

UNIVERSITATEA “BABEȘ – BOLYAI” CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE FIZICĂ

SILVIA NEAMȚU

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Funcționalitatea celulelor vii în câmpuri
electrice și magnetice

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:
C.S. I Dr. VASILE V. MORARIU

CLUJ-NAPOCA

2010

CUPRINS

INTRODUCERE.....	1
PARTEA I	
INFLUENȚA CÂMPURILOR MAGNETICE SLABE ASUPRA DEZVOLTĂRII PLANTELOR ȘI BACTERIILOR	
CAPITOLUL I	
1. Percepția câmpurilor magnetice slabe la nivel celular.....	6
2. Mecanisme de interacție ale câmpurilor magnetice slabe cu structurile celulare..	9
2.1. Mecanisme de rezonanță.....	10
2.2. Stări metastabile ale apei.....	14
2.3. Efectul câmpului magnetic asupra fluxului de electroni.....	14
2.4. Modelul recombinării perechilor de radicali (RP).....	15
3. Rezumat.....	17
CAPITOLUL II	
CÂMP GEOMAGNETIC– VARIAȚII MAGNETICE NATURALE.....	19
1. Fluctuații naturale ale câmpului geomagnetic.....	21
1.1. Noțiuni generale.....	21
1.2. Influența activității geomagnetice asupra procese biologice.....	23
2. Semnificația câmpului geomagnetic pentru organismele vii.....	27
CAPITOLUL III	
EFECTUL CAMPURILOR MAGNETICE SLABE ASUPRA CREȘTERII VEGETATIVE A PLANTELOR	
1. Dezvoltarea vegetativă a plantelor. Noțiuni generale.....	30
1.1. Germinarea semințelor.....	30
1.2. Dezvoltarea postembrională a plantelor.....	33
1.2.1. Diviziunea celulară în meristemele apicale ale radiclei embrionale..	33
1.2.2. Extensia celulară.....	34
1.3. Dezvoltarea organelor laterale ale plantei.....	35
2. Bioefecte ale câmpurilor magnetice slabe în etapa vegetativă de creștere a plantelor	37
2.1. Influența câmpurilor magnetice slabe în faza de germinare a semințelor..	37
2.2. Efectul câmpurilor magnetice a.c/d.c combinate.....	39
2.3. Efectul câmpurilor magnetice alternative.....	40
2.3.1. Efectul câmpurilor magnetice AC slabe potențat de factori de stress	41
2.4. Efecte biologice în câmp magnetic zero.....	42
3. Dezvoltarea vegetativă a plantelor în câmp magnetic zero – Rezultate experimentale	44
3.1. Câmp magnetic zero – compensare și monitorizare.....	45
3.2. Pregătirea și expunerea probelor în CMZ.....	46
3.3. Germinarea semințelor în CMZ.....	49
3.4. Efectul CMZ în faza postembrională de creștere a plantulelor.....	54
3.5. Efectul CMZ asupra dezvoltării organelor laterale ale plantelor.....	65
3.5.1. Analiza modificărilor morfologice ale plantelor.....	65

3.5.1.1-6. <i>Tagetes Patula L., Tagetes erecta L., Calendula officinalis L., Triticum aestivum L., Secale cereale Lycopersicum esculentum L., Capsicum anuum L.</i>	65
3.5.2. Analiza modificărilor ultrastructurale ale frunzelor.....	76
3.6. Concluzii.....	85

CAPITOLUL IV

INTERACȚIA CAMPURILOR MAGNETICE SLABE CU BACTERIILE ȘI CIANOBACTERIILE

1. Bioefecte în câmp magnetic static și oscilant.....	94
1.1. Câmpuri magnetice intense.....	95
1.2. Câmpuri magnetice moderate.....	96
1.3. Câmpuri magnetice slabe.....	97
1.3.1. Efecte la nivelul structurilor celulare.....	98
1.3.1.1. Transpoziția și expresia genelor.....	98
1.3.1.2. Modificări conformaționale ale cromatinei în genomul bacterian.....	99
1.3.2. Creșterea bacteriilor în câmpuri magnetice slabe.....	101
1.4. Influența activității geomagnetice asupra dezvoltării bacteriilor.....	102
2. Efecte ale câmpului magnetic zero asupra dezvoltării bacteriilor.....	107
2.1. Date din literatură.....	107
2.2. Curba de creștere în sisteme închise de cultivare bacteriană.....	108
2.3. Rezultate experimentale.....	110
2.3.1. Expunerea culturilor de bacterii în CMZ.....	110
2.3.2. Evaluarea creșterii bacteriene în CMZ.....	111
2.3.3. Multiplicarea bacteriană și activitatea metabolică în culturi de <i>Listeria monocitogenes</i> , <i>E. coli</i> și <i>Salmonella</i> expuse în CMZ	114
2.3.4. Creșterea și activitatea metabolică a unor germeni microbieni pe substrat de albumină.....	117
2.4. Discuții.....	120
3. Dezvoltarea cianobacteriilor în câmp magnetic zero. Influența activității geomagnetice	
3.1. Pregătirea și expunerea culturilor de cianobacterii în CMZ.....	122
3.2. Evaluarea vitezei de creștere a cianobacteriilor în CMZ.....	123
3.3. Rezultate experimentale.....	123

CAPITOLUL V

MOTILITATEA *LISTERIEI MONOCITOGENES* ȘI A SPERMATOZOIZILOR IN CAMP MAGNETIC ZERO - DATE PRELIMINARII

1. Motilitatea celulară.....	128
1.1. Motoare moleculare.....	128
2. Efecte ale câmpurilor electromagnetice asupra motilității celulare.....	132
3. Rezultate experimentale	134
3.1. Expunerea culturilor de <i>Listeria monocitogenes</i> în CMZ.....	134
3.2. Analiza motilității spermatozoizilor umani în lichid seminal.....	134
3.3. Motilitatea <i>Listeriei monocitogenes</i> in CMZ.....	135
3.4. Motilitatea spermatozoizilor în CMZ.....	136

CAPITOLUL VI - CONCLUZII FINALE.....	139
BIBLIOGRAFIE.....	142

PARTEA II

EFECTE ALE CÂMPURILOR ELECTRICE INTENSE, DE SCURTĂ DURATĂ ASUPRA CELULELOR VII: ELECTROPERMEABILIZAREA BIOMEMBRANELOR

CAPITOLUL I

1. Introducere.....	157
2. Procese primare în biomembrane expuse unui câmp electric pulsat.....	159
2.1. Potențialul de membrană indus sub acțiunea pulsurilor de câmp electric	161
3. Caracteristici ale procesului de electropermeabilizare membranară.....	164
3.1. Dependența potențialului transmembranar de intensitatea câmpului electric extern.....	164
3.2. Caracterul vectorial al câmpului electric pulsat – permeabilizarea asimetrică	165
3.3. Interdependența parametrilor electrici.....	167
4. Transport molecular prin membrane electropermeabilizate.....	168
5. Cinetica procesului de electropermeabilizare membranară.....	170
6. Modele teoretice ale procesului de electropermeabilizare membranară.....	177
7. Electroporarea biomembranelor – metodă utilizată în biotehnologie.....	177

CAPITOLUL II – REZULTATE EXPERIMENTALE

1. Tehnica electropermeabilizării biomembranelor – Instalația experimentală.....	180
1.1. Parametrii electrici.....	181
1.2. Procedeele de electroporare în flux.....	182
1.3. Blocul de termostatare.....	183
2. Contribuția parametrilor de puls electric în procesul de electropermeabilizare a membranei eritrocitare.....	184
1. Experiment.....	184
2.2. Rezultate	185
3. Inactivarea procesului de reinchidere a electroporilor în membrane eritrocitare iradiate cu electroni.....	190
3.1. Analiza țintă.....	191
3.2. Iradiere cu electroni.....	192
3.3. Electroporare.....	192
3.4. Rezultate experimentale.....	193
4. Determinarea distribuției dimensionale a celulelor pe baza experimentelor de electropermeabilizare membranară.....	196
4.1. Electrohemoliza eritrocitară.....	198
4.2. Rezultate experimentale.....	199
5. Electropermeabilizarea membranară în patologia diabetică și leucemică.....	201
5.1. Rezultate experimentale.....	202

CAPITOLUL III – CONCLUZII.....	207
BIBLIOGRAFIE.....	210

Cuvinte cheie:

- câmpuri magnetice slabe, câmp geomagnetic, câmp magnetic zero, activitate geomagnetică, indice Ap, mecanisme de rezonanță magnetică, modelul transferului de electroni, recombinarea perechilor de electroni,
- plante, creștere vegetativă a plantelor, germinare, lucerna - *Medicago sativum* L., grâu - *Triticum aestivum* L., seară - *Secale cereale* L., roșii- *Lycopersicon esculentum* L., ardei - *Capsicum annuum* L., craiță - *Tagetes erecta* L., *Tagetes patula* L., gălbenele - *Calendula officinalis* L., analiza ultrastructurală, analiza fractală,
- bacterii, multiplicare bacteriană, *Listeria monocitogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, împrăștierea luminii laser la unghiuri mici, electroforeză în gel de poliacrilamidă, electroforeză în gel de agaroză, cianobacterii, *Synechocystis*, motilitate celulară, motoare moleculare, spermatozoizi umani,
- electropermeabilizare membranară, electroporare, potențial critic transmembranar, câmp electric pulsant, transport molecular, transfer de ADN, teoria porilor apoși, simularea dinamicii moleculare (MD), electroincorporare, electroinsertie, electrofuziune, electrochemoterapie, electrotransfer transdermic,
- electrohemoliză, refacerea membranei electropermeabilizate, iradiere cu electroni, analiza țintă, citoschelet eritrocitar, spectrină, distribuție dimensională,
- glicozilare proteică, diabet zaharat tip I, diabet zaharat tip II, leucemie limfatică cronică, limfom Hodykin, insuficiență medulară, hemoglobina glicozilată.

INTRODUCERE

Teza are drept obiectiv investigarea efectelor morfologice și funcționale induse de interacțiunea sistemelor vii cu câmpurile electrice și magnetice.

Natura nonmagnetică a membranelor, celulelor și a țesuturilor permite penetrarea câmpurilor magnetice cu o atenuare neglijabilă și acțiunea directă la diferite nivele ale structurilor și proceselor celulare. Problema actuală a interacției structurilor celulare cu câmpurile magnetice slabe (μT) este dată de pragul de percepție și răspuns celular. Câmpul geomagnetic ca factor de mediu a organismelor vii cuprinde o componentă statică (principală) cu originea în nucleul Pământului ($\sim 50 \mu\text{T}$) peste care se suprapune o componentă alternativă generată de surse naturale de origine interplanetară modulate de activitatea solară și surse electromagnetice de natură tehnologică. Câmpurile magnetice ambientale sunt câmpuri slabe ($1-100 \mu\text{T}$) de joasă frecvență ($0-300\text{Hz}$) cu o componentă majoră de $50-60\text{Hz}$ generată de liniile de transmisie și distribuție electrică. La nivel celular, energia produsă în acest interval al parametrilor de câmp se află sub pragul de percepție celulară definit de energia indusă de zgomotul termic membranar și nu justifică existența unui răspuns biologic semnificativ. Răspunsul biologic în prezența câmpurilor magnetice slabe este susținut însă de o largă bază de date experimentale și epidemiologice și este caracterizat prin curbe neliniare doză-răspuns, cu eficiență semnificativă în intervale de amplitudine și/sau frecvență, definite prin „ferestre de amplitudine” și „ferestre de frecvențe”. „Ferestrele biologice” pentru câmpurile magnetice slabe sunt puse în evidență la diferite nivele de organizare structurală, sau la nivel funcțional.

Un număr mare de publicații atestă existența unor corelații semnificative între datele clinice, epidemiologice, diferite procese biologice și fluctuațiile naturale ale componentei alternative a câmpului geomagnetic. Perturbările geomagnetice sunt considerate un factor de risc ecologic care pot desincroniza ritmurile biologice și alte procese în organism sau pot modifica starea funcțională a creierului. În mod similar, reducerea componentei statice a câmpului geomagnetic poate constitui un factor de risc pentru sănătate, generând perturbări funcționale ale diferitelor sisteme ale organismului [Pokhodzey 1998]. La nivel celular, ecranarea câmpurilor magnetice induce o diminuare a proliferării celulare, procese de accelerare a sintezei proteinelor, modificări la nivelul ultrastructurii celulare, etc [Belyavskaia 2004]. Compensarea componentei statice a câmpului geomagnetic este percepută ca un element de stres la nivelul proceselor de transport membranar [Morariu și colab. 1999, Ciorba și Morariu 2001, Ciorța și colab 2001]. Variabilitatea răspunsului biologic pare să constituie o caracteristică generală a interacției organismelor simple (plante, procariote) cu câmpurile magnetice slabe.

Studiul sistematic al proceselor de creștere a plantelor și a bacteriilor în absența componentei principale a câmpului geomagnetic (câmp magnetic zero) prezentat în prima parte a tezei, completează tabloul de ansamblu al semnificației câmpului geomagnetic în dezvoltarea acestor organisme și al influenței fluctuațiilor magnetice naturale (furtuni magnetice).

Membrana celulară prezintă pe de altă parte un important câmp electric intrinsec menținut prin distribuția dipolilor și prin deplasările permanente de ioni între mediile intra-respectiv extra-celular. Această componentă intrinsecă de câmp electric intens prezent la nivelul membranelor celulare reprezintă o barieră esențială pentru acțiunea câmpurilor

electrice externe. Un important aspect de interes biotehlogic al interacției celulelor cu câmpurile electrice este modularea potențialului membranelor intrinsec prin intermediul unui câmp electric pulsat intens (kV/cm) și de scurtă durată (μ s). Peste o valoare de prag a potențialului transmembranelor indus are loc o restructurare a bistratului lipidic însoțită de permeabilizarea membranei și transportul molecular intra și extracelular. Electropereabilizarea membranelor este un proces neinvaziv care poate fi controlat și modulată de parametrii electrice. Succesele care însoțesc utilizarea acestui proces în scopuri aplicative au dat naștere unei noi biotehnologii bazată pe tehnica electroporării biomembranelor. În timp ce din punct de vedere experimental literatura este impresionantă și dovedește importanța practică a tehnicii de electroporare, procesele moleculare care stau la baza electropereabilizării membranelor reprezintă un subiect mult dezbătut și în prezent.

Studiile prezentate în a doua parte a tezei cuprind contribuții originale legate atât de aspectele fundamentale ale procesului de electropereabilizare membranelor cât și de aplicații ale tehnicii de electroporare ca metodă alternativă de investigare a modificărilor la nivel celular în diverse patologii.

PARTEA I

INFLUENȚA CÂMPURILOR MAGNETICE SLABE ASUPRA DEZVOLTĂRII PLANTELOR ȘI BACTERIILOR

Scopul primei părți al tezei constă în ilustrarea influenței câmpurilor magnetice naturale în procese bazate pe creșterea și multiplicarea celulară a unor organisme unicelulare cum sunt bacteriile și cianobacteriile și în dezvoltarea vegetativă a plantelor. Semnificația câmpului geomagnetic în aceste procese a fost pusă în evidență în condiții de compensare a componentei statice a câmpului geomagnetic (câmp magnetic zero). Cercetarea este motivată în primul rând de numărul extrem de redus de studii privind răspunsul acestor organisme în câmp geomagnetic compensat. S-a avut în vedere realizarea unor investigații complete, care în cazul evoluției plantelor au cuprins toate etapele de creștere vegetativă, experimentele fiind realizate pe un număr semnificativ de specii, în diferite perioade ale anului.

Studiile de multiplicare bacteriană au cuprins cel puțin două metode de analiză pe diferite tulpini bacteriene. Rezultatele preliminare legate de motilitatea celulară în câmp magnetic zero încheie prima parte a acestei teze.

Datele experimentale sunt precedate de o sistematizare a bioefectelor câmpurilor magnetice slabe pentru fiecare sistem biologic investigat.

III. EFECTUL CAMPURILOR MAGNETICE SLABE ASUPRA CREȘTERII VEGETATIVE A PLANTELOR

1. DEZVOLTAREA VEGETATIVĂ A PLANTELOR. NOȚIUNI GENERALE

Din punct de vedere ontologic, dezvoltarea temporală a plantelor pe durata unui ciclu de viață este definită prin patru stadii [Pankaj și colab. 2005]: 1. etapa vegetativă care cuprinde faza de: i) germinare a semințelor, ii) dezvoltare a plantulei marcată prin formarea frunzelor și elongarea tulpinii, iii) ramificarea; 2. etapa reproductivă definită prin fazele de

inflorescență, înflorire, formarea fructului și maturizarea plantei; 3. senescența cuprinde procesele care au loc până la finalizarea vieții active a plantei; 4. perioada de latență constă în suspendarea activităților fiziologice care pot fi însă reactivate.

Spre deosebire de regnul animal la care tiparul structural de bază a corpului și a organelor este conturat încă din faza de dezvoltare embrionară, evoluția plantelor presupune formarea și dezvoltarea continuă de noi țesuturi și organe.

Germinarea semințelor, respectiv trecerea de la starea de repaus vegetativ la cea de viață activă, constă într-o succesiune de faze inițiate prin preluarea apei prin pereții celulari (faza de îmbibare) și activarea hormonilor de semnalizare. Din punct de vedere fiziologic, procesul de germinare este finalizat odată ce radica embrională străpunge țesuturile care înconjoară embrionul (embriogeneza). Balansul între capacitatea de expansiune a embrionului (potențialul de creștere) și restricția impusă de țesutul înconjurător (endospermul) reprezintă factorul determinant al duratei procesului de germinare

Procesul fiziologic de creștere post embrională a plantulei are la bază procesul de diviziune și extensie celulară la nivelul unor țesuturi specializate numite meristeme care se formează în timpul embriogenezei la polii opuși ai seminței (meristeme apicale) și care inițiază dezvoltarea rădăcinii și a axului principal al plantulei. Creșterea plantelor depinde de continua funcționare a meristemelor în care balansul între proliferarea și diferențierea celulară este riguros controlată.

