

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Легута Ульяна Григорьевна

Магнитно-изотопные эффекты в бактериях *E. coli*

03.01.02 – биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

доктора физико-математических наук

Научный консультант:

доктор физико-математических наук,

доцент **В. Л. Бердинский**

Москва 2021

Содержание

Список обозначений и сокращений	5
Введение	7
Актуальность	7
Степень разработанности темы	8
Цель диссертационного исследования.....	10
Объект и предмет исследования	10
Методология и методы исследований.....	10
Научная новизна.....	11
Теоретическая значимость работы определяется:	13
Практическая значимость работы	13
Положения, выносимые на защиту	14
Степень достоверности.....	14
Личный вклад автора	14
Внедрение результатов работы.....	15
Публикации.....	16
Апробация работы.....	16
Структура и объём диссертации	16
Глава 1 Магнитно-изотопные эффекты магния в росте и метаболизме бактерий <i>E. coli</i>	17
Введение.....	17
1.1 МИЭ магния, цинка, кальция в ферментативном синтезе (обзор литературы)....	18
1.2 Материалы и методы.....	24
1.2.1 Условия культивирования и питательная среда	24
1.2.2 Элементно-изотопный анализ питательных сред и клеточной биомассы	27
1.2.3 Кинетика роста бактерий.....	28
1.2.4 Определение КОЕ	31
1.3 Влияние изотопов магния на внутриклеточный элементный состав бактерий <i>E.coli</i>	32

1.4 МИЭ магния в росте <i>E. coli</i>	35
1.5 Влияние магнитного изотопа на колониеобразующую способность и скорость отмирания бактерий <i>E. coli</i>	39
1.6 Влияние внутриклеточного обогащения изотопами магния на рост клеток <i>E. coli</i>	42
1.7 Заключение	43
Глава 2 Влияние изотопов магния на резистентность к антибиотикам и образование биоплёнок	45
Введение.....	45
2.1 Материалы и методы.....	46
2.1.1 Диско-диффузионный метод.....	48
2.1.2 Определение минимальной рост-ингибирующей концентрации.....	49
2.1.3 Исследование морфологии бактерий <i>E. coli</i>	50
2.1.4 Способность к образованию биоплёнок	51
2.2 Синергизм и антагонизм изотопов магния и антибиотиков	52
2.2.1 Исследование антимикробной активности в присутствии изотопов магния диско-диффузионным методом	52
2.2.2 Совместное влияние антибиотиков и изотопов магния на рост бактерий <i>E. coli</i>	57
2.2.2.1 Аминогликозиды	57
2.2.2.2 Представитель ансамицинов - рифампицин.....	62
2.2.2.3 Представители линкозамидов и карбапенемов.....	64
2.2.2.4 Представитель пенициллинов - амоксициллин.....	68
2.2.2.5 Хинолоны/ фторхинолоны	70
2.2.2.6 Цефалоспорины	74
2.2.3 Изменения морфологии бактериальных клеток как результат влияния антибиотиков и изотопов магния	77
2.2.3.1 Аминогликозиды	80
2.2.3.2 Ансамицины.....	86
2.2.3.3 Линкозамиды	88

2.2.3.4 Пенициллины.....	91
2.2.3.5 Цефалоспорины.....	92
2.2.3.6 Фторхинолоны.....	94
2.2.3.7 Основные особенности морфологии бактерий <i>E. coli</i> : МИЭ магния.....	96
2.3 Образование биоплёнок.....	100
2.4 Заключение.....	102
Глава 3 Совместное влияние постоянного магнитного поля и изотопа магния ²⁵Mg на бактерии <i>E. coli</i>.....	103
Введение.....	103
3.1 Магнитно-полевые эффекты в бактериях <i>E. coli</i> (обзор литературы).....	105
3.2 Материалы и методы.....	107
3.2.1 Условия культивирования.....	107
3.2.2 Установка.....	108
3.2.3 Образование биоплёнок.....	110
3.3 Влияние постоянного магнитного поля на рост бактерий <i>E. coli</i>	111
3.4 Совместное влияние постоянных магнитных полей и изотопов магния на рост бактерий <i>E. coli</i>	115
3.5 Влияние внешнего магнитного поля на внутриклеточный элементный состав бактерий <i>E. coli</i> , культивируемых в присутствии изотопов магния.....	122
3.6 Влияние магнитных взаимодействий на образование биоплёнок бактериями <i>E. coli</i> , обогащенных изотопами магния.....	126
3.7 Заключение.....	129
Глава 4 Совместное влияние изотопов цинка и постоянных магнитных полей на бактерии <i>E. coli</i>.....	131
Введение.....	131
4.1 Ферментативные реакции с участием ионов цинка (обзор литературы).....	132
4.2 Материалы и методы.....	137
4.3 Влияние изотопов цинка на рост бактерий <i>E. coli</i>	140
4.4 Влияние внешних постоянных магнитных полей и магнитных изотопов цинка на основные функциональные свойства микроорганизмов.....	144

4.5 Изменение внутриклеточного содержания бактерий <i>E. coli</i> в зависимости от внешних постоянных магнитных полей и изотопов цинка	149
4.6 Заключение	155
Глава 5 Магнитно-зависимый пул АТФ в бактериях <i>E. coli</i>	157
Введение.....	157
5. 1 Ион-радикальный механизм синтеза АТФ (обзор литературы).....	160
5.2 Материалы и методы: биолюминесцентный метод измерения АТФ в бактериях.....	165
5.3 Магнитно-полевые эффекты в содержании АТФ в бактериях <i>Escherichia coli</i> .	168
5.4 Совместное влияние магнитного поля и магнитного изотопа магния ²⁵ Mg на содержание АТФ в бактериях <i>E. coli</i>	170
5.5 Магнитно-полевые и магнитно-изотопные эффекты цинка в пуле АТФ бактерий <i>E. coli</i>	173
5.6 Заключение	175
Глава 6 Физические механизмы магнитно-изотопных и магнитно-полевых эффектов в живых организмах.....	177
Введение.....	177
6.1 Существующие механизмы влияния постоянных магнитных полей на живые организмы (лит. обзор)	178
6.2 Модель ферментативной магниточувствительности	184
6.3 Заключение	207
Заключение.....	208
Основные результаты и выводы	210
Список использованных источников.....	212
Список публикаций автора в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах Web of Science, Scopus, RSCI, РИНЦ.....	231
Тезисы международных и всероссийских конференций	234
Благодарности.....	239

АДФ – аденозиндифосфорная кислота

АСМ – атомно-силовая микроскопия

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИРП – ион-радикальная пара

КОЕ – колониобразующая единица

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

МИЭ – магнитно-изотопный эффект

МРТ – магнитно-резонансная томография

РНК - рибонуклеиновая кислота

мРНК - матричная рибонуклеиновая кислота

тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота

РП – радикальная пара

СТВ – сверхтонкое взаимодействие

ПМП – постоянные магнитные поля

ICR – ионно-циклотронный резонанс

PBPs – пенициллин-связывающие белки

Введение

Актуальность

Эффекты, вызываемые стабильными изотопами, могут быть обусловлены как различиями атомной массы, так и магнитными характеристиками ядра. Различия масс являются причиной фракционирования изотопов в биологии (масс-зависимые изотопные эффекты): живые организмы по-разному потребляют и используют лёгкие и тяжёлые изотопы одного и того же химического элемента. Физико-химические причины такого фракционирования связаны с различиями в скоростях реакций или диффузии лёгких и тяжелых изотопов, а также - в константах равновесия [1]. Тип биологических эффектов, обусловленных различиями магнитных характеристик ядер изотопов, получил название магнитно-изотопных эффектов (МИЭ) и был обнаружен в ферментативном фосфорилировании *in vitro* в начале 21-ого столетия [2-19]. МИЭ представляют наибольший интерес, так как их величина превосходит эффекты фракционирования изотопов в несколько раз. Причина этого кроется в особенности магнитных изотопов, например, ^{25}Mg , ^{31}P , ^{67}Zn , - ядра этих элементов имеют ненулевой спин и магнитный момент, способный влиять на спиновое состояние реагентов химической реакции в активном сайте фермента, что приводит к изменению констант скоростей элементарных актов ферментативных реакций [5,7-13]. Особенность такого влияния и наблюдаемых МИЭ строго обусловлена двумя фундаментальными законами природы – сохранением углового момента и его проекции в химических реакциях и квантово-механическим принципом Паули [8]. Разрешены только такие реакции, в которых сохраняется полный спин, то есть спин реагентов совпадает со спином продуктов. Изменить спиновое состояние и, соответственно, снять запрет могут магнитные взаимодействия, например, магнитные моменты ядер изотопов. Магнитные энергии по порядку величины значительно меньше тепловых энергий, но они

способны переключать каналы реакции со спин-запрещенных на спин-разрешенные, индуцируя синглет-триплетный переход (и наоборот).

Обнаруженные МИЭ в синтезе АТФ и ДНК [2-16] заложили основу для появления нового научного направления – магнитной изотопии и спиновой биохимии. Однако актуальным оставались вопросы: будет ли магнитно-изотопное влияние отражаться на организмах в процессе роста и способны ли они различать тип изотопа – магнитный или немагнитный. Кроме того, накопленный экспериментальный материал [2-16] свидетельствовал о специфической роли магнитных стабильных изотопов во внутриклеточных процессах, требующей теоретического обоснования.

Так возникли актуальные фундаментальные научные проблемы, решаемые в диссертационной работе:

- способность живых организмов «чувствовать» наличие ядерного магнитного момента у изотопов химических элементов;
- существование связи между магнитно-изотопными эффектами и магнитной чувствительностью живых организмов.

Степень разработанности темы

Впервые различное влияние магнитных и немагнитных изотопов было продемонстрировано в опытах с выделенными фосфорилирующими ферментами и изолированными митохондриями [2-4]. Наличие магнитного изотопа магния ^{25}Mg в активном сайте фермента увеличивало выход АТФ по сравнению с немагнитными изотопами $^{24,26}\text{Mg}$. Магний имеет три стабильных изотопа ^{24}Mg , ^{25}Mg и ^{26}Mg (природное содержание 78.60%, 10.11%, 11.29%, соответственно), из которых только ^{25}Mg имеет магнитный момент атомного ядра (спин $I=5/2$). Впоследствии вышел цикл работ о МИЭ магния ^{25}Mg , кальция ^{43}Ca и ^{67}Zn цинка в синтезе АТФ и ДНК [9-14]. При этом участие магнитного изотопа стимулирует синтез АТФ и ингибирует синтез ДНК. Различий в скорости синтеза для немагнитных изотопов не наблюдалось. В биофизике это мощное и универсальное средство для уничтожения раковых клеток путем подавления

ферментативного синтеза ДНК в этих клетках с помощью магнитных ядер ионов Mg, Ca и Zn, а также средство для стимуляции синтеза АТФ в изолированных ферментативных реакциях [20-25].

Для объяснения МИЭ в синтезе АТФ и ДНК был предложен ион-радикальный механизм ферментативных реакций [5, 7, 8, 13]. Согласно нему промежуточной стадией некоторых ферментативных реакций является образование ион-радикальной пары (ИРП). Как правило, такая радикальная пара находится в синглетном состоянии, то есть суммарный спин участников реакции равен нулю $S=0$. Внешнее магнитное поле и/или ядерные спины магнитных изотопов способны, взаимодействуя с неспаренными электронными спинами, индуцировать переход ИРП в триплетное состояние, когда суммарный спин $S=1$. Триплетное состояние отличается от синглетного допустимыми каналами реакции. А именно, регенерация исходных реагентов в триплетном состоянии невозможна из-за строгих спиновых запретов, что, в итоге, приводит к увеличению скорости реакции синтеза продукта. Повлиять на ход ферментативной реакции, идущей с образованием ИРП, можно с помощью магнитного изотопа, находящегося в активном сайте фермента, или с помощью внешнего магнитного поля. Были проведены квантово-химические расчёты, описывающие роль магнитного изотопа магния ^{25}Mg в ферментативном синтезе АТФ [10, 19].

Воздействие внешнего магнитного поля, и ядерных спинов магнитных изотопов способно влиять на физиологическое состояние клеток, органов и живых организмов посредством изменения скорости и выхода продуктов ферментативных реакций. Здесь появляется важная задача, требующая решения, – получение экспериментальных доказательств совместного влияния внешних магнитных полей и магнитных изотопов химических элементов на живые организмы, на модели *in vivo*. Притом немаловажно обнаружить не только магнитно-полевые и магнитно-изотопные эффекты *in vivo*, но и найти связующее звено между теорией и экспериментом, обосновать возникновение физиологического отклика организма на магнитное воздействие (магнитные

моменты ядер изотопов и внешние магнитные поля). Диссертационные исследования направлены на решение этих задач.

Цель диссертационного исследования - поиск эффектов стабильных магнитных изотопов в живых организмах и их физико-химическое обоснование на примере бактерий *E. coli*.

Для достижения этой цели были поставлены и решены следующие задачи:

1) Получение экспериментальных зависимостей роста, метаболизма и основных физиологических свойств (образование биоплёнок, резистентность к антибиотикам) бактерий *E. coli* от наличия ядерного магнитного момента у ядра изотопа магния.

2) Получение экспериментальных данных влияния изотопов магния и цинка и постоянных магнитных полей на рост бактерий *E. coli*.

3) Получение магнитно-полевых зависимостей внутриклеточной концентрации АТФ в бактериях *E. coli*, выращенных в присутствии изотопов магния и цинка.

4) Поиск модели магниточувствительности живых организмов, учитывающей влияния и внутренних (создаваемых магнитными ядрами изотопов), и внешних магнитных полей.

Объект и предмет исследования

Объект исследования – бактерии *E. coli*, их физиологические свойства, показатели роста и развития; а также внутриклеточные ферментативные процессы. Предмет исследования – магнитные эффекты изотопов магния и цинка и внешних постоянных магнитных полей.

Методология и методы исследований

В рамках данной работы были использованы следующие экспериментальные методы и подходы: стандартные методы культивирования

бактерий и определения показателей роста и развития (турбидиметрический метод построения ростовых кривых и кривых отмирания, метод измерения колониеобразующих единиц с применением серийных разведений, спектрофотометрический метод определения образования биоплёнок по степени связывания красителя кристаллического фиолетового, диско-диффузионный метод определения антимикробной активности); люминесцентный метод измерения удельного пула АТФ в клетках с помощью реакции, катализируемой люциферин-люциферазой; метод атомно-силовой микроскопии в контактном режиме для исследования морфологии бактерий; масс-спектральные и атомно-эмиссионные методы определения элементного и изотопного состава; стандартные статистические методы обработки экспериментальных результатов. Для культивирования бактерий в присутствии изотопов магния и цинка была разработана питательная среда на основе синтетической среды М9, позволяющая добиваться высокого внутриклеточного обогащения [1-2]¹. Магнитно-полевая установка для исследования роста бактерий была разработана и собрана специально для проведения экспериментов данной диссертационной работы и является оригинальной. Она позволяет получать зависимости в диапазоне постоянных магнитных полей 0,8–100 мТл в процессе роста бактерий.

Теоретические расчёты спиновых состояний партнёров ферментативных реакции и констант скоростей ферментативных процессов были проведены с применением квантово-механического формализма спиновых матриц плотности (с использованием квазистационарного приближения).

Научная новизна

1) Впервые обнаружены МИЭ магния ²⁵Mg *in vivo* на примере бактерий *E. coli*. Показано, что микробы способны чувствовать наличие магнитного момента у ядра изотопа магния ²⁵Mg: их культивирование на питательной среде, обогащенной магнитным магнием, повышает жизнеспособность бактериальной культуры, скорость роста, изменяет внутриклеточный элементный состав и

¹ Здесь и далее красным цветом обозначены публикации автора

основные физиологические свойства (резистентность к антибиотикам и способность образовывать биоплёнки).

2) Впервые выполнены исследования совместных эффектов постоянного магнитного поля и магнитных изотопов химических элементов в бактериях *E. coli* на оригинальной экспериментальной установке. Аналогов собранной установки по исследованию влиянию магнитных полей на бактерии *E. coli* не было найдено в научных работах. Она позволяет не только одновременно исследовать несколько экспериментальных групп (магнитный и немагнитные изотопы, контроль), но и получать достоверную магнитно-полевою зависимость в широком диапазоне полей. Полученные экспериментальные магнитно-полевые зависимости являются оригинальными.

3) Показано *in vivo*, что усиление МИЭ возможно с помощью внешних магнитных полей. Так, увеличение колониеобразующей способности клеток *E. coli* до 4-х раз было обнаружено при культивировании в присутствии магнитного изотопа магния ^{25}Mg и в постоянных магнитных полях 76–85 мТл. При культивировании в присутствии изотопов магния такой совместный эффект был зарегистрирован для магнитного цинка ^{67}Zn в другом диапазоне полей 25–35 мТл.

4) Впервые получены данные о зависимости концентраций химических элементов в бактериях *E. coli* от постоянных магнитных полей и изотопов магния и цинка. Магний- или цинк-изотопное обогащение бактерий включает ионный синергизм: внутриклеточная концентрация ионов P, Ca, K, Na, связанных с метаболизмом магния или цинка, изменяется.

5) Впервые обнаружены МИЭ магния в резистентности бактерий к антибиотикам групп аминогликозидов, линкозамидов, хинолонов/фторхинолонов и ансамицинов. Усиление чувствительности бактерий, обогащенных магнитным магнием ^{25}Mg , можно использовать для потенцирования антимикробных препаратов этих групп.

6) Впервые показано, что пул АТФ в бактериях *E. coli* зависит от содержания магнитных изотопов в питательной среде и действия внешних постоянных магнитных полей.

7) Впервые получена магнитно-полевая зависимость формирования биоплёнок клетками *E. coli*, культивируемых на средах с изотопами магния.

Теоретическая значимость работы определяется:

предложенной моделью ферментативной магниточувствительности живых организмов, основанной на ион-радикальном механизме ферментативных реакций и объясняющей биологическую восприимчивость к магнитным моментам ядер изотопов химических элементов и к внешним слабым магнитным полям. В соответствии с моделью, специфическая роль магнитного изотопа во внутриклеточных процессах связана с изменением вероятностей ферментативных реакций за счёт взаимодействия ядерного спина магния с неспаренными электронными спинами ближнего молекулярного окружения и с внешним магнитным полем.

Практическая значимость работы

Обнаруженные в диссертационной работе магнитно-полевые и магнитно-изотопные эффекты магния и цинка в бактериях *E. coli* открывают возможности применения стабильных изотопов для влияния на ростовые и физиологические показатели клеток. Разработанные уникальные методы внутриклеточного изотопного обогащения бактерий могут быть использованы для проведения аналогичных исследований других стабильных изотопов, а также для получения биополимеров с высокой степенью естественного изотопного обогащения.

Проведенные в работе исследования и полученные результаты вносят существенный вклад в развитие нового научного направления – биологической магнитной изотопии.

Положения, выносимые на защиту

- 1) Бактерии *E. coli* способны «чувствовать» наличие магнитного момента у ядра изотопа, что подтверждается стимулированием роста, колониеобразующей способности в присутствии изотопа магния ^{25}Mg .
- 2) Концентрация АТФ в бактериях *E. coli* зависит от действия внешних постоянных магнитных полей и магнитных изотопов магния и цинка.
- 3) Внутриклеточное обогащение бактерий определенным изотопом магния влияет не только на жизнеспособность микроорганизмов, но и на их внутриклеточный элементный состав, резистентность к антибиотикам и способность образовывать биоплёнки.
- 4) Слабые постоянные магнитные поля 0,8-10 мТл повышают жизнеспособность бактериальной культуры.
- 5) Модель ион-радикальных ферментативных реакций с участием магнитных ядер изотопов химических элементов способна объяснить магнитную чувствительность живых организмов к внешним постоянным слабым магнитным полям и магнитным изотопам.

Степень достоверности

Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается использованием проверенных и стандартных методов исследования и теоретических подходов, а также обеспечивается их публикацией в рецензируемых журналах. Все эксперименты проводились в нескольких независимых повторах; использовались необходимые контроли, а также метод «двойного слепого» эксперимента. Анализ данных проводился с применением адекватных методов статистической обработки. Магнитно-изотопные и магнитно-полевые эффекты считались статически значимы при $p < 0,05$ ($n \geq 6$).

Личный вклад автора

Основные результаты, изложенные в диссертации, получены автором лично или при его непосредственном участии. Идеи экспериментальных работ и

методологии исследований принадлежат преимущественно автору диссертации. Модель ферментативной магниточувствительности живых организмов, описанная в шестой главе, была разработана автором совместно с д. ф.-м. н. Бердинским В.Л.

Часть результатов, изложенных в первой и шестой главах, вошли в кандидатскую диссертацию У.Г. Летуты «Магнитно-изотопные эффекты магния в клетках *E. coli*» под руководством В.Л. Бердинского (защищена в 2013 г. в диссертационном совете Д.212.243.05).

Внедрение результатов работы

По результатам работы получены 2 патента РФ на изобретения «Способ изотопного обогащения клеток *E. coli*» и «Способ повышения продуктивности микроорганизмов *E. coli*», которые использовались в работе и могут быть взяты за основу для проведения аналогичных исследований магнитных изотопов химических элементов.

На основе результатов, описанных в диссертационной работе, были выполнены исследования по грантам РФФИ (гранты № 09-03-09432, 10-04-96083, 11-03-09581, 16-33-60021); Министерства образования и науки РФ (государственное задание № FSGU-2020-0003); Совета по грантам Президента РФ (СП-225.2019.4); Правительства Оренбургской области (соглашение № 25 от 30.06.2015, стипендии в 2014, 2019 гг); в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (ГК № 02.740.11.0703, П207, 14.740.11.1193). За выполнение научных исследований, описанных в диссертации, автор был дважды отмечен премией губернатора Оренбургской области в области науки и техники за 2011, 2018 гг..

Публикации

Всего опубликовано 23 статьи. По теме диссертации опубликовано всего 21 статьи, из них 19 в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах Web of Science, Scopus, RSCI.

Апробация работы

Результаты работы представлены на 21 международной и всероссийской конференции (35 тезисов, 11 устных докладов).

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения и списка литературы. Отдельно приводится список публикаций автора. Работа изложена на 239 страницах, включает 107 рисунков и 9 таблиц. Библиография включает 224 источника.

Глава 1 Магнитно-изотопные эффекты магния в росте и метаболизме бактерий *E. coli*

Введение

Химические элементы присутствуют в природе в нескольких формах – изотопах. Изотопы одного и того же элемента отличаются количеством нейтронов и, соответственно, массой ядра. В зависимости от способности подвергаться радиоактивному распаду различают радиоактивные и стабильные изотопы. Длительное время только радиоактивные изотопы наиболее активно использовались в биофизических экспериментах благодаря легкости их детектирования. В настоящее время с развитием высокочувствительных методов предпочтение отдаётся стабильным изотопам ввиду отсутствия ионизирующих излучений и их безопасности для биологических объектов. При этом критерием выбора того или иного изотопа, как правило, остаётся масса ядра. Однако ядра стабильных изотопов отличаются ещё и магнитными характеристиками. Некоторые стабильные изотопы, например, ^1H , ^{13}C , ^{31}P , имеют ядерный магнитный момент и спин, и называются магнитными. Именно магнитные свойства ядер изотопов являются причиной разнообразных магнитно-изотопных эффектов (МИЭ) в химических реакциях [29-31].

В биохимических реакциях первыми были открыты МИЭ магния в ферментативном фосфорилировании *in vitro* [2-4]. В экспериментальном исследовании использовались выделенные митохондрии и фосфорилирующие ферменты, обогащенные изотопами магния. «Скорость синтеза АТФ повышалась в 2-4 раза, если фермент работал на магнитном изотопе магния ^{25}Mg . Среди трёх стабильных изотопов магния ^{24}Mg , ^{25}Mg , ^{26}Mg (природное содержание, соответственно, 78.7, 10.1 и 11.2%) только ядро ^{25}Mg имеет спин $I=5/2$ и является магнитным, остальные два изотопа – немагнитны. Для объяснения действия магнитного момента ядра изотопа ^{25}Mg на скорость синтеза АТФ был предложен ион-радикальный механизм ферментативной реакции» [5,7].

Благодаря описанным открытиям появилась новая научная проблема влияния магнитных моментов атомных ядер на внутриклеточные процессы и, как следствие, на функционирование целого организма. Поиск экспериментальных доказательств влияния магнитного изотопа магния на живые организмы на примере микроорганизмов – основная цель экспериментальных исследований, описанных в данной главе. Подобные эксперименты вносят существенный вклад в развитие нового научного направления – магнитной изотопии в биофизике и биологии и медицине. Работы, описанные в первой главе диссертации, направлены на решение ряда ключевых задач: отражается ли присутствие изотопов магния в питательной среде на ростовых характеристиках микроорганизмов; связаны ли наблюдаемые эффекты с изотопным обогащением самих клеток и влияет ли внутриклеточное изотопное обогащение на жизнеспособность бактериальной культуры.

1.1 МИЭ магния, цинка, кальция в ферментативном синтезе (обзор литературы)

Биологические эффекты, вызываемые стабильными изотопами, могут быть обусловлены как различиями атомной массы, так и магнитными характеристиками ядра. Различия масс являются причиной фракционирования изотопов в биологии (масс-зависимые изотопные эффекты): живые организмы по-разному потребляют и используют лёгкие и тяжёлые изотопы одного и того же химического элемента. «Физико-химические причины такого фракционирования связаны с различиями в скоростях реакций или диффузии лёгких и тяжелых изотопов, а также - в константах равновесия» [1].

Эффекты фракционирования стабильных изотопов исследуются уже не одно десятилетие. Наиболее интересные масс-зависимые изотопные эффекты обнаружены для ядер водорода $^1\text{H}/^2\text{H}$ [32]. Высокие концентрации дейтерия подавляют рост и деление клеток [33-34]. Изотопное обогащение дейтерием увеличивает жесткость белков [35], влияет на экспрессию генов [36] и на физико-

химические характеристики биологических мембран [37-39]. Дейтерированная ДНК оказывается более стабильна и устойчива к внешним воздействиям [40]. Обнаружено, что большинство прокариот и некоторые низшие эукариоты (водоросли, дрожжи, грибы) могут расти в 99,8 ат. % D₂O. При этом снижается скорость роста по сравнению с культивированием в H₂O [33, 38, 41-43]. Обогащение изотопами в процессе роста позволяет получать изотопно-меченые молекулярные соединения естественным способом, что активно применяется для исследования метаболических путей микроорганизмов [44-46]. Эти связанные с метаболизмом изотопные эффекты, как правило, небольшие, и только в некоторых случаях достигают 50%. Такие изменения могут быть зарегистрированы для конкретной жирной кислоты одного микробного штамма, что значительно превышает другие формы изменчивости микроорганизмов. Стабильный изотоп углерода ¹³C также широко применяется для анализа метаболизма [47], как и метод мечения стабильными изотопами серы [48-50].

Тип биологических эффектов, обусловленных различиями магнитных характеристик ядер изотопов, получил название магнитно-изотопных [8]. МИЭ представляют наибольший интерес, так как их величина превосходит эффекты «классического» фракционирования изотопов в несколько раз. Это обусловлено наличием ненулевого ядерного спина и магнитного момента у магнитных изотопов химических элементов, например, таких, как ²⁵Mg, ³¹P, ⁶⁷Zn. Такие ядра способны влиять на квантово-химическое состояние ближайшего молекулярного окружения и изменять константы скоростей ферментативных реакций.

МИЭ свидетельствует о фракционировании изотопов в биологических процессах по принципу магнитный/немагнитный. Управляет этим процессом мощное и уникальное средство – ядерно-магнитный катализ. Магнитный катализ индуцируется тремя факторами: постоянными магнитными полями; переменными электромагнитными полями; магнитными полями, создаваемыми ядрами стабильных магнитных изотопов. Следует отметить, что простого присутствия магнитных частиц в молекулярных процессах недостаточно для появления и регистрации магнитных эффектов. Спиновая ориентация одного радикала не

может обеспечить ни магнитных, ни электромагнитных эффектов. Они проявляют себя только в многоспиновых системах, когда, по крайней мере, два спина связаны в паре. Такая радикальная (или ион-радикальная) пара может существовать в двух спиновых состояниях: синглетном (полный спин $I=0$) или триплетном (спин $I=1$). Эти состояния химически идентичны, но различны по реакционной способности [51-54]. Синглетные пары более реакционноспособны. В триплетных же парах радикалов или ион-радикалов не может происходить ни рекомбинация, ни перенос электронов между партнерами в силу строгих спиновых запретов [55]. Синглет-триплетную эволюцию пары способны индуцировать магнитные взаимодействия, устраняя спиновые запреты и контролируя, как следствие, реакционные пути.

Возрастание эффективности ферментативного синтеза АТФ креатинкиназой, глицерофосфаткиназой, пируваткиназой и АТФ-синтазой в присутствии магнитных изотопов магния ^{24}Mg , кальция ^{40}Ca и цинка ^{64}Zn свидетельствует об ион-радикальном механизме этой реакции [2-4,9,11]. Киназы, содержащие ионы $^{25}\text{Mg}^{2+}$, $^{43}\text{Ca}^{2+}$ и $^{67}\text{Zn}^{2+}$ были почти в два раза эффективнее, чем киназы, содержащие ионы $^{24}\text{Mg}^{2+}$, $^{40}\text{Ca}^{2+}$ и $^{64}\text{Zn}^{2+}$ [5,10,12]. Экспериментальные графики приведены на рисунках 1.1-1.2. Подробный физико-химический механизм ферментативного синтеза АТФ будет рассмотрен в [пятой главе](#), а модель спин-зависимых ферментативных реакций – в [шестой главе](#). Ядерно-индуцированный магнитный катализ (или МИЭ) был обнаружен также в изолированных митохондриях и в живых организмах (крысы, кролики) [3, 9].

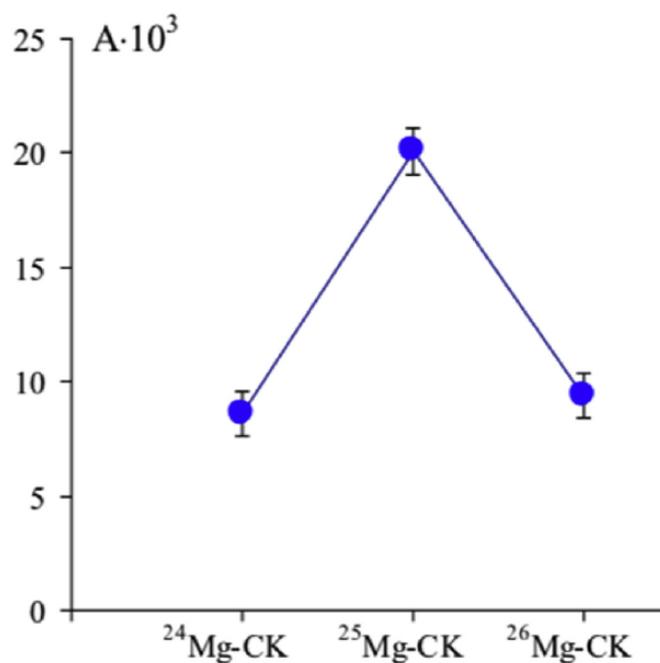


Рисунок 1.1 – Скорость синтеза АТФ креатинкиназой как функция изотопии магния [3]. Скорость А дана как радиоактивность ^{32}P -АТФ, измеренная как число сцинтилляций/мин/мг общего количества белка (чистого фермента); концентрация MgCl_2 составляет 15 мМ

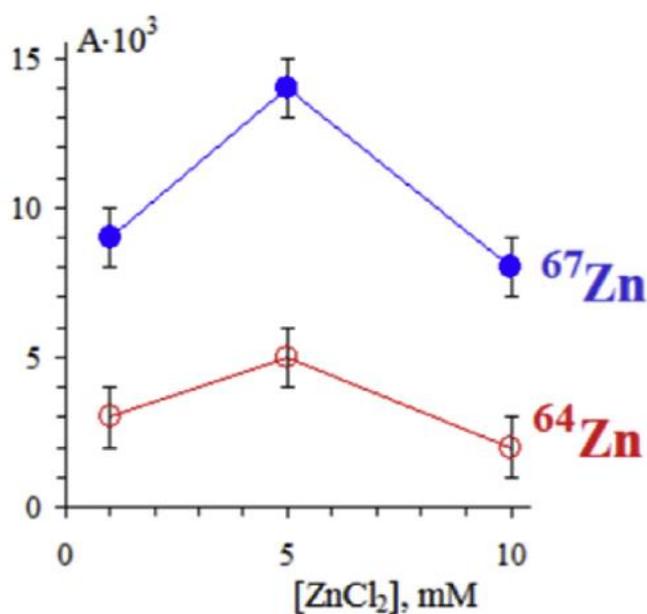


Рисунок 1.2 – Скорость синтеза АТФ креатинкиназой в митохондриях в зависимости от концентрации изотопов цинка: $^{64}\text{ZnCl}_2$ и $^{67}\text{ZnCl}_2$ [9]

Другой жизненно важный ферментативный процесс, зависящий от участия магнитных изотопов химических элементов – это синтез ДНК. Было показано, что ионы $^{25}\text{Mg}^{2+}$, $^{43}\text{Ca}^{2+}$ и $^{67}\text{Zn}^{2+}$ с магнитными ядрами подавляют синтез ДНК в 3-5 раз по сравнению с немагнитными ядрами [13-14]. В качестве иллюстрации на рисунке 1.3 приведена экспериментальная зависимость синтеза ДНК β -полимеразой. Эти результаты однозначно свидетельствуют о том, что синтез ДНК происходит по ион-радикальному механизму, который подразумевает парную генерацию радикалов путем переноса электронов между партнерами реакции. Как и в случае синтеза АТФ, этот механизм включается, когда в каталитический сайт входят как минимум два иона, но в случае ДНК, образующийся радикал разлагается и препятствует добавлению нуклеотида к растущей цепи ДНК и подавляет синтез ДНК [14]. Зависимость синтеза ДНК от магнитного поля [14] убедительно доказывает ион-радикальный механизм, проявляющийся в полимеразной цепной реакции. Этот механизм сосуществует с нуклеофильным почти наравне; их конкуренция контролируется концентрацией ионов. Он индуцируется обоими видами ионов, магнитными и немагнитными; единственная разница заключается в том, что он функционирует в 3–5 раз эффективнее с магнитными ионами. Нет сомнения, что тот же механизм действует и в других полимеразах, осуществляющих репликацию ДНК и транскрипцию РНК, поскольку синтез ДНК и РНК химически абсолютно идентичны. Это означает, что ионы с магнитными ядрами подавляют синтез ДНК, мРНК и тРНК, контролируя репликацию, транскрипцию и трансляцию.

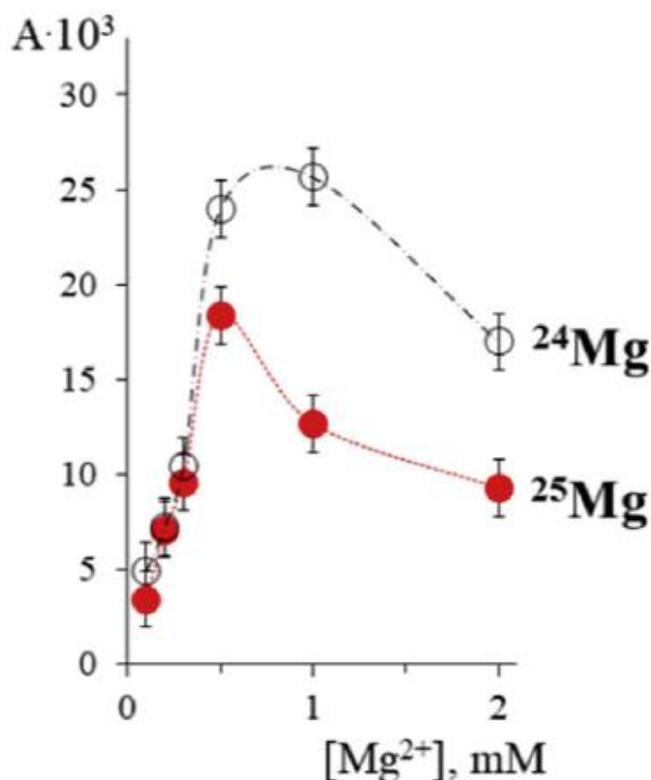


Рисунок 1.3 – Скорость синтеза ДНК β -полимеразой в зависимости от концентрации ионов магния ^{24}Mg , ^{25}Mg [13]

Таким образом, два ключевых ферментативных процесса в живых организмах – синтез АТФ и ДНК являются магнитно-чувствительными и зависят от присутствия магнитных ядер в активных сайтах ферментов. Логичным является вопрос, как будет реагировать живой организм на обогащение магнитным изотопом. Проявится ли на организменном уровне различная эффективность ферментов в присутствии магнитных и немагнитных изотопов, или суммарный физиологический отклик будет незначительным? Для ответа на эти вопросы были проведены эксперименты *in vivo*. В качестве объекта исследований были выбраны бактерии *E. coli* – широко распространенный и хорошо изученный микроорганизм.

1.2 Материалы и методы

Экспериментальные данные на графиках представлены в виде среднего значения $\bar{X} \pm SD$ (стандартная ошибка). Использовался критерий Стьюдента для определения статистической достоверности. Различия между средними значениями считались статистически достоверны при $p < 0,05$ ($n \geq 5$). Статистическая обработка и графическое представление экспериментальных данных проводилось с помощью программного обеспечения Origin 8.0 (версия 8.0; Microcal Software).

1.2.1 Условия культивирования и питательная среда

Объектом исследования служила культура клеток *E. coli*, бесплазмидный музейный штамм K12TG1 (из коллекции Института клеточного и межклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия). В качестве химического элемента, имеющего стабильные магнитный и немагнитные изотопы, выбран магний. Характеристика изотопов и информация об их природном содержании приведена в таблице 1.1 [56, 10]

Таблица 1.1 – Характеристики изотопов магния

Изотоп	Спин	Магнитный момент (μ_B)	Природное содержание, %
^{24}Mg	0	0	79
^{25}Mg	5/2	0,85	10
^{26}Mg	0	0	11

В качестве питательной среды использовалась искусственно приготовленная среда M9, позволяющая замещать сульфат магния на изотопный аналог. Изотопы магния добавляли в среду в виде сульфатов магния $^{24}\text{MgSO}_4$,

$^{25}\text{MgSO}_4$ или $^{26}\text{MgSO}_4$. Концентрация сульфата подбиралась экспериментально в диапазоне 0,5-12 мМ. Бактерии демонстрировали оптимальные показатели роста при концентрации 2,2 мМ. Сульфаты изотопов магния готовились из оксидов ^{24}MgO , ^{25}MgO и ^{26}MgO (ФГУП "Электрохимприбор", г. Лесной, Россия) с высоким изотопным обогащением: 99,8, 98,8 и 97,7 ат. % соответственно. Информация о примесях оксидов изотопов магния и изотопном составе представлена в таблице 1.2 [56, 10]

Состав минимальной питательной среды М9: 37,4 мМ NH_4Cl , 2,2 мМ $^{24,25,26}\text{MgSO}_4$, 55,5 мМ глюкозы, 84,5 мМ Na_2HPO_4 , 44,1 мМ KH_2PO_4 , 17,1 мМ NaCl (Реахим, Москва, Россия) [56, 10]. В качестве контроля использовалась среда с природным содержанием изотопов магния. В одном из экспериментов такая смесь была приготовлена искусственно из растворов сульфатов изотопов магния в их природном соотношении (таблица 1.1). При приготовления синтетической питательной среды М9 строго контролировался уровень. Он был одинаковым для всех сред во всех опытных сериях и составлял $\text{pH}=(6,85\pm 0,15)$.

