

Parametric Modeling of Nerve Cell under the Sinusoidal Environmental 50 Hz Extremely Low Frequency Magnetic Fields

Ebrahimian H ^{*1}, Firoozabadi M², Janahmadi M³, Kaviani Moghadam M²

¹ Department of Biomedical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Medical Physics, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

³ Neuroscience Research Center and Department of Physiology, School of Medicine, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding Author. Tel: +98 4517728694 Fax: +98 4517713141 E-mail: h.ebrahimian@srbiau.ac.ir

Received: 28 Dec 2011 Accepted: 27 Dec 2012

ABSTRACT

Background & Objectives: The development of technology has naturally given rise to an increase in environmental low-frequency electromagnetic fields and consequently has attracted scholars' attention. Most of the studies have focused on transmission lines and power system distribution with 50 Hz. This research is an attempt to show the effect of 50 Hz magnetic fields on bioelectric parameters and indicates the possible influence of this change in F1 cells of *Helix aspersa*.

Methods: The present research used *Helix aspersa* neuron F1 to identify the location of magnetic fields as well as the rate of effects of environmental magnetic fields on nervous system. Control group was used to study the effect of elapsed time, electrode entering and the cell membrane rupture. Intuition group and environmental group were considered in order to study the potential impact of interfering environmental factors and identify the effectiveness rate of magnetic fields, respectively. For the purpose of producing uniform magnetic field Helmholtz coil was used. Electrophysiological recording was realized under the requirements of current clamp. And, in order to show the impacts from magnetic fields on ion channels Hodgkin-Huxley cell model was applied. All data were analyzed taking the advantage of SPSS 16 software and two-way ANOVA statistical test. $P < 0.05$ was considered as significance level. And MATLAB software environment and PSO were used in order for applying the algorithm and estimating the parameters.

Result: No statistically significant difference was found between control and sham groups in different time intervals. Once the 45.87 microtesla was applied significant differences were observed 12 minutes after the application. The highest amount of change happened 14 minutes after the application of more fields. With the application of the field, the amplitude of the sodium action potential shows decreasing trend. No significant changes were observed in different time intervals, whereas significant differences were seen in frequency of action potential during different time intervals. The amplitude of AHP shows no significant changes.

Conclusion: The results indicated that low-frequency magnetic fields with 50 Hz frequency will directly lead to change in bioelectric activities of neurons through a change in amount and rate of opening and closing of ionic channels and the conductivity of sodium and potassium channels reduces together with increase in conductance of potassium dependent calcium channel (AHP).

Key words: Nerve Cells; Current Clamp; Hodgkin-Huxley Model; Ionic Channels; Environmental Electromagnetic Fields

مدلسازی پارامتریک سلول عصبی تحت تاثیر میدان مغناطیسی محیطی ۵۰ هرتز سینوسی

همایون ابراهیمیان^{۱*}، سید محمد فیروزآبادی^۲، مهیار جان احمدی^۳، مهری کاویانی مقدم^۲

^۱ گروه مهندسی پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. ^۲ گروه فیزیک پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. ^۳ مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۵۱۷۷۲۸۶۹۴ فاکس: ۰۴۵۱۷۷۱۳۱۴۱ پست الکترونیک: h.ebrahimian@sbiau.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: رشد تکنولوژی، افزایش میدانهای الکترومغناطیسی کم فرکانس محیطی را به همراه داشته و به تبع، توجه مجامع علمی را به اثرات بیولوژیک این میدانها معطوف کرده است. بیشترین بحث روی خطوط انتقال و توزیع برق با فرکانس ۵۰ هرتز است. هدف این تحقیق نشان دادن اثرات میدانهای مغناطیسی ۵۰ هرتز در محدوده شدت محیطی بر روی پارامترهای بیوالکتریک سلول عصبی F1 حلزون باغی (*Helix aspersa*) می باشد.

روش کار: در این مطالعه از سلول عصبی F1 حلزون باغی جهت شناسایی محل و میزان تاثیر میدانهای مغناطیسی محیطی بر سیستم عصبی مورد استفاده قرار گرفت. گروه کنترل به منظور بررسی تاثیر گذشت زمان و ورود الکتروود و پاره شدن غشاء سلول، گروه شاهد به منظور بررسی تاثیر احتمالی عوامل محیطی مداخله گر و گروه آزمایش برای شناسایی میزان تاثیر میدان مغناطیسی در نظر گرفته شد. برای تولید میدان مغناطیسی یکنواخت از کویل هلمهولتز استفاده شد. ثبت الکتروفیزیولوژیکی از سلول تحت شرایط کلمپ جریان انجام پذیرفته و جهت نشان دادن تاثیرات ناشی از میدانهای مغناطیسی بر روی کانالهای یونی از مدل سلولی هاجکین-هاکسلی استفاده شد. تمامی داده ها با نرم افزار SPSS 16 و آزمون آماری ANOVA دو طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شده و از محیط نرم افزار Matlab جهت اجرای الگوریتم PSO جهت تخمین پارامترها استفاده شد.

یافته ها: در بررسی های پتانسیلهای عمل ثبت شده در گروههای کنترل و شاهد در بازه های زمانی مختلف تغییرات معنی داری از نظر آماری مشاهده نشد. با اعمال میدان مغناطیسی ۴۵/۸۷ میکروتسلا در پتانسیل استراحت غشاء تغییرات معنی داری ۱۲ دقیقه بعد از اعمال میدان مشاهده شد و بیشترین تغییرات ۱۴ دقیقه بعد از اعمال میدان مشاهده شد. دامنه پتانسیل عمل سدیمی با اعمال میدان، روند کاهشی نشان داد و با افزایش زمان اعمال میدان این تغییرات افزایش نشان داد. در بررسی طول مدت زمان پتانسیل عمل در بازه های زمانی مختلف تغییرات معنی دار مشاهده نشد، در صورتیکه فرکانس شلیک پتانسیل عمل در بازه های زمانی مختلف تغییرات معنی داری را نشان داد. بررسی دامنه هیپرپلاریزاسیون متعاقب پتانسیل عمل (AHP) با اعمال میدان مغناطیسی تغییرات افزایشی در جهت منفی نشان داد ولی در بازه های زمانی تغییرات معنی دار آماری نشان نداد.

نتیجه گیری: نتایج حاکی از آن است که میدانهای مغناطیسی فرکانس پایین ۵۰ هرتز در محدوده شدتهای محیطی بطور مستقیم با تغییر در میزان و سرعت باز و بسته شدن کانالهای یونی منجر به تغییر در فعالیتهای بیوالکتریک سلول عصبی می شود و میزان رسانایی کانالهای سدیمی و پتاسیمی کاهش و کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیمی افزایش می یابد.