Inițierea organelor laterale ale plantelor cum sunt formarea frunzelor, florilor, fructelor implică o creștere a vitezei de diviziune celulară în partea laterală a meristemului apical al tulpinii. Proliferarea celulară localizată în această zonă duce la formarea primordiilor organului lateral și inițierea diviziunii celulare în primordiile nou formate. Activitatea hormonală și expresia genetică reprezintă principalul motor al procesului de dezvoltare al plantelor tinere și mature.

3. DEZVOLTAREA VEGETATIVĂ A PLANTELOR ÎN CÂMP MAGNETIC ZERO – REZULTATE EXPERIMENTALE

Interesul pentru germinarea și creșterea plantelor în lipsa câmpului geomagnetic (CMZ) este legată în primul rând de cercetările spațiale. În acest sens sunt relevante primele cercetări revizuite de Conley în 1969. O importantă contribuție în perioada 1978-2000 au adus-o grupurile de cercetare din Federația Rusă, a căror publicații (în limba rusă) greu accesibile până de curând, au fost mediatizate de Belyavskaya [2004]. Principala problemă a acestor cercetări rămâne marea diversitate a rezultatelor publicate.

Influența câmpului geomagnetic compensat asupra creșterii plantelor a fost predominant investigată în condiții de ecranare magnetică pe perioade de creștere relativ scurte. Datele publicate în literatura de specialitate ilustrează doar aspecte parțiale ale evoluției unei specii în astfel de condiții. Cercetările noastre au avut ca scop principal extinderea investigațiilor la analiza întregului interval de creștere vegetativă. Alte aspecte noi cuprind:

- 1) monitorizarea procesului de creștere în diferite perioade ale anului pe același material și în aceleași condiții experimentale

- 2) testarea comparativă a unor specii de plante care nu au mai fost analizate

Selecția plantelor a avut în vedere o varietate a speciilor de plante care să cuprindă atât plante de cultură cu importanță economică (lucerna - *Medicago sativum* L. var. *Luzerne*

Euver, grâu - *Triticum aestivum*, fam Gramineae, seară - *Secale cereale*, fam Gramineae, hrișcă - *Fagopyrum esculentum*, fam Polygonaceae, roșii- *Lycopersicon esculentum*, fam Solanaceae, ardei - *Capsicum annuum*, fam Solanaceae) cât și plante din flora spontană (*craiță* - *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, fam Asteraceae, gălbenele - *Calendula officinalis*, fam Asteraceae). Cu excepția semințelor de grâu, speciile selectate nu au mai fost investigate.

3) decelarea influenței fluctuațiilor magnetice naturale în diferite stadii de dezvoltare ale plantelor în condiții de câmp magnetic zero (CMZ). Câmpul magnetic zero trebuie înțeles ca o reducere a componentei statice a câmpului geomagnetic, variațiile diurne și fluctuațiile magnetice generate de apariția furtunilor magnetice rămân operative.

Răspunsul plantelor în câmp magnetic zero a fost evaluat sub două aspecte:

1. morfologic în următoarele stadii de dezvoltare: i) germinarea semințelor, ii) faza post embrională de creștere definită prin apariția și dezvoltarea radiclei embrionale în interval de 4-5 zile, iii) dezvoltare a plantulelor tinere în interval de o lună, iv) stadiul de plantă matură până în faza de înflorire și apariție a rodului.

2. ultrastructural prin analiza electronmicroscopică a frunzelor în ultimele două stadii de dezvoltare ale plantei.

3.1. Câmp magnetic zero – compensare și monitorizare

Metoda de compensare a componentei continue a câmpului geomagnetic utilizează o bobină de tip Helmholtz cu diametru de 1.2m, montate pe un schelet de lemn, orientată în direcția N-S, la un unghi pe verticală apropiat de înclinarea vectorului de câmp geomagnetic (Fig. 3.1).



Fig.3.1.
Sistem de compensare a componentei
statice a câmpului geomagnetic –
Bobina Helmholtz

În spațiul delimitat de bobine, componenta statică a câmpului geomagnetic este redusă cu un factor de ~100. Pentru monitorizarea variațiilor câmpului magnetic pe suprafața selectată în vederea expunerii probelor a fost utilizat un magnetometru FLUXMASTER cu o precizie de ± 1 nT. În diferite poziții câmpul variază în intervalul 0-500nT. Aceste valori includ variații diurne ale câmpului geomagnetic. Prin acest dispozitiv a fost compensată numai componenta statică, fluctuațiile magnetice naturale rămân operative. Acest fapt ne permite evaluarea suplimentară a influenței fluctuațiilor magnetice induse în timpul furtunilor magnetice. Pentru fiecare experiment datele au fost analizate în relație cu variația zilnică a activității geomagnetice (GMA) reprezentată prin indicele A_p . Acesta este un indice mediu al activității zilnice înregistrată de anumite observatoare pe suprafața pământului și este furnizat de site-ul National Geographic Data Center, USA. Ca măsură a variației activității geomagnetice am utilizat deviația standard a valorilor indicelui A_p (sd

$A_{p_{index}}$) în intervalul desfășurării experimentului. Prezența unei furtuni magnetice a fost notată prin valoarea A_p și ziua în care aceasta a fost înregistrată.

3.3. Germinarea semințelor în câmp magnetic zero

Germinarea unei populații de semințe urmărește o curbă sigmoidală a cărei pantă caracterizează viteza de germinare. Această curbă a fost determinată pentru fiecare specie testată pe baza procentului de semințe germinate stabilit la fiecare 3 ore în intervalul de expunere a lotului experimental (câmp magnetic zero - CMZ) și a lotului martor (câmp geomagnetic - CGM). Efectul CMZ a fost estimat prin diferența normalizată a vitezei de germinare în câmp geomagnetic compensat și în câmp magnetic natural, reprezentată de parametrul x_0 a curbei de fitare Boltzman a datelor experimentale: $((x_{CMZ}-x_{CGM})/x_{CGM})*100$.

După cum se observă din rezultatele prezentate în Tabelul 1, în perioade cu activitate geomagnetică scăzută, viteza de germinare a semințelor a fost nesemnificativ modificată în CMZ la toate speciile de plante selectate [Neamtu și Morariu 2005]. Conform acestor date absența componentei statice a câmpului geomagnetic nu reprezintă un stres în această fază de dezvoltare a plantelor.

Tabel 1.
Viteza de germinare a semințelor în CGM (M) și CMZ (P), efectul CMZ și variația GMA în intervalul de expunere a semințelor

Specia plantei	x_0 (%/oră) M – CGM; P- CMZ	Efect CMZ $((x_{CMZ}-x_{CGM})/x_{CGM})*100$ [%]	GMA (sd $A_{p_{index}}$)
Medicago sativa	M – 30.49 ± 0.87 ; P – 29.67 ± 0.98	- 2.6	2–10
Tagetes patula	M – 26.5 ± 1.50 ; P – 26.92 ± 1.09	1.5	2–8
Calendula officinalis	M – 26.06 ± 0.13 ; P – 26.03 ± 0.64	0.11	2–8
Triticum aestivum	M – 9.09 ± 0.16 ; P – 8.79 ± 0.12	- 3.3	2–11
Secale cereale	M – 8.93 ± 0.31 ; P – 9.11 ± 0.11	2	2–11

Diferențe semnificative au fost observate în perioade perturbate magnetic în setul de experimente efectuat pe semințe de lucernă [Neamtu și Morariu 2005]. Viteza de germinare a semințelor este reprezentată în Fig.3.2.a. pentru nouă experimente (a) în paralel cu activitatea geomagnetică corespunzătoare perioadei de incubare a semințelor (b). Efecte semnificative a CMZ sunt marcate pe grafic cu asterix (*).

În perioade cu activitate geomagnetică scăzută au fost înregistrate efecte statistice nesemnificative. Prezența unei furtuni majore ($A_p=53$) în faza de îmbibare a semințelor (prima zi de expunere) (Exp 2) și a unei furtuni minore ($A_p=41$) în a doua zi de incubare (Exp 9) a fost corelată cu o viteză de germinare semnificativ stimulată ($p<0.05$) în CMZ. Perioada de germinare a semințelor a fost redusă cu 10% în primul caz și cu 6% în Exp. 9. În Fig. 3.2.b sunt detaliate curbele de germinare a semințelor expuse în CMZ și CGM pentru cele două perioade experimentale.

Rezultatele obținute susțin ipoteza unei influențe favorabile a fluctuațiilor magnetice naturale induse de furtuni magnetice majore în fazele inițiale ale procesului de germinare și sunt în acord cu rezultatele publicate de Alexander și Doijde [1995] și Pazur și Scheer [1992] care semnalează efecte semnificative de stimulare a germinării semințelor [$1.5 \mu T$, 5 Hz] și a

diviziunii celulare la alge [20-200 μ T, 7.5 Hz] în câmpuri magnetice alternative slabe cu frecvențe apropiate de frecvențele oscilațiilor rezonante Schuman

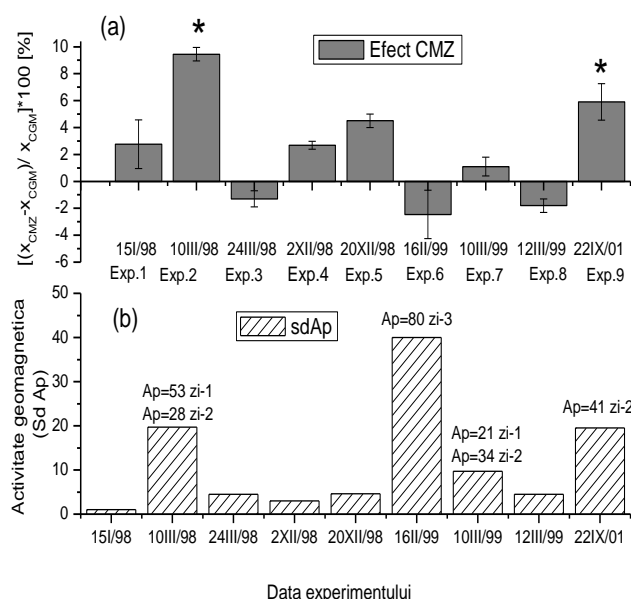


Fig.3.2.a

Efectul CMZ asupra germinării semințelor de lucernă (a) și variația activității geomagnetice asociate perioadelor de incubare (b)

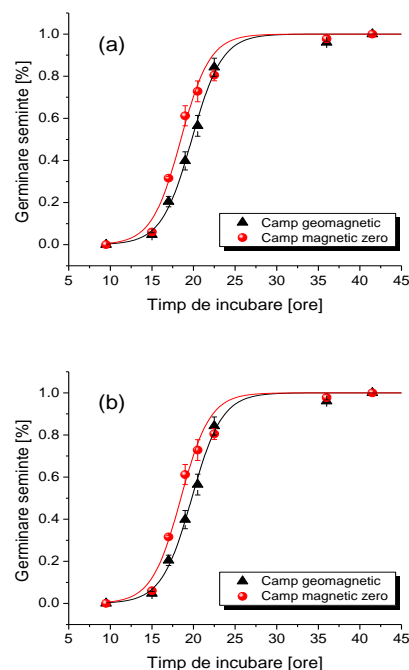


Fig.3.2.b.

Stimularea germinării semințelor de lucernă în câmp magnetic zero; (a) Exp 2, (b) Exp 9

3.4. Efectul câmpului magnetic zero în faza postembrională de creștere

Influența CMZ în stadiul postembrional de creștere a fost evaluat prin parametrii de lungime a rădăcinii și a tulpinii primare, după patru zile de incubare la întuneric a semințelor. Analiza statistică (testul ANOVA, program Origin 7.5) a diferențelor de creștere a plantulelor expuse în CMZ față de lotul martor (CGM) a cuprins 80-120 plantule. Semnificația datelor a fost estimată pentru $p = 0.5$. Efectul CMZ a fost evaluat prin diferența normalizată a parametrilor de creștere: $((L_{CMZ} - L_{CGM}) / L_{CGM}) * 100$ unde L reprezintă lungimea rădăcinii sau a tulpinii în câmp magnetic zero și câmp geomagnetic. Fiecare experiment/specie a fost repetat de 6-8 ori în diferite perioade ale anului și fiecare perioadă a constat în incubarea simultană a două sau trei specii de plante.

Rezultatele obținute indică o specificitate de răspuns a plantelor în funcție de specie [Neamțu și colab. 2009, Neamțu și Morariu 2010]. În perioade cu activitate geomagnetică scăzută (Fig.3.3), efectul dominant asupra creșterii plantelor din sp. *T. erecta* L. a fost dat de stimularea creșterii rădăcinilor în CMZ ($p < 0.05$) (Fig. 3.4.), cu diferențe de creștere cuprinse între 19% - 32,9%. Notăm că acest efect a fost evidențiat în perioadele de primăvară și vară.

O situație particulară a fost dată de lipsa unui efect semnificativ în perioadele de toamnă și iarnă (octombrie 2005, februarie și septembrie 2006). Acest fapt poate fi asociat cu descreșterea sensibilității plantelor în afara perioadelor naturale de vegetație. În prezența unei furtuni magnetice minore ($A_p = 48$) în prima zi de incubare a semințelor (iunie 2005) creșterea rădăcinilor nu a fost afectată, efect care poate fi privit și ca o mascare a efectului de stimulare a CMZ pus în evidență în perioade cu activitate geomagnetică scăzută.

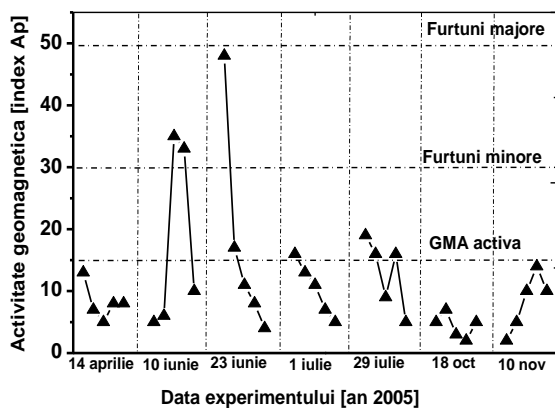


Fig.3.3.
 Variația zilnică a activității geomagnetice în diferite perioade experimentale pe parcursul anului 2005. Valorile aparținând unui experiment sunt conectate prin linie dreaptă. Data inițierii experimentului este notată pe abscisă.

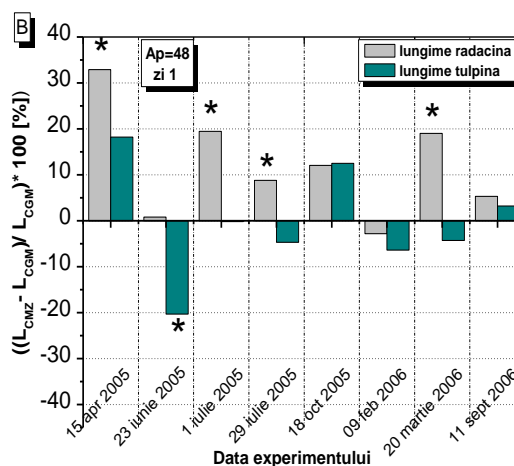
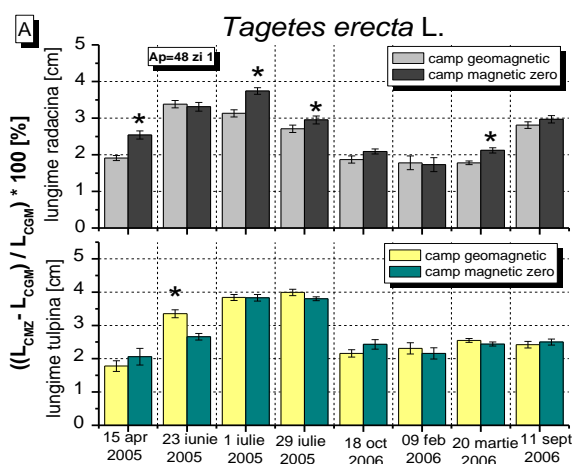


Fig 3.4.
 Valorile parametrilor de creștere în lungime a plantulelor din sp. *Tagetes erecta* în CMZ și CGM în diferite perioade ale anului 2005 și 2006 (A) și efectul CMZ corespunzător (B). Valorile statistic semnificative sunt marcate printr-un asterix (*) în dreptul parametrilor de creștere corespunzători.

Spre deosebire de speciile aparținând genului *Tagetes*, dezvoltarea postembrională a sp. *Triticum aestivum* L și sp *Secale cerevisiae* L. este cu predomiță inhibată în CMZ. Capacitatea semințelor de grâu de a genera rădăcini a fost redusă în șase din opt perioade experimentale (Fig.3.5.). Remarcăm reactivitatea ridicată a plantulelor de secară în condiții de CMZ (Fig.3.5.). Fiecare expunere a semințelor a fost urmată de o reducere în medie cu $10\% \pm 0.60$ ($p < 0.5$) a parametrilor de creștere în CMZ, efectul maxim fiind înregistrat în februarie și septembrie 2006 (~18%).

Dezvoltarea sp. *Tagetes patula* L. ilustrează un răspuns inconstant în diferite experimente, care alternează între stimularea semnificativă a creșterii rădăcinii și inhibarea dezvoltării tulpinii în CMZ.

Creșterea postembrională a *Calendula officinalis* L. nu a fost afectată, indicând o sensibilitate scăzută la modificarea mediului magnetic. În același timp, o creștere a activității magnetice în prezență unor furtuni magnetice minore ($Ap=35$; $Ap=33$) a fost asociată cu un efect biologic nesemnificativ.