Музейный штамм *E. coli* предварительно инкубировали в бульоне LB (Sigma-Aldrich) в течение 7 ч при 37 °С. Плотность посевной культуры контролировали фотометрически с помощью спектрофлуориметра SOLAR (CM2203, SOLAR Technical Service, Минск, Беларусь) (длина волны 620 нм, поглощение $0,61\pm 0,01$ отн. ед.). Это соответствует 10^8 бактериальных клеток на мл посевной культуры. Затем бактерии *E. coli* высевали в среду М9, содержащую изотопы магния. В каждую лунку 96-луночной планшеты (Aprexlab, Москва, Россия) добавляли по 200 мкл среды с клетками *E. coli*. Бактерии культивировали в термостате (ТС-1/80 СПУ, Смоленск, Россия) при 37 °С на шейкере ST-3 ELMi (ELMi, Рига, Латвия) при 200 об/мин в течение 10 часов [56, 3, 10].

Таблица 1.2 - Содержание изотопов магния и химических веществ в оксидах магния ^{24}MgO , ^{25}MgO и ^{26}MgO согласно паспорту [56, 10]

Изотоп магния	Изотопное содержание, ат. %		
	^{24}MgO	^{25}MgO	^{26}MgO
^{24}Mg	99,88±0,02	99,37±0,08	97,70±0,20
^{25}Mg	0,07	0,33	1,98
^{26}Mg	0,05	0,30	0,20
Содержание химического элемента, вес. %			
Химический элемент	^{24}MgO	^{25}MgO	^{26}MgO
К	< 0,005	< ПО	0,017
Na	0,002	< ПО	0,004
Ca	< 0,005	0,008	0,34
Fe	< 0,005	0,019	0,048
Al	0,0011	0,0008	0,031
Si	< ПО	< ПО	< ПО
Cr	< ПО*	< ПО	0,0030
Ni	0,0001	0,0001	0,0001
Cu	0,0029	0,0021	0,0004
Mn	0,0032	0,0021	0,059
Pb	< ПО	< ПО	0,0015
Lu	< ПО	< ПО	0,0003
Pt	< ПО	0,0031	0,0002
B	< ПО	0,008	0,0026
Ti	< ПО	< ПО	0,0015
Co	< ПО	< ПО	0,0011
Sr	< ПО	< ПО	0,0002
Ba	< ПО	0,0003	0,0002
La	< ПО	< ПО	0,0003
Eu	< ПО	< ПО	0,0002
Zn	0,0006	0,0005	0,0009
Ru	< ПО	0,0001	< ПО
Cd	< ПО	0,0001	< ПО
P	< 0,005	< ПО	< ПО

* ПО – порог определения

1.2.2 Элементно-изотопный анализ питательных сред и клеточной биомассы

Элементный и изотопный анализ растворов и проб биомассы проведен в Аналитическом сертификационном испытательном центре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем технологии микроэлектроники и особочистых материалов РАН (АСИЦ ИПТМ РАН) под руководством кандидата химических наук Карандашева В. К.

«Все исходные среды М9 были исследованы методом масс-спектрометрии (ICP-MS X-7, Thermo Elemental, Thermo Fisher Scientific MA) и атомной эмиссии (ICAP-61, Thermo Jarrell Ash, Thermo Fisher Scientific MA) на содержание более 70 химических элементов для определения примесного содержания: Li, Be, B, Na, Mg, Al, Si, P, S, K, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Br, Rb, Sr, Y, Zr, Mo, Nb, Ru, Rh, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Te, Cs, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Th и U» [56]. Отдельно проводился магний-изотопный анализ питательных сред и бактериальной биомассы после цикла культивирования. Бактериальная биомасса после культивирования на изотопных средах многократно отмывалась центрифугированием от остатков питательной среды и отправлялась на элементно-изотопный анализ [3, 4].

Среднее содержание основных и примесных элементов в питательных средах М9 по результатам элементного анализа приведено на рисунке 1.4.

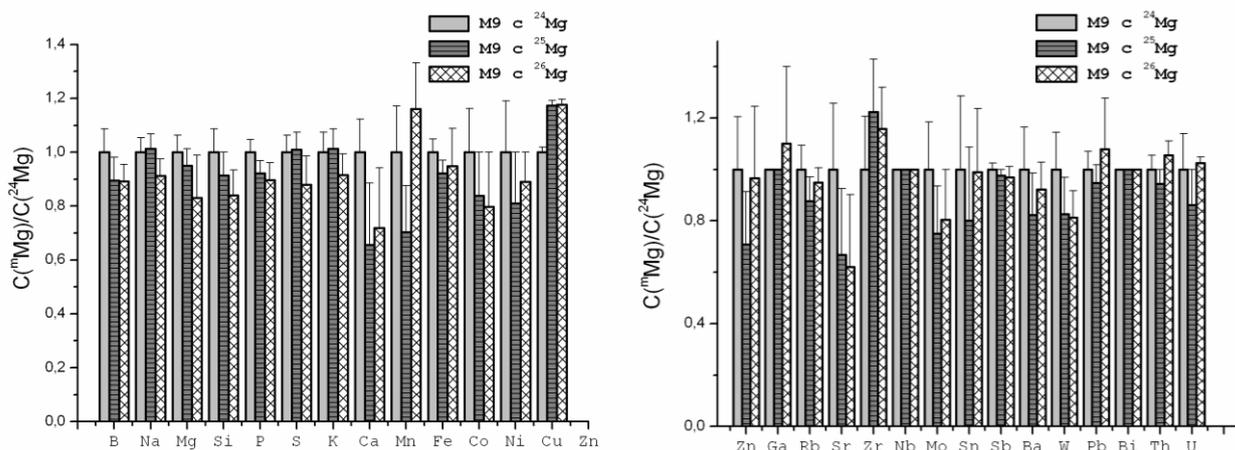


Рисунок 1.4 – Относительное содержание элементов питательных сред М9; $C(^m\text{Mg})/C(^{24}\text{Mg})$ – концентрация элементов в средах М9, где m – обозначает атомную массу изотопа (24, 25 или 26), добавляемого в соответствующую питательную среду. $C(^{24}\text{Mg})$ – концентрация элементов в питательной среде М9, содержащей изотоп магния ^{24}Mg . В качестве погрешности приведена стандартная ошибка, $n=10$ [56]

Приведенные диаграммы демонстрируют, что отсутствуют достоверные различия в содержании основных и примесных элементов в питательных средах М9, в том числе парамагнитных ионов железа и марганца. Следовательно, различия в росте бактерий при росте на питательных средах М9 обусловлены влиянием магнитного или немагнитных изотопов магния. Это единственный переменный параметр (тип изотопа магния) в эксперименте.

1.2.3 Кинетика роста бактерий

«Ростовые кривые (зависимости оптической плотности суспензий от времени культивирования) получали турбидиметрическим методом с помощью измерения оптической плотности суспензий каждый час на иммуноферментном анализаторе АИФР-01 УНИПЛАН (Пикон, Россия) на длинах волн 450, 492 и 620 нм и на спектрофлуориметре SOLAR 2203 (в разных экспериментальных сериях)» [56, 3, 10]. Экспериментальные кривые роста бактерий не отличались качественно

на длинах волн 450, 492 и 620 нм, поэтому в диссертации представлены данные только для 450 или 492 нм [56, 3, 10].

Кривые роста обрабатывались с использованием двух наиболее распространенных методов аппроксимации, принятых в биологии и микробиологии для определения скорости роста. Часть кинетической кривой роста, описывающая логарифмический рост, аппроксимировалась с помощью следующей формулы [57]

$$D_{492}=D(0)\exp(\mu t) \quad (1.1)$$

где $D(0)$ —начальная оптическая плотность, μ -константа скорости роста (в ч^{-1}), также известная как репродуктивный потенциал бактериальной культуры.

Линейная часть кривых, соответствующая фазе активного клеточного деления, аппроксимировалась формулой [58]

$$D_{492}=D(0) + \mu t. \quad (1.2)$$

На рисунке 1.5 в качестве примера приведена кинетика роста для контрольных образцов – бактерий *E. coli*, культивируемых на среде М9 с природным магнием.

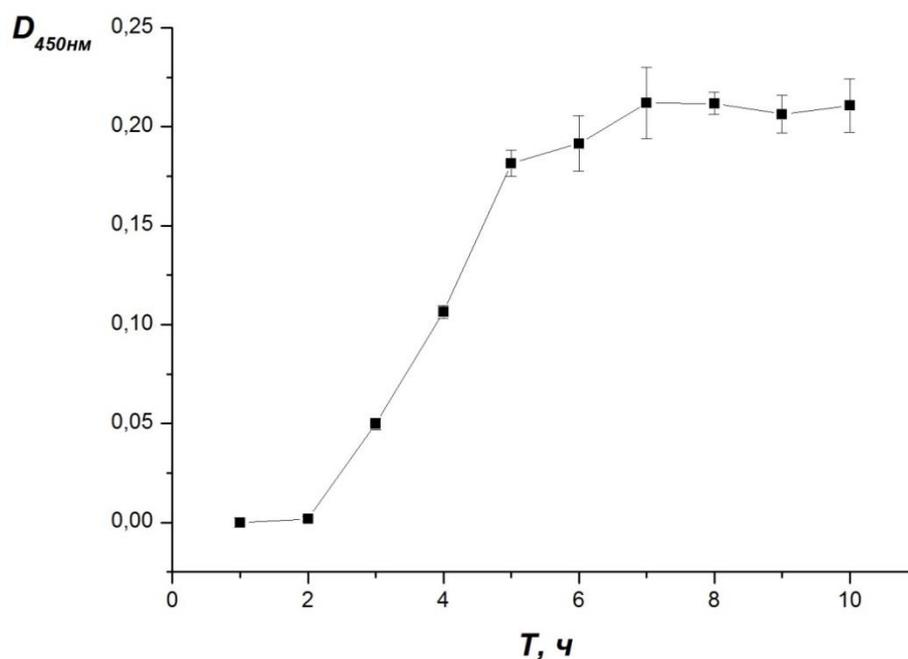


Рисунок 1.5 – Ростовая кривая бактерий *E. coli*, культивируемых на среде М9 с природным магнием. Контроль роста. В качестве погрешности приведена стандартная ошибка, $n=5$

Следует выделить три ключевых фазы роста бактериальной культуры:

1) адаптационная или лаг-фаза, длится с 0-го по 2-й час (рисунок 1.5). Рост бактерий отсутствует, так как происходит адаптация клеточной культуры к новым условиям; перестраивается метаболизм клетки. Для описания этой фазы при аппроксимации определялась продолжительность фазы в ч;

2) фаза экспоненциального роста, длится со 2-го по 5-й час. В течение этого периода происходит активный рост (деление клеток), быстро накапливаются биомасса и продукты разных реакций. Лучше всего этот участок ростовой кривой аппроксимируется экспоненциальной функцией и характеризуются константой скорости роста μ ;

3) стационарная фаза начинается с 5-6-ого часа (рисунок 1.5). На данном этапе роста количество новых клеток приблизительно равно количеству погибающих клеток. Один из параметров, характеризующий стационарную фазу роста – это средняя оптическая плотность, которая отражает количество

накопленной клетками биомассы. Но более информативным параметром является количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл питательной среды.

1.2.4 Определение КОЕ

В качестве основного показателя роста на стационарной фазе была выбрана колониеобразующая способность бактерий, измеренная после 7 ч инкубации клеток. Для подсчёта КОЕ использовался метод последовательных разведений в физиологическом растворе (0,85 % NaCl) [59-60]. Равные количества клеток *E. coli*, выращенных на среде М9 с магнитным и немагнитными изотопами магния, разведенными в соответствующих концентрациях, высевали на твердую питательную среду LB в чашки Петри. Подсчёт КОЕ проводили после 16 ч инкубации при 37 °С.

Некоторые эксперименты были проведены по двойной слепой процедуре с целью получения достоверных результатов. «Двойной слепой» означает, что ни исследователь, готовивший питательные среды с изотопами магния, ни исследователь, проводивший измерения с образцами бактерий, не знает, какие образцы относятся к группе с магнитным изотопом магния ^{25}Mg , а какие – к группе с немагнитным изотопом $^{24,26}\text{Mg}$ и природным магнием. Двойной слепой контроль необходим для подтверждения достоверности эффектов, а также для исключения человеческого фактора.

После 20 часов культивирования в магний-изотопных средах М9 клетки *E. coli* были пересеяны (в эквивалентных количествах) на аналогичную среду М9, но не содержащую искусственно добавляемого магния, т.е. концентрация ионов магния Mg^{2+} составляла 0 моль/л (состав среды NH_4Cl – 2 г, глюкоза – 10 г, Na_2HPO_4 – 12 г, KH_2PO_4 – 6 г, NaCl – 1 г). Колониеобразующая способность измерялась через 24, 48, 72 часа после начала культивирования. Данный эксперимент уникален, так как на его результаты не могут повлиять различия в содержании примесных элементов в М9: среда, в которой растёт культура, одинакова для всех клеток. На показатели КОЕ и жизнедеятельность культуры

повлияет только степень внутреннего обогащения клеток *E. coli* соответствующим изотопом магния, которой они достигли во время культивирования на изотопных средах. Такой эксперимент проводился для определения эффективности изотопов магния как внутриклеточных элементов» [56].

1.3 Влияние изотопов магния на внутриклеточный элементный состав бактерий *E.coli*

После культивирования на изотопных средах бактериальные клетки исследовались на содержание изотопов магния для оценки степени внутриклеточного обогащения. Результаты такого исследования приведены в таблице 1.3. Оказалось, что бактерии были обогащены от 88,4 до 99,5 % тем изотопом магния, который содержался в питательной среде. Следовательно, внутриклеточные системы микроорганизмов, например, ферменты, также будут обогащены конкретным изотопом магния – магнитным или немагнитным.

Таблица 1.3 – Соотношение изотопов магния (%) в клетках *E. coli* после цикла культивирования на изотопных средах М9* ($n=5$) [56, 3]

Изотоп	исходная культура	Клетки, выращенные на среде М9 с ^{24}Mg	Клетки, выращенные на среде М9 с ^{25}Mg	Клетки, выращенные на среде М9 с ^{26}Mg
^{24}Mg	87,80±1,10	99,50±1,03	6,60±1,02	10,00±0,91
^{25}Mg	5,90±0,59	0,23±0,11	92,50±1,41	1,60±0,53
^{26}Mg	6,30±0,61	0,23±0,09	0,87±0,10	88,40±2,03

Бактериальная биомасса после культивирования на минимальных питательных средах М9 с изотопами магния исследовалась на содержание

химических элементов: Li, Be, B, Na, Mg, Al, Si, P, S, K, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Br, Rb, Sr, Y, Zr, Mo, Nb, Ru, Rh, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Te, Cs, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Th и U. На рисунках 1.6-1.8 представлены экспериментальные зависимости относительного внутриклеточного содержания химических элементов от изотопов магния в среде роста. Каждая точка представляет собой отношение внутриклеточной концентрации определенного химического элемента в бактериях *Escherichia coli*, выращенных на средах с изотопами магния, к концентрации этого же элемента, но при росте на среде LB (исходная культура).

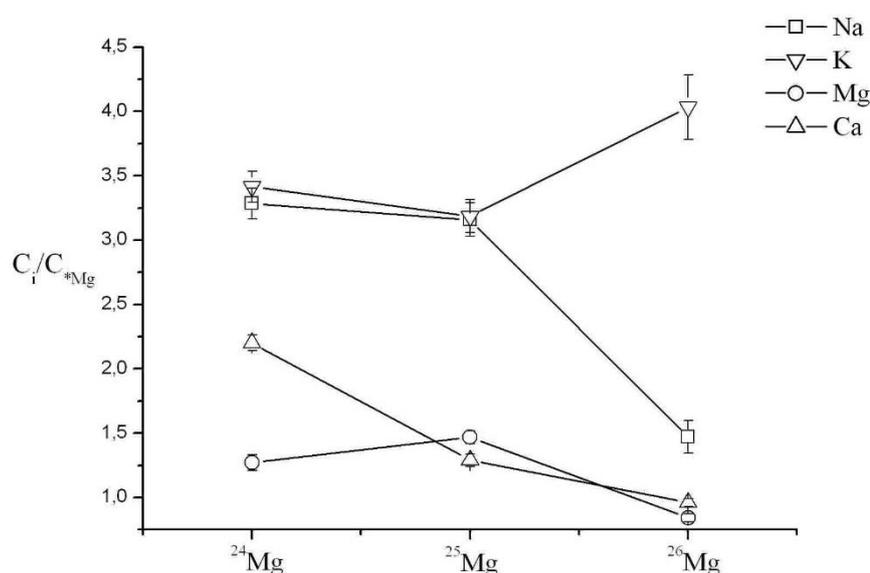


Рисунок 1.6 – Относительное содержание макроэлементов Na, K, Mg, Ca в клетках *E. coli*, после цикла культивирования на средах M9 с изотопами магния. C_i – содержание элемента в клетках, выращенных на среде с i -м изотопом (^{24}Mg , ^{25}Mg , ^{26}Mg); $C_{*\text{Mg}}$ – содержание элемента в исходной клеточной культуре, выращенной на питательной среде с природным Mg. В качестве погрешности приведена стандартная ошибка, $n=5$ [56, 3]

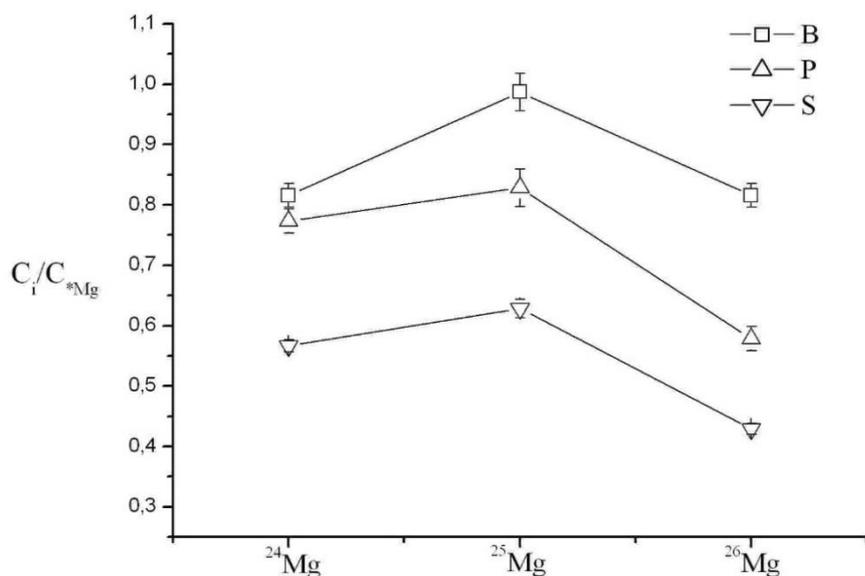


Рисунок 1.7 – Относительное содержание макроэлементов B, P, S в клетках *E. coli*, после цикла культивирования на средах M9 с изотопами магния. C_i – содержание элемента в клетках, выращенных на среде с i -м изотопом (^{24}Mg , ^{25}Mg , ^{26}Mg); $C_{*\text{Mg}}$ – в исходной клеточной культуре, выращенной на питательной среде с природным Mg. В качестве погрешности приведена стандартная ошибка, $n=5$ [56, 3]

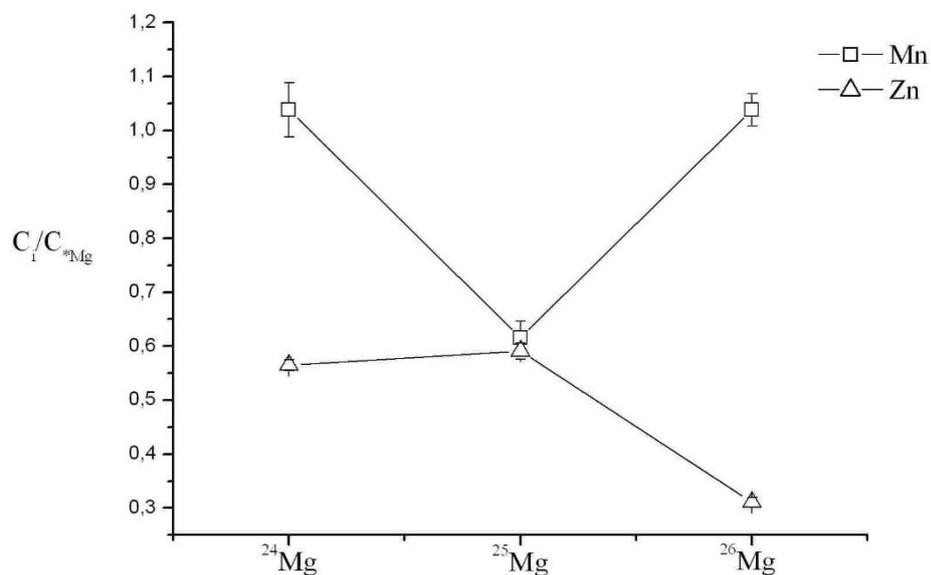


Рисунок 1.8 – Относительное содержание макроэлементов Mn, Zn в клетках *E. coli*, после цикла культивирования на средах M9 с изотопами магния. C_i – содержание элемента в клетках, выращенных на среде с i -м изотопом (^{24}Mg , ^{25}Mg , ^{26}Mg); $C_{*\text{Mg}}$ – в исходной клеточной культуре, выращенной на питательной среде с природным Mg. В качестве погрешности приведена стандартная ошибка, $n=5$ [56, 3]

Обнаруженные зависимости внутриклеточного содержания Mn, Zn В, Р, S, Na, К, Mg, Са весьма интересны. В литературе отсутствуют какие-либо данные об ионном синергизме в связи с фракционированием изотопов по магнитному признаку. Поэтому сложно делать выводы о механизмах влияния изотопов магния на элементный состав бактерий. «Очевидно, что роль магнитных изотопов в клетках не сводится к ускорению отдельных ферментативных процессов» [56]. Обогащение бактерий магнитным изотопом магния влияет на метаболизм, что влечёт за собой удаление одних химических элементов и накопление других..

1.4 МИЭ магния в росте *E. coli*

В результате проведения серий из 10 идентичных экспериментов, четыре из которых были двойными слепыми (в каждой серии выполнялось не менее трех повторов для каждого изотопа), были получены кривые роста клеток *E. coli*, отражающие различное влияние изотопов магния (магнитного и немагнитного) на рост микроорганизмов ($n=30$). Кинетики роста бактерий, полученные в одном из «двойных слепых» экспериментов представлены на рисунке 1.9. Рост бактерий на минимальных средах с изотопами магния характеризовался тремя типичными фазами роста бактериальной культуры, которые были описаны в [пункте 1.2.3](#): лаг-фаза, экспоненциальная и стационарная фазы роста.

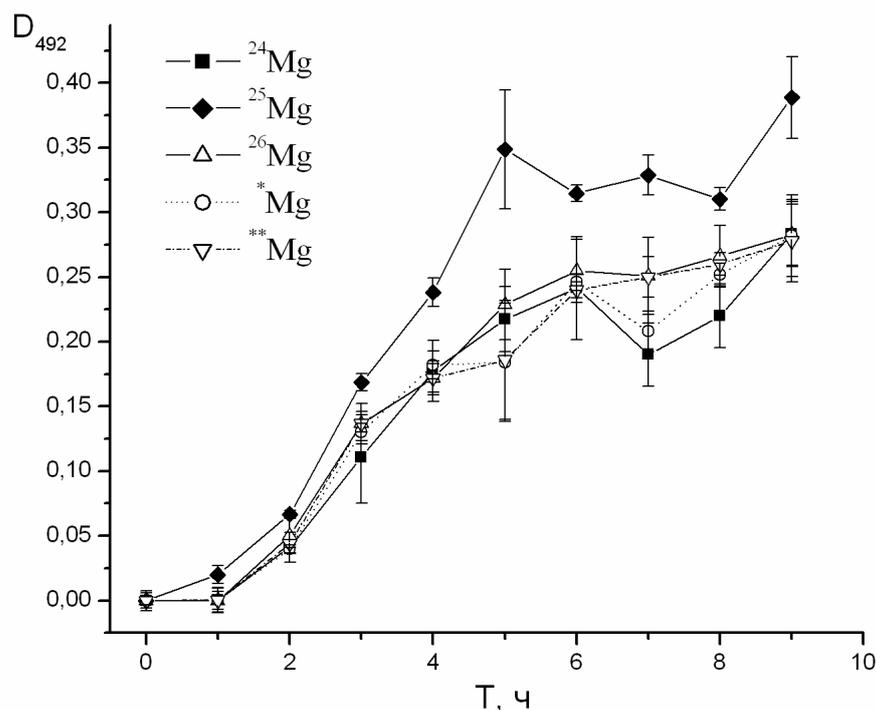


Рисунок 1.9 – Ростовые кривые клеток *E. coli*, выращенных на питательных средах М9 с изотопами магния. ^{24}Mg , ^{25}Mg и ^{26}Mg – питательная среда М9 с соответствующим изотопом магния; *Mg – с природным магнием; **Mg – с магнием, полученным искусственно из смеси изотопов в их природном соотношении. Регистрация оптической плотности производилась на длине волны 492 нм. Каждая точка на графике представляет собой среднее значение ($n=6$) \pm стандартная ошибка [3, 10, 56]

Адаптационная фаза роста бактерий *E. coli* на среде с немагнитными изотопами $^{24,26}\text{Mg}$ продолжалась не менее 1 ч. Оптическая плотность для экспериментальной группы бактерий, выращенной на изотопной среде с магнитным магнием ^{25}Mg , удвоилась в течение первого часа, что свидетельствует об увеличении числа бактериальных клеток. Другими словами, микроорганизмы, растущие на среде с магнитным магнием, быстрее адаптируются к новым условиям и переходят в фазу активного деления ранее других бактерий, растущих на среде немагнитными изотопами $^{24,26}\text{Mg}$ и природным магнием. Изотоп магния ^{25}Mg , имеющий ядерный спин, оказывается более эффективен на начальной стадии роста бактериальных культур. Относительные значения

продолжительности адаптационной фазы роста как функция изотопии магния, полученные при аппроксимации ростовых кривых, приведены на рисунке 1.10 [3, 10, 56]

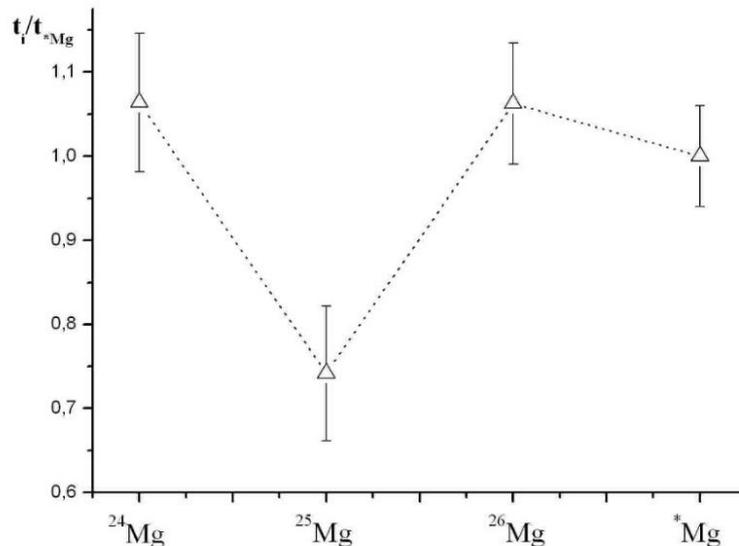


Рисунок 1.10 – Относительные значения продолжительности адаптационной фазы роста как функция изотопии магния. T_i – продолжительность адаптационной фазы для клеток, выращенных на среде с i -м изотопом (^{24}Mg , ^{25}Mg , ^{26}Mg , *Mg); $t_{*,Mg}$ – для клеток, выращенных на среде с природным магнием *Mg. В качестве погрешности приведена стандартная ошибка, $n=6$ [3, 10, 56]

После аппроксимации кривых роста (рисунок 1.9) были найдены константы скорости роста микробных клеток, инкубируемых на питательных средах с магнитным и немагнитными изотопами магния. На рисунке 1.11 приведены полученные значения констант скоростей роста. Независимо от способа аппроксимации логарифмической фазы константы скорости роста бактерий *Escherichia coli*, культивируемых на среде с магнитным изотопом магния ^{25}Mg , выше (на 10-15%), чем у микроорганизмов, инкубируемых с немагнитными изотопами магния ^{24}Mg , ^{26}Mg или природным магнием *Mg. Качественно экспериментальные зависимости совпадают с данными о влиянии магнитного изотопа Mg на скорость ферментативного фосфорилирования [2-3, 8] (рисунок

1.1). Этот факт говорит о том, что скорость деления клеток увеличивалась в том числе из-за эффективной работы АТФ-синтезирующих ферментов. «Во время фазы адаптации и начала логарифмической фазы роста скорость синтеза АТФ играет ключевую роль, так как макроэргические молекулы АТФ вовлечены в большинство процессов, связанных с ростом и делением клеток. Результирующий МИЭ магния определяется, в том числе, скоростью накопления достаточного количества молекул АТФ, необходимых для активной жизнедеятельности бактерий» [56].

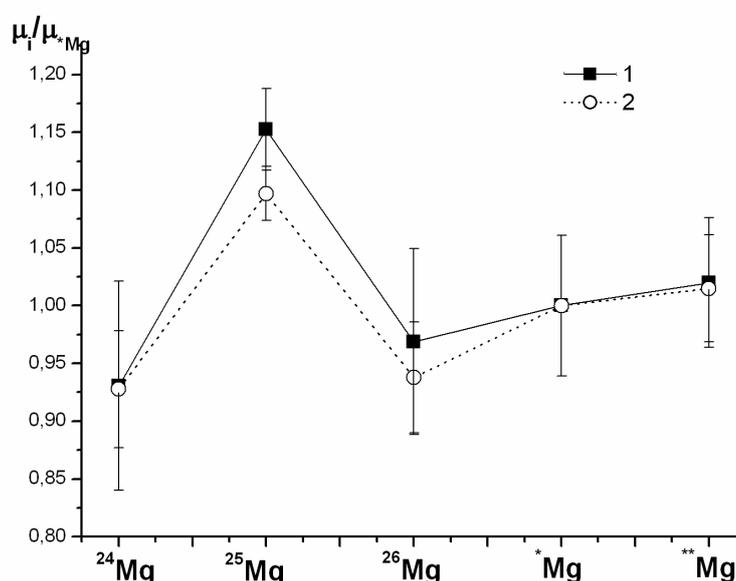


Рисунок 1.11 – Относительные значения констант скорости роста для клеток *E. coli* как функция изотопии магния. μ_i – константа скорости роста для клеток, выращенных на среде с *i*-м изотопом (²⁴Mg, ²⁵Mg, ²⁶Mg, *Mg или **Mg); μ_{*Mg} – для клеток, выращенных на среде с природным магнием *Mg. Константы найдены с помощью различных способов аппроксимации ростовых кривых: 1 – экспоненциальная; 2 – линейная. В качестве погрешности приведена стандартная ошибка, $n=6$ [3, 10, 56]

1.5 Влияние магнитного изотопа на колониеобразующую способность и скорость отмирания бактерий *E. coli*

Для характеристики роста бактериальной культуры на стационарной фазе, как правило, используют другой важный показатель - это колониеобразующая способность, бактерий выражаемая в единицах КОЕ. Результаты измерения КОЕ бактерий, выращенных на питательных средах М9 с изотопами магния, приведены на рисунке 1.12. Количество КОЕ бактерий, инкубируемых с магнитным изотопом магния ^{25}Mg , было выше в 1,5-2 раза по сравнению с клетками, растущими на питательной среде с немагнитными изотопами магния $^{24,26}\text{Mg}$. Обнаруженный МИЭ в количестве КОЕ также свидетельствует о положительном влиянии изотопа магния ^{25}Mg , имеющего ядерный спин, на рост культуры *E. coli*.

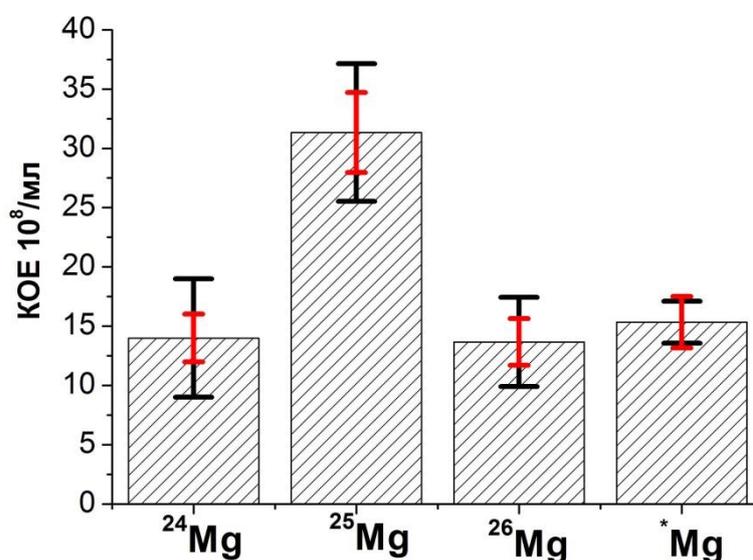


Рисунок 1.12 – КОЕ клеток *E. coli* на стационарной фазе роста, выращенных на питательных средах М9 с изотопами магния ^{24}Mg , ^{25}Mg , ^{26}Mg и природным магнием *Mg. В качестве погрешности приведена стандартная ошибка для данной экспериментальной серии (чёрные черты, $n=6$) и

доверительный интервал (красные черты, $n=30$) для 10 экспериментальных серий ($p<0,05$) [3, 10, 56]

Следует отметить, что практически во всех экспериментах не наблюдалось существенных различий между эффектами немагнитных изотопов ^{24}Mg и ^{26}Mg (рисунок 1.10–1.12), что доказывает магнитную природу наблюдаемых эффектов. Микроорганизмы способны фракционировать изотопы по магнитному (наличию ядерного магнитного момента) признаку [3].

Вплоть до третьего дня культивирования на средах с изотопами магния количество КОЕ бактерий, обогащенных ^{25}Mg , превышает количество КОЕ для клеток, обогащенных немагнитными изотопами (рисунок 1.13). Однако, константа скорости отмирания бактериальной культуры, культивируемой на питательной среде с магнитным изотопом магния ^{25}Mg , оказывается выше по сравнению с немагнитными изотопами $^{24,26}\text{Mg}$ (рисунок 1.14). Ускоренный метаболизм бактерий, обогащенных магнитным изотопом магния, приводит и к более раннему отмиранию культуры» [56, 3, 10]. Важно отметить, что при переходе бактерий в стационарную фазу в бактериях *E. coli* образуются нанокристаллические структуры ДНК с ДНК-ассоциированными белками [61-62]. Образование таких структур обусловлено стрессовыми условиями и голоданием клеток, и, может, в том числе, быть причиной повышенной резистентности бактерий к внешним физико-химическим взаимодействиям. При этом, неясно, способен ли магнитный момент изотопа магния ^{25}Mg , эффекты которого были обнаружены, повлиять на формирование таких структур. Вероятнее всего, формирование структур ДНК с ДНК-ассоциированными белками происходит для всех исследуемых групп.

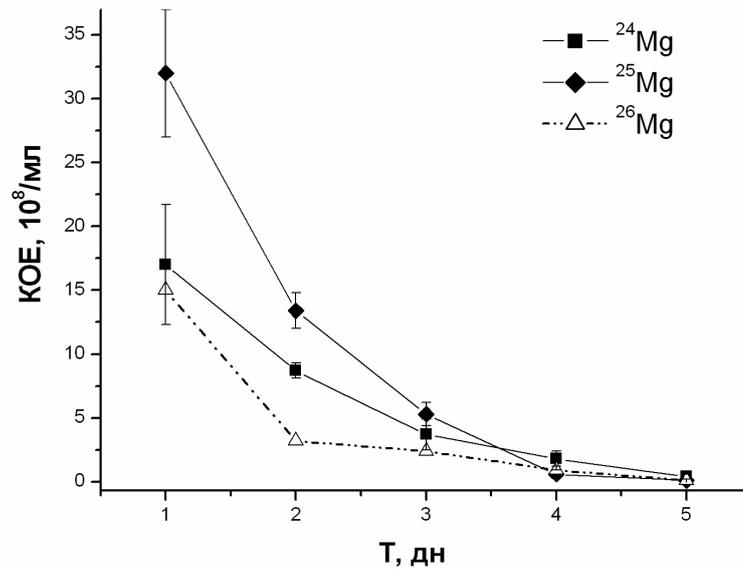


Рисунок 1.13 – КОЕ клеток *E. coli* на начальной фазе отмирания, выращенных на питательных средах М9 с изотопами магния ^{24}Mg , ^{25}Mg , ^{26}Mg . В качестве погрешности приведена стандартная ошибка, $n=6$ [3, 10, 56]

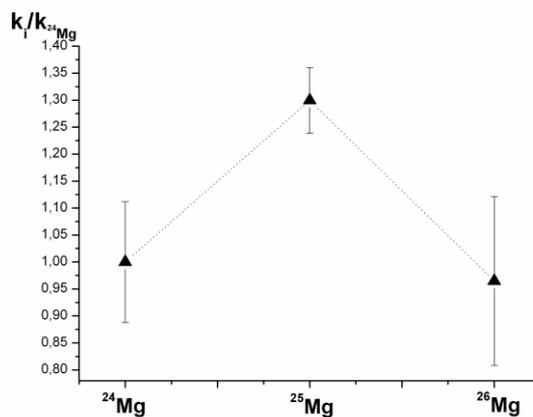


Рисунок 1.14 – Относительные значения констант скоростей отмирания клеток *E. coli*, как функция изотопии магния. k_i – константа скорости отмирания для клеток, выращенных на среде с i -м изотопом (^{24}Mg , ^{25}Mg или ^{26}Mg); $k_{^{24}\text{Mg}}$ – константа скорости отмирания для клеток, выращенных на среде с изотопом магния ^{24}Mg . Константа скорости отмирания *E. coli* находилась как показатель убывающей экспоненциальной функции. В качестве погрешности приведена стандартная ошибка, $n=6$ [3, 10, 56]

1.6 Влияние внутриклеточного обогащения изотопами магния на рост клеток *E. coli*

Культивирование бактерий *E. coli* на питательных средах M9 с изотопами магния приводит к высокому внутриклеточному замещению природного магния на конкретный изотоп (см. таблицу 1.3) [3]. В связи с этим было интересно проверить, насколько каждый из изотопов эффективен в качестве внутриклеточного элемента. Для этого бактерии *E. coli*, после культивирования на изотопных средах и обогащенные конкретным изотопом магния (магнитным или немагнитным) были пересеяны на безмагниевою среду (с нулевой концентрацией ионов магния).

Измерение колониеобразующей способности при проведении такого эксперимента показало, что бактерии, обогащенные магнитным изотопом магния ^{25}Mg , формировали большее количество жизнеспособных колоний по сравнению с немагнитными изотопами магния $^{24,26}\text{Mg}$ в течение трёх дней (рисунок 1.15)» [3]. Так как бактерии обогащаются изотопом магния, содержащимся в питательной среде, до 80% и более (таблица 1.3), то почти все внутриклеточные системы, в том числе ферментативные, будут содержать именно тот изотоп магния, который был в среде. Другими словами все внутриклеточные процессы в клетках, обогащенных магнитным изотопом магния ^{25}Mg , будут использовать именно его с вероятностью 90 % и более. Увеличение колониеобразующей способности бактерий, содержащих ^{25}Mg , свидетельствует о более эффективной работе ферментативных систем, использующих магний, в таких клетках. Таким образом, «бактериальная культура, выращенная на магнитном изотопе магния, впоследствии оказывается более жизнеспособной по сравнению с немагнитными изотопами магния $^{24,26}\text{Mg}$ » [56,3].