کلمات کلیدی: سلول عصبی، کلمپ جریان، مدل هاجکین-هاکسلی، کانالهای یونی، میدانهای الکترومغناطیس محیطی

دریافت: ۹۰/۱۰/۷ پذیرش: ۹۱/۱۰/۷

مقدمه

رشد تکنولوژی، افزایش میدانهای مغناطیسی کم فرکانس^۱ محیطی را به همراه داشته و به تبع، توجه مجامع علمی را به اثرات بیولوژیک این میدانها معطوف کرده است. بیشترین بحث روی خطوط انتقال و توزیع نیروی برق با فرکانس ۵۰ هرتز است. همچنین منابع بسیاری در محیط کار و زندگی نیز وجود دارند که در اطراف خود میدانهای الکتریکی و مغناطیسی با فرکانس ۵۰ هرتز ایجاد می‌نمایند و با افزایش سطح مصرف انرژی، مقدار تابش این میدانها در محیط افزایش می‌یابد [۱-۳].

میدانهای مغناطیسی کم فرکانس در محدوده ۳ تا ۳۰۰۰ هرتز قرار دارد و با توجه به انرژی پایین، در برخورد با سیستمهای بیولوژیک نمی‌توانند منجر به اثرات گرمایی و یونیزاسیون شوند. بنابراین مکانیزمهای مؤثر دیگری در برخورد این میدانها با سیستمهای زنده مطرح بوده که یافتن این مکانیزمها و بررسی تاثیرگذاری این میدانها با سیستمهای زنده انسان مستلزم تحقیقات علمی است [۳-۵]. بطور کلی تولید میدانهای مغناطیسی ناشی از عبور جریان است. با در نظر گرفتن پیشرفت تکنولوژی، شدت میدانهای مغناطیسی متغیر ساخت بشر، بیشتر از شدت میدانهای مغناطیسی طبیعی است و در نتیجه آن میزان تابش میدانهای مغناطیسی کم فرکانس نیز افزایش یافته است. شدت میدانهای مغناطیسی محیطی متوسط در محدوده ۴۰ الی ۶۰ میکروتسلا است [۶،۷].

آزمایشات حیوانی، مطالعات سلولی، بررسیهای کلینیکی و شبیه سازی کامپیوتری از جمله روشهایی می‌باشند که می‌توانند راهگشایی برای رسیدن به تاثیر میدانهای مغناطیسی بر روی سیستم عصبی باشد [۸]. حلزون و سایر بی‌مهرگان اگر چه در سطح ارگانیسم و اندامها تفاوت فاحشی را با مهره‌داران و

پستانداران نشان می‌دهند ولی در سطح سازمان مولکولی تا حد زیادی با آنها مشابه‌اند. این حیوانات ضمن داشتن سیستم عصبی ساده، بزرگترین نورونها را در سلسله جانوران دارند و از این جهت برای مطالعه فرآیندهای سلولی و مولکولی به خصوص در ثبت داخل سلولی از مناسبترین نمونه‌ها به شمار می‌آیند [۹].

شواهد بدست آمده حساسیت سیستم عصبی را به میدانهای مغناطیسی مطرح می‌کنند و پاسخ سلولهای عصبی به این میادین از الگوهای متفاوتی برخوردار است که ناشی از ویژگیهای کانالهای یونی و تعداد آنها در غشاء سلول عصبی می‌باشد [۱۰،۱۱]. نتایج تحقیقات انجام شده نشان می‌دهند که اثرات میدانهای الکترومغناطیس کم فرکانس ناشی از تأثیر این میدانها بر روی نفوذپذیری غشاء سلول است. بنابراین مطالعه وقایعی که در هنگام انتقال پیامهای عصبی در حین اعمال میدان ایجاد می‌شود، گام بزرگی در فهم اثرات بیولوژیکی این میدانها می‌باشند [۱۲].

عملکرد کانالهای یونی حساس به ولتاژ، وابسته به اختلاف ولتاژ دو طرف غشاء سلول می‌باشد. بنابراین هر عاملی که توانایی تغییر ولتاژ دو طرف غشاء سلول را داشته باشد، محرکی در جهت تغییر روند عملکرد کانالهای یونی از طریق تحت تأثیر قرار دادن و باز و بسته شدن آنها می‌شود. در جهت بررسی مکانیزمهای مؤثر در بروز اثرات بیولوژیک میدانهای مغناطیسی کم فرکانس اشاره می‌شود که غشاء سلول و کانالهای یونی، نقش اصلی را در تحریک و فعالیت سلولهای تحریک‌پذیر از جمله نورونها دارند. بنابراین تغییر عملکرد این کانالها ممکن است در بروز برخی عوارض از جمله تغییر در سطح فعالیت پایه نورونها مؤثر باشد [۱۳].

همچنین مدلی که بتواند تغییرات حاصله را در پارامترهای مشخصی نشان دهد، می‌تواند در فهم چگونگی اثرگذاری این میدان بر روی سیستمهای

¹ ELF-EMF (Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields)

NaCl(80), KCL(4), CaCl₂(10), Glucose(10), MgSO₄(5), HEPES(10) بود و PH آن با افزودن TRISMA base در حد ۷/۴-۷/۶ تنظیم می‌شد [۱۵].

گروههای آزمایشی

جمعیت مورد مطالعه شامل سه گروه کنترل، شاهد و آزمایشی بود. گروه کنترل به منظور بررسی تاثیر گذشت زمان، ورود الکتروود و پاره شدن غشاء و بررسی احتمال نشت یونها از طریق محل ورود الکتروود و تاثیر میدانهای مغناطیسی مفید بر روی فعالیتهای بیوالکتریک سلول، در نظر گرفته شد. در این گروه ثبت فعالیت الکتریکی سلول در رینگر استاندارد بدون اعمال میدان الکترومغناطیس انجام شد. بعد از آماده سازی سلول در فواصل زمانی ۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸ و ۲۰ دقیقه، در حالیکه دستگاه مولد میدان مغناطیسی خاموش بود ۶ ثبت متوالی به فواصل ۲ دقیقه‌ای انجام شد (شکل ۱).

گروه شاهد به منظور بررسی تاثیر احتمالی عوامل محیطی مداخله‌گر از جمله میدانهای مغناطیسی تولید شده ناشی از روشن شدن مولد میدان مغناطیسی و تقویت کننده صوتی (جهت تطبیق امپدانس) بر فعالیتهای بیوالکتریک سلول، در نظر گرفته شد. به این منظور بعد از آماده سازی سلول و ثبت اولیه بدون تحریک مغناطیسی، فقط دستگاه مولد میدان مغناطیسی و تقویت کننده صوتی روشن بود و در فواصل زمانی ۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸ و ۲۰ دقیقه، ۶ ثبت متوالی به فواصل ۲ دقیقه‌ای مطابق شکل ۲ انجام شد.

