

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова

Физический факультет

На правах рукописи

Новиков Сергей Михайлович

**ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ОСЛАБЛЕННОГО МАГНИТНОГО
ПОЛЯ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ НЕРВНОЙ КЛЕТКИ**

Специальность 01.04.11 – физика магнитных явлений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва 2007 г.

Работа выполнена на кафедре магнетизма физического факультета
и кафедре биофизики биологического факультета
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Научные руководители: доктор физико-математических наук, доцент
Шалыгин Александр Николаевич

доктор биологических наук, профессор
Максимов Георгий Владимирович

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук, профессор
Твердислов Всеволод Александрович

доктор физико-математических наук, в.н.с.
Иванов Валерий Александрович

Ведущая организация: ГУП Институт Медико-Биологических Проблем
РАН, г. Москва

Защита состоится “24” мая 2007 года в 16-30 часов на заседании диссертационного совета К 501.001.02 физического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992 ГСП-2, г. Москва, Ленинские горы, МГУ, физический факультет, аудитория ЮФА.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке физического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова.

Автореферат разослан “ ” апреля 2007 года.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета К 501.001.02,
кандидат физико-математических наук

И. А. Никанорова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Магнитобиология изучает влияние внешних искусственных и естественных магнитных полей (МП) на биологические системы (клетка, организм, популяция и т.д.). Известно, что слабые магнитные поля (СМП, 10^2 - 10^3 мкТл) способны менять функциональное состояние биологического объекта [Холодов, 1991; Шакура 1987]. При исследовании действия СМП на биологический объект используют различные конфигурации и диапазоны магнитных полей (ослабленное геомагнитное поле, постоянное МП, переменное МП, комбинированные МП). Интерес к воздействию ослабленного геомагнитного поля (ОМП) обусловлен важной ролью геомагнитных полей в жизнедеятельности биосистем, популяций, а так же с коррекцией магнитных санитарных норм. Известно, что ослабление МП в три-четыре раза вызывает нарушение функции нервной деятельности человека и животных [Дубров, 1974; Бинги, 2002]. Однако систематических исследований действия ослабленного ГМП на разных уровнях организации биологических систем при одной и той же степени воздействия мало. В настоящее время не ясен клеточный и молекулярный механизм действия МП. Существуют предположения, что действие МП на биологический объект связано с изменением состояния конформации отдельных молекул, содержащих парамагнитные атомы (кислород, оксид азота, гемопорфирин, каротин, цитохромы и т.д.), а так же, транспортом электронов или ионов (перенос электронов в органеллах (митохондрия), транспорт ионов в биологических мембранах и т.д.).

Актуальность темы обусловлена, как необходимостью исследования комплексной зависимости функционирования возбудимых клеток при действии ослабленного геомагнитного поля, так и перспективами применения результатов в практике.

Целью данной работы являлось:

1. исследование изменения возбудимости нервного волокна (амплитуда, порог, скорость проведения потенциала действия, форма импульса) в условиях ослабленного в ~250 раз геомагнитного поля;
2. исследование действия ослабленного в ~200 раз геомагнитного поля на конформацию молекул каротиноидов, как выделенных из клеток, так и локализованных в субклеточных органеллах нейронов и плазматической мембране нервного волокна;
3. исследование действия ослабленного в ~200 раз геомагнитного поля на регулярные изменения коэффициента преломления структур, локализованных в примембранной и цитоплазматической областях нейрона.

Научная новизна работы заключается в следующем: впервые для исследования действия ослабленного геомагнитного поля, были выбраны наиболее чувствительные функционирующие биологические системы (полиеновая молекула каротина, нейрон и нерв).

Впервые применялись спектральные методы, не меняющие характер функционирования объекта (метод спектроскопии комбинационного рассеяния (КР), метод динамической фазовой микроскопии (ДФМ) в сочетании с методами Фурье-анализа).

Впервые проведены системные исследования действия ослабленного геомагнитного поля на функционирование нейрона (амплитуда и скорость проведения возбуждения, порог возбуждения), конформацию полиеновых молекул каротиноидов, локализованных в различных областях нервной клетки (в липидах плазматической мембраны или субклеточных органелл), а так же структурные изменения различных отделов цитоплазмы клетки.

Предложена схема, объясняющая выявленные эффекты (изменение возбудимости, изменения конформации молекул каротиноидов плазматической и субклеточных мембран, состояния цитоплазмы),

обусловленные действием ослабленного магнитного поля на возбудимую клетку, с позиций перераспределения молекул кислорода.

Научная и практическая ценность

Данные, полученные при исследовании действия ослабленного геомагнитного поля на нервные клетки, проясняют и дополняют современное понимание процессов, связанных с функционированием нервной системы при ослаблении естественного геомагнитного поля. Выявленные изменения на молекулярном и клеточном уровне (возбудимость нерва, изменения конформации молекул каротиноидов плазматической мембраны и мембран субклеточных органелл, а также структурной организации цитоплазмы) позволят охарактеризовать состояния клеток, тканей и органов в условиях ослабления естественного геомагнитного фона.

Полученные данные, могут быть использованы при анализе условий электромагнитной безопасности в ходе космического полета, а так же могут быть учтены при корректировке магнитных санитарных норм.

Основные результаты диссертации, которые выносятся на защиту, можно сформулировать следующим образом:

1. Ослабление геомагнитного поля приводит к увеличению порога возбуждения потенциала действия для чувствительных нервных волокон.
2. Действие ослабленного геомагнитного поля приводит к изменению конформации молекул каротиноидов, локализованных в мембране нервного волокна и цитосомах нервных клеток.
3. Ослабление геомагнитного поля приводит к изменению ритмических процессов движения цитоплазматических структур клетки (митохондрии, цитосомы, нейрофибриллы и т.д.).

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались и обсуждались на российских и международных конференциях и симпозиумах: Magnetic International Symposium, (Москва, 1999 г.), Третий Европейский биофизический конгресс (Мюнхен, 2000 г.), Третья Всероссийская научная конференция “Физические проблемы экологии (Экологическая физика)”

(Москва, 2001 г.), Четвертый Международный конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине» (Санкт - Петербург, 2006 г.). А так же, на научных семинарах кафедры биофизики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Публикации. Основные результаты диссертации опубликованы в 4 статьях (одна в печати) и 5 тезисах докладов, список которых приведен в конце автореферата.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения и списка литературы. Полный объем диссертации 121 страниц машинописного текста, включая 44 рисунка и библиографии из 124 наименований.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационной работы, научная новизна и практическая ценность работы, сформулирована цель работы, излагаются выносимые на защиту положения.

Первая глава содержит обзор результатов исследований воздействия ОМП на биологические объекты, а так же теоретических работ, объясняющих действия ОМП. В обзоре показано, что ослабление геомагнитного поля влияет в первую очередь на процессы, связанные с функционированием нервной системы.

Вторая глава содержит описание объектов, и методов исследования применявшихся в данной работе, а так же способов получения и контроля ослабленного магнитного поля.

Объектами исследования служили изолированные пейсмекерные нейроны (Ретциус (Rz)-клетки) медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*) и мотонейроны pedalного ганглия прудовика (*Lymnaea stagnalis*), окологлоточные нервные кольца улиток - катушек (*Planorbis carinatus*), седалищный нерв травяной лягушки (*Rana temporaria*), раствор β -каротина (40 мМ).

