

УДК 577.3043:537.8

СЛАБОЕ КОМБИНИРОВАННОЕ МАГНИТНОЕ ПОЛЕ, НАСТРОЕННОЕ НА ПАРАМЕТРИЧЕСКИЙ РЕЗОНАНС ЯДЕРНЫХ СПИНОВ АТОМОВ ВОДОРОДА, УВЕЛИЧИВАЕТ ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕОБЛАСТОВ В РЕГЕНЕРИРУЮЩИХ ПЛАНАРИЯХ *DUGESIA TIGRINA*

© 1996 г. В. В. Леднев, Л. К. Сребницкая, Е. Н. Ильясова,
З. Е. Рождественская, А. А. Климов, Х. П. Тирас

Представлено академиком А.С. Спириным 29.02.96 г.

Поступило 20.03.96 г.

К настоящему времени твердо установлено, что слабое комбинированное магнитное поле (КМП), содержащее коллинеарные постоянный (B_{DC}) и переменный ($B_{AC} \cdot \cos 2\pi ft$) компоненты, способно оказывать существенное влияние на метаболические и функциональные свойства биосистем [1]. В экспериментах с использованием КМП биоэффекты наблюдаются лишь при определенных теоретически предсказуемых значениях частоты переменного компонента. При этом величина биоэффекта зависит, также предсказуемым образом, от соотношения амплитуд переменного и постоянного компонентов. Согласно теории магнитного параметрического резонанса (МПР) в биосистемах [1, 2], первичными мишенями магнитного поля являются специфически связанные в ферментах и в белок-ферментных комплексах ионы (прежде всего Ca^{2+}), регулирующие активность Ca^{2+} -кальмодулин- и протеникиназа С-зависимых биологических реакций. Основные количественные предсказания теории находятся в хорошем соответствии с экспериментальными данными [1].

В рассмотренных до сих пор вариантах теории МПР связанный ион аппроксимировался заряженным изотропным осциллятором, не обладающим ядерным или электронным спином, что справедливо для биологически наиболее важных $^{40}Ca^{2+}$ и $^{24}Mg^{2+}$. Согласно теории, биологически эффективные резонансные частоты КМП определяются величиной зеемановского расщепления

колебательных уровней энергии иона осциллятора. Известно, однако, что атомы 1H , ^{39}K , ^{23}Na , ^{35}Cl , ^{37}Cl , ^{14}N и ^{31}P , входящие в состав биосистем, обладают ядерными спинами. Теоретически нельзя исключить возможность того, что взаимодействие ядерных спинов, по крайней мере некоторых из перечисленных ионов с КМП, настроенным на частоту, соответствующую разнице энергии спина при его ориентации по полю и против него, т.е. на частоту ларморовской прецессии спина в постоянном магнитном поле, также может привести к изменению свойств биосистемы. В данной статье мы приводим результаты экспериментов, свидетельствующих о том, что слабое КМП, настроенное на ларморовскую частоту ядерных спинов атомов водорода, существенно увеличивает пролиферативную активность резервных клеток (необластов) в регенерирующих планариях *Dugesia tigrina*. Обнаруженный эффект может быть, по крайней мере формально, описан в рамках теории МПР в биосистемах [1, 2].

Работа выполнена на планариях *D. tigrina* – бесполой лабораторной расе животных. Планарий содержали в прудовой воде при комнатной температуре и кормили раз в неделю личинками двукрылых. Для экспериментов отбирали животных длиной около 10 мм и прекращали их кормление за 7 дней до опытов. Ампутацию головной части тела планарий проводили глазным скальпелем в нестерильных условиях под бинокулярной лупой: отсекали примерно 1/5 часть тела, содержащую головной ганглий. Затем планарий помещали в два стеклянных стакана, содержащих по 20 мл прудовой воды (обычно по 28 планарий на стакан). В каждый стакан добавляли колхицин (до концентрации 0.05%), обеспечивавший остановку пролиферации необластов в метафазе. Эксперименты проводили при температуре $17.5 \pm 0.5^\circ C$ и $8.0 \pm 0.5^\circ C$; температура воды в экспериментальном и контрольном

Институт теоретической и экспериментальной
биофизики Российской Академии наук,
Пушино Московской обл.

