

## Badania wpływu biegunów „N” oraz „S” stałego pola magnetycznego na apoptozę komórek białaczki ludzkiej HL-60

**Streszczenie.** Artykuł przedstawia wyniki badań *in vitro* przeprowadzone na stanowisku badawczym zaprojektowanym i zbudowanym na Politechnice Wrocławskiej w Laboratorium Badania Zagrożeń Elektromagnetycznych i Bioelektromagnetyzmu mające na celu ustalenie wpływu poszczególnych biegunów N i S stałego pola magnetycznego na apoptozę komórek białaczki ludzkiej HL-60. Badania przeprowadzono we współpracy z Uniwersytetem Medycznym we Wrocławiu w Katedrze i Klinice Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku.

**Abstract.** The paper presents the results of *in vitro* tests carried out on a testing stand designed and built at the Wrocław University of Technology in the Laboratory for Electromagnetic Hazards and Bioelectromagnetism in order to determine the influence of particular poles of N and S of fixed magnetic field on the apoptosis of human leukemia cells HL-60. The tests were carried out in cooperation with the Medical University of Wrocław in the Department and Clinic of Hematology, Blood Cancer and Marrow Transplantation. (**Influence of north and south poles of static magnetic field (SMF) on apoptosis of HL60 cell line.**)

**Słowa kluczowe:** Stałe pole magnetyczne (SMF), bieguny magnetyczne N i S, *in vitro*, komórki białaczki ludzkiej HL-60, apoptoza  
**Keywords:** constant SMF magnetic field, *in vitro*, HL-60 cell, apoptosis

### Wstęp

Organizmy żywe ekspozowane są w środowisku w którym żyją na szeroki zakres częstotliwości pól i fal elektromagnetycznych. Stałe ziemskie pola magnetyczne i elektryczne towarzyszyły ewolucji organizmów żywych od początku ich istnienia i zapewne miały na nią wpływ. Przykładem takiego wpływu może być przeprowadzone badanie podczas którego wykazano, że linie elektroenergetyczne wytwarzają w odległości do 500 metrów pole elektromagnetyczne, które zakłóca pole magnetyczne ziemi, w takim stopniu, że jest ono powodem dezorientacji zwierząt względem bieguna magnetycznego ziemi [1]. Inni naukowcy wykazali wpływ wolnozmiennego pola magnetycznego na obszar mózgu RTPJ. W wyniku takiego oddziaływania zaburzona została czasowo ocena moralna zachowań osób poddanych działaniu tego pola. Eksperyment ujawnił na jak wiele reakcji dotąd nie branych pod uwagę może mieć wpływ pole magnetyczne [2]. Wiele innych ośrodków zajmujących się tego typu problematyką na całym świecie również wykazało wpływ tego czynnika fizycznego jakim jest pole magnetyczne na zachodzące w organizmach żywych procesy biologiczne.[3,4,5].

Jednocześnie od wielu lat trwa nierozstrzygnięta dotychczas dyskusja na temat potencjalnej szkodliwości pól elektromagnetycznych na organizm człowieka. Wolnozmiennne pole magnetyczne już przy natężeniach spotykanych w sąsiedztwie niektórych urządzeń przemysłowych (np. zgrzewarki) może powodować metamorfopsję, zaniewidzenie (pozbawienie wzroku w czasie działania pola – od wartości indukcji kilku mT-badania własne ), ale mogą one również wywierać pozytywne skutki na organizm człowieka, przyczyniając się np. do walki z niektórymi schorzeniami [6,7,8]. Pola magnetyczne znajdują, z jednej strony, zastosowania w medycynie do leczenia niektórych chorób (przy leczeniu ran, szybszego zrostu kości, czy leczenia depresji metodą TMS [9]), z drugiej zaś strony - wiele prac naukowych wskazuje na ich negatywny wpływ na organizm człowieka. W skrajnych przypadkach przy bardzo wysokich wartościach natężenia mogą one doprowadzić do zgonu człowieka w krótkim czasie./ Pomiędzy tak skrajnymi przypadkami oddziaływań tych pól istnieje ogromna ilość sytuacji, w których ze względów zawodowych, zdrowotnych i innych należy rozstrzygnąć problem poziomów bezpiecznej ekspozycji na omawiany czynnik fizyczny.