В работе использовались следующие **методы**:

- метод экстраклеточной регистрации мембранного потенциала [Тасаки, 1958], для исследования изменений возбудимости нервного волокна (амплитуда, порог, форма импульса, скорость передачи потенциала действия) в ОМП ($H=0,17\pm 0,02$);

- метод резонансного комбинационного рассеяния (РКР) для исследования выделенного β -каротина и β -каротиноидов нервной клетки, с возбуждением от твердотельного Nd-лазера (473 нм, мощность 17 мВт) [Maxwell & Caughey, 1976; Соловьев и др., 1985; Maksimov et al., 1900; Максимов и др. 2000];

- метод модуляционно-интерференционной микроскопии для исследования регулярных изменений локального показателя преломления цитоплазмы и плазматической мембраны нейронов [Тычинский, 2001]. Для обработки результатов было использовано программное обеспечение Matlab с применением стандартных процедур быстрого Фурье-преобразования с последующей нормировкой амплитуды.

ОМП формировали с помощью экранировки и компенсации геомагнитного поля Земли. Для экранирования использовалась система камер. Каждая камера (2 шт.) была сделана из переплетенных полос аморфного пермаллоя K74 (Fe 50%, Ni 50%), и имела 8 слоев. Каркасом камер служил картон. Размеры камер 485x195x205 и 475x106x180 мм соответственно, меньшая камера располагалась в большей, в промежутке между камерами находился пенопласт. Для компенсации постоянной составляющей использовалось три пары катушек Гельмгольца, расположенных перпендикулярно друг к другу. Внешний диаметр 35 мм, внутренний 20 мм, соответственно. Для контроля, за величиной ослабленного МП использовались магнитометры НВ 0204, НВ 0599А.

Третья глава содержит результаты исследования и их обсуждение.

1. Исследование изменений возбудимости нервного ствола при ослаблении МП в 250 раз.

Изменения возбудимости нервного волокна исследовали при

экранировании геомагнитного поля в ~ 250 раз ($H=0,17\pm 0,02$ мкТл), относительно лабораторного значения ($H=42,3\pm 0,4$ мкТл), используя систему камер из пермаллоя. Фиксируемые параметры: амплитуда потенциала действия (ПД), скорость прохождения ПД, форма импульса. Параметры стимуляции были следующими: электрические прямоугольные импульсы амплитудой 300 мВ для одной группы нервов и 800 мВ для другой соответственно, с частотой 115 Гц, длительностью 0,3 мс. Результаты регистрировали в течение 30 сек. через каждые 5 мин. Стимуляция была двух видов: непрерывная в течение всего времени измерений и подаваемая, только в момент регистрации, т.е. через каждые 5 мин. Время в течение которого осуществляли контроль за работой нервных волокон составляло 50 мин. Стимуляция нерва и запись данных осуществлялась с помощью ПК. Статистика набиралась на 10 парах нервных волокон для каждого типа измерений.

Установлено, что при непрерывной стимуляции импульсами с амплитудой 300 мВ, амплитуда ПД нервного волокна находящегося под действием ОМП, снижается на $\sim 30\%$ (рис. 1(б)).

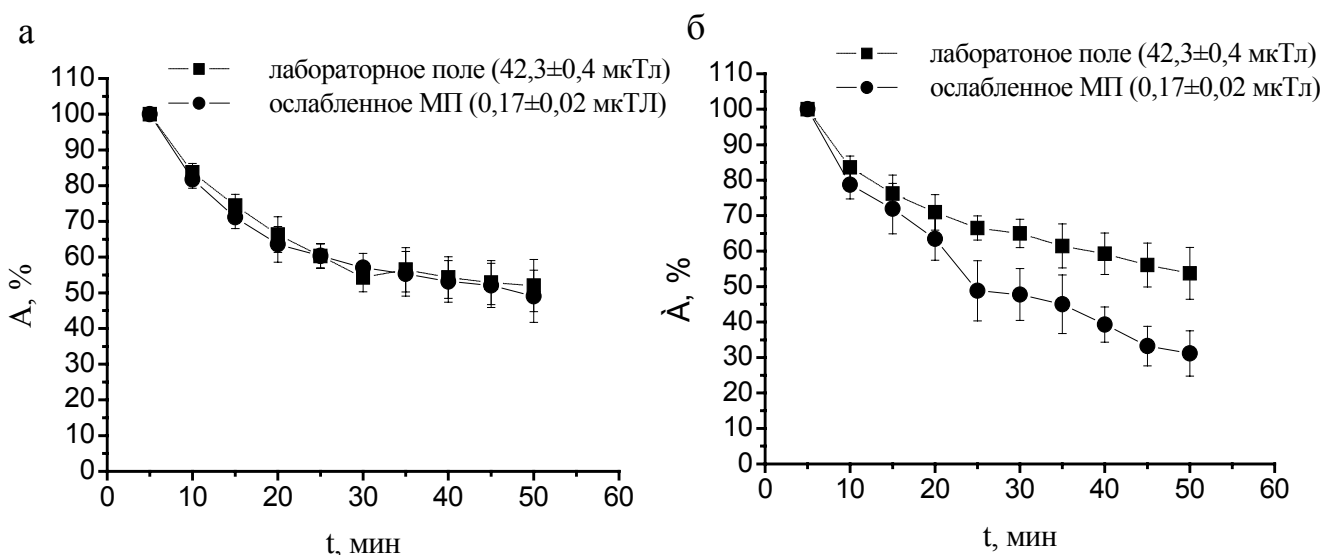


Рис 1. (а). Изменения амплитуды потенциала действия нервного волокна при непрерывной стимуляции с амплитудой 800 мВ в контроле и при действии ослабленного в ~ 250 раз ГМП. (б). Изменения амплитуды потенциала действия нервного волокна при непрерывной стимуляции с амплитудой 300 мВ в контроле и при действии ослабленного в ~ 250 раз ГМП.

При непрерывной стимуляции нерва электрическими импульсами с амплитудой 800 мВ, достоверных отличий от контроля, амплитуды ПД, в ОМП не обнаружили (рис. 1(а)). Отметим, что при этом скорости проведения ПД и форма ПД не отличались от контроля.

В случаях, когда стимуляция нерва осуществлялась раз в 5 мин, достоверных отличий от контроля (при амплитудах стимулирующего импульса- 300 и 800 мВ) так же, обнаружено не было.

Отметим, что стимуляции нерва с амплитудой импульса 800 мВ является режимом максимального порога возбуждения, в котором работают все волокна нервного ствола, тогда как при 300 мВ – функционируют только наиболее чувствительные волокна. Уменьшение амплитуды ПД вероятно свидетельствует о том, что только для этих волокон при действии ослабленного МП повышается порог возбуждения.

Для определения порога генерации ПД, нерв раздражали электрическими прямоугольными импульсами с амплитудами от 100 до 500 мВ (шаг - 10 мВ, время регистрации в точке - 1 сек, пауза между точками 2 сек). Интервал между измерениями составлял 8 мин. В одной серии экспериментов нерв непрерывно раздражали током с частотой 115 Гц и амплитудой 300 мВ для одной группы и 800 мВ для другой. В контроле в промежутках между измерениями нерв не стимулировали.

В случае стимуляции нерва прямоугольными импульсами тока с амплитудой 800 мВ, достоверного изменения величины порога не обнаружено (данные не представлены).

При стимуляции нерва током с амплитудой 300 мВ, было показано, что в контроле амплитуда ПД через 50 мин начинает возрастать при 270 мВ (рис. 2(а)), тогда как, для волокна находящегося в ОМП уже при 330 мВ (рис. 2(б)).

Полученный результат свидетельствует об увеличении порога возбуждения нерва в ОМП. В случае, когда в интервалах между измерениями стимуляция нерва не осуществлялась, изменений порога не выявлено.

