить 31 хв, що відповідає тривалості клітинного циклу. Відомо, що зменшення амплітуди та частоти коливань трансмембранного потенціалу супроводжується сповільненням розвитку зародків [20]. Динаміка мембранного потенціалу, як вказує автор [21], істотно змінюється внаслідок впливу зовнішніх факторів — фізичних та хімічних і є чутливим показником, що й ініціювало проведення таких досліджень на зародках шпорцевих жаб, а саме дослідження впливу електромагнітних та магнітних полів на зміни мембранного потенціалу.

На рис. 3 представлені результати дослідження мембранного потенціалу під час дроблення бластомерів шпорцевої жаби після дії ЕМП різних потужностей. З рисунка видно, що досягнення максимальних значень мембранного потенціалу збігається з часом закладки борозни наступного поділу (на графіках цей час позначений стрілкою з вказаною кількістю утворених бластомерів). Після обробки зародків електромагнітним полем на всіх кривих (20 Вт, 40 Вт, 60 Вт) спостерігалось різке зростання рівня мембранного потенціалу (~ на 10...27 мВ), після чого він теж стрімко повертався майже до вихідних значень, крутизна наростання та амплітуда коливань (особливо на графіках реєстрації МП піля впливу ЕМП 20 Вт та 40 Вт) також збільшувались в порівнянні з контролем. Як видно з рис. 3, найбільший рівень МП (-75 мВ) спостерігався після впливу ЕМП (60 Вт), під час утворення 16 бластомерів, що свідчить про високу гіперполяризацію. Крім того, при цій потужності ЕМП відзначено найбільший період (36 хв.) і амплітуду (25 мВ) коливань МП, хоча крутизна

наростання при цьому, майже в два рази менша, ніж після дії ЕМП потужністю 20 Вт, де спостерігається найменша тривалість періоду коливання МП (17 хв), що зумовлено зменшенням тривалості клітинного циклу. Найбільш наближена до контролю була крива впливу ЕМП (40 Вт), яка займає на графіку проміжне положення між розглянутими вище кривими, де потужність ЕМП була 20 Вт та 60 Вт, і відрізнялась лише незначною різницею рівня МП (~ 2,5–3 мВ) в порівнянні з контролем. Період коливань цієї кривої становить 33 хв, амплітуда — 20 мВ, а крутизна в 4 рази менша від крутизни наростання кривої, отриманої після дії ЕМП (20 Вт).

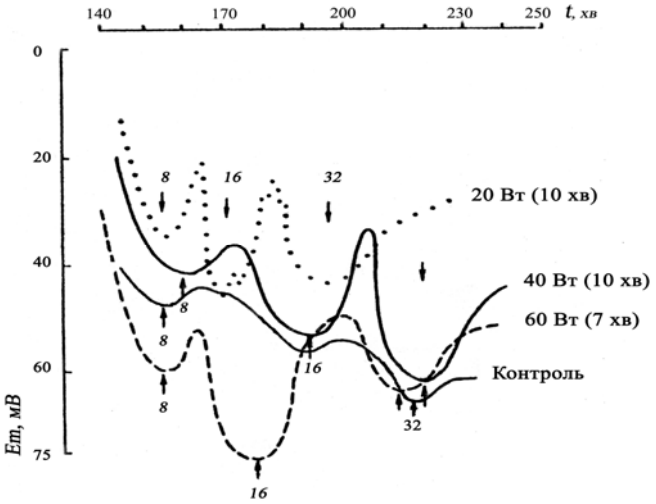

Рис. 3. Зміни рівня мембранного потенціалу (E_m) протягом раннього розвитку шпорцевої жаби (8–32 бластомери) за різної потужності (20, 40, 60 Вт) електромагнітного поля.

На загал, можна сказати, що після впливу ЕМП спостерігається чітка її залежність від потужності наведеного поля, що проявляється як в гіперполяризації мембрани, так і в таких параметрах коливань МП як амплітуда та період. Останній добре корелює з тривалістю ділення бластомерів.

На рис. 4 зображені криві, що характеризують МП зародка шпорцевої жаби після впливу ПМП і ЗМП порівняно з контролем.