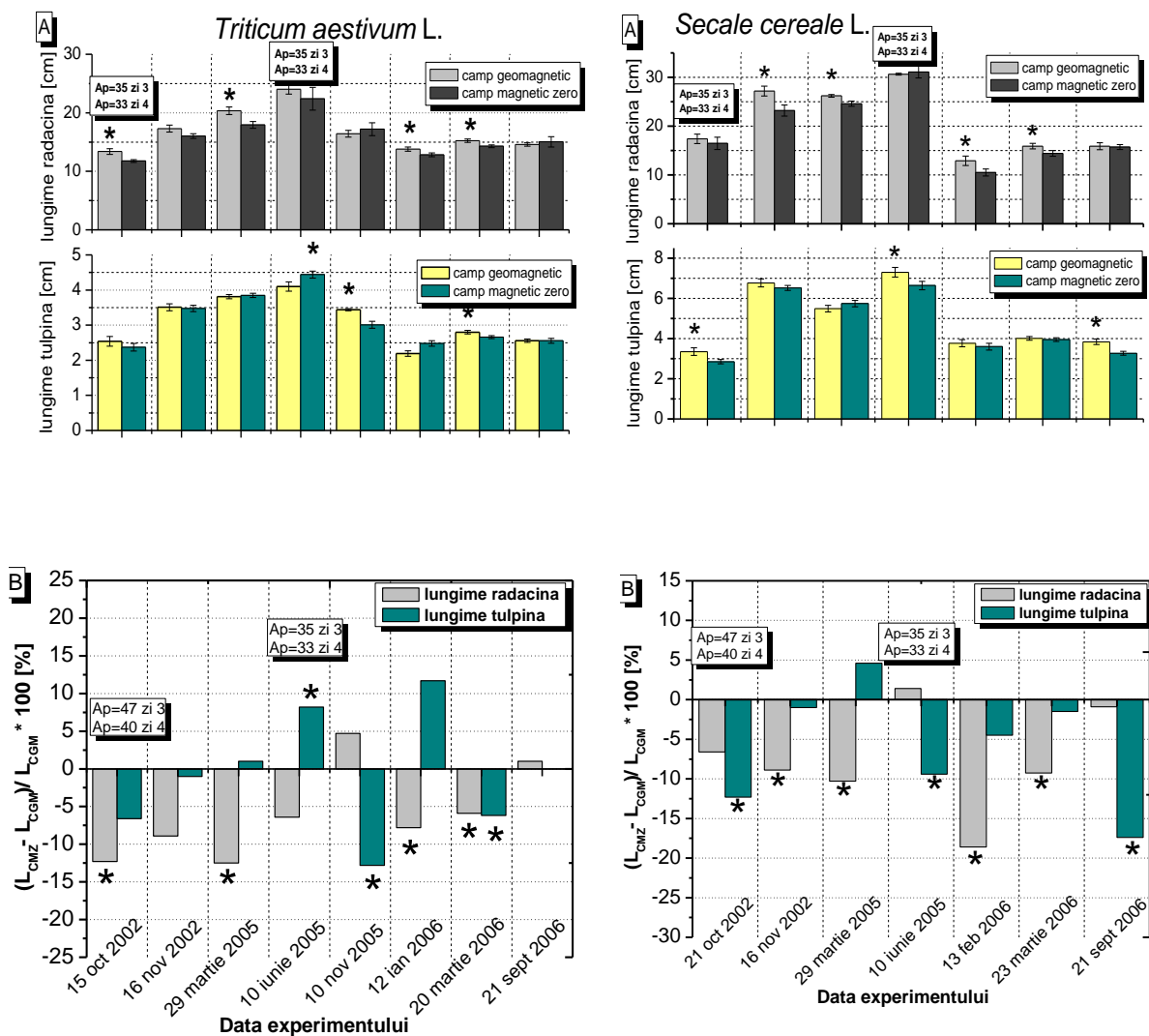


Fig. 3.5. Valorile parametrilor de creștere în lungime a plantelor din sp. *Triticum estivum* (grâu) și *Secale cereale* (secară) în CMZ și CGM în diferite perioade ale anului (A) și efectul CMZ corespunzător (B).

Efectele de stimulare sau inhibare a creșterii unor specii de plante în primele patru zile de expunere în câmp magnetic zero, ar putea fi explicate prin potențarea sensibilității plantelor în cursul fazelor de creștere intensă cum este stadiul postembrional de creștere la fel cum efectele câmpurilor alternative slabe sunt potențate de factorii de stres [Ruzic și colab. 1998, 2000] sau de starea fiziologică a semințelor [Aksyonov și colab. 2001, Alexander și Doijode 1995].

Sub acest aspect putem explica răspunsul semnificativ a sp. *Tagetes erecta* și *Tagetes patula* în perioadele de primăvară și vară când viteza de creștere a plantelor este potențată, față perioadele de toamnă și vară, când o evoluție mai lentă a creșterii este însoțită de diferențe ne semnificative în dezvoltarea postembrională a plantelor în CMZ și CGM.

3.5. Efectul CMZ asupra dezvoltării organelor laterale ale plantelor

Influența CMZ în stadiul de formare și dezvoltare a organelor laterale ale plantelor a fost urmărită sub aspect morfologic și ultrastructural.

Analiza morfologică a constat în monitorizarea diferențelor înregistrate în faza de apariție a plantelor și a frunzelor și prin evaluarea statistică a diferențelor de lungime a tulpinii, a frunzelor, lungimea totală a plantei și greutatea acesteia, numărul de boboci, flori și rod. Semnificația statistică a datelor experimentale și evaluarea efectului câmpului magnetic zero a fost determinată în mod similar dezvoltării post embrionale.

Influența CMZ pusă în evidență în faza postembrională de creștere este mult diminuată în faza de dezvoltare a plantelor tinere și a plantelor mature [Neamtu și colab. 2009, Neamtu și Morariu 2010]. Analiza statistică a parametrilor de creștere arată pentru aceeași specie expusă în CMZ, efecte semnificative dar și diferențe de creștere ne semnificative în diferite perioade ale anului după cum se poate observa în Fig.3.6 exemplificată pentru *Calendula officinalis*.

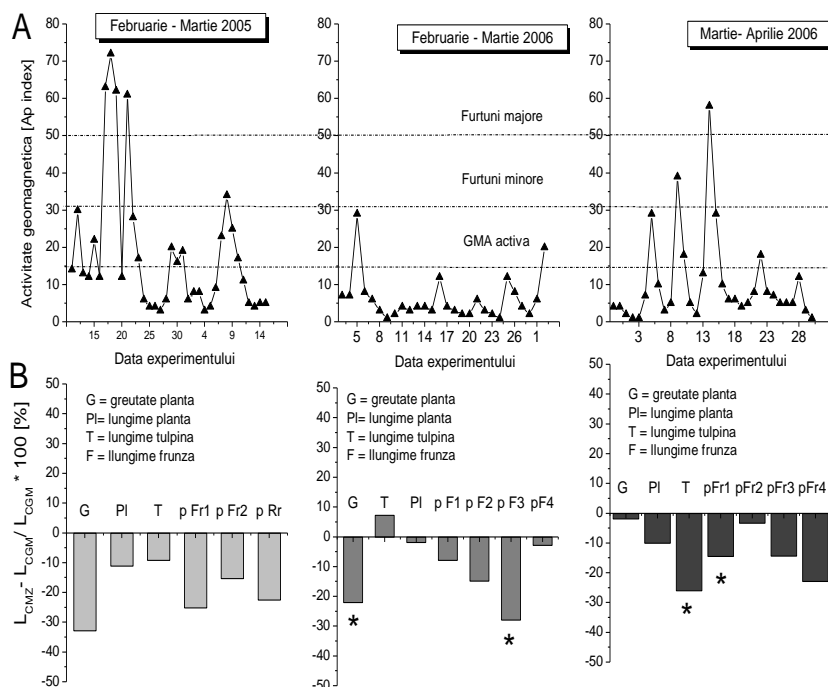


Fig.3.6. Variația activității geomagnetice (A) și efectul CMZ asupra creșterii sp. *Calendula officinalis* după o lună de incubare

În absența câmpului geomagnetic, dezvoltarea *T. erecta L.*, *Calendula officinalis L.*, *Triticum aestivum L.* și *Capsicum annum L.* a fost cu preponderență încetinită, evoluție ilustrată prin apariția întârziată și dimensiunea redusă a frunzelor tinere în curs de creștere (Fig. 3.7.). Aspectul plantelor este mai puțin viguros după o lună de expunere în CMZ iar greutatea medie a masei verzi mai mică față de plantele din lotul martor.

Rezultate similare au fost semnalate de Lebedev în cazul plantulelor de orz expuse într-un interval de trei săptămâni în câmpuri magnetice ecranate la 10 nT [Lebedev 1977].

Dezvoltarea plantulelor tinere aparținând sp *Lycopersicum esculentum* și sp *Tagetes patula* nu este influențată în CMZ în prima lună de viață. Expunerea prelungită a plantelor la cinci- șapte luni evidențiază un efect negativ a CMZ asupra dezvoltării masei verzi a plantelor mature aparținând sp. *Tagetes patula L.* și confirmă influența negativă în dezvoltarea sp. *Capsicum annum L.* sau răspunsul nesemnificativ al sp. *Lycopersicum esculentum L.*

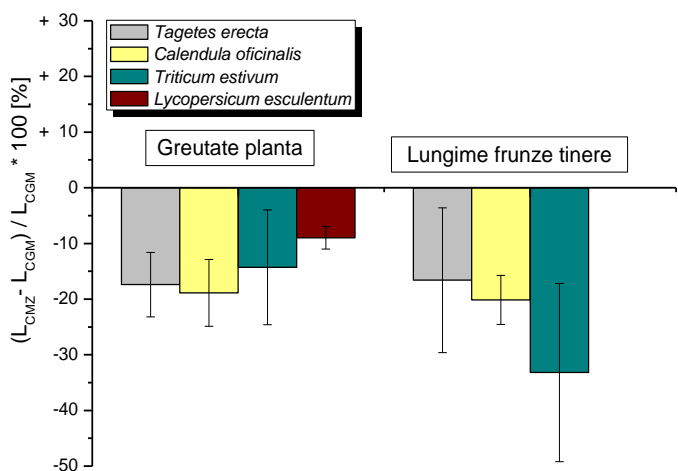


Fig.3.7.
Efectul CMZ asupra parametrilor de creștere (greutate, lungime frunze tinere) a plantelor din sp. *Tagetes patula*, *Calendula officinalis*, *Triticum estivum*, *Lycopersicum esculentum* după o lună de incubare.
(pentru fiecare specie este reprezentată valoarea medie a mai multor experimente)

La majoritatea speciilor etapa reproductivă de creștere a fost nesemnificativ influențată în CMZ. Se poate vorbi însă de o potențare a creșterii în înălțime a plantelor tinere (*Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Capsicum anuum*) și de un proces mai rapid (*Lycopersicum aesculentum*) sau mai lent (*Tagetes patula*) în faza de apariție a bobocilor și a florilor. În această etapă de creștere, evoluția plantelor de ardei a fost întârziată iar rezistența la boli mult diminuată.

Efectul CMZ bine conturat la unele specii în primele stadii de creștere este semnificativ diminuat prin expunerea plantelor pe termen lung, sugerând o capacitate crescută de adaptare temporală a plantelor în absența câmpului geomagnetic.

Analiza modificărilor ultrastructurale ale frunzelor a fost realizată pe baza imaginilor obținute prin microscopie electronică, urmărindu-se în primul rând ultrastructura cloroplastului, organitul principal al procesului de fotosinteză [Neamțu și colab 2009]. Tabloul de ansamblu al acestei analize arată că anularea câmpului geomagnetic a indus modificări negative semnificative la acest nivel, în primul rând asupra cloroplastelor și nucleilor celulelor foliare ale plantelor luate în studiu, concretizate prin diminuarea activităților lor metabolice. Cu toate acestea, există o anumită diferențiere a răspunsului fiecărei plante ca reacție la lipsa câmpului magnetic, răspuns care se datorează particularităților lor somatice, filogenetice și genetice. Plantele tinere manifestă o sensibilitate mai mare decât cele mature sau pe cale de îmbătrânire. De asemenea, plantele de cultură resimt mai mult lipsa câmpului magnetic decât plantele provenite din flora spontană (plante sălbaice).

Utilizarea unor metode de analiză cantitativă a imaginilor electronomicroscopice, cum este analiza fractală de imagine pentru determinarea dimensiunii fractale de masă și analiza proprietăților de corelare pe distanță lungă (FFT și DFA), aduc informații complementare privind modificările ultrastructurale ale frunzelor la plantele expuse în CMZ [Morariu și colab 2006, Buimaga-Iarinca și colab 2007, Neamțu și colab 2009].

Dimensiunea fractală a unei imagini este percepută ca o proprietate locală a imaginii. Pentru aflarea dimensiunii fractale de masă a nucleelor (incluzând nucleoli, eucromatina și heterocromatina) și a cloroplastelor, s-au folosit imaginile de microscopie electronică ale acestora. A fost utilizat programul de calcul ImageJ, cu "plugins-ul" FracLac. Conturul

nucleilor și al cloroplastelor a fost selectat din cadrul imaginii generale, apoi analizate prin metoda Box Counting.

Corelarea pe distanță lungă reprezintă o proprietate globală a sistemului și poate să aducă informații legate de structura eucromatinei în cazul nucleilor și de structura generală a cloroplastelor. Această proprietate a fost determinată utilizând metodele FFT (transformata Fourier rapidă) și DFA (detrended fluctuation analysis) pentru care am folosit un soft dezvoltat în cadrul grupului nostru de cercetare. Din analiza spectrală a rezultat exponentul spectral de corelare, β , care reprezintă panta reprezentării dublu-logaritmice a spectrului. Exponentul spectral de corelare (coeficient β) s-a dovedit a fi un parametru cantitativ eficient de caracterizare a modificărilor ultrastructurale ale frunzelor. Modificări ultrastructurale semnificative au fost puse în evidență atât în structura cloroplastelor cât și a nucleilor. La toate speciile de plante analizate au fost determinate diferențe semnificative ale coeficientului β la plantele expuse în CMZ față de martor în prima lună de incubare. Diferențele devin nesemnificative în cazul cloroplastelor la plantele de roșii și ardei în vârstă de 66 zile. La crăiță diferențele se mențin și la această vârstă dar devin nesemnificative în etapa reproductivă a dezvoltării plantei, după 180 zile de incubare.

Aceste rezultate arată o sensibilitate mai mare plantelor tinere în absența câmpului geomagnetic și pe de altă parte sugerează că în timp are loc un proces de adaptare a plantelor la modificările condițiilor de mediu magnetic, cu restabilirea funcționalității normale a plantei corespunzătoare procesului natural de îmbătrânire. Prin analiza proprietăților de corelare au fost determinate modificări persistente în structura nucleilor la plantele expuse în câmp magnetic zero. La ardei, crăiță și gălbenele, modificările structurale ale nucleilor ilustrate prin diferențe semnificative ale exponentului spectral de corelare se mențin atât la plantele în vârstă de 66 zile cât și după 180 zile. Aceste observații sugerează că procesul de adaptare a plantelor este doar parțial și vizează în primul rând funcționalitatea cloroplastelor. Rezultatele obținute confirmă în cea mai mare parte observațiile ultrastructurale.

IV. INTERACȚIA CÂMPURILOR MAGNETICE SLABE CU BACTERIILE ȘI CIANOBACTERIILE

2. EFECTE ALE CÂMPULUI MAGNETIC ZERO ASUPRA DEZVOLTĂRII BACTERIILOR

Literatura oferă date sporadice în ce privește răspunsul bacteriilor în absența câmpului geomagnetic. În condiții de ecranare a câmpului geomagnetic cu un factor de 10, Becker determină o reducere de 15 ori în numărul și dimensiunea coloniilor de *Staphylococcus aureus* față de culturile martor la o expunere timp de 72 de ore [Becker 1963]. Achkasova constată de asemenea o deprimare a funcțiilor vitale a bacteriilor în câmp geomagnetic ecranat [1973]. Studiul descris în continuare a avut ca scop observarea răspunsului bacterian în procesul de multiplicare celulară în câmp magnetic zero realizat prin compensarea câmpului geomagnetic cu un factor de 100. Au fost testate tulpini de bacterii gram pozitive (*Listeria monocitogenes*), gram negative (*Salmonella* și *Escherichia coli*) și microorganisme nespecifice dezvoltate pe substrat nutritiv proteic (albumina) în sisteme de cultivare închise (culturi „batch”) [Neamțu și colab. 2003]. Multiplicarea celulară a fost evaluată prin metode directe de apreciere a numărului de germeni/ml suspensie celulară în paralel cu metode indirecte de monitorizare a rezervei nutritive din mediu. Același sistem de

cultivare a fost utilizat pentru analiza creșterii culturilor de cianobacterii din sp *Synechocystis* în mediu nutritiv Zarrouch. Paralel a fost investigată sensibilitatea bacteriilor în câmp magnetic 3 Gauss (300μT).

2.3. Rezultate experimentale

2.3.2. Evaluarea creșterii bacteriene în CMZ

Modificarea densității de germeni/ml suspensie bacteriană a fost estimată prin :

- transmisie optică a suspensiei celulare determinată spectrofotometric în domeniul spectral vizibil (520 nm - 700 nm) *Salmonella* și *Listeria* pe baza unei curbe de etalonare (Fig.4.1.)

- scala de etalonare Mc Farland stabilită prin metoda împrăștierii luminii laser utilizată în scopul extrapolării densității de germeni dezvoltați în soluție de albumină 5% (Fig.4.2.).

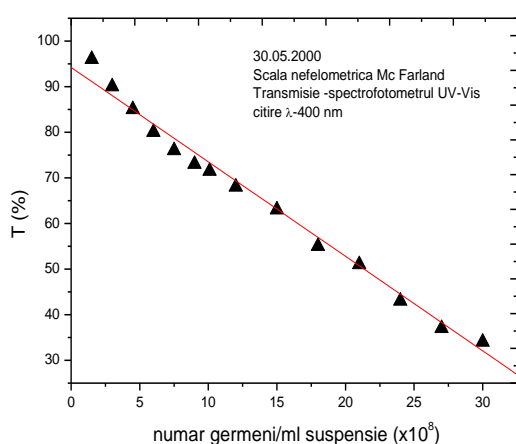


Fig.4.1.