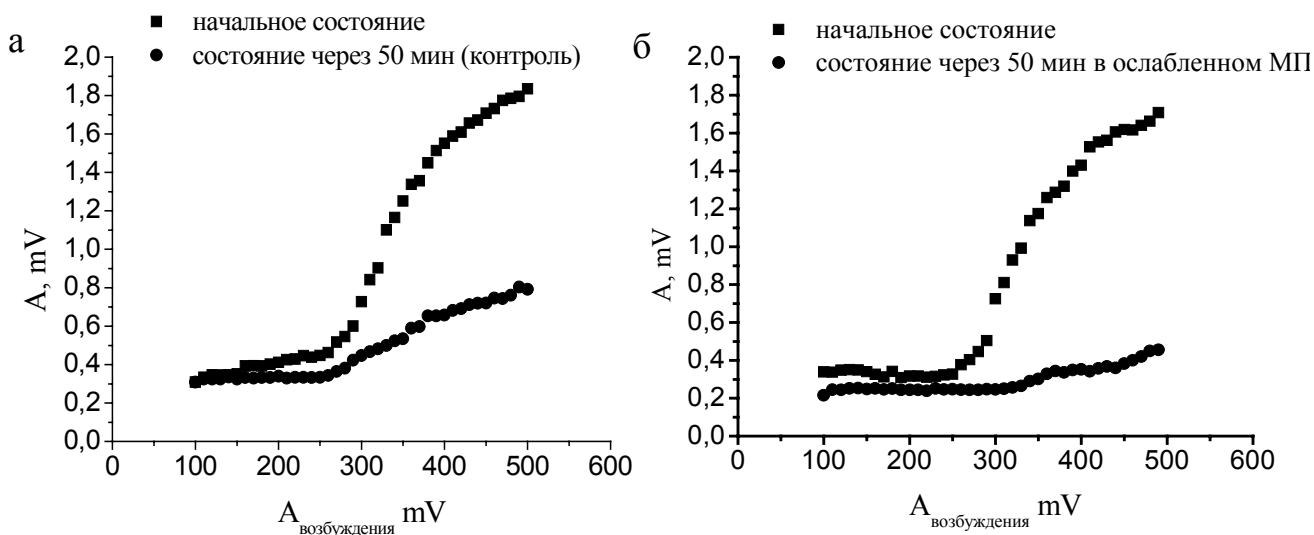


Рис. 2 (а) Изменение порогового значения ПД нервного волокна в контроле ($N=42,3\pm 0,4$ мкТл); (б) Изменение порогового значения ПД нервного волокна в ОМП при стимуляции ($N=0,17\pm 0,02$ мкТл). По оси абсцисс амплитуда подаваемого возбуждения, по оси ординат амплитуда ПД. Графики приведены для случая, когда в интервалах между измерениями осуществлялась непрерывная стимуляция нервного волокна с амплитудой 300 мВ.

Известно, что при ритмическом возбуждении нерва увеличение порога и снижение амплитуды ПД могут быть обусловлены комплексом процессов, обусловленных состоянием вязкости и проницаемости аксолеммы, меняющих конформацию мембранных каротиноидов [Максимов, 1997].

Мы предположили, что в качестве чувствительных к действию ОМП процессов, при ритмическом возбуждении нерва, могут быть перераспределение электронов и изменение конформации полиеновой молекулы каротиноидов.

2. Исследование изменений в спектрах молекул C_{40} -каротиноидов при ослаблении МП в ~ 200 раз.

Известно, что в плазматической мембране нервного волокна и в цитосомах нейронов, содержатся C_{40} -каротиноиды (Рис. 3В). При перераспределении или делокализации π -электронов в полиеновой цепочке каротина, меняется характер спектра РКР данной молекулы. Известно, что конформация каротиноидов зависит от вязкости микроокружения,

мембранного потенциала, транспорта ионов через мембрану, а также количества связанного Ca^{2+} и NO [Koyama et. Al., 1979; Максимов и др. 1982; Ульянова и др. 2005].

В нервном волокне каротиноиды содержатся в мембране аксолемы и миелине, причем в мембране содержание каротиноидов составляет ~75%, а остальные располагаются в миелине [Максимов, 1997]. С помощью микроспектрометрии нами было показано, что в цитоплазме нейронов прудовика и катушек, цитосомы распределены неравномерно: поглощение каротиноидов наблюдается только на периферических участках клетки, где выявлены скопления цитосом (рис. 3А).

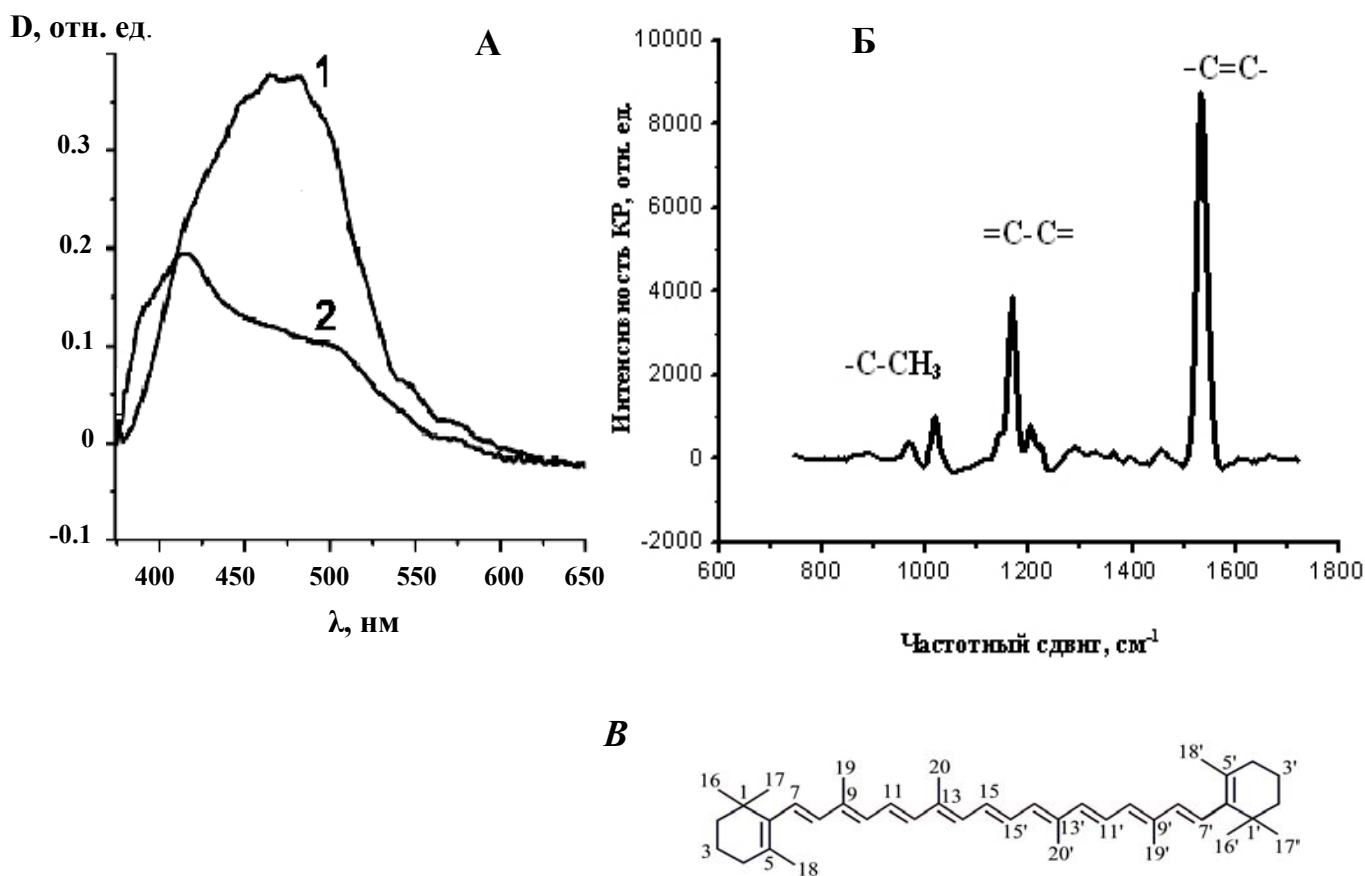


Рис. 3. А – Спектры поглощения: (1) участка клетки со скоплением цитосом; (2) участка клетки без цитосом. Б – спектр комбинационного рассеяния нейронов нервного окологлоточного кольца катушек. В – структурная формула молекулы β -каротина.