Z tego powodu ustawodawcy w większości krajów wprowadzają przepisy mające na celu ograniczenie ekspozycji ludzi na działanie tych pól. Jednocześnie należy zwrócić uwagę na to, że coraz więcej krajów zastrzega przepisy związane z ekspozycją na pola ELF (Extremely Low Frequency), pomimo iż obowiązujące dotychczas przepisy powstały na podstawie zaleceń sformułowanych przez specjalizujące się w tej dziedzinie nauki instytucje międzynarodowe, zajmujące się zagadnieniami ochrony przed promieniowaniem, takie jak: Międzynarodowe Towarzystwo Ochrony przed Promieniowaniem (IRPA), Międzynarodowa Komisja Ochrony przed Promieniowaniem Niejonizującym (ICNIRP) oraz Europejski Komitet Normalizacji Elektrotechnicznej (CENELEC). Taki stan rzeczy ujawnia znikomą wiedzę jaką dysponujemy w tym zakresie nauki. Dlatego nadal trwają intensywne prace badawcze mające na celu identyfikację wpływu tego typu czynników fizycznych na organizm człowieka.

Jednocześnie wynikiem przeprowadzonych dotychczas badań dotyczących interakcji pól elektromagnetycznych z materią ożywioną Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC - International Agency for Research of Cancer) zakwalifikowała stałe pola magnetyczne oraz elektryczne jako czynniki nie rakotwórcze [10]. Jednocześnie ta sama Agencja zakwalifikowała pola wolnozmiennne pod względem rakcerogennym w następujący sposób: pola elektryczne 50/60Hz uznała jako czynnik niemożliwy do klasyfikacji jako rakotwórczy dla człowieka (podobnie jak herbata, kofeina) wśród 496 innych czynników i zaliczono go do grupy 3, w której istnieją niepełne dowody epidemiologiczne oraz z badań na zwierzętach na ich rakcerogeny charakter, natomiast pola magnetyczne 50/60 Hz są przypuszczalnym czynnikiem rakotwórczym wśród takich czynników jak (benzyna, spaliny silnika benzynowego – w grupie tej sklasyfikowano łącznie 232 podobne czynniki) i zaliczyli go do grupy 2B w której istnieją ograniczone dowody epidemiologiczne oraz z badań na zwierzętach na ich rakcerogeny charakter.

Przeprowadzone w 2001 roku badania wpływu wolnozmiennego pola magnetycznego na komórki nowotworowe wykazały, że nie jest ono obojętne na zachodzące w nich procesy biologiczne. Wykazano wpływ wolnozmiennego pola magnetycznego na komórki białaczki ludzkiej HL-60. Ekspozując je w polu magnetycznym 50 Hz o indukcji w przedziale 6,9 – 7,1mT wykazano wpływ tego

pola na delokalizację spektry w badanych komórkach. Spektry (białka) tworzące błonę komórkową komórek HL-60 po ekspozycji w polu magnetycznym przemieszczały się w głąb do jądra komórkowego. Świadczyło to o zachodzących w nich procesach apoptotycznych które doprowadziły do śmierci badanych komórek nowotworowych [11].

Zagadnienie wpływu stałego pola magnetycznego na komórki nowotworowe jest ważne ze względu na powszechne występowanie tego czynnika fizycznego w diagnostyce medycznej np. przy stosowaniu Magnetic Resonance Imaging (MRI). W przeprowadzonych dotychczas badaniach z jednej strony wykazano zwiększenie śmiertelności komórek HL-60 poddanych działaniu pola magnetycznego o indukcji 0,5T oraz busulfanu względem grupy poddanej działaniu samego cytostatyka [12]. Jednocześnie te same komórki poddane ekspozycji tylko w samym polu magnetycznym o tej indukcji nie wykazują podwyższonej śmiertelności względem grupy kontrolnej [13,14].

Jednak przeprowadzone dotychczas badania komórek HL-60 w polu SMF nie uwzględniały potencjalnego wpływu poszczególnych biegunów magnetycznych.

Z tego powodu w niniejszej pracy podjęto próbę dokonania oceny wpływu poszczególnych biegunów N oraz S stałego pola magnetycznego SMF na proliferację komórek HL-60 w badaniach in vitro. Przedstawiony materiał stanowi kolejną część prowadzonych interdyscyplinarnych badań biomedycznych.