Scala de etalonare transmitanță - concentrație germeni bacterieni /ml suspensie germeni de *Salmonella*. $\lambda = 400\text{nm}$

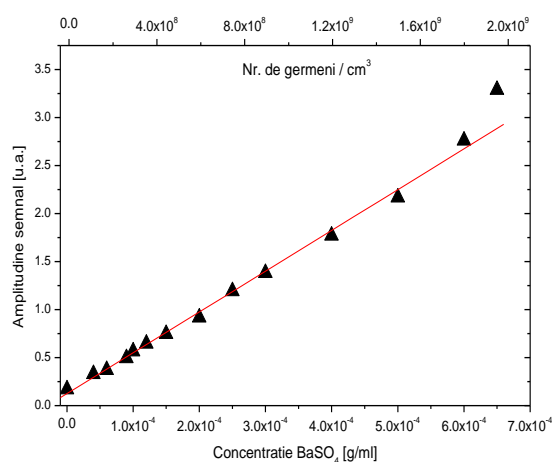


Fig.4.2.

Scala de etalonare Mc Farland pentru un domeniu de concentrații 10^{-5} - 10^{-3} BaSO_4 determinată prin detecția împrăștierii radiației laser

Activitatea biochimică a fost monitorizată prin degradarea substratului energetic (glucoză, lactoză) și variația pH-ului în mediul de suspensie datorită activității specifice a unor tulpini bacteriene: *Salmonella*, *E. Coli*, *Listeria monocitogenes* și degradarea substratului de albumină în prezența unor germeni nespecifici gram (-).

Degradarea substratului de albumină ca urmare a dezvoltării germeilor microbieni a fost pusă în evidență prin tehnici de electroforeză în gel de agaroză și electroforeză în gel de poliacrilamidă în prezență de SDS (dodecilsulfat de sodiu) într-un interval de 5 zile de incubare în CMZ și CGM.

2.3.3. Multiplicarea bacteriană și activitatea metabolică în culturi de *Listeria*, *E. coli* și *Salmonella* expuse în CMZ

Pentru toate tulpinile bacteriene testate rezultatele obținute pun în evidență o rezistență crescută în câmp magnetic 3 Gauss. În câmp magnetic zero răspunsul bacterian arată o dependență în funcție de specie. Culturile de *Salmonella* răspund pozitiv în aceste

condiții, stimularea dezvoltării celulare fiind semnificativă în faza de creștere exponențială (Fig4.3). Rezultatele obținute indică condiții favorabile dezvoltării enterobacteriilor din sp. *Salmonella* în absența câmpului geomagnetic.

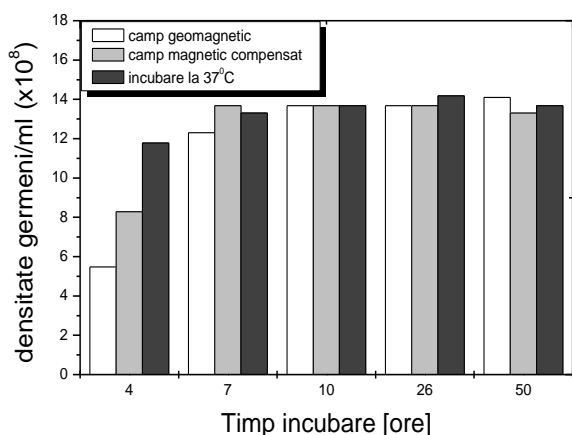


Fig.4.3.
Multiplicarea celulară în culturi de *Salmonella* incubate în CGM, CMZ, CM 3Gauss, la 24°C și în CGM la 37°C

Rezultate similare au fost obținute în testele de metabolizare a substratului de glucoză. În primele patru ore conținutul de glucoză a fost semnificativ redus (49,5%), însoțit de o scădere a pH-ului (6,8%) în mediu de suspensie (Fig 4.4.a, b) ceea ce confirmă sensibilitatea crescută a culturilor de *Salmonella* în CMZ.

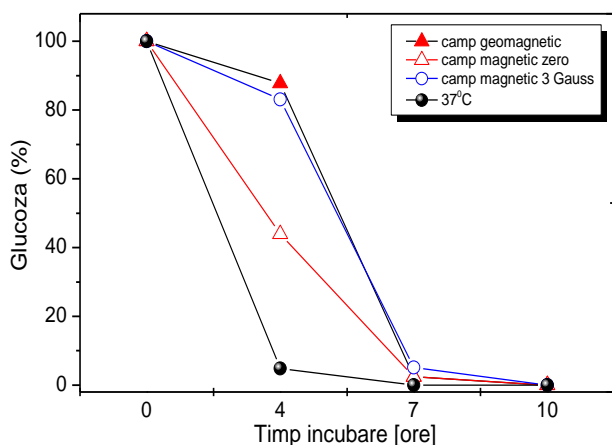


Fig.4.4.a
Metabolizarea glucozei în prezența de *Salmonella* în CGM și CMZ la 24°C și în CGM la 37°C

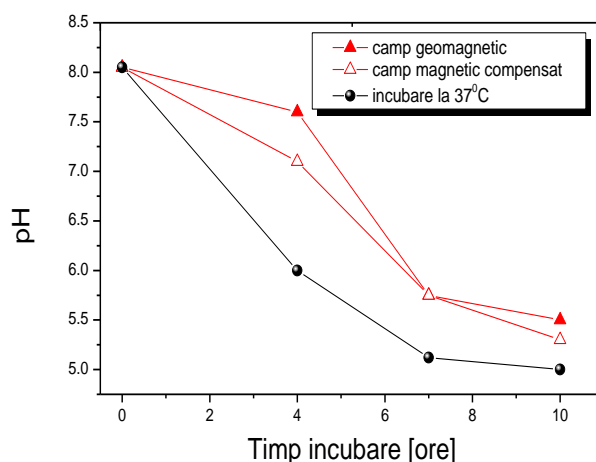


Fig. 4.4.b.
Variația pH-ului în mediul de suspensie a culturilor de *Salmonella* în CGM, CMZ la 24°C și în CGM la 37°C

Alte două tulpini au prezentat rezistență (*Listeria monocitogenes*) sau o diminuare a activității metabolice (*E. Coli*) în CMZ.

2.3.4. Creșterea și activitatea metabolică a unor germeni microbieni pe substrat de albumină

În soluții apoase, albumina constituie un mediu nutritiv proteic favorabil dezvoltării bacteriene. Rezultatele obținute indică o contaminare bacteriană favorizată în absența câmpului geomagnetic. După două zile de expunere se înregistrează o dublare a numărului de

germeni/ml suspensie (Fig. 4.5.). Diferența de creștere este menținută la 37% în a treia zi de incubare în favoarea culturilor expuse în CMZ.

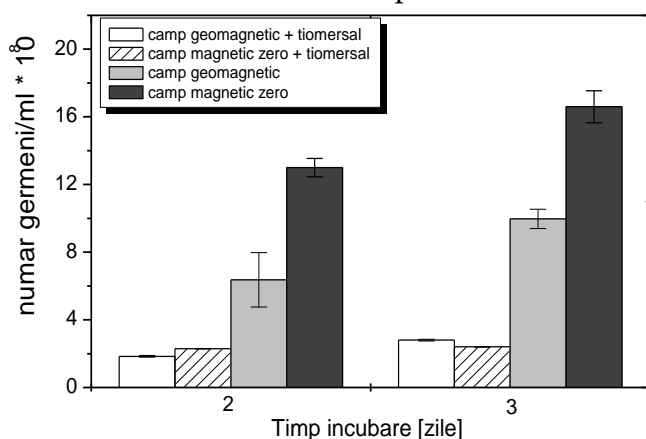


Fig.4.5. Multiplicarea microorganismelor în prezența albuminei ca substrat nutritiv în câmp geomagnetic și câmp magnetic compensat cu și fără agent de inhibare (tiomersal).

Rezultate similare au fost obținute prin analiza degradării substratului nutritiv (Fig. 4.6.). În electroforeza în gel de poliacrilamidă apariția unor noi benzi de migrare pune în evidență prezența unor fragmente proteice cu greutate moleculară mai mică decât a albuminei (Fig. 4.6.).

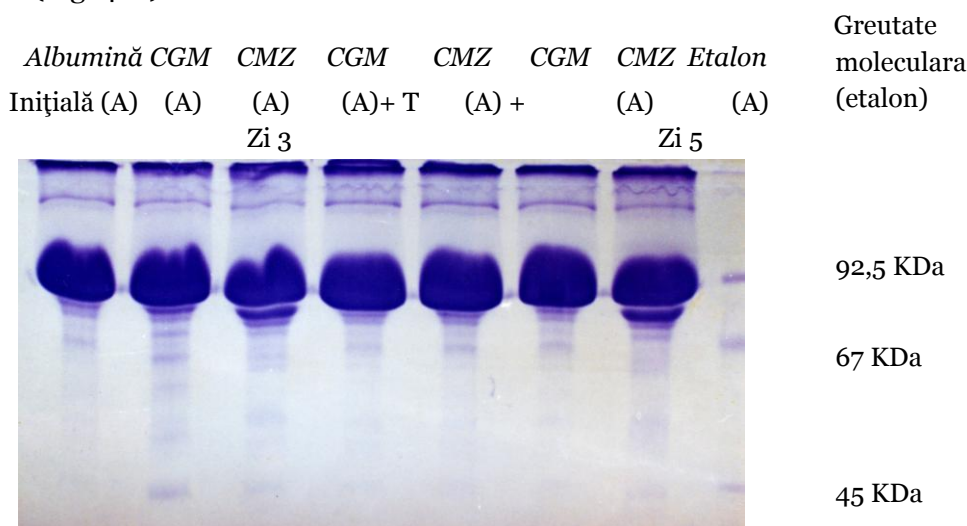


Fig. 4.6. Electroforeza albuminei în gel de poliacrilamidă în prezență de SDS în prezență și în absență de agent bactericid (tiomersal) după 3 și 5 zile de incubare în CGM și CMZ

Diferențe importante a integrității moleculare a albuminei se disting după trei zile de expunere. Separarea unei benzi distincte sub spotul inițial al albuminei indică un proces de degradare mai accentuat în CMZ față de probele expuse în CGM, efect persistent după cinci zile de incubare.

În gel de agaroză modificările electroforetice devin evidente după 5 zile de expunere și constau în lărgirea ariei spotului de migrare, respectiv în scăderea vitezei de migrare a unei fracțiuni proteice. Procentul fracțiunii electroforetice cu migrare lentă crește cu 20-45% în CMZ raportat la probele expuse în câmp geomagnetic. Aceste modificări reflectă un proces de degradare mai accentuat în CMZ și sunt în acord cu rezultatele obținute prin electroforeza în gel de poliacrilamidă.

Investigațiile noastre completează studiile de toleranță a bacteriilor (*Pseudomonas*, *Enterobacter*, *E. coli*) față de antibiotice [Creangă și colab 2004, Poiată și colab 2003] și evidențiază un răspuns bacterian dependent de specie în condiții de compensare avansată a câmpului geomagnetic. Rezultatele acestor studii arată că dezvoltarea bacteriană în culturi de *Salmonella* și virulența unor tulpini de *Pseudomonas* este potențată în câmp magnetic zero, în timp ce reactivitatea unor tulpini de *Enterobacter* și *E. coli* este deprimată sau nu este influențată. Cu alte cuvinte, prezența unui câmp magnetic de 25-75 μT , echivalent valorii câmpului geomagnetic, reprezintă un mediu protector față de contaminarea cu germeni de *Salmonella* și față de virulența unor tulpini de *Pseudomonas*. Dezvoltarea microorganismelor pe substrat de albumină ilustrează de asemenea un efect protector al câmpului geomagnetic. Pe de altă parte mediul magnetic natural creează condiții favorabile contaminării cu tulpini de enterobacterii prin creșterea rezistenței acestora la unele antibiotice.

3. DEZVOLTAREA CIANOBACTERIILOR ÎN CÂMP MAGNETIC ZERO. INFLUENȚA ACTIVITĂȚII GEOMAGNETICE

Cianobacterile sunt organisme care au capacitatea de creștere atât în prezența luminii (prin fotosinteză pe baza de oxigen) cât și la întuneric pe baza glicolizei și a fosforilării oxidative. Caracteristicile structurale și biochimice sunt similare bacteriilor, fiind lipsite de nucleu și cloroplaste. Cianobacteriile sunt microorganisme model pentru studiul fotosinzei, asimilare de azot și adaptare la stresul de mediu. Cu excepția unui studiu realizat cu scopul de a examina posibilitatea de stimulare a biomesei algelor în câmpuri electromagnetice la frecvențe de 50-60Hz [Serafin și colab 1995], nu cunoaștem alte referințe privind influența câmpurilor magnetice slabe asupra dezvoltării cianobacteriilor.

Cianobacteriile aparținând sp *Synechocystis* sunt organisme unicelulare care în medii lichide se dispersează uniform, oferind un sistem biologic avantajos pentru studiile de multiplicare celulară. Modificarea dezvoltării cianobacteriilor în condiții de compensare a componentei statice a câmpului geomagnetic, și în prezența fluctuațiilor naturale a câmpului magnetic, a fost urmărită pe suspensii de *Synechocystis* aparținând liniei celulare AICB 51, furnizate de Institutul de Cercetări Biologice din Cluj-Napoca din colecția proprie de alge.

3.2. Evaluarea vitezei de creștere a cianobacteriilor în CMZ

Curba de creștere în suspensii de *Synechocystis* a fost estimată spectrofotometric prin determinarea zilnică timp de 8-12 zile a absorbanței suspensiei la valoarea de maxim specific spectrului de absorbție a clorofilei a ($\lambda = 670 \text{ nm}$), pigmentul predominant în celula cianobacteriilor din sp. *Synechocystis*. Viteza de creștere celulară a fost cuantificată prin parametrul de fit " x_o " obținut prin fitarea Boltzmann a curbei de creștere celulară. Efectul CMZ a fost estimat prin diferența normalizată a vitezei de creștere x_o în probele expuse în CMZ și CGM.

3.3. Rezultate experimentale

În perioade cu activitate geomagnetică scăzută, viteza de multiplicare celulară în CMZ variază față de probele martor sub pragul de semnificație statistică ($p > 0.5$). Efecte semnificative au fost în schimb observate în condiții de perturbare a activității geomagnetice. Într-un set de 9 experimente, viteza de creștere a cianobacteriilor a fost stimulată în condiții

de expunere în CMZ în toate perioadele în care a fost înregistrată prezența unei furtuni magnetice. Rezultatele obținute în aceste cazuri sunt detaliate în Fig. 4.7. prin reprezentarea curbelor de creștere celulară (dreapta i-iii)) în paralel cu variația zilnică a activității geomagnetice (stânga).

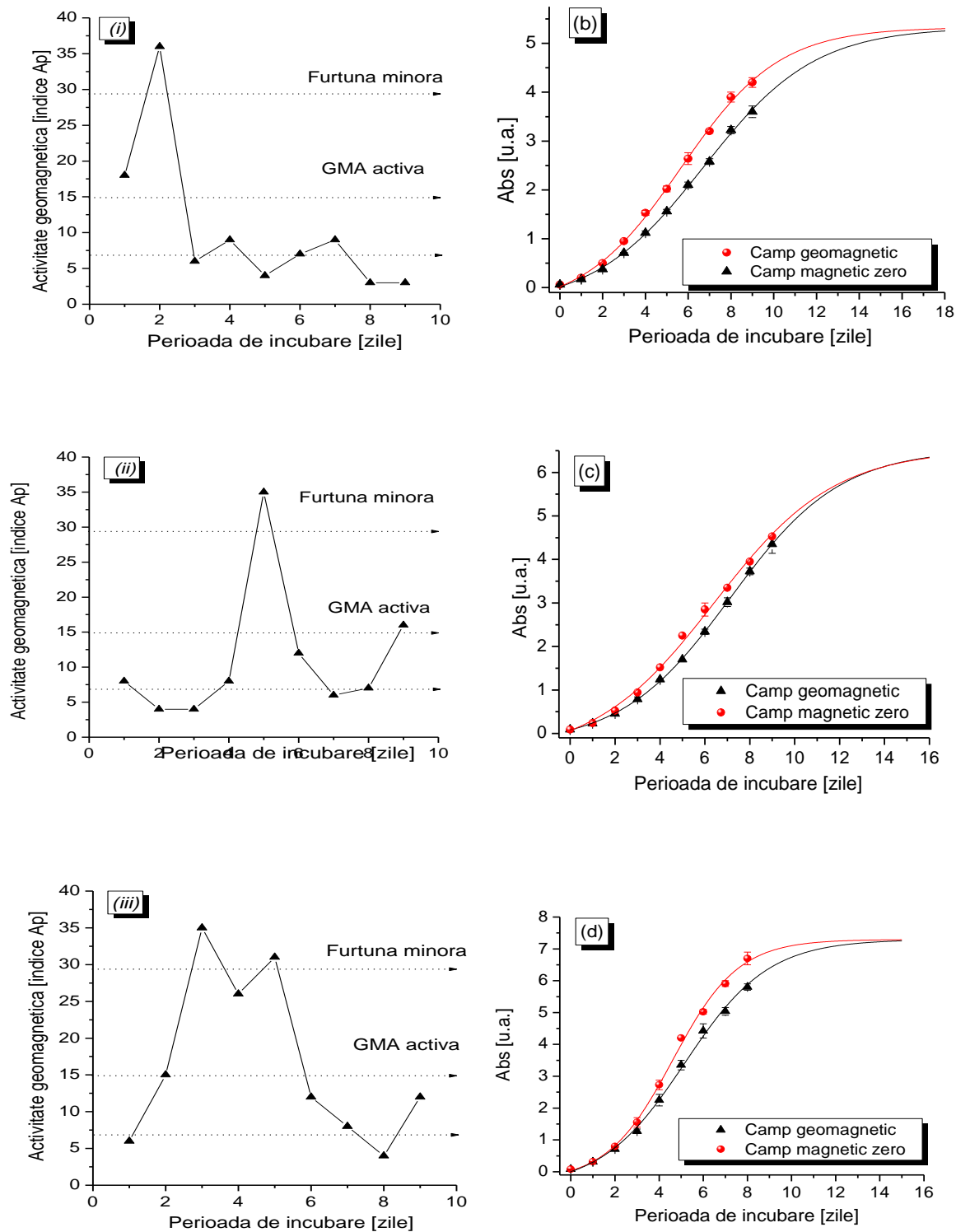


Fig. 4.7. Variația activității geomagnetice în perioade de liniște magnetică (v) și în prezența de furtuni magnetice(i,ii,iii)

Dezvoltarea cianobacterilor în CMZ și în CGM în perioade de liniște magnetică (a) și în prezență de furtuni magnetice (b,c,d)

Relația GMA - efect CMZ arată următoarele asocieri

- Prezența unei furtuni minore ($A_p = 35$) la începutul perioadei de incubare este asociată cu o stimulare semnificativă a vitezei de multiplicare celulară în câmp magnetic zero (15%, $p < 0.05$) (Fig.4.7, caz i).
- Furtuni magnetice succesive ($A_p = 35; 30$) în prima parte a perioadei de incubare celulară, însoțite de o perioadă activă a GMA ($A_p = 26$) sunt asociate cu o stimulare semnificativă a vitezei de creștere (10%, Fig. 4.7, caz iii).
- Prezența unei furtuni minore ($A_p = 35$) la mijlocul fazei exponențiale de creștere este corelată cu un răspuns diminuat (Fig. 4.7, caz ii), efectul de stimulare (7%) fiind similar cu cel înregistrat în perioade cu variație moderată a GMA.

