

Zmiany ilościowe populacji limfocytów CD3+ i CD45RA+ we krwi szczurów poddanych działaniu wolnozmiennego pola elektromagnetycznego

BRYGIDA BECK, BOGDAN MAZUR*, ANNA SALWICZEK**,
BARBARA KRÓLAK-OLEJNIK***, ARMAND CHOLEWKA**, ZOFIA DRZAZGA**,
JERZY ARENDT****, WOJCIECH KRÓL*****, KONSTANTY ŚLUSARCZYK*****

Katedra i Zakład Biofizyki, Śląska AM, ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze

oraz Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Opolu, ul. Kośnego 55, 45-372 Opole

*Pracownia Immunologii Śląskiego Centrum Pediatrii, Śląska AM, ul. 3-go Maja 13-15, 41-800 Zabrze

**Zakład Fizyki Medycznej, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, Instytut Fizyki, UŚI, ul. Uniwersytecka 4, 40-007 Katowice

***Klinika Ginekologii i Perinatologii, Śląska AM, Plac Traugutta 6, 41-800 Zabrze

****Katedra i Oddział Kliniczny Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologicznej, Śląska AM, ul. Żeromskiego 7, 41-902 Bytom

*****Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii, Śląska AM, ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze

*****Katedra i Zakład Anatomii Opisowej i Topograficznej, Śląska AM, ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze

Beck B., Mazur B., Salwiczek A., Królak-Olejnik B., Cholewka A., Drzazga Z.,
Arendt J., Król W., Ślusarczyk K.

Quantitative changes in CD3+ and CD45RA+ lymphocytes in the blood of rats exposed to an extremely low frequency magnetic field

Summary

It was reported that an extremely low frequency (ELF) electromagnetic field causes biological effects *in vitro* and *in vivo*. The major functions of the immune system are to develop the concept of "self" and eliminate what is "non-self". In our preliminary study we proved that an extremely low frequency (ELF) magnetic field increased IgG concentration in the serum of rats. The study was carried out on male Wistar rats. The rats were exposed during 3 or 6 days (8 minute a day) to an ELF magnetic field of a complex shape generated by a device used in medicine. Five groups were used in this experiment: Group I – control group, absence of ELF magnetic field, Group II – exposure during 3 days ($B = 0.06$ mT), Group III – exposure during 3 days ($B = 0.14$ mT), Group IV – exposure during 6 days ($B = 0.06$ mT), Group V – exposure during 6 days ($B = 0.14$ mT). The animals were sacrificed for the experiment on the 2nd day after exposure to the ELF magnetic field. The leukocytosis and lymphocytes subpopulations (CD3+ and CD45RA+) in the blood of rats were assayed. Our results did not show significant changes of leukocytosis in groups II, III and IV. In rats of group V the leukocytosis decreased. In all groups we observed a decrease of CD3+ lymphocytes during the experiment. ELF magnetic field ($B = 0.14$ mT) induced a decrease of CD45RA+ lymphocytes in rats of groups III and V.

Keywords: magnetic field, lymphocytes

Pole magnetyczne wykazuje wysoką biologiczną skuteczność. Istnieje wiele przypadków pozytywnego oddziaływania pól magnetycznych na organizmy żywe, dlatego w ostatnich latach obserwuje się duże zainteresowanie terapeutycznymi zastosowaniami pól magnetycznych, w szczególności pól niskiej częstotliwości. Stosowanie pól magnetycznych w terapii medycznej jest coraz częstsze, natomiast mechanizmy i skutki oddziaływań wolnozmiennych pól magnetycznych na organizmy żywe pozostają wciąż niewyjaśnione, stąd konieczność ich badań.

W ostatnim okresie pojawiły się dane eksperymentalne, publikowane w piśmiennictwie, dotyczące działania pól niskiej częstości na układy biologiczne na poziomie molekularnym, komórkowym i tkankowym (2, 5, 9, 10, 13). Przeprowadzono szereg eksperymentów, które pozwoliły stwierdzić, że obserwowane efekty zależą od gęstości prądów indukowanych w organizmie (18).