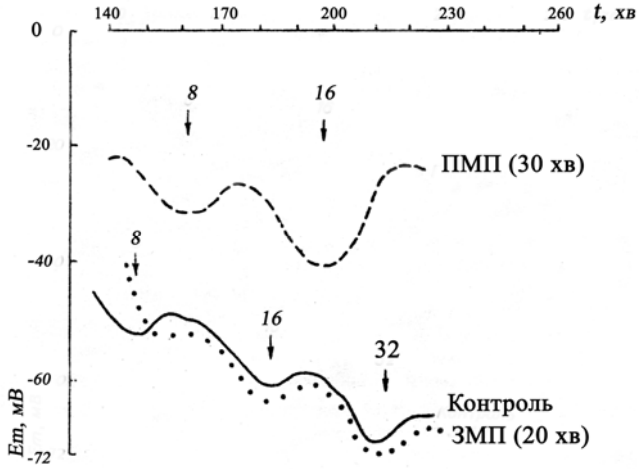

Рис. 4. Вплив ПМП — 30 хв (2000 Ерс) та ЗМП — 20 хв (50 Гц) на динаміку мембранного потенціалу (E_m) у зародків шпорцевої жаби (8–32 бластомери).

З рисунка видно, що крива динаміки коливання МП, при дії ЗМП, мало відрізняється від контролю, хоча крутизна наростання МП перевищує таку в контролі.

Дещо інший вигляд має крива змін мембранного потенціалу зародків шпорцевої жаби після впливу постійного магнітного поля. Порівнюючи її з контролем, можна зробити висновок, що ПМП знижують рівень МП (~ на 20 мВ) і збільшують період (~ на 33 %) та амплітуду (~ на 46 %) порівняно до рівня МП у час поділу бластомерів.

Зіставляючи одержані зміни рівня МП при поділі бластомерів зародків шпорцевої жаби з їх виживанням після впливу ЕМП, ПМП та ЗМП (діаграма, рис. 5), можна помітити, що при різних потужностях ЕМП найбільше виживання зародків спостерігалося при

потужності 40 і 60 Вт, тобто в тих партіях зародків, де мав місце найвищий рівень гіперполяризації плазматичних мембран, але мало змінювалась тривалість мітотичного циклу. Слід зауважити, що при високій потужності ЕМП (60 Вт) і значній тривалості їх дії (10 хв.) виживання зародків знижувалося більше, ніж в 2 рази. При потужностях 20 Вт виживання було меншим, пропорційним до падіння рівня потенціалу на мембранах, відповідно змінювалась крутизна його наростання та спаду.

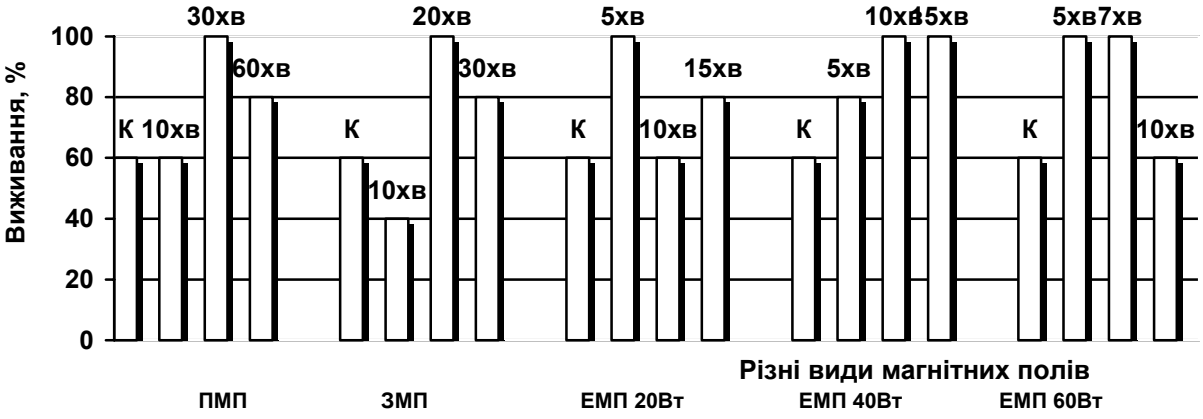

Рис. 5. Діаграма залежності виживання зародків шпорцевої жаби після впливу різних видів магнітних полів

Чітка різниця у виживанні та зміні рівня поляризації мембран спостерігалась нами при зіставленні результатів, одержаних після впливу ПМП та ЗМП на зародки *Xenopus laevis*. Так, динаміка МП та виживання зародків при дії ЗМП мало відрізняється від контролю, хоча й видно незначне зростання його рівня, а після впливу ПМП хоча і значно (майже на 20–25 мВ) падає рівень МП — виживання було вищим за контроль.