Институт биофизики клетки
Российской Академии наук,
Пушино Московской обл.

стаканах поддерживалась одинаковой с точностью $\pm 0.5^\circ\text{C}$. Все опыты начинали и заканчивали в одно и то же время – в 12 ч дня. Один из стаканов помещали в КМП, другой – в контрольное. Величина магнитной индукции постоянного магнитного поля в контроле равнялась таковой для постоянного компонента в КМП. Эффект КМП оценивали после 24 ч регенерации по разнице величины митотического индекса $\Delta\text{МИ}$ (%) в экспериментальных и контрольных образцах с помощью модифицированного метода [3] определения числа митозов в суспензии клеток, приготовленных из участков постбласты толщиной 0.5 мм. Необласты окрашивали флуоресцентным красителем Hoechst-33342 (“Sigma”) и наносили на предметные стекла. Количество метафазных клеток определяли с помощью флуоресцентного микроскопа Fluoval (“Carl Zeiss”, Jena). Каждое экспериментально полученное значение МИ является результатом усреднения по 7000 необластов.

КМП, состоящее из коллинеарных постоянного и переменного компонентов, создавали двумя, несколькими различными способами. В первом из них в качестве постоянного компонента поля B_{DC} использовали локальное магнитное поле Земли в месте расположения тест-системы, а переменный компонент B_{AC} , направленный параллельно земному полю, создавали с помощью катушечной пары Гельмгольца, диаметром около 30 см. Во втором способе постоянный и переменный компоненты поля формировались с помощью трех пар катушек Гельмгольца с диаметром около 40 см. Две пары колец устанавливались соосно с горизонтальной компонентой земного поля, в то время как третья пара – соосно с его вертикальной компонентой. Для подачи переменного напряжения на катушки использовали генератор ГЗ-110, стабилизированный кварцем и обеспечивающий поддержание заданной частоты с точностью до пятого знака. Резонансную частоту f_p переменного компонента, т.е. ларморовскую частоту прецессии спинов ядер атомов водорода, вычисляли по формуле

$$f_p = \gamma B_{DC},$$

где $\gamma = 42.577 \text{ Гц/мкТ}$ – гиромагнитное отношение ядерного спина атома водорода. Величину постоянного компонента поля измеряли с помощью феррозондового магнитометра типа СГК-64М (завод “Геологоразведка”), обеспечивающего возможность измерения величины индукции магнитного поля в использовавшемся нами диапазоне с точностью $\pm 0.01 \text{ мкТ}$ (при использовании калибровочных таблиц магнитометра). Амплитуду переменного компонента поля устанавливали с точностью 1% с учетом величины передаточного коэффициента k (нТ/мкА) катушки Гельмгольца данного типа.

Таблица 1. Влияние КМП, настроенного на параметрический резонанс спинов атомов водорода, на митотическую активность необластов в регенерирующих планариях

Номер опыта	Митотический индекс, МИ, число митозов на 100 клеток		Величина эффекта магнитного поля, $\Delta\text{МИ}$, %
	эксперимент, $\text{МИ}_\text{э} \pm \delta_\text{э}$	контроль, $\text{МИ}_\text{к} \pm \delta_\text{к}$	
1	0.99 ± 0.03	0.67 ± 0.04	46.8 ± 11.2
2	1.17 ± 0.02	0.78 ± 0.04	48.9 ± 8.4
3	0.88 ± 0.04	0.60 ± 0.02	47.2 ± 9.8
4	0.86 ± 0.03	0.60 ± 0.02	43.3 ± 7.5
5	0.84 ± 0.02	0.60 ± 0.02	40.0 ± 7.5
6	0.97 ± 0.04	0.66 ± 0.03	47.8 ± 10.1

Примечания. 1. Параметры магнитных полей: КМП (эксперимент): $B_{DC} = 42.70 \pm 0.01 \text{ мкТ}$, $B_{AC} = 1.84 \times B_{DC} \approx 78.5 \pm 0.7 \text{ мкТ}$, $f_{AC} = 1818.0 \pm 0.1 \text{ Гц}$. Постоянное поле (контроль): $B_{DC} = 43.00 \pm 0.01 \text{ мкТ}$.