Нами было проведено исследование изменения конформации выделенного β -каротина, а так же каротиноидов, содержащихся в нервном волокне и цитосомах нейронов окологлотовочного кольца при действии лабораторного магнитного поля ($H=39,7\pm 0,4$ мкТл), и изменения при компенсации постоянной составляющей ГМП в ~ 200 раз ($H=0,20\pm 0,03$ мкТл). Для компенсации использовались расположенные перпендикулярно друг к другу 3 пары колец Гельмгольца. От каждого образца получали последовательно 6 спектров, по 20 серий для каждого из объектов. В спектре РКР каротиноидов (рис. 3Б) обнаружены три характерных пика с длиной волны 1526 см^{-1} (колебания $-C=C-$ связей), 1160 см^{-1} (колебания $=C-C=$ связей) и 1008 см^{-1} (колебания $C-CH_3$ метильного радикала) соответственно.

В качестве одного из критериев изменений конформации в молекуле, используют отношение пиков интенсивностей КР - спектров I_{1526}/I_{1160} , I_{1526}/I_{1008} , I_{1160}/I_{1008} . В частности, величина соотношения интенсивностей I_{1526}/I_{1160} пиков КР-спектра каротиноидов линейно зависит от степени упорядоченности жирнокислотных «хвостов» мембранных липидов [Максимов и др., 1990].

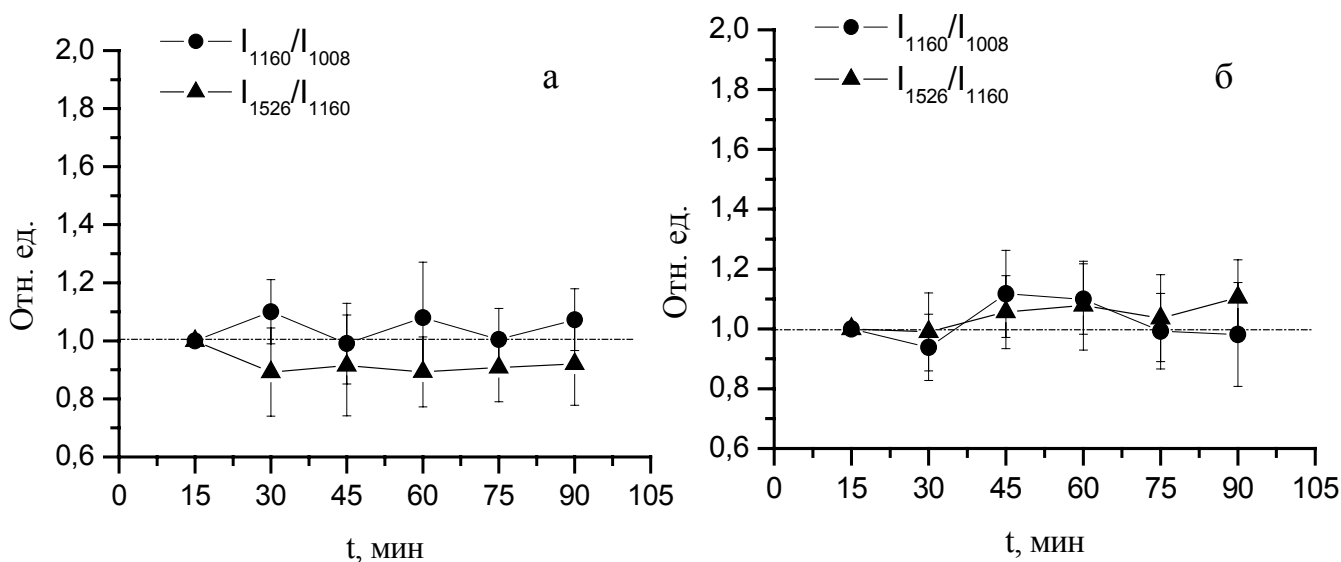


Рис. 4. (а) Соотношения интенсивностей полос КР- спектров раствора β -каротина в лабораторном поле ($H=39,7\pm 0,04$ мкТл). (б) Отношения интенсивностей полос КР-спектра β -каротина при компенсации постоянной составляющей в 200 раз ($H=0,20\pm 0,03$ мкТл).

В модельных экспериментах было показано, что ослабление МП в 200 раз не приводит к видимым конформационным изменениям каротиноидов.

На рис. 4 (а) представлены отношения пиков интенсивности для раствора β -каротина в контроле (лабораторное поле) и при помещении его в ослабленное МП (рис. 4(б)). Таким образом было показано, что ослабление МП не влияет на делокализацию π -электрона полиеновой системы молекул и конформацию каротиноидов.

Для каротиноидов, локализованных в нервном волокне и цитосомах нейронов, было показано, что действие ОМП приводит к росту величин отношения пиков интенсивности (рис. 5(б), 6(б)).

При этом изменения каротиноидов, локализованных на плазматической мембране миелинового нервного волокна, более выражены, чем изменения каротиноидов, локализованных в субклеточных органеллах нейронов.

Известно, что увеличение отношения I_{1526}/I_{1160} соответствует увеличению микровязкости фосфолипидного окружения, которое наблюдали при блокировании тетродотоксином натриевых каналов нервного волокна

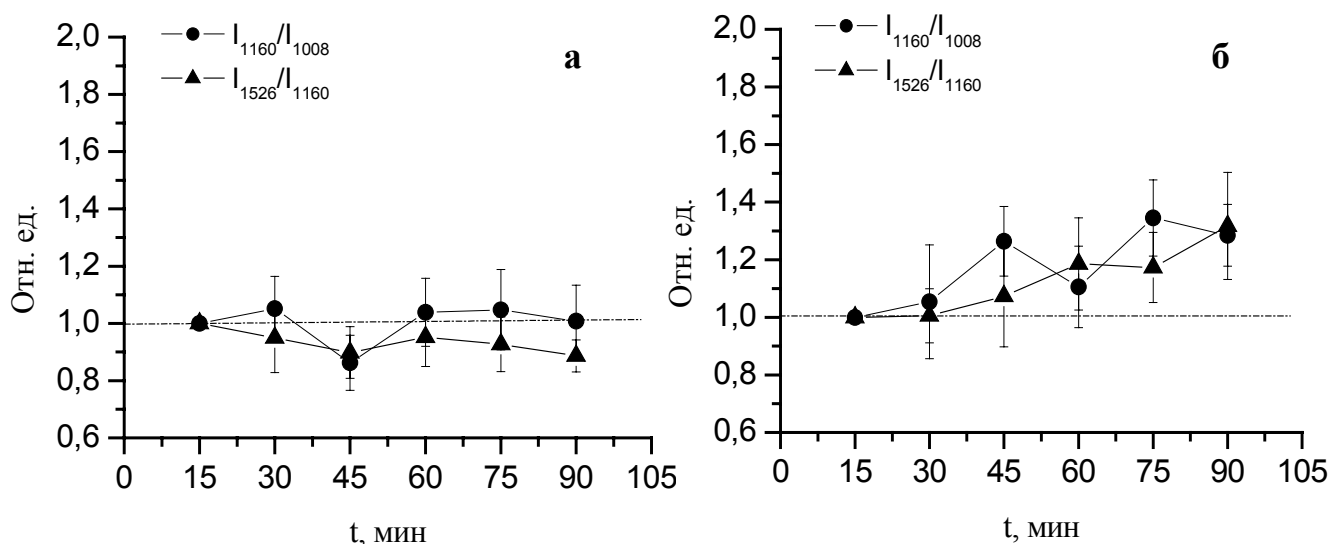


Рис. 5. (а) Отношения интенсивностей полос КР спектра каротиноидов нейронов в лабораторном поле ($N= 39,7\pm 0,04$ мкТл). (б) Отношения интенсивностей полос КР спектров каротиноидов нейронов при компенсации постоянной составляющей в 200 раз ($N= 0,20\pm 0,03$ мкТл).