Таким чином, в трьох різновидностях впливу магнітних полів на електрофізіологічні параметри мембран зародків шпорцевої жаби виявлені достовірні зміни чутливості мембран ембріональних клітин, що дає можливість прогнозувати їх вплив на живі організми. Адже невідомо, чи гіперполяризація мембрани є первинна, чи вторинна. Зокрема, виявлена нами кореляція залежності від потужності ЕМП динаміки рівня МП в період дроблення бластомерів амфібій. Ці дані поглиблюють уявлення про дію ЕМП на електрогенез при поділі клітин, що значно розширює концепцію Шварбахера та Аудуса [22], про вплив магнітного поля на ріст організмів. Є дані [9, 23] про прискорення метаболізму в магнітному полі, а також про вплив магнітних полів на ембріональний розвиток і процеси проліферації клітин. Автори цих робіт, використовуючи анізотропні діамагнітні властивості біомакромолекул, а також високо впорядкований їх рідинно кристалічний стан при поділі клітин, припускають, що магнітне поле створює сприятливі умови для певної орієнтації напрямку поділу клітин, в тому числі, орієнтуючи хромосоми в метафазі, мітотичне веретено, мембранні ламели та клітинні стінки. Ось чому не виключено, що в наших дослідах електромагнітні поля сприяють певній орієнтації білкових компонентів іонних каналів, що веде до покращення процесів провідності мембран і, як наслідок, до високої гіперполяризації, виявленої в наших дослідах.

H. Yaremkevych[1], *D. Sanagurski*[2]

CHANGES OF MEMBRANE POTENTIAL OF EMBRYOS OF *XENOPUS LAEVIS* AFTER INFLUENCE OF THE ELECTROMAGNETIC AND PERMANENT MAGNETIC FIELDS

S u m m a r y

The influence of different types of the magnetic fields — electromagnetic field (EMF) of different powers (20 Wt, 40 Wt, 60 Wt) and ultrahigh frequency (27,14 MHz), variable electromagnetic field (VMF) with frequency 50 Hz by from solenoid and permanent magnetic field (PMF) with tension 2000 Ers. on the changes of electrophysiological parameters of embryonic cells in early development of Xenopus and their survival after magnetization was explored.

The evaluation of influence of these fields on the changes of membrane potential of plazmatic membranes of embryos Xenopus during the period of the synchronous crushing of blastomers (2–32 blastomers) in the early period of development was appraised. It was assigned, that after influence of EMF there is clear dependence of MP on power of the resulted field, that shows up both in giperpolyarization of membrane, and in such parameters of vibrations of MP as amplitude and period. The curve of dynamics fluctuations of MP under the influence of VMF differs a little from the control and only shows up in a steepness, of increasing of MP which considerably exceeds the same one in the control. PMF decrease level of MP (~ on 20 mV) and increase the period (~ on 33 %) and amplitude (~ on 46 %) of fluctuations of level of MP during division of blastomers.

[1]Department of Technology of Biological Active Substances,Pharmacy and Biotechnology, Lviv National Polytechnic University S. Bandera St. 12, UA-79013 L'viv, Ukraine e-mail: ilenkova@polynet.lviv.ua

[2]Ivan Franko National University of L'viv, Hrushevskoho St. 4, UA-79005 Lviv, Ukraine

1. *Чижевский А. Л.* Земное эхо солнечных бурь. — М.: Мысль, 1976. — 367 с.

2. *Холодов Ю. А.* Неспецифическая начальная адаптационная реакция мозга на различные электромагнитные поля // Электромагнитные поля. Биологическое нормирование. — Женева, 1999. — С. 143–151.

