

## ВЛИЯНИЕ НИЗКОЧАСТОТНОГО ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ МАГНИТОМАРКИРОВАННЫХ КЛЕТОК *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Беспалова С.В.<sup>1</sup>, Кладько Д.В.<sup>1</sup>, Легенький Ю.А.<sup>1</sup>, Павлов В.Н.<sup>1</sup>, Глазунова В.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Донецкий национальный университет

ул. Университетская, 24, г. Донецк, 83055, ДНР

<sup>2</sup>Донецкий физико-технический институт им. А.А. Галкина

ул. Розы Люксембург, 72, г. Донецк, 283050, ДНР; e-mail: yu-legen@mail.ru, dan.kladko@yandex.ru

Поступила в редакцию: 26.07.2019

**Аннотация.** В данной работе исследовалось влияние низкочастотного переменного магнитного поля на жизнеспособность и магнитные свойства магнитомакированных и нативных дрожжевых клеток. В результате магнитной маркировки с разной внеклеточной концентрацией магнитных наночастиц в среде культивирования были получены образцы суспензий жизнеспособных магнитомакированных дрожжевых клеток с различной магнитной восприимчивости, а, следовательно, с различной степенью насыщенности клеток магнитными наночастицами. Измерения жизнеспособности клеток показали, что процедура магнитной модификации снижает жизнеспособность клеток не более чем на 30% по сравнению с нативными клетками. Установлено, что под действием переменного магнитного поля клетки теряют жизнеспособность тем сильнее, чем выше частота магнитного поля. Оценка метаболической активности клеток с помощью теста силы подкисления показала, что ингибирование клеточных процессов переменным магнитным полем усиливается при повышении частоты магнитного поля в исследованном диапазоне. Наибольший эффект ингибирования жизнеспособности переменным магнитным полем при сравнении нативных и магнитомакированных клеток наблюдается у нативной дрожжевой суспензии.

**Ключевые слова:** магнитные наночастицы, магнитная модификация, переменное магнитное поле, дрожжевые клетки.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время магнитные наночастицы оксидов железа нашли широкое применения в биомедицинской области, охватывающей направления адресной доставки лекарств, контрастирующих агентов для МРТ и, в частности, в качестве агентов для магнитной гипертермии и механических актуаторов. В научной литературе широко известно применение магнитных наночастиц в качестве преобразователей энергии высокочастотного переменного магнитного поля (ПМП) в тепло, что позволяет уничтожать раковые клетки посредством действия губительной для них температуры [1].

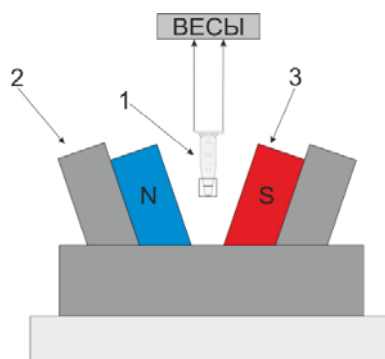
Однако такое лечение является рискованным, особенно вблизи термочувствительных структур, так как индукция тепла не может контролироваться в пространстве с высокой точностью и может вызвать некроз тканей [2]. Поэтому в данной работе внимание сфокусировано на применение магнитных наночастиц в качестве преобразователя энергии магнитного поля не в тепло, а в механическое воздействие на клетки [3], достигаемое использованием низкочастотного переменного магнитного поля.

Кроме непосредственно действия переменного магнитного поля на магнитные наночастицы, также остается вопрос безопасности действия такого поля на нативные клетки. Одним из эффектов, который может вызвать действие переменного магнитного поля, является наведение индукционных токов. Данное обстоятельство способно вызывать электрические пробои мембран и локально увеличивать температуру клеток и тканей [4].

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве агентов для маркировки клеток в данной работе использовались магнитные наночастицы магнетита, синтезированные по методике, представленной в работе [5]. Концентрацию железа в полученном коллоиде магнитных наночастиц определяли с помощью атомно-абсорбционной спектроскопии (Сатурн-ЗПЭА1). Магнитная модификация дрожжевых клеток проводилась по методике, аналогично работе [6]. В процессе магнитной маркировки к 2 мл отмытой дрожжевой суспензии вносили феррожидкость в объемах, которые обеспечивали следующие концентрации наночастиц магнетита (в пересчете на количество Fe, приходящееся на одну клетку): 1,5 пг, 3 пг и 5 пг на клетку. Распределение магнитных наночастиц на поверхности клеток исследовалось с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM 200A.