Do najlepiej poznanych pozytywnych mechanizmów oddziaływania pola magnetycznego na organizm jest pobudzający wpływ pola na procesy oddychania ko-

mórkowego oraz regeneracji tkankowej. Regenerujący wpływ pola magnetycznego potwierdziły badania doświadczalne, których efektem było przyspieszenie procesu syntezy DNA. Innym przejawem regeneracyjnego działania pola jest pobudzenie procesów dyfuzji oraz wychwytu tlenu przez hemoglobinę i cytochromy, co powoduje intensyfikację procesu utylizacji tlenu i oddychania tkankowego w narządach poddanych jego działaniu. Ponadto wykazano znaczne przyspieszenie procesu tworzenia się zgrubienia kości, skrócenie czasu powstawania zrostu kostnego oraz stymulację opóźnionego zrostu kostnego w wyniku zastosowania zmiennego pola magnetycznego, które wywołuje efekt piezoelektryczny w kolagenie i innych białkach organizmu (14).

Interesujące wyniki otrzymano w badaniach wpływu pola magnetycznego na zmiany aktywności enzymów. Przeprowadzono badania wpływu wolnozmiennego pola magnetycznego na zmiany aktywności fosfatazy kwaśnej i fosfatazy zasadowej w warunkach *in vitro* i *in vivo*. W wyniku tych badań stwierdzono, że pole magnetyczne wpływa na aktywność fosfatazy zasadowej i fosfatazy kwaśnej zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*, obniżając lub zwiększając aktywność. Dodatkowo zauważono, że zmiany aktywności *in vivo* są zawsze przeciwne do kierunku zmian aktywności *in vitro* (3).

Przeprowadzono badania *in vitro* dotyczące aktywności dehydrogenazy bursztynianowej i mleczanowej, ATP-azy stymulowanej jonami Mg^{2+} oraz fosfatazy kwaśnej. U większości zwierząt obserwowano pobudzenie aktywności analizowanych enzymów, przejawiające się zwiększeniem ilości produktu reakcji enzymatycznych w porównaniu z grupą kontrolną (15). Pod wpływem wolnozmiennego pola elektromagnetycznego dochodzi również do zwiększenia stężenia immunoglobulin G w surowicy krwi, co świadczy o stymulacji i zwiększonej sekrecji IgG (6).

Celem badań było określenie wpływu wolnozmiennego pola magnetycznego na komórkową odpowiedź immunologiczną organizmu, poprzez badanie jego wpływu na ogólną liczbę leukocytów oraz na liczbę populacji limfocytów CD3+ i CD45RA+ u szczurów. Limfocyty szczura charakteryzują się odmienną antygenowością w porównaniu z limfocytami człowieka. Komórki B szczura wykazują obecność markera CD45RA+. Powierzchniowym markerem szczurzych komórek T jest cząsteczka CD3+ (17, 19).

Materiał i metody

Na przeprowadzone badania praca uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej do Badań na Zwierzętach Śląskiej Akademii Medycznej nr 23/03 z dnia 10.06.2003 r. Eksperyment przeprowadzono na 30 szczurach, dojrzałych płciowo samcach, szczepu Wistar. Zwierzęta poddawane były działaniu wolnozmiennego pola magnetycznego, którego źródłem było urządzenie MRS2000 stosowane w magnestymulacji. Szczury wkładane były do klatki, w której

mogły swobodnie się poruszać. Klatkę ustawiono na aplikatorze pola magnetycznego w postaci maty z wmontowanymi cewkami. Badania przeprowadzono w pięciu grupach, po 6 szczurów w każdej grupie. Grupa I – grupa kontrolna; brak ekspozycji na pole magnetyczne, Grupa II – ekspozycja na pole magnetyczne przez 3 dni po 8 minut, przy $B_{max} = 0,06$ mT, Grupa III – ekspozycja na pole magnetyczne przez 3 dni po 8 minut, przy $B_{max} = 0,14$ mT, Grupa IV – ekspozycja na pole magnetyczne przez 6 dni po 8 minut, przy $B_{max} = 0,06$ mT, Grupa V – ekspozycja na pole magnetyczne przez 6 dni po 8 minut, przy $B_{max} = 0,14$ mT.