## Materiały i metody zastosowane w badaniach

### Ekspozycja w stałym polu magnetycznym

Ekspozycja materiału biologicznego polegała na umieszczeniu komórek w stałym polu magnetycznym o indukcji 0,5 T. Stanowisko zaprojektowano w ten sposób, że w grupie badanej znajdowały się trzy próbki. Pierwsza próbka poddawana była wpływowi bieguna pola magnetycznego N, druga podlegała wpływowi pola magnetycznego pomiędzy biegunami N i S, trzecia próbka ekspozycja była w biegunie S Rys1. Ekspozycja na działanie pola magnetycznego wynosiła 72 godziny. Równolegle była prowadzona hodowla komórek odizolowanych od działania pola magnetycznego, która stanowiła grupę kontrolną.

Źródłem pola magnetycznego były magnesy neodymowe wykonane z materiału N48 o wymiarach: długość: 60 mm, szerokość: 60 mm, wysokość: 25 mm, kierunek magnesowania: wzdłuż wymiaru 25 mm. Ciężar elementu magnetycznego wynosi 674 [g]. Własności magnetyczne materiału, z którego wykonano źródło pola magnetycznego przedstawiają się następująco: indukcja remanencji Br 1,38-1,42 [T], koercja HcB min. 835 [kA/m], koercja HcJ min. 875 [kA/m], gęstość energii magnetycznej (BH)max 366-390 [kJ/m<sup>3</sup>]. Kierunek magnesowania wzdłuż wysokości oznacza, że prostopadła do wysokości powierzchnia elementu magnetycznego stanowi biegun "N" a druga przeciwnie prostopadła do wysokości powierzchnia magnesu stanowi biegun "S". Indukcja magnetyczna blisko krawędzi powierzchni bieguna magnetycznego (maksymalna) przy dystansie 0,7 [mm] wynosi ~0,520 [T] [15].

### Pomiar indukcji pola magnetycznego

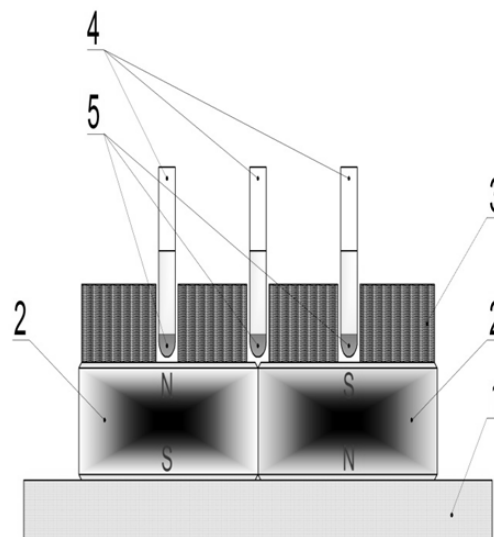
Monitorowanie stałego pola magnetycznego podczas prowadzonych badań przeprowadzono przy pomocy miernika pola magnetycznego F.W.Bell 4048.

Przyrząd pomiarowy F.W.Bell 4048 posiada sondę która umożliwia pomiar tylko jednej składowej indukcji pola

magnetycznego wykorzystując w swym działaniu efekt Halla.

Na zakresie pomiarowym o największej czułości zapewnia on dokładność rzędu 0,01 mT. W celu określenia wartości indukcji magnetycznej w danym punkcie należy w tym przypadku dokonać trzech oddzielnych pomiarów dla poszczególnych składowych: Bx, By oraz Bz, w celu obliczenia wartości skutecznej indukcji w punkcie pomiaru.

Wymiary sond pomiarowych miernika F.W.Bell 4048 dają możliwość pomiaru wartości pola magnetycznego (indukcji magnetycznej) w odległości około 1 mm od jego źródła [12,14].



Rys.1. Stanowisko do ekspozycji komórek HL-60 zastosowane w eksperymencie. Na podstawie oznaczonej nr 1 umieszczono dwa magnesy neodymowe 2, na których umieszczono próbki 4, w których znajdowały się komórki HL-60 oznaczone nr 5 utrzymywane w stelażu nr 3

### Hodowle komórkowe

Eksperymenty prowadzono na komórkach ludzkiej linii białaczkowej mieloblastycznej HL-60, hodowanych w zawieszynie w inkubatorze (Nuair), w standardowych warunkach (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% wilgotność) w pożywce RPMI 1640 (IITD PAN, Wrocław) zawierającej 10% surowicy płodowej cielęcej (Invitrogen, Warszawa) i 100 µg/ml gentamycyny (KRKA-Polska, Warszawa) – podłoże hodowlane.