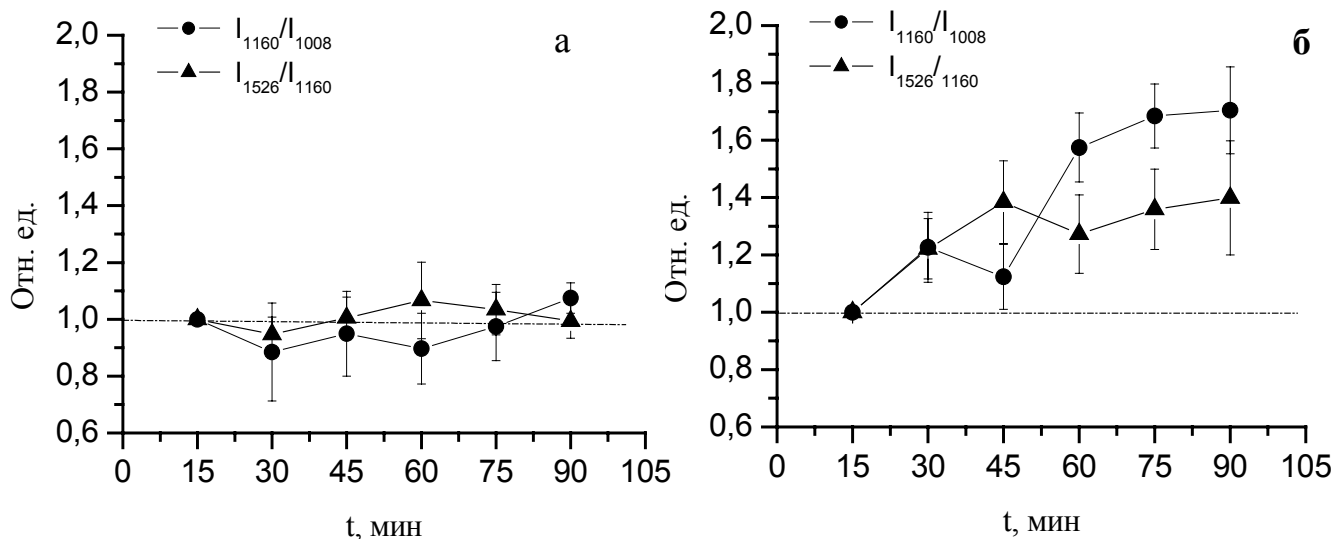


Рис. 6. (а) Отношения интенсивностей полос КР- спектров каротиноидов нервного волокна в лабораторном поле ($H = 39,7 \pm 0,04$ мкТл). (б) Отношения интенсивностей полос КР- спектров каротиноидов нервного волокна при компенсации постоянной составляющей в 200 раз ($H = 0,20 \pm 0,03$ мкТл).

[Максимов и др., 1990], так же увеличение отношения наблюдалось при гипероксии нерва. Возможно, что действие ОМП на нервную клетку влияет на диффузию O_2 внутрь волокна и связывание O_2 с каротиноидами.

Но изменения состояния каротиноидов могут изменить состояние цитоплазмы и мембранный потенциал, влияя тем самым на порог возбуждения и потенциал действия.

В связи с этим в следующей серии экспериментов исследовали изменения состояния цитоплазмы возбудимой клетки при действии ослабленного МП.

3. Исследование регулярных изменений показателя преломления цитоплазмы и плазматической мембраны нейронов при действии ослабленного МП.

Известно, что изменение мембранного потенциала, формы клетки, положения и объема органоидов, в частности митохондрий, влияют на оптические свойства нейронов. С помощью динамической фазовой микроскопии (ДФМ), исследовали локальные изменения коэффициента преломления изолированных нейронов, при действии ослабленного в 200 раз МП. Метод основан на регистрации изменений оптической плотности клетки

на выбранном участке. Высота фазового профиля (ВФП) клетки определяется, как геометрическим размером клетки, так и величиной коэффициента преломления в данной точке, который зависит от распределения органелл и элементов цитоскелета (рис. 7 (а), (б)). Для негомогенных объектов, какими являются большинство клеток, фазовая высота $\Phi(x,y)$ связана с показателем преломления цитоплазмы клетки и ее геометрической высотой следующим соотношением:

$$\Phi(x, y) = \int_0^{z_{\max}} (n(x, y, z) - n_1) dz - \Phi_0 \quad (1)$$

где n_1 - показатель преломления буферного раствора, величина которого постоянна, $n(x,y,z)$ - величина показателя преломления в точке клетки с координатами (x, y) и расстоянием z от подложки, z_{\max} - верхний предел интегрирования, выбирается выше верхней точки объекта.

Анализ, проведенный с помощью метода Фурье-преобразования, позволил нам выявить группу частот, характеризующую регулярные динамические процессы в плазматической мембране и примембранной области цитоплазмы (0,3–3 Гц). Важно, что даже в состоянии покоя Rz-нейрона нами были выявлены регулярные флуктуации локального коэффициента преломления (рис. 7 (г)). Таким образом, метод позволяет получить интегральную информацию о процессах в клетке.

Процессы, протекающие в клетке, условно можно разделить на мембранные и цитоплазматические. Исходя из этого, в эксперименте линии сканирования проводили в центре клетки и в области плазматической мембраны. В ходе исследования было показано, что в центральной части клетки изменения ВФП представляют спектр, в котором можно выявить как отдельные частоты, так и их группы. В данном случае, при сканировании регистрируются изменения, происходящие как в цитоплазме, так и в плазматической мембране.