Datele prezentate în acest capitol indică un răspuns nespecific în ce privește viteza de multiplicare a cianobacteriilor unicelulare în medii lipsite de componenta statică a câmpului geomagnetic (CGM) și un răspuns biologic sensibil modulat de modificarea componentei variabile. Rezultatele obținute sugerează o condiționare a răspunsului biologic de apariția furtunii magnetice în primele faze ale multiplicării celulare sau de durata perturbării magnetice în timpul fazei exponențiale de creștere.

V. MOTILITATEA *LISTERIEI MONOCITOGENES* ȘI A SPERMATOZOIZILOR ÎN CÂMP MAGNETIC ZERO

- date preliminare -

1. MOTILITATEA CELULARĂ

Motilitatea este un proces dinamic care joacă un rol fundamental în funcționalitatea celulară cum este transportul organitelor celulare, segregarea cromozomială în mitoză, modificări ale formei celulei sau în locomoția celulelor și a organismelor simple (prokariote, eukariote) ca răspuns la stimulii externi. Motilitatea celulară se bazează pe procese complexe de autoorganizare mecano-chimică susținute de așa numitele motoare moleculare [Fletcher și Theriot 2004]. Acestea sunt constituite dintr-un ansamblu de proteine și complexe moleculare care furnizează energia necesară mișcării prin conversia energiei chimice eliberată prin hidroliza legăturilor macroergice ale moleculei de ATP sau a energiei stocate în potențialul transmembranar. Motoarele moleculare cunoscute pot fi grupate în 5 categorii dintre care cele mai bine caracterizate sunt motorul rotor specific mișcării bacteriilor și motoarele lineare care reprezintă una din cele mai comune forme de mișcare întâlnită la nivelul celulei eukariote precum și pentru deplasarea spermatozoizilor și a unor tipuri de protozoare. O categorie aparte o formează motoarele bazate pe asamblarea și dezamblarea actinei, pe care se bazează motilitatea unor bacterii patogene: *Listeria monocitogenes*, *Shigella*, și *Rickettia*.

3. REZULTATE EXPERIMENTALE

Studiile prezentate în acest capitol au avut ca obiectiv monitorizarea în câmp geomagnetic compensat a motilității unor organisme prokariote (bacterii) și celule eukariote bazată pe mecanisme moleculare diferite. Au fost testate: (i) tulpini bacteriene aparținând sp *Listeria monocitogenes* a căror deplasare are la bază mecanismul asamblării și dezamblării

actinei și (ii) spermatozoizi umani în lichid seminal a căror motilitate este generată de motoare lineare având ca promotor moleculele de dineină. [Boldiszar și colab. 2001, Neamțu și colab. 2005, Truță și colab 2005,]

3.1. Expunerea culturilor de *Listeria monocitogenes* în CMZ

Culturile de *Listeria monocitogenes* au fost furnizate de laboratorul de microbiologie a USAMV Cluj-Napoca. Această bacterie prezintă particularitatea de a sintetiza cili la temperatura camerei (21-22°C) care la 37°C sunt imobili.

Motilitatea bacteriei inoculate în tuburi pe medii semisolide de geloză a fost determinată după 48 ore de incubare prin deplasarea inelului format de cultura bacteriană dezvoltată în mediu. Paralel au fost expuse tuburi inoculate cu germeni în câmp magnetic de intensitate 3Gauss față de un martor corespunzător. Analiza motilității celulare a fost repetată după o săptămână de la scoaterea probelor din mediul magnetic modificat și păstrate la temperatura camerei.

3.3. Motilitatea *Listeriei monocitogenes* în CMZ

Diferențe de motilitate a bacteriilor au fost detectate după 24 ore de incubare a celulelor în CGM și CMZ [Neamtu și colab 2005]. Examenul direct la microscop pe preparate native a arătat o mobilitate redusă a bacteriilor incubate în CMZ, observație confirmată ulterior prin cultivare în geloză moale după o inoculare de 48 ore (Fig. 5.1).

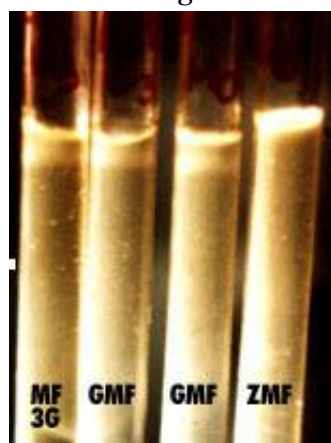


Fig. 5.1.a
Migrarea *Listeriei monocitogenes*
după 48 ore incubare la 21°C.
Martor CM 3G, probă CM 3G, martor CMZ,
probă CMZ



Fig. 5.1.b.
Migrarea *Listeriei monocitogenes* după 6 zile de
incubare la temperatura camerei
robă CMZ, martor CMZ, martor CM 3G, probă
CM 3G,

În aceste probe se observă o zonă de opalescență discretă spre suprafața mediului în timp ce la culturile incubate în câmp geomagnetic și în câmp 3Gauss zona de opalescență a fost mai exprimată ca intensitate și ca grosime (>0.5 cm). Inelul format de cultura bacteriană s-a deplasat în lungul coloanei similar în CGM și câmp magnetic 3G însă a rămas la linia de start în proba expusă în CMZ. Aceste rezultate arată că în absența câmpului geomagnetic motilitatea *Listeriei* este inhibată, dar nu este afectată în câmpuri magnetice mai intense (3Gauss). Prezența câmpului geomagnetic pare să fie o cerință esențială pentru locomoția acestei bacterii.

Motilitatea celulară nu a fost restabilită după expunerea în CMZ ceea ce sugerează un efect de lungă durată. Cu excepția probelor incubate în CMZ, în toate tuburile păstrate la

temperatura camerei, a mai apărut la interval de o săptămână un disc opalescent în profunzimea mediului, cu o lățime apropiată de primul inel, ca o consecință a continuării procesului de migrare și multiplicare bacteriană (Fig. 5.1.b).

Sandodze și colab [1995] semnalează un efect similar în cazul celulelor endimale. Motilitatea aparatului ciliar al acestor celule a fost practic stopată în câmp magnetic compensat (x100). Aceste date arată că producerea mișcării cililor și flagelilor generată de mecanisme moleculare diferite (asamblarea și dezasamblarea actinei în cazul bacteriei și motor linear în cazul celulelor endimale) este afectată în același sens în CMZ. Punctul comun în cele două tipuri de mecanisme constă în sursa energetică necesară motilității, bazată pe hidroliza ATP. Efecte de inhibare a unor procese celulare bazate pe procese energetice în care este implicată hidroliza ATP (ex. transportul ionic transmembranar) au fost puse în evidență în studii anterioare privind procesul de îmbătrânire a eritrocitelor umane în CMZ [Morariu și colab 1999].

3.2. Analiza motilității spermatozoizilor umani în lichid seminal

Viteza de deplasare a spermatozoizilor reprezintă o modalitate de apreciere a capacității de fertilizare a celulelor. Capacitatea de fertilizare este atribuită grupului de celule rapide care se mișcă cu o viteză $> 16 \text{ um/s}$. Sub această valoare se încadrează celulele lente și celulele imobile considerate celule moarte.

Viteza de deplasare a celulelor a fost urmărită pe o perioadă de 30 ore la diferite temperaturi de incubare ($17 - 22^\circ\text{C}$) și a fost determinată printr-o metodă de analiză de imagine [Neamtu și colab 2005] prin intermediul unei camere CCD cuplată la microscop. Au fost analizate statistic 15-30 traiectorii ale celulelor/2 probe la interval de 3 ore, fiecare traiectorie fiind compusă din 6-10 lungimi/sec. Motilitatea celulară în CGM și CMZ a fost caracterizată prin raportul procentual al vitezei de deplasare a spermatozoizilor rapizi față de numărul total de celule. Efectul CMZ a fost determinat prin diferența normalizată a procentului de celule rapide în CMZ și CGM luat ca martor.

3.4. Motilitatea spermatozoizilor umani în câmp magnetic zero

În CMZ remarcăm o creștere semnificativă a vitezei de deplasare a spermatozoizilor în primele ore de incubare (Fig.2.).

Stimularea motilității spermatozoizilor rapizi atinge un maxim care fluctuează între 17-20% la temperaturi cuprinse în intervalul $17^\circ\text{C} - 20^\circ\text{C}$. Viteza celulelor revine la valoarea inițială, în timp ce motilitatea celulelor în CGM scade sub această valoare. Diferența de motilitate se menține între 5-10% pentru toată perioada în care categoria spermatozoizilor rapizi este viabilă.

La 22°C viteza celulelor nu este influențată de modificarea mediului magnetic. Spermatozoizii rapizi viabili se deplasează cu viteze similare atât în CGM cât și în CMZ. Putem considera aceste condiții de temperatură ca fiind un prag al sensibilității celulelor la modificări ale câmpului magnetic. Curba de viabilitate a spermatozoizilor rapizi este deplasată spre valori semnificativ mai mari în CMZ, însă viteza acestora nu este stimulată.

Stimularea vitezei de deplasare a celulelor în primele ore de incubare în CMZ la temperaturi mai scăzute de 22°C ($17-20^\circ\text{C}$) pare să fie o reacție de adaptare la condițiile nefiziologice din mediu prin activarea motilității spermatozoizilor lenți care trec astfel în categoria celor rapizi. Mărimea efectului nu depinde de temperatură și este reversibil,

revenind la valoarea inițială, după care viteza medie de deplasare a celulelor fluctuează în jurul acestei valori.

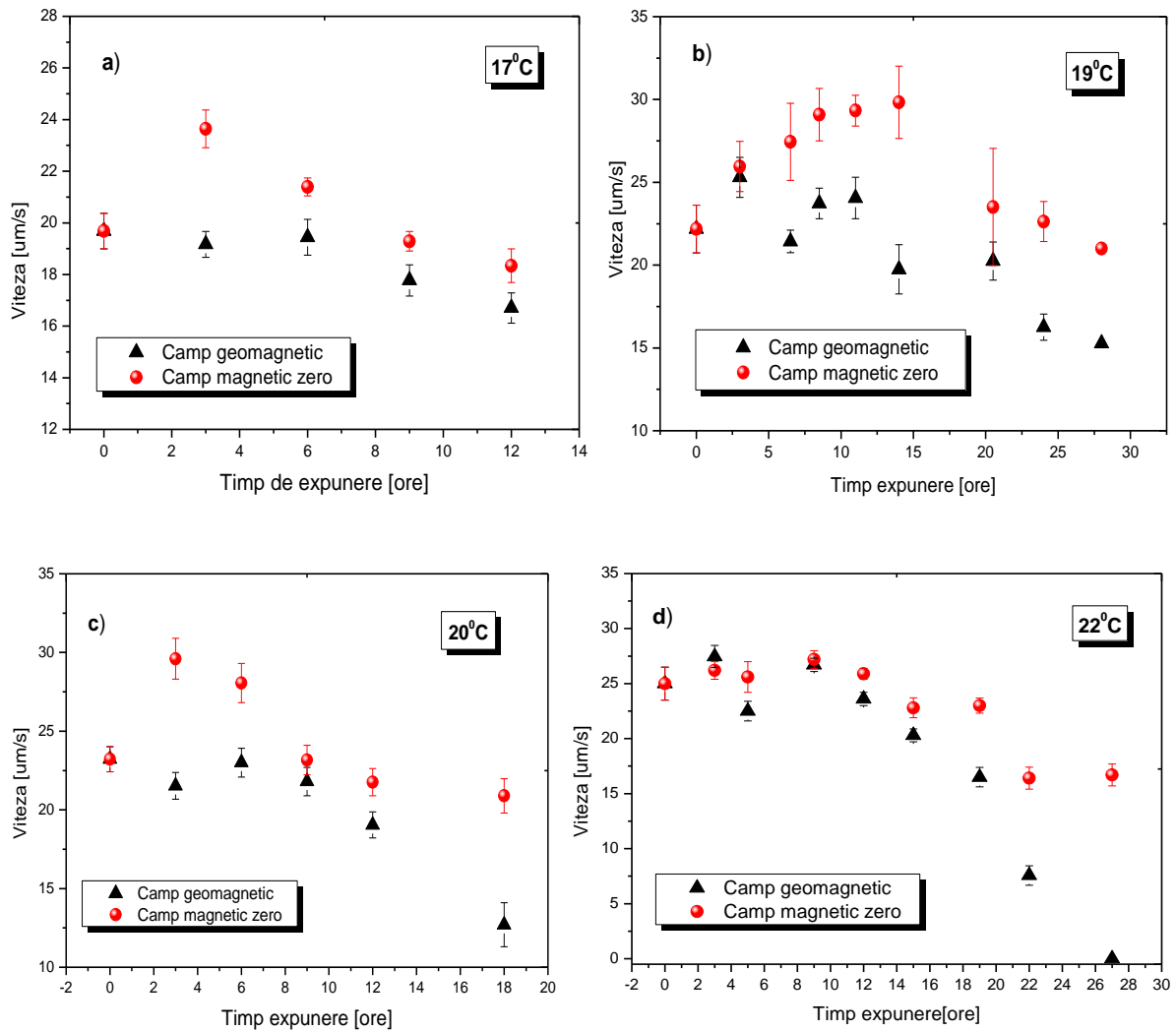


Fig.2.

Viteza de deplasare a spermatozoizilor rapizi la diferite temperaturi de incubare

In CGM, viteza de deplasare celulară variază în jurul valorii inițiale în primele ore de incubare fără a fi stimulată, după care scade până la valoarea minimă care delimitează categoria spermatozoizilor rapizi de cei lenți.

VI. CONCLUZII GENERALE

Prima parte a tezei cuprinde o analiză a influenței mediului lipsit de componenta statică a câmpului geomagnetic (câmp magnetic zero) (I) în etapa vegetative de creștere a unor specii de plante și (II) în procesul de multiplicare bacteriană. In capitolul final sunt prezentate rezultate preliminare privind motilitatea unor organisme unicelulare (bacterii, spermatozoizi) în câmp magnetic zero.

Rezultatele originale cuprind următoarele aspecte:

I. DEZVOLTAREA PLANTELOR ÎN ETAPA VEGETATIVĂ DE CREȘTERE

A fost realizat un studiu sistematic a dezvoltării plantelor în absența câmpului geomagnetic pe întregul interval de creștere vegetativă. Au fost investigate opt specii de plante: *Medicago sativum*, *Tagetes patula* L., *Tagetes erecta* L., *Calendula officinalis* L., *Triticum aestivum*, *Secale cereale* L., *Lycopersicum esculentum* L. și *Capsicum annuum* L. în următoarele stadii de dezvoltare: i) germinarea semințelor, ii) faza post embrională de creștere definită prin apariția și dezvoltarea radiclei embrionale pe o perioadă de 4-5 zile, iii) dezvoltarea plantulelor tinere în interval de o lună, iv) stadiul de plantă matură până în faza de înflorire și apariție a rodului.

Aspectele originale constau în: 1) extinderea studiului de la aspectele parțiale ale evoluției plantelor în câmp magnetic zero la analiza întregului interval de creștere vegetativă; 2) monitorizarea procesului de creștere în diferite perioade ale anului pe aceeași specie și în aceleași condiții experimentale 3) testarea comparativă a unor specii de plante care nu au mai fost analizate 4) decelarea influenței fluctuațiilor magnetice naturale în condiții de câmp magnetic zero în diferite stadii de dezvoltare ale plantelor.

1. Germinarea semințelor

Absența componentei statice a câmpului geomagnetic nu reprezintă un factor de stres în faza de germinare a semințelor. Procesul este favorabil influențat în prezența furtunilor magnetice majore, în cazul în care perturbarea magnetică este prezentă în faza inițială a procesului de germinare (faza de îmbibare). În acest sens au fost obținute rezultate în germinarea semințelor de *Medicago sativa* L și *Secale cereale* L.