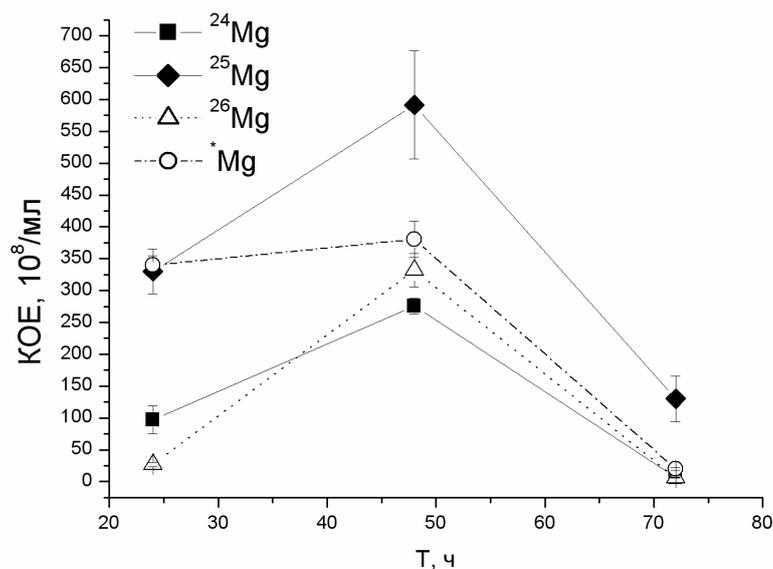


Рисунок 1.15 – КОЕ клеток *E. coli*, обогащенных изотопами магния ^{24}Mg , ^{25}Mg , ^{26}Mg природным магнием *Mg которые культивировались на питательной среде М9 с концентрацией ионов магния 0 ммоль/л ($n=5$)

1.7 Заключение

Впервые обнаружены МИЭ магния в росте бактерий *E. coli*:

- константа скорости роста бактериальных клеток *E. coli*, культивируемых на питательной среде с магнитным изотопом магния ^{25}Mg оказывается выше на 10–15 % по сравнению с клетками, культивируемых на средах с немагнитными изотопами магния ^{24}Mg и ^{26}Mg ;

- количество КОЕ на стационарной фазе роста микроорганизмов было в 1,5–2 раза выше в случае, когда в питательной среде содержался именно магнитный изотоп магния ^{25}Mg ;

- увеличение константы скорости роста и жизнеспособности бактериальной культуры во время экспоненциальной и стационарной фазы роста приводит к более быстрому отмиранию таких клеток по сравнению с клетками, культивируемых на средах с немагнитными изотопами магния;

- магнитный изотоп магния ^{25}Mg является более эффективным внутриклеточным элементом по сравнению с немагнитными изотопами ^{24}Mg и ^{26}Mg .

Полученные данные достоверны и уникальны, поскольку исключено возможное биологическое влияние различий в содержании примесных элементов среды на экспериментальные результаты. Внутриклеточную эффективность доказывают данные элементного и изотопного анализа.

Обнаруженные МИЭ магния *in vivo* свидетельствует о влиянии магнитных моментов ядер изотопа ^{25}Mg на жизнедеятельность целого организма через последовательность внутриклеточных процессов. Микробы способны чувствовать наличие магнитного момента у ядра изотопа магния ^{25}Mg , то есть обладают удивительным и уникальным свойством – магнитной чувствительностью, для которой не требуется наличие специальных органелл или внутриклеточных включений наподобие магнетита.

Полученные в первой главе результаты отражены в работах [2, 3, 19]; на их основе были получены два патента на «Способ изотопного обогащения клеток *E. coli*» [1] и «Способ повышения продуктивности микроорганизмов *E. coli*» [2].

Глава 2 Влияние изотопов магния на резистентность к антибиотикам и образование биоплёнок

Введение

МИЭ магния ^{25}Mg , кальция ^{43}Ca , цинка ^{67}Zn в ферментативных реакциях синтеза АТФ и ДНК *in vitro* [2-16] изменили сложившееся представление о фракционировании изотопов в биологических процессах. Наличие ядерного магнитного момента у изотопа способно влиять на скорость ферментативной реакции. Биологические МИЭ *in vitro* свидетельствуют о спин-селективности ферментативных систем. Их открытие стимулировало исследования медицинских применений магнитных изотопов на уровне живых организмов. Синтезированы лекарственные препараты, доставляющие магнитные изотопы к органам, обнаружены положительные эффекты [24-28]. Активно ведутся работы по применению обнаруженных магнитно-изотопных эффектов и в других областях генетики и медицины [20-25].

Описанные в [первой главе](#) МИЭ магния в росте и метаболизме бактерий *E. coli* показали, что биологическое значение магнитных изотопов гораздо шире. Чувствительность к наличию ядерного магнитного момента у изотопа магния ^{25}Mg проявляется на организменном уровне: бактерии фракционируют изотопы магния по магнитному признаку. Витальность микроорганизмов повышается в присутствии магнитного изотопа магния ^{25}Mg [2, 3]. Закономерно возникновение вопроса: зависят ли важнейшие физиологические свойства микробов, такие как резистентность к антибиотикам и образование биоплёнок, от наличия ядерного магнитного момента у изотопа магния? Исследования данной главы призваны ответить на этот вопрос. Фундаментальное значение таких работ ещё и в конкретизации клеточных подсистем, чувствительным к действию ядерных магнитных моментов изотопов. Совместные эффекты антимикробного препарата и магнитного изотопа могут быть зарегистрированы только для тех антибиотиков, которые действуют на магнитно-чувствительную мишень.

2.1 Материалы и методы

Резистентность к антибиотикам бактерий *E. coli* в присутствии изотопов магния определялась с помощью диско-диффузионного метода ([см. пункт 2.1.1](#)). Следующим этапом было проведено исследование совместного влияния антибиотиков и изотопов магния на кинетику роста ([см. пункт 2.1.2](#)). Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) для таких исследований подбиралась методом серийных разведений. Для оценки степени совместного влияния изотопов магния и антибиотиков различных групп регистрировались изменения в морфологии бактерий *E. coli* с помощью атомно-силовой микроскопии ([см. пункт 2.1.3](#)). Метод оценки способности бактерий к образованию биоплёнок описан в [пункте 2.1.4](#). Во всех экспериментах использовался бесплазмидный музейный штамм K12TG1 (из коллекции Института клеточного и межклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия). В таблице 2.1 приведены все тестируемые антибактериальные препараты.

Таблица 2.1 – Антибиотики, используемые в исследованиях

Группа антибиотиков	Название антибиотика	Механизм действия
Аминогликозиды	Амикацин ^{1,2,3}	ингибируют синтез белка, связываясь с А-участком 16S р-РНК 30S-рибосомы [63]
	Канамицин ^{2,3}	
	Тобрамицин ^{1,2,3}	
Ансамицины	Рифампицин ^{2,3}	специфически ингибируют ДНК-зависимую РНК-полимеразу, то есть предотвращают транскрипцию видов РНК из матрицы ДНК [64]
Карбапенемы	Имипенем ¹	ингибируют синтез клеточной стенки путем связывания с белком РВРs, вызывая дефект клеточной стенки и лизис [65]
	Меропенем ^{1,2}	

Продолжение таблицы 2.1

Группа антибиотиков	Название антибиотика	Механизм действия
Линкозамиды	Линкомицин ^{1,2,3}	специфически блокируют синтез белка; связывают 23S субъединицу 50S рибосомы [66]
	Клиндамицин ¹	
Пенициллины	Амоксицилин ^{1,2}	ингибируют транспептидазу, которая катализирует заключительный этап биосинтеза клеточной стенки – сшивку пептидогликана [67]
	Ампициллин ³	
Тетрациклины	Тетрациклин ¹	связываются с 30S-субъединицей рибосомы, предотвращая прикрепление аминоацил-тРНК к РНК-рибосомному комплексу, что препятствует синтезу белков [68]
Хинолоны/ фторхинолоны	Налидиксовая кислота ¹	связываются с комплексами топоизомеразы IV и ДНК-гираза, ингибируя репликацию ДНК [69]
	Левифлоксацин ^{2,3}	
	Ципрофлоксацин ^{1, 2,3}	
Цефалоспорины	Цефазолин ^{1,2}	нарушают синтез пептидогликанового слоя [70]
	Цефтриаксон ^{1,2,3}	

¹Использовались в исследовании резистентности бактерий диско-диффузионным методом (см. пункт 2.2.1)

²Использовались в исследовании совместного влияния изотопов и антибиотиков на рост бактерий *E. coli* (см. пункт 2.2.2)

³Использовались в исследовании совместного влияния изотопов и антибиотиков на морфологию бактерий *E. coli* (см. пункт 2.2.3)

Все экспериментальные данные на графиках представлены в виде среднего значения $\bar{X} \pm SD$ (стандартная ошибка). Различия между средними значениями считались статистически достоверны при $p < 0,05$. Статистическая обработка и

графическое представление экспериментальных данных проводилось с помощью программного обеспечения Origin 8.0 (версия 8.0; Microcal Software).

2.1.1 Диско-диффузионный метод

Антибиотикочувствительность клеток *E. coli*, культивируемых в присутствии изотопов магния, исследовалась диско-диффузионным методом и определялась по размеру диаметров зон задержки роста в миллиметрах в соответствии с методическими указаниями 4.2.1890-04 [71].

«В эксперименте использовалась питательная среда М9 (NH_4Cl – 2 г, $^{24,25,26}\text{MgSO}_4$ – 260 мг, глюкоза – 10 г, Na_2HPO_4 – 12 г, KH_2PO_4 – 6 г, NaCl – 1 г, бактериологический агар – 0,8 г), потому что только она позволяет добиваться высокого обогащения магнитным ^{25}Mg и немагнитными $^{24,26}\text{Mg}$ изотопами магния, как самой среды, так и культивируемых на них бактерий ([см. пункт 1.2.1, 1.3](#)).

Для получения инокулюма, соответствующего по плотности 0,5 по МакФарланду, использовался LB-бульон (производства Sigma Aldrich Co.). 2 мл инокулюма вносилось в чашки Петри с питательной средой М9 (20 мл), содержащей различные изотопы магния. Аппликация дисков с антибиотиками семи различных групп (производство НИИЭМ им. Пастера) проводилась через 10 минут после инокуляции. Чашки инкубировались в течение 24 часов при температуре 37°C, после чего производился учёт результатов.

В качестве контроля использовалась твёрдая питательная среда М9 с природным соотношением изотопов магния (^{24}Mg – 78,60%, ^{25}Mg – 10,11%, ^{26}Mg – 11,29%). Измерение зоны подавление роста осуществлялось стандартным методом после 36 часов инкубации клеток *E. coli* при температуре 37° С» [6, 17].

Использовались основные группы антибиотиков (таблица 2.1), которые действовали на определенные клеточные подсистемы и блокировали жизненно важные функции микроорганизмов. Для обнаружения ферментативных процессов, механизм действия которых связан со спиновой селективностью,

проводились пять независимых экспериментальных серий с двумя повторами в каждой.

2.1.2 Определение минимальной рост-ингибирующей концентрации

Метод серийных разведений использовался для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) антибиотиков. «Музейный штамм *Escherichia coli* K12TG1 предварительно инкубировался в LB-бульоне (Sigma-Aldrich) в течение 24 часов при температуре 37 °С. После клетки *E. coli* пересеивались в среды М9 с ^{24}Mg , ^{25}Mg , ^{26}Mg , соответственно.

Культивирование бактерий для получения ростовых кривых осуществлялось при 37°С в 96-луночных полистироловых планшетах при постоянной аэрации путём помещения сред с культурой бактерий на шейкер ST-3 ELMi (ELMI, Рига, Латвия), 200 об/мин. Начальная плотность культуры после добавления инокулюма в среды М9 составляла 10^5 КОЕ/мл. Концентрация антибиотика в среде была в 2, 4 и 8 раз меньше подобранных МИК. В качестве контроля были получены кривые роста бактерий *E. coli* на средах М9 с добавлением изотопов магния, но без антибиотиков.

Ростовые кривые (зависимости оптической плотности суспензий от времени культивирования) получали турбидиметрическим методом с помощью измерения оптической плотности суспензий каждый час на иммуноферментном анализаторе АИФР-01 УНИПЛАН (Пикон, Россия) на длине волны 450 нм.

Линейный участок ростовой кривой, соответствующий фазе активного деления клеток, аппроксимировался по формуле [58].

$$D_{450}=D_0+\mu\times t$$

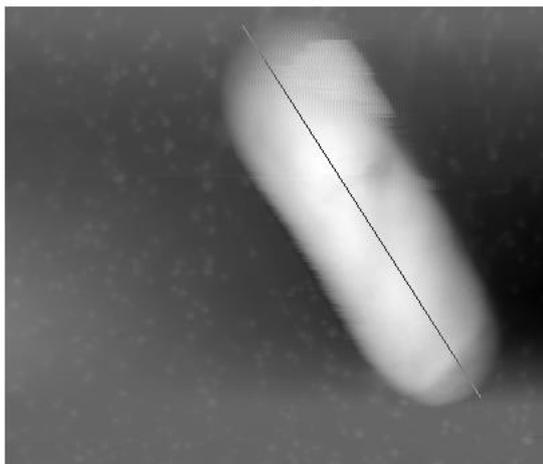
Определяли константу скорости роста μ , которая соответствует максимальной удельной скорости роста бактериальной культуры» [17].

2.1.3 Исследование морфологии бактерий *E. coli*

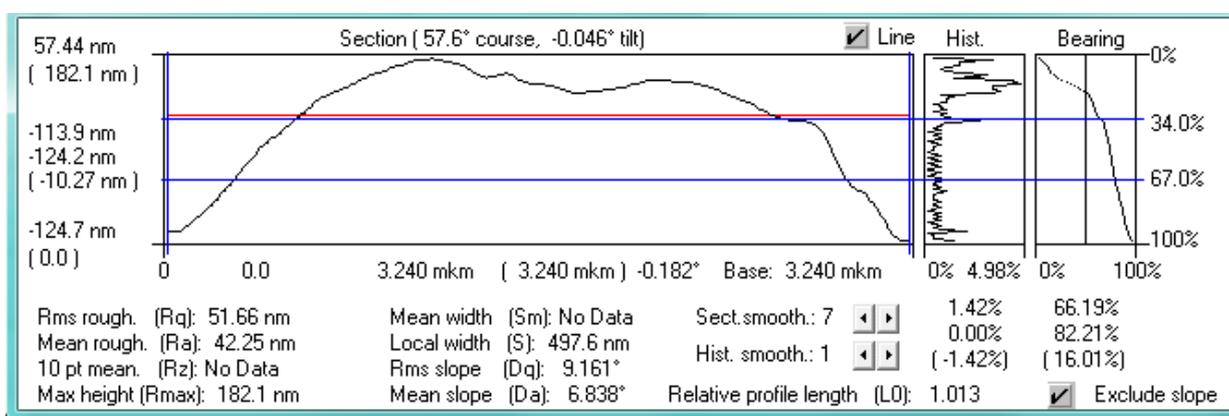
Образцы для сканирования на атомно-силовом микроскопе (АСМ) готовились после культивирования бактерий *E. coli* на питательных средах М9 с изотопами магния и антибиотиками в концентрации $\frac{1}{2}$ МИК в течение 9 часов при температуре 37° С. Образцы для АСМ готовили многократной отмывкой от среды, после чего 2–3 мкл суспензии с бактериями помещали на поверхность подложки из металлической шайбы и скола слюды размером около 8x8 мм. Сканирование образцов производили на сканирующем зондовом микроскопе СММ-2000 (ОАО «Завод ПРОТОН-МИЭТ», Россия) в атомно-силовом режиме в воздушной среде. В работе использовались кантилеверы MSCT-AUNM («Veeco Instruments Inc.», США) микроскопа с жесткостью балки 0,03 Н/м и радиусом кривизны иглы порядка 10 нм. Количественный морфометрический анализ полученных изображений (длина, ширина, высота, а также показатель шероховатости) проводили с использованием штатного программного обеспечения микроскопа.

Для характеристики профиля шероховатости бактериальных клеток, подвергнувшихся действию антибиотиков и магнитного и немагнитных изотопов магния, использовались два параметра – средний шаг местных выступов профиля (далее - шаг выступов) и среднее арифметическое отклонение профиля (далее - шероховатость).

Средним шагом **S** местных выступов профиля называется среднее значение шага местных выступов в пределах базовой длины. Среднее арифметическое отклонение **R_a** профиля - есть среднее арифметическое абсолютных значений отклонений профиля в пределах базовой длины. На рисунке 2.1а приведено АСМ-изображение бактерии *E. coli*, иллюстрирующее каким образом измерялся профиль шероховатости с помощью встроенного программного обеспечения микроскопа. На рисунке 2.1б приведен соответствующий профиль с полученными средними характеризующими его величинами.



а)



б)

Рисунок 2.1 – а) АСМ-изображение бактерии *E. coli* со снятым профилем шероховатости; б) полученный профиль шероховатости

2.1.4 Способность к образованию биоплёнок

Способность «к образованию биопленок оценивали по стандартной фотометрической методике по степени связывания красителя кристаллического фиолетового [72]. После 24 ч инкубации на питательных средах М9 (см. пункт 1.2.1) с изотопами магния при температуре 37°C в 24-луночных полистироловых планшетах суспензию бактерий тщательно удаляли, а лунки дополняли 1,5 мл 0,005%-ного водного раствора красителя кристаллического фиолетового для окрашивания образовавшихся биопленок. Окрашивание проводили в течение 60 мин. Затем, после полного удаления раствора кристаллического фиолетового из

лунок планшеты, краситель экстрагировали из биопленок инкубацией с 1 мл 96%-ого этанола в течение 45 мин при комнатной температуре. После этого остатки биопленок и бактерий осаждали центрифугированием при 9000 об/мин в течение 7 мин на центрифуге СМ-50М (ELMI, Латвия). Затем надосадочную жидкость переносили (200 мкл) в лунки 96-луночной планшеты. Концентрацию кристаллического фиолетового определяли фотометрическим методом на анализаторе АИФР-01 УНИПЛАН (Пикон, Россия), длина волны 530 нм» [14].

2.2 Синергизм и антагонизм изотопов магния и антибиотиков

2.2.1 Исследование антимикробной активности в присутствии изотопов магния диско-диффузионным методом

Средние диаметры зон подавления роста бактерий *E. coli*, культивируемых на твёрдой питательной среде с содержанием одного из изотопов магния ^{24}Mg , ^{25}Mg , ^{26}Mg или природного магния Mg, полученные в результате проведения пяти независимых экспериментальных серий с двумя повторами в каждой, приведены в таблице 2.2.

Из 14 тестируемых антибиотиков семи различных групп статистически достоверные различия для диаметров зон подавления роста бактерий получены только для двух представителей группы хинолонов, а также для двух антибиотиков из групп аминогликозидов и линкозамидов. «Совместное влияние изотопов магния и антибиотиков на бактерии *E. coli* не было обнаружено для цефалоспоринов, карбапенемов, пенициллинов и тетрациклинов» [6, 17].

Таблица 2.2 – Диаметр зоны подавления роста бактерий *E.coli*, культивируемых на твёрдой питательной среде с содержанием одного из изотопов магния ^{24,25,26}Mg или природного магния Mg [6, 15, 17]

Группа антибиотиков	Наименование диска с препаратами	Содержание препарата в диске, мкг	d, мм			
			Среда с Mg	Среда с ²⁴ Mg	Среда с ²⁵ Mg	Среда с ²⁶ Mg
Цефалоспорины	Цефазолин	30	26,0 ± 0,7	27,1 ± 0,2	27,3 ± 0,3	25,9 ± 0,5
	Цефтриаксон	30	32,2 ± 0,6	34,5 ± 0,5	33,7 ± 0,3	35,0 ± 0,5
	Цефуросим	30	24,1 ± 0,1	23,3 ± 0,8	24,3 ± 0,9	21,5 ± 0,9
Карбапенемы	Меропенем	10	31,7 ± 0,8	31,0 ± 0,9	32,3 ± 0,9	30,7 ± 0,7
	Имипенем	10	24,3 ± 0,4	27,0 ± 0,5	26,3 ± 0,4	28,7 ± 0,9
Пенициллины	Амоксицилин	20	17,7 ± 0,7	18,3 ± 0,2	18,0 ± 0,5	18,6 ± 0,7
Аминогликозиды	Тобрамицин	10	24,3 ± 0,4	24,0 ± 0,9	22,5 ± 0,5	21,3 ± 0,4
	<i>Амикацин</i>	30	19,3 ± 1,2	19,3 ± 1,2	16,0 ± 0,6*	18,5 ± 0,6
	Гентамицин	10	19,7 ± 0,4	19,5 ± 0,2	20,7 ± 0,9	18,8 ± 0,3
Линкозамиды	Линкомицин	15	14,0 ± 0,3	14,0 ± 0,5	13,5 ± 0,4	15,3 ± 0,3
	<i>Клиндамицин</i>	2	13,7 ± 0,8	12,6 ± 0,6	10,4 ± 0,6*	13,1 ± 0,8
Тетрациклины	Тетрациклин	30	20,3 ± 0,4	21,3 ± 0,3	21,5 ± 0,4	22,1 ± 0,6
Хинолоны/Фторхинолоны	Налидиксовая кислота	30	20,7 ± 0,3	20,3 ± 0,2	22,2 ± 0,4*	19,5 ± 0,4
	Ципрофлоксацин	5	32,0 ± 0,6	32,0 ± 0,1	34,3 ± 0,7*	32,0 ± 0,3

*Различия между средними значениями для магнитного изотопа магния ²⁵Mg и немагнитных изотопов магния ^{24,26}Mg являются статистически значимыми при $p < 0,001$, $n = 10$

Были зарегистрированы два вида МИЭ магния ²⁵Mg в резистентности микроорганизмов *Escherichia coli* к антибиотикам: эффект усиления резистентности к антибиотикам амикацину и клиндамицину (антагонизм антибиотика и магнитного магния) и эффект усиления чувствительности к антибиотикам налидиксовая кислота и ципрофлоксацин из группы

хинолонов/фторхинолонов (эффект синергизма или потенцирования антибиотика) [6, 17].

Увеличение резистентности бактерий при обогащении питательной среды М9 магнитным изотопом магния происходит для антибиотиков амикацина и клиндамицина, механизм действия которых связан с нарушением стадий синтеза белка [63, 66]. Такой МИЭ может быть связан, в первую очередь, с влиянием магнитных моментов ядер изотопа магния ^{25}Mg на энергетические процессы в клетке, а именно, на синтез АТФ [2-8]. Кроме того, при исследовании роста бактерий *E. coli* на магний-изотопных средах было обнаружено, что магнитный магний ^{25}Mg способствует быстрой адаптации клеток и стимулирует рост (см. пункт 1.4). Когда диски с антибиотиками размещаются в чашке Петри, содержащей твёрдую питательную среду М9 с изотопами магния и бактериями *E. coli*, инициируются два процесса: диффузия антибиотика в агар и рост бактериальной культуры. От скорости роста бактерий зависит конечный результат – диаметр зоны задержки роста. Бактерии, обогащенные магнитным изотопом магния ^{25}Mg , имеют меньшую лаг-фазу по сравнению с бактериями [2], обогащенными немагнитными изотопами, что означает более ранний рост культуры, а значит, впоследствии, диаметр зоны подавления роста будет меньше. «Большая жизнеспособность бактериальных клеток, обогащенных магнитным магнием (см. пункт 1.4), повлияла на увеличение резистентности к амикацину и клиндамицину» [6]. Однако, такой эффект не был обнаружен в чувствительности бактерий *E. coli*, культивируемых с ^{25}Mg , к другим антибиотикам.

Известно несколько механизмов развития резистентности бактерий к антибиотикам: синтез ферментов, модифицирующих молекулу антибиотика и инактивирующих её; синтез белков-поринов, способных выводить антибиотик из клетки; изменение целевого сайта связывания молекулы-антибиотика за счёт различных мутаций [73-74]. Кроме того, в стрессовых условиях роста (действие антибиотиков) в бактериях формируются нанокристаллические структуры ДНК с ДНК-ассоциированными белками [61-62], что может приводить, по мнению

некоторых авторов [75], к развитию резистентности. Рассмотрим вероятные механизмы влияния магнитных ядер магния на резистентность бактерий к отдельным представителям аминогликозидов и линкозамидов.

Аминогликозиды чаще всего инактивируются аминогликозидными модифицирующими ферментами, которые делятся на ацетилтрансферазы, фосфотрансферазы и нуклеотидтрансферазы [76-77]. У грамотрицательных бактерий больше всего представлены ацетилтрансферазы, которые ацетируют молекулу антибиотика, тем самым лишая его антибактериальных свойств. Интересно, что ферменты этого класса эффективно работают в присутствии ионов магния Mg^{2+} и ингибируются при добавлении других двухвалентных ионов – цинка Zn^{2+} или меди Cu^{2+} [78]. При этом в процессе ферментативной реакции вместе с продуктом – ацетатом, - путём фосфорилирования образуется и молекула АТФ [79]. Схема такой реакции аналогична работе креатинкиназы, глицерофосфаткиназы и других фосфорилирующих ферментов, для которых был обнаружен МИЭ магния [8]. Вероятно, что и ацетилтрансферазы в присутствии магнитного изотопа магния ^{25}Mg работают эффективнее по сравнению с немагнитными ядрами. Это приводит к ингибированию аминогликозидов и, в итоге, к уменьшению антибиотикочувствительности. Следует отметить, что незначительный МИЭ магния проявился и в резистентности бактерий *E. coli* к другому антибиотику класса аминогликозидов – тобрамицину, но он не является статистически достоверным.

Наиболее распространенный механизм резистентности бактерий к антибиотикам из группы линкозамидов – это модификация участка молекулы путём метилирования с помощью ферментов метилтрансфераз [80]. Для работы этих ферментов также необходимы ионы магния [81-82]. При реализации ион-радикального механизма в таких ферментах [5,7-8], когда ферментативная реакция идёт с образованием промежуточной ИРП, магнитные ядра магния ^{25}Mg способны влиять на направление и скорость процесса по сравнению с немагнитными изотопами $^{24,26}Mg$. В итоге, аналогично случаю с

аминогликозидами, это приводит к развитию резистентности к линкозамидам. Ионы магнитного магния $^{25}\text{Mg}^{2+}$ оказываются более эффективными.

Потенцирование антибиотиков группы хинолонов (налидиксовой кислоты и цiproфлоксацина) магнитным изотопом магния ^{25}Mg или эффект синергизма антибиотика и магнитного магния представляет особый интерес. «Зона подавления роста для бактерий, которые инкубировались на среде с содержанием магнитного изотопа магния, оказывается больше на 9,5-13,5 % для этих антибиотиков по сравнению с клетками *E. coli*, инкубируемыми на среде M9 с ^{24}Mg , ^{26}Mg или природным магнием Mg» [6]. Налидиксовая кислота подавляет репликацию ДНК, цiproфлоксацин ингибирует ДНК-гиразу, вызывая быструю гибель клетки [69]. Влияние магнитного изотопа магния на синтез ДНК, как и самого антибиотика, негативно: присутствие ядерного спина в активном сайте ДНК-полимеразы блокирует прямую реакцию, замедляя сам процесс [13-14]. Так антибиотики группы хинолонов/фторхинолонов и магнитный изотоп магния ^{25}Mg усиливают подавляющее действие друг друга на синтез ДНК, что приводит к значительному изменению антибиотикочувствительности [6, 15, 17].

Совместный эффект магнитного изотопа магния и антибиотиков группы хинолонов в антибиотикочувствительности бактерий *E. coli* является независимым, надёжным подтверждением негативного влияния магнитного изотопа магния ^{25}Mg на синтез ДНК [13-14]. Группа хинолонов – единственная из всего тестируемого ряда, препараты которой воздействуют именно на различные стадии синтеза ДНК, в отличие от шести других групп. При создании антибактериальных препаратов, обогащенных магнитным изотопом магния и имеющих «мишенью действия» ДНК-синтезирующую систему, можно ожидать, что эффективность таких лекарственных средств увеличится при условии подбора концентрации изотопа и адресной доставки [6, 15, 17].

2.2.2 Совместное влияние антибиотиков и изотопов магния на рост бактерий *E. coli*

2.2.2.1 Аминогликозиды

В эксперименте использовались следующие сертифицированные медицинские препараты, соответствующие антибиотикам группы аминогликозидов: канамицин, амикацин в виде порошков для приготовления инъекций, гентамицин в виде раствора для инъекций и тобрамицин – капли для глаз.

Механизм действия аминогликозидов заключается в следующем: они ингибируют синтез белка, связываясь (с высоким сродством) с А-участком 16S р-РНК 30S-субъединицы рибосомы [63]. Разные представители аминогликозидов имеют различную специфичность к А-участку, но они все изменяют его конформацию. В результате происходит синтез белка с ошибками, и полипептид составляется из «неправильных» аминокислот. Впоследствии такие полипептиды вызывают повреждение клеточных мембран [84-86].

Ростовые кривые бактерий *E. coli*, инкубируемых на питательных средах М9 с изотопами магния и различными концентрациями канамицина, представлены на рисунке 2.2. Наибольшая концентрация соответствует МИК. Меньшие концентрации были получены методом серийных разведений. Аналогично были получены рабочие концентрации и для всех последующих антибиотиков. Константы скоростей роста, полученные после аппроксимации кинетических кривых, приведены на рисунке 2.3.

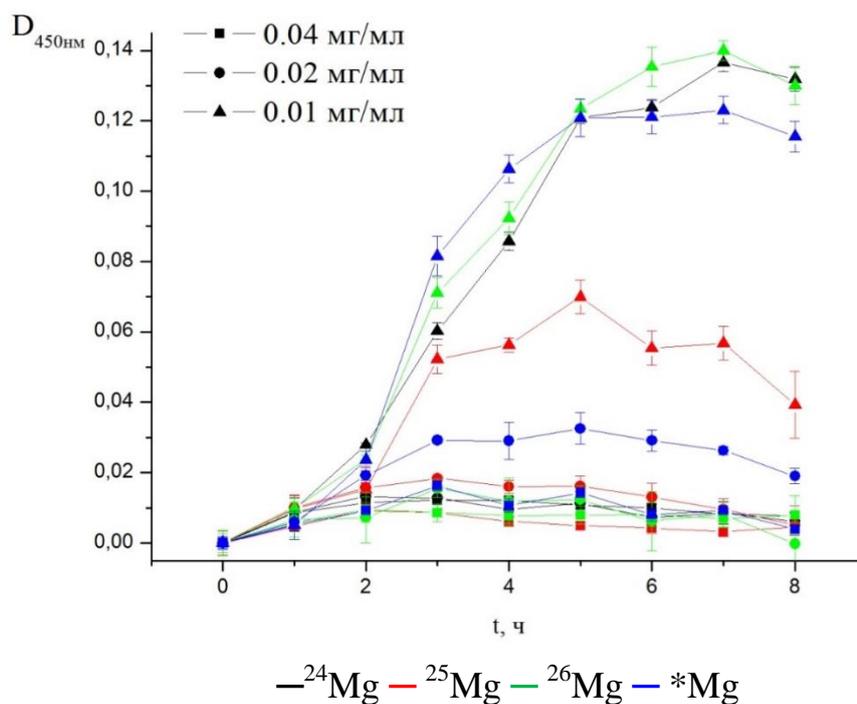


Рисунок 2.2 – Кинетика роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на питательных средах М9 с изотопами магния и канамицином ($n=6$)

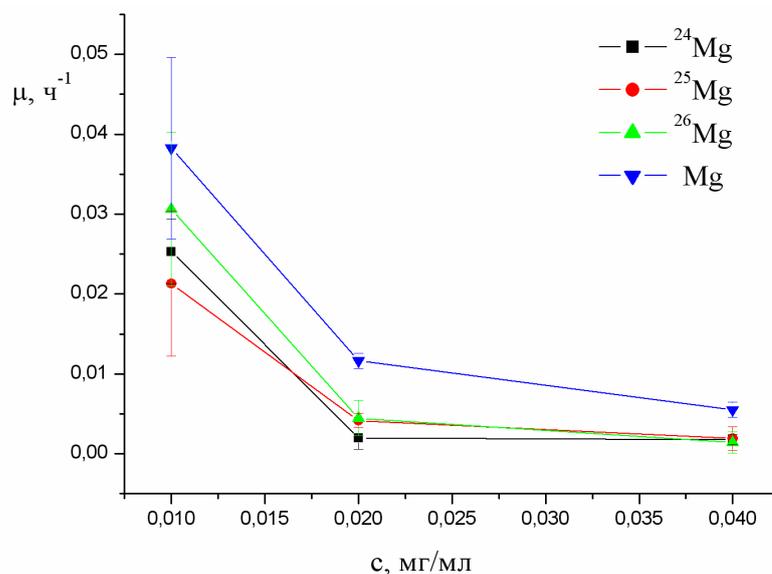


Рисунок 2.3 – Концентрационные зависимости констант скоростей роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с изотопами магния и канамицином ($n=6$)

На рисунках 2.4–2.5 приведены кинетики роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с изотопами магния и тобрамицином, и константы скоростей роста, полученные после аппроксимации ростовых кривых.

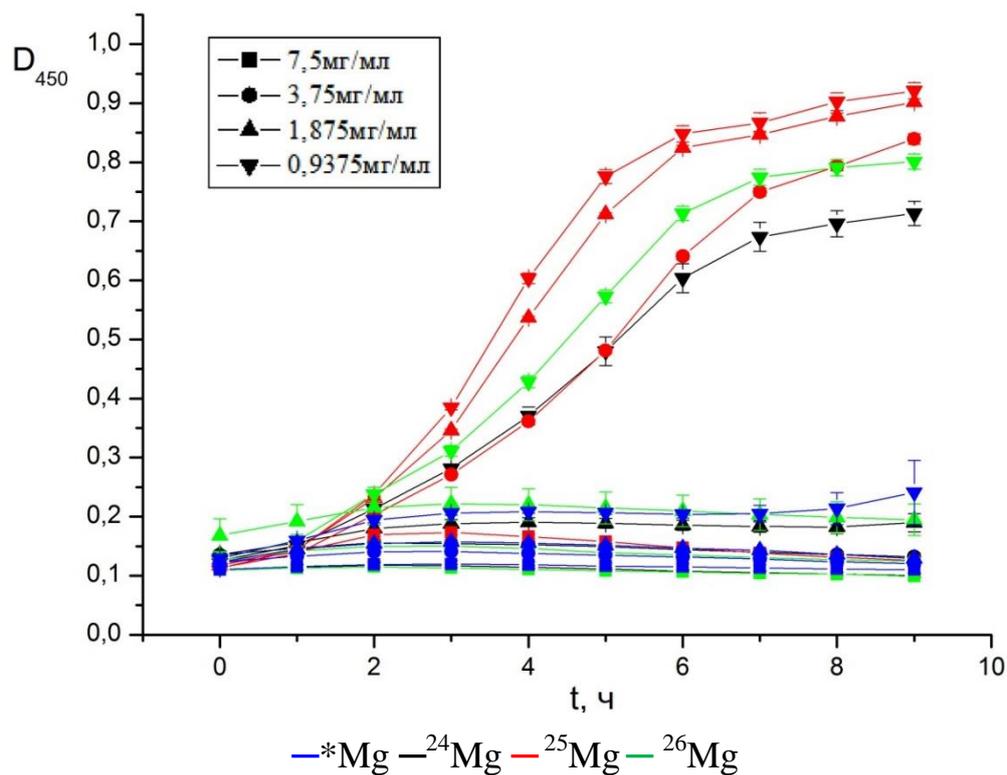


Рисунок 2.4 – Кинетика роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на питательных средах М9 с изотопами магния и тобрамицином ($n=6$)

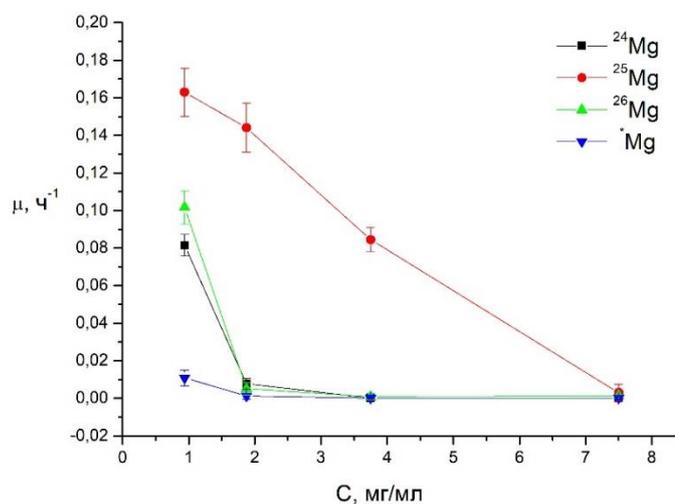
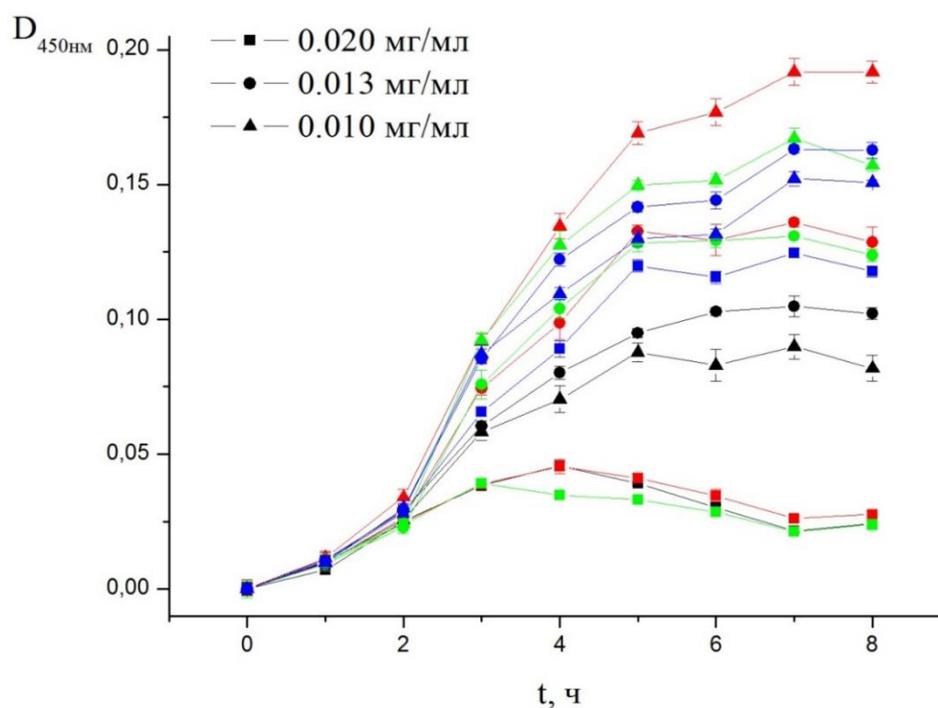


Рисунок 2.5 – Концентрационные зависимости констант скоростей роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с изотопами магния и тобрамицином ($n=6$)

На рисунках 2.6–2.7 приведены кинетики роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с изотопами магния и амикацином, и константы скоростей роста, полученные после аппроксимации ростовых кривых.