2. $\delta_\text{э}, \delta_\text{к}$ – стандартные ошибки средней величины митотического индекса (МИ) в экспериментальных и контрольных образцах планарий.

$$3. \Delta\text{МИ}(\%) = \frac{(\text{МИ}_\text{э} - \text{МИ}_\text{к}) \pm (\delta_\text{э} + \delta_\text{к})}{\text{МИ}_\text{к}} \times 100\%.$$

4. Разброс в абсолютных значениях $\text{МИ}_\text{э}, \text{к}$ в разных опытах обусловлен, в основном, различием временных интервалов между кормлением животных и началом опыта.

Необходимо учитывать, что амплитуда суточных вариаций “спокойного” магнитного поля Земли в открытом пространстве (вне помещений) достигает $\approx 0.04 \text{ мкТ}$, что может обусловить отклонение (расстройку) ларморовской частоты прецессии спинов водородных ядер примерно на 1.7 Гц от резонансного значения. Важно отметить, что эта величина значительно меньше полуширины (на половине высоты) пика ответа биосистемы, используемой в данной работе, на воздействие КМП (см. ниже). Очевидно, что локальное магнитное поле в месте расположения экспериментальных животных также может быть подвержено воздействию этих вариаций, несколько ослабленных из-за частичной экранировки помещений. Следовательно, каждое измерение, полученное в данной работе, соответствует некоторой эффективной величине постоянной компоненты КМП, усредненной за 24 ч регенерации планарий. Поскольку все опыты проводились в один и тот же интервал времени суток, можно предположить, что вариации магнитного поля Земли вносили одинаковую ошибку в каждое измерение.

Эффект, ДМИ, %

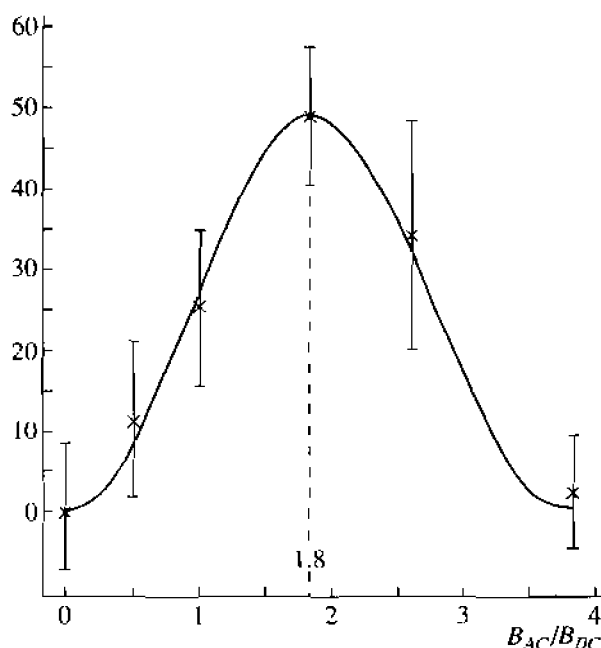


Рис. 1. Зависимость митотической активности изообластов в регенерирующих планариях от соотношения, B_{AC}/B_{DC} , величин магнитной индукции переменного и постоянного компонентов КМП, настроенного на параметрический резонанс спинов атомов водорода. Параметры КМП: $B_{DC} = 20.87 \pm 0.01$ мкТ, $f_{AC} = 889.0$ Гц, $B_{AC}/B_{DC} = 0.0; 0.5; 1.0; 1.8; 2.6$ и 3.8 . Контрольные образцы находились в постоянном поле с величиной магнитной индукции, равной 20.90 ± 0.01 мкТ. Здесь и в рис. 2 $\Delta \text{МИ}(\%) = \frac{(\text{МИ}_3 - \text{МИ}_k) \pm (\delta_3 + \delta_k)}{\text{МИ}_k} \times 100\%$

разница (%) между величинами митотического индекса в экспериментальных (МИ_3) и контрольных (МИ_k), образцах планарий.