2. Faza post embrională de creștere

În această fază de creștere, rezultatele obținute indică o specificitate de răspuns a plantelor în funcție de specie. În perioade cu activitate geomagnetică scăzută creșterea plantei este cu preponderență i) stimulată pentru sp. *Medicago sativa* L. și *Tagetes erecta* L., ii) inhibată în cazul *Triticum aestivum* L. și *Secale cereale* L. iii) *Calendula officinalis* L. prezintă o sensibilitate scăzută.

Răspunsul semnificativ înregistrat poate fi privit ca o potențare a sensibilității plantelor în cursul unor faze în care procesul de creștere este intens, cum este stadiul postembrional de creștere.

Variații crescute ale activității geomagnetice echivalente apariției furtunilor magnetice nu influențează faza de creștere postembrională. O sensibilitate mărită este sugerată de răspunsul sp. *Tagetes erecta* în prezența unei furtuni minore în faza de îmbibare a semințelor.

3. Dezvoltarea plantulelor tinere în interval de o lună

valuarea statistică a parametrilor de creștere arată pentru aceeași specie, în diferite perioade ale anului, atât efecte semnificative în CMZ cât și efecte la limita pragului de semnificație statistică. În absența câmpului geomagnetic, dezvoltarea *T. erecta* L., *Calendula officinalis* L., *Triticum aestivum* L. și *Capsicum annuum* L. a fost cu preponderență încetinită, evoluție ilustrată prin apariția întârziată și dimensiunea redusă a frunzelor tinere în curs de creștere. După o lună de expunere în CMZ aspectul plantelor este mai puțin viguros iar greutatea medie a masei verzi mai mică față de plantele din lotul martor.

4. Plante mature –expunere cinci - șapte luni în CMZ

Etapele reproductivă de creștere nu este semnificativ influențată în CMZ. Se poate vorbi însă de o potențare a creșterii în înălțime a plantelor tinere (*Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Capsicum anuum*) și de un proces mai rapid (*Lycopersicum aesculentum*) sau mai lent (*Tagetes patula*) în faza de apariție a bobocilor și a florilor.

5. Analiza ultrastructurală a frunzelor

Analiza ultrastructurală a frunzelor prin pune în evidență modificări negative în structura cloroplastelor și nucleilor celulelor foliare ale plantelor luate în studiu, concretizate prin diminuarea activităților lor metabolice. Există o anumită diferențiere a răspunsului fiecărei plante: plantele tinere manifestă o sensibilitate mai mare decât cele mature sau pe cale de îmbătrânire. De asemenea, plantele de cultură (*Lycopersicum aesculentum*, *Capsicum anuum* L) resimt mai mult lipsa câmpului magnetic decât plantele provenite din flora spontană (*Tagetes patula* L.).

În concluzie, efectul CMZ bine conturat la unele specii în primele stadii de creștere este semnificativ diminuat prin expunerea plantelor pe termen lung, sugerând o capacitate crescută de adaptare temporală a plantelor în absența câmpului geomagnetic.

II. MULTIPLICAREA BACTERIILOR

Rezultatele noastre completează studiile de toleranță față de antibiotice [Creangă și colab 2004, Poiată și colab. 2003] și evidențiază un răspuns bacterian dependent de specie în condiții de compensare x100 a câmpului geomagnetic. Culturile de *Salmonella* răspund pozitiv în aceste condiții, dezvoltarea celulară fiind semnificativ stimulată. Reactivitatea culturilor de *Listeria monocitogenes* indică o bună adaptare a acestei specii în timp ce multiplicarea celulară în culturi de *E. coli* nu este afectată sau este nesemnificativ deprimată. Dezvoltarea microorganismelor pe substrat de albumină este semnificativ stimulată în CMZ. Aceste rezultate arată că prezența câmpului geomagnetic reprezintă un mediu protector față de contaminarea unor microorganisme și a unor germeni bacterieni patogeni cum este *Salmonella*, fără a influența semnificativ dezvoltarea altor germeni (*Listeria monocitogenes*, *E. coli*).

La valori relativ crescute ale câmpului magnetic (300μT) dezvoltarea bacteriană nu este afectată.

Multiplicarea cianobacteriilor

Viteza de multiplicare a cianobacteriilor nu este influențată în câmp magnetic zero în perioade cu activitate geomagnetică redusă. Corelarea semnificativă ($p < 0.05$) între viteza de creștere a populației celulare și variația activității geomagnetice sugerează o sensibilitate crescută a multiplicării cianobacteriilor în prezența furtunilor magnetice minore. Răspunsul biologic este condiționat de apariția furtunii magnetice în primele faze ale multiplicării celulare sau de durata perturbării în timpul fazei exponențiale de creștere.

III. MOTILITATE CELULARĂ – date preliminare

Influența mediului magnetic lipsit de componenta statică asupra motilității celulare a fost urmărită în cazul unor organisme unicelulare procariote (tulpini bacteriene din sp.

Listeria monocitogenes) și celule eukariote (spermatozoizi umani) lipsite de proprietăți magnetotactice, a căror deplasare este generată de motoare moleculare diferite.

Rezultatele obținute au evidențiat o dependență a motilității *Listeriei monocitogenes* de prezența câmpului geomagnetic. În câmp magnetic zero migrarea bacteriană este inhibată, efect persistent la expunerea ulterioară în câmp geomagnetic, sugerând un efect de lungă durată. Motilitatea bacteriană nu este afectată în câmpuri magnetice crescute (300 μ T).

Un răspuns diferit este dat de motilitatea spermatozoizilor umani. Studiul vitezei de deplasare celulară în intervalul de temperatură 17-22°C indică un efect de stimulare a motilității în primele ore de expunere în CMZ la temperaturi mai scăzute de 22°C. Acest răspuns pare să fie o reacție de adaptare la condițiile nefiziologice din mediu prin activarea motilității spermatozoizilor lenți care trec în categoria celor rapizi.

BIBLIOGRAFIE

1. Aksyonov S.I., Bulychev A.A., Grunina T.Yu., Goryachev S.N., Turovetsky V.B., 2001, Effects of ELF-EMF treatment on wheat seeds at different stages of germination and possible mechanisms of their origin, *Electro and Magnetobiol.* 20 (2) 231-253,
2. Alexander M.P, Doijde SD, 1995, Electromagnetic field, a novel tool to increase germination and seedling.vigour of conserved onion (*Allium cepa L*) and rice (*Oryza sativa L*) seeds with low viability, *Plant Genet Resources Newslett*, 104, 1-5
3. Belyaev I.Ya., Alipov Y. D., Ringdahl. M.H., 1997, Effects of zero magnetic field on the conformation of chromatin in human cells. *Biochem. Biophys. Acta* 1336, 465-473.
4. Belyaev I.Y., Alipov D.Ye., 2001, Frequency-dependent effects of ELF magnetic field on chromatin conformation in *Escherichia coli* cells and human lymphocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1526, 269–276.
5. Belyavskaya NA. 2004. Biological effects due to a weak magnetic field on plants. *Adv. Space Res.* 34: 1566-1574
6. Blank M., Goodman R., 1999, Electromagnetic field may act directly on DNA, *Cell Biochem.*, 75, 369-374.
7. Blank M. and Goodman R., 2000, Stimulation of the Cellular Stress Response by Low Frequency Electromagnetic Fields: Possibility of Direct Interaction with DNA. *IEEE Trans Plasma Sci* 28:168-172.
8. Binhi V.N., 1997a, Interference of ion quantum states within a protein explains weak magnetic field's effect on biosystems. *Electro-and Magnetobiology* 16:203-214
9. Binhi V.N., 1998, Interference mechanism for some biological effects of pulsed magnetic fields, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 45, 73–81
10. Binhi V.N., Alipov Ye.D. and Belyaev I.Ya., 2001, Effect of static magnetic field on E. coli cells and individual rotations of ion-protein complexes." *Bioelectromagnetics*, 22(2):79-86
11. Boldiszar E., Rapuntean Gh., Neamtu S., Near-null magnetic field effects upon mobility of some *Listeria monocytogenes* strains, *International Symposium: Prospects for the Agriculture of the 3rd Millenium*, 25-27 october, 2001, Cluj-Napoca.
12. Buimaga-Iarinca L., Morariu V.V., Neamtu S., Craciun C., Ultrastructural changes of leaves in zero magnetic field. A quantitative images analysis, 5th Conference on Isotopic and Molecular Processes, Cluj-Napoca, September 20-22, 2007
13. Ciorba D. and Morariu V.V., 2001, Life in zero magnetic field. III. Activity of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase during in vitro aging of human blood, *Electro and Magnetobiology*, 20 (3), 313-321

14. Ciortea L.I., Morariu V.V., Todoran A., Popescu S., 2001, Life in zero magnetic field. II, The effect on Zinc and copper in the human blood serum during in vitro aging. *Electro and Magnetobiology*, 20(2), 151-163.
15. Conley C.C., Effects of near-zero magnetic fields upon biological systems, in *Biological effects of magnetic fields*, Vol 2, ed. Barnothy M.F., Plenum Press, New York , 29-52, 1969
16. Corneanu G.C., Crăciun C., Corneanu M., Morariu V.V., Nuti M.P., Crăciun V., Bica D., 2000, The reaction of two *Escherichia coli* strains at different values of the geomagnetic and geoelectric field. *Evolution and adaptation*, 177-191.
17. Creangă D.E., Poiată A., Morariu V.V. and Tupu P.: 2004, Zero-magnetic field effect in pathogen bacteria, *J. Magnet. Magnetic Mat.*, 272–276, 2442–2444.
18. Fletcher D.A., Theriot J.A., 2004, An introduction to cell motility for the physical scientist, *Phys. Biol.* 1, T1-T10.
19. Lebedev S.I., Baranskiy P.I., Litvinenko L.G, Shiyan L.T., 1977, Barley growth in superweak magnetic field. *Electronic Treatment of Materials* 3: 71-73.
20. Liboff A.R., 2005. The charge-to-mass ICR signature in weak ELF bioelectromagnetic effects. In Lin C (ed). *Advances in electromagnetic fields in living systems Vol.4*, Springer Verlag, 189–218.
21. Liboff A.R., 1985. Geomagnetic cyclotron resonance in living cells. *Biol Phys* 9:99–102.
22. Maeda K, Henbest K.B., Cintolesi F., Kuprov I., Rodgers C.T., Liddell P.A., Gust D., Timmel C.R., Hore P.J., 2008, Chemical compass model of avian magnetoreception. *Nature* 453:387–390
23. Morariu V.V., Ciorba D, Neamtu S., Life In Zero Magnetic Field Part II. In Vitro Human Blood Aging. *Electro and Magnetobiology*, 19 (3) (1999) 271-278
24. Morariu V.V., Craciun C., Neamtu S., Iarinca L., 2006, A fractal long-range correlation analysis of vegetal nucleus ultrastructure, *Romanian Journal of Biophysics*, 16(4);243-252
25. Neamtu Silvia, Craciun C., Morariu V.V., 2009, Zero magnetic field influence on *Tagetes sp.* and *Calendula L* growth. Morphological and ultrasctructural analysis, *Processes in Isotopes and Molecules*, September 24-26, Cluj-Napoca, Romania
26. Neamtu S., Boldizar E., Morariu V.V., 2003, Metabolic activity of bacteria in zero magnetic field, *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Physica, Special Issue 2, XLVIII*, 544-547
27. Neamtu S. and Morariu V.V., 2005, Plant growth in experimental space flight field conditions, *Romanian Journal of Biophysics*, 15 (1–4): 41–46
28. Neamtu S., Truta Z., Boldizar E., Pop C.V.L., Morariu V.V., 2005, Cell motility in zero magnetic field, *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Physica, L(4b)*: 697-700
29. Neamtu S. and Morariu V.V., 2010, Zero magnetic field effect on the vegetative growth of wheat, rye and decorative plant species, *Bioelectromagnetics*, trimisă spre publicare
30. Pazur A, Scheer H., 1992, The growth of freshwater green algae in weak alternating magnetic fields of 7.8 hz frequency. *Z Naturforsch.* 47:690–694.
31. Pilla A.A. 2003, Weak time-varying and static magnetic fields: from mechanisms to therapeutic applications. In: Stavroulakis P, editor. *Biological effects of electromagnetic fields: mechanisms, modeling, biological effects, therapeutic effects, international standards, exposure criteria*. Berlin: Springer;
32. Pokhodzey L.V., 1998, Electromagnetic fields: Biological effects and hygienic standardization, *Proceedings of the International Meetings 18-22 May*, M.H.Repacholi, M.B. Rubtsova, A.M. Muc, World Health Organisation, Geneva, Switzerland.
33. Pojata A., Creanga D.E. and Morariu V.V. 2003, Life in zero magnetic field. V. *E. coli* resistance to antibiotics, *Electromagnet. Biol. Med.*, 22, 171–182.

34. Ružič R.; Jerman, I.; Gogala, N., 1998b, Effects of weak low-frequency magnetic fields on spruce seed germination under acid conditions. *Can.J.For, Res.* 28, 609 – 616.
35. Ružič R.; Jerman, I.; Gogala, N., 1998a, Water stress reveals effects of ELF magnetic fields on the growth of seedlings. *Electro-Magnetobiol.*, 17(1), 17- 30.
36. Ružič R.; Vodnik, D.; Jerman, I., 2000, Influence of aluminium in biological effects of ELF magnetic field stimulation. . *Electro-Magnetobiol.* 19 (1), 57 68.
37. Serafin D.J., Dupouy D.P., Bolomey J.C., 1995, Electromagnetic Environment and Consequences, International Symposium on Electromagnetic Environment and Consequences, EUROEM Gramat France, (2), 1914.
38. Truta Z., Neamtu S., Morariu V.V., 2005, Zero magnetic field influence on in vitro human spermatozoa cells behavior, *Romanian Journal of Biophysics*, 15, (1-4), 73-79

PARTEA II

EFECTE ALE CÂMPURILOR ELECTRICE INTENSE, DE SCURTĂ DURATĂ ASUPRA CELULELOR VII: ELECTROPERMEABILIZAREA BIOMEMBRANELOR

1. INTRODUCERE

Procesul de electropermeabilizare, cunoscut și sub denumirea de electroporare, este un fenomen de membrană inițiat prin aplicarea unor pulsuri de câmp electric de formă exponențială sau dreptunghiulară, intense (kV/cm) și de scurtă durată (μ s-ms) unor suspensii, culturi celulare sau țesuturi vii și constă în îndepărtarea temporară a barierei membranare pentru moleculele din mediul intra și extracelular, la atingerea unui potențial transmembranar critic. Peste această valoare are loc străpungerea dielectrică a membranei și transportul transmembranar consecutiv de ioni și molecule [Neumann and Rosenheck, 1972; Zimmermann și colab. 1974; Kinoshita și Tsong, 1977] prin așa numiții pori apoși.. Ca proces molecular, este acceptată ideea electropermeabilizării ca proces reversibil de restructurare a bistratului lipidic.

Electropermeabilizarea membranelor este un proces controlat și modulată de parametrii electrici ai câmpului aplicat și este influențat de o serie de factori chimici, fizici și biologici. Ca biotehnologie, electroporarea membranelor oferă soluții optime pentru rezolvarea unor scopuri aplicative, fiind utilizată cu succes în toate domeniile care presupun manipularea celulelor vii. Deși înțelegerea mecanismelor moleculare ale procesului de permeabilizare membranară continuă să rămână un subiect de studiu deschis, motivat de înțelegerea limitată a bazelor teoretice a fenomenului [Teissie și colab. 2005, Weaver 2003, Weaver și Chizmadzev 1996] metoda electroporării este astăzi larg utilizată pentru incorporarea celulară a unei mari diversități de molecule, cum sunt substanțele farmacologic active, antibiotice, oligonucleotide, ARN, ADN [Favard 2007, Gehl, 2003, Rolls 2006, Golzio și colab. 2002], eliberarea transdermică a substanțelor active [Prausnitz 1996, Denet și colab. 2004, Pavselj și colab 2005b], fuziunea celulară [Zimmermann 1982], electroinsertia membranelor a proteinelor [Teissie și Ramon 1998], sterilizare [Rowan și colab. 2000, Teissie și colab. 2002], ablația țesuturilor [Davalos și colab. 2005, Lavee și colab. 2007].

Importanța practică a procesului de electropermeabilizare membranelor cuprinde următoarele aspecte:

- ✓ este un proces fizic, neinvaziv și reversibil în intervale cunoscute a parametrilor electrici
- ✓ este influențat de factori care pot fi controlați și utilizați în scopul modulării procesului în sensul dorit
- ✓ sistemele celulare obținute sunt compatibile cu organismul
- ✓ este creată o cale de acces directă la locul de acțiune a substanței active și este evitată astfel biodegradarea acesteia

Manipularea celulară prin tehnica electroporării a facilitat dezvoltarea unor noi căi de terapie medicală.

II REZULTATE EXPERIMENTALE

1. TEHNICA ELECTROPERMEABILIZĂRII BIOMEMBRANELOR - INSTALAȚIA EXPERIMENTALĂ

În scopul abordării tematicii de cercetare privind electroporabilizarea biomembranelor a fost proiectat și construit un aparat complex având în componentă un generator de pulsuri electrice dreptunghiulare și cu descărcare exponențială [Fig.2.1] proiectat pentru generarea unor pulsuri de tensiune de formă dreptunghiulară sau exponențială având durata și amplitudinea programabile în intervale definite în Tab 2.1.



Puls dreptunghiular		Puls exponențial	
Durata μs -ms	Intensitate e KV/cm	Durata μs -ms	Intensitate e KV/cm
20 μs -50 μs	0-12	10-800 μs	0-12
50 μs -100 μs	0-8	0,8-8ms	0-4
100 μs - 400 μs	0-4	8-20ms	0-2
0.4 μs - 1.5ms	0-2	20-50ms	0-1
1.5 μs -5ms	0-1		

Tabel 1.1 Intervale de valori a parametrilor de puls – amplitudine și durată, pentru pulsuri dreptunghiulare și pulsuri exponențiale

Instalația este prevăzută cu o celulă de electroporare funcționând în flux cu o capacitate de procesare de 2 ml probă biologică. Cuva de lucru este plasată într-un bloc termostatat cu precizie de 0,5C în domeniul 2-40°C.