Drugiego dnia po ekspozycji poświęcano zwierzęta dla eksperymentu i pobierano krew z prawej komory serca do badań morfologicznych i cytometrycznych. Badania morfologiczne wykonano na analizatorze hematologicznym ACT 5 Diff CP firmy Beckman-Coulter. Badania cytometryczne zostały wykonane w dniu pobrania krwi na cytometrze przepływowym FACScan firmy Becton Dickinson. Do badań wykorzystano przeciwciała monoklonalne firmy BD Biosciences.

Źródłem wolnozmiennego pola magnetycznego podczas eksperymentu był przyrząd MRS2000, wykorzystywany w placówkach medycznych do fizykoterapii polem magnetycznym. MRS 2000 składa się z części generująco-sterującej oraz aplikatora pola w postaci maty z wmontowanymi cewkami. Urządzenie to ma możliwość wyboru kształtu i sekwencji impulsów, zmianę wartości indukcji oraz regulację czasu trwania zabiegu. Wartość indukcji magnetycznej (B) zależy od wyboru poziomu intensywności w zakresie 0,5-12 (3, 8). Wyniki badań rozkładu pola magnetycznego nad aplikatorem wykorzystywanym w doświadczeniu pokazują, że są dwa miejsca na aplikatorze o największej wartości indukcji. Badania te wykazały także, że maksymalna wartość indukcji maleje wraz ze wzrostem odległości od aplikatora (3).

Obliczenia statystyczne przeprowadzono w programie Statistica używając t-testu, po sprawdzeniu normalności (test Shapiro-Wilka) dla każdej z badanych grup (wszystkie grupy miały rozkład normalny).

Wyniki i omówienie

Wszystkie uzyskane wyniki zebrano w tab. 1-3. W przedstawionych badaniach uzyskano statystycznie istotne zmiany, dotyczące subpopulacji limfocytów CD3+ i CD45RA+, chociaż nie we wszystkich przypadkach. Stwierdzono, że działając polem magnetycznym o wartości indukcji 0,06 mT lub 0,14 mT przez 3 dni liczba leukocytów nie zmienia się. Jednak stosując pole magnetyczne o indukcji 0,14 mT przez dłuższy czas (6 dni) ogólna liczba leukocytów maleje, co spowodowane jest prawdopodobnie znacznym spadkiem liczby limfocytów CD3+ i CD45RA+.

Wszystkie uzyskane wyniki zmian liczby limfocytów CD3+ są istotne statystycznie. Wynika z nich, że nawet pole o niskiej wartości indukcji ($B_{max} = 0,06$ mT) stosowane przez krótki czas (3 dni) powoduje zmniejszenie liczby tych limfocytów. Jednak największy spadek liczby limfocytów CD3+ otrzymuje się po dłuższym (6 dni) zastosowaniu pola o indukcji wyższej ($B_{max} = 0,14$ mT).

Tab. 1. Zmiany liczby leukocytów w grupach eksperymentalnych uzyskane z badania morfologicznego krwi

Grupa	Średnia ± odchylenie standardowe
Grupa kontrolna brak pola	4466,67 ± 1945,94
Grupa II 3 dni $B_{max} = 0,06$ mT	4216,67 ± 1192,34
Grupa III 3 dni $B_{max} = 0,14$ mT	3333,33 ± 643,95
Grupa IV 6 dni $B_{max} = 0,06$ mT	5833,33 ± 1564,18
Grupa V 6 dni $B_{max} = 0,14$ mT	2766,67 ± 605,53*