Сплошной кривой показана теоретически ожидаемая зависимость — квадрат функции Бесселя первого порядка, $J_1^2(B_{AC}/B_{DC})$. При аппроксимации теоретический и экспериментальный максимумы были совмещены.

Исходя из предположения о том, что КМП, настроенное на частоту ларморовской прецессии ядерных спинов атомов водорода, может взаимодействовать с биосистемой по механизму МПР, мы выполнили три серии экспериментов.

В первой серии было проведено сравнение пролиферативной активности в контрольных и экспериментальных регенерирующих планариях при температуре $8.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Контрольные образцы находились в локальном постоянном магнитном поле $B_{DC} = 43.00 \pm 0.01$ мкТ, экспериментальные — в комбинированном: $B_{DC} = 42.70 \pm 0.01$ мкТ, $B_{AC} = 78.5 \pm 0.8$ мкТ с частотой $f_{AC} = 1818.0 \pm 0.1$ Гц (здесь и ниже символом B_{AC} обозначено значение пика амплитуды переменного компонента). Соглас-

но теории [1, 2], при соотношении $B_{AC}/B_{DC} = 1.8$, использованном в этих экспериментах, достигается максимальное значение биоэффекта. Результаты шести независимых измерений, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что при этих условиях в экспериментальных образцах наблюдается увеличение МИ неопластов примерно на 46%. Заметим, что величина и знак наблюдаемого эффекта практически совпадают с таковыми, полученными нами на этой же тест-системе при ее экспонировании в КМП, настроенном на параметрический резонанс для кальция [1, 4].

Во второй серии экспериментов мы определили зависимость биоэффекта КМП ($B_{DC} = 20.87 \pm 0.01$ мкТ, $f_{AC} = 889.0$ Гц) от величины соотношения B_{AC}/B_{DC} при значениях B_{AC}/B_{DC} , равнявшихся 0.0; 0.5; 1.0; 1.8; 2.6 и 3.8. За величину биоэффекта магнитного поля принимали разницу, ДМИ (%), между величинами, измеренными у экспериментальных и контрольных животных (при температуре $17.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$). Как видно из рис. 1, экспериментально наблюдаемая зависимость, по крайней мере в области $0 \leq B_{AC}/B_{DC} \leq 3.8$, хорошо аппроксимируется квадратом функции Бесселя первого порядка, $J_1^2(B_{AC}/B_{DC})$. Именно такая зависимость биоэффектов от соотношения B_{AC}/B_{DC} ожидается в том случае, когда взаимодействие магнитного поля с биосистемой происходит по механизму параметрического резонанса [1].

В третьей серии экспериментов мы определили зависимость величины биоэффекта КМП ($B_{DC} = 42.74 \pm 0.01$ мкТ, $B_{AC} = 78.6 \pm 0.8$ мкТ) от частоты переменного компонента поля при значениях частот f_{AC} , равных 1808.0; 1814.0; 1816.5; 1819.7 (резонансная частота, f_p); 1822.0; 1824.8; 1826.0 и 1830.0 при температуре $8.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

Согласно теории магнитного параметрического резонанса в биосистемах, зависимость величины биоэффекта (в данном случае ДМИ, %) от частоты переменного компонента поля f определяется вторым сомножителем в правой части выражения

$$\Delta \text{МИ}(\%) = J_1^2(B_{AC}/B_{DC}) \times [1 + (f - f_p)^2 / \lambda^2]^{-1},$$

где λ соответствует полуширине (в Гц) пика ответа биосистемы (контура Лорентца) на половине максимального значения эффекта. Полуширина лорентциана, аппроксимирующего экспериментальные точки на рис. 2, равна примерно 4.2 Гц (при аппроксимации максимум лорентциана совмещали с экспериментально найденным максимумом эффекта при $f_p = 1819.7$ Гц). Заметим что, $\lambda = k/2\pi$, где $k = 1/\tau$ с⁻¹ — константа скорости