سیگنال ژنراتور و سیستم مولد میدان مغناطیسی

از آی سی سیگنال ژنراتور XR2206 (EXAR Corporation, CA) با توجه به ویژگی‌های مناسب آن، برای ایجاد شکل موج سینوسی با فرکانس ۵۰ هرتز استفاده شد. سیگنال‌ها با استفاده از تقویت کننده صوتی تقویت شده و در هر بار آزمایش شکل موج و محتوی هارمونیک سیگنال‌ها با اسیلوسکوپ دیجیتالی (TNM DSO Software)

بیولوژیکی راهگشا باشد [۱۴]. در بین مدل‌های سلولی ارائه شده، مدل سلولی هاجکین - هاکسلی^۱ به دلیل دارا بودن خصوصیات غیرخطی، نه تنها مدل مناسبی برای تولید پتانسیل عمل سلول می‌باشد بلکه خصوصیات مهمی در تحریک‌پذیری نوری و همچنین فعال یا عدم فعال بودن جریانهای وابسته به ولتاژ را در مقیاسهای زمانی مختلف تشریح می‌کند. همچنین به دلیل اختصاصی بودن کانالهای یونی برای تمامی یونهای طرفین غشاء سلول به راحتی می‌توان رفتار هر کانال را بصورت پارامتری بیان کرد و با ثبت پتانسیل عمل سلول در دوره‌های قبل و بعد از اعمال میدان این پارامترها را با الگوریتم PSO^۲ محاسبه نمود. با محاسبه میزان رسانائی‌های کانالهای سدیمی، پتاسیمی و پتاسیمی تاخیری^۳ از روی پارامترهای بدست آمده میزان تاثیر میدان مغناطیسی محیطی بر روی کانالهای یونی سلول مشخص خواهد شد.

روش کار

حیوانات

در همه آزمایش‌ها از حلزون باغی^۴ به عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده شد. این حلزون‌ها از استان‌های شمالی کشور جمع‌آوری شده و در شرایط آزمایشگاه نگهداری و با کاهو تغذیه می‌شدند. روش انجام کار توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تایید شده است.

حلزون‌ها ابتدا با قرار گرفتن در آب فعال شده سپس صدف حیوان با انبر استخوان شکن خرد شده و حلزون به کمک سر سوزن روی قطعه چوب پنبه ثابت می‌شد. سلول‌های F1 بعد از شناسایی در محفظه ثبت داخل سلولی در رینگر نرمال قرار می‌گرفتند. محلول رینگر نرمال حلزون به میلی‌مولار شامل:

¹ Hodgkin-Huxley Model

² Particle Swarm Optimization

³ Afterhyperpolarizing (AHP)

⁴ *Helix aspersa*

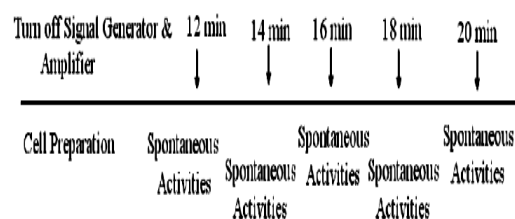
ثبت الکتروفیزیولوژی

مجموعه گانگلیونی در محفظه ثبت حاوی محلول رینگر نرمال قرار داده می‌شد و با میکروسکوپ سلول‌ها رویت می‌شدند. سلول عصبی F1 بر اساس موقعیت، اندازه و شکل ظاهری به وسیله میکروسکوپ شناسایی می‌شد. عمل ثبت با استفاده از میکروالکترودهای شیشه‌ای انجام می‌شد که از میکروپیپت‌های دیواره نازک از جنس بروسیلیکات (Clark, UK inner filament with) و با کمک یک میکروالکتروود پولر افقی (Sutter, USA) تهیه می‌شدند و با محلول KCL سه مولار پر شده و به ورودی پیش‌تقویت‌کننده وصل می‌شد و سپس به آمپلی‌فایر مبدل A/D (Axoclamp, USA 2B) متصل می‌گردید. میکروالکترودها دارای مقاومت ۲-۷ مگا اهم بودند. نوک میکروالکترودها به کمک مانیپولاتور به سمت سلول مورد نظر هدایت و وارد سلول می‌شد. پس از ورود الکتروود به نورون، ثبت پایه بعمل می‌آمد و در صورتیکه نورون از نظر ویژگی‌های الکتریکی غشاء از جمله تثبیت پتانسیل استراحت غشاء، وضعیت مناسب و پایداری داشت، ثبت پتانسیل‌های غشایی در وضعیت تکنیک کلمپ (گیرش) جریان^۲ در شرایط کنترل، شاهد و آزمایش به عمل می‌آمد [۷]. جهت حذف میدانهای مغناطیسی محیطی تمامی آزمایشها در داخل قفس فارادی انجام گرفت [۱۴].

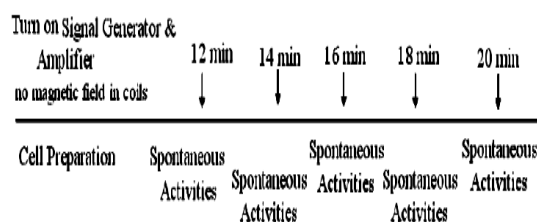
مدل هاجکین - هاکسلی در سلولهای عصبی

نورونهای عصبی در سطح وسیعی مورد مطالعه قرار می‌گیرند. برای مدلسازی تک سلول در شبکه عصبی، تعداد و نوع کانالها، رفتار سلول نسبت به تحریک و عملکرد ذاتی سلول، پارامترهای بسیار مهم در تعیین مدل است [۱۲]. این مدل شامل حداقل مجموعه‌ای از جریانهای یونی وابسته به ولتاژ نسبت به داده‌های بدست آمده است. ثبتهای داخل سلولی از سلول F1

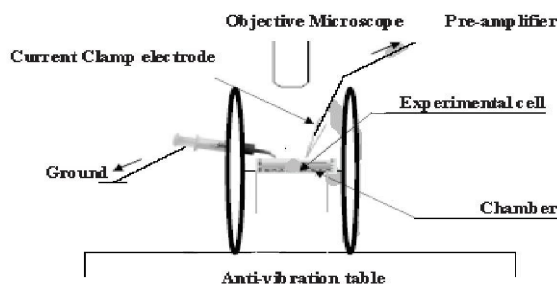
مورد بررسی قرار می‌گرفت. پس از ایجاد سیگنال و تقویت آن، خروجی تقویت‌کننده به کویل‌های ایجاد میدان مغناطیسی (شکل ۳) متصل می‌شد. برای ایجاد فرکانس و شار میدان مغناطیسی یکنواخت از کویل هلمهولتز استفاده شد. این کویل شامل یک جفت سیم‌پیچ دایره‌ای می‌باشد که از سیم مسی روکش‌دار با قطر ۰/۵ میلی‌متر و ۳۲۵ دور با قطر داخلی ۲۰ سانتی‌متر ساخته شده بود. فاصله بین سیم‌پیچ‌ها برابر شعاع کویل تنظیم گردید و محفظه ثبت داخل سلولی روی محور میانی در فضای بین دو کویل قرار می‌گرفت. چکالی شار میدان مغناطیسی در فضای بین دو کویل با دستگاه سنجش میدان مغناطیسی (TES1394) اندازه‌گیری می‌شد.