Objaśnienie: * $p < 0,05$ w porównaniu z grupą kontrolną

Tab. 2. Zmiany liczby limfocytów CD3+ we krwi zwierząt eksperymentalnych

Grupa	Średnia ± odchylenie standardowe
Grupa kontrolna brak pola	576,82 ± 214,84
Grupa II 3 dni $B_{max} = 0,06$ mT	260,91 ± 72,61*
Grupa III 3 dni $B_{max} = 0,14$ mT	181,55 ± 112,55*
Grupa IV 6 dni $B_{max} = 0,06$ mT	308,93 ± 120,63*
Grupa V 6 dni $B_{max} = 0,14$ mT	55,16 ± 26,62**

Objaśnienie: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ w porównaniu z grupą kontrolną

Tab. 3. Zmiany liczby limfocytów CD45RA+ we krwi zwierząt eksperymentalnych

Grupa	Średnia ± odchylenie standardowe
Kontrola brak pola	125,411 ± 87,55
Grupa II 3 dni $B_{max} = 0,06$ mT	148,41 ± 40,75
Grupa III 3 dni $B_{max} = 0,14$ mT	44,10 ± 24,61*
Grupa IV 6 dni $B_{max} = 0,06$ mT	199,13 ± 62,21
Grupa V 6 dni $B_{max} = 0,14$ mT	38,32 ± 27,23*

Objaśnienie: * $p < 0,05$ w porównaniu z grupą kontrolną

Mechanizm zmian zachodzących w układzie immunologicznym, spowodowanym działaniem wolnozmennego pola magnetycznego jest trudny do wyjaśnienia, ponieważ badania wpływu tego pola na stan czynnościowy układu immunologicznego dają niejednoznaczne rezultaty. Wykazano, że 20-minutowa ekspozycja hodowli limfocytów szczurzych w zmiennym polu magnetycznym o sinusoidalnym i prostokątnym

przebiegu impulsu, częstotliwości 0-100 Hz i indukcji 5 mT w obecności mitogenu, prowadzi po 72 godzinach do zmniejszenia aktywności proliferacyjnej tych komórek (16). Natomiast Liboff i wsp. (12) oraz Antonopoulos i wsp. (1) donoszą, że wolnozmiennne pole elektromagnetyczne aktywuje proliferację limfocytów *in vitro*.

W innym badaniu poddano ekspozycji w zmiennym polu magnetycznym o sinusoidalnym przebiegu impulsu, częstotliwości 50 Hz i indukcji 0,05-2,5 mT *in vitro* limfocyty krwi obwodowej zdrowych dawców krwi. Porównując rezultaty w grupie ekspozycyjnej w polu, z grupą w której stosowano ekspozycję porównaną, nie wykazano istotnych różnic w zakresie aktywności proliferacyjnej oraz cytotoksyczności, przy czym analiza cytofluorymetryczna potwierdziła, w poszczególnych przypadkach, obecność indywidualnej wrażliwości limfocytów na działanie pola magnetycznego (16).

Badania eksperymentalne (16), w których oceniano zachowanie się hodowli ludzkich komórek krwiotwórczych w warunkach oddziaływania pola magnetycznego o przebiegu sinusoidalnym, częstotliwości 50 Hz i indukcji 1 mT nie wykazały żadnych zmian ultrastrukturalnych ani zaburzeń kinetyki i proliferacji tych komórek w porównaniu z kontrolą nie poddaną działaniu pola magnetycznego. Podobnie inni autorzy (11) nie stwierdzili żadnych odchyżeń od stanu prawidłowego w zakresie obrazu morfologicznego krwi osób poddanych działaniu zmiennego pola magnetycznego niskiej częstotliwości.

Układ odpornościowy badano także po zastosowaniu pola o niskich wartościach indukcji. W badaniach klinicznych wykazano zmniejszenie udziału procentowego limfocytów typu NK w warunkach zawodowych ekspozycji w polu magnetycznym o częstotliwości 50 Hz i indukcji 0,2-3,6 μ T przez 20 godzin w tygodniu (7).

W przeprowadzonych wcześniejszych badaniach własnych (6) stwierdzono, że pod wpływem wolnozmennego pola elektromagnetycznego dochodzi do przejściowego zwiększenia stężenia immunoglobulin G w surowicy krwi, co może świadczyć o wpływie zastosowanego pola na sekrecję tych immunoglobulin.