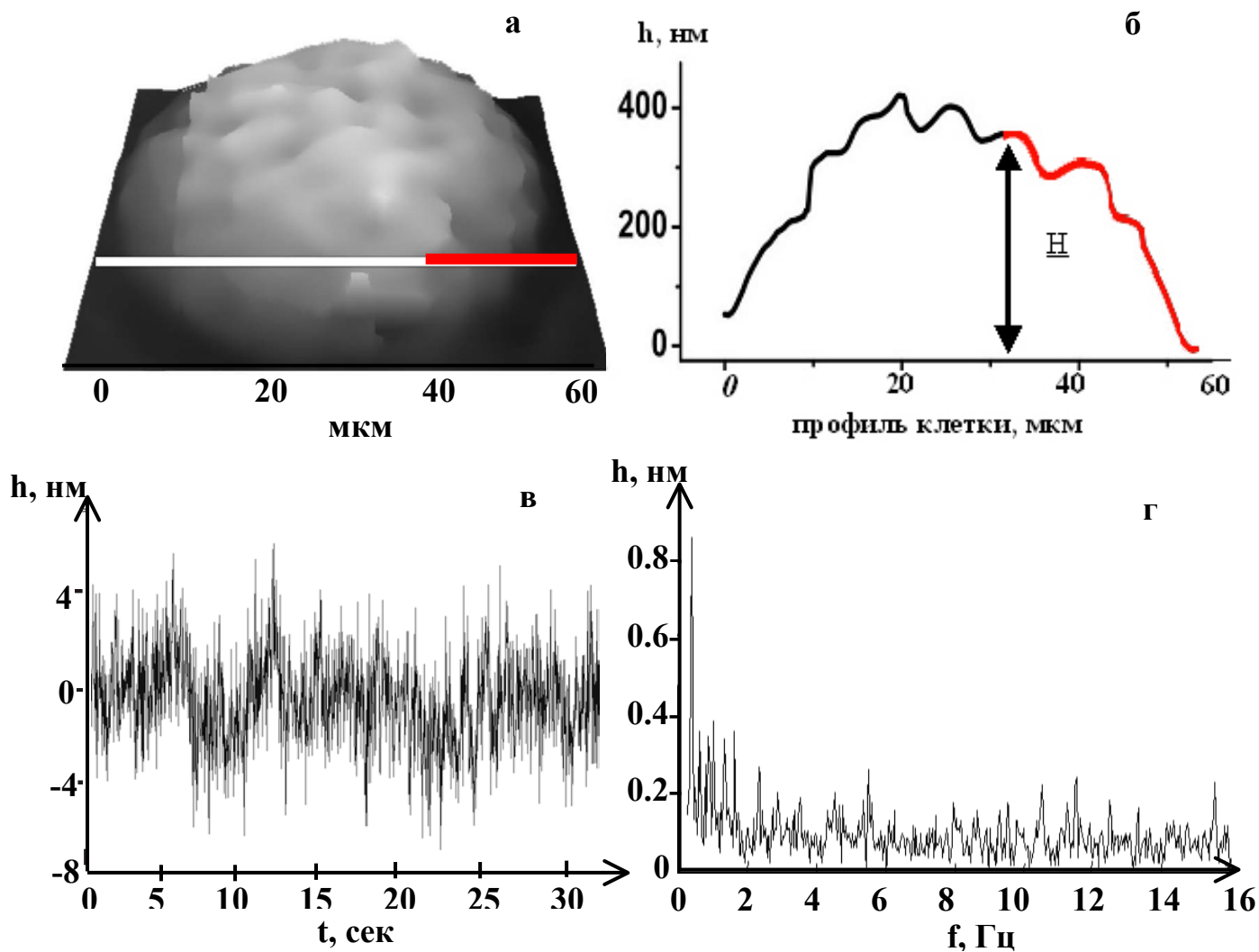


Рис. 7 (а) Фазовое изображение клетки – нейрона; (б) фазовый профиль клетки; (в) регистрограмма изменение высоты фазового профиля от времени в одной из точек скан-линии, (г) спектр Фурье характеризующий изменения оптической плотности клетки в выбранной точке.

При исследовании примембранной области клетки получали спектр частот изменений ВФП, который, в отличие от центра клетки, был представлен только одной группой частот 0,3-3,0 Гц.

Данная группа характерна для обеих исследуемых областей клетки, но их амплитуда в примембранной области клетки в 1,5–2,0 раза больше, чем центральной. При сканировании на краю клетки захватываемый объем мембраны в 2-3 раза больше, чем при сканировании в центре клетки. Таким образом, группа частот 0,3-3,0 Гц изменений ВФП связана с процессами, проходящими на мембране.

Отметим, что появление некоторых частот имеет нерегулярный характер, поэтому для представления результатов удобнее пользоваться вероятностью появления частот. Для этого за «полезный» пик брались те, что превышали уровень шума в 2 раза. На основе таких пиков строились графики $M(f)$. Для статистической обработки использовалось биномиальное распределение. В исследуемом интервале частот наиболее вероятные изменения происходили в областях 0,3-3; 4-6; 8-10; 13-15 Гц. Наиболее ярко выраженные изменения ВФП наблюдались в диапазоне частот от 0,3 до 3,0 Гц. Поэтому в дальнейшем для рассмотрения был выбран этот участок, как наиболее информативный. В связи с тем, что для исследования действия ОМП на нейроны важно было выявить процессы в примембранной области клетки, то процессы в центре клетки не рассматривались. На рис. 8 (а) представлен характерный вероятностный спектр нейрона в примембранной части. Этот спектр был взят в качестве критерия действия ослабленного МП.

На рис. 8 (б) представлен спектр регулярных изменений коэффициента преломления цитоплазмы нейрона, в ОМП со степенью ~ 200 кратного ослабления ($H=0,23\pm 0,02$ мкТл).

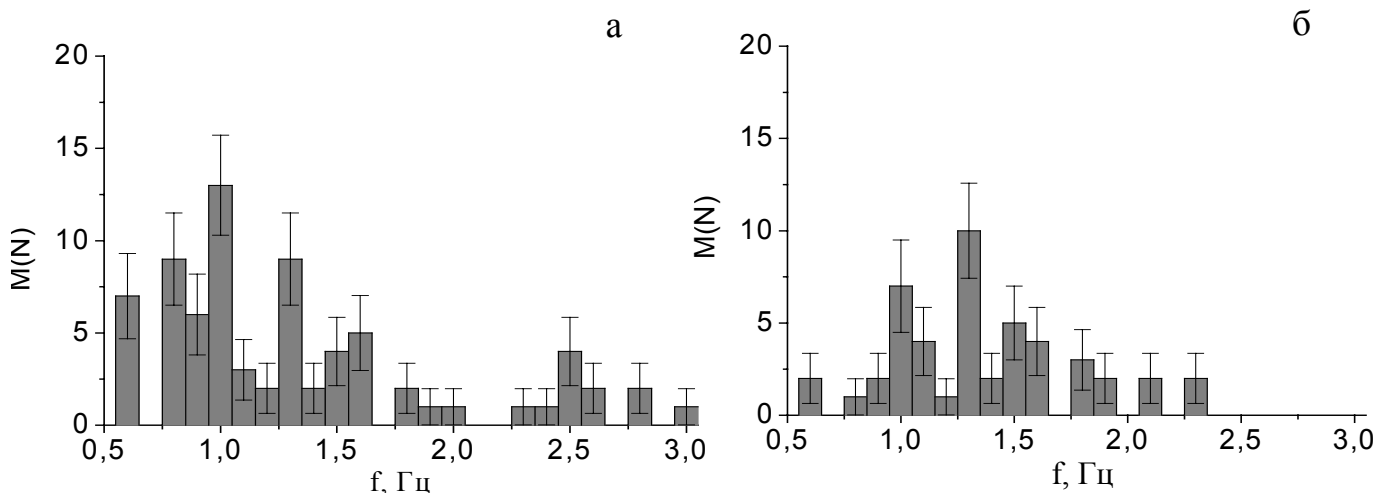


Рис. 8. (а) Спектр клетки лабораторное поле ($H=46,6\pm 0,4$ мкТл). (б) Спектр клетки в ослабленном МП ($H=0,23\pm 0,02$ мкТл).

Геомагнитное поле компенсировали с помощью трех пар колец Гельмгольца, расположенных перпендикулярно по отношению друг к другу.

Величину постоянной компоненты магнитного поля контролировали с помощью магнитометров. Время нахождения нейрона в ослабленном МП составляло 50 мин. Для каждого типа измерений была набрана статистка на 30 клетках.

Для проверки предположения, что изменение спектра при действии ОМП на нервную клетку, связано с деполяризацией плазматической мембраны, было проведено исследование действия поляризующих агентов на регулярные изменения коэффициента преломления цитоплазмы нейрона.

На рис. 9 представлены спектры, полученные при действии на нейрон блокатора K^+ канала (тетраэтиламмония (ТЭА)) и экстраклеточного раствора с повышенным содержанием ионов калия (K^+ -деполяризация). При действии ТЭА наблюдалось значительное снижение вероятности появления частот на всех интервалах, а при инкубации клетки в среде с повышенным содержанием калия наблюдается уменьшение вероятности появления частот ВФП (в интервале от 0,3 до 3,0 Гц.).