—²⁴Mg—²⁵Mg—²⁶Mg—*Mg

Рисунок 2.6 – Кинетика роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на питательных средах М9 с изотопами магния и амикацином ($n=6$)

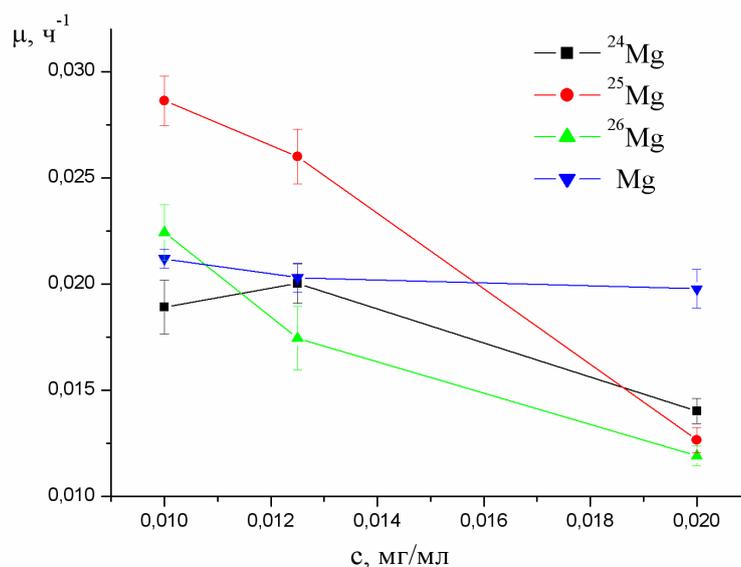


Рисунок 2.7 – Концентрационные зависимости констант скоростей роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с изотопами магния и амикацином ($n=6$)

Статистически достоверных различий для констант скоростей роста бактерий *E. coli*, выращенных на среде М9 с магнитным и немагнитными изотопами магния, для канамицина не обнаружено. Канамицин относится к первому поколению аминогликозидов, а вот тобрамицин и амикацин ко второму и третьему поколению, соответственно. Для них обнаружены МИЭ магния ^{25}Mg , проявляющиеся, как повышение резистентности бактерий *E. coli* к антимикробным препаратам. Это справедливо только для тех микроорганизмов, которые инкубировались в присутствии магнитного изотопа магния ^{25}Mg . Например, резистентность к тобрамицину культуры *E. coli*, обогащенной магнитным изотопом магния ^{25}Mg , оказывается максимальной: при концентрации антибиотика, в 2 раза меньшей МИК, скорость роста составляет 86,08% от контроля (рост на магний-изотопной среде без антибиотика). При этом скорость роста бактерий, растущих на средах с немагнитными изотопами и природным магнием, уменьшается на 40–50% по сравнению с контрольными образцами.

С помощью диско-диффузионного метода аналогичный достоверный эффект увеличения резистентности в присутствии магнитного магния был обнаружен для амикацина ([см. пункт 2.2.1](#)). Для тобрамицина зарегистрировано незначительное уменьшение диаметра зоны задержки роста бактерий *E. coli*, культивируемых с магнитным магнием, находящееся в пределах погрешности. Развитие резистентности обусловлено работой фосфорилирующих ферментов ацетилтрансфераз [76]. На скорость ферментативной реакции, очевидно, влияет наличие магнитного момента у ядра иона магния $^{25}\text{Mg}^{2+}$. Для уточнения молекулярного механизма нужны дополнительные исследования. Прикладное значение этого результата состоит в увеличении вероятности быстрого развития резистентности у микроорганизмов и появления условно-патогенных штаммов при одновременном приёме антибактериальных и изотопно-обогащенных препаратов.

2.2.2.2 Представитель ансамицинов - рифампицин

Ансамицины – группа антибиотиков, образуемых лучистым грибом *Streptomyces mediterranei*. Трансформация химической структуры природных ансамицинов (рифамицинов) позволила получить полусинтетические производные – рифампицин (основной представитель), который и был выбран для проведения экспериментов. Действует антибиотик бактерицидно. В эксперименте использовался следующий сертифицированный медицинский препарат: рифампицин в капсулах по 150 мг.

Рифампицин и другие соединения ансамициновой группы специфически ингибируют ДНК-зависимую РНК-полимеразу, то есть предотвращают транскрипцию РНК из матрицы ДНК. Рифампицин является чрезвычайно эффективным ингибитором бактериального фермента и не влияет на эукариотическую РНК-полимеразу. Рифампицин специфически связывается с β -субъединицей РНК-полимеразы и блокирует инициацию синтеза РНК. При этом связывание происходит в кармане, находящимся в 12 Å от активного сайта фермента [64].

На рисунке 2.8 приведены кинетики роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с изотопами магния и различными концентрациями рифампицина, полученными с помощью метода серийных разведений. На рисунке 2.9 приведены соответствующие концентрационные зависимости констант скоростей роста бактерий, обогащенных различными изотопами магния, полученные с помощью аппроксимация ростовых кривых.

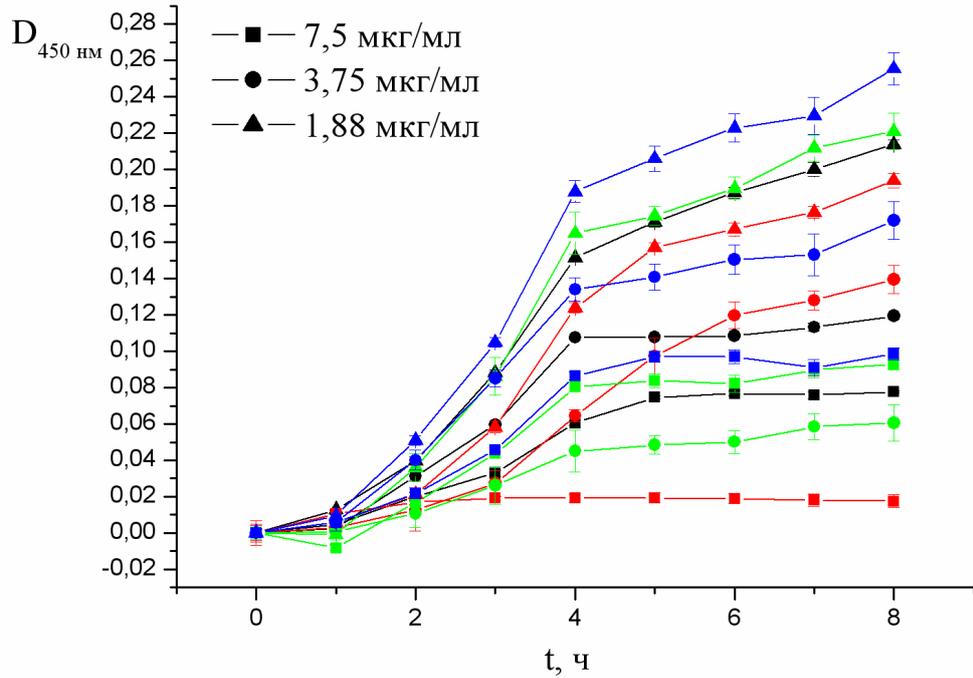


Рисунок 2.8 – Кинетика роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на питательных средах М9 с изотопами магния и рифампицином ($n=6$)

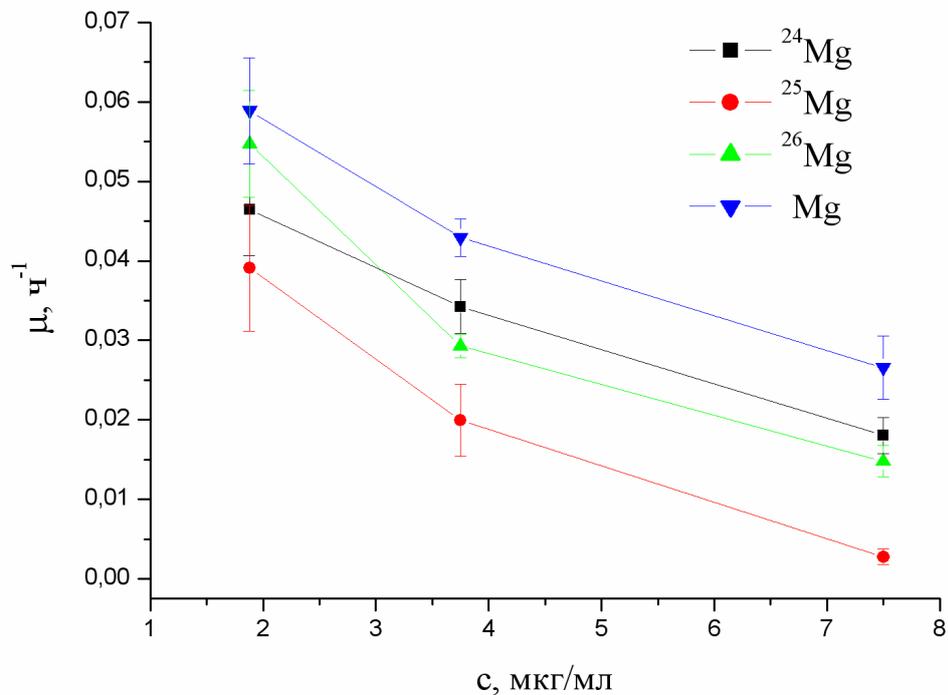
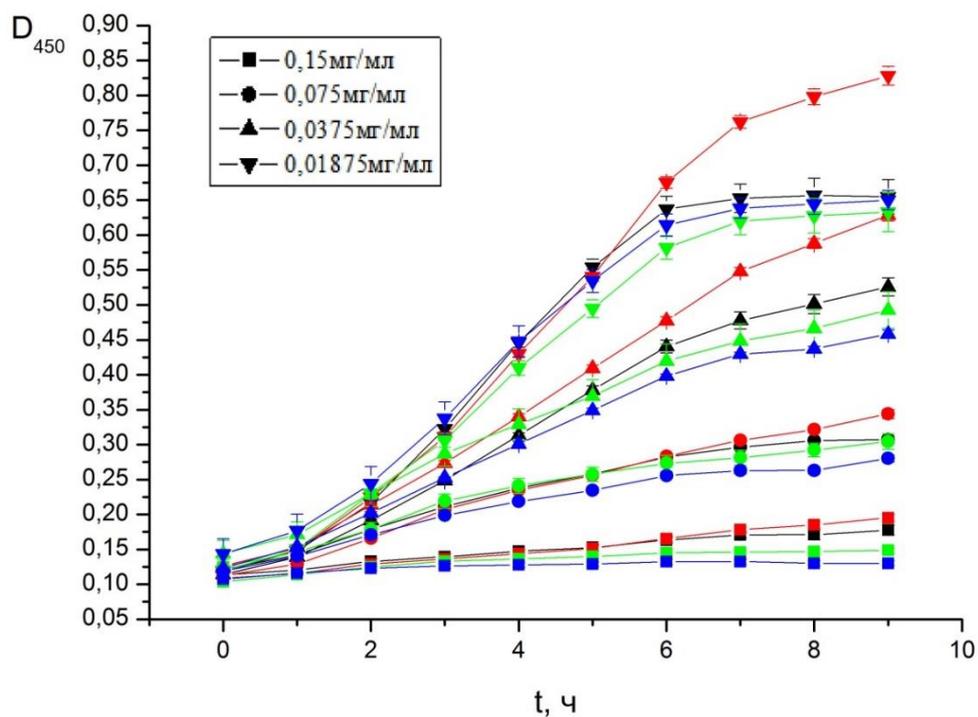


Рисунок 2.9 – Концентрационные зависимости констант скоростей роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с изотопами магния и рифампицином ($n=6$)

Анализируя приведенные ростовые кривые и концентрационные зависимости констант скоростей роста, можно сделать вывод о появлении эффекта синергизма антибиотика рифампицина и магнитного изотопа магния ^{25}Mg в чувствительности бактерий *E. coli*. Константы скорости роста клеток, инкубируемых на среде с магнитным магнием и $\frac{1}{2}$ МИК рифампицина, оказываются ниже в 1,5–2 раза по сравнению с микробами, инкубируемыми на средах с немагнитными формами магния $^{24,26}\text{Mg}$. Магнитный изотоп магния так же, как рифампицин, подавляет стадии синтеза ДНК [13-14], что препятствует нормальному делению и росту бактерий. Представитель ансамицинов и магнитный изотоп магния усиливают действия друг друга, что проявляется снижением витальности бактериальной культуры.

2.2.2.3 Представители линкозамидов и карбапенемов

Линкомицин, используемый в экспериментах по исследованию совместного влияния антибактериальных препаратов и изотопов магния на рост бактерий *E. coli*, относится к группе линкозамидов. Он подавляет белковый синтез бактерий вследствие обратимого связывания с 50S-субъединицей рибосом, нарушает образование пептидных связей [66]. Статистическая обработка ростовых кривых (рисунок 2.10) показала, что константы скоростей роста бактерий *E. coli*, подвергнувшихся воздействию линкомицина разных концентраций (рисунок 2.11), не зависят от типа изотопа магния, добавленного в питательную среду. На малых концентрациях антибиотика наблюдается лучшая сопротивляемость его действию тех клеток, которые растут на среде с магнитным изотопом магния. Подобное поведение бактерий, обогащенных магнитным магнием, характерно для контрольных экспериментов без применения антибиотиков.



—*Mg —²⁴Mg —²⁵Mg —²⁶Mg

Рисунок 2.10 – Кинетика роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на питательных средах М9 с изотопами магния и линкомицином ($n=6$)

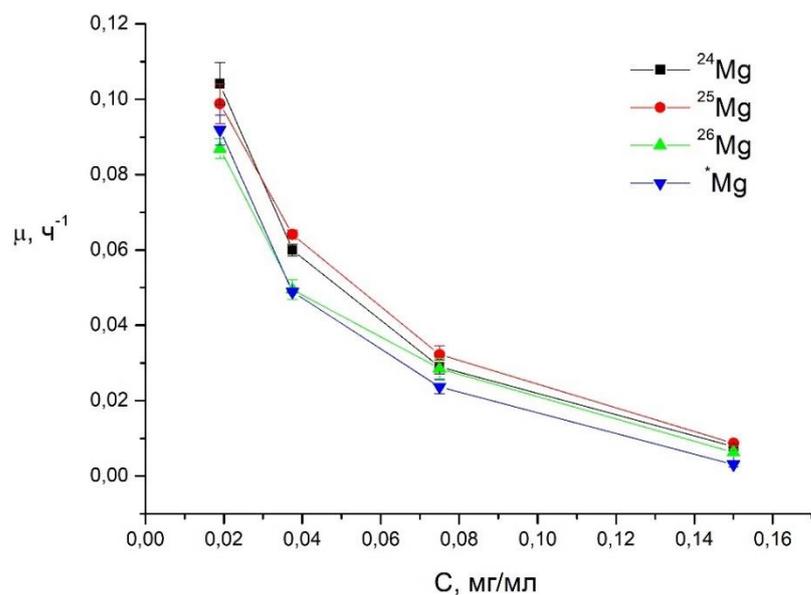


Рисунок 2.11 – Концентрационные зависимости констант скоростей роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с изотопами магния и линкомицином ($n=6$)

На рисунке 2.12 приведены кинетики роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на питательных средах с изотопами магния и меропенемом различных концентраций. Меропенем – это представитель карбапенемов. Механизм действия этой группы антибиотиков заключается в ингибировании синтеза пептидогликана клеточной стенки путем ингибирования пенициллинсвязывающих белков (PBPs), вызывая дефект бактериальной клеточной стенки и «отёк» бактерии [65]. Впоследствии это приводит к смерти микробов. Карбапенемы действуют как ингибиторы пептидазного домена PBPs, в том числе подавляя сшивку пептидов, а также другие пептидазные реакции. Ключевым фактором эффективности карбапенемов является их способность связываться с несколькими различными видами PBPs [87]. Поскольку формирование клеточной стенки представляет собой динамический «трехмерный процесс», при котором образование и аутолиз происходят одновременно, то при ингибировании PBPs аутолиз продолжается. В конце концов пептидогликан ослабевает, и клетка лопается из-за осмотического давления [81].

Присутствие в питательной среде изотопа магния ^{25}Mg не изменяет резистентность микроорганизмов к антибиотику, как показывают концентрационные зависимости констант скоростей роста, приведенные на рисунке 2.13. Это согласуется с экспериментальными данными для антибиотиков группы пенициллинов ([см. пункт 2.2.2.4](#)) и цефалоспоринов ([см. пункт 2.2.2.6](#)), мишенью действия которых также является синтез пептидогликана.

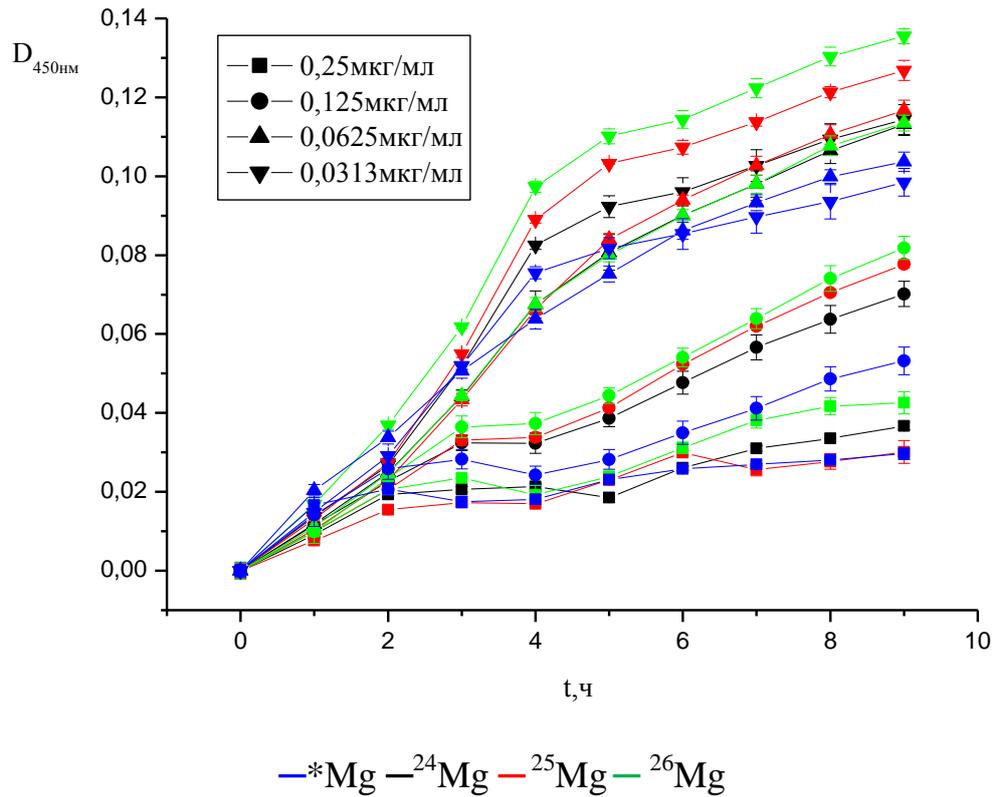


Рисунок 2.12 – Кинетика роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на питательных средах М9 с изотопами магния и меропенемом ($n=6$)

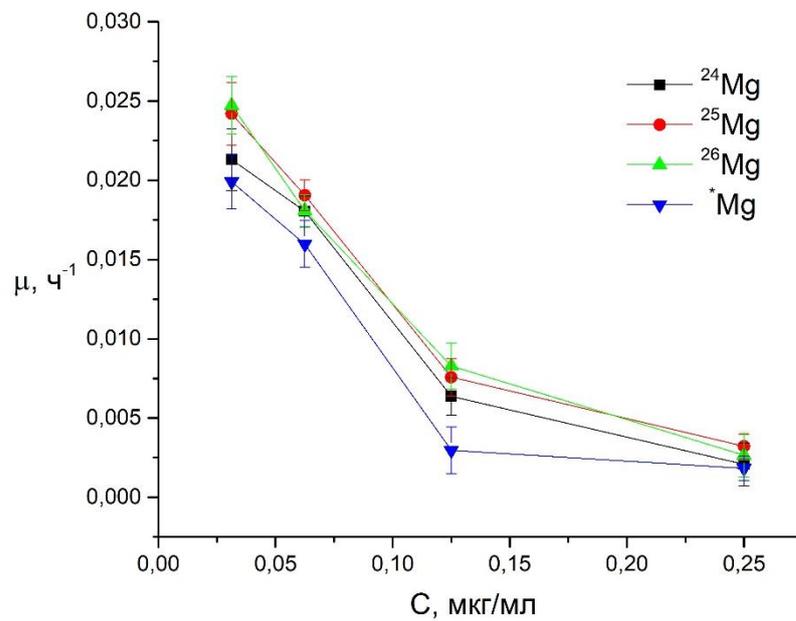


Рисунок 2.13 – Концентрационные зависимости констант скоростей роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с изотопами магния и меропенемом ($n=6$)

2.2.2.4 Представитель пенициллинов - амоксициллин

Пенициллины положили начало классу бета-лактамовых антибиотиков, которых объединяет наличие в структуре бета-лактамового кольца. Кроме пенициллинов к бета-лактамовым препаратам относятся цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы. Пенициллины обладают преимущественно бактерицидным эффектом. Они препятствуют синтезу пептидогликана, являющегося основным компонентом клеточной стенки бактерий, а именно подавляют транспептидазную реакцию синтеза компонентов клеточной стенки (например D-аланина). Блокирование синтеза пептидогликана приводит к гибели бактерии [67].

Для проведения исследований совместного влияния пенициллинов и изотопов магния на рост бактерий *E. coli* использовался сертифицированный медицинский препарат амоксициллин в виде порошка для приготовления инъекций. На рисунке 2.14 представлены полученные кинетики роста микроорганизмов *E. coli*, инкубируемых на питательных средах М9 с изотопами магния и амоксициллином различных концентраций. Концентрационные зависимости констант скоростей роста, полученные после обработки ростовых кривых, приведены на рисунке 2.15.

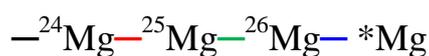
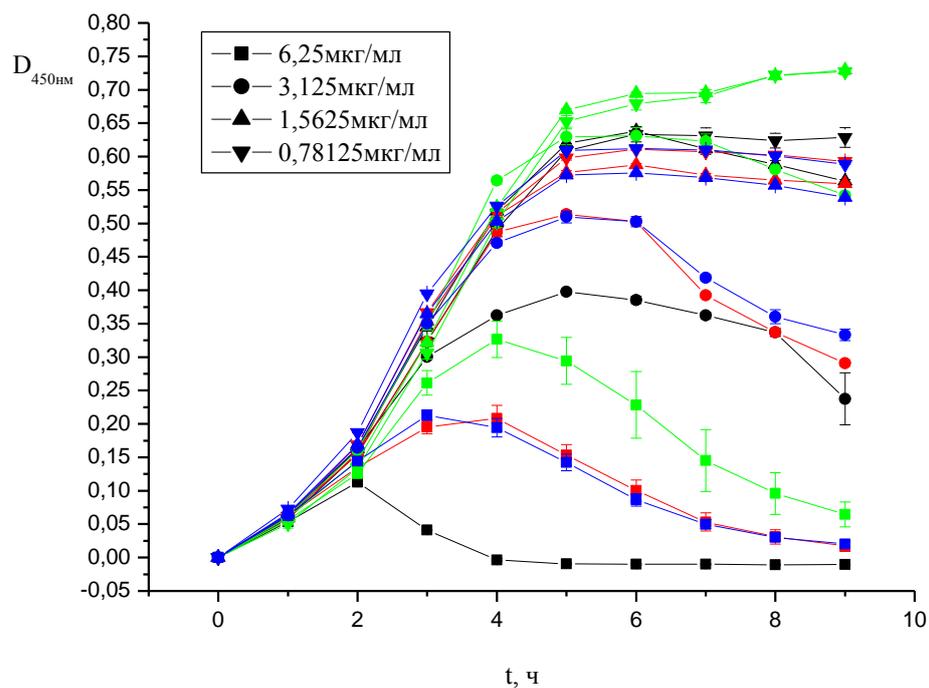


Рисунок 2.14 – Кинетика роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на питательных средах М9 с изотопами магния и амоксициллином ($n=6$)

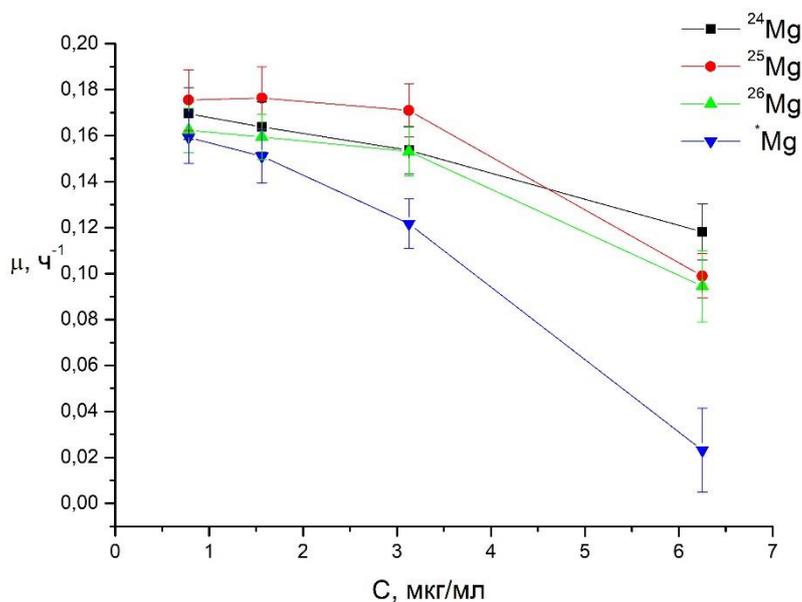


Рисунок 2.15 – Концентрационные зависимости констант скоростей роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с изотопами магния и амоксициллином ($n=6$)

Представленные на рисунке 2.14 кривые имеют интересную особенность для концентрации амоксициллина, равной МИК и в 2 раза меньшей. Для этих ростовых кривых можно отметить появление фазы отмирания с 3–4 часа вместо стационарной фазы роста. На начальной фазе роста (0–3 час) культуры концентрация антибиотика является недостаточной для полной гибели клеточной культуры – процессы пролиферации всё же запускаются. Однако при внутриклеточном насыщении антибактериальным препаратом начинается резкая гибель бактерий. При этом константы скорости роста для этих концентраций оказываются ниже в том случае, когда бактерии инкубировались на среде с природным магнием по сравнению с чистыми изотопными формами. Каких-либо достоверных различий в действии магнитного и немагнитных изотопов магния на чувствительность бактерий *E. coli* к антибиотикам группы пенициллинов не наблюдалось.

2.2.2.5 Хинолоны/ фторхинолоны

Препараты группы хинолонов/ фторхинолонов ингибируют ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, связываясь с ними [69,88]. После связывания хинолоны вызывают конформационные изменения в ферменте. Фермент разрушает ДНК, а молекула антибиотика предотвращает повторное лигирование сломанных нитей ДНК. Происходит образование комплекса хинолон–фермент–ДНК, который ингибирует репликацию ДНК. Считается, что образование такого комплекса обратимо ингибирует рост ДНК и деление клеток и, таким образом, отвечает только за бактериостатическое действие хинолонов. Летальное же действие антибиотика необратимо и происходит по другому механизму, независимо от образования комплекса [82]. Уничтожение клеток происходит при более высоких концентрациях. Считается, что гибель клеток происходит из-за высвобождения нитей ДНК из комплекса хинолон–гираза–ДНК. То есть хинолоны в зависимости от концентрации способны действовать бактерицидно или бакетриостатически [82].

Для исследования совместного влияния хинолонов/ фторхинолонов и изотопов магния на рост бактерий *E. coli* использовались сертифицированные препараты: капли ципролет (действующее вещество ципрофлоксацин) и капли сигницеф (действующее вещество левофлоксацин).

На рисунках 2.16–2.17 представлены кинетики роста и соответствующие концентрационные зависимости констант скоростей роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на питательных средах М9 с изотопами магния и левофлоксацином разных концентраций.

Ростовые кривые бактерий *E. coli*, инкубируемых на питательных средах М9 с изотопами магния и ципрофлоксацином различных концентраций, представлены на рисунке 2.18. На рисунке 2.19 приведены зависимости констант скоростей роста от концентрации антибиотика, которые были получены после аппроксимации кинетики роста.

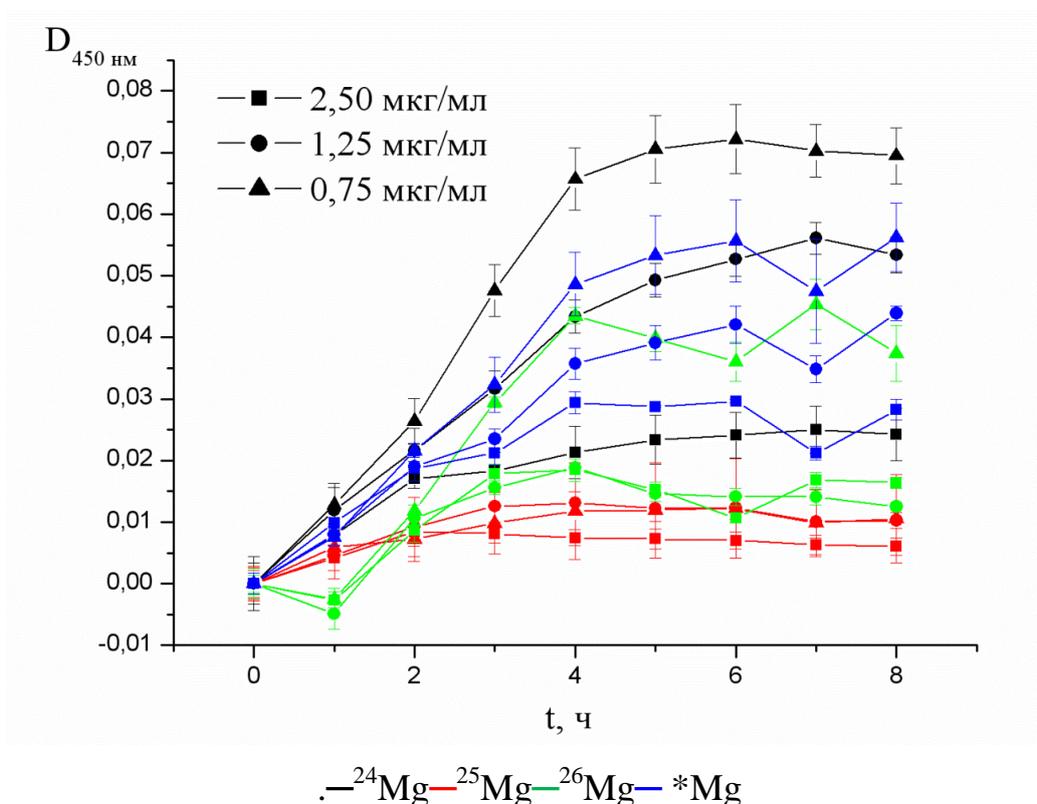


Рисунок 2.16 – Кинетика роста бактерий *E.coli*, инкубируемых на питательных средах М9 с изотопами магния и левофлоксацином ($n=6$)

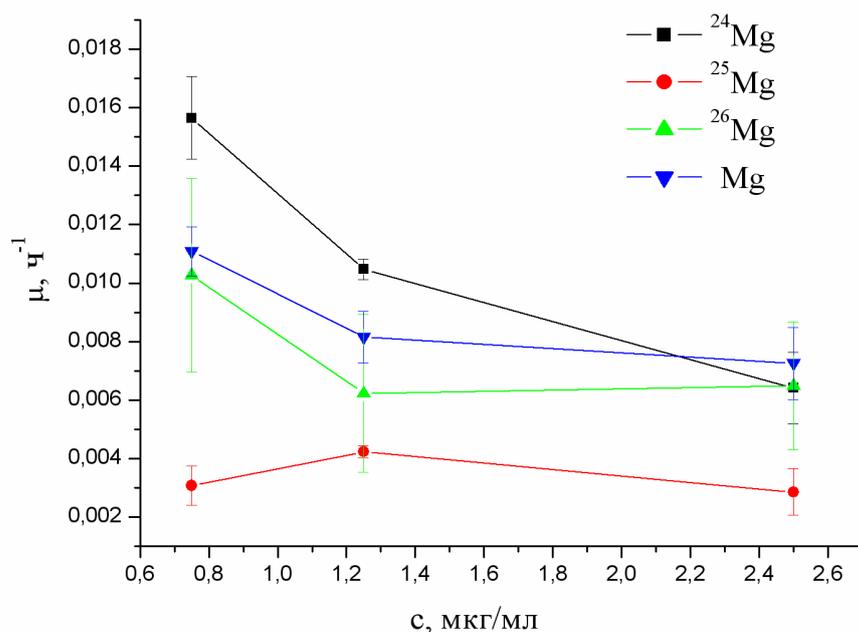


Рисунок 2.17 – Концентрационные зависимости констант скоростей роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с изотопами магния и левофлоксацином ($n=6$)

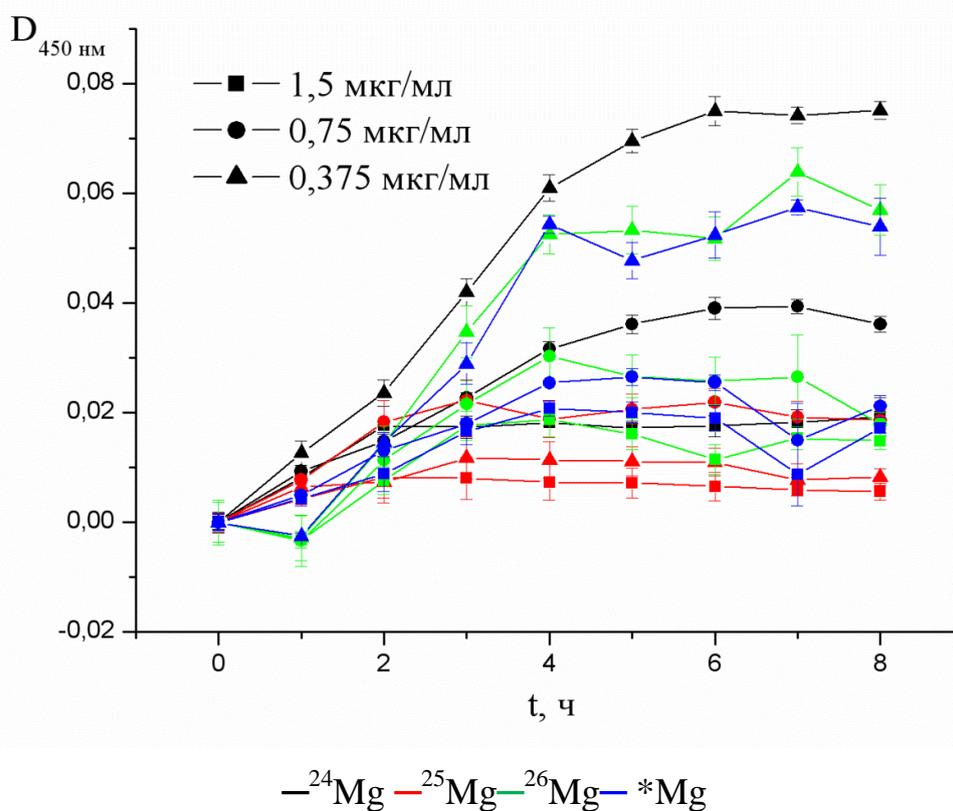


Рисунок 2.18 – Кинетика роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на питательных средах М9 с изотопами магния и ципрофлоксацином ($n=6$)

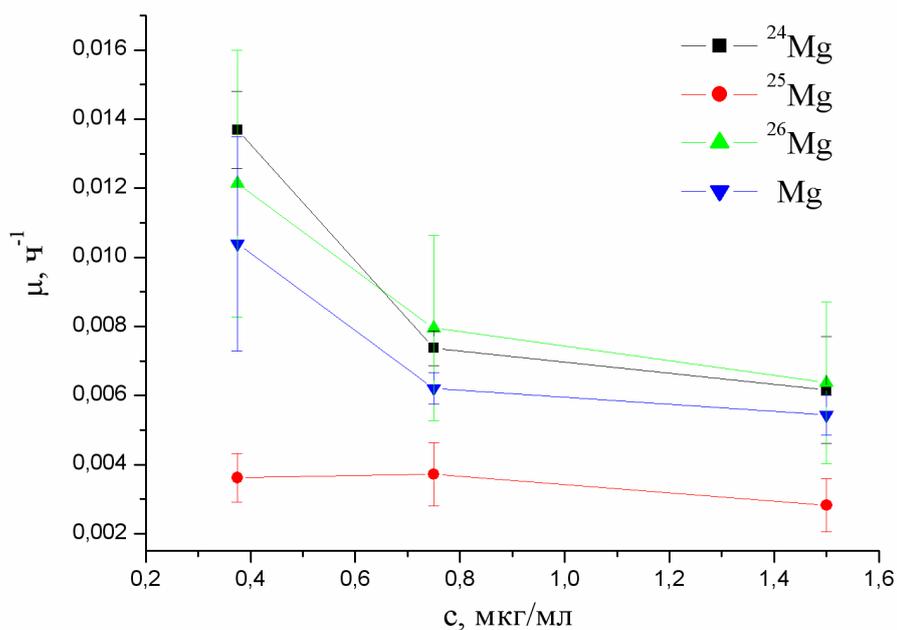


Рисунок 2.19 – Концентрационные зависимости констант скоростей роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с изотопами магния и ципрофлоксацином ($n=6$)

Анализ приведенных ростовых кривых и концентрационных зависимостей констант скоростей роста свидетельствует об обнаружении эффекта синергизма левофлоксацина и ципрофлоксацина и магнитного изотопа магния ^{25}Mg на рост бактерий *E. coli*. Даже для самой малой концентрации антибиотика зарегистрировано отсутствие роста бактерий в случае, если в питательной среде содержался именно магнитная форма магния ^{25}Mg (рисунки 2.17, 2.19). В то время как для среды с немагнитными изотопами $^{24,26}\text{Mg}$ незначительный рост бактериальной культуры наблюдается уже на самой высокой концентрации антибиотика. МИЭ магния в резистентности бактерий к хинолонам/фторхинолонам согласуется с результатами для рифампицина ([см. пункт 2.2.2.2](#)): наблюдается эффект потенцирования антибиотиков, действующих на различные стадии синтеза ДНК, магнитным изотопом магния ^{25}Mg .

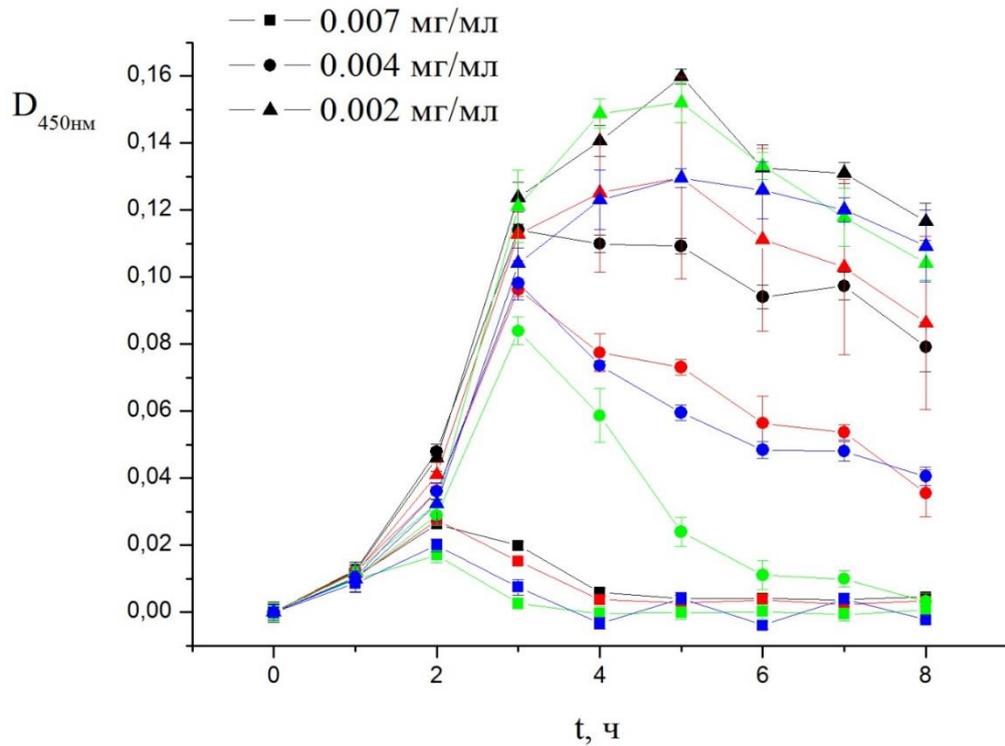
Представленные данные подтверждают ранее полученные результаты с применением диско-диффузионного метода исследования антимикробной активности бактерий ([см. пункт 2.2.1](#)). Подавление роста бактерий как результат

совместного влияния магнитного изотопа магния ^{25}Mg и антибиотиков группы хинолонов/фторхинолонов проявляется независимо от метода исследования. Обнаруженный эффект является независимым, надёжным подтверждением негативного влияния магнитного изотопа магния ^{25}Mg на синтез ДНК [13]. Кроме того, обнаруженный МИЭ магния в резистентности бактерий к хинолонам и ансамицинам свидетельствует о магнитной чувствительности ДНК-синтезирующих систем *in vivo*.

