

Studio ab initio di stress biologici da intensi campi magnetici alternati

V. Nassisi¹, A. Ciccarese¹, A. Purricella², C. Pinto¹, M.P. Bozzetti², V. Specchia²

¹ Dipartimento di Matematica e Fisica, Laboratorio di Elettronica Applicata e Strumentazione, LEAS, Università del Salento; vinceno.nassisi@unisalento.it

² Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali, Laboratorio di Genetica, Università del Salento SS Monteroni-Lecce – 73100 Lecce, Italy

Abstract

Sono in corso nuovi studi di stress biologici da campi magnetici variabili nel range della radiofrequenza LF e con intensità di centinaia di mT . Per raggiungere lo scopo è necessario generare correnti di qualche ampere in solenoidi di bassa induttanza. In questo lavoro sviluppiamo un circuito oscillante LC alimentato da un generatore di corrente/voltaggio e da un interruttore veloce per alte correnti mediante transistor di potenza 2N3055. Il solenoide produce un campo magnetico di frequenza di 230 kHz e picco di 1.4 mT . I test sono stati condotti su moscerini di *Drosophila melanogaster*. Dopo 30 min. di trattamento è stata evidenziata un'alterazione della geotassi negativa dei moscerini.

Introduzione

Oggi giorno, la presenza di campi magnetici è sempre più invasiva per l'uso inarrestabile della strumentazione elettrica ed elettronica. La conoscenza dell'effetto dei campi magnetici sull'organismo ha un duplice scopo: il primo è quello di scoprire il ruolo dei campi magnetici sul comportamento degli esseri viventi; il secondo è quello comprendere quali siano gli effetti biologici, sia positivi che negativi. [1-7]

Recentemente sono stati condotti esperimenti con campi magnetici variabili sul comportamento delle drosophile utilizzando un generatore impulsato di campo magnetico [8-10]. Una corrente di qualche kA viene fatta passare in un solenoide di bassissima resistenza poiché è realizzato con un tubo di rame di 0.8 cm di diametro. Esso è composto da 11 spire e ha un'altezza di circa 12 cm e un diametro di 6 cm . Un condensatore di alta

tensione (50 kV) è fatto scaricare sull'induttore mediante un interruttore veloce (spark-gap). A causa della resistenza del solenoide e dell'impedenza interna del condensatore la corrente, non ha un comportamento cw (continuous wave). Essa assume un andamento che si smorza nel tempo e che è descritto dalla seguente equazione:

$$i(t) = \frac{V}{\omega L} e^{-\frac{R}{2L} \sin \omega t} \quad (1)$$

con $\omega = \sqrt{\frac{1}{LC} - \frac{R^2}{4L^2}} \cong \sqrt{\frac{1}{LC}}$. Analizzando l'Eq. 1 si trova che il campo oscilla alla frequenza di circa 230 kHz che persiste per un tempo pari a circa 30 μs . Per raggiungere una dose significativa di campo magnetico, si applicano una sequenza di impulsi alla frequenza di 1 Hz [11].

Dopo un'esposizione di 2 ore al campo magnetico impulsato la distribuzione media dei moscerini è maggiore nei primi tre centimetri, la situazione opposta si verifica nel settore 6-9 cm. Questo risultato indica che il campo magnetico impulsato induce un'alterazione della geotassi negativa di *Drosophila*.

Per verificare se l'alterazione del comportamento dei moscerini è dovuto principalmente al valore dell'intensità del campo magnetico, alla frequenza di 1 Hz con la quale viene applicato, oppure alla modalità di oscillazione a 230 kHz, abbiamo studiato il comportamento di *drosophila*, utilizzando un campo magnetico impulsato continuous wave a 230 kHz.

L'importanza del campo magnetico nella materia biologica consiste nel fatto che esso interagisce con le cariche in moto e conseguentemente con il momento magnetico. Il momento magnetico della materia è regolato dalla meccanica quantistica e le molecole ferromagnetiche e paramagnetiche sono le più coinvolte. Le molecole diamagnetiche, caratteristiche di tutta la materia, sono sensibili alla derivata del flusso magnetico a causa della legge di Lenz. Durante l'interazione del campo magnetico con la materia paramagnetica, quest'ultima viene sottoposta ad un momento meccanico corrispondente a $\vec{N} = \vec{M} \times \vec{B}$, in cui \vec{M} rappresenta il momento magnetico della materia e \vec{B} il campo magnetico. All'interno della materia il momento meccanico provoca una variazione di orientamento e un cambiamento di energia della stessa molecola espressa da:

$$E_B = -\vec{M} \cdot \vec{B} \quad (2)$$

Studiare la materia vivente esposta a campi è molto difficile a causa della complessità della struttura della membrana cellulare. In questi casi, è ragionevole supporre che il momento meccanico indotto dal campo magnetico possa influenzare il trasporto della carica

attraverso la membrana e lo stato energetico. Il campo magnetico potrebbe interagire direttamente con il DNA, ma questo è da scoprire. Considerando il solo momento magnetico dovuto all'elettrone il cui spin è $\pm \frac{1}{2}$, la variazione di energia secondo l'Eq. 2 può essere positiva o negativa, cioè:

$$E_B = \pm g\mu_B B m \quad (3)$$

dove g è il fattore di Landé che è prossimo a 2.00 per gli elettroni liberi e per la maggior parte dei radicali organici [4], μ_B è il magnetone di Bohr, B è il campo magnetico e m è la costante quantistica.

Sulla terra, è noto che il campo magnetico terrestre è rilevante per molti organismi viventi anche se la sua intensità è molto bassa, circa 0,05 mT. In generale, campi più intensi sono utilizzati in esperimenti di laboratorio e si esprimono col termine di campo moderato e vanno 1 a 1000 mT, in modulo.

Materiali e metodi

Drosophila stocks

I moscerini sono stati allevati alla temperatura ottimale di 25°C su terreno di coltura standard.

Individui adulti Oregon-R (Or-R) sono stati usati come ceppo wild type.

Saggio di geotassi negativa

La 'geotassi negativa' è un comportamento innato mediante il quale i moscerini risalgono le pareti del contenitore dopo averli fatti cadere sul fondo.

Le immagini delle posizioni dei moscerini dopo 9 s sono state ricavate con una fotocamera digitale.

Apparato sperimentale

La realizzazione di campi magnetici variabili ed intensi è piuttosto difficoltosa per il fatto che per i nostri scopi sono necessarie correnti piuttosto alte, circa 10 A, variabili. I comuni generatori RF sono di bassa corrente e per i

nostri scopi è stato necessario realizzarne uno ad *hoc*. Quindi, abbiamo realizzato un solenoide dal diametro interno di circa 3.5 cm e alto 9 cm con un numero di spire di 15 per avere una bassa induttanza e una bassa resistenza alla corrente. L'induttore viene accoppiato in parallelo con un condensatore polyester da 100 nF e con in parallelo un set di 10 condensatori ceramici da 10 nF ciascuno. In totale formano 200 nF. I condensatori ceramici sono utilizzati perché rispondono bene alle alte frequenze. I condensatori con l'induttore formano un circuito LC. Per avere una frequenza di circa 230 kHz è necessario che l'induttore abbia un'induttanza di circa $L \approx 1/\omega^2 C = 2.4 \text{ nH}$. Tutti i circuiti LC reali sono dispersivi, cioè smorsati e per mantenere l'oscillazione in continua è necessario ripristinare l'energia perduta per ciclo. Inoltre per controllare il campo magnetico, poiché non esistono gaussometri per campi magnetici variabili ai centinaia di kHz optiamo per misurare il valore di corrente nell'induttore mediante un secondo induttore concatenato con il principale e chiuso su di un'impedenza infinita. Quest'ultimo è formato da 4 spire e il coefficiente di attenuazione è $A_{tt} = I_B/V_L = 1.14 \text{ A/V}$. Il circuito è raffigurato in Fig. 1, mentre la foto dell'apparecchiatura è in Fig. 2.

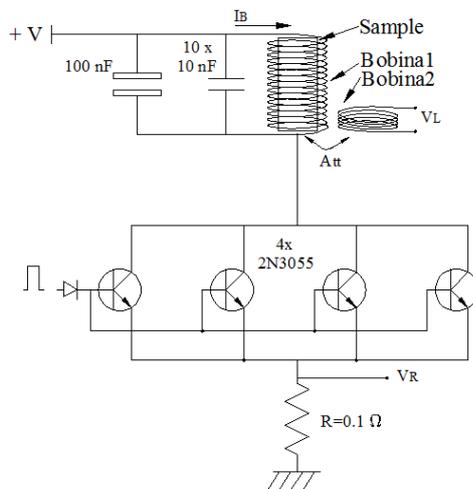


Fig.1: Schema elettrico dell'apparato utilizzato per la generazione del campo a 230 kHz.