شکل ۱. الگوی زمانی مراحل ثبت داخل سلولی در گروه کنترل



شکل ۲. الگوی زمانی مراحل ثبت داخل سلولی در گروه شاهد

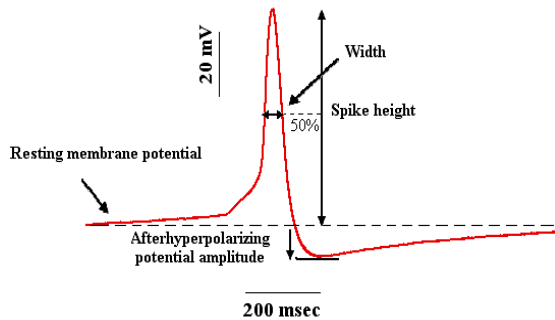


شکل ۳. نمایی شماتیکی از وضعیت کویل‌های مولد میدان مغناطیسی و اجزاء ثبت داخل سلولی

¹ Analog to Digital Convertor

² Current Clamp

ذخیره می‌شدند. در هر نورون از روی فعالیتهای خودبه‌خودی، پتانسیل استراحت^۱ اندازه‌گیری شده و میانگین آنها محاسبه گردید. فاصله بین اسپایکها^۲ به شکل فاصله بین دو قله پتانسیل عمل و مدت پتانسیل عمل در ۵۰٪ دامنه اسپایکها اندازه‌گیری شد. همچنین دامنه پتانسیل عمل و هیپرپلاریزاسیون متعاقب از سطح پتانسیل استراحت غشاء محاسبه گردید (شکل ۴).



شکل ۴. نحوه اندازه‌گیری ویژگی‌های پتانسیل عمل

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Chart 6 انجام شد. مقادیر کمی به صورت $S.E.M \pm Mean$ بیان شده است. آزمون مقایسه میانگین‌ها با روش ANOVA دو طرفه با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد. $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شده است. از محیط نرم‌افزار Matlab جهت اجرای الگوریتم PSO جهت تخمین پارامترها استفاده شده است.

یافته‌ها

ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک سلول عصبی F1 در گروه کنترل

به منظور بررسی خواص ذاتی غشاء سلول عصبی و محلول مورد استفاده (رینگر) و همچنین تاثیر گذر زمان، از داده‌های فعالیتهای خودبه‌خودی گروه

حلزون باغی در رینگر استاندارد نشان دهنده جریان رو بدخل سدیمی و کلسیمی و رو به خارج پتاسیمی سریع و تاخیری و پتاسیمی وابسته به کلسیمی برای تنظیم شلیک فرکانس و دامنه پتانسیل متعاقب هیپرپلاریزاسیون است. همچنین جریان نشستی ناشی از جریانهای پتاسیمی در سلول در نظر گرفته شده است. جریانهای کلسیمی رو به داخل فقط زمانی آشکار می‌شود که جریان سدیمی مهار شود و در غیر اینصورت تحت تاثیر کامل جریانهای سدیمی هستند. بنابراین در کل جریانهای سدیمی، پتاسیمی، پتاسیمی وابسته به کلسیمی و جریان نشستی در نظر گرفته شده است.

(۱) جریان رو به داخل سدیمی

$$I_{Na} = g_{Na(MAX)} m^3 h (V - V_{Na})$$

(۲) جریان رو به خارج پتاسیمی سریع

$$I_K = g_{K(MAX)} n^4 (V - V_K)$$

(۳) جریان رو خارج پتاسیمی وابسته به کلسیم

$$I_A = g_{a(MAX)} a^3 b (V - V_A)$$

(۴) جریان نشستی

$$I_L = g_L (V - V_L)$$

و در نهایت مدل سلولی بصورت زیر در نظر گرفته شد.

$$C_m \frac{dV}{dt} = g_{Na} m^3 h (V - V_{Na}) + g_K n^4 (V - V_K) + g_A a^3 b (V - V_A) + g_L (V - V_L)$$

آنالیز داده‌ها

با مراجعه به مقالات مربوطه تعداد نمونه‌های هر گروه جهت بدست آوردن نتایج الکتروفیزیولوژیک و مدلسازی بین ۴ الی ۶ تخمین زده شد. سیگنال‌ها با نرخ نمونه برداری ۳۰ کیلو هرتز ثبت می‌شدند و با استفاده از مبدل آنالوگ به دیجیتال A/D رقمی شده و اطلاعات در رایانه به کمک نرم‌افزار Chart 6

¹ Resting Membrane Potential

² Interspike Interval (ISI)

آزمایشات مورد نظر در داخل قفس فارادی انجام شد. کلیه میدانهای محیطی در داخل قفس ناچیز بوده و تنها دو دستگاه سیگنال ژنراتور و تقویت کننده صوتی در محدوده قفس موجود بود. لذا جهت بررسی تاثیر نویزهای محیطی بر فعالیت بیوالکتریک سلولهای عصبی، گروه شاهد در نظر گرفته شد. در این گروه سیگنال ژنراتور و تقویت کننده صوتی روشن بوده ولی ارتباط آن با کویلهای مولد میدان قطع بود. روند بررسی در این گروه همانند گروه کنترل بود و ویژگیهای ۳۰ پتانسیل عمل مورد بررسی قرار گرفت و نتایج بصورت $S.E.M \pm Mean$ ارائه شد (جدول ۲).

آزمونهای آماری انجام شده در گروه کنترل، در گروه شاهد نیز انجام پذیرفت و مشابه با نتایج بدست آمده در گروه کنترل، روند تغییرات تدریجی در ویژگیهای پتانسیل عمل مشاهده شد ولی در هیچ یک از فواصل زمانی تغییرات معنی داری مشاهده نشد ($p > 0.05$ و $n = 30$). بنابراین فعالیت بیوالکتریک

کنترل جهت ارائه نتایج الکتروفیزیولوژیک و مدلسازی استفاده شد. برای ارائه نتایج الکتروفیزیولوژیک در این گروه، از ۶ نمونه سلول عصبی F1 ثبت شده، از هر بازه زمانی ویژگیهای ۳۰ پتانسیل عمل، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بصورت $S.E.M \pm Mean$ ارائه شده است (جدول ۱).