Otrzymane wyniki wykazują, że pole magnetyczne o indukcji 0,14 mT powoduje istotne zmiany liczby limfocytów CD45RA+. W grupach poddanych działaniu takiego pola liczba limfocytów maleje, ale jednocześnie, zgodnie z naszymi wcześniejszymi badaniami (6), są one zdolne przejściowo do produkcji większej ilości immunoglobulin, o czym świadczy większe stężenie IgG. Natomiast w grupach poddanych działaniu pola o indukcji 0,06 mT obserwuje się tendencję do wzrostu liczby limfocytów CD45RA+, jednak zmiany te nie są istotne statystycznie.

Na podstawie uzyskanych wyników dotyczących limfocytów CD3+ (obniżenie liczby limfocytów CD3+

we wszystkich grupach eksperymentalnych), można przypuszczać, że w organizmie dochodzi prawdopodobnie do zaburzeń reakcji immunologicznych typu komórkowego. W związku z tym, że limfocyty CD3+ współdziałają z limfocytami CD45RA+, może dochodzić do pośredniego wpływu zmian ilościowych limfocytów CD3+ na proliferację i wytwarzanie przeciwciał przez limfocyty CD45RA+. Zmiany ilościowe limfocytów CD3+ mogą również prowadzić do zaburzeń fagocytozy w organizmie. Należy również wziąć pod uwagę możliwość obniżonej odpowiedzi cytotoksycznej.

Pod wpływem pola elektromagnetycznego o indukcji 0,14 mT prawdopodobnie dochodzi do zaburzeń reakcji typu humoralnego, ponieważ pole to doprowadza do obniżenia liczby limfocytów CD45RA+. Jednak na uwagę zasługuje fakt, że po 3 dniach ekspozycji ($B_{\max} = 0,14$ mT), pomimo spadku liczby limfocytów CD45RA+ dochodzi, zgodnie z wcześniejszymi naszymi badaniami (6), do istotnego statystycznie wzrostu produkcji immunoglobulin. W grupie poddanej działaniu pola przez 6 dni ($B_{\max} = 0,14$ mT), dochodzi do statystycznie istotnego spadku limfocytów CD45RA+. Pomimo że nie obserwujemy w tej grupie statystycznie istotnego wzrostu stężenia immunoglobulin, możemy jednak przypuszczać, że limfocyty tej grupy eksperymentalnej są również zdolne do produkcji większej ilości immunoglobulin.

Obserwowane w niniejszych badaniach zmiany liczby subpopulacji limfocytów CD3+ i CD45RA+ są interesujące, chociaż trudne w interpretacji. Problem oddziaływania wolnozmiennego pola elektromagnetycznego na układ immunologiczny wydaje się problemem bardzo złożonym i wymagającym dalszych badań. W badaniach należałoby uwzględnić wpływ pola elektromagnetycznego na narządy limfatyczne oraz na zmiany ilościowe subpopulacji limfocytów: limfocytów cytotoksycznych i pomocniczych.

Wnioski

1. Wolnozmiennne pole elektromagnetyczne doprowadza do zmian ilościowych w populacji limfocytów CD3+ i CD45RA+ u szczura.

2. Pod wpływem wolnozmiennego pola elektromagnetycznego limfocyty CD45RA+ są zdolne przejściowo do zwiększonej produkcji immunoglobuliny G.

Piśmiennictwo

1. Antonopoulos A., Yang B., Stamm A., Heller W. D., Obe G.: Cytological effect of 50 Hz electromagnetic fields on human lymphocytes in vitro. *Mutat. Res.* 1995, 346, 151-157.
2. Balcavage W. X., Alvager T., Swez J., Goff C. W., Fox M. T., Abdullyava S., King M. W.: A mechanism of action of extremely low frequency electromagnetic fields on biological system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996, 222, 374-378.
3. Beck B., Beck E., Polaniak R., Salwiczek A., Drzazga Z.: An effect of extremely low frequency magnetic field on alkaline phosphatase activity – in vivo and in vitro study. *Phys. Med.* 2004, 20, 31-33.
4. Beck E., Beck B., Drzazga Z.: Influence of extremely low frequency magnetic field on alkaline phosphatase and gamma-glutamyl transpeptidase activity. *Phys. Med.* 2003, 19, 2, 105-109.