2. CONTRIBUȚIA PARAMETRILOR DE PULS ELECTRIC ÎN PROCESUL DE ELECTROPERMEABILIZARE A MEMBRANEI ERITROCITARE

Intervalul de valori ai parametrilor de puls electric utilizat pentru permeabilizarea reversibilă a membranei celulare este cuprins între 1-20 kV/cm pentru amplitudine și 10 μs – 10 ms pentru durata pulsului. Valori scăzute ale amplitudinii pulsului pot genera câmpuri sub valoarea critică necesară permeabilizării membranare. În schimb intensități de câmp

prea mari determină străpungerea dielectrică ireversibilă a membranei, urmată de un eflux masiv a componentilor intracelulari.

Investigațiile noastre au avut ca scop determinarea ponderii parametrilor de puls electric - amplitudinea și durata - în electroporabilizarea reversibilă a eritrocitelor umane [Neamțu și colab 2000]. Au fost urmărite două procese diferite: cinetica de eflux a macromoleculelor de hemoglobină (65 000 Da) (Fig 2.1.) și influxul unor particule de dimensiune mică cum sunt ioni de mangan (55 Da) normal impermeabili prin membrana eritocitară, pentru patru combinații a parametrilor de puls electric:

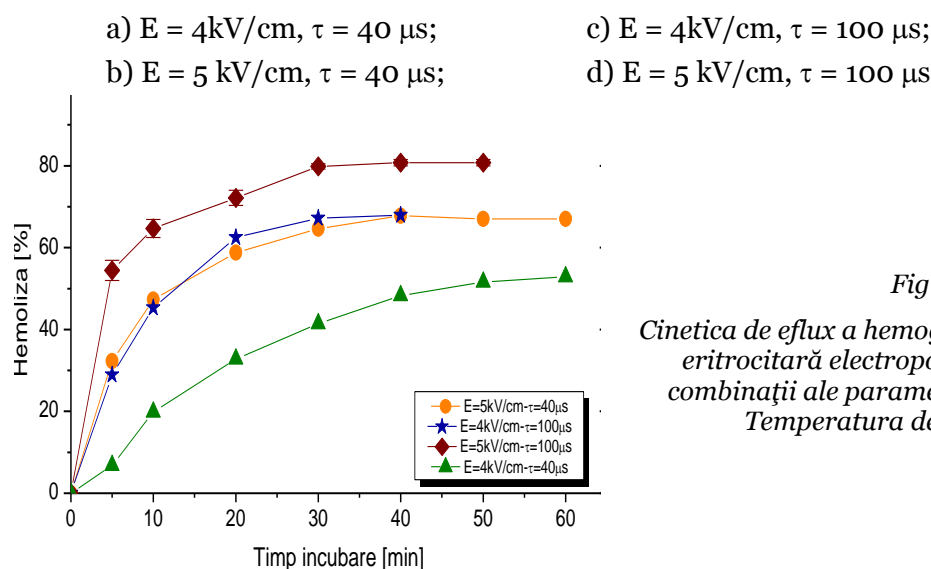


Fig.2.1

Cinetica de eflux a hemoglobinei prin membrana eritocitară electroporată, pentru diferite combinații ale parametrilor de puls electric. Temperatura de incubare - 4°C

Efluxul moleculelor de hemoglobină urmărește o curbă ascendentă care atinge o valoare de platou după 30 min corespunzătoare echilibrării concentrației moleculelor de hemoglobină în compartimentele intra și extracelulare.

Prin expunerea suspensiilor celulare la oricare din combinațiile de parametrii de câmp electric se obțin în proporții diferite două populații celulare distincte

- a) fantome eritrocitare cu conținut redus de hemoglobină
- b) eritrocite cu conținut integral de hemoglobină și membrana parțial permeabilă la ionii de mangan.

Permeabilitatea la ionii de mangan a membranelor celor două populații de celule diferă foarte mult. Distribuția ionilor de mangan în compartimentele intracelulare este puternic asimetrică fiind incorporată aproape exclusiv în fantomele eritrocitare.

Rezultatele pun în evidență complexitatea fenomenului de electroporabilizare. Diferite domenii de valori ai parametrilor pulsurilor de câmp electric induc o permeabilizare selectivă pentru diverse specii moleculare. Cele două „specii” testate: hemoglobina și ionii Mn^{2+} sunt considerați reprezentativi pentru capetele unui spectru larg de specii moleculare discriminate prin masă molară și implicit dimensiune.

Refacerea integrității și a impermeabilității membranare a celulelor fantomă obținute a fost testată prin determinarea permeabilității la mangan a celulelor electroporate și incubate la 37°C (Fig. 2.2).

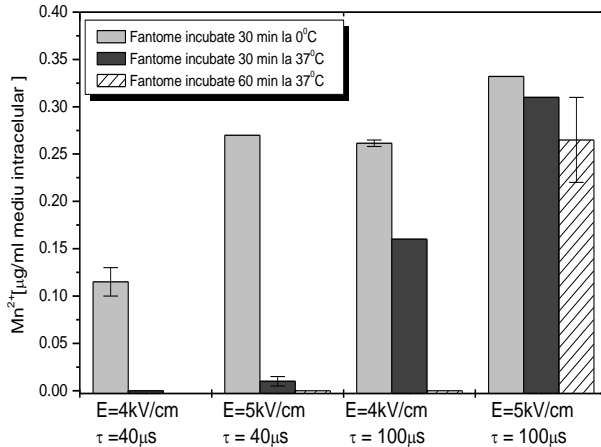


Fig.2.2
 Concentrația intracelulară a ionilor de mangan în fantome celulare obținute prin expunerea eritrocitelor la diferiți parametri ai pulsurilor de câmp electric

Deși permeabilizarea membranelor indusă de pulsuri la $E = 4\text{ kV/cm}$, $\tau = 100\ \mu\text{s}$ pusă în evidență atât prin efluxul molecular de hemoglobină cât și prin influxul ionilor de mangan este similară cu permeabilizarea înregistrată prin electroporarea cu pulsuri la $E = 5\ \text{kV/cm}$, $\tau = 40\ \mu\text{s}$, refacerea integrității membranelor este diferită și este dependentă de durata pulsului aplicat. Aceste date confirmă faptul că parametrul durată de puls este factorul care controlează procesul de reînchidere a porilor apoși induși în membranele electroporate.

3. INACTIVAREA PROCESULUI DE REINCHIDERE A ELECTROPORILOR IN MEMBRANE ERITROCITARE IRADIATE CU ELECTRONI

Mecanismele moleculare ale fenomenului de permeabilizare membranelor continuă să rămână unul din aspectele mult dezbătute în literatura de specialitate. Este acceptat faptul că inducerea permeabilizării membranelor este un proces atribuit domeniului lipidic, însă stabilitatea stării permeabile după electroporare sugerează că alte structuri moleculare, cum sunt proteinele membranelor și citoscheletul ar putea fi implicate în procesul de reînchidere a porilor [Teissie și Rols 1994, Rols și Teissie 1992, Chang și Reese 1990]. Membrana și rețeaua proteică citoscheletală sunt privite ca un sistem complex, asocierea lor fiind localizată la nivelul proteinelor integrale a bistratului lipidic printr-o proteină de legătură, ankirina. Ipoteza implicării citoscheletului în procesul de electropermeabilizare este susținută de mai multe grupuri de cercetare [Rols și Teissie 1992, Chang și Reese 1990].

Cercetările noastre au avut ca scop identificarea componentei proteice cu contribuția dominantă între diferiții componenți care ar putea fi implicați în etapa de refacere a membranelor eritrocitare electroporate [Neamțu și colab. 1999]. În acest sens a fost exploatat avantajul oferit de metoda "analizei țintă" aplicată în urma inactivării funcției unei proteine cauzată prin iradierea cu un fascicul de electroni de energie înaltă. S-a arătat că metoda oferă posibilitatea de a evalua greutatea moleculară a unei proteine. [Kempner și Macey 1989].

3.1. Analiza țintă

Ipoteza de bază a metodei se referă la faptul că fiecare ciocnire între electronii cu energie înaltă și molecula țintă afectează puternic complexul molecular, care își pierde astfel funcția biologică. Frațiunea rămasă nealterată descrește exponențial cu media ciocnirilor:

$$N/N_0 = e^{-KD} \quad (3.1)$$

Media “țintelor“ este proporțională cu doza D, iar constanta K conține informații directe legate de masa sistemului molecular țintă.

Parametrul accesibil experimental este panta curbei numite ‘curbă de inactivare’ obținută prin reprezentarea logaritmică a dependenței fracțiunii proteice active de doza radiației. Greutatea moleculară a sistemului este calculat prin relația:

$$M_m = K \cdot 6,4 \cdot 10^9 \quad (3.2)$$

determinat empiric de Kepner și Marcey [1968] și teoretic de Kepner și Haigler [1985].

3.2. Iradiere cu electroni și electroporare

Suspensii eritrocitare au fost iradiate la temperatura azotului lichid (270°K) cu fascicul de electroni cu energie 5 MeV, generat de un accelerator linear. La această temperatură este exclusă formarea radicalilor liberi ai apei (efect secundar dominant care ecranează efectul primar al radiațiilor).

Procesul de electroporabilizare a fost cuantificat prin gradul de hemoliză a eritrocitelor electroporate cu pulsuri electrice rectangulare 40μs și amplitudine variabilă în intervalul 2-6 kV cm⁻¹, sau la o valoare fixă de 4 kV cm⁻¹ la temperatură joasă (0-4°C.) Concentrația de hemoglobină extracelulară a fost determinată spectrofotometric la λ= 410 nm iar gradul de hemoliză a fost stabilit prin raportul normalizat a absorbanței în probele electroporate și în hemolizatul suspensiei inițiale

3.2. Rezultate experimentale

Efectul direct al radiațiilor cu electroni asupra membranei eritrocitare, a fost urmărit pentru doze de iradiere cuprinse între 1-6 kGy, în ambele faze ale procesului de electroporabilizare membranară:

1) inducerea permeabilizării monitorizată prin efluxul moleculelor de hemoglobină la temperatură scăzută (4°C).

2) refacerea impermeabilității membranei pentru aceste molecule prin incubarea suspensiei electroporate la temperaturi cuprinse între 0-37°C .

În timp ce pentru prima fază a procesului de electroporabilizare acțiunea directă a radiațiilor ionizante pare să fie irelevantă, procesul de refacere termică a impermeabilității membranare este puternic afectat. Timpul de viață a stării permeabile a membranei eritrocitare este redusă la creșterea temperaturii, cu descreșterea simultană a permeabilității membranei pentru hemoglobină. Acest proces a fost investigat pentru eritrocite iradiate la patru doze de iradiere: 1, 2, 4 și 6 kGy, electroporate la E=4kV cm⁻¹ și incubate 1h la temperaturi crescânde (Fig 3.3.).

Prezența moleculelor de hemoglobină în mediul extracelular a fost folosită pentru cuantificarea stării de permeabilizare a membranei celulare. În același mod a fost testată o probă neiradiată (martor).

Pentru a estima prin metoda analizei target greutatea moleculară a structurilor afectate prin iradiere au fost luate în calcul rezultatele obținute la 37°C. În cazul de față, curba de inactivare este dată de logaritmul variației hemoglobinei intracelulare ln(1-H/H₀) față de doza de iradiere (Fig 3.4). Prin creșterea dozei de iradiere, capacitatea de a refacere a funcției membranare de barieră pentru moleculele de hemoglobină este progresiv alterată.

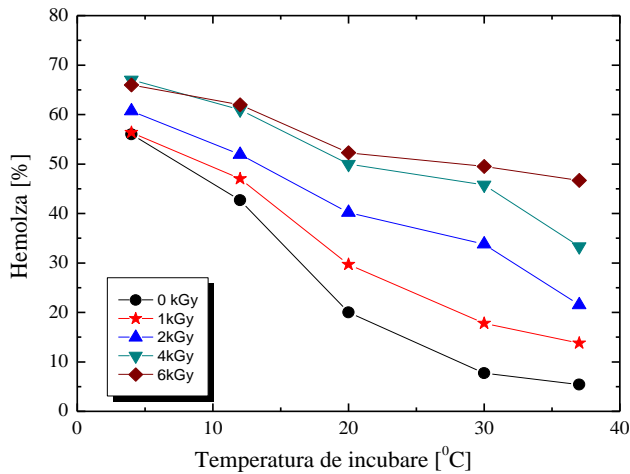


Fig 3.3.

Dependența electrohemolizei eritrocitelor iradiate de temperatura de incubare. Iradiere cu fascicul de electroni 5 MeV, la doze de 0-6 Gy. $E=4kV/cm$, $\tau=40 \mu s$, temperatura $4^{\circ}C$

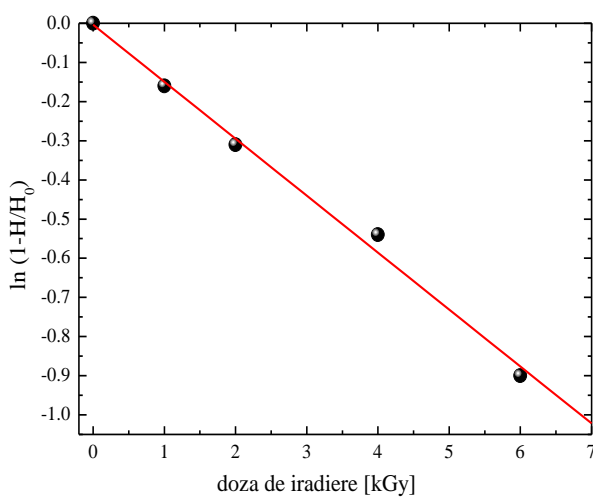


Fig 3.4

Curba de inactivare a refacerii membranare ($T=37^{\circ}C$) pentru diferite doze de iradiere.

Graficul prezintă o pantă $K=0,145 (kGy)^{-1}$. Aplicând această valoare în relația (3.2) obținem o masă moleculară $M \sim 930kDa$, valoare foarte apropiată sistemului molecular spectrină sub formă de tetramer. Toate celelalte structuri proteice membranare au o masă moleculară sub 400 kDa. Spectrina este componentul proteic de bază ce formează rețeaua citoscheletului eritrocitar. Rezultatele noastre confirmă implicarea rețelei de spectrină în procesul de refacere a membranei electroporate.

4. DETERMINAREA DISTRIBUȚIEI DIMENSIONALE A CELULELOR PE BAZA EXPERIMENTELOR DE ELECTROPERMEABILIZARE MEMBRANARA

Pentru orice specie celulară dată se poate defini o valoare critică a diferenței de potențial transmembranar efectiv ψ_c^{ef} . Dacă intensitatea câmpului electric extern este suficient de mare vor fi electroporabile toate celulele a căror rază îndeplinește condiția limită:

$$\psi_c^{ef} = \frac{3}{2} ER \quad (4.1)$$

Procesul de electropermeabilizare devine astfel dependent doar de dimensiunea celulei. Într-o populație celulară care în mod obișnuit este neomogenă ca dimensiune, potențialul critic indus sub acțiunea câmpului electric este atins inițial de celulele cu dimensiunea cea mai mare. La creșterea intensității câmpului, procentul celulelor ce ating condiția critică favorabilă electroporării crește la rândul ei. Într-un domeniu de valori a intensității de câmp, toate celulele sunt permeabilizate. Astfel, pentru o populație de celule normal distribuită, curba de electropermeabilizare prezintă o dependență sigmoidală (Fig 2.5).

În cazul electroporării eritrocitelor, curba de electrohemoliză este caracterizată prin parametrii: $E_{1/2}$ reprezintă intensitatea câmpului electric care determină hemoliza a 50% din populația eritrocitară și $R_{1/2}$ atribuit razei celulare medii. Pe baza eficienței procesului de electropermeabilizare (η) definită de raportul între numărul de celule permeabilizate și numărul total de celule am propus o relație care definește distribuția dimensională a unei populații celulare.

$$\eta(y) = 1 - \int_0^{x(y)} f(x) dx \quad (4.2)$$

unde $f(x)$ este funcția distribuției dimensionale normalizate, x și y fiind variabilele adimensionale: $x = R/R_{1/2}$; $y = E/E_{1/2}$. Condiția critică dată de ecuația (4.1) devine cu noile variabile:

$$xy = 1 \quad (4.3)$$

Prin derivarea ecuației (4.2) în raport cu x , funcția de distribuție dimensională normalizată $f(x)$, devine:

$$f(x) = \frac{1}{x^2} \frac{d\eta}{dy} \quad (4.4)$$

Această formulă poate fi utilizată pentru caracterizarea funcției de distribuție dimensionale în condițiile în care eficiența procesului este determinată experimental. Avantajul net al acestui mod de abordare constă în faptul că utilizarea variabilelor normalizate au o validitate universală, fiind independente de valorile specifice ale conductivității membranare, dimensiunea celulei, și proprietățile electrice ale mediilor interne și externe celulare.

Funcția de distribuție dimensională a fost verificată în experimente de electrohemoliză eritrocitară realizate în două condiții experimentale diferite. Curbele de electrohemoliză au fost obținute prin metoda unicelulară respectiv metoda multicelulară.

1. metoda unicelulară – utilizează diluții mari de suspensie celulară (0.01%) care permite (i) electroporarea unei singure celule adusă între electrozi și (ii) determinarea valorii de prag a intensității de câmp electric care produce hemoliza celulară.

2. metoda multicelulară – expunerea unor suspensii celulare cu hematocrit 1% pulsurilor electrice presupune electroporarea a 60-80% celule. Eficiența electrohemolizei este calculată prin raportul: numărul de celule lizate / numărul total de celule.

Dependența normalizată a procentului de celule electropermeabilizate în funcție de intensitatea câmpului electric aplicat este reprezentată în Fig.2.5. pentru două valori ale duratei de puls: 1 ms (A) și 50 μ s (B).