در این گروه از ویژگیهای ۳۰ پتانسیل عمل انتخاب شده از هر بازه زمانی، پارامترهای پتانسیل استراحت غشاء، فرکانس شلیک پتانسیل عمل، دامنه پیک پتانسیل عمل، دامنه پیک منفی پتانسیل عمل، طول مدت پتانسیل عمل با آزمون آماری ANOVA دوطرفه نسبت به بازه زمانی ثبت اولیه انجام شد و تغییرات معنی داری مشاهده نشد. بنابراین فعالیت بیوالکتریک سلولهای عصبی F1 با گذشت زمان تغییرات معنی دار نشان نمی دهد ($p > 0.05$ و $n = 30$).

ویژگی های الکتروفیزیولوژیک سلول عصبی F1 در گروه شاهد

در جهت حذف نویز از ثبتهای داخل سلولی،

جدول ۱. ویژگیهای الکتروفیزیولوژیک سلولهای عصبی F1 در گروه کنترل

زمان دقیقه	۰	۱۲	۱۴	۱۶	۱۸	۲۰
پتانسیل استراحت غشاء mV	-۴۱/۹±۰/۵۳	-۴۲/۲±۰/۰۴	-۴۲/۱±۰/۲۹	-۴۱/۲۱±۰/۳۱	-۴۰/۹۷±۰/۲۵	-۴۰/۸۷±۰/۲۴
فرکانس شلیک پتانسیل عمل Hz	۲/۲۹±۰/۰۸	۲/۲۹±۰/۰۷	۲/۲۸±۰/۰۶	۲/۲۷±۰/۰۷	۲/۲۱±۰/۰۷	۲/۲۹±۰/۰۵
دامنه پیک مثبت پتانسیل عمل mV	۴۱/۳۹±۳/۹۳	۴۱/۳۷±۳/۳۴	۴۱/۷۲±۳/۰۰	۴۱/۷۳±۲/۹۸	۴۱/۷۳±۳/۱۲	۴۱/۷۷±۳/۷۹
دامنه پیک منفی پتانسیل عمل mV	-۵۰/۸۶±۰/۳۹	-۵۰/۷۲±۰/۴۱	-۵۰/۵۳±۰/۵۵	-۵۰/۵۷±۰/۵۸	-۵۰/۵۷±۰/۵۹	-۵۰/۵۵±۰/۵۷
طول مدت پتانسیل عمل ms	۵/۷۱±۰/۱۳	۵/۷۲±۰/۱۳	۵/۷۱±۰/۱۴	۵/۷۴±۰/۱۴	۵/۷۷±۰/۱۶	۵/۷۵±۰/۱۵

جدول ۲. ویژگیهای الکتروفیزیولوژیک سلولهای عصبی F1 در گروه شاهد

زمان دقیقه	۰	۱۲	۱۴	۱۶	۱۸	۲۰
پتانسیل استراحت غشاء mV	-۴۱/۹۹±۰/۵۱	-۴۲/۰۷±۰/۵۲	-۴۲/۱۲±۰/۵۲	-۴۱/۰۶±۰/۵۳	-۴۲/۹۷±۰/۵۴	-۴۲/۲±۰/۴۹
فرکانس شلیک پتانسیل عمل Hz	۲/۴۴±۰/۰۸	۲/۴۱±۰/۰۷	۲/۴۲±۰/۰۸	۲/۴۰±۰/۰۷	۲/۴۱±۰/۰۸	۲/۴۳±۰/۰۹
دامنه پیک مثبت پتانسیل عمل mV	۳۸/۱۹±۳/۶۴	۳۷/۲۶±۳/۳۴	۳۹/۱۷±۲/۹۸	۳۷/۲۱±۳/۱۱	۳۸/۱۴±۳/۲۳	۳۹/۵۷±۳/۹۱
دامنه پیک منفی پتانسیل عمل mV	-۵۲/۶۱±۰/۶۷	-۵۳/۰۲±۰/۷۸	-۵۳/۰۱±۰/۶۱	-۵۲/۹۶±۰/۵۹	-۵۲/۷۵±۰/۵۸	-۵۲/۸۷±۰/۵۹
طول مدت پتانسیل عمل (دیوریشن) ms	۵/۲۲±۰/۱۲	۵/۱۹±۰/۰۹	۵/۱۷±۰/۱۴	۵/۱۸±۰/۱۶	۵/۲۳±۰/۱۹	۵/۱۹±۰/۱۴

طول مدت زمان^۱ پتانسیل عمل

اعمال میدان مغناطیسی با این شدت تاثیری معنی‌داری بر روی طول مدت زمان پتانسیل عمل نداشت. در گروه کنترل طول مدت زمان پتانسیل عمل 12 ± 0.99 ms بود و در بازه‌های زمانی مختلف تغییرات معنی‌دار مشاهده نشد ($p > 0.05$) و $n = 30$.

فرکانس شلیک پتانسیل عمل

اعمال میدان مغناطیسی با این شدت تاثیر معنی‌داری در بازه‌های زمانی مختلف نسبت به گروه کنترل داشت ($p < 0.05$ و $n = 30$). بطوریکه در شرایط کنترل فرکانس شلیک پتانسیل عمل 3.3 ± 0.06 Hz بود و ۱۴ دقیقه بعد از اعمال میدان مغناطیسی به 1.04 ± 0.07 Hz رسید.

دامنه هیپرپلاریزاسیون متعاقب پتانسیل عمل (AHP)

اعمال میدان مغناطیسی با این شدت باعث منفی‌تر شدن دامنه هیپرپلاریزاسیون متعاقب پتانسیل عمل می‌شود و با افزایش مدت زمان اعمال میدان این تغییرات بیشتر می‌شود. آزمونهای آماری در بازه‌های زمانی مختلف تغییرات معنی‌داری را نشان نداد ($p > 0.05$ و $n = 30$).

بطوریکه دامنه هیپرپلاریزاسیون متعاقب پتانسیل عمل سلول در شرایط کنترل 2.17 ± 0.19 mV بود و ۱۴ دقیقه بعد از اعمال میدان مغناطیسی خارجی به مقدار میانگین 2.77 ± 0.11 mV و ۲۰ دقیقه بعد از اعمال میدان به مقدار میانگین 2.19 ± 0.97 mV رسید. نتیجه اینکه برای میدان $45/87$ میکروتسلا با فرکانس ۵۰ هرتز سینوسی، ۱۴ دقیقه بعد از اعمال میدان بعنوان نقطه بحرانی انتخاب می‌شود (شکل ۵).

سلولهای عصبی F1 تاثیرپذیر از میدانهای الکترومغناطیس و نویز ناشی از روشن شدن دستگاههای سیگنال ژنراتور و تقویت کننده صوتی نیست. بنابراین هر تغییر معنی‌دار آماری در پارامترهای مستخرج از پتانسیل عمل در اثر اعمال میدان مغناطیسی خارجی ناشی از اعمال میدان مغناطیسی خواهد بود.