2.2.2.6 Цефалоспорины

Цефалоспорины относятся к классу бета-лактамовых антибиотиков, аналогично пенициллинам и карбапенемам. Механизм их действия связан с угнетением транспептидаз (PBP), участвующих в синтезе пептидогликана бактерий [70], что влечёт за собой разрушение клеточной стенки и гибель бактерий.

В экспериментальном исследовании использовались следующие сертифицированные препараты из группы цефалоспоринов: цефазолин и цефтриаксон в виде порошка для приготовления инъекций. На рисунках 2.20 и 2.22 представлены кинетики роста бактерий *E. coli*, культивируемых на средах M9 с изотопами магния и цефазолином или цефтриаксоном различных концентраций. Соответствующие зависимости констант скоростей роста от концентрации антибиотика приведены на рисунках 2.21 и 2.23.



—²⁴Mg—²⁵Mg—²⁶Mg—*Mg

Рисунок 2.20 – Кинетика роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на питательных средах М9 с изотопами магния и цефазолином ($n=6$)

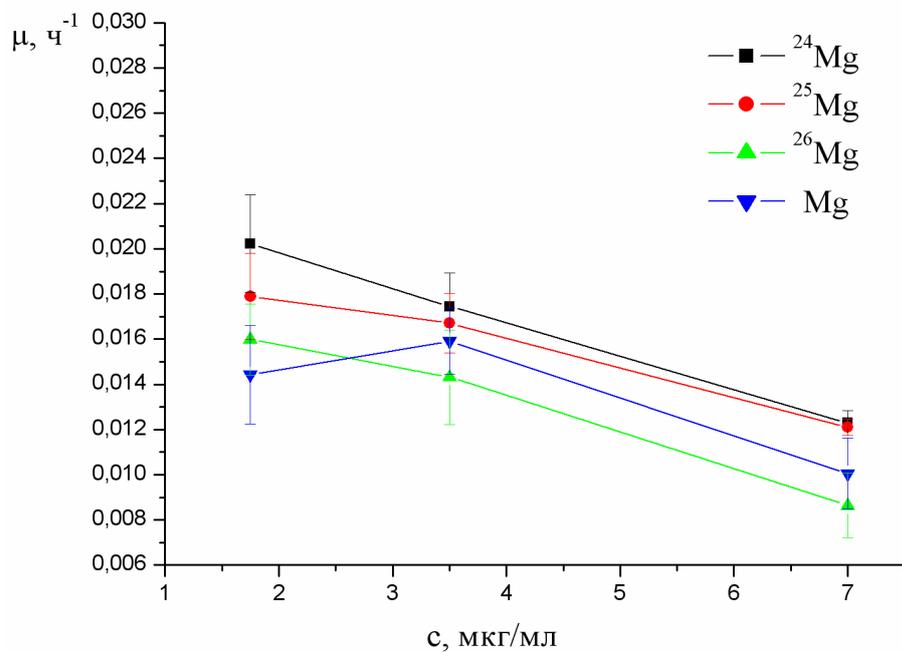


Рисунок 2.21 – Концентрационные зависимости констант скоростей роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с изотопами магния и цефазолином ($n=6$)

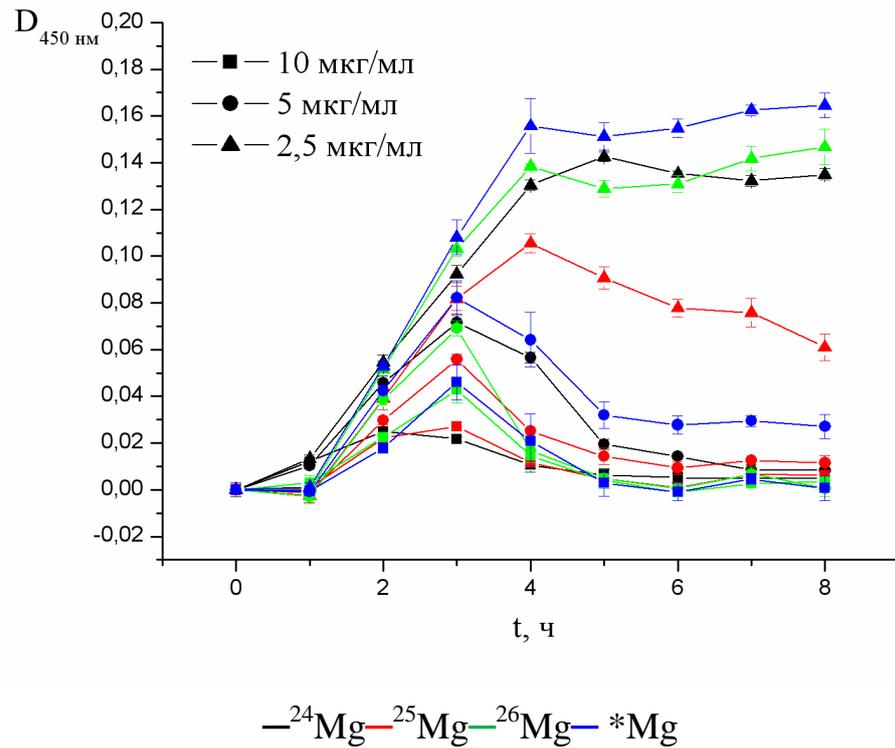


Рисунок 2.22 – Кинетика роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на питательных средах М9 с изотопами магния и цефтриаксоном ($n=6$)

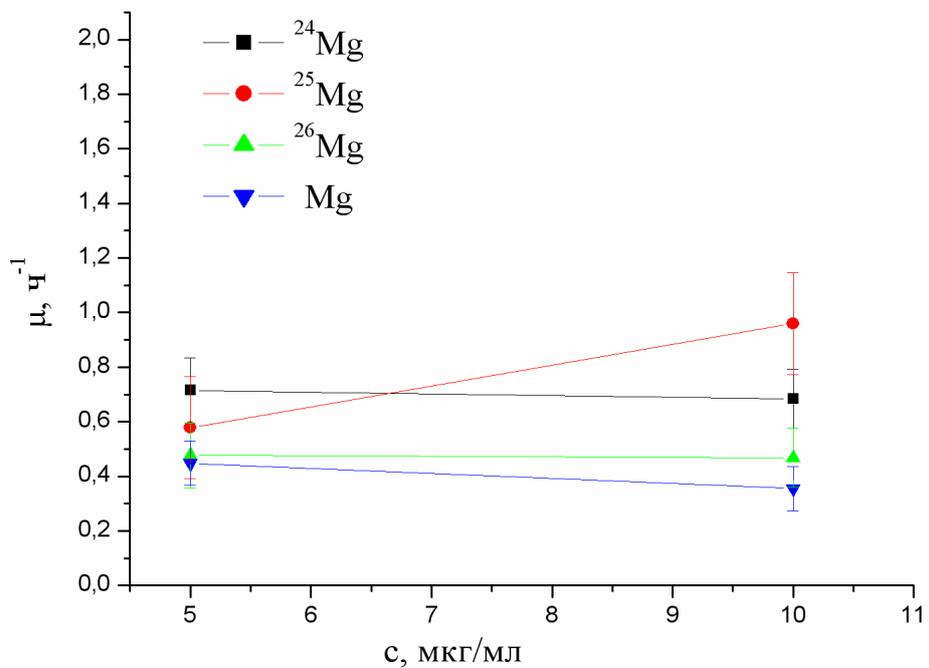


Рисунок 2.23 – Концентрационные зависимости констант скоростей роста бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с изотопами магния и цефтриаксоном ($n=6$)

В кинетике роста бактерий *E. coli* в присутствии цефалоспоринов зарегистрированы особенности роста аналогично влиянию пенициллинов ([см. пункт 2.2.2.4](#)): с 3-ого часа наблюдается появление фазы отмирания для больших концентраций антибиотика. Однако, каких-либо достоверных различий роста бактериальной культуры в зависимости от типа (магнитный/немагнитный) изотопа магния в питательной среде М9 обнаружено не было.

2.2.3 Изменения морфологии бактериальных клеток как результат влияния антибиотиков и изотопов магния

На первом этапе исследований совместного влияния антибиотиков и изотопов магния на морфологию бактерий *E. coli* были получены и проанализированы АСМ-изображения контрольных образцов – бактерий *E. coli*, выращенных на питательном бульоне LB и на синтетической питательной среде М9 с природным магнием без добавления антибиотиков. На рисунке 2.24а,б приведены полученные АСМ-изображения бактериальных клеток.

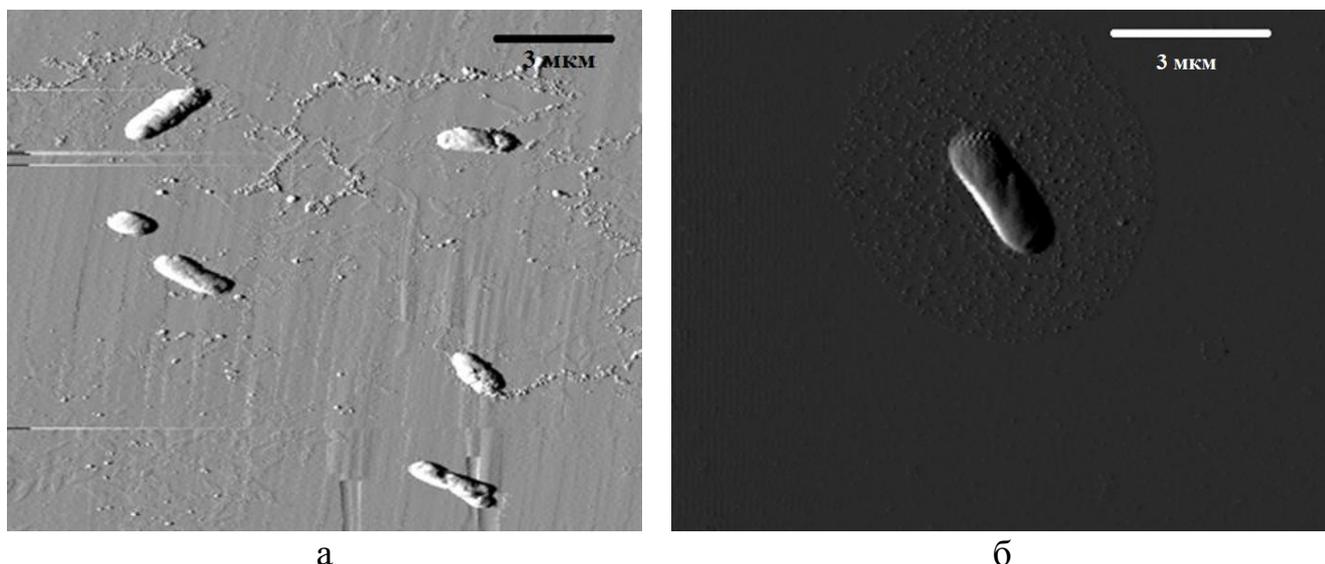


Рисунок 2.24 – а) АСМ-изображение бактерий *E. coli*, выращенных на среде LB; б) на среде М9

Для клеток, растущих в нормальных условиях (LB-бульон), характерно отдельное расположение и клеточная стенка без видимых повреждений. Диаграмма морфометрических показателей представлена на рисунке 2.25. Средняя длина клетки составляет 1,5–2 мкм.

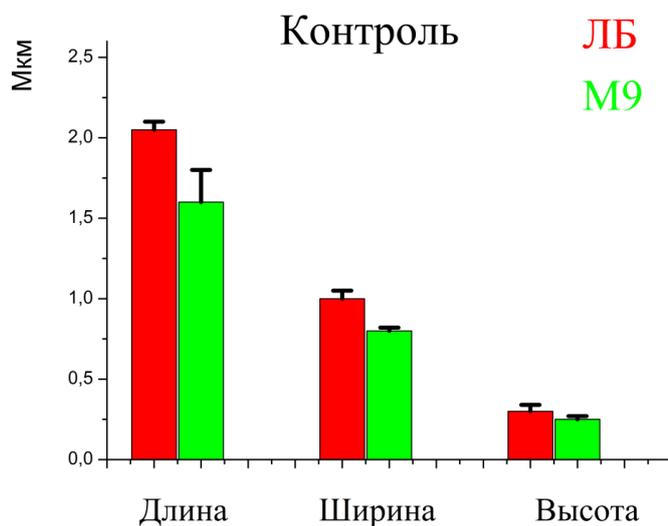


Рисунок 2.25 – Диаграмма размеров бактерий *E. coli*, выращенных на среде LB и M9 ($n=6$)

Сравнение морфометрических показателей говорит о снижении размеров клеток при их культивировании на обедненной среде M9 по сравнению с богатой питательной средой LB. При культивировании бактерий на среде M9, содержащей различные изотопы магния, не было выявлено статистически достоверных различий. Морфометрические показатели для этих бактерий приведены в таблице 2.3.

Таблица 2.3 – Морфометрические показатели бактерий *E. coli*, культивируемых в средах М9 с изотопами магния ^{24}Mg , ^{25}Mg и ^{26}Mg без антибиотиков ($n=10$)

Изотоп Mg в среде М9	Длина, мкм	Ширина, мкм	Высота, нм	Шероховатость, %*
^{24}Mg	2,01±0,12	0,82±0,08	250±15	72,52±8,25
^{25}Mg	1,95±0,14	0,90±0,06	240±14	82,29±6,89
^{26}Mg	2,12±0,18	0,90±0,07	250±15	91,58±9,02

*в % по отношению к шероховатости для бактерий, инкубируемых на среде М9 с природным магнием

Анализ профиля шероховатости таких бактерий показал, что шероховатость бактерий возрастает при увеличении атомной массы изотопов. Наблюдается классический, масс-зависимый изотопный эффект. Это может быть связано с эволюционной приспособленностью клеток к природному магнию. При этом анализ средних значений шага выступа профиля не выявил достоверных различий.

Следующий этап исследований состоял непосредственно в получении АСМ-изображений бактерий *E. coli*, выращенных в средах М9 с каждым из изотопов магния в комбинации с антибиотиками различных групп. Полученные изображения и их анализ приводятся в последующих пунктах.

2.2.3.1 Аминогликозиды

На рисунке 2.26 приведены полученные АСМ-изображения бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с изотопами магния и амикацином.

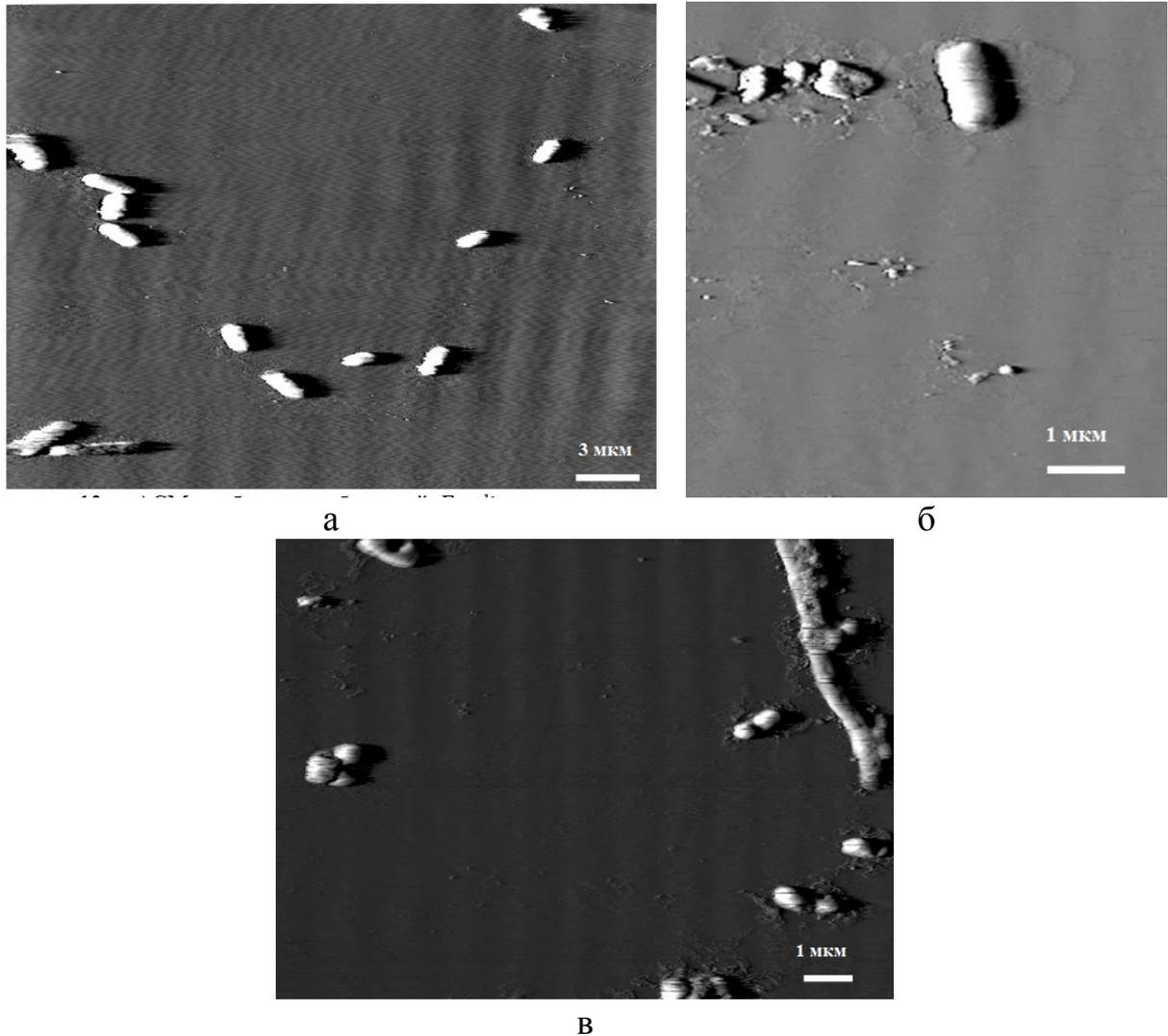


Рисунок 2.26 – АСМ-изображение бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с амикацином и изотопами магния а) ^{24}Mg , б) ^{25}Mg и в) ^{26}Mg

Диаграмма морфометрических параметров клеток приведена на рисунке 2.27.

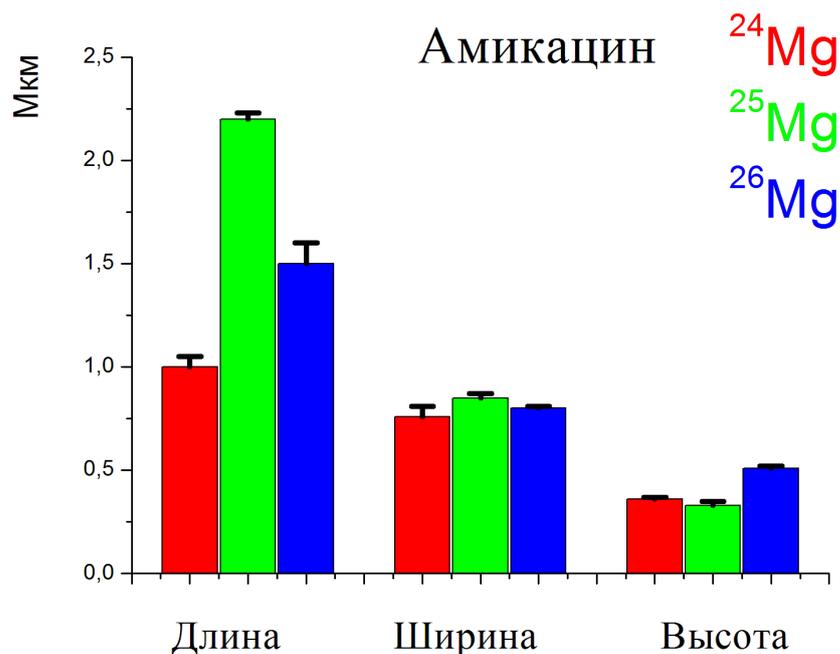


Рисунок 2.27 – Диаграмма размеров клеток *E. coli*, выращенных в присутствии амикацина и изотопов магния ($n=10$)

Длина бактерий, инкубируемых на среде М9 с магнитным изотопом магния ²⁵Mg, соответствовала таковой для контрольных образцов (таблица 2.3), что свидетельствует об отсутствии воздействия антибиотика на морфологию клеток. При этом микроорганизмы, инкубируемые на средах с немагнитными формами, демонстрировали тенденцию к образованию сферических клеток (рисунок 2.26в) и были в 1,5-2 раза короче.

На рисунке 2.28 приведены АСМ-изображения бактерий *E. coli*, выращенных на средах М9 с изотопами магния и другим антибиотиком из группы аминогликозидов – канамицином.

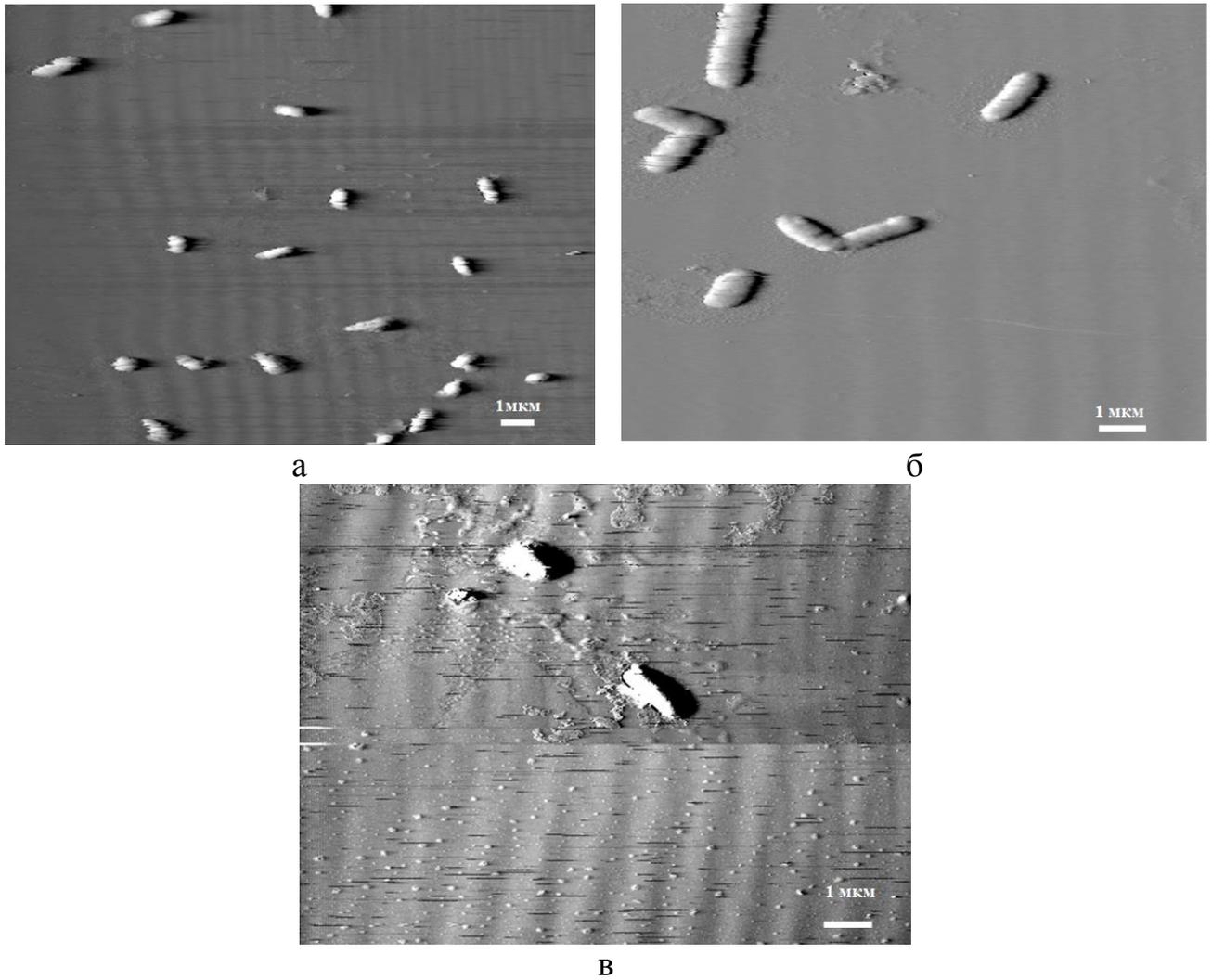


Рисунок 2.28 – АСМ-изображения бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 канамицином и изотопами магния а) ^{24}Mg , б) ^{25}Mg и в) ^{26}Mg

Сравнительная диаграмма морфометрических параметров клеток, полученная после обработки изображений, представлена на рисунке 2.29.

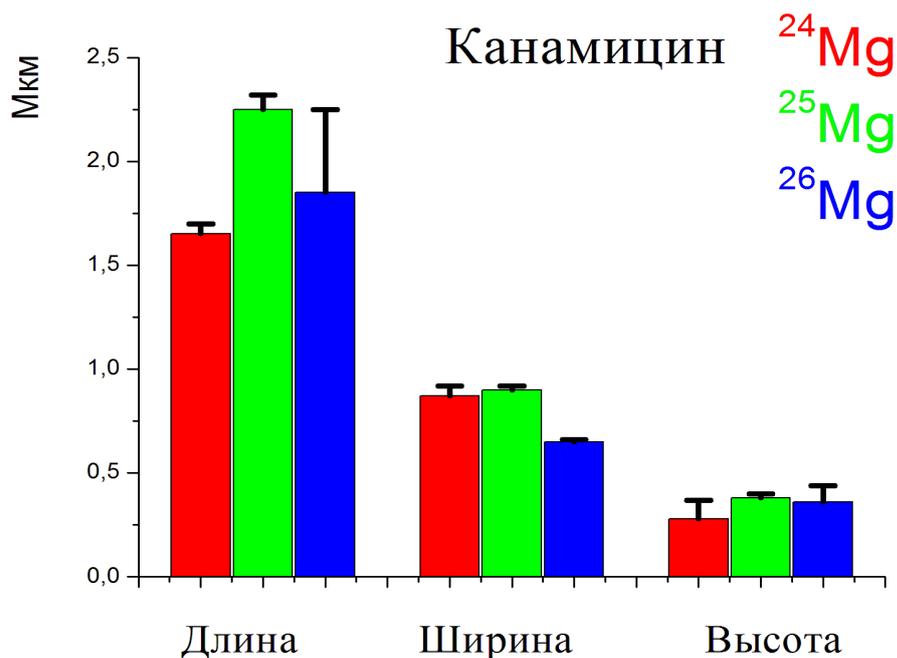


Рисунок 2.29 – Диаграмма размеров клеток *E. coli*, выращенных в присутствии канамицина и изотопов магния ($n=10$)

Большинство клеток, подвергнувшихся воздействию канамицина, имеют нормальную форму с гладкой поверхностью. Значит, клеточная стенка не была повреждена и цитоплазма осталась в клетке. На рисунке 2.28а,б заметно появление сферических клеток. Очевидно, что при наличии магнитного изотопа магния ^{25}Mg в питательной среде бактерии чувствуют себя лучше, так как их размеры соответствуют размерам в контрольной группе (таблица 2.3).

На рисунке 2.30 приведены АСМ-изображения бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с изотопами магния и тобрамицином.

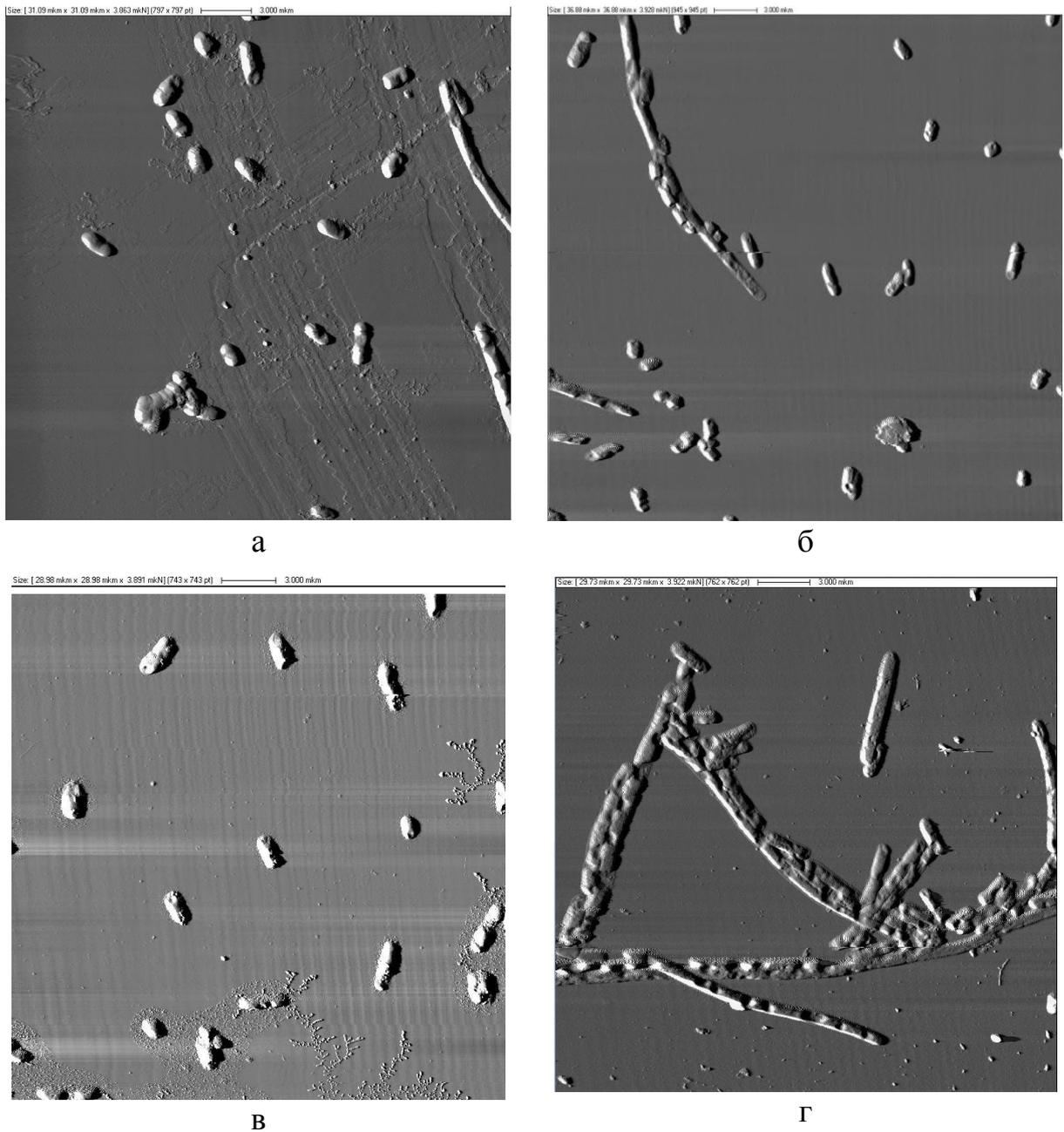


Рисунок 2.30 – АСМ-изображения бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с тобрамицином и изотопами магния а) ^{24}Mg , б) ^{25}Mg , в) ^{26}Mg и г) $^*\text{Mg}$

На рисунке 2.31 представлены результаты измерения размеров бактерий, подвергнувшихся воздействию тобрамицина и различных изотопов магния.

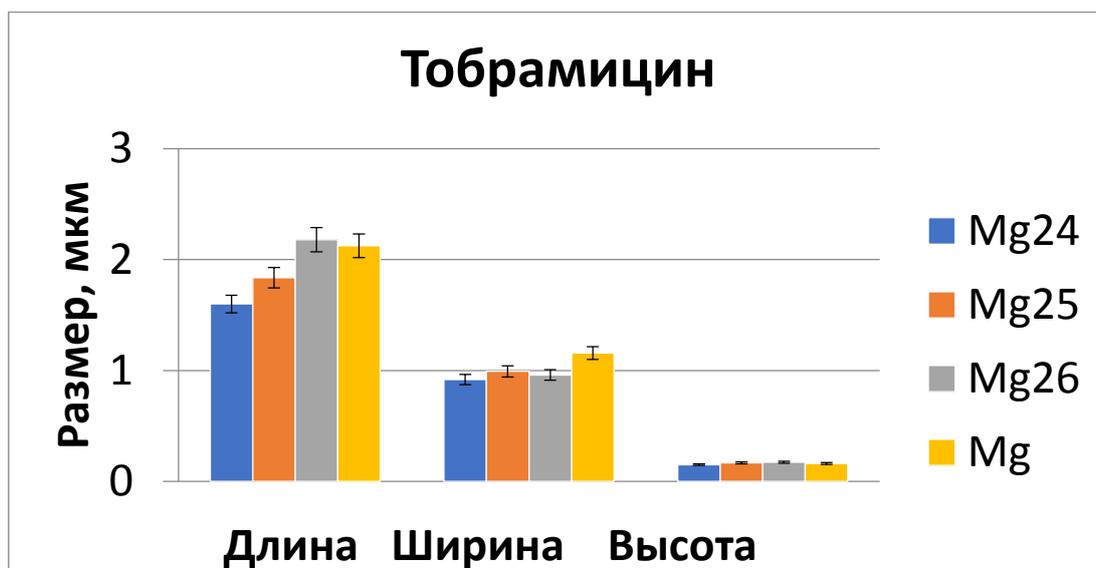


Рисунок 2.35 – Диаграмма размеров клеток *E. coli*, выращенных в присутствии тобрамицина и изотопов магния ($n=10$)

На АСМ-изображениях клетки расположены по отдельности, без слипания (за исключением бактерий, выращенных на среде с природным магнием). Поверхность клеток гладкая, с редкой вакуолизацией.

Для бактерий, которые инкубировались на среде М9 с магнитным изотопом магния ^{25}Mg , чаще наблюдалось слипание клеток. Ещё одним характерным признаком таких клеток является образование так называемых «желобков» или пор. Появление этих образований и объясняет значительные различия средней шероховатости и шага выступов профиля для бактерий, подвергнувшихся совместному воздействию тобрамицина и магнитного изотопа магния ^{25}Mg (рисунок 2.36). Значения этих показателей меньше в два раза по сравнению с бактериями, выращенными на среде М9 с тобрамицином и немагнитными изотопами магния $^{24,26}\text{Mg}$. При этом показатели шероховатости для клеток, культивируемых в средах с немагнитными изотопами и природным магнием, не различаются между собой. Подробнее особенности морфологии бактерий *E. coli*, инкубируемых с тобрамицином и изотопами магния, будут рассмотрены в пункте [2.2.3.7.](#)

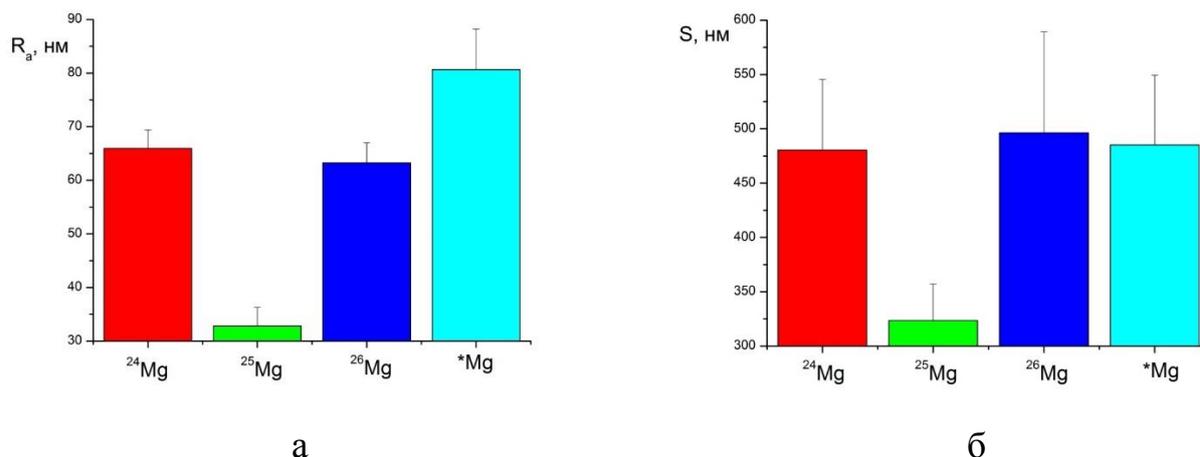


Рисунок 2.36 – Диаграмма средних арифметических значений отклонения (а) и шага выступов (б) профиля шероховатости бактерий *E. coli*, культивируемых в присутствии тобрамицина и изотопов магния ($n=10$)

2.2.3.2 Ансамицины

АСМ-изображения бактерий *E. coli*, инкубируемых в питательных средах среде М9 с изотопами магния и рифампицином (представитель ансамицинов), представлены на рисунке 2.37. Диаграмма морфометрических параметров клеток приведена на рисунке 2.38. Анализ экспериментальных данных показал, что в присутствии ^{25}Mg бактерий *E. coli* оказались менее жизнеспособны: на рисунке 2.37б заметны результаты разрушения клеток, следы их лизиса и «обломки». При этом размеры целых клеток, выращенных в присутствии магнитного магния, не отличаются от тех, что культивировались с немагнитными изотопами $^{24,26}\text{Mg}$.