После магнитной маркировки на клетки воздействовали низкочастотным переменным магнитным полем, имеющим частоты 10 и 20 Гц с амплитудой равной 7 мТл, в течение 20 минут при постоянной температуре, которая контролировалась медь-константановой термопарой. Оценку магнитных свойств клеток до и после воздействия переменным магнитным полем проводили с помощью магнитофореза в специальной ячейке [5] и с помощью метода Фарадея (рис. 1).



**Рисунок 1.** Схема выполнения измерения в методе Фарадея. 1 – измеряемая пробирка с веществом, которая находится в участке с постоянным силовым фактором системы (обозначено квадратом), 2 – основа магнитной системы, 3 – магниты, создающие в области измерения постоянный градиент магнитного поля

В нашем случае измерения по методу Фарадея заключаются в определении разницы между кажущейся массой  $m_2$  образца 1 (см. рисунок 1), измеренной в неоднородном магнитном поле магнитной системы 3, и истинной массой этого образца  $m_1$ , измеренной без приложения магнитного поля, возникающей за счет магнитной силы, действующей параллельно силе тяжести на образец 1 с магнитной восприимчивостью  $\chi$  в неоднородном магнитном поле магнитной системы 3. Из величины магнитной силы  $\Delta mg = (m_2 - m_1)g$ , действующей на образец 1, вычисляется магнитная восприимчивость этого образца по формуле (1):

$$\chi = \frac{\Delta mg}{H\nabla H \cdot V}, \quad (1)$$

где  $\chi$  – магнитная восприимчивость образца;  $\Delta m$  – разность масс образца 1, измеренных в магнитном поле и без него, кг;  $H\nabla H$  – произведение напряженности магнитного поля на её градиент  $A^2/m^3$ ;  $V$  – объем образца,  $m^3$ .

Зная магнитную восприимчивость образца, содержащего измеренное с помощью камеры Горяева количество магнитомаркированных клеток, вычислялась магнитная восприимчивость клеток. В объеме образца  $V$  находится известное количество клеток  $N$ , определенное в камере Горяева. Магнитная сила, действующая на клетку, определяется как:

$$F_m = \mu_0 V_k \chi_k N H \nabla H, \quad (2)$$

где  $\chi_k$  – магнитная восприимчивость клеток;  $V_k$  – объем клетки,  $m^3$ ;  $N$  – число клеток в объеме образца.

Эта сила равна величине определяемой магнитной силы  $\Delta mg$ . Из этого равенства сил находим магнитную восприимчивость клеток  $\chi_k$ :

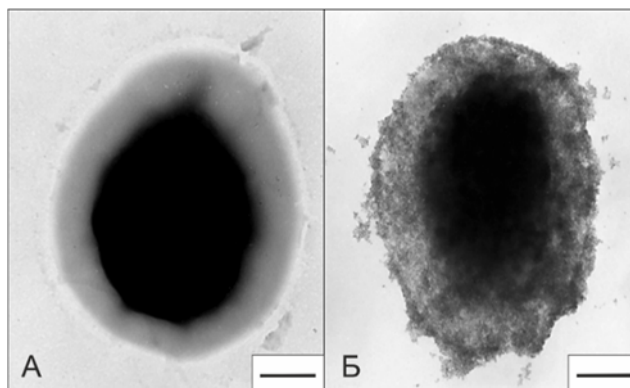
$$\chi_k = \frac{\Delta mg}{\mu_0 V_k N H \nabla H}. \quad (3)$$

Оценку жизнеспособности дрожжевых клеток до и после воздействия переменным магнитным полем проводили с помощью метода прижизненного окрашивания клеток метиленовым синим с подсчетом количества живых и мертвых клеток в камере Горяева и теста «силы подкисления» [7]. В его основе лежит определение уровней спонтанного и индуцированного снижения внеклеточного pH дрожжевой суспензии. Эти уровни отражают содержание гликогена в клетке (спонтанное подкисление) и протекание гликолитического пути метаболизма у дрожжей (индуцированное подкисление). Для определения спонтанного, индуцированного и общего подкисления биомассу клеток, маркированную наночастицами  $Fe_3O_4$  при определенной концентрации, суспендировали в 30 мл дистиллированной воды, после чего регистрировали изменение уровня водородного показателя в течение 10 минут (это этап спонтанного подкисления) с помощью pH-метра ULAB MP551. По истечении этого времени вносили 5 мл 20% раствора глюкозы и фиксировали показания pH ещё на протяжении 10 минут (этап индуцированного подкисления). Показатель  $\Delta pH$  определялся по формуле:

$$\Delta pH = pH_0 - pH_{20}, \quad (4)$$

где  $pH_0$  – показатель водородного потенциала в первую минуту измерения;  $pH_{20}$  – значение водородного потенциала на 20-й минуте проведения теста.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