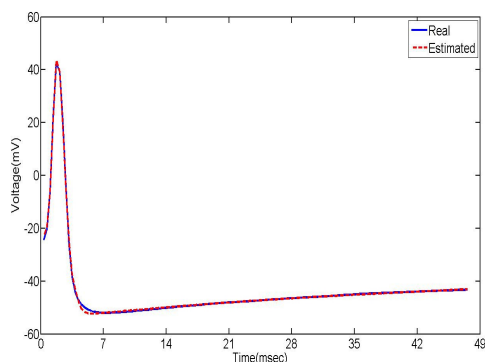
نتایج حاصل از اعمال میدان مغناطیسی ۴۵/۸۷**میکروتسلا با فرکانس ۵۰ هرتز سینوسی****پتانسیل استراحت غشاء**

اعمال میدان مغناطیسی با این شدت باعث دپلاریزه شدن پتانسیل استراحت غشاء سلول عصبی گردید. با اعمال میدان مغناطیسی به مدت ۱۲ دقیقه طبق آزمونهای آماری تغییرات معنی‌داری مشاهده شد و بیشترین تغییر ۱۴ دقیقه بعد از اعمال میدان بود. ($p < 0.05$ و $n = 30$) بطوری که میانگین پتانسیل استراحت غشاء سلول در شرایط کنترل 43.19 ± 0.71 mV بود و بعد از ۱۴ دقیقه اعمال میدان به 32.79 ± 0.91 mV رسید. با افزایش مدت زمان اعمال میدان مغناطیسی میزان تغییر پتانسیل استراحت کمتر می‌شد.

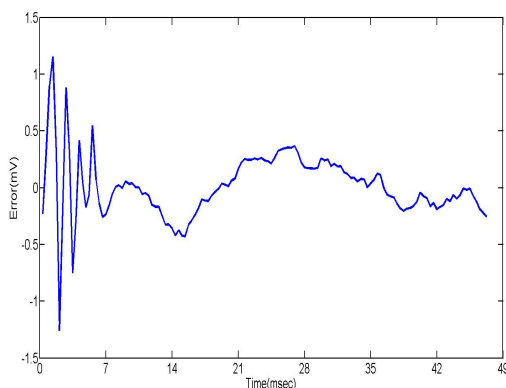
دامنه پتانسیل عمل سدیمی

اعمال میدان مغناطیسی با این شدت باعث کاهش دامنه پتانسیل عمل گردید. بعد از ۱۲ دقیقه اعمال میدان تغییر معنی‌داری در دامنه پتانسیل عمل نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد و با افزایش مدت زمان اعمال میدان مغناطیسی به ۱۴ دقیقه، تغییرات معنی‌دار شد ($p < 0.05$ و $n = 30$). بطوریکه میانگین دامنه پتانسیل عمل سدیمی در شرایط کنترل 31.96 ± 2.23 mV بود و ۱۴ دقیقه بعد از اعمال میدان مغناطیسی به مقدار میانگین 26.66 ± 2.11 mV رسید و ۲۰ دقیقه بعد از اعمال میدان به 25.96 ± 3.02 mV رسید.

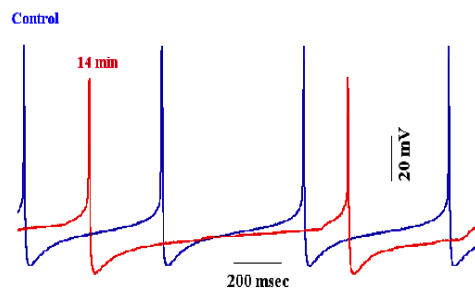
^۱ Duration



شکل ۶. نمونه پتانسیل عمل ثبت شده و تخمین زده شده در شرایط ۱۴ دقیقه بعد از اعمال میدان ۴۵/۸۷ میکروتسلا ۵۰ هرتز سینوسی



شکل ۷. میزان خطای لحظه‌ای پتانسیل عمل واقعی و تخمین زده شده در شرایط اعمال میدان ۴۵/۸۷ میکروتسلا بعد از ۱۴ دقیقه اعمال میدان



شکل ۸. تاثیر میدان مغناطیسی ۱۴ دقیقه بعد از اعمال میدان ۴۵/۸۷ میکروتسلا ۵۰ هرتز سینوسی

جهت مدلسازی سلول، از بازه زمانی شرایط کنترل به تعداد نمونه‌های ثبت شده (از هر نمونه یک پتانسیل عمل) ($n=6$) و از بازه زمانی بیشترین تاثیر میدان نیز مشابه شرایط کنترل پتانسیل عمل سلول انتخاب شد. در مدل مورد نظر تمامی اعداد ثابت بصورت پارامتر در نظر گرفته شد (۱۵ پارامتر برای رسانایی سدیمی، ۹ پارامتر برای رسانایی پتاسیمی سریع، ۱۷ پارامتر برای رسانایی جریان AHP، ۲ پارامتر برای جریان نشستی و ۱ پارامتر برای ظرفیت خازنی) با انجام الگوریتم PSO، ۴۴ پارامتر محاسبه گردید. (شکل‌های ۶ و ۷) و از روی مقادیر بدست آمده میزان رسانایی سدیمی، پتاسیمی سریع و تاخیری محاسبه شد (جدول ۳).

جدول ۳. میانگین پارامترهای مدل هاجکین-هاکسلی سلول عصبی F1 در شرایط کنترل و ۱۴ دقیقه بعد از اعمال میدان ۴۵/۸۷ میکروتسلا سینوسی ۵۰ هرتز

پارامتر	شرایط	میانگین قبل از اعمال میدان (شرایط کنترل)	میانگین بعد از اعمال میدان (نقطه بحرانی)
$G_{Na} = \overline{G_{Na}} m^3 h (mS)$	دامنه پیک مثبت	۰/۲۹۱۰	۰/۲۸۴۰
$V_{Na} (mV)$		۴۷/۹۲۰	۴۸/۱۲۹
$G_k = \overline{G_k} n^4 (mS)$	دامنه پیک مثبت	۰/۰۵۳۴	۰/۰۵۳۳
$V_K (mV)$		-۶۳/۷۹۳	-۶۴/۱۷۸
$G_{a(AHP)} = \overline{G_a} a^3 b (mS)$	دامنه پیک منفی	۰/۰۰۴۹۰	۰/۰۰۵۱۵
$V_{a(AHP)} (mV)$		-۶۷/۸۲۷	-۶۹/۷۵۶
$G_L (mS)$		۰/۰۰۱۲	۰/۰۰۱۲
$V_L (mV)$		-۲۲/۱۹۲	-۲۰/۰۱۶۴
$C_m (\mu F / cm^2)$		۱/۰۰	۱/۰۱
MSE		۰/۱۹۸۳۷۸	۰/۲۵۴۰۴

بحث

هدف تحقیق حاضر بررسی تاثیر میدانهای مغناطیسی کم فرکانس محیطی با فرکانس ۵۰ هرتز بر روی پارامترهای سلول عصبی و نشان دادن این تاثیرات بر روی مدل سلول عصبی می‌باشد.