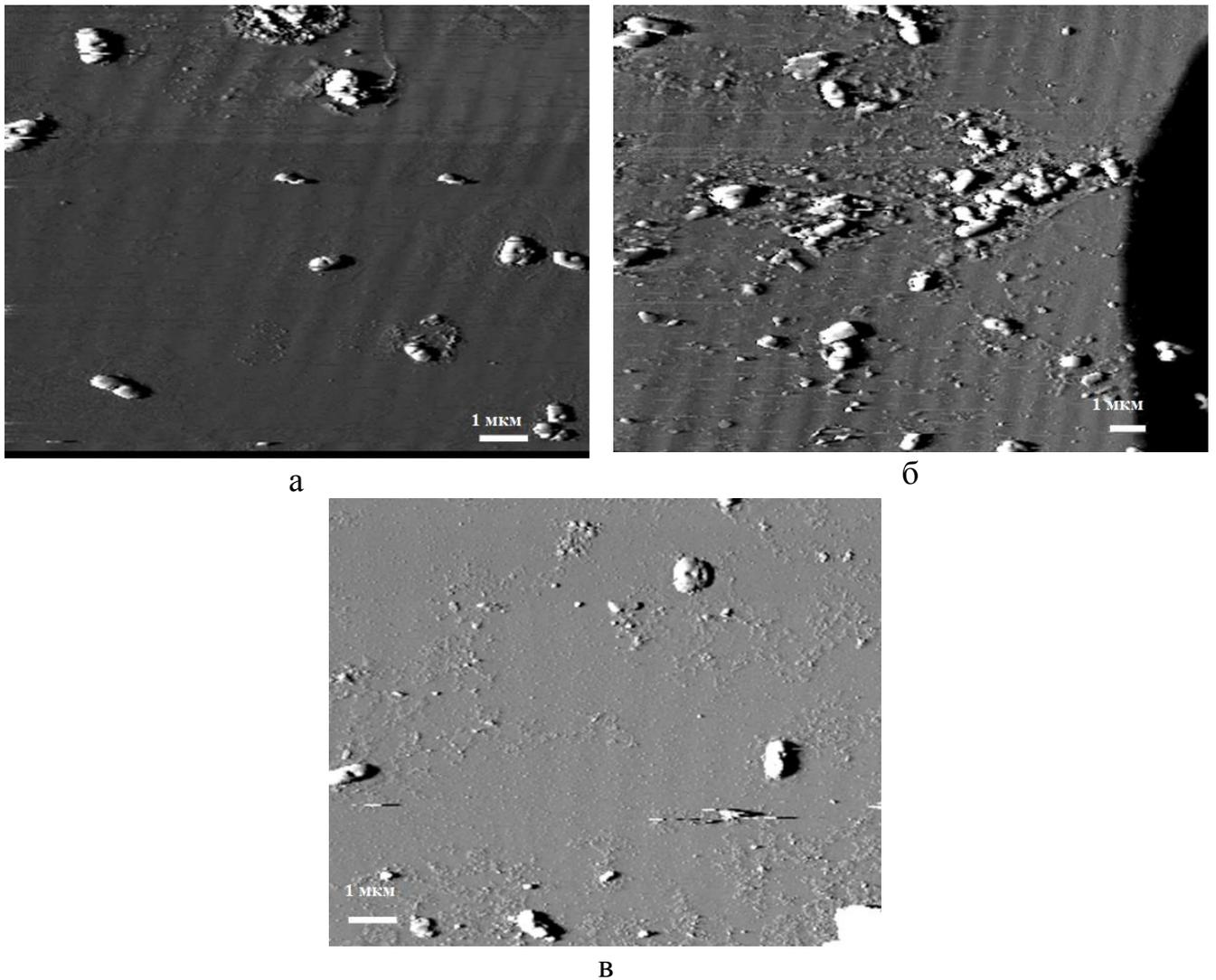


Рисунок 2.37 – АСМ-изображения бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с рифампицином и изотопами магния а) ^{24}Mg , б) ^{25}Mg и в) ^{26}Mg

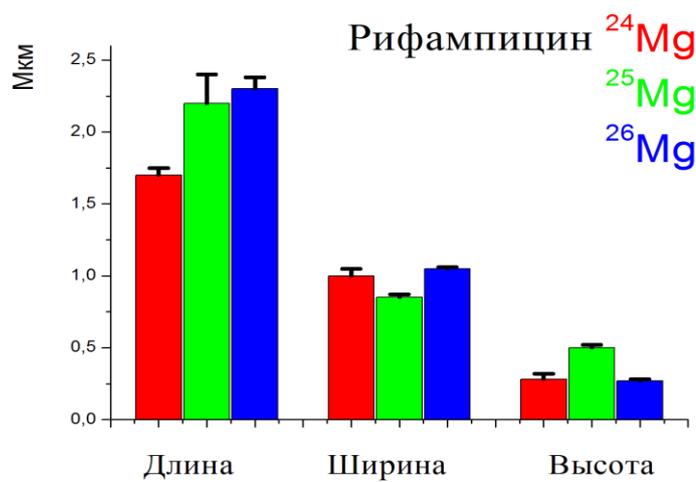


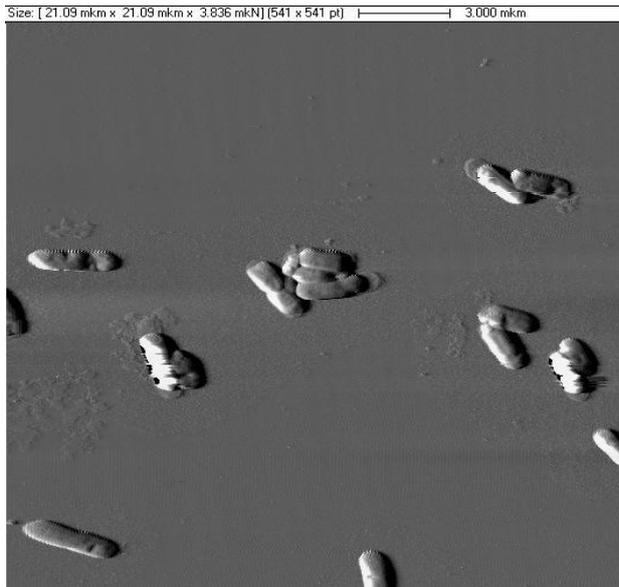
Рисунок 2.38 – Диаграмма размеров клеток *E. coli*, выращенных в присутствии рифампицина и изотопов магния ($n=10$)

Для бактерий, выращенных в присутствии немагнитных изотопов, характерно появление клеток округлой формы и отверстий в клеточной стенке, что говорит о нарушении функционирования аппарата клеточного скелета. То есть действие рифампицина на морфологию бактерий зависит от типа изотопа магния, который присутствовал в питательной среде, что согласуется с результатами исследования особенностей роста таких микроорганизмов ([см. пункт 2.2.2.2](#)).

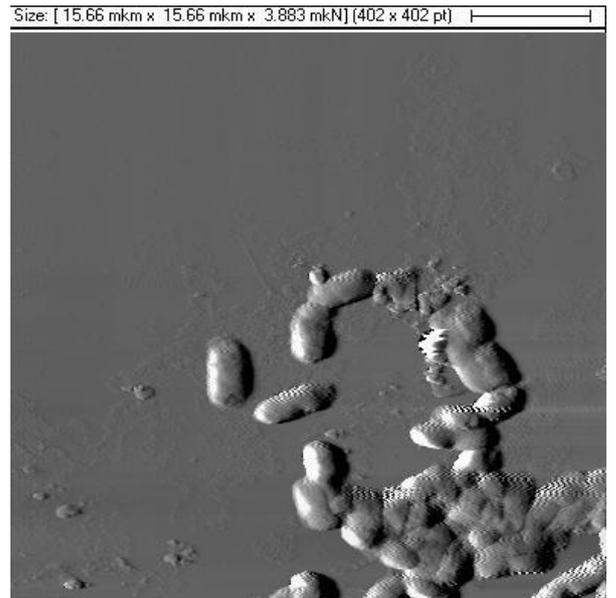
2.2.3.3 Линкозамиды

На рисунке 2.39 приведены АСМ-изображения бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с изотопами магния и линкомицином (представитель линкозамидов). Обработка полученных изображений позволила сопоставить морфометрические параметры клеток, представленные в виде диаграммы на рисунке 2.40.

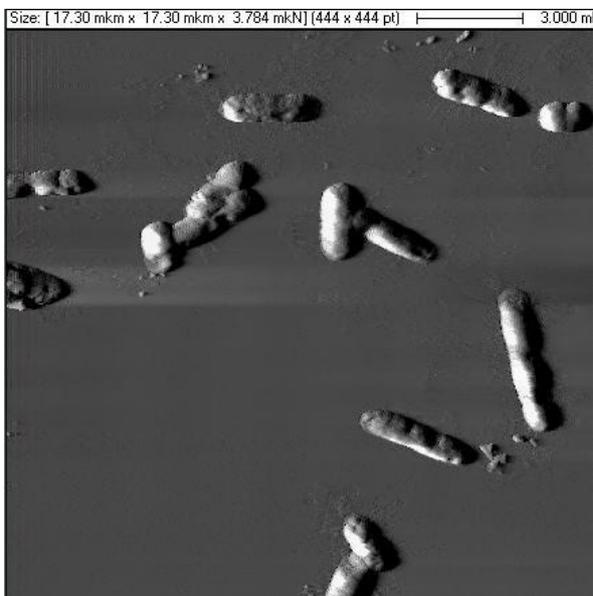
Клетки, выращенные в присутствии ^{24}Mg , расположены отдельно, образование пор определяется редко. В остальных случаях (при культивировании в присутствии $^{25,26}\text{Mg}$ и природного магния Mg), поры встречаются чаще, на поверхности клеток появляются бороздки, клетки зачастую расположены парами. В особенности такая картина характерна для бактерий, инкубируемых на среде М9 с магнитным изотопом магния ^{25}Mg . Это справедливо и для 100 % содержания магния ^{25}Mg в среде и для 10 % - для среды М9 с природным магнием. То есть можно говорить о слабом совместном эффекте магнитного изотопа магния и линкомицина в морфологии бактерий. При этом достоверных различий между размерами бактерий в различных экспериментальных группах не было зарегистрировано.



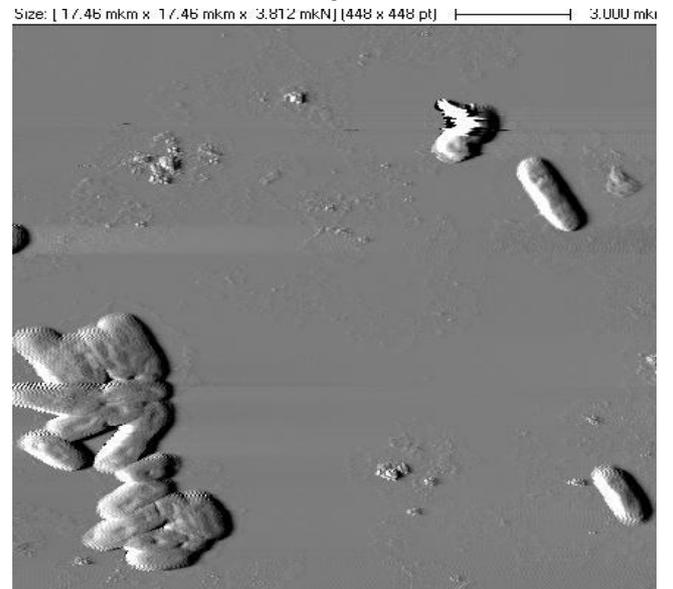
а



б



в



г

Рисунок 2.39 – АСМ-изображения бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с линкомицином и изотопами магния а) ^{24}Mg , б) ^{25}Mg , в) ^{26}Mg и г) Mg

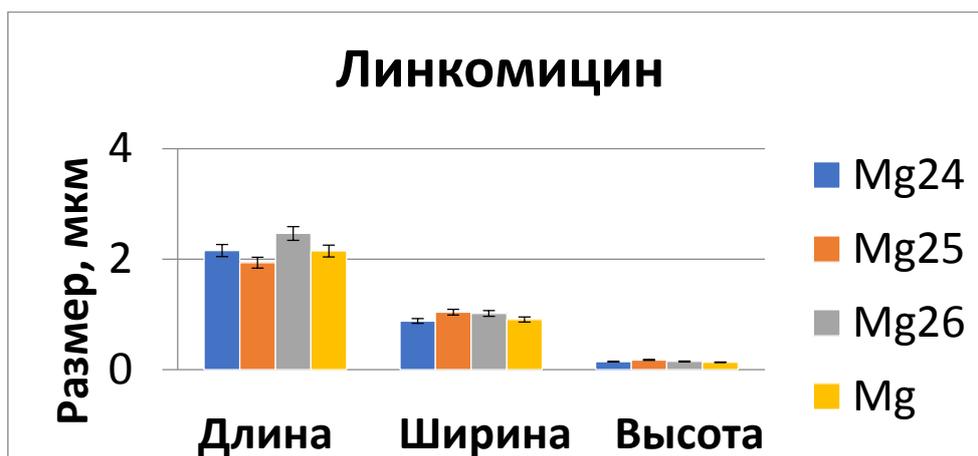


Рисунок 2.40 – Диаграмма размеров клеток *E. coli*, выращенных в присутствии линкомицина и изотопов магния ($n=10$)

Данные шероховатости и шага выступов профиля (рисунок 2.41) подтверждают различное действие линкомицина на бактерии в присутствии магнитного изотопа магния ^{25}Mg . Для этого случая оба показателя оказываются значительно ниже (до 2 раз) по сравнению с бактериями, инкубируемыми в средах с немагнитными изотопами магния и природным магнием. При этом шероховатость и шаг выступов профиля бактериальных клеток, подвергнувшихся действию линкомицина и немагнитных изотопов магния $^{24,26}\text{Mg}$, находятся в пределах погрешности. Важно отметить, что так же, как и тобрамицин, линкомицин нарушает процесс белкового синтеза, блокируя одну из субъединиц рибосом [66]. Для обоих антибиотиков обнаружен МИЭ магния ^{25}Mg в морфологии бактерий, который проявляется, в том числе, как изменение шероховатости бактериальных клеток. Таким образом, можно сделать вывод, что процесс белкового синтеза – является магниточувствительным или спин-зависимым, и он будет протекать с разной эффективностью для магнитного и немагнитных изотопов магния.

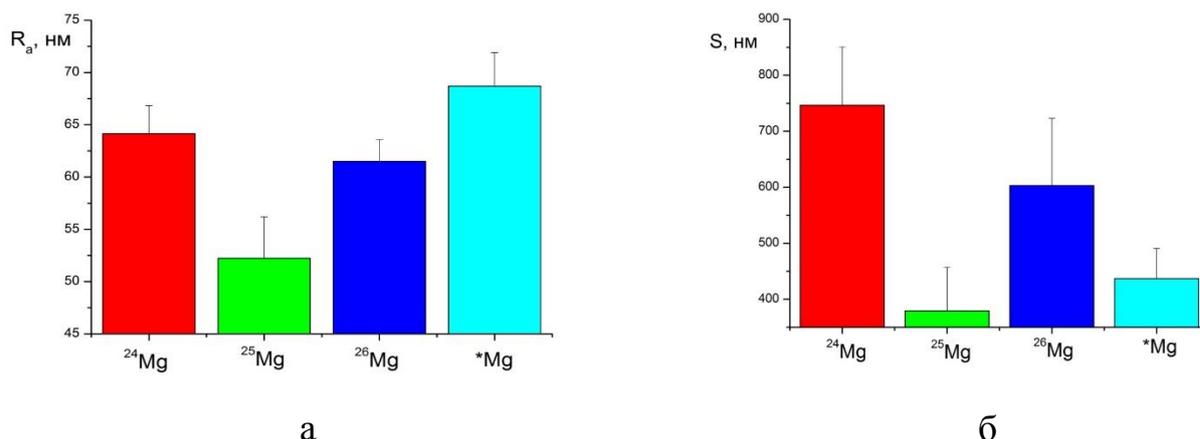


Рисунок 2.41 – Диаграмма средних арифметических значений отклонения (а) и шага выступов (б) профиля шероховатости бактерий *E. coli*, культивируемых в присутствии линкомицина и изотопов магния ($n=10$)

2.2.3.4 Пенициллины

АСМ-изображения бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с изотопами магния и ампициллином (представитель пенициллинов), представлены на рисунке 2.42. На изображениях различимы плоские клетки с многочисленными шероховатостями поверхности и следами повреждения клеточной мембраны. Одно из наиболее ярких изменений морфологии бактерий после воздействия ампициллина – это так называемая филаментация или удлинение клеток. Степень удлинения клеток велика и превышает размер контрольных клеток в несколько раз (таблица 2.3). Поэтому проследить корреляцию средних значений размеров клеток, обогащенных магнитным и немагнитными изотопами магния, не представляется возможным. Появление филаментации связано с механизмом действия пенициллинов, нарушающих синтез пептидогликанового слоя [67].

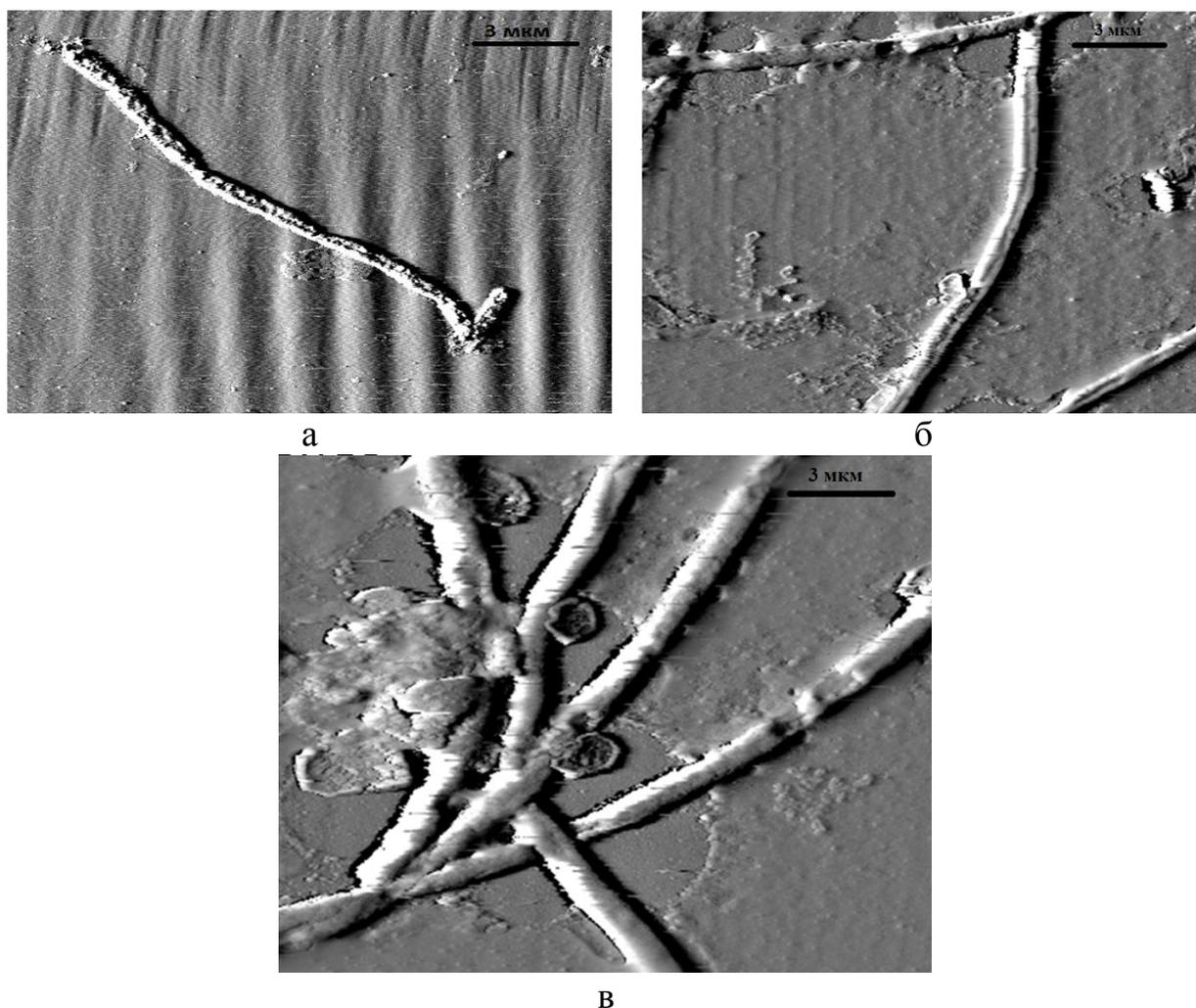


Рисунок 2.42 – АСМ-изображения бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с ампициллином и изотопами магния а) ^{24}Mg , б) ^{25}Mg и в) ^{26}Mg

2.2.3.5 Цефалоспорины

На рисунке 2.43 представлены АСМ-изображения бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с изотопами магния и цефтриаксоном – представителем цефалоспоринов. Как и пенициллины, цефалоспорины подавляют синтез пептидогликанового слоя бактерий [70]. Картина клеточных повреждений и морфологических изменений при действии цефтриаксона на бактерии аналогична действию ампициллина (рисунок 2.42).

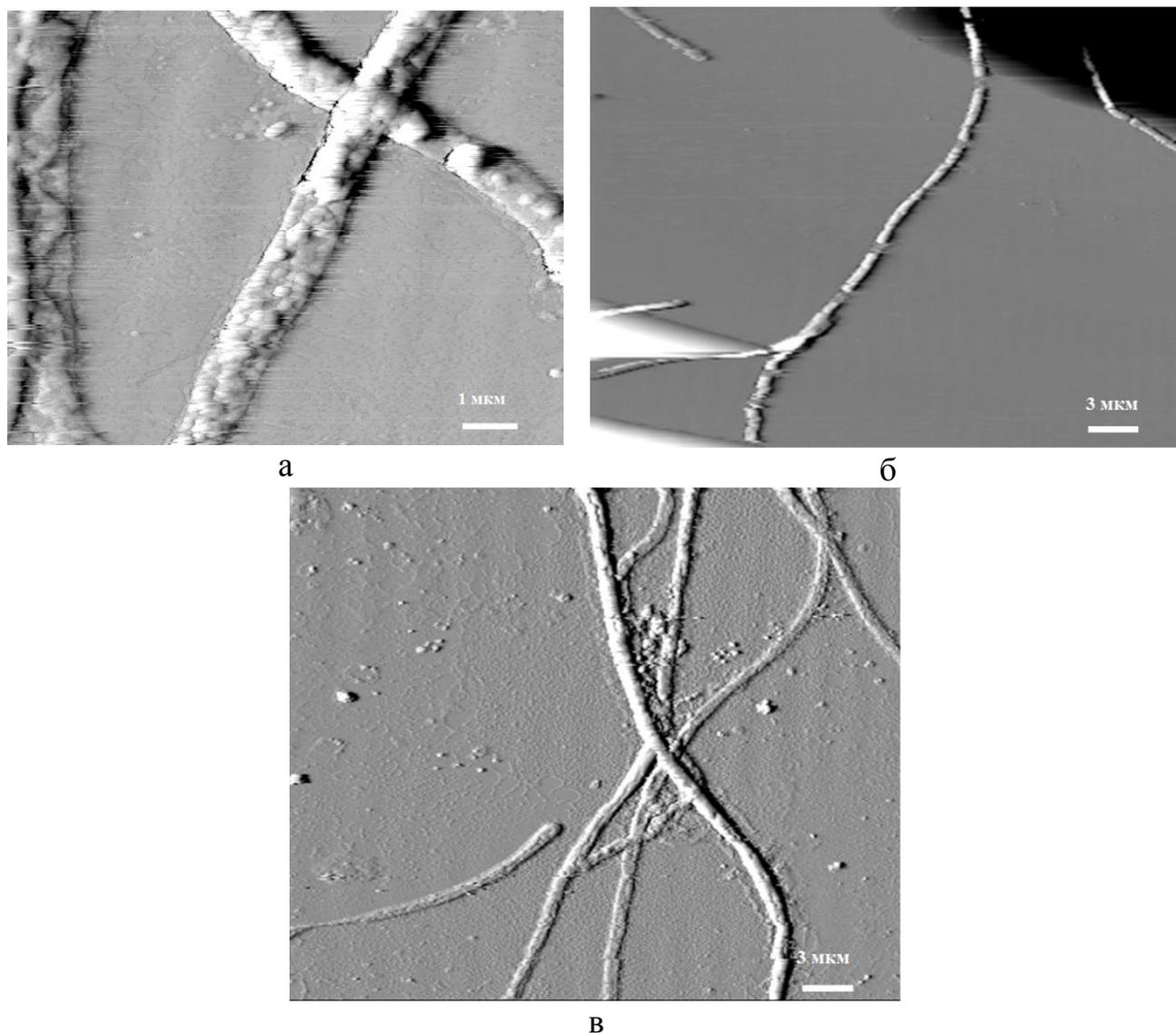


Рисунок 2.43 – АСМ-изображения бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с цефтриаксоном и изотопами магния а) ^{24}Mg , б) ^{25}Mg и в) ^{26}Mg

Для бактерий, растущих на средах М9 со всеми изотопами магния, наблюдается значительная филаментация. Длина таких бактерий-нитей более 60 мкм (рисунок 2.43). Кроме того, заметны следы клеточного лизиса, как результат повреждения клеточной мембраны и высвобождения аутолитических ферментов. На рисунке 2.43в можно различить появление клеток-«призраков», которые имеют небольшую высоту и практически полностью разрушены. Значительных различий для бактерий, выращенных в присутствии магнитного и немагнитных изотопов магния не зарегистрировано.

2.2.3.6 Фторхинолоны

На рисунках 2.44–2.45 приведены АСМ-изображения бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с изотопами магния и фторхинолонами: левофлоксацином и ципрофлоксацином.

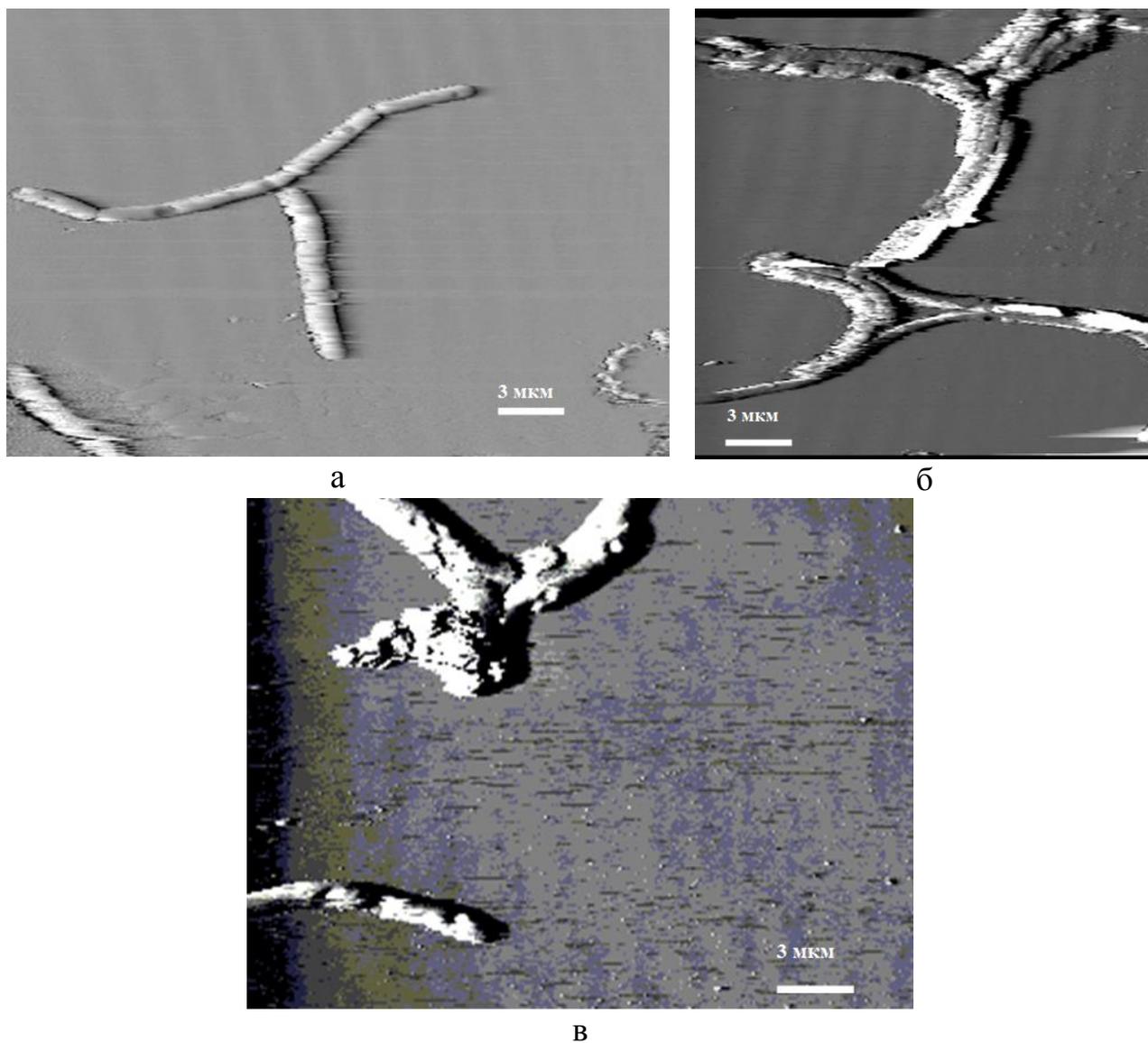


Рисунок 2.44 – АСМ-изображения бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с левофлоксацином и изотопами магния а) ^{24}Mg , б) ^{25}Mg и в) ^{26}Mg

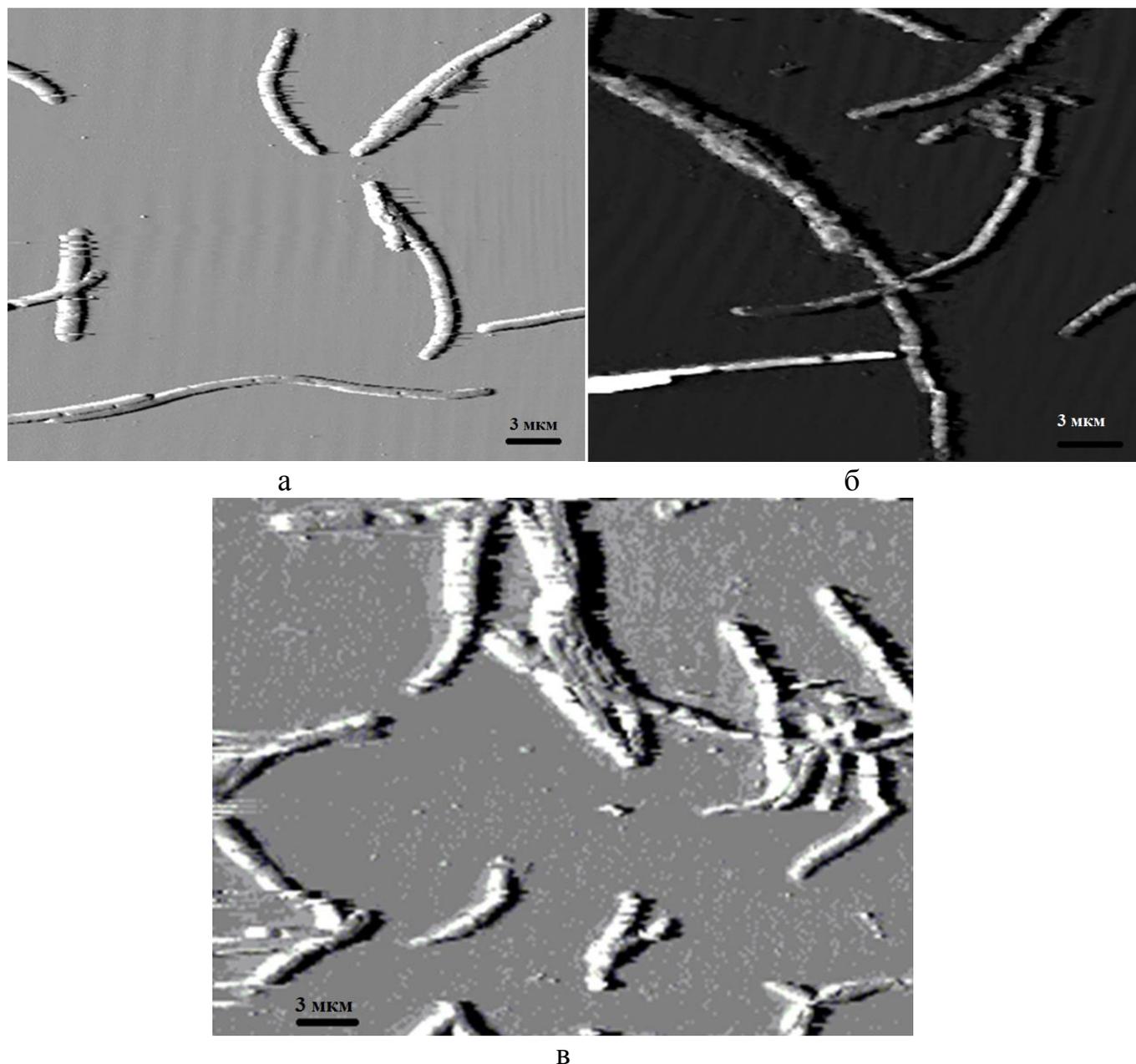


Рисунок 2.45 – АСМ-изображения бактерий *E. coli*, инкубируемых на средах М9 с ципрофлоксацином и изотопами магния а) ^{24}Mg , б) ^{25}Mg и в) ^{26}Mg

Особенностью морфологии бактерий, подвергнувшихся воздействию фторхинолонов, является филаментация. Происходит значительное удлинение клеток, поверхность сильно шероховата. Но существуют следующие отличия от действия пенициллинов и цефалоспоринов на морфологию клеток:

- средняя длина клеток составляет от 7 до 10 мкм, что значительно меньше, чем при действии бета-лактамных антибиотиков (около 60 мкм);
- заметно наличие перетяжек.

Эти отличия в совокупности свидетельствуют о нарушении процесса деления бактерий, а не подавления синтеза пептидогликанового слоя. Более подробный анализ приведенных изображений дан в пункте [2.2.3.7](#).

2.2.3.7 Основные особенности морфологии бактерий *E. coli*: МИЭ магния

Получены и проанализированы АСМ-изображения бактериальных клеток *E. coli*, культивируемых на среде М9 с изотопами магния и антибиотиками. При культивировании бактерий в присутствии антибиотиков различных групп были обнаружены следующие типы морфологических изменений: филаментация, клеточный лизис, образование клеточных агломератов, разрушение пептидогликанового слоя, образование «желобков» или пор. При этом значимых МИЭ магния в морфологии бактерий при действии ампициллина, амикацина, канамицина, цефтриаксона не было обнаружено. Самые интересные эффекты отображены в таблице 2.4, в которой представлены результаты морфологических изменений в бактериях, подвергнувшихся действию ципрофлоксацина, левофлоксацина, тобрамицина и линкомицина. Все данные представлены по отношению к контролю (таблица 2.3) в %.

Таблица 2.4 - Морфометрические показатели бактерий *E. coli*, культивируемых в средах М9 с изотопами магния ^{24}Mg , ^{25}Mg и ^{26}Mg и антибиотиками* [18]

	Изотоп Mg в среде М9	Ципрофлоксацин	Левовфлоксацин	Тобрамицин	Линкомицин
С антибиотика, мкг/мл*		0,38	0,33	0,94	19
Длина, %**	^{24}Mg	>299±50	>398±29	80±10	107±8
	^{25}Mg	>462±41 ^б	>513±53 ^б	90±5	97±10
	^{26}Mg	>283±43	>330±48	96±10	109±10
Ширина, %**	^{24}Mg	106±9	111±13	105±6	100±5
	^{25}Mg	152±12 ^б	137±10 ^б	108±6	114±5 ^а
	^{26}Mg	102±8	99±6	101±12	107±4
Высота, %**	^{24}Mg	84±6	76±7	84±8	72±8
	^{25}Mg	42±7 ^б	58±6 ^б	96±5	83±8
	^{26}Mg	80±8	72±7	88±3	72±9
Шероховатость, %**	^{24}Mg	- ^в	- ^в	91±6	89±9
	^{25}Mg	- ^в	- ^в	40±9 ^б	64±5 ^а
	^{26}Mg	- ^в	- ^в	69±11	72±8
Виды повреждений	^{24}Mg	филаментация	филаментация	повреждения клеточно-стенки	образование пор и бороздок
	^{25}Mg	филаментация, клеточный лизис, слипания клеток	филаментация (рис.2.46а), клеточный лизис	слипания, образование «желобков» (рис.2.46б), лизис (рис.2.46д)	Слипание клеток (рис.2.46в), образование пор и бороздок
	^{26}Mg	филаментация	филаментация	Повреждения клеточной стенки	Повреждения клеточной стенки (рис.2.46г), образование пор и бороздок

*концентрация антибиотика 1/2 МИК

** в % от значений для контрольных образцов (таблица 2.3)

а) различия статистически значимы при $p < 0,05$ ($n=10$); б) различия статистически значимы при $p < 0,001$ ($n=10$); в) измерение шероховатости было невозможно из за аномальной длины бактериальных клеток

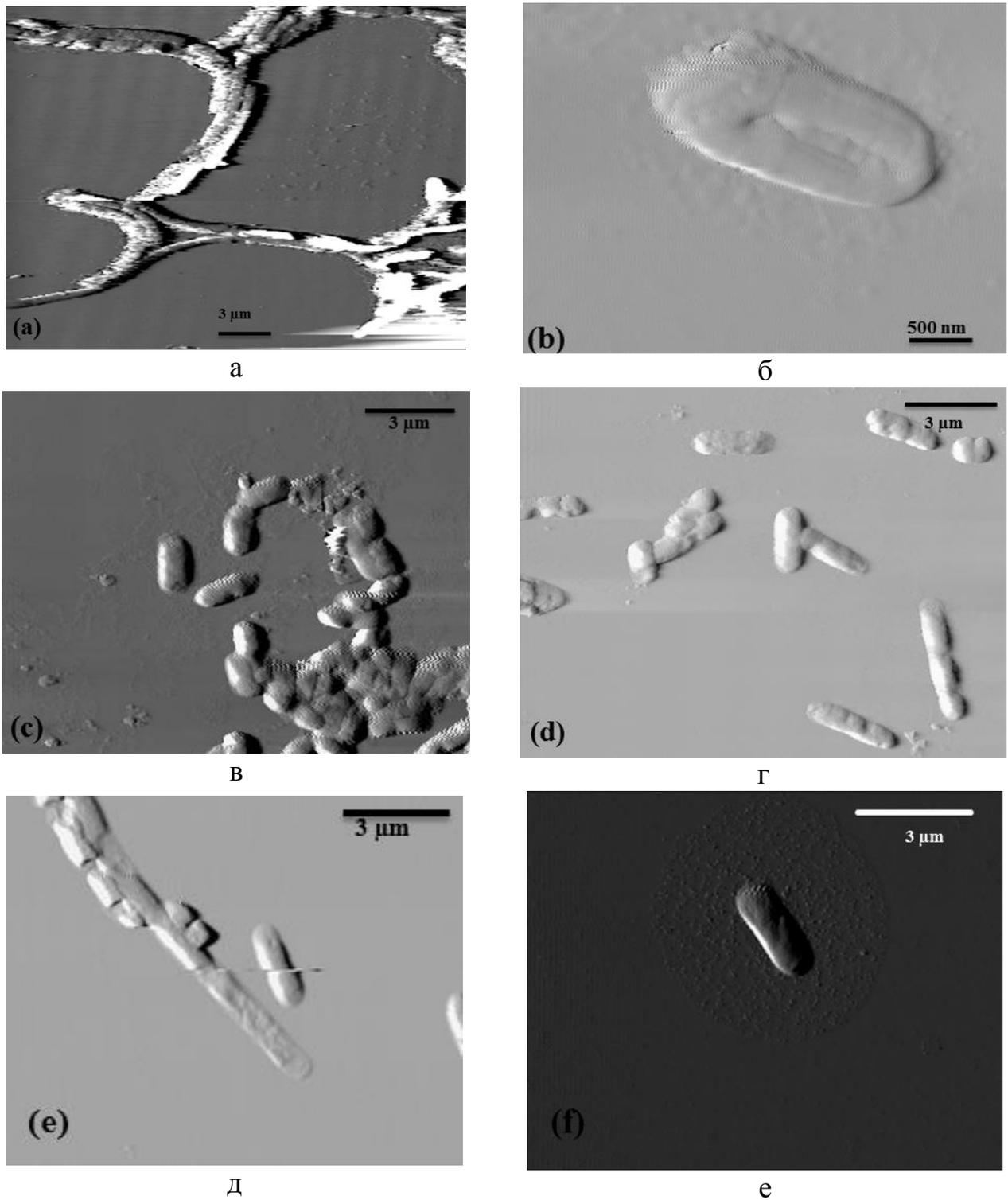


Рисунок 2.46 - АСМ-изображения бактериальных клеток *E. coli*- примеры основных морфологических изменений: а) филаментация (^{25}Mg и левофлоксацин); б) образование «бороздок» или пор (^{25}Mg и тобрамицин); в) агломерация клеток (^{25}Mg и линкомицин; г) повреждение клеточной стенки (^{26}Mg и линкомицин); д) лизис клеток (^{25}Mg и тобрамицин); е) контроль без антибиотиков (среда М9 с ^{25}Mg)

Для антибиотиков из группы хинолонов/фторхинолонов (ципрофлоксацин, левофлоксацин), механизм действия которых связан с угнетением синтеза ДНК, характерно появление удлинённых клеток (филаментация), в 3–5 раз превосходящих по длине нормальные бактерии. На АСМ-изображениях таких бактерий (рисунок 2.46а) заметно наличие перетяжек. Это означает, что нарушен процесс деления клеток, и несколько бактерий формируют одну нить. Совместное действие именно магнитного изотопа магния ^{25}Mg и хинолонов на бактерии приводит к значительному удлинению клеток по сравнению с немагнитными $^{24,26}\text{Mg}$ изотопами, что свидетельствует об усилении действия антибиотика. Изменение ширины и высоты бактерий, выращенных с магнитным магнием по сравнению с контролем и немагнитными изотопами, говорит о значительных разрушениях клеток и лизисе и подтверждает совместное негативное влияние магнитного изотопа ^{25}Mg и хинолонов. Ципрофлоксацин и левофлоксацин нарушают синтез ДНК, блокируя ферменты ДНК-гиразу и топоизомеразу IV [69,88]. Магнитный изотоп магния так же угнетает синтез ДНК, уменьшая эффективность работы ДНК-полимеразы [13]. Таким образом, совместное использование магнитного магния и хинолонов увеличивают чувствительность бактерий к этим антибактериальным препаратам, что подтверждает полученные ранее результаты ([см. пункт 2.2.1, 2.2.2.5](#)).