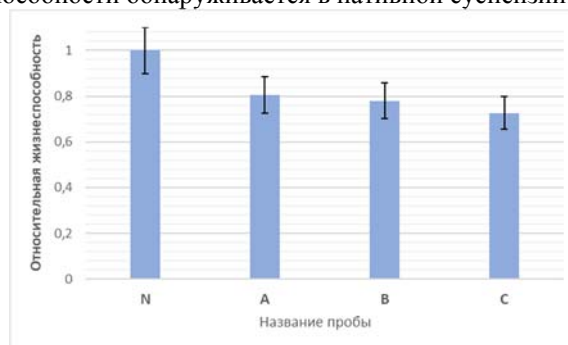


**Рисунок 2.** Фотографии нативной (А) и магнитомаркированной дрожжевой клетки (Б), полученной с помощью просвечивающей электронной микроскопии (увеличение 7000х). Линейка – 1 мкм

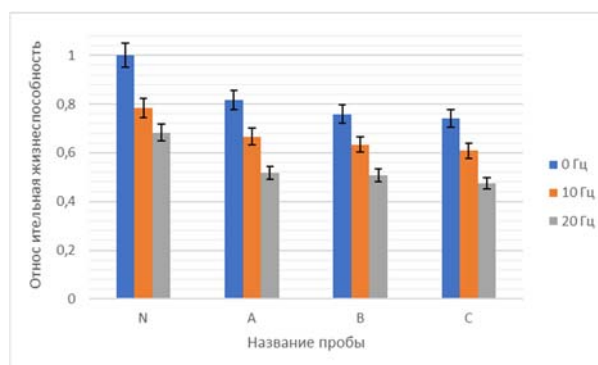
В результате магнитной маркировки с разной внеклеточной концентрацией магнитных наночастиц в среде культивирования были получены образцы суспензий жизнеспособных магнитомаркированных дрожжевых клеток с различной магнитной восприимчивостью. Фотографии, полученные с помощью просвечивающего электронного микроскопа (рис. 2) показывают, что клетки захватывают значительное количество магнитных наночастиц, которые в большей степени концентрируются на поверхности клеточной стенки и в периплазматической области дрожжевой клетки (рис. 2Б).

Данное обстоятельство говорит о высокой эффективности магнитной модификации клеток, в результате чего такими клетками возможно легко управлять с помощью градиентных магнитных полей и появляется возможность воздействовать на магнитомаркированные клетки переменным магнитным полем с помощью магнито-механической трансдукции. Измерения жизнеспособности клеток показали, что процедура магнитной модификации снижает жизнеспособность клеток не более чем на 30% по сравнению с нативными клетками (рис. 3), что говорит об отсутствии сильного цитотоксического действия магнитных наночастиц в данном диапазоне концентраций наночастиц.

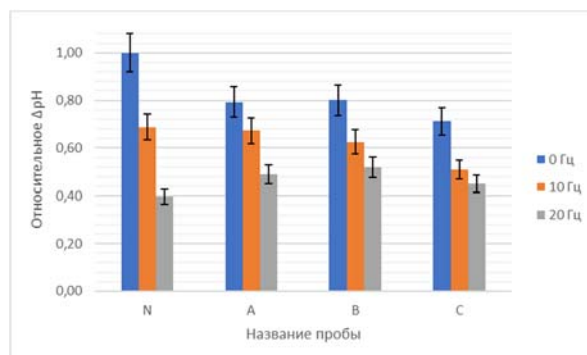
Воздействие низкочастотного магнитного поля на магнитомаркированные и нативные клетки повлияло на их жизнеспособности (рис. 4). В частности, после обработки магнитным полем с частотой 10 Гц доля мертвых клеток в суспензии клеток увеличивается на 15%, а при частоте 20 Гц – на 30%. При этом стоит отметить, что наибольшее подавление жизнеспособности обнаруживается в нативной суспензии.