5. Beck E., Beck B., Duliban H., Drzazga Z.: An effect of static and elf magnetic field on enzyme activity – in vitro study. *IFMBE Proc., MEDICON 2001, Part II*, 765-768.
6. Beck B., Jędrzejowska-Szypulka H., Cholewka A., Król W., Drzazga Z.: An effect of extremely low frequency magnetic field on immunoglobulin G concentration in serum. *Pol. J. Envir. Stud.* 2005, 14, supl. II, 439-445.
7. Boscolo P., Bergamaschi A., Di Sciascio M. B., Benvenuti F., Reale M., Di Stefano F., Conti P., Di Gioacchino M.: Effects of low frequency electromagnetic fields on expression of lymphocyte subsets and production of cytokines of men and women employed in a museum. *Sci. Total Environ.* 2001, 270, 13-20.
8. Drzazga Z., Sieroń A., Liszka G., Wójcik J.: Pola magnetyczne stosowane w magnetoterapii. *Baln. Pol.* 1997, 39, 79-94.
9. Goodman E. M., Greenbaum B., Marron M. T.: Effect of electromagnetic fields on molecules and cells. *Int. Rev. Cytol.* 1995, 158, 279-338.
10. Goodman E. M., Greenebaum B., Marron M. T.: Altered protein synthesis in cell-free system exposed to a sinusoidal magnetic field. *Biochim. Biophys. Acta* 1993, 1202, 107-112.
11. Hauf R.: Hematological and biochemical effects of ELF fields in man-laboratory experiments, [w:] Grandolfo M., Michaelson S. M., Rindi A. (wyd.): *Biological Effects and Dosimetry of Static and ELF Electromagnetic Fields.* Plenum Press, New York-London 1985.
12. Liboff A. R., Williams T., Strong D. M., Wistar R.: Time varying fields: Effects on DNA synthesis. *Science* 1984, 223, 818-820.
13. Shimizu H., Suzuki Y., Okonogi H.: Biological effect of electromagnetic fields. *Nippon Eiseigaku Zasshi* 1995, 5, 919.
14. Sieroń A., Cieślak G., Adamek M.: *Magnetoterapia i Laseroterapia.* Śląska Akademia Medyczna. Katowice 1994.
15. Sieroń A., Cieślak G., Kamiński M., Teister M., Laitl-Kobierska A., Konieczny P.: Oddziaływanie zmiennego pola magnetycznego na aktywność wybranych enzymów błonowych i mitochondrialnych w hepatocytach u szczurów. *Baln. Pol.* 1997, 39, 3-4, 85-89.
16. Sieroń A., Cieślak G., Kawczyk-Krupka A., Biniszkiwicz T., Bliska-Urban A., Adamek M.: *Zastosowanie pól magnetycznych w medycynie.* Ośrodek Wyd. „Augustana”, Bielsko-Biała 2002.
17. Tanaka T., Masuko T., Yagita H., Tamura T., Hashimoto Y.: Characterization of a CD3-like rat T cell surface antigen recognized by a monoclonal antibody. *J Immunol.* 1989, 142, 2791-2795.
18. Tenforde T. S.: Biological interactions of extremely-low-frequency electric and magnetic fields. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1991, 25, 1-17.
19. Woollett G. R., Barclay A. N., Puklavec M., Williams A. F.: Molecular and antigenic of the rat leukocyte-common antigen from thymocytes and T and B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 1985, 15, 73-168.

Adres autora: dr n. med. Brygida Beck, Regionalne Centrum Krwiopławstwa i Krwiolecznictwa w Opolu, ul. Końskiego 55, 45-372 Opole; e-mail: brygida.beck@rckik-opole.com.pl