Воздействие тобрамицина – представителя аминогликозидов, - приводило к повреждению клеточной стенки и слипанию клеток, как следствие механизма действия тобрамицина, влияющего на синтез белка. Характерным морфологическим признаком бактерий, инкубируемых на среде с магнитным ^{25}Mg по сравнению с немагнитными изотопами $^{24,26}\text{Mg}$, было образование «желобков» (рисунок 2.46б). Статистический анализ профиля шероховатости подтверждает совместный эффект тобрамицина и магнитного магния в морфологии бактерий *E. coli* (таблица 2.4, рисунок 2.36): такие бактерии имеют более неоднородную структуру по сравнению с контролем и инкубируемыми в присутствии немагнитных изотопов.

Незначительное изменение шероховатости бактерий, которые инкубировались на среде с магнитным изотопом магния ^{25}Mg , было обнаружено и для линкомицина (линкозамиды). Этот антибиотик так же, как тобрамицин, нарушает процесс белкового синтеза, блокируя 50S-субъединицу рибосом. Следовательно, синтез белка в бактериях является спин-чувствительным процессом, и он будет протекать с разной эффективностью для магнитного и немагнитных изотопов магния.

Исследование совместного влияния изотопов магния и антибиотиков различных групп на морфологию бактерий *Escherichia coli* с помощью АСМ позволило выявить два вида МИЭ. Один из них связан с изменением профиля шероховатости и появления желобков у бактерий, которые инкубировались с магнитным магнием ^{25}Mg и антибиотиками, подавляющими синтез белка, - линкомицина и тобрамицина. Другой МИЭ магния обнаружен при действии антибиотиков группы хинолонов – ципрофлоксацина и левофлоксацина, блокирующих синтез ДНК в бактериальной клетке. Прикладное значение этих результатов состоит в применении магнитного изотопа магния для усиления действия антибиотика - его потенцировании. Проведенные исследования показали, что метод АСМ может использоваться для регистрации МИЭ магния и других химических элементов, как самостоятельный и дополнительный метод.

2.3 Образование биоплёнок

На рисунке 2.47 представлены результаты исследования зависимости образования биоплёнок бактериями *E. coli* от присутствия изотопов магния в питательной среде М9.

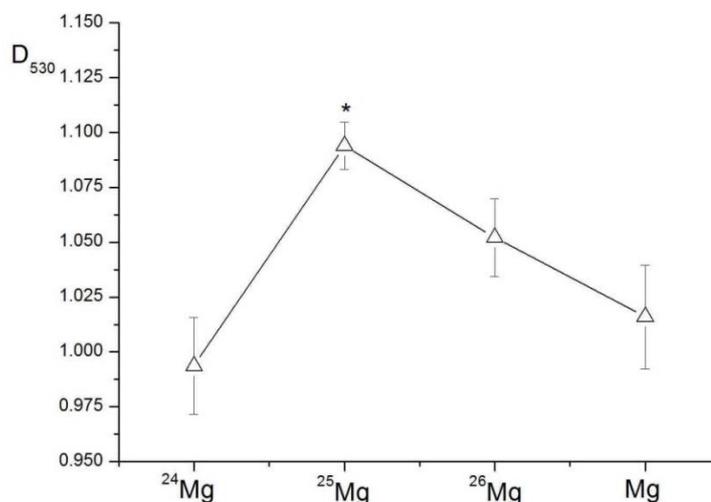


Рисунок 2.47 - Образование биопленок бактериями *E. coli* как функция изотопии магния. В качестве погрешности указана средняя ошибка, $n=10$ [14]

Образование биоплёнок бактериями *E. coli* происходит лучше в случае роста на питательной среде М9 с магнитным изотопом магния ²⁵Mg. Обнаруженный МИЭ магния составляет 7-8 %. Аналогичные зависимости ранее были получены для констант скоростей роста бактерий *E. coli*, обогащенных магнитным изотопом магния (рисунок 1.11). Образование биопленок является одним из важнейших свойств микробов, которому традиционно уделяют особое внимание. Это связано с особенностями формирования биоплёнок как фактора защиты от физико-химических воздействий внешней среды. Биоплёночные сообщества микробов – это сложноорганизованная надмолекулярная структура, состоящая из самих бактерий и синтезируемого ими внеклеточного матрикса, включающего белки, полисахариды и нуклеиновые кислоты [89]. Микроорганизмы под защитой биоплёнки способны сопротивляться действию антибиотиков, ультрафиолетового облучения, механических воздействий и пр. [89]. Достаточно трудно удалить и инактивировать развитые и зрелые биопленки, что приводит к нежелательным проблемам, особенно в медицине и промышленности. «Стимуляция способности к образованию

биоплёнок в присутствии магнитного магния свидетельствует о повышенной витальности микробов» [14].

2.4 Заключение

При исследовании влияния изотопов магния на чувствительность бактерий *E. coli* к антибиотикам разными методами обнаружен эффект синергизма магнитного изотопа магния и антибиотиков группы хинолонов/фторхинолонов и ансамицинов. Повышается чувствительность таких микробов к антибиотикам в случае роста на среде с магнитным изотопом магния ^{25}Mg . Прикладное значение этого результата состоит в возможности потенцирования антибактериальных средств этих групп магнитным изотопом ^{25}Mg . Бактерии, обогащенные магнитным изотопом магния ^{25}Mg , обладают повышенной резистентностью к линкомицину (по данным АСМ), амикацину и тобрамицину. Такой МИЭ обусловлен участием магнитных ядер в работе аминогликозид- и линкозамид-модифицирующих ферментов. Обнаруженные МИЭ магния в чувствительности бактерий *E. coli* к хинолонам/фторхинолонам и ансамицинам свидетельствуют о магнитной чувствительности процессов синтеза ДНК, РНК. Процессы белкового синтеза являются магнитно-зависимыми, о чём говорят МИЭ магния в резистентности бактерий к линкозамидам и аминогликозидам.

Обнаружен МИЭ магния в образовании биоплёнок бактериями *E. coli*. Это свидетельствует о повышенной витальности микробов, что подтверждает результаты, описанные в [первой главе](#) диссертации, а также о чувствительности процессов межклеточной сигнализации, ответственных за чувство кворума микроорганизмов [84], к магнитному изотопу магния. Результаты исследований первой и второй глав однозначно доказывают, что бактерии *E. coli* обладают удивительным свойством – магнитной чувствительностью, для которой не требуется наличие специальных органелл или внутриклеточных включений наподобие магнетита. Представленные во второй главе результаты опубликованы в работах [6, 14, 17, 18, 19].

Глава 3 Совместное влияние постоянного магнитного поля и изотопа магния ^{25}Mg на бактерии *E. coli*

Введение

Существует множество физико-химических факторов, влияющих на биологические процессы. Среди них наиболее загадочным является магнитное поле. Способность реагировать на магнитные поля проявляется практически на всех уровнях организации жизни и у всех живых организмов [91-99]. С развитием техногенной цивилизации проблемы и задачи магнитобиологии как науки стали ещё более актуальны. Кроме уже исследуемых вопросов ориентации, навигации животных и чувствительности организмов к естественным полям (магнитное поле Земли, солнечная активность и солнечный ветер и т.д.) появились новые задачи, имеющие социальную значимость, например, влияние на человека и животных электромагнитных полей сотовых телефонов и высоковольтных линий электропередач [93-99].

«Накопление экспериментального материала и поиск гипотез о механизмах магнитно-полевых эффектов в живых клетках ведётся с начала XX века [100-102]. За это время пытались варьировать самые различные параметры влияния магнитного поля на живые системы: напряженность магнитного поля (от 10^{-6} до 10 T); время воздействия (от нескольких минут до нескольких дней); типы исследуемых систем (от молекулярных комплексов до многоклеточных организмов) [91]. Однако большая часть исследований представляет собой слепые попытки нащупать закономерности возникновения отклика в живых системах в ответ на действие магнитных полей. Это связано с отсутствием строгой теоретической базы биологических магнитно-полевых эффектов. Так и не было обнаружено специализированных органов, отвечающих за биологическую магниточувствительность, даже у животных, которые, как известно, используют магнитные поля для навигации [96]. Магниточувствительность не имела решающего значения для выживания растений и животных в ходе биологической

эволюции. Большинство биологических эффектов магнитного поля не имеют надежных физических и химических объяснений» [9].

Новый подход к проблеме эффектов магнитных полей стал возможен после открытия эффектов магнитного изотопа ^{25}Mg в ферментативном синтезе АТФ *in vitro*, а позже в синтезе ДНК [2-4, 13]. Для объяснения эффектов магнитного изотопа ^{25}Mg в ферментативном синтезе был предложен ион-радикальный механизм [2, 5, 7, 8, 10], подробно описанный в пункте 5.1. Этот механизм был заложен в основу модели ферментативной магниточувствительности живых организмов (глава 6), согласно которой на скорость ферментативной реакции способны влиять магнитные взаимодействия, как внешние (постоянные или переменные), так и внутренние магнитные поля (создаваемые магнитными ядрами). Также в 6-ой главе будут рассмотрены другие вероятные механизмы магнитно-полевых эффектов.

Таким образом, в соответствии с ион-радикальным механизмом [2, 5, 7, 8, 10] внешние магнитные поля, а также ядерный спин магнитных изотопов индуцируют синглет-триплетную эволюцию ИРП, образующуюся в активном сайте фермента. Согласно экспериментальным данным [6-8, 16] это приводит к изменению констант скоростей элементарных актов ферментативной реакции. Влияние ядерных спинов, обусловленных сверхтонкими взаимодействиями, может быть качественно проанализировано как влияние некоторого «внутреннего» магнитного поля. Если ферментативная реакция зависит от ядерного спина, то она должна быть зависимой и от внешнего магнитного поля, и наоборот. Таким образом, открытие МИЭ в ферментативных процессах означает, что магнитные поля могут также влиять на аналогичные внутриклеточные ион-радикальные ферментативные реакции. Повышение эффективности магнитного изотопа в процессах ферментативного синтеза АТФ и ДНК *in vitro* внешними магнитными полями подтвердило магнитную чувствительность таких внутриклеточных реакций [6, 13].

Открытия МИЭ в росте и метаболизме бактерий *Escherichia coli*, описанные в главах 1-2, доказывают наличие у микроорганизмов уникальной особенности,

ранее неизвестной, - способности «фракционировать» изотопы по магнитным свойствам. Бактерии обладают чувствительностью к наличию магнитного момента и спина у ядра изотопа магния. Следовательно, влиять на внутриклеточные процессы микроба возможно и с помощью внешних магнитных полей. При этом наиболее интересные эффекты будут наблюдаться при совместном действии и внешних, и внутренних полей (магнитных ядер). Цель исследований данной главы – экспериментальная проверка этого утверждения; поиск доказательств совместных эффектов внешних постоянных магнитных полей (ПМП) и магнитного изотопа магния на бактерии *E. coli* в процессе роста.

3.1 Магнитно-полевые эффекты в бактериях *E. coli* (обзор литературы)

Магнитные поля, способные вызывать биологические эффекты, классифицируются как очень слабые (<1 мТ), умеренные (от 1 мТ до 1 Т), сильные (от 1 до 5 Т) и сверхсильные (более 5 Т) [103-104]. Геомагнитное поле считается слабым, так как оно колеблется 0,03 до 0,06 мТл [105]. Сильные и сверхсильные ПМП влияют на ориентацию диамагнитных анизотропных органических молекул, таких как мембранные липиды [103-104]. Влияние слабых или умеренных ПМП изучалось в рамках многочисленных моделей на примере эукариот. Как правило, наблюдаемые эффекты были связаны с изменениями тока ионов Ca^{2+} через биологическую мембрану и проницаемости мембранных ионных каналов в целом [98]. Для прокариот были получены результаты, демонстрирующие чувствительность бактерий к умеренным ПМП: изменяются ростовые параметры и выживаемость бактерий [106-111]. Однако результаты выглядят неубедительно за счёт противоречивых эффектов, полученных разными исследователями.

В работе [107] показано, что ПМП 450 мТл ингибируют рост *Escherichia coli* в течение 60 мин воздействия. Эффект усиливается при росте температуры. При этом в работе [110] получено, что ПМП 300 мТл не влияют на рост *E. coli* в богатой питательной среде LB. Более того, на стационарной фазе роста плотность

бактериальной культуры увеличивается. Выживаемость бактериальных клеток в буфере Трис (трисаминометан) в анаэробных условиях после воздействия ПМП 100 мТл была измерена в работе [108]. Обнаружено, что выживаемость мутантных штаммов *S. aureus* снижается после воздействия ПМП, в то время как на выживаемость бактерий *E. coli* влияние магнитного поля не происходило. Авторы работы [109] показали, что умеренные ПМП от 50 до 500 мТл по-разному влияют на рост *Streptococcus pyogenes*: ингибирование роста в диапазоне 50-300 мТл сменяется увеличением количества клеток при действии ПМП 500 мТл.

В работе [112] исследовалось влияние ПМП 450 мТл на выживаемость бактерий *E. coli*. Было обнаружено значительное подавление роста бактерий и повреждения клеточной мембраны, зарегистрированные с помощью сканирующей электронной микроскопии. В работе [113] были получены данные по выживаемости музейных и клинических уропатогенных штаммов *E. coli* в разных ПМП 2, 4, 6, 9, 14, 16, 18, и 20 мТл и при различных временах экспозиции (0, 15, 30, 45, 60, 75 и 90 мин). Между штаммами не было выявлено различий при реакции на действие магнитного поля. При этом значительное изменение выживаемости – снижение, – показали обе группы при воздействии ПМП 18 и 20 мТл. Существуют работы, где обнаружено повышение антибиотикорезистентности бактериальной культуры [114] при воздействии внешнего ПМП. Однако важной особенностью, отсутствующей в большинстве работ, является отсутствие системного подхода, анализа соотношения «экспозиция-реакция» [115], а также отсутствие физических, биохимических и физиологических объяснений. Немаловажным является и кратковременность воздействия ПМП. Другими словами, бактерии не растут в магнитном поле, а испытывают воздействие им в определённых временных рамках. Следующий фактор, который не позволяет сформировать цельную картину магнитно-полевого воздействия на живые организмы, – это произвольный выбор точечных диапазонов, не обоснованных теоретически. Только в некоторых работах проведены исследования выживаемости бактерий в нескольких полях [113]. Как

правило, выбор напряженности магнитного поля в описанных выше работах обусловлен имеющейся экспериментальной базой или носит случайный характер.

В следующем пункте будет описана экспериментальная установка, которая позволила разрешить противоречия этих работ. Влияние ПМП на бактерии с помощью этой установки можно исследовать и в процессе роста, и кратковременно. При этом появляется экспериментальная возможность одновременно получать данные в диапазоне полей 0,8–100 мТл как минимум в 20 точках для каждой тестируемой группы.

3.2 Материалы и методы

3.2.1 Условия культивирования

Для проведения экспериментальных исследований совместного влияния постоянных магнитных полей и изотопов магния на бактерии *E. coli* использовался музейный штамм K12TG1 и синтетическая питательная среда M9, позволяющая обогащать микроорганизмы изотопами магния и подробно описанная в главе 1 ([см. пункт 1.2.1](#)). Бактерии предварительно инкубировались в бульоне LB (Sigma-Aldrich) после чего пересеивались в среды M9 с изотопами магния ^{24}Mg , ^{25}Mg и ^{26}Mg и природным магнием *Mg. Культивировались бактерии в 96-луночных полистироловых планшетах в течение 7–8 часов при температуре 37 °C в ПМП. Используемая установка описана в [пункте 3.2.2](#). Регистрировались ростовые показатели: константа скорости роста по кинетике роста, полученной турбидиметрическим методом ([см. пункт 1.2.3](#)), количество КОЕ с использованием методы серийных разведений и посева на питательный агар ([см. пункт 1.2.4](#)) [10].

Для создания аэробных условиях каждый час планшеты с бактериями *E. coli* в изотопных средах помещались на шейкер ST-3 ELMi (Рига, Латвия) на 5 мин при 200 об/мин. Таким образом, количество кислорода было достаточным для

обеспечения аэробных условий культивирования, учитывая, что встряхивание производилось каждый час [10].

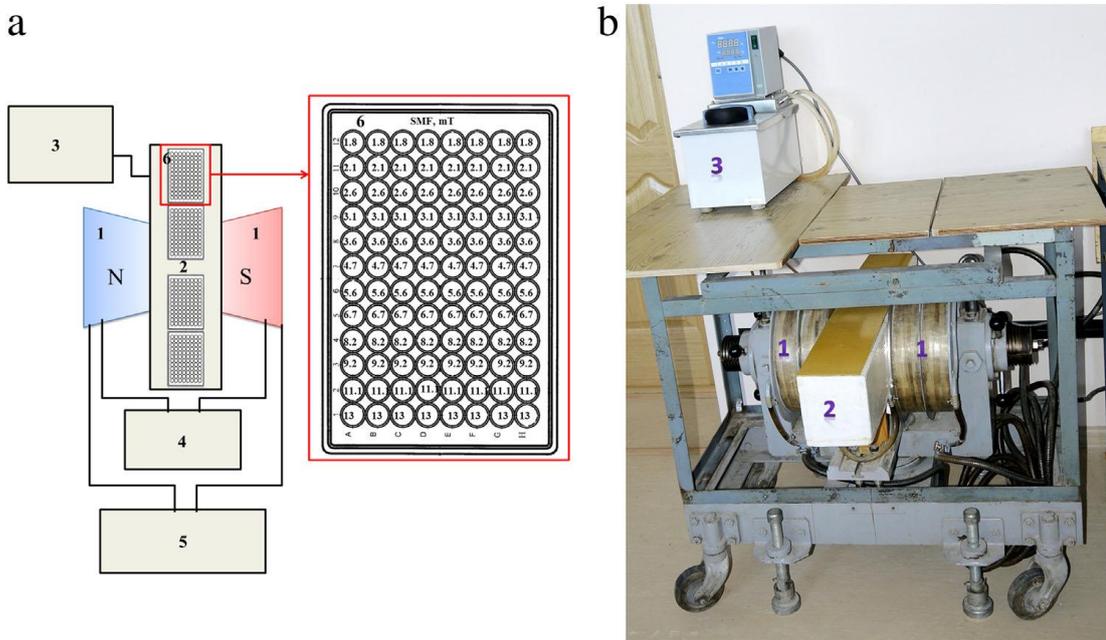
В контрольных экспериментах по регистрации магнитно-полевых эффектов в росте бактерий, описанных в пункте [3.3](#), культивирование бактерий проводилось на питательном бульоне LB, без добавления изотопов магния.

Элементное содержание бактериальной биомассы после культивирования в ПМП на средах с изотопами магния определялось с помощью масс-спектрометрии (ICP-MS X-7, Thermo Elemental, Thermo Fisher Scientific MA) и атомной эмиссии (ICAP-61, Thermo Jarrell Ash, Thermo Fisher Scientific MA) на содержание более 70 химических элементов ([см. пункт 1.2.2](#)) [10].

3.2.2 Установка

Планшеты с бактериями культивировались в «ПМП, создаваемом электромагнитом (TR-309, Takeda Riken, Токио, Япония), в течение 7 часов при постоянном термостатировании 37 °С. Фотография и схема экспериментальной установки приведены на рисунке 3.1. Установка имеет систему охлаждения для предотвращения перегрева катушек при длительной работе. Температуру контролировали в течение всего периода культивирования бактерий. Электромагнит имеет две катушки с наружным диаметром 28 см и внутренним диаметром 16 см, длиной катушек 11 см и расстоянием между ними 12 см. Источник тока позволяет регулировать индукцию магнитного поля от 0,8 мТл до 280 мТл в центральной области между полюсами. Катушки имеют общее сопротивление 10 Ом. Флуктуации магнитных полей не превышали 10^{-2} мТл» [10]. Комбинация катушек и железного хомута создает неоднородное ПМП в центральной части термостатируемого бокса (размеры бокса: длина 68 см, ширина 9 см, высота 8 см). При этом поле становится более однородным по краям бокса (часть, выступающая за пределы катушек). Основываясь на теоретических расчётах, описанных в [главе 6](#), был выбран диапазон ПМП – 1,8-100 мТл (подаваемый ток на катушки составил 4 А). Впоследствии установка была

модифицирована, и проводились детальные исследования в диапазоне 0,8–25 мТл (подаваемый ток на катушки составлял 2 А).



1 - полюса электромагнита; 2 - термостатическая коробка; 3 – термостат; 4 - источник питания магнита; 5 - система охлаждения электромагнита; 6 – планшета с культурой клеток

Рисунок 3.1 – Схема экспериментальной установки и её фотография

Бактерии культивировались одновременно в 96 контрольных точках, соответствующих 16 стационарным магнитным полям для диапазона 1,8–100 мТл и 27 стационарным полям для диапазона 0,8–25 мТл. Магнитное поле в этих точках измерялось с помощью [миллitesламетра ТП2-2У](#) (Фела-контроль, Санкт-Петербург), чувствительным элементом которого является датчик Холла. Предварительно установка была включена на 24 ч без бактерий для контроля колебаний магнитных полей в течение длительного времени, и ПМП были измерены во всех ячейках планшеты в 0, 6, 18 и 24 ч. Была построена карта поля и отмечены в боксе места для постановки планшет. Впоследствии магнитное поле измерялось только до и после эксперимента в нескольких контрольных точках и сравнивалось с ранее полученными значениями и картой поля. Флуктуации

магнитного поля в каждой лунке планшеты (точке) в течение эксперимента не превышали 0,1 мТл. Кроме того, бактерии находятся в движении, и каждый час они перемешивались на шейкере в течение 5 минут, тем самым усредняя магнитно-полевое влияние. Используемая установка является уникальной, так как позволяет одновременно исследовать 27 точек с разными значениями ПМП. При этом бактерии выращиваются в средах, содержащих разные изотопы магния. Важно отметить, что магнитное поле лаборатории составляло $0,70 \pm 0,15$ мТл, что значительно превышает геомагнитное поле.

Аналогов такой экспериментальной установки не было найдено в научных работах. При исследовании влияния магнитных полей на живые организмы, как правило, выбирается не более 3 контрольных точек, что не позволяет получить достоверную магнитно-полевую зависимость. Данная экспериментальная установка позволяет одновременно помещать в термостатируемый бокс четыре 96-луночные планшеты с бактериями *E. coli*. Таким образом, культивирование микроорганизмов проводили одновременно на всех питательных средах М9 (содержащих магнитный ^{25}Mg , немагнитные $^{24,26}\text{Mg}$ изотопы и природный магний) во всех точках диапазона выбранных ПМП в одинаковых условиях (аэрация, температура).

3.2.3 Образование биоплёнок

Для исследования влияния ПМП «на образование биоплёнок бактериями *E. coli*, культура предварительно инкубировалась в LB-бульоне (Sigma Aldrich) в течение 16 часов при температуре 37 °С. После клетки *E. coli* пересеивались в среды М9, содержащие изотопы ^{24}Mg , ^{25}Mg , ^{26}Mg , Mg. Плотность стартовой культуры составляла $3 \cdot 10^6$ клеток/мл. Затем образцы в 24-луночных полистироловых планшетах помещались в термостатируемый бокс (рисунок 3.1). Бактерии культивировались в ПМП в течение 24 часов при постоянной температуре 37°С. Контрольные образцы помещались в термостат и инкубировались при температуре 37° С без дополнительного ПМП.

Способность к биоплёнкообразованию оценивали стандартным фотометрическим методом по степени связывания кристаллического фиолетового [14, 72]. После 24 часов инкубирования в ПМП культуру осторожно удаляли и вносили в лунки 1,5 мл 0,005 % водного раствора кристаллического фиолетового для окрашивания сформированных биопленок. Окрашивание проводили в течение 60 мин. Далее, полностью удалив из пробирок раствор кристаллического фиолетового, проводили экстракцию красителя из биопленки в 1 мл 96% этанола в течение 45 минут часа при комнатной температуре. После этого проводили осаждение остатков биоплёнок и бактерий с помощью центрифугирования в течение 7 минут при 9000 об/мин на центрифуге СМ-50М (ELMI, Рига, Латвия). Затем образцы вносили в объеме 200 мкл в лунки 96-луночного плоскодонного полистиролового планшета; измерение концентраций кристаллического фиолетового проводили на иммуноферментном анализаторе АИФР-01 УНИПЛАН (Пикон, Россия), длина волны 530 нм [14].

Все экспериментальные данные на графиках представлены в виде среднего значения $\bar{X} \pm SD$ (стандартная ошибка). Использовался критерий Стьюдента для определения статистической достоверности. Различия между средними значениями считались статистически достоверны при $p < 0,05$. Статистическая обработка и графическое представление экспериментах данных проводилось с помощью программного обеспечения Origin 8.0 (версия 8.0; Microcal Software).

3.3 Влияние постоянного магнитного поля на рост бактерий *E. coli*

На первом этапе исследований влияния ПМП 0,8–100 мТл на бактерии *Escherichia coli* были выполнены контрольные эксперименты: клетки инкубировались в ПМП в богатом питательном бульоне LB без добавления изотопов магния. Рост на среде LB при температуре 37 °С соответствует оптимальным условиям роста бактерий кишечной палочки. В результате выполнения серии из шести идентичных экспериментов (в каждой серии было

выполнено не менее трех повторов) получены ростовые кривые культуры *E. coli*. Кривые были аппроксимированы и найдены константы скорости роста, магнитно-полевая зависимость которых представлена на рисунке 3.2. Приведенные кривые демонстрируют различное влияние ПМП в диапазоне от 1,8 до 100 мТл на рост микроорганизмов.

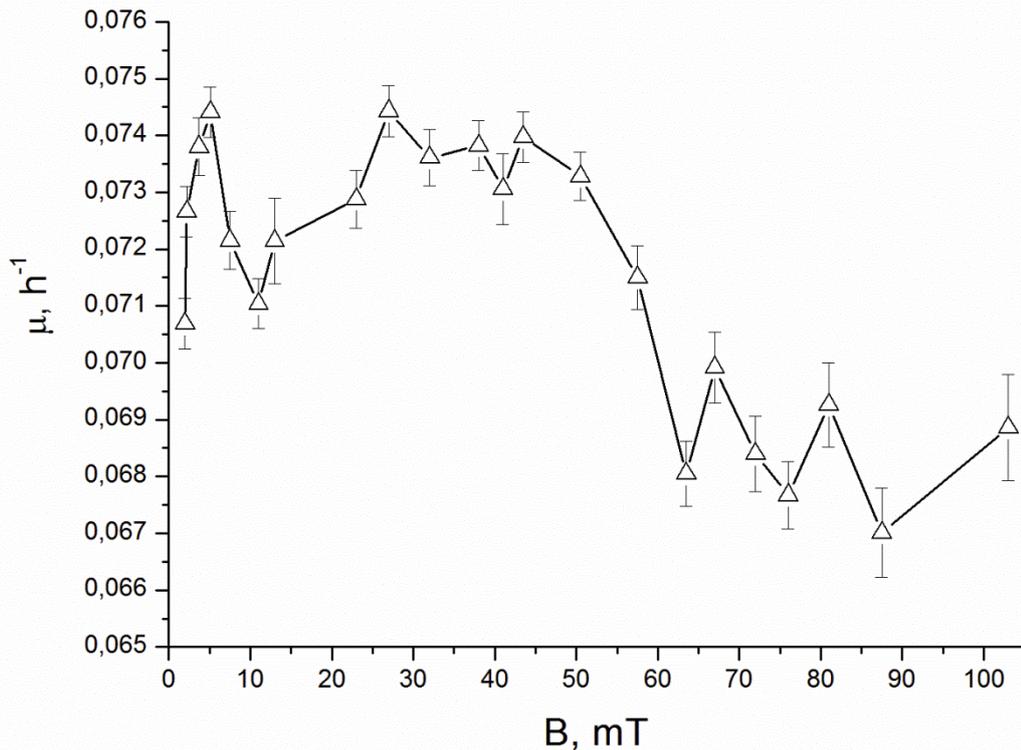


Рисунок 3.2 – Магнитно-полевая зависимость констант скоростей роста бактерий *E. coli*, выращенных на среде LB в ПМП. В качестве погрешности указана стандартная ошибка, $n=5$

Анализ магнитно-полевых зависимостей констант скоростей роста, приведенных на рисунке 3.2, позволяет выделить три значимых диапазона ПМП: 1,8–10, 25–55 и >55 мТл. Положительное влияние ПМП на рост бактериальной культуры обнаружено в интервалах 1,8–10 мТл и 25–55 мТл. При увеличении напряженности магнитного поля от 1,8 до 6,5 мТл константа скорости роста увеличивается на 7 % и достигает максимального значения. Увеличение напряженности магнитного поля с 55 до 100 мТл приводит к значительному

ингибированию роста бактерий. Константа скорости роста в этом диапазоне ПМП уменьшается на 11% по сравнению с ее максимальным значением, что свидетельствует о подавляющем действии ПМП 55–100 мТл на рост бактерий *E. coli*, инкубируемых в оптимальных условиях.

Количество КОЕ на стационарной фазе роста – один из важных показателей бактериальной культуры, характеризующий её жизнеспособность. На рисунке 3.3 представлена магнитно-полевая зависимость колониеобразующей способности бактерий *E. coli*, выращенных в ПМП на среде LB.

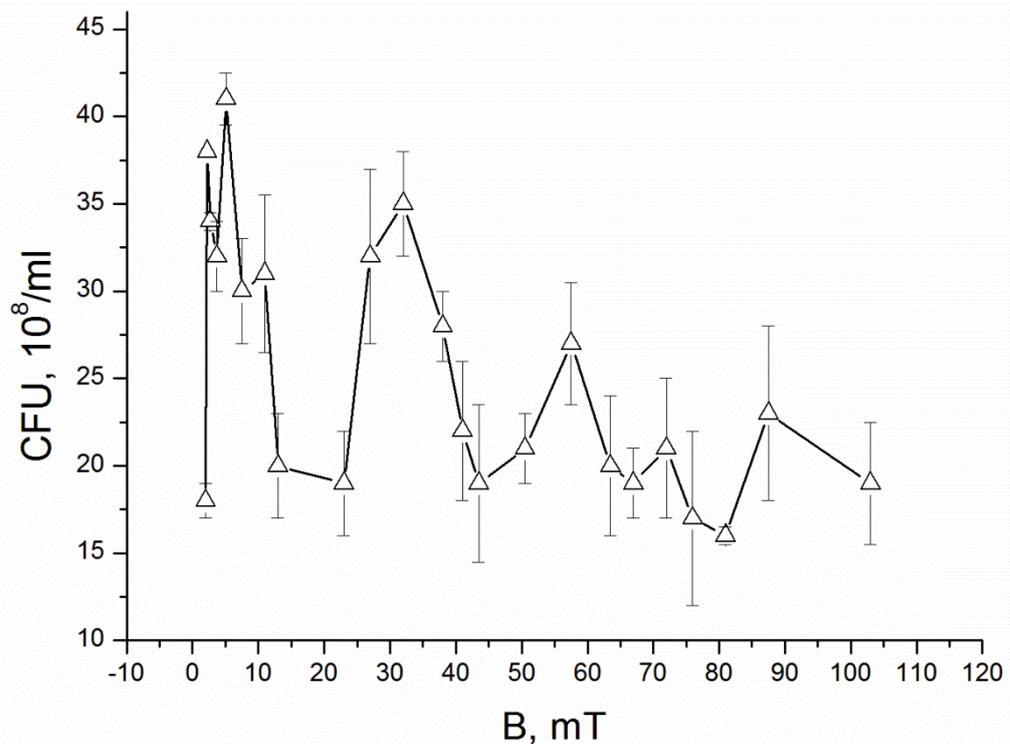


Рисунок 3.3 – Магнитно-полевая зависимость КОЕ бактерий *E. coli*, выращенных в питательной среде LB, диапазон ПМП 1,8-100 мТл. В качестве погрешности указана стандартная ошибка, $n=5$

При увеличении напряженности магнитного поля от 1,8 до 7 мТл колониеобразующая способность возрастает в 2–2,5 раза и достигает максимального значения. Повышение количества КОЕ происходит и в диапазоне

23–40 мТл. При этом дальнейшее увеличение напряженности магнитного поля приводит к уменьшению колониеобразующей способности, что подтверждает подавляющее действие ПМП этого диапазона на рост бактерий, культивируемых на богатой питательной среде.

Наиболее интересными, согласно теоретическим прогнозам ([глава 6](#)), являются эффекты магнитного поля в диапазоне 0–10 мТл. Эти поля привлекательны тем, что константы СТВ большинства органических радикалов, содержащих магнитные стабильные изотопы ^1H и ^{13}C с ядерным магнитным моментом, относятся к диапазону 0,1–4 мТл [30-31, 219]. Многие исследователи ошибочно концентрируются на регистрации магнитно-полевых эффектов в ПМП, значительно превышающих геомагнитное поле [116-118]. И это вызывает ещё большее расхождение в механизмах магнитно-полевых эффектов. Потому что реакция живых организмов на действие сильных ПМП не связана с природной магниточувствительностью. Более того, эти результаты вряд ли могут быть использованы для понимания механизма магнитного контроля внутриклеточных ферментативных процессов. Совместные эффекты внешних магнитных полей и магнитных моментов атомных ядер могут наблюдаться и регистрироваться именно в слабых магнитных полях, напряженность которых меньше или равна величине констант СТВ ([глава 6](#)).

Зарегистрированные магнитно-полевые эффекты в скорости роста и колониеобразующей способности бактерий *E. coli* в диапазоне ПМП 1,8–10 мТл свидетельствуют об обоснованности теоретических прогнозов и наличии магниточувствительных ферментативных реакций. Эффекты магнитного поля, зарегистрированные во втором диапазоне ПМП от 15 до 55 мТл, могут быть связаны с ферментативными реакциями, включающими стадии ион-радикалов с высокими константами СТВ, например ^{23}Na , ^{31}P . С другой стороны, эти эффекты могут возникать вследствие влияния магнитных полей на внутриклеточные процессы с парамагнитными ионами, Fe, Mn и др. Увеличение магнитного поля от 50 до 100 мТл приводит к торможению роста бактерий. Это проявляется в снижении скорости роста и количества КОЕ.

Описанные в данном пункте результаты получены для бактерий *Escherichia coli*, инкубируемых в ПМП на богатой среде LB без искусственного обогащения изотопами магния.

3.4 Совместное влияние постоянных магнитных полей и изотопов магния на рост бактерий *E. coli*

Совместное влияние магнитного ^{25}Mg и немагнитных изотопов магния $^{24,26}\text{Mg}$ и ПМП на рост бактерий *E. coli* оценивалось с помощью двух показателей: константа скорости роста и колониеобразующая способность (КОЕ). После статистической обработки и аппроксимации логарифмической фазы роста более 100 кинетических кривых были получены магнитно-полевые зависимости констант скоростей роста бактерий *Escherichia coli*, инкубируемых на средах M9 с изотопами магния в ПМП. На рисунке 3.4 приведены полученные зависимости.

Экспериментальный диапазон ПМП составлял от 0,8 до 100 мТл. Однако на графике представлены только начальные участки до 22 мТл. Это связано с тем, что достоверных различий в ПМП >22 мТл между константами скоростей роста для разных экспериментальных групп не было обнаружено.

Полученные зависимости имеют две интересные особенности. Во-первых, в диапазоне ПМП 0,8–3 мТл константы скорости роста для всех бактерий (независимо от изотопа магния, присутствовавшего в питательной среде) оказываются выше, чем в полях 3,5–22 мТл. Во-вторых, максимальной скорости роста в этом диапазоне достигают бактериальные клетки, обогащенные магнитным изотопом магния ^{25}Mg . Наибольшее значение константы скорости роста $0,081 \pm 0,005 \text{ ч}^{-1}$ зарегистрировано при совместном влиянии ПМП 2,2 мТл и изотопа магния ^{25}Mg , имеющего ядерный магнитный момент. Кинетические кривые роста для этого поля приведены на рисунке 3.5.

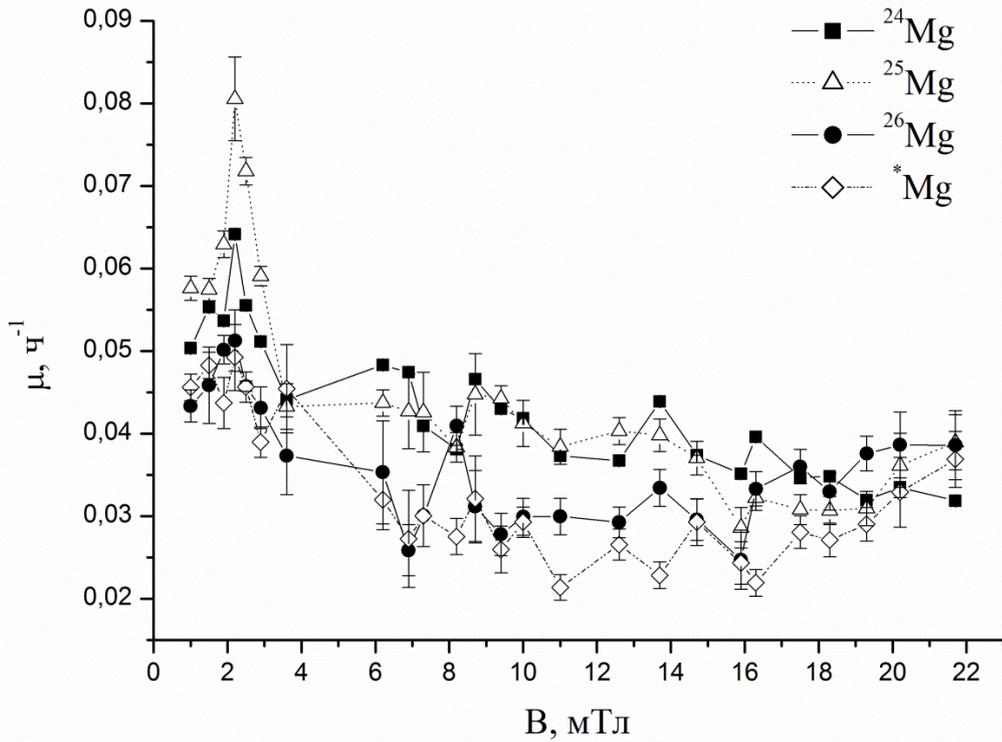


Рисунок 3.4 – Магнитно-полевые зависимости констант скоростей роста бактерий *E. coli*, культивируемых на среде М9 с изотопами магния ^{24}Mg , ^{25}Mg , ^{26}Mg и природным магнием *Mg. В качестве погрешности указана стандартная ошибка, $n=10$

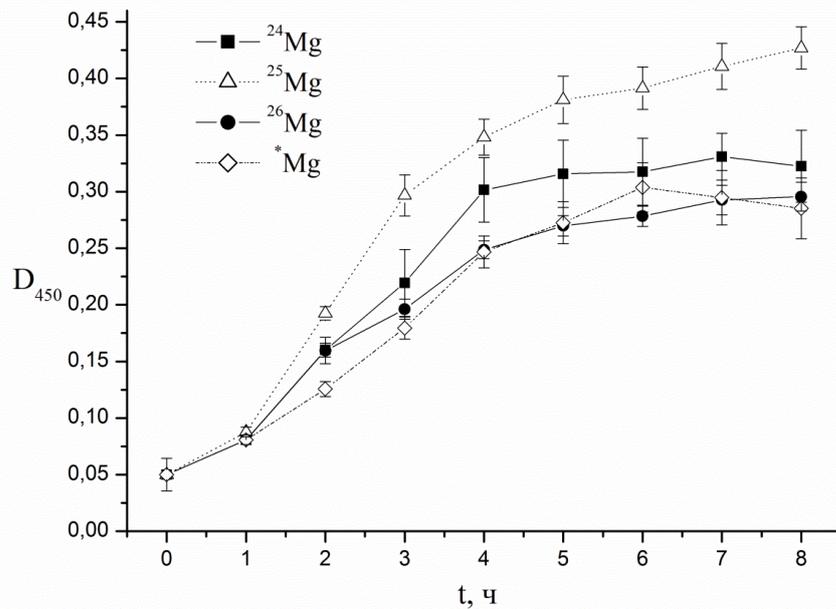


Рисунок 3.5 – Ростовые кривые бактерий *E. coli*, культивируемых на среде М9 с изотопами магния в ПМП 2,2 мТл. В качестве погрешности указана стандартная ошибка, $n=5$

На рисунках 3.6-3.7 приведены ростовые кривые, полученные при культивировании бактерий *E. coli* на среде М9 с изотопами магния ^{24}Mg и ^{25}Mg в разных ПМП. На рисунке 3.8 приведены магнитно-полевые зависимости количества КОЕ бактерий *E. coli*, инкубируемых в ПМП в питательных средах М9 с изотопами магния. Количество КОЕ бактерий, как и константы скорости роста, увеличивается и достигает максимального значения в ПМП 0,8–3 мТл для всех тестируемых групп клеток. При росте на среде с магнитным изотопом магния ^{25}Mg бактерии становятся более жизнеспособными: КОЕ этой экспериментальной группы в 2-4 раза выше по сравнению с бактериями, обогащенными немагнитными изотопами магния $^{24,26}\text{Mg}$ и природным магнием $^*\text{Mg}$.