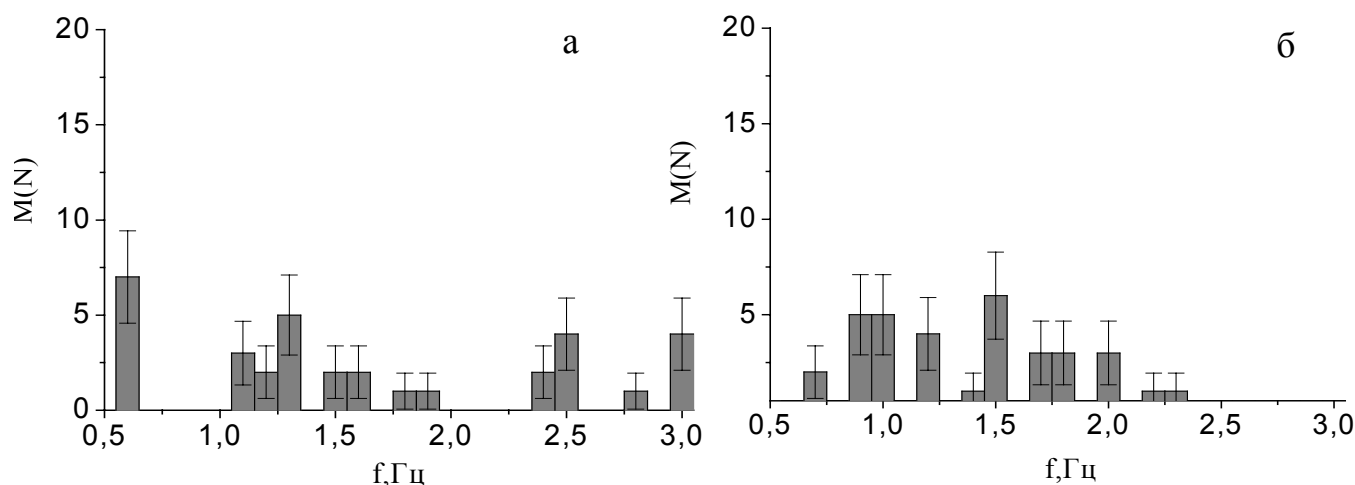


Рис. 9 (а). Спектр регулярных изменений коэффициента преломления цитоплазмы клетки в среде с 50мМ K^+ . (б) Спектр регулярных изменений коэффициента преломления цитоплазмы клетки в растворе с тэтроэтиламмонием. Лабораторное поле ($H=46,6\pm 0,4$ мкТл)

В данном исследовании нами было выявлено уменьшение вероятности возникновения группы частот 0,7-0,9 Гц; 1,2-1,5 Гц, а также отдельной частоты 2,0 Гц (рис. 9 (б)). Незначительно увеличилась вероятность на частотах 1,6-1,8 Гц; 2,5-3,0 Гц, и на отдельной частоте 0,6 Гц.

Установлено, что действие нейромедиаторов (ацетилхолина (АХ) и серотонина (5-НТ)), деполяризующих мембрану нейрона, приводит к увеличению амплитуд регулярных изменений коэффициента преломления цитоплазмы, и увеличению вероятности появления частот в наблюдаемом интервале.

Итак, деполяризация плазматической мембраны нейрона меняет спектр регулярных изменений оптической плотности цитоплазмы нейрона аналогичным образом, как и действие ослабленного МП (рис. 9 (а)). Как отмечалось ранее, в характер спектра вносят вклад интегральные клеточные процессы. Изменение ВФП клетки связано с флуктуациями коэффициента преломления цитоплазмы, что в свою очередь, может определять ход различных процессов. В связи с этим, рассмотрим возможные цитоплазматические процессы клетки, меняющие ВФП. Известно, что в клетках, в том числе и в нейронах, имеет место циклическое движение цитоплазмы, где с цитоплазмой движутся молекулы и органеллы (митохондрии, цитосомы). Очевидно, что прохождение этих объектов через область сканирования вносит свой вклад в интегральное изменение оптической плотности. Аналогичное влияние на изменение оптической плотности цитоплазмы клетки может оказать и процесс миграции цитоплазматических везикул в клетке. Вероятно, изменения оптической плотности могут быть связаны с процессами, происходящими на мембране клетки, такими, как изменения вязкости (латеральная диффузия) и флуктуации примембранного объема цитоплазматических структур. Так, кинетика изменений коэффициента преломления плазматической мембраны аксона, четко коррелирует с фазами ПД, а регулярные изменения коэффициента преломления цитоплазмы – с циклозисом и перемещением везикул в нейроне

[Cohen. 1973, Браже и др., 2006].

Итак, изменения ВФП мембраны могут быть связаны с целым рядом процессов: с изменением мембранного потенциала, вязкости, амплитудой циклозиса и изменениями объема нейрона. Предполагается, что регулярные изменения коэффициента преломления цитоплазмы с частотой 1 Гц связаны с изменением мембранного потенциала нейрона [Schutt et al., 2000, Браже, 2006 г]. Однако блокирование калиевых каналов не только препятствует выходу ионов калия из клетки и деполяризует мембрану нейрона, но также меняет объем и состояние цитоплазмы клетки.

Как и в случае плазматической мембраны нейрона, мы предполагаем, что действие ОМП, меняя конформацию каротиноидов и вязкость цитосом нейронов, модифицирует частоту и амплитуду циклозиса (регулярное движение цитоплазмы в клетке). Комплексный процесс, сопровождающийся перераспределением в клетке O_2 и оптической плотности митохондрий и цитосом проявляется в изменении частотного спектра (рис. 8 (б)).

Продолжительное возбуждение нерва при действии ОМП, приводит к повышению порога ПД, что может быть связано с увеличением мембранного потенциала плазматической мембраны. По видимому, действие ослабленного МП проявляется именно в плазматической мембране. Это предположение подтверждают результаты, полученные с помощью интерференционной микроскопии по изучению изменения оптической плотности примембранной области нейронов. Показано, что действие ОМП аналогично действию деполяризации мембраны нервной клетки, а в качестве агентов, транслирующих действия ОМП, могут выступать чувствительные к состоянию мембраны и внешним изменениям, молекулы каротина. Действие ОМП приводит к конформационным изменениям этих молекул. Подобные конформационные изменения наблюдалось при увеличении микровязкости мембраны нерва. В свою очередь изменение микровязкости в мембране аксона может вызвать, как один, так и совокупность процессов: снижения числа SH-групп, десорбция мембранно-связанного кальция увеличение рН или снижение

концентрации протонов во внешней среде, изменение парциального давления кислорода.

Важно, что изменения канформации каротиноидов при действии ОМП наблюдались только для каротиноидов локализованных в нервном волокне или в мембране цитосом нейронов, но не в выделенных каротиноидах. Кроме того, отсутствие изменений в скорости проведения ПД при действии ослабленного МП, свидетельствует о том, что данным процессе участвуют каротиноиды локализованные в перехвате Ранвье, а не миелине нервного волокна.

Известно, что одной из основных функций каротиноидов в клетке блокирование свободно-радикальных процессов и связывания O_2 [Карнаухов, 2000 г.]. Мы предположили, что действие ОМП приводит к изменению последнего процесса. Молекулы каротиноидов, локализованные в плазматической мембране нервного волокна, под действием ОМП сбрасывают O_2 увеличивая число двойных $C=C$ связей. Этот процесс может сопровождаться изменением конформации молекулы, увеличением микровязкости мембраны и величины порога ПД [Максимов, 1997]. В наших экспериментах снижение парциального давления кислорода приводило к аналогичным изменениям конформации каротиноидов, как и при действии ОМП. Изменение конформации каротиноидов и вязкости цитосом нейрона при действии ОМП и сбрасывании O_2 , по-видимому, меняет скорость циклозиса в клетке, что сказывается на регулярных изменениях коэффициента преломления цитоплазмы нейрона.