**Рисунок 3.** Относительная жизнеспособность клеток после процедуры магнитной модификации. Шифр названия проб: N – нативные; А, В, С – магнитомаркированные клетки при концентрации железа 1,5, 3 и 5 пг на клетку, соответственно



**Рисунок 4.** Изменение относительной жизнеспособности клеток после обработки переменным магнитным полем с частотами 10 и 20 Гц. Шифр названия проб: N – нативные; А, В, С – магнитомаркированные клетки при концентрации железа 1,5, 3 и 5 пг на клетку, соответственно



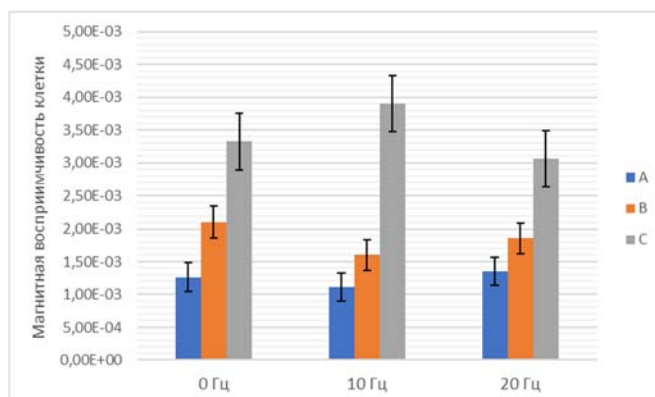
**Рисунок 5.** Изменение относительной  $\Delta pH$  после обработки переменным магнитным полем с частотами 10 и 20 Гц. Шифр названия проб: N – нативные; A, B, C – магнитомаркированные клетки при концентрации железа 1,5, 3 и 5 пг на клетку, соответственно

Оценка метаболической активности клеток с помощью теста силы подкисления показала, что переменное магнитное поле ингибирует клеточные процессы тем сильнее, чем выше частота магнитного поля в данном диапазоне частот (рис. 5). Необходимо отметить, что, аналогично данным по камере Горяева, наибольшее подавление выделения протонов во внеклеточную среду при проведении теста подкисления наблюдается у нативных дрожжевых клеток после обработки переменным магнитным полем.

Оценка магнитных свойств магнитомаркированных клеток показала, что образцы суспензий магнитомаркированных дрожжевых клеток имели различную магнитную восприимчивость, возрастающую в ряду A, B, C (рис. 6). При этом нами не обнаружено изменение магнитных свойств клеток после обработки переменным магнитным полем. Данный результат говорит об отсутствии деградации магнитных свойств клеток под воздействием низкочастотного магнитного поля с исследованными параметрами и о хорошем закреплении магнитных наночастиц на клетках.

Механизмы действия низкочастотных магнитных полей небольшой амплитуды на биологические объекты на данный момент не объяснены и интенсивно обсуждаются в научной литературе [5]. Так как в настоящем исследовании показано, что ингибирование жизнеспособности и метаболических процессов для магнитомаркированных дрожжевых клеток в ПМП проявляется менее сильно, чем для нативных клеток, следовательно, явления, связанные с магнитной механотрансдукцией, не играют заметной роли в исследованном диапазоне параметров ПМП. Возможным объяснением данных по снижению жизнеспособности может быть действие наведенных индукционных токов на дрожжевые клетки. В пользу этой гипотезы говорит тот факт, что наибольший эффект снижения жизнеспособности проявляется на нативных клетках, а не на магнитомаркированных, как следовало бы ожидать при механическом действии наночастиц на клеточную стенку и мембрану магнитомаркированных клеток в переменном магнитном поле. Данный факт позволяет предположить, что магнитные наночастицы на клетках обеспечили экранирование клеточной мембраны от действия ПМП, тем самым магнитная маркировка способствует более легкому перенесению маркированными клетками неблагоприятного фактора в виде переменного магнитного поля. Кроме того, данный результат позволяет говорить о том, что для появления эффектов механического воздействия наночастиц на клетки требуются другие режимы обработки клеток переменным магнитным полем.

Таким образом, результаты проведенного исследования демонстрируют принципиальную возможность использования низкочастотного переменного магнитного поля для регулирования жизнеспособности и метаболической активности как магнитомаркированных клеток, так и нативных. Поэтому вопрос применения такого магнитного поля в терапии требует дальнейших исследований в области безопасности и селективности использования по отношению к здоровым клеткам, не имеющим магнитных наночастиц.