3. *Черников Ф. Р.* Сверхмедленные колебания светорассеивания в жидкостях разного типа // Биофизика. — 1990. — Т. 35. — Вып. 5. — С. 717–721.

4. *Владимирский Б. М., Темурьянц Н. А.* Влияние солнечной активности на биосферу — ноосферу (Гелиобиология от А. Л. Чижевского до наших дней). — М.: Изд–во МНЭПУ, 2000.— 374 с.

5. *Темурянц Н. А.* О биологической эффективности слабого электромагнитного поля инфранизкой частоты // Проблемы косм. Биологии. — 1982. — Т. 43. — С. 129–139.

6. Биогенный магнетит и магниторецепция. Новое о биомагнетизме / Под ред. Дж. Киршвинка. — М.: Мир, 1989. — Т. 1.— 353 с.

7. *Темурянц Н. А., Владимирський Б. М., Тишки О. Г.* Сверхнизкочастотные электромагнитные сигналы в биологическом мире. — К.: Наука. Думка, 1992. — 185 с.

8. *Дубров А. П.* Геофизические факторы и динамика выделения органических веществ корнями растений // Пробл. космической биологии. — 1973. — Т. 18. — С. 67–96.

9. *Joschi K. M., Kamat P. V.* The Effect of Magnetic Field on the Physical Properties of Water // J. Indian Chem. Soc. — 1966. — V. 43. — № 9. — P. 108–122.

10. *Дубров А. П.* Влияние природных электрических и магнитных полей на проницаемость биологических мембран // Материалы 2-го Всесоюзного совещ. по изучению влияния магнит. полей на биол. объекты. — М.; 1969. — С. 79–89.

11. *Тинчер К.* О структурированной воде, прилегающей к поверхностному слою эритроцитов // Состояние и роль воды в биологических объектах. — М.: Наука, 1967. — С. 143–149.

12. *Баран Б. А.* Влияние переменного магнитного поля на скорость окислительно-восстановительных реакций // Укр. хим. журн. — 1999. — Т. 65, № 7. — С.105–107.

13. Ответные реакции живой клетки на хронические воздействия переменного магнитного поля. Экстремальная физиология, гигиена и средства индивидуальной защиты человека / Левишин И. В. // Тезисы докл. 3 Всесоюзн. конф. 25–27 сент. 1990. — М., 1990. — С. 120–121.

14. *Дунаев В. В., Карпенко А. В.* Проницаемость сульфацила натрия через мембранные структуры различной степени организации в условиях влияния на организм низкочастотного магнитного поля // Фармакология и токсикология. — 1983. — Т. 46, № 1. — С. 62–65.

15. *Скрынник А. В*. Влияние импульсного магнитного поля на проницаемость роговой оболочки и сорбционные свойства тканевых структур и преломляющих сред глаза // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1985. — Т. 100, № 10. — С. 429–431.

16. Сильные и сверхсильные магнитные поля и их применение / Под ред. Херлаха. — М., 1988 — 231 с.

17. *Сидякин В. Г., Темурянц Н. А., Макеев В. Б., Владимирский Б. М*. Космическая экология. — К.: Наукова думка, 1985. — С. 29–30.

18. *Рудерман С. Ю*. О процедурах формирования «сообщений» в биополимерах // Башкирский хим. журнал. — 1994. — Т. 1, № 2. — С. 43–48.

19. *Гойда О. А*. Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных. — К.: Наук. думка, 1993. — 224 с.

20. *Санагурський Д. І.* Трансмембранний біоелектрогенез: модифікуючі впливи на нього, структурно-функціональний аналіз і моделі: Автореф. дис. д-ра біол. наук: — К., 2003. — 39 с.

21. *Санагурський Д. І.* Трансмембранный потенциал в раннем эмбриогенезе вьюна (*Misgurnus fossilis L.*) при гормональных воздействиях: Автореф. дис. канд. биол. наук. — К., 1983. — 23 с.

22. *Schwarsbacher J C., Audus L. J.* // J. Exp. Bot. — 1973. — V. 24. — P. 459.

23. *Kirshvinc J. L*. Biosystem. — 1981. —V. 14. — P. 193.