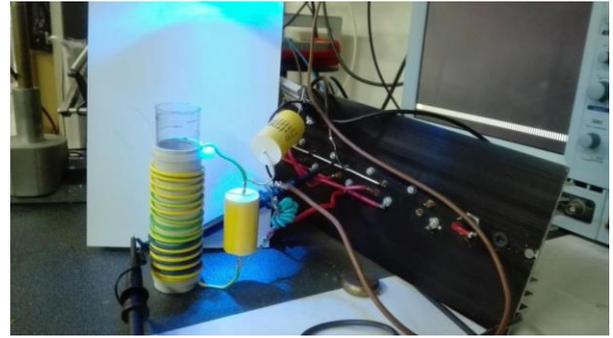


Fig.2: Foto del generatore.

Gli emitter dei quattro transistor sono connessi a massa mediante la resistenza R . Essa è molto piccola per non influenzare la caduta di potenziale tra base e massa. La resistenza non è indispensabile per il funzionamento ma è presente per determinare il valore della corrente di alimentazione nel momento in cui i transistor sono in conduzione. I transistor sono in conduzione quando la loro base è alimentata e allo scopo poniamo un generatore che fornisce un impulso di tensione della durata di 800 ns e frequenza di ripetizione 230 kHz.

L'intensità del campo magnetico è governata sia dalla massima corrente erogabile dal dall'alimentatore che dalle caratteristiche del segnale di trigger applicato alla base.

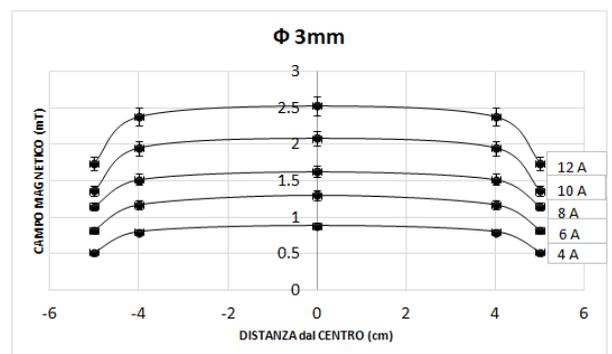


Fig.3: Mappa del campo magnetico all'interno della bobina a differenti valori di corrente continua.

È necessario però tarare il campo magnetico in funzione della corrente nel solenoide. E ciò viene fatto in corrente continua. In Fig. 3 è rappresentato il valore del campo magnetico

in funzione della corrente secondo la relazione:

$$B = \mu_0 k \frac{N}{l} I_B \quad (4)$$

dove k è il fattore di correzione, μ_0 la permeabilità magnetica in vuoto, N il numero totale delle spire e l l'altezza del solenoide. Per la corrente utilizzata in questo esperimento, 7.0 A, il picco del campo magnetico risulta di circa 1.4 mT. La forma d'onda del campo e il segnale di sincronismo sono mostrati in Fig. 4.

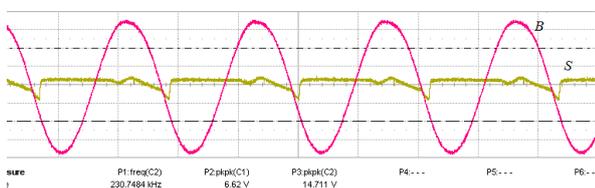


Fig.4: Forma d'onda del campo magnetico B, e del segnale di trigger S.

In *Drosophila melanogaster* è stata identificata la proteina cryptochrome (Cry). Cryptochrome appartiene alla classe delle flavoproteine ed è implicata nella percezione del campo geomagnetico attraverso la reazione della coppia di radicali attivati dalla radiazione luminosa. Cry attivata dalla luce blu (circa 450 nm) va in contro ad un cambiamento conformazionale che le permette di interagire con altre proteine, siano esse appartenenti al pathways di regolazione dei ritmi circadiani che alle proteine implicate nella magnetorecezione. I moscerini che mancano della proteina Cry non sono in grado di percepire il campo magnetico [4,5]. Un'altra proteina chiamata MagR è un magnetorecettore e forma un complesso proteico con Cry. Questo complesso agisce come un magnetosensore ed è in grado di allinearsi spontaneamente al campo magnetico [12].