В заключении сформулированы основные результаты, полученные в ходе выполнения настоящей диссертационной работы:

В ходе проделанной работы было показано, что действие ослабленного в ~ 250 раз постоянного МП при непрерывном и длительном возбуждении нервного волокна приводит к увеличению порога ПД и соответственно к уменьшению амплитуды ПД, только для чувствительных волокон. При этом скорость проведения ПД не меняется.

Показано, что действие ослабленного в ~ 200 раз МП приводит к изменению в спектрах каротиноидов встроенных в мембрану нервного волокна и мембрану цитосом нейронов, выражено в увеличении отношения пиков КР-спектра. Это соответствует изменением конформации каротиноидов, аналогичной увеличению вязкости. Показано, что при действии изменений МП конформация каротина меняется только в клетке, а не в выделенной молекуле.

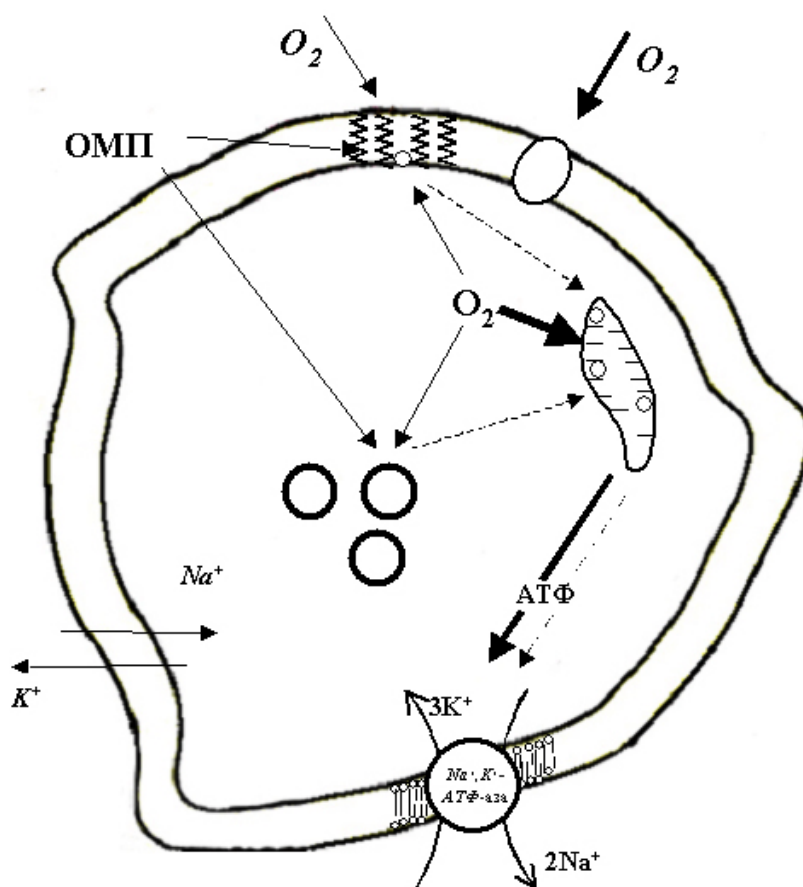


Рис. 10. Схема действия ОМП на нервную клетку. Молекулы каротиноидов, локализованные в плазматической мембране нервного волокна, под действием ОМП сбрасывают O_2 увеличивая число двойных $-C=C-$ связей. Изменение конформации молекулы, приводит к увеличению вязкости фосфолипидного окружения и к увеличению мембранного потенциала и порога ПД. Каротиноиды цитосом клетки, сбрасывая O_2 изменяют скорость циклолиза в клетке, что сказывается на регулярных изменениях коэффициента преломления цитоплазмы нейрона.

Показано, что изменение оптической плотности в примембранной части клетки связано с изменением мембранного потенциала. Показано, что ослабление в ~ 200 раз, постоянной составляющей ГМП, приводит к регулярным изменениям коэффициента преломления цитоплазмы, аналогичным действию агентов деполяризующих мембрану нейрона.

Предполагается, что «молекулярным сенсором» ОМП в нервной клетке является молекула каротиноида, полиеновая цепочка которой чувствительна не только к мембранному потенциалу или упорядоченности мембранных фосфолипидов, но и к содержанию кислорода в клетке [Карнаухов, 2000]. По-видимому, действие ОМП меняют способность каротиноидов связывать или отдавать кислород, что отражается на функционировании нервной клетки (рис. 10).

Выводы

1. При действии ослабленного в ~ 250 раз геомагнитного поля на нервное волокно с низким порогом возбуждения, обнаружено уменьшение амплитуды потенциала действия и увеличение порога, но не выявлены изменения в скорости проведения потенциала действия.
2. При действии ослабленного в ~ 200 раз геомагнитного поля меняется конформация молекулы каротиноида, локализованной в плазматической мембране и мембранах субклеточных органелл.
3. С помощью метода динамической фазовой микроскопии выявлены регулярные изменения коэффициента преломления примембранных структур цитоплазмы.
4. Действие ослабленного в ~ 200 раз геомагнитного поля, как и деполяризация плазматической мембраны, приводит к снижению амплитуды регулярных изменений показателя преломления примембранных областей цитоплазмы клетки.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. S.Norina, A.Shalygin, S.Novikov, S.Rastopov. "Magnetic separation study of the translational and orientable properties arising in biological microparticles under the adsorption and disturbing processes". // MISM99, Moscow International Simp.on Magnetism, Abstr.Book. - 1999. - 23P5-6.
2. T.Brindikova, S.Novikov, G.Maksimov, T.Vyshenskaja, V.Tychinsky. // "Investigation of R-neuron at neuro-glia interaction, European Biophysics Journal". – 2000. - Vol. 29. P. 351.
3. T.Brindikova, S.Novikov, G.Maksimov, T.Vyshenskaja, V.Tychinsky, "Investigation of the R-neuron membrane's oscillations during action potential". // International Workshop "New Biophysical Methods in Biology and Medicine". Neptun, Roumanie, Abstr.Book. - 2000. P. 141.
4. Т.Бриндикова, С.Новиков, Г.Максимов, А.Шалыгин, Т.Вышенская, В.Тычинский, А.Рубин. "Исследование состояния плазматической мембраны нейрона с помощью динамической фазовой микроскопии". // Биологические мембраны. – 2001. - Т.18 №5 - С. 359-362.
5. Новиков С. М., Бриндикова Т. А., Максимов Г. В., Шалыгин А. Н., Тычинский В.П., Вышенская Т.В. "Исследование влияния «нулевого» магнитного поля на R-нейрон retzius методом динамической фазовой микроскопии". // Сборник тезисов конференции "Физические проблемы экологии (Экологическая физика)". Россия, Москва, 2001. С. 171.
6. Л.А. Ерохова, С.М.Новиков, Т.А. Казакова, К.В. Индукаев, Г.Л. Лазарев, Д. А. Орлов, Г. В. Максимов. "Применение лазерной интерференционной микроскопии для исследования внутриклеточных и мембранных процессов в нейронах". // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины". – 2005. – Т. 140 № 8. – С. 237-239.
7. А.И. Юсипович, С.М. Новиков, Т.А. Казакова, Л.А. Ерохова, Н.А. Браже, Г.Л. Лазарев, Г.В. Максимов. "Особенности исследования изолированного нейрона методом лазерной интерференционной микроскопии". // Квантовая электроника. – 2006 - Т. 36 (9) - С. 874-878.

8. Новиков С.М., Максимов Г.В., Шалыгин А.Н., Труханов К.А. “Исследование действия МП близкого к нулю, на возбудимость нервной клетки”. // Сборник тезисов конференции «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине». Россия, Санкт–Петербург, 2006. С. 139.
9. Новиков С.М., Максимов Г.В., Волков В.В., Шалыгин А.Н. “Исследование действия ослабленного постоянного магнитного поля на возбудимость нервной клетки”. // Биофизика (в печати).