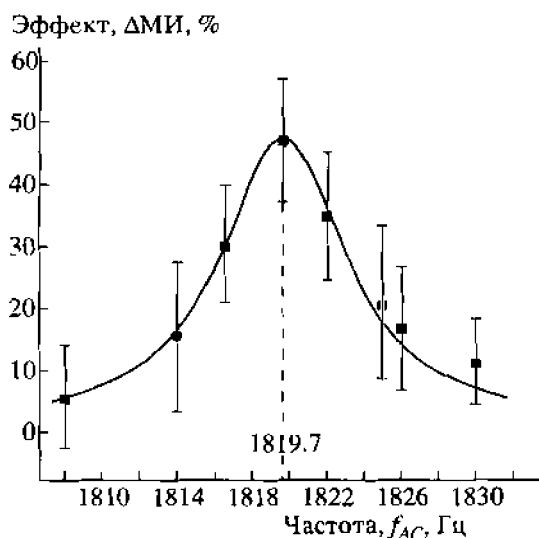


Рис. 2. Зависимость митотической активности необластов в регенерирующих планариях от частоты f_{AC} , переменного компонента КМП, настроенного на параметрический резонанс спинов атомов водорода.

Параметры КМП: $B_{DC} = 42.74 \pm 0.01$ мкТ, $B_{AC} = 78.6 \pm 0.8$ мкТ, $f_{AC} = 1808.0; 1814.0; 1816.5; 1819.7$ (резонансная частота f_p); $1822.0; 1824.8; 1826.0$ и 1830.0 . Контрольные образцы находились в постоянном поле с величиной магнитной индукции, равной 43.00 ± 0.01 мкТ.

Сплошной кривой показана теоретически ожидаемая зависимость – лорентциан, $[1 + (f - f_p)^2/\lambda^2]^{-1}$, где λ – полуширина (на половине высоты) пика ответа биосистемы на воздействие магнитного поля. При аппроксимации теоретический и экспериментальный максимумы были совмещены.

некоторого переходного процесса со средним временем жизни τ , в котором участвуют атомы водорода, взаимодействующие с КМП. Согласно нашим измерениям, $k = \lambda/2\pi = 26.4 \text{ с}^{-1}$ и, соответственно, $\tau = 38 \text{ мс}$.

В совокупности полученные нами данные свидетельствуют о том, что взаимодействие слабого комбинированного магнитного поля со спинами ядер атомов водорода может оказывать существенное влияние на свойства биосистем, в данном случае – на митотическую активность резервных клеток в регенерирующих планариях. Зависимость величины митотической активности необластов от соотношения величин магнитной индукции переменного и постоянного компонентов КМП, а также от частоты переменного компонента КМП может быть, по крайней мере формально, описана в рамках теории МПР в биосистемах [1]. Заметим, что полученная нами оценка константы k близка по величине к значениям констант скоростей диссоциации ионов из “сильных” центров Ca^{2+} -связывающих белков, которые, в свою очередь, практически совпадают со скоростями соответствующих конформационных изменений в структуре этих белков [5]. Поэтому в качестве рабочей гипотезы можно предположить, что первичными мишенями магнитного поля в биосистемах являются спины атомов водорода, входящие в состав внутрибелковых водородных связей.

Авторы благодарны проф. А.Н. Козлову за помощь в планировании экспериментов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант 95-04-11739.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Леднев В.В. // Биофизика. 1996. Т. 41. С. 224.
2. Lednev V.V. // Bioelectromagnetics. 1991. V. 12. P. 71.
3. Vagina J., Salo E. // Hydrobiologia. 1981. V. 81. P. 181.
4. Леднев В.В., Сребнишкая Л.К., Ильясова Е.Н. и др. // Биофизика. 1996. Т. 41.
5. Пермяков Е.А. Парвальбумин и родственные кальцийсвязывающие белки. М.: Наука, 1985.