Risultati

Per analizzare gli effetti del campo magnetico impulsato, abbiamo applicato un campo magnetico di 1.4 mT/230 kHz ai moscerini. Abbiamo usato 100 individui adulti (4 giorni di vita) wild type, OR-R e suddiviso i moscerini in dieci gruppi da dieci individui ciascuno. Cinque gruppi sono stati esposti al campo per 30 min. in presenza di luce blu. Essa è fornita da un set di 4 diodi blu il cui spettro di emissione è centrato a 480 nm, Fig. 5.

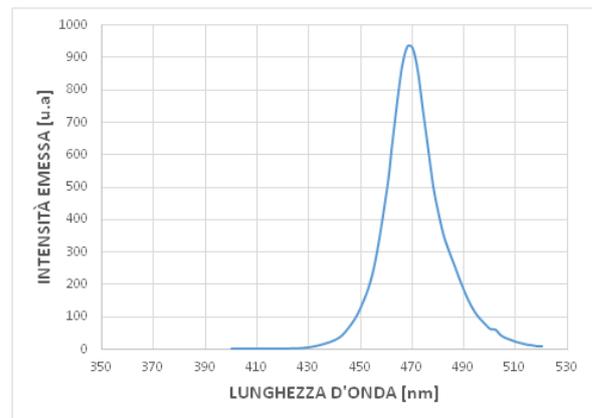


Fig. 5: Spettro di emissione del set di diodi UV.

Cinque gruppi sono stati illuminati con luce blu senza esporli al campo magnetico e sono stati usati come controllo. Alla fine dell'esposizione è stato effettuato il saggio di geotassi negativa, ripetendolo quattro volte per ogni gruppo. In particolare i moscerini sono stati fatti cadere sul fondo del tubo contenitore alto 6 cm ed è stata calcolata la loro distribuzione in 2 settori di 3 cm ciascuno dopo 9 secondi di tempo. (Tabella 1 e 2).

TRATTATO 0-3cm	CONTROLLO 0-3 cm
<i>N°DI MOSCERINI</i>	<i>N°DI MOSCERINI</i>
6	3
7	2
3	2
4	3
4	1
6	2
3	1
6	2

4	0
4	3
3	2
6	1
3	7
3	5
2	1
2	3
5	2
4	2
2	4
3	4

Tabella 1. Distribuzione dei moscerini controllo e trattato nell'intervallo 0-3 cm.

TRATTATO 3-6 cm	CONTROLLO 3-6 cm
N°DI MOSCERINI	N°DI MOSCERINI
3	5
1	5
4	6
1	1
4	8
3	4
6	7
1	4
4	5
2	4
5	3
1	4
1	3
3	2
3	6
4	4
1	5
0	5
4	3
3	3

Tabella 2. Distribuzione dei moscerini controllo e trattato nell'intervallo 3-6 cm.

I risultati sono stati riportati nel grafico (Figura 6 e 7). La distribuzione media dei moscerini dopo l'esposizione al campo magnetico impulsato è maggiore nei primi tre

centimetri, la situazione opposta si verifica nel settore 3-6 cm. Questo risultato indica che il campo magnetico impulsato cw induce un'alterazione della geotassi negativa di *Drosophila*.

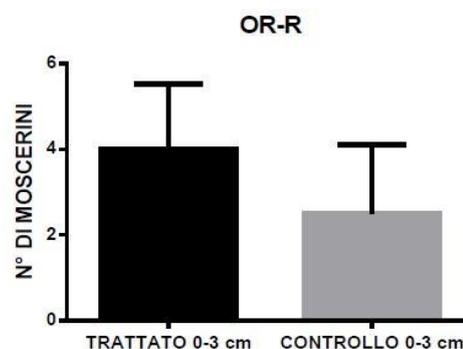


Fig.6 Rappresentazione grafica della distribuzione media di moscerini (controllo e trattato) nel primo settore del tubo.