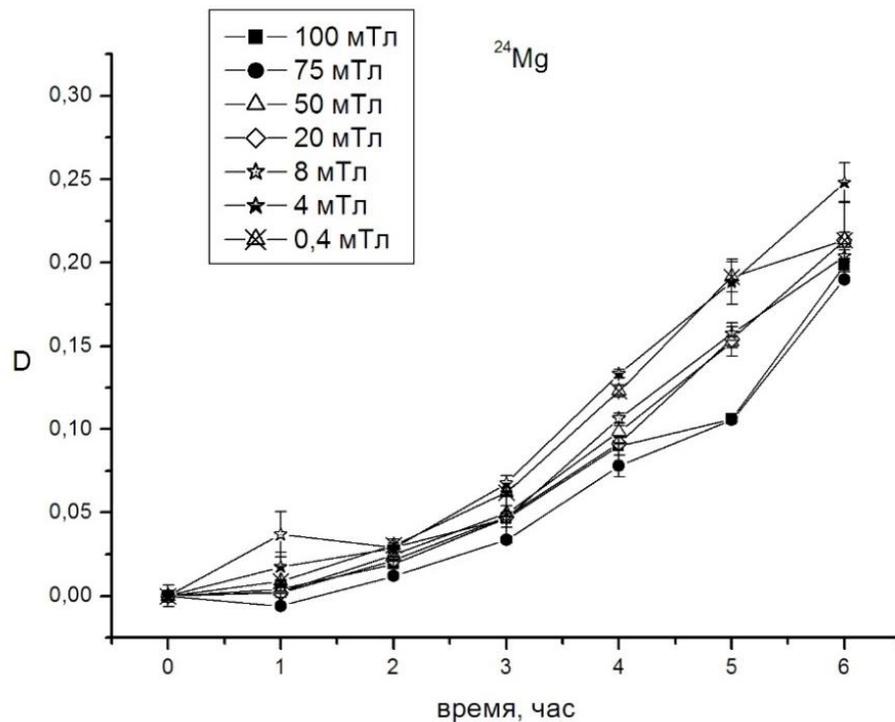


Рисунок 3.6 – Ростовые кривые бактерий *E. coli*, культивируемых на среде М9 с немагнитным изотопом магния ^{24}Mg в разных ПМП. В качестве погрешности указана стандартная ошибка, $n=5$

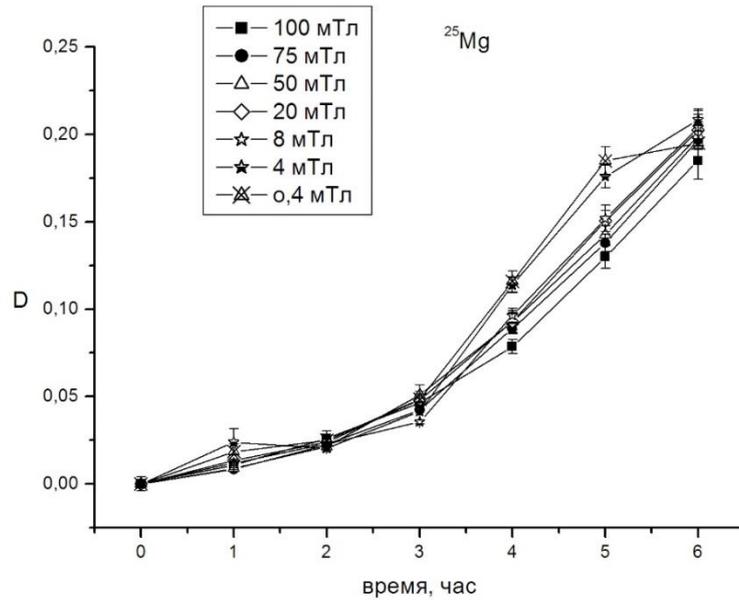


Рисунок 3.7 – Ростовые кривые бактерий *E. coli*, культивируемых на среде М9 с магнитным изотопом магния ^{25}Mg в разных ПМП. В качестве погрешности указана стандартная ошибка, $n=5$

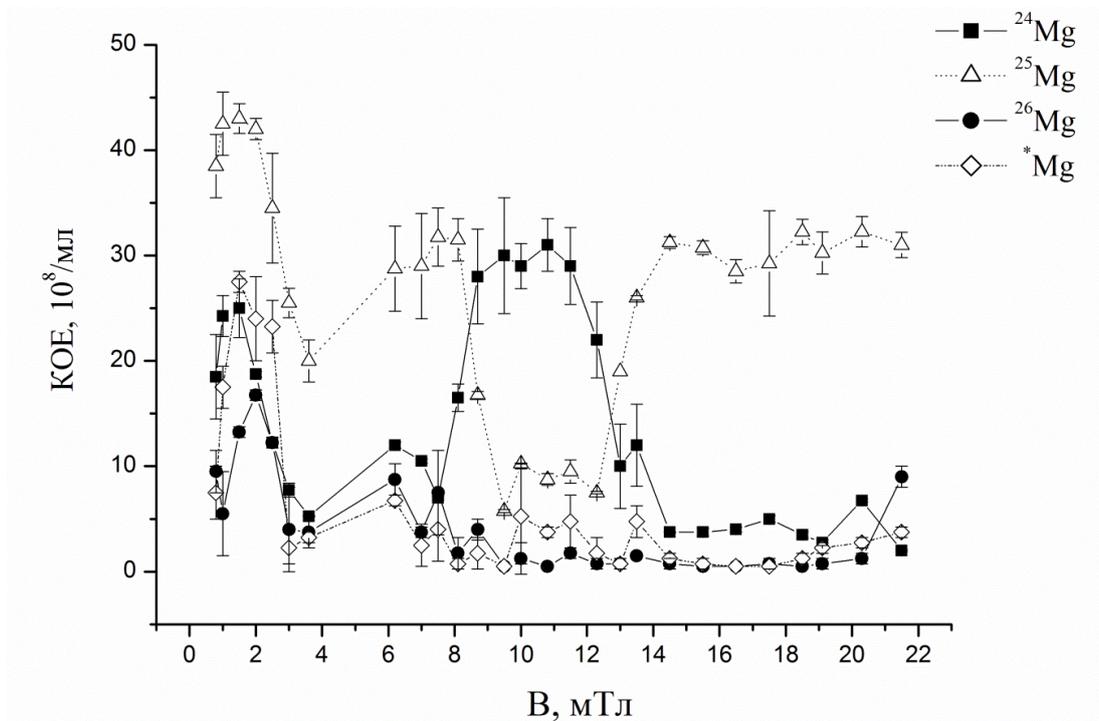


Рисунок 3.8 – Магнитно-полевые зависимости КОЕ бактерий *E. coli*, культивируемых на средах М9 с изотопами магния. Диапазон ПМП 0,8-22 мТл. В качестве погрешности указана стандартная ошибка, $n=10$

Положительное совместное влияние внешнего ПМП и изотопа магния, ядро которого обладает магнитным моментом, на колониеобразующую способность бактерий *E. coli* (рисунок 3.8) проявляется во всем исследуемом диапазоне 0,8-22 мТл, за исключением полей 9-11 мТл. Здесь происходит резкое уменьшение (в 3 раза) количества КОЕ бактерий, обогащенных магнитным магнием ^{25}Mg , а возрастает КОЕ микроорганизмов, обогащенных немагнитным изотопом магния ^{24}Mg . Других статистически достоверных различий для колониеобразующей способности бактерий *E. coli*, культивируемых в ПМП диапазонов 3,5-9 мТл и 13-22 мТл и изотопов магния не обнаружено [9].

Физиологический «отклик» на воздействие внешнего ПМП 0,8-3 мТл был зарегистрирован для всех бактериальных клеток, обогащенных и магнитным ^{25}Mg , и немагнитными $^{24,26}\text{Mg}$ изотопами магния, и природным магнием $^*\text{Mg}$. Важно отметить, что магнитно-полевые эффекты в росте бактерий *E. coli*, инкубируемых на богатой питательной среде LB ([см. пункт 3.4](#)), также были зарегистрированы в ПМП 1,8-7 мТл. Этот диапазон самый интересный с точки зрения теории ферментативной магниточувствительности ([глава 6](#)), где в качестве первичного приёмника внешнего магнитного поля выступают спин-зависимые стадии элементарных актов ферментативных процессов. Магниточувствительность этих стадий обусловлена участием частиц, имеющих магнитные моменты, например, магнитных изотопов ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{25}Mg , ^{23}Na , и их сверхтонким взаимодействием с электронными спинами и внешним магнитным полем. Обнаруженные магнитно-полевые эффекты в скорости роста и колониеобразующей способности для всех исследуемых групп бактерий *E. coli* в диапазоне магнитных полей 0,8–3,5 мТл свидетельствует о справедливости теоретических предсказаний и наличии магниточувствительных ферментативных реакций, протекающих по ион-радикальному механизму [9]. Важно отметить, что экспериментальные данные констант скоростей роста, КОЕ для бактерий, обогащенных магнитным изотопом магния ^{25}Mg , в этом диапазоне оказываются достоверно выше по сравнению с бактериями, обогащенными немагнитными изотопами или природным магнием. Это связано с тем, что магнитно-изотопный

состав бактерий, которые росли на средах с ^{24}Mg , ^{26}Mg или $^*\text{Mg}$ примерно одинаковый – это стабильные магнитные изотопы, которые всегда присутствуют в живых организмах, например, ^1H , ^{13}C , ^{31}P . Соответственно, константы СТВ для этих изотопов и для органических радикалов, в структуру которых они входят, одинаковы для всех трёх исследуемых групп бактерий и лежат в диапазоне 0,1-4 мТл [30-31, 219]. Для группы бактерий, растущих на среде с магнитным магнием ^{25}Mg , к естественному изотопному составу добавляется дополнительное обогащение магнитным изотопом ^{25}Mg . В этом случае ферментативные процессы с участием иона магния ^{25}Mg будут протекать с большей эффективностью, что значительно изменяет физиологический (скорость роста, КОЕ) отклик» микроорганизмов [9].

Очевидно, что наряду с МИЭ магния ^{25}Mg в росте бактерий *E. coli* проявляется и классический, масс-зависимый, изотопный эффект в отношении немагнитных изотопов ^{24}Mg и ^{26}Mg . Например, константы скорости роста бактерий, выращенных на среде с ^{24}Mg выше, чем для бактерий, культивируемых с ^{26}Mg (рисунок 3.4). Однако подобные зависимости не всегда статистически достоверны и составляют не более 15 % от эффектов магнитного изотопа магния ^{25}Mg в исследуемом диапазоне ПМП. Это говорит о том, что совместное влияние внешнего магнитного поля и изотопа магния ^{25}Mg , имеющего ядерный спин и магнитный момент, на внутриклеточные процессы приводит к значительным физиологическим изменениям по сравнению с немагнитными изотопами, даже с учётом масс-зависимого изотопного эффекта.

На рисунке 3.9 приведены магнитно-полевые экспериментальные зависимости количества КОЕ бактерий *E. coli*, инкубируемых на питательных средах М9 в ПМП 1,8–100 мТл. Магнитно-полевые эффекты в диапазоне ПМП 0–22 мТл были рассмотрены выше. Самый интересный магнитно-полевой был зарегистрирован в диапазоне ПМП 76-93 мТл для тех бактерий *E. coli*, которые инкубировались на среде М9 с магнитным магнием ^{25}Mg . Количество КОЕ этих микроорганизмов было выше и достигало максимального значения в ПМП 76 мТл, в четыре раза превосходящее значения КОЕ для клеток, инкубируемых на

средах с немагнитными изотопами ^{24}Mg и ^{26}Mg (рисунок 3.9). Важно отметить, что абсолютные значения по оси ординат для рисунка 3.8 и 3.9 нельзя сравнивать, так как это разные серии экспериментов, проводимые в разное время. Кроме того, отличались и посевные дозы бактерий *E. coli*.

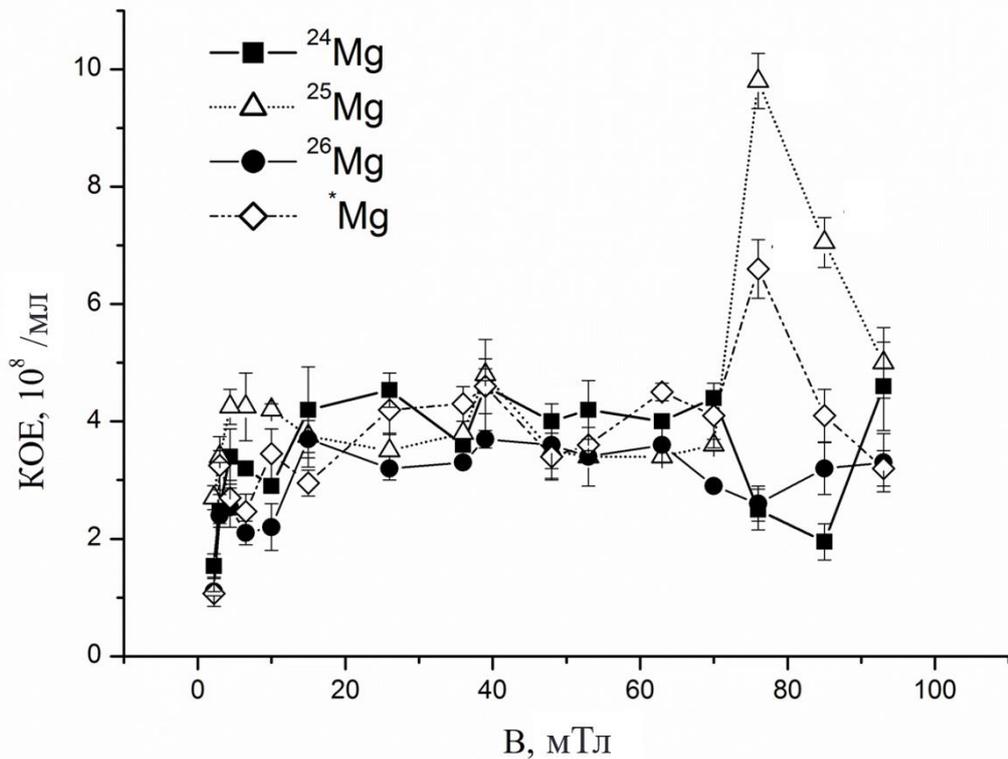


Рисунок 3.9 – Магнитно-полевые зависимости КОЕ бактерий *E. coli*, культивируемых на среде М9 с изотопами магния. Диапазон полей 1,8-100 мТл. В качестве погрешности указана стандартная ошибка, $n=10$

Количество КОЕ бактерий, выращенных на питательной среде М9 с природным соотношением изотопов магния, было выше, чем для клеток *E. coli*, выращенных на среде с немагнитными изотопами, но ниже, чем для клеток с магнитными ^{25}Mg . «Это является дополнительным доказательством стимулирующего влияния магнитных ядер ^{25}Mg на спин-зависимые ферментативные процессы, так как природный магний содержит 10,11% магнитного изотопа» [4]. В диапазоне ПМП 76–93 мТл был обнаружен

совместный эффект магнитного поля и магнитного изотопа магния ^{25}Mg в колониеобразующей способности бактерий *E. coli*. При этом амплитуда совместного эффекта превосходит МИЭ магния без магнитного поля (см. рисунок 1.12) в количестве КОЕ микроорганизмов [4].

Подобные эффекты в живых организмах предсказывает модель ферментативной магниточувствительности ([глава 6](#)). При этом для бактерий, которые инкубировались в ПМП диапазона 76–93 мТл на среде LB без добавления изотопов магния, не было зарегистрировано увеличение КОЕ (рисунок 3.3). Наоборот, такие ПМП ингибируют рост клеток, растущих в оптимальных условиях. Питательная же среда М9 является минимальной, т.е. обеспечивает микроорганизмы только минимальным набором питательных веществ, необходимых для роста. Следовательно, проявление совместных эффектов ПМП и магнитных изотопов зависит от среды роста. Живые организмы, находящиеся в неоптимальных условиях, становятся чувствительнее к магнитным взаимодействиям, что также предсказано теорией ферментативной магниточувствительности ([см. пункт 6.2](#)).

3.5 Влияние внешнего магнитного поля на внутриклеточный элементный состав бактерий *E. coli*, культивируемых в присутствии изотопов магния

Данные по элементному составу бактерий *E. coli*, выращенных на питательных средах М9 с изотопами магния в ПМП 1,8–100 мТл, приведены на рисунках 3.10–3.14.

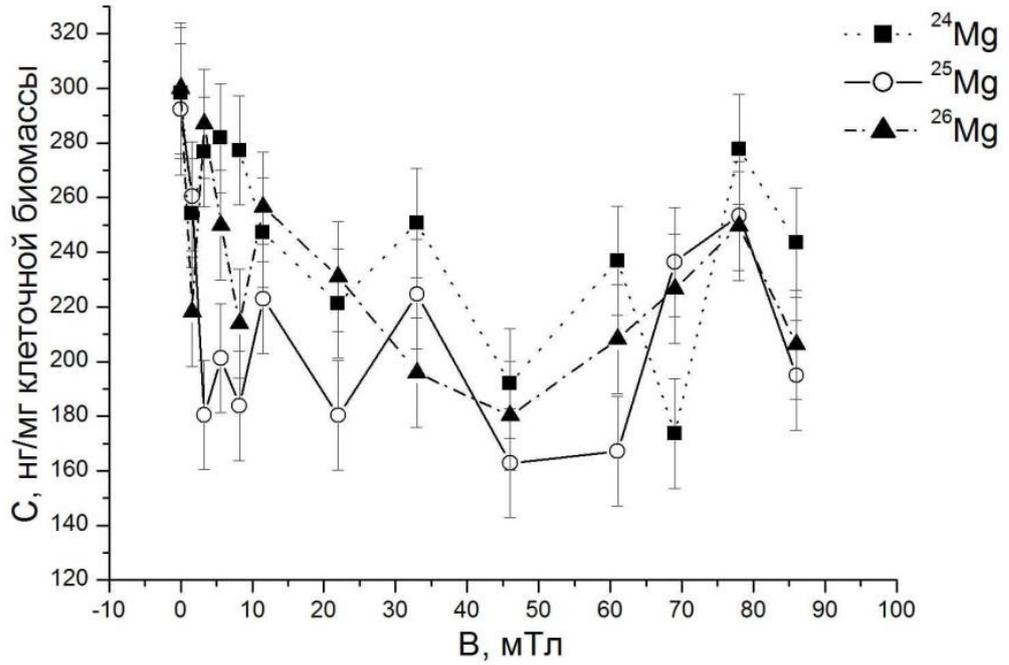


Рисунок 3.10 – Относительное содержание К в бактериях *E. coli* после культивирования в ПМП в присутствии изотопов магния. В качестве погрешности указана стандартная ошибка, $n=12$

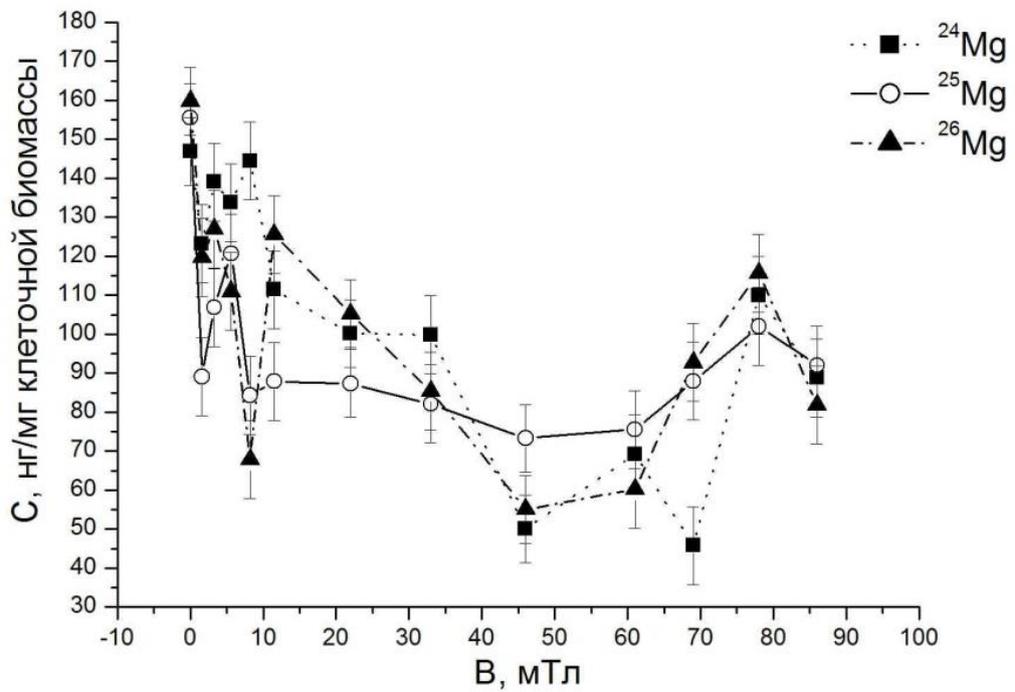


Рисунок 3.11 – Относительное содержание Na в бактериях *E. coli* после культивирования в ПМП. В качестве погрешности указана стандартная ошибка, $n=12$

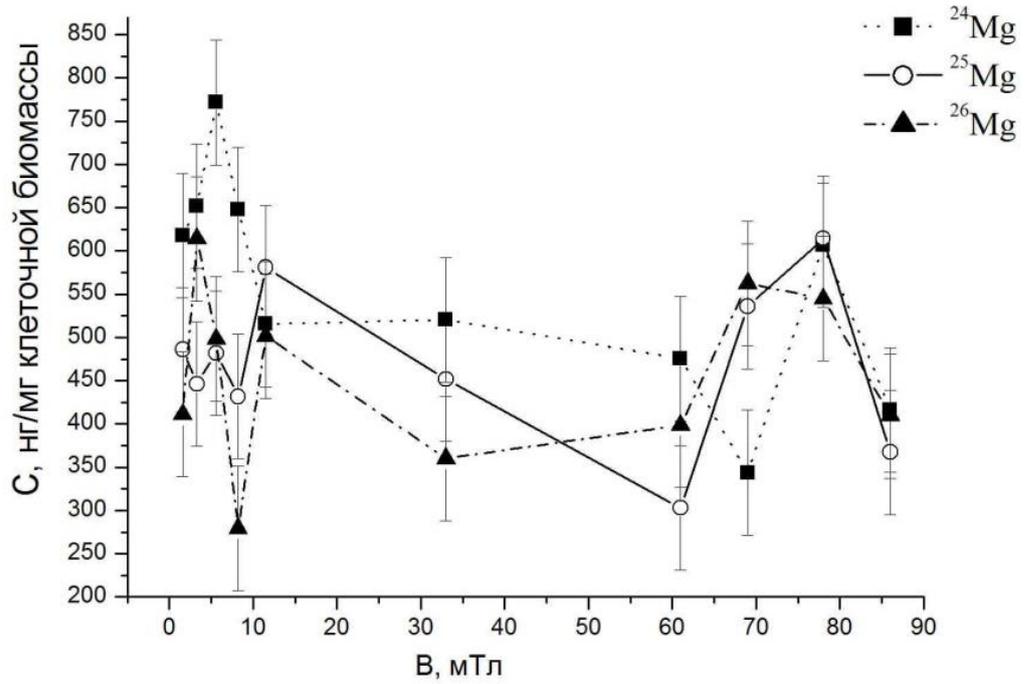


Рисунок 3.12 – Относительное содержание S в бактериях *E. coli* после культивирования в ПМП. В качестве погрешности указана стандартная ошибка, $n=12$

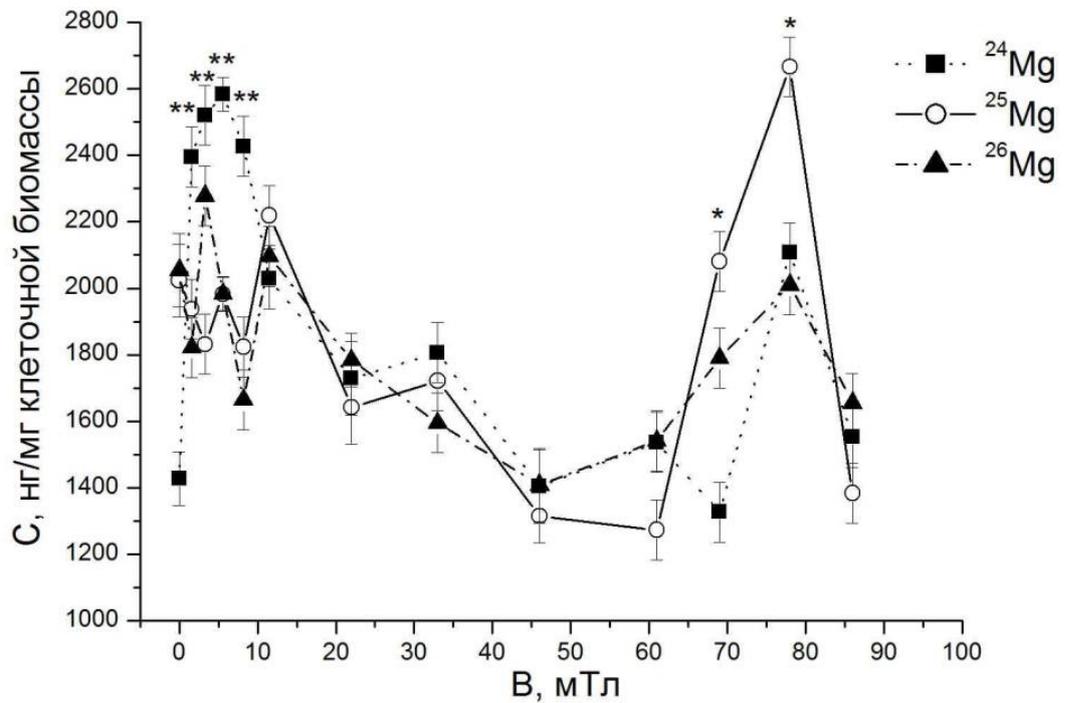


Рисунок 3.13 – Относительное содержание P в бактериях *E. coli* после культивирования в ПМП. В качестве погрешности указана стандартная ошибка, $n=12$

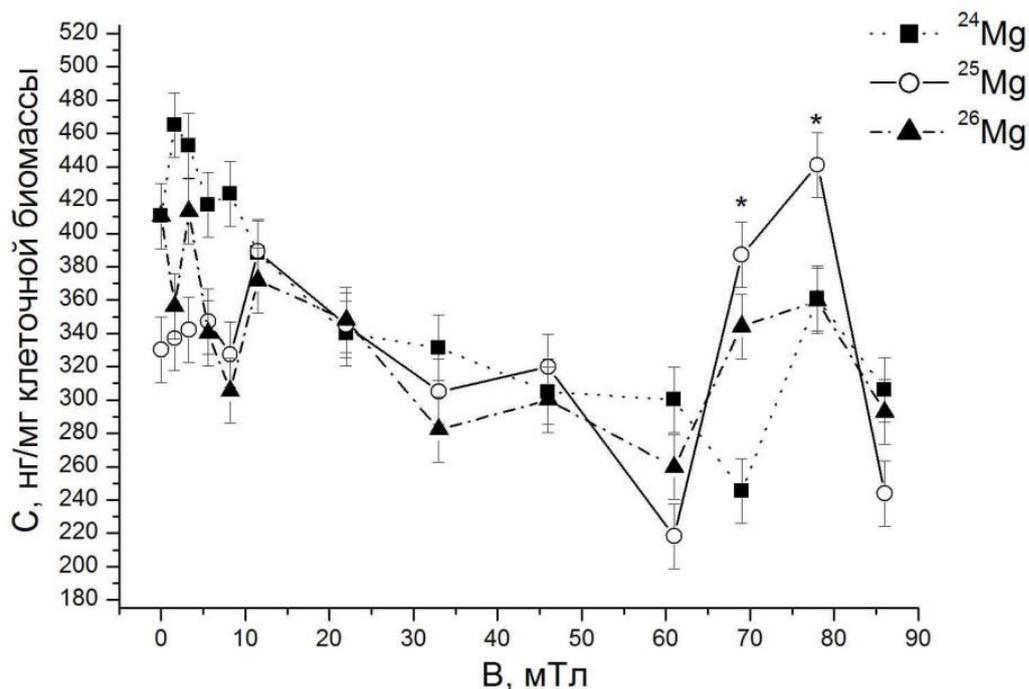


Рисунок 3.14 – Относительное содержание Mg в бактериях *E. coli* после культивирования в ПМП. В качестве погрешности указана стандартная ошибка, n=12

Анализ данных внутриклеточного содержания химических элементов в бактериях *E. coli* после культивирования в ПМП на средах M9 с изотопами магния позволил выбрать 19 элементов, которые присутствовали во всех образцах и достоверно определялись. Два из них - P, S, - относятся к основным питательным элементам, которые вместе с C, H, O, N составляют до 97% сухой биомассы бактерий [119-120]. «Из обнаруженных в бактериях металлов четыре относятся к жизненно-важным макроэлементам - Na, Mg, K, Ca, - остальные являются эссенциальными микроэлементами (Fe, Cu, Zn, Mo, Ni, Mn, Li). Из условно «токсичных» металлов в бактериях *E. coli* обнаружены Al и Cr» [4, 10]. В результате статистического анализа данных (n=12) окончательно было выделено пять элементов – P, S, K, Na, Mg (рисунки 3.10-3.14). Для этих элементов были зарегистрированы достоверные изменения внутриклеточного содержания в зависимости от внешнего ПМП и содержания изотопов магния в питательной среде роста. «Внутриклеточные концентрации других обнаруженных элементов

(S, Fe, Cu, Mo, Ni, Mn, Al, Cr, Sr, Rb, Ba, Ce, Li) находятся в пределах погрешности и не обнаруживают каких-либо закономерностей» [4, 10].

Характер магнитно-полевых зависимостей внутриклеточного содержания P, S, K, Na, Mg (рисунки 3.10-3.14) в бактериях *E. coli* позволяет выявить следующие закономерности:

1) магнитно-полевые зависимости внутриклеточного содержания для химических элементов Na–K качественно схожи;

2) содержание «элементов S, Mg, P достоверно изменяется для бактерий, выросших на среде с магнитным изотопом магния ^{25}Mg именно при действии внешнего магнитного поля 76 мТл, что коррелирует с данными по колониеобразующей способности» [4, 10];

3) слабые ПМП 1,8-10 мТл влияют на относительное внутриклеточное содержание почти всех элементов. В этом диапазоне происходит увеличение или уменьшение внутриклеточной относительной концентрации большинства элементов.

«Всё вышесказанное свидетельствует об изменении метаболизма бактериальных клеток в зависимости от типа изотопа магния – магнитный/немагнитный, - и величины внешнего ПМП» [4, 10]. Магнитно-изотопное и магнитно-полевое влияние на внутриклеточные процессы приводит к замещению одних химических элементов другими в связи со сложными изменениями в метаболических путях.

3.6 Влияние магнитных взаимодействий на образование биоплёнок бактериями *E. coli*, обогащенных изотопами магния

Одно из основных физиологических свойств бактерий, представляющих исключительный интерес для медицины, – это образование биоплёнок. «Сообщества микробов, объединенных в единый полимерный матрикс (белки, полисахариды и нуклеиновые кислоты), – это сложная структура, выстроенная

самими бактериями для защиты от губительных внешних факторов (антибактериальных средств, механического воздействия) и т.п. [89]. Удалить и инактивировать развитые и зрелые биопленки достаточно трудно [83], что приводит к различным проблемам, особенно в медицине и промышленности. Возможность контроля образования биопленок – это междисциплинарная научная задача, изучаемая давно и активно. При этом в литературе не найдено достоверных данных о влиянии ПМП на образование биоплёнок бактериями. В работе [121] показано, что этот процесс подавляется у микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa* при воздействии переменным магнитным полем [14].

В результате проведения 10 экспериментальных серий исследования совместного влияния ПМП 1,8-100 мТл и изотопов магния на образование биоплёнок бактериями *E. coli* были получены магнитно-полевые зависимости оптической плотности, приведенные на рисунке 3.15. Анализ полученных данных позволяет выделить два диапазона ПМП, в которых удалось зарегистрировать значимые эффекты в формировании биоплёнок: 2-10 мТл, 20-35 мТл (рисунок 3.15). В первом диапазоне наблюдаются резкие изменения оптической плотности – увеличение или уменьшение. Это говорит о чувствительности процесса биоплёнкообразования к слабым ПМП, независимо от типа изотопа магния в питательной среде роста. Обнаружение эффектов в этом диапазоне коррелирует с экспериментальными данными роста и внутриклеточного элементного содержания [14].

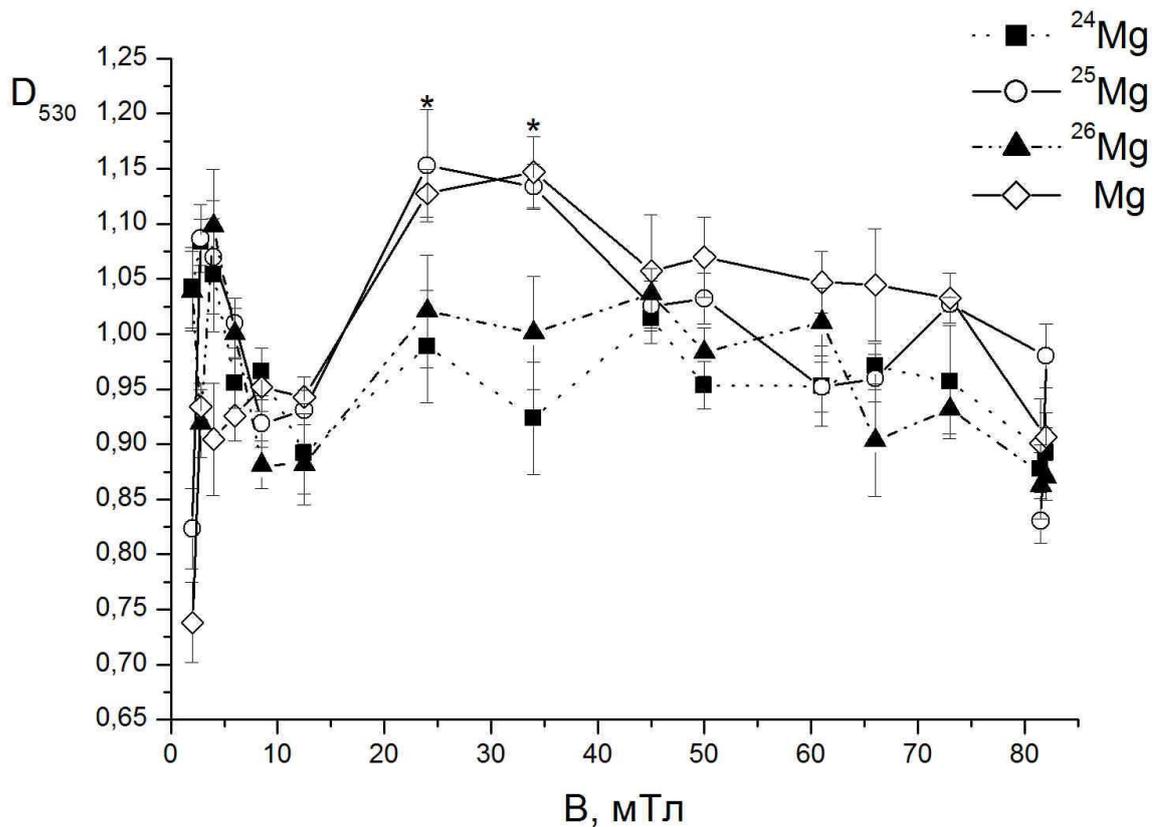


Рисунок 3.15 - Магнитно-полевые зависимости формирования биоплёнок бактериями *E. coli*, культивируемых на средах М9 с изотопами магния ^{24}Mg , ^{25}Mg , ^{26}Mg , Mg. *Различия между средними значениями оптической плотности считались статистически достоверны при $p < 0,05$ ($n=10$) [14]

«В диапазоне 20–35 мТл происходит незначительное повышение оптической плотности для двух исследуемых групп – бактерий, культивируемых в присутствии магнитного изотопа магния ^{25}Mg и природного магния (содержащего 10 % магнитного изотопа магния). Значит, в этих условиях микробы лучше формируют биоплёнки» [14]. Совместное влияние ПМП этого диапазона 20-35 мТл и магнитных моментов атомных ядер на ростовые показатели бактерий *E. coli* также обнаружено для стабильного магнитного изотопа цинка ^{67}Zn (глава 4). Происходит увеличение и скорости роста, и колониеобразующей способности. Вероятно, что ПМП 20–35 мТл и магнитные моменты ядер ^{25}Mg влияют на процессы ферментативного синтеза белка, а также репликации ДНК, в которых

участвуют ионы цинка [121]. «Естественным образом это приводит к стимуляции биоплёнокообразования бактериями *E. coli*, так как синтезируемый бактериями внеклеточный матрикс состоит, в основном, из белков и полисахаридов [89]. При дальнейшем увеличении постоянного магнитного поля до 80 мТл происходит незначительное подавление образования плёнок микроорганизмами всех исследуемых групп» [14].

Таким образом, образование биоплёнок – это магниточувствительный процесс, который возможно регулировать с помощью магнитно-полевых и магнитно-изотопных воздействий. Обнаруженные эффекты внешнего ПМП и магнитного изотопа магния ^{25}Mg в биоплёнокообразовании согласуются с моделью магниточувствительности живых организмов ([6 глава](#)).

3.7 Заключение

Обнаружены магнитно-полевые эффекты в диапазоне 0,8–15 мТл для всех регистрируемых показателей роста и метаболизма и для всех экспериментальных групп независимо от типа изотопа магния в питательной среде:

- константы скорости роста;
- колониеобразующая способность;
- содержание основных внутриклеточных элементов;
- способность к образованию биоплёнок.

При этом количество КОЕ и константы скорости роста для бактерий *E. coli*, обогащенных магнитным изотопом магния ^{25}Mg , были выше, чем для клеток, обогащенных немагнитными изотопами $^{24,26}\text{Mg}$ и природным магнием Mg , при воздействии ПМП 0,8–10 мТл.

Совместные эффекты магнитного изотопа магния ^{25}