În Fig 2.6 sunt redată histogramele funcțiilor de distribuție dimensională normalizate obținute prin derivatizarea numerică a dependenței eficienței electroporării.

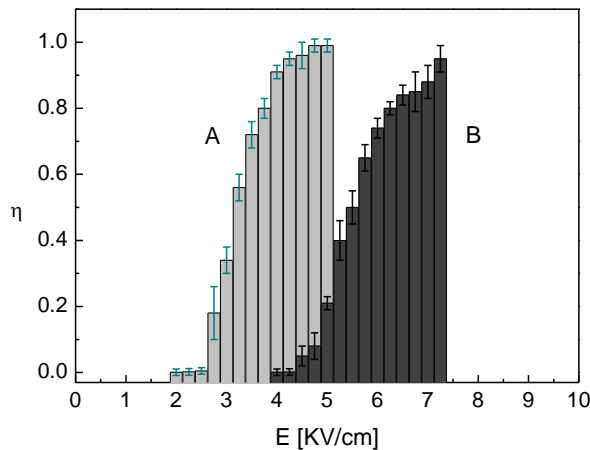


Fig 2.5.
Dependența sigmoidală a eficienței electrohemolizei de intensitatea pulsului electric. Durata de puls; A – 1 ms, B – 50 μ s

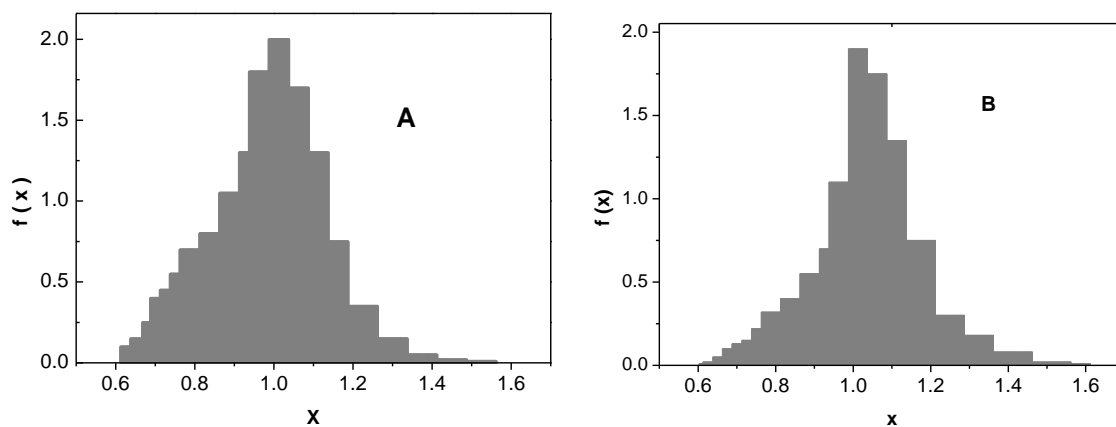


Fig. 2.6.
Funcția de distribuție dimensională normalizată. Durata de puls; A – 1 ms, B – 50 μ s

Pentru condiții experimentale ce diferă prin durata pulsului electric aplicat, distribuția dimensională calculată este similară și anume prezintă un singur pic relativ îngust centrat la $R_{1/2}$ și o formă similară. Lărgimea ambelor distribuții este $\sim 0,3R_{1/2}$ ceea ce corespunde unei valori de aproximativ 1 μ m.

3.5. ELECTROPERMEABILIZAREA MEMBRANARĂ ÎN PATOLOGIA DIABETICĂ ȘI LEUCEMICĂ

În condițiile unei hiperglicemii cornice se produc modificări chimice, structurale și funcționale ale proteinelor din țesuturile permeabile pentru glucoză, ceea ce determină instalarea unor complicații cunoscute în patologia diabetică cum sunt: afecțiuni renale, oculare, nervoase, vasculare. Mecanismele prin care excesul de glucoză poate afecta structurile proteice sunt atribuite intensificării (i) glicozilării enzimatică a proteinelor, (ii) a glicozilării neenzimatică a proteinelor, (iii) căii polioli, (iv) depleției mioinozitolului intracelular. Glicozilarea hemoglobinei conduce la formarea unor hemoglobine anormale HbA_{1a}, HbA_{1b}, HbA_{1c} cu consecințe în funcționalitatea eritrocitului: flexibilitate redusă a celulei, vâscozitate intrinsecă crescută care se presupune că contribuie la reducerea deformabilității eritrocitelor diabetice. Modificări în permeabilitatea membranei eritrocitare

au fost puse în evidență și în patologii maligne [Moore și colab. 1979]. Studii RMN au arătat un influx mult mai lent a ionilor de mangan în celulele roșii și limfocite în cazurile de leucemie cronică.

În acest context am utilizat tehnica electroporării pentru a analiza modificarea permeabilității membranare a eritrocitelor umane în patologia diabetică tip I și tip II și patologia leucemică: leucemie limfatică cronică, limfom Hodgkin (Fig 2.7, Fig. 2.8).

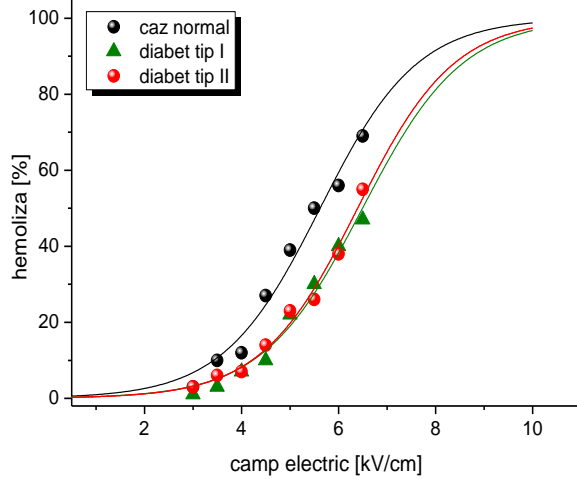
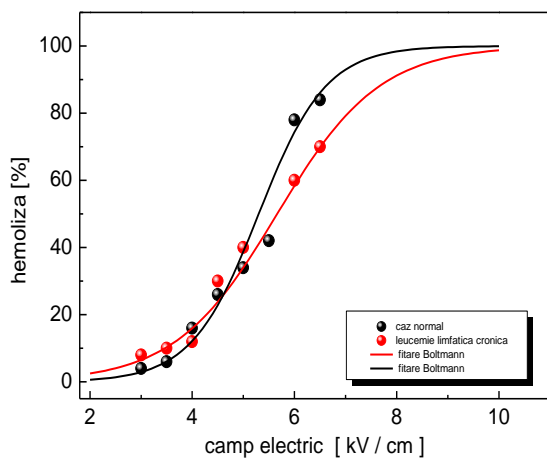
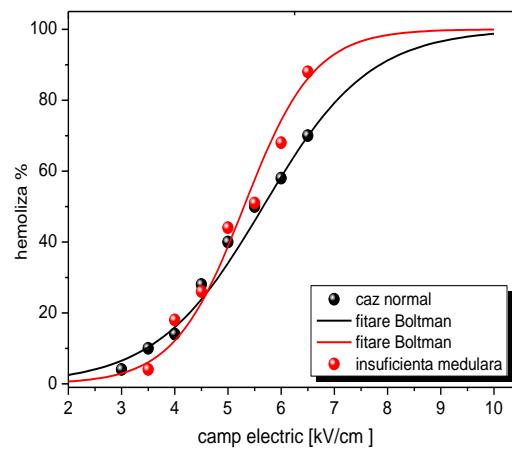


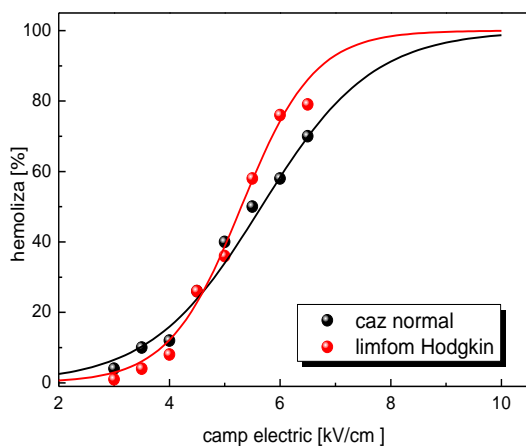
Fig.2.7.
Electrohemoliza în suspensii eritrocitare 1% provenite de la subiecți sănătoși și în patologia diabetică - diabet zaharat tip I și tip II



a.



b.



c.

Fig 2.8.
Electrohemoliza unei suspensii eritrocitare 1% în cazuri normale și în patologia malignă:
a. leucemie limfatică cronică,
b. insuficiență medulară
c. limfom Hodgkin,

Electropermeabilizarea membranei eritrocitare a fost caracterizată prin electrohemoliza unei suspensii eritrocitare 1%, expusă unor pulsuri electrice dreptunghiulare de scurtă durată (100/μs) și amplitudine variabilă în intervalul 3-7 KV/cm. Curba de electrohemoliză obținută, are ca parametru caracteristic valoarea $E_{1/2}$ a intensității câmpului electric care determină hemoliza a 50% din populația eritrocitară. Acest parametru a fost utilizat pentru a caracteriza modificările de permeabilitate a celulelor patologice față de cele normale. În cele două tipuri de patologie, curbele de hemoliză reprezintă media experimentală a cazurilor luate în studiu.

Se observă o deplasare similară a curbelor de electrohemoliză în diabet zaharat tip I și tip II față de curba martor în sensul creșterii amplitudinii pulsului electric necesar permeabilizării celulare (Fig 2.7). Deplasarea relativă E_0 este +7% și indică o rezistență membranară crescută a eritrocitelor afectate de excesul glicemic în sânge.

Electropermeabilizarea membranară este nesemnificativ modificată față de normal în leucemie limfatică cronică (Fig.2.8.a), insuficiență medulară (Fig.2.8.b) și limfom Hodykin (Fig.2.8.c).

Rezultatele obținute au pus în evidență următoarele aspecte:

- diminuarea permeabilității membranare în patologia diabetică cu $E_E=+7\%$, este corelată cu o creștere a glicozilării hemoglobinei intraeritrocitare;

- permeabilitatea membranei eritrocitare electroporate este similară în cazuri de diabet zaharat tip I și tip II;

- permeabilitatea normală în leucemie limfatică cronică, insuficiență medulară, limfom Hodgkin este corelată cu valori normale ale hemoglobinei glicozilate.

Scăderea permeabilității membranei eritrocitare la hemoglobină în diabet zaharat, respectiv creșterea rezistenței membranare la electrohemoliză poate fi explicată prin glicozilarea hemoglobinei și formarea unei hemoglobine anormale. Vâscozitatea acestei hemoglobine este crescută iar volumul mărit. Ca urmare viteza de difuzie în mediul extracelular este diminuată în comparație cu hemoglobina normală. Efluxul diferit pentru cele două tipuri de hemoglobină determină pentru un anumit grad de hemoliză, o valoare a $E_{1/2}$ deplasată față de normal în sensul creșterii intensității pulsului de câmp electric necesar permeabilizării membranare.

III CONCLUZII

Cercetările prezentate în această parte a tezei cuprind următoarele rezultate originale:

- A fost conceput și realizat un aparat de electroporare complex cu posibilitate de generare a două tipuri de pulsuri electrice: dreptunghiulare și cu descărcare exponențială. Amplitudinea și durata pulsurilor sunt programabile, măsurate și afișate. Aparatul are posibilitatea de aplicare programată a unui număr de 1-10 pulsuri succesive pe aceeași fracțiune de probă la o singură trecere printre electrozi. Celula de electropermeabilizare atașată aparatului, este termostatăată cu precizie de 0,5°C în domeniul 2-40°C, și funcționează în flux cu o capacitate de procesare a 2ml probă biologică.
- Ponderea amplitudinii și duratei de puls electric în procesul de permeabilizare membranară a fost determinată prin electroporarea eritrocitelor umane utilizând diferite combinații a parametrilor de puls. Procesul a fost urmărit prin cinetica de eflux a

macromoleculilor de hemoglobină (65 000 Da) și influxul ionilor de mangan (55 Da) normal impermeabili prin membrana eritrocitară.

- a fost dovedită posibilitatea de control a permeabilizării membranare prin ajustarea amplitudinii și a duratei pulsului electric aplicat.
 - a fost pusă în evidență existența unor pori de dimensiuni diferite în membrana eritrocitară electropereabilizată
 - procesul de reînchidere a porilor membranari induși sub acțiunea pulsului de câmp electric este controlat în mare măsură de durata pulsului aplicat. La același grad de permeabilizare refacerea integrității și a impermeabilității membranare se realizează în intervale de timp mai lungi prin creșterea duratei de puls.
- Pe baza dependenței potențialului transmembranar de dimensiunea celulei, am propus o relație care definește distribuția dimensională a unei populații eritrocitare. Funcția de distribuție dimensională a fost verificată în două condiții diferite de electroporare:
- A fost identificată componentei proteice cu implicare majoră în procesul de refacere membranară. În acest sens a fost exploatat avantajul oferit de metoda “analizei țintă” care oferă posibilitatea de a evalua greutatea moleculară a unei proteine a cărei funcție este inactivată prin iradierea cu un fascicul de electroni de energie înaltă.
- Metoda de analiză țintă a fost aplicată rezultatelor obținute în faza de refacere a membranelor eritrocitelor electroporate, expuse inițial iradierii cu electroni la diferite doze. Inactivarea acestei fazei a permis identificarea proteinei implicată în procesul de reînchidere a porilor membranari ca fiind spectrina sub formă de tetramer. Spectrina reprezintă unitatea structurală de bază a rețelei citoscheletale. Rezultatele noastre confirmă și aduc dovada concretă a participării citoscheletului eritrocitar în procesul de electropereabilizare membranară.
- Am utilizat tehnica de electropereabilizare membranară ca modalitate alternativă de identificare a modificărilor celulare în patologia diabetică (tip I și tip II) și în patologia malignă (leucemie limfatică cronică, insuficiență medulară, limfom Hodgkin). Prin această tehnică au fost puse în evidență modificări la nivel celular în patologia diabetică. Modificarea cineticii de eflux a hemoglobinei prin membrana eritrocitară electroporată a fost corelată cu creșterea glicozilării hemoglobinei intraeritrocitare și a fost explicată prin creșterea constantei de timp a difuziei transmembranare a moleculelor de hemoglobină anormale cu vâscozitate și volum crescut.

BIBLIOGRAFIE

1. Chang D.C., Reese T.S. Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy, *Biophys. J.*, 58 (1990) 1-12
2. Davalos R. V., Mir L. M. And B. Rubinsky, Tissue ablation with irreversible electroporation, *annals of biomedical engineering*, 33 (2005) 2, 223–231
3. Denet, A. R., R. Vanbever, and V. Preat. Skin electroporation for transdermal and topical delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 56 (2004):659–674.
4. Favard C., Dean D.S., Rols M.P. Electrotransfer as a non viral method of gene delivery. *Curr Gene Ther* 7 (2007) 67–77
5. Gehl J, Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand*, 177 (2003) 437-447
6. Golzio M., Justin Teissie, and Marie-Pierre Rols, Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery, *PNAS*, 99 (2002), 3

7. Kinoshita K., Tsong T.Y., Voltage-induced pore formation and hemolysis of human erythrocytes, *Biochim. Biophys. Acta* 471 (1977) 227–242.
8. Lavee J., Onik G. Mikus P., Rubinsky B., A Novel Nonthermal Energy Source for Ablation: Irreversible Electroporation, Forum Multimedia Publishing, LLC, 10 (2007) (2), 96-101
9. Neamtu S., Morariu V.V, Turcu I., Hategan Popescu A, Copăescu I.L., Pore resealing inactivation in electroporated erythrocyte membrane irradiated with electrons *Bioelectrochem. Bioenerg* 48 (1999) 441-445
10. Neamtu S., Turcu I., Dragu C., Bindea C., The role of the electric field pulse strength and duration in the biomembrane electropermeabilization processes, *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Physica, Special Issue* (2000) 303-309
11. Moore R., Mlekoday J.H., Jin D., The Asiatic filatation coefficient of human erythrocytes drom normal subjects and leucemic patients. *Stud. Biophys.* 76 (1979) 115-120
12. Morariu V.V. and Petrov L., Nuclear magnetic resonance investigation of erythrocyte membranes in chronic myeloproliferative disorders *Cancer Biochemistry Biophysics.* (1986), 8(3) 203-9.
13. Neumann E., Rosenheck K., Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes, *J. Membrane Biol.* 10: (1972) 279
14. Prausnitz M. R, The effects of electric current applied to skin; a review for transdermal drug delivery, *Adv. Drug Del. Rev.* 18 (1996) 395-425
15. Pavselj, N., Bregar, Z., Cukjati, D., Batiuskaite, D., Mir, L.M. and Miklavčič, D. The course of tissue permeabilization studied on a mathematical model of subcutaneous tumor in small animals. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 52 (2005b) 1373–1381.
16. Rols, M.P. Electropermeabilization, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758 (2006) 423–428.
17. Teissie J., Rols M.P., Manipulation of cell cytoskeleton affects the lifetime of cell membrane electropermeabilization, *Ann. N.Y.Acad. Sci.* 720 (1994) 98-110
18. Teissie J., Golzio M., Rols M.P. Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: a minireview of our present (lack of ?) knowledge. *Biochim Biophys Acta*, 1724 (2005) 270–280.
19. Turcu I. and Neamtu S., Dimensional distribution of human erythrocytes obtained from electropermeabilization experiments, *Biochim. Biophys. Acta.* 1238 (1995) 81- 85
20. Weaver J.C., Electroporation of Biological Membranes from Multicellular to Nano Scales, *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation* 10 (2003) 5,754-768
21. Zimmermann, U., G. Pilwat and F. Rienmann, Reversibler dielektrischer Durchbruch von Zellmembranen in elektrostatischen Feldern, *Z. Naturforsch.* 29c (1974) 304–305.