Komórki używane w badaniach dokarmiano w dniu poprzedzającym eksperyment dodając świeże podłoże i ustalając stężenie na 3-4x10<sup>5</sup>/ml.

Każda grupę stanowiło dwieście tysięcy komórek HL60 w objętości 1 ml podłoża hodowlanego w 5 ml polistyrenowych probówkach hodowlanych (75x12 mm) dostarczonych przez Sarstedt (Warszawa). W grupach które poddano wpływowi cytostatyku jego stężenie wynosiło 12 µg/ml [12,14].

### Ocena apoptozy

Apoptozę komórek HL60 poddanych działaniu pola magnetycznego mierzono metodą cytometrii przepływowej w oparciu o test wiązania aneksyny V i barwienia propydylikiem jodowym (PI). Test wykorzystuje zjawisko obserwowane już we wczesnych etapach apoptozy polegające na utracie asymetrii błony cytoplazmatycznej, w wyniku czego ujemnie naładowane reszty fosfatydyloseryny ekspozowane są z wnętrza do zewnętrznych warstw cytoplazmy. Aneksyna V jest z kolei białkiem o silnym powinowactwie do fosfatydyloseryny. Wyznakowana fluorochromem (FITC, izotiocyanian fluoresceiny) łączy się w obecności jonów wapnia z błonami komórek

apoptotycznych, nie reaguje natomiast z komórkami żywymi. Z kolei jodek propidyny jest barwnikiem tworzącym fluoryzujące addukty z dwuniciowym DNA – nie wybarwia żywych komórek (o zachowanej integralności błony cytoplazmatycznej), wnika natomiast do jąder komórek martwych. Do testu użyto zestawu Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (Becton Dickinson-Pharmingen, San Diego, USA) postępując zgodnie z protokołem producenta. Komórki po ekspozycji na pole magnetyczne i komórki kontrolne z równolegle prowadzonej hodowli kontrolnej wirowano, zawieszano w buforze wiążącym o podwyższonym stężeniu jonów wapnia i inkubowano przez 15 min z roztworem Aneksyny V-FITC i propidylku jodowego (PI). Apoptozę mierzono w cytometrze przepływowym (PAS, Partec, Niemcy), osobno oceniając odsetek komórek wiążących tylko aneksynę V (apoptoza wczesna) oraz jednocześnie aneksynę V i PI (apoptoza późna). Każdorazowo analizie poddawano 15000 komórek [12,14].

### Analizy statystyczne wyników eksperymentalnych

Testy T i przedziały ufności (CI) obliczono za pomocą Excela (Microsoft, Warszawa, Polska). Wartości P mniejsze niż 0,05 są statystycznie istotne.

### Dyskusja wyników z przeprowadzonych badań

Celem przeprowadzonych eksperymentów było sprawdzenie czy poszczególne bieguny N oraz S stałego pola magnetycznego o indukcji 0,5 T powodują wzrost poziomu apoptozy mierzonej metodą cytometrii przepływowej w oparciu o test wiązania aneksyny V i barwienia propidylkiem jodowym (PI) w komórkach białaczki ludzkiej HL-60.

Czas ekspozycji dla każdego z eksperymentów wynosił 72 godziny. W normalnych warunkach (komórki kontrolne) poziom apoptozy był stosunkowo niski i tylko pojedyncze komórki wykazywały właściwości apoptotyczne (Rys. 2).

Eksperymenty wykonano ośmiokrotnie. Z opracowania statystycznego odrzucono wyniki skrajne.

W każdym z przeprowadzonych eksperymentów dokonano pomiaru poziomu apoptozy w komórkach kontrolnych jak i poddanych ekspozycji przez okres 72 godzin w stałym polu magnetycznym od poszczególnych biegunów magnetycznych N oraz S.