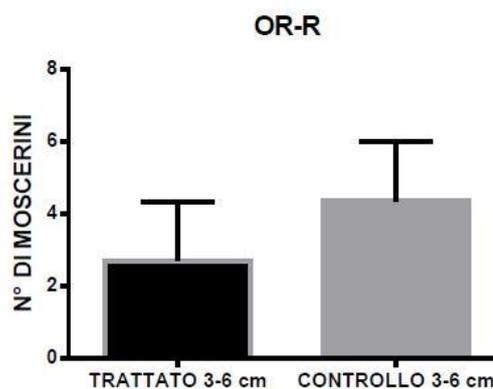


Fig.7 Rappresentazione grafica della distribuzione media di moscerini (controllo e trattato) nel secondo settore del tubo.

Conclusioni

Negli ultimi anni la scoperta che l'interruzione della geotassi negativa nel modello *Drosophila melanogaster* fornisce un metodo affidabile per lo studio delle reazioni comportamentali ai campi magnetici statici (Fedele, 2014) ha permesso di iniziare a studiare e capire quali siano le molecole implicate in questo processo.

In questo lavoro abbiamo valutato gli effetti del campo magnetico impulsato cw sul

comportamento dei moscerini. Abbiamo dimostrato che l'utilizzo di un campo cw a 230 kHz e 1.4 mT, determina un'interruzione della geotassi in *Drosophila* dopo solo 30 min. di esposizione. Tale risultato mette in evidenza che oltre all'intensità, anche la frequenza e la forma di oscillazione sono dei parametri fondamentali da tenere in considerazione nello studio dell'effetto dei campi magnetici sugli organismi viventi.

References

- [1] N.M. Shupak, F.S. Prato and A.W. Thomas, Therapeutic uses of pulsed magnetic-field exposure: a review, *Radio Sci. Bull.* 307 (2003) 9.
- [2] G. Maret and K. Dransfeld, Macromolecules and membranes in high magnetic fields, *Physica B+C* 86 (1977) 1077.
- [3] A.D. Rosen, Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems, *Cell Biochem. Biophys.* 39 (2003) 163.
- [4] C.B. Grissom, Magnetic field effects in biology: A survey of possible mechanisms with emphasis on Radical-Pair recombination, *Chem. Rev.* 95 (1995) 3.
- [5] C.T. Rodgers, Magnetic field effects in chemical systems, *Pure Appl. Chem.* 81 (2009) 19.
- [6] U.E. Steiner and T. Ulrich, Magnetic field effects in chemical kinetics and related phenomena, *Chem. Rev.* 89 (1989) 51.
- [7] C. Eichwald and J. Walleczek, Low-frequency-dependent effects of oscillating magnetic fields on radical pair recombination in enzyme kinetics, *J. Chem. Phys.* 107 (1997) 4943.
- [8] V. Nassisi, D. Delle Side, L. Velardi, G. Buccolieri, F. Paladini, D. Giove, C. De Martinis, A. Fazzi, "High voltage pulse of short duration to feed solenoids for intense ion beam transport", *Proceedings of III Workshop Plasmi Sorgenti Biofisica e Applicazioni*, October 19 2012, Lecce, Italy, ISBN: 978-88-8305-087-9, (2013)
- [9] D. Delle Side, V. Specchia, S. D'Attis, E. Giuffreda, G. Quarta, L. Calcagnile, M.P. Bozzetti and V. Nassisi, "Stressing biological samples with pulsed magnetic fields: physical aspects and experimental results", *JINST* 11C05007 (2015)
- [10] A. Friscini, V. Nassisi, D. Delle Side, E. Giuffreda, E. De Giorgio, S. Pimpinelli, V. Specchia, M.P. Bozzetti, "Differenti stress fisici provocano risposte biologiche diverse in *Drosophila melanogaster*", *Proceedings of IV Workshop Plasmi, Sorgenti, Biofisica e Applicazioni*, Lecce, 17-18 ottobre 2014, Edizione Coordinamento SIBA ISBN 978-88-8305-107-4, 111-116, printed in 2015
- [11] A. Ciccarese, "Alterazioni comportamentali e molecolari dopo stress da campo magnetico impulsato nel modello *Drosophila*" Tesi di Laurea Magistrale a.a. 2015-16
- [12] Rtynn [6] Siying Qin, Hang Yin, Celi Yang, Yunfeng Dou, Zhongmin Liu, Peng Zhang, He Yu, Yulong Huang, Jing Feng, Junfeng Hao, Jia Hao, Lizong Deng, Xiyun Yan, Xiaoli Dong, Zhongxian Zhao, Taijiao Jiang, Hong-Wei Wang, Shu-Jin Luo and Can Xie *Nature Materials* (2015) 15:217-226.