در سطح سلولی یکی از روشهای ممکن برای نشان دادن اثرات بیولوژیک میدانهای مغناطیسی بررسی تاثیر این میدانها بر غشاء سلول عصبی است و می‌توان مکانیزم این اثر را در مجموعه‌ای از پروتئین‌هایی که در غشاء دو لایه چربی وجود دارند و کانالهای یونی را تشکیل می‌دهند، با استفاده از تکنیک‌های الکتروفیزبولوژی نشان داد. مکانیزم دقیقی که نشان دهد چگونه میدان های مغناطیسی باعث تغییر در تحریک پذیری فعالیت سلول ها می شوند، مشخص نیست. اما این بر هم کنش می‌تواند به علت تغییرات در کینتیک کانال های یونی در غشاء باشد. [۱۶].

نتایج حاصل از بررسی حاضر نشان می‌دهد که اعمال میدان مغناطیسی با فرکانس ۵۰ هرتز با شدت ثابت، در بازه‌های زمانی مختلف منجر به تغییر پارامترهای بیوالکتریک سلول عصبی می‌شود و نشان دادن این تغییرات بر روی مدل سلول عصبی، محل تاثیر و میزان آن را نشان می‌دهد.

در سلول های عصبی حلزون، کانال های سدیمی وابسته به ولتاژ که در ایجاد جریانات رو به داخل در فاز بالا رو نقش دارند سهم اصلی را بر عهده دارند، جریانات سدیمی رو به داخل با دپولاریزاسیون غشاء تا حد آستانه و باز شدن کانال های سدیمی فعال می‌شوند. این جریانهای سدیمی سریع فعال شده (۱ تا ۲ میلی‌ثانیه) و با ثابت زمانی کمتر از ۱۰ میلی ثانیه غیرفعال می شوند. در روند رپولاریزاسیون پتانسیل عمل انواعی از کانال های پتاسیمی وابسته به ولتاژ مشارکت دارند [۱۸،۱۷]. نه تنها کانال های پتاسیمی وابسته به ولتاژ بلکه کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم نیز در این فاز فعال می‌شوند. دو گروه عمده

کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم نوروں ها، BK^۱ (هدایت بالا) و SK^۲ (هدایت پائین)، در نوروں های حلزون شناسایی شده‌اند. کانال های BK و SK نقش شناخته شده‌ای در ایجاد AHP و تنظیم الگوی firing دارند. البته کانال های BK بخاطر کینتیک سریع در رپولاریزاسیون پتانسیل عمل نیز سهیم اند در حالی که کانال های SK در رپولاریزاسیون پتانسیل عمل شرکت می‌کنند ولی در فرکانس های بالا شدیداً فعال شده و بعنوان یک عامل بازدارنده قوی firing عمل می‌کنند [۲۰،۱۹]. کاهش دامنه پتانسیل در شدت مورد بررسی ناشی از تغییرات زمانی فعال و غیر فعال شدن کانالهای سدیمی می‌باشد و افزایش دامنه AHP ناشی از تغییر رفتار کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم است. یون کلسیم به دلیل داشتن بار مثبت بیشتر نسبت به سدیم و پتاسیم بیشترین تغییر را به محرک میدانهای خارجی نشان می‌دهد [۲۰].

نتایج تحقیق حاضر عدم وجود تغییرات معنی‌داری در دامنه متعاقب هیپرپلاریزاسیون به دنبال اعمال میدان مغناطیسی به کار رفته بود ولی به دلیل هیپرپلاریزه شدن غشاء سلول این اثر در فرکانس ۵۰ هرتز مشهود نیست.

تغییر پتانسیل استراحت غشاء در فرکانس ۵۰ هرتز بصورت دپلاریزاسیون با روندی کاملاً وابسته به زمان اعمال میدان مغناطیسی با تغییرات سریعی مشاهده شد و با افزایش بازه زمانی این تغییرات آهسته‌تر می‌شد.

نتایج تحقیق اخیر نشان می‌دهد که ویژگی‌های پتانسیل عمل به علت تغییرات خصوصیات بیوفیزیکی کانال‌های یونی غشاء ناشی از تاثیر میدان مغناطیسی تغییر می‌یابد. نتایج این بررسی نیز در راستای یافته‌های دیگران است که با استفاده از تکنیک ثبت داخل سلولی از جمله گیرش جریان تغییر در

¹ Big conductance K_{Ca} channel

² Small conductance K_{Ca} channel

می‌باشد که یون کلسیم بر روی این دو کانال بیشترین تاثیر مستقیم را دارد که مطابق با آنچه که تا حال در رابطه با تاثیرات میدانهای مغناطیسی کم فرکانس بیان شده، مدلسازی تایید می‌شود.

میدان ۵۰ هرتز محیطی در بازه‌های زمانی متفاوت منجر به تغییرات تحریک‌پذیری سلولهای عصبی F1 حلزون باغی می‌شود که این تغییرات ناشی از تغییرات پتانسیل استراحت غشاء سلول است.

علی‌رغم کاهش میزان رسانایی سدیم با اعمال میدان مغناطیسی، میزان رسانایی ماکزیمم سدیم $g_{Na}(\max)$ افزایش نشان می‌دهد. بنابراین تغییر در سرعت باز و بسته شدن کانالهای سدیمی باعث کاهش رسانایی سدیم می‌شود. افزایش رسانایی کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیمی در نتیجه افزایش میزان رسانایی ماکزیمم $g_a(\max)$ و سرعت باز و بسته شدن کانال پتاسیمی وابسته به کلسیمی می‌باشد. افزایش ظرفیت خازنی سلول F1 حلزون در نتیجه کاهش ضخامت غشاء سلول می‌باشد. که در نتیجه تغییر حالت دو قطبیهای الکتریکی موجود بر روی غشاء سلول در اثر تابش میدان مغناطیسی است.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور که حمایت مالی بخشی از این تحقیق را تامین نموده‌اند، اعلام می‌دارد.

تحریک‌پذیری سلولهای عصبی را مرتبط با تغییر کینتیک کانالهای یونی غشاء دانسته‌اند [۲۳-۲۱].

آنچه مسلم می‌باشد این است که اصول حاکم بر تابش های یونیزان در رابطه با پرتوهای غیریونیزان صادق نمی‌باشد و با افزایش دوز تابشی میدانهای مغناطیسی کم فرکانس اثرات مشاهده شده بیشتر نمی‌شود و بنظر می‌رسد در این شرایط خاص سیستم زنده با حداکثر توان به این محرک عکس العمل نشان داده و در این حالت می‌تواند با محیط تبادل انرژی نموده و در شرایط جدیدی قرار گیرد [۲۱].