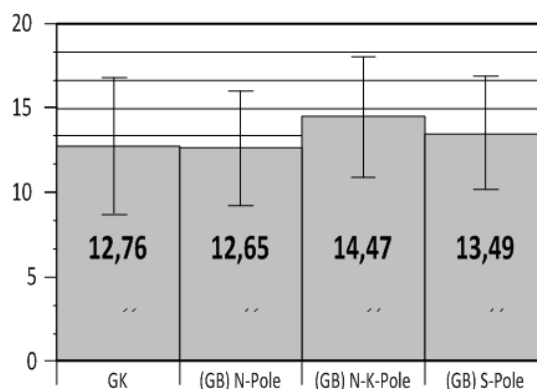
Tabela 1. Wyniki opracowania statystycznego z badań poziomu apoptozy w badanej populacji komórek HL-60 przed i po ekspozycji w stałym polu magnetycznym 0,5T dla poszczególnych grup: grupy kontrolnej (GK), grupy poddanej działaniu bieguna N pola magnetycznego oznaczonej (N-Pole), grupy poddanej działaniu bieguna S pola magnetycznego oznaczonej (S-Pole), grupy poddanej działaniu pomiędzy biegunami N i S pola magnetycznego oznaczonej (N-K Pole)

	Poziom apoptozy w grupie kontrolnej (GK)	Poziom apoptozy w grupie poddanej działaniu pola (GB) N-Pole	Poziom apoptozy w grupie poddanej działaniu pola (GB) S-Pole	Poziom apoptozy w grupie poddanej działaniu pola (GB) N-K Pole
M – średnia	12,76	12,65	13,49	14,47
P – przedział ufności +/-	5,0	4,2	4,3	4,5

Przed każdym pobraniem zawiesina komórek została dokładnie wymieszana. Tabela 1 zawiera wartości dla poszczególnych poziomów apoptozy w komórkach HL-60 występujących w grupie kontrolnej (GK), oraz w grupach

badanych (GB) poddanych działaniu poszczególnych biegunów N oraz S stałego pola magnetycznego. Opracowanie statystyczne uzyskanych wyników z badań oparto na estymacji przedziałowej, polegającej na konstrukcji przedziału liczbowego (przedział ufności dla średniej arytmetycznej), który z prawdopodobieństwem 95% będzie zawierał nieznaną, prawdziwą wartość szacowanego parametru z populacji generalnej.

W tabeli 1 zestawiono wyniki statystycznego opracowania analizowanych badań eksperymentalnych. Zastosowano następujące oznaczenia parametrów rozkładu statystycznego:  $\alpha=0,05$  – poziom istotności, m - wartości średnie, P – przedział ufności.



Rys.2. Ilustracja poziomu apoptozy mierzonej metodą cytometrii przepływowej pod wpływem stałego pola magnetycznego 0,5T. Wykres przedstawia wartości średnie oraz przedziały ufności dla grupy kontrolnej GK oraz grup badanych GB poddanych działaniu pola magnetycznego.

Rysunek 2 ilustruje poziom apoptozy pod wpływem poszczególnych biegunów N oraz S stałego pola magnetycznego o wartości indukcji 0,5T. Wykres przedstawia wartości średnie. Poszczególne kolumny przedstawiają: kolumna GK odpowiadająca grupie kontrolnej, kolumna (GB) N-Pole odpowiadająca grupie badanej poddanej wpływowi bieguna N pola magnetycznego, kolumna (GB) S-Pole odpowiadająca grupie badanej poddanej wpływowi biegunowi P pola magnetycznego oraz kolumna (GB) N-K-Pole odpowiadająca grupie badanej poddanej wpływowi pola magnetycznego umieszczonego pomiędzy biegunami N i S. Wyliczone przedziały ufności dla  $\alpha= 0,05$  zaznaczono pionowymi czarnymi odcinkami.

### Wnioski

Analiza wyników z obserwacji poziomu apoptozy dla poszczególnych grup poddanych działaniu pola magnetycznego N oraz S nie wykazała statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupą kontrolną a grupami badanymi. Nie zaobserwowano wpływu stałego pola magnetycznego o indukcji 0,5 T na poziom apoptozy w badanej populacji dla poszczególnych biegunów magnetycznych.

Wyniki z przeprowadzonych doświadczeń wskazują na celowość przeprowadzenia i rozszerzenia zakresu ekspozycyjnego z rozwinięciem badań o kolejne wyższe wartości stałych pól magnetycznych do wartości powyżej wartości indukcji magnetycznej pola SMF takich, na jakie narażeni są ludzie ekspozycyjni podczas obrazowania w nowo wprowadzonych do użycia aparatach rezonansu magnetycznego.

**Autorzy:** dr Dariusz Szafrowski, Politechnika Wrocławska, Katedra Energoelektryki, ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, E-mail: [dariusz.szafrowski@pwr.edu.pl](mailto:dariusz.szafrowski@pwr.edu.pl), prof. dr hab. med. Kazimierz Kuliczkowski, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku, E-mail: [kazimierz.kuliczkowski@umed.wroc.pl](mailto:kazimierz.kuliczkowski@umed.wroc.pl), mgr inż. Bożena Jaźwiec, Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku, Pracownia Biologii Molekularnej, E-mail: [bozena.jazwiec@umed.wroc.pl](mailto:bozena.jazwiec@umed.wroc.pl), E-mail mgr inż. Jacek Gumiela, Politechnika Wrocławska, Katedra Energoelektryki, ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, E-mail: [jacek.gumiela@pwr.edu.pl](mailto:jacek.gumiela@pwr.edu.pl);

#### LITERATURA

- [1] Burda H., Begall S., Červený J., Neef J., Němec P. Extremely low-frequency electromagnetic fields disrupt magnetic alignment of ruminants. PNAS. 2009.
- [2] Young L., Camprodon, J., Hauser, Pascual-Leone, Saxe R, Disruption of the right temporoparietal junction with transcranial magnetic stimulation reduces the role of beliefs in moral judgments. PNAS. 2010.
- [3] Szafrowski, D., Aksamit-Stachurska, A., Kostyn, K., Mackiewicz, P., & Łukaszewicz, M. (2017). Electromagnetic Field Seems to Not Influence Transcription via CTCT Motif in Three Plant Promoters. Frontiers in plant science, 8, 178.
- [4] Korzeniewska E., Gałązka-Czarnecka I., Czarnecki A., Piekarska A., Krawczyk A., Influence of PEF on antocyanins in wine, Przegląd Elektrotechniczny Nr 1/2018.
- [5] Goćłowski J., Sekulska-Nalewajko J., Korzeniewska E., Piekarska A., The use of optical coherence tomography for the evaluation of textural changes of grapes exposed to pulsed electric field, Computers and Electronics in Agriculture vol. 142 Part A, 2017.
- [6] Krawczyk A., Korzeniewska E., Łada-Tondyra E., Magnetophosphenes – History and contemporary implications, Przegląd Elektrotechniczny Nr 1/2018.
- [7] Szafrowski D.; Jakubaszko J.: Wpływ zmiennego pola magnetycznego na funkcje narządu wzroku. tc, (2005), 1: 1.
- [8] Sieroń, A., et al. "Zastosowanie pól magnetycznych w medycynie." Alfa-Medica Press, Bielsko-Biała (2002).
- [9] Zyss T.: Bezpieczeństwo stosowania magnetoterapii przy stymulacji magnetycznej w okolicach głowy. Fizjoterapia. 1997, 5, 28-31.
- [10] Non-Ionizing Radiation, Part 1: Static and Extremely Low-Frequency (ELF) Electric and Magnetic Fields, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 80 (2002).
- [11] Szafrowski D., Wróblewski Z., Łukaszewicz M., Sikorski A., Majkowski M.: Magnetic field 50 Hz: its influence on living cells HL-60. W: 2011 10th International Conference on Environment and Electrical Engineering [Dokument elektroniczny], Rome, Italy, 8-11 May 2011 / eds. M. Caciotta, Z. Leonowicz. [Piscataway, NJ] : IEEE, cop. 2011. s. 774-777.
- [12] Szafrowski, D., Kuliczkowski, K., Jaźwiec, B., & Gumiela, J. Effect of static magnetic field and Busulfan on HL-60 cell apoptosis. Przegląd Elektrotechniczny, 94, (2018): 109-112
- [13] Sabo, J., et al. "Effects of static magnetic field on human leukemic cell line HL-60." Bioelectrochemistry 56.1 (2002): 227-231.
- [14] Szafrowski D., Kuliczkowski K., Jaźwiec B., Dec M., Gumiela J.; "Badanie wpływu stałego pola magnetycznego na apoptozę komórek białaczki ludzkiej HL-60." Przegląd Elektrotechniczny 92.12 (2016): 169-172.
- [15] [http://www.magnesy.eu/mpl\\_60\\_x\\_60\\_x\\_25\\_n48\\_-\\_magnes\\_neodymowy-t4058.html](http://www.magnesy.eu/mpl_60_x_60_x_25_n48_-_magnes_neodymowy-t4058.html)