**Рисунок 6.** Магнитная восприимчивость клеток, усредненная по измерениям двумя методами. A, B, C – магнитомаркированные клетки при концентрации железа 1,5, 3 и 5 пг на клетку, соответственно

**Список литературы / References:**

1. Bettina Kozissnik, Ana C. Bohorquez, Jon Dobson & Carlos Rinai. Magnetic fluid hyperthermia: Advances, challenges, and opportunity. *International Journal of Hyperthermia*, 2013, vol. 29, no. 8, pp. 706-7142.
2. Ahmed M., Brace C.L., Lee F.T., Goldberg S.N. Principles of and Advances in Percutaneous Ablation. *Radiology*, 2011, vol. 258, pp. 351-369.
3. Zhang E., Kircher M.F., Koch X.M., Eliasson L., Goldberg S.N., Renstro E. Dynamic Magnetic Fields Remote Control Aporptosis via Nanoparticle Rotation. *ACS Nano*, 2014, vol. 8, pp. 3192-3201.
4. Турчин В.В., Легенький Ю.А., Солопов М.В., Попандопуло А.Г., Беспалова С.В., Фисталь Э.Я. Магнитофоретические свойства фетальных фибробластов человека, маркированных суперпарамагнитными наночастицами оксида железа, стабилизированными цитратом. *Гены и клетки*, 2017, т. 12, вып. 1, с. 47-53. [Turchyn V.V., Legenkiy Yu.A., Solopov M.V., Popandopulo A.G., Bepalova S.V., Fistal E.Ya. Magnetophoretic properties of human fetal fibroblasts magnetically labeled with citrate stabilized superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Genes and cells*, 2017, vol. 12, iss. 1, pp. 47-53. (In Russ.)]
5. Бинги В. Н. *Принципы электромагнитной биофизики*. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2011, 592 с. [Binhi V.N. *Principles of electromagnetic biophysics*. Moscow: FIZMATLIT, 2011, 592 p. (In Russ.)]
6. Беспалова С.В., Кладко Д.В., Легенький Ю.А. Влияние постоянного магнитного поля на процесс магнитной модификации *Saccharomyces cerevisiae*. I Всероссийская конференция с международным участием «Физика и экология ЭМИ», п. Агой, 2017, Научные труды конференции, т. 1, с. 3-4. [Bepalova S.V., Kladko D.V., Legenkiy Yu.A. Influence of static magnetic field on magnetic modification of yeast cells. I Russian conference with international participation "Physics and Ecology of EMP", Agoy, 2017, Conference proceedings, vol. 1, p. 3-4. (In Russ.)]
7. Kara B.V., Simpson W.M., Hammond R.M. Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test. *Journal of the Institute of Brewing*, 1988, no. 94, pp. 153-158.

**INFLUENCE OF LOW-FREQUENCY ALTERNATING MAGNETIC FIELD ON VIABILITY OF MAGNETICALLY MODIFIED YEAST CELLS****Bepalova S.V.<sup>1</sup>, Kladko D.V.<sup>1</sup>, Legenkiy Yu.A.<sup>1</sup>, Pavlov V.N.<sup>1</sup>, Glazunova V.A.<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Donetsk National University

Universitetskaya str., 24, Donetsk, 283050, DPR

<sup>2</sup>A.A. Galkin Donetsk Physicotechnical Institute

Rose Luxemburg str., 72, Donetsk, 283050, DPR; e-mail: yu-legen@mail.ru, dan.kladko@yandex.ru

**Abstract.** In this paper, we studied the influence of a low-frequency alternating magnetic field on viability and magnetic properties of magnetically modified and native yeast cells. As a result of magnetic labeling with different extracellular concentration of magnetic nanoparticles in the culture medium, samples of suspensions of viable magnetically labeled yeast cells with different magnetic susceptibility were obtained. Measurements of cell viability showed that the procedure of magnetic modification reduces cell viability less than 30% compared with native cells. It was found that under the action of an alternating magnetic field, cells lose their viability in frequency-dependent manner. The greatest effect of inhibiting viability by an alternating magnetic field is in the native yeast suspension. In addition, we found no significant changes in the magnetic properties of cells after their treatment by alternating magnetic field. A possible explanation of the viability data might be the action of inductive currents on yeast cells.

**Key words:** magnetic nanoparticles, magnetic labeling, alternating magnetic field, yeast cells.