در مجموع نتایج حاصل از مدلسازی سلول عصبی تحت میدان مغناطیسی در این تحقیق، تاثیر میدان بر روی تمامی پارامترها را نشان می‌دهد. از طرفی در این مطالعه تقریباً تمامی پارامترهای اساسی پتانسیل عمل شامل پتانسیل استراحت غشاء، فواصل بین اسپایک‌ها و دامنه هیپرپلاریزاسیون متعاقب، دامنه پتانسیل عمل، در مدلسازی مورد استفاده قرار گرفته است. در حالی که در تحقیقات مشابه صرفاً تحریک‌پذیری سلول عصبی از طریق بررسی فرکانس اسپایک‌ها در نظر گرفته شده که نمایانگر تحریک‌پذیری سلول است و در چنین تحقیقاتی امکان مدلسازی وجود نخواهد داشت [۲۴،۲۵].

به غیر از کاربردهای تحقیقاتی، با مدلسازی سلول تحت تاثیر میدان مغناطیسی، می‌توان به فهم بیشتری از دینامیک کانالهای یونی تحت میدانهای مغناطیسی بدست آورد و بعنوان یک ابزار درمانی مؤثر از میدانهای مغناطیسی خالص جهت تحریک استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

بیشترین تغییرات مشاهده شده ناشی از مدلسازی در کانالهای سدیمی و پتاسیمی وابسته به کلسیمی

References

- 1- Adey WR. Biological effects of electromagnetic fields. *Cell Biochem*. 1993 Sep; 51(4): 410-6.
- 2- Levallois P, Gauvin D, Gingrad S. Comparison between personal exposure to 60 Hz magnetic fields and stationary home measurements for people living near and away from a 735kV power line. *Bioelectromagnetics*. 1999 Oct; 20: 331-337.
- 3- Ahmed N, Asaad A, Aboul E, Radwan N. Effects of exposure to electromagnetic radiation from the mobile phone on acetylcholinesterase activity in the hippocampus and striatum of young and adult male rats. *Proceeding of the 3rd International Workshop of Biological Effects of Electromagnetic Fields*, Kos, Greece. 2004 Oct; 4-8: 924-930.
- 4- Ainsbury EA, Conein E, Henshaw DL. An Investigation into the vector ellipticity of extremely low frequency magnetic fields from appliances in UK homes. *Phys Med Biol*. 2005 Sep; 50(13): 3197-3209.
- 5- Valentini E, Curcio G, Moroni F, Ferrara M, De Gennaro L, Bertini M. Neurophysiological effects of mobile phone electromagnetic fields on humans: a comprehensive review. *Bioelectromagnetics*. 2007 May; 28(6): 415-9.
- 6- Kaviani-Moghaddam M. The 50Hz extremely low frequency electromagnetic fields effect on bioelectrical activities of helix aspersa nerve cells [Dissertation], Tarbiat Modares University. 2002. (Full Text in Persian)
- 7- Shu-Min H, Yu-Wen L, Fung-Chang S, Chung-Yi L, Ming-Fong C, Pei-Chun C. Occupational exposure of dentists to extremely-low-frequency magnetic field. *J occup Health*. 2011 Oct; 53(1):130-136.
- 8- Weaver CM, Susan L, Wearne SL. The role of action potential shape and parameter constraints in optimization of compartment models. *Neurocomputing*. 2006 Nov; 69: 1053-1057.
- 9- Hauges G, Kerkut G. Electrical activity in a slug ganglion in relation to the concentration of lock solution. *J Gen Physiol*. 1955 May; 44(2): 282-294.
- 10- Calvo AC, Azanza MJ. Synaptic neuron activity under applied 50 Hz alternating magnetic fields. *Electro and Magneto*. 1999 Jun; 124 : 99-107.
- 11- Calvo AC, Azanza MJ. Electrophysiological responses of snail brain neurons under applied 50 Hz alternating magnetic fields. *Electro and Magneto*. 1999 Jun; 8(3); 305-315.
- 12- Balcavage WX, Alvager T, Swez J, GoffCW, Fox MT, Abdullyava S, et al. A mechanism for action of extremely low frequency electromagnetic fields on biological systems. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Oct; 222 (2): 374-8.
- 13- Chung SH, Andersen OS, Krishnamurthy V. *Biological Membrane Ion` Channels Dynamics Structure and Applications*. 1st ed. New York: Elsevier: 2007: 420-560.
- 14- Ebrahimian H, Firoozabadi M, Janahmadi M. Effect of 50Hz magnetic Field on Non-Uniform (Fractal) Parameters of Nerve Cell. The 1st Conference on Electromagnetic Field Effect on Live Tissues, Amirkabir University, Tehran, Iran, 2008 May: 27-29. (Full Text in Persian)
- 15- Taylor PS. Selectivity and patch measurement of A-Current channels in Helix aspersa neurons. *J Physiol*. 1987 March; 388(3): 437-447.
- 16- Takebe H, Shiga T, Kato M, Masada E. Biological and health effects from exposure to power-line frequency electromagnetic fields. IOS press. 2001 Dec; 7(4): 44-69.
- 17- Bawin SM, Adey WR. Sensitivity of calcium binding in cerebral tissue to weak environmental electric fields oscillating at low frequency. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1976; 73(6): 1999-2003.
- 18- Bean BP. The action potential in mammalian central neurons. *Nature Reviews*. 2007 May; 8(6):416-451.
- 19- Berg H. Problems of weak electromagnetic field effects in cell biology. *Bioelectrochem Bioenerg*. 2009 Jun; 48(2): 355-60.
- 20- Bernardi P, Dinzeo G, Pisa S. A generalized ionic model of the neuronal membrane electrical activity. *IEEE Trans Biomed Eng*. 1994 May; 41(3): 125-133.
- 21- Perentos N, Iskra S, McKenzie RJ, Cosi I. Simulation of pulsed ELF magnetic fields generated by GSM mobile phone handsets for human electromagnetic bioeffects research. *Australas Phys Eng Sci Med*. 2008 Sep; 31(3): 235-242.

- 22- Mckay BE, Turner RW. Kv3 K⁺ channels enable burst output in rat cerebellar Purkinje cells. *Eur J Neurosci*. 2004 Nov; 20(3): 729.
- 23- Morqado-Valle C, Verdugo-Diaz L, Garcia DE, Morales-Orozco C, Druker-Colin R. The role of voltage-gated Ca²⁺ channels in neurite growth of chromaffin cells induced by extremely low frequency (ELF) magnetic field stimulation. *Cell Tissue Res*. 1998 Feb; 291(2): 217-30.
- 24- Azanza MJ, Calvo AC. Snail neuron bioelectric activity induced under static or sinusoidal magnetic fields reproduces mammal neuron responses under transcranial magnetic stimulation. *Electro-magnetbiol*. 2000 Jun; 19: 303-319.
- 25- Azanza MJ, Moral AD. Frequency resonance effect of neurons under low frequency weak magnetic field. *J Magn Mater*. 2007 July; 310(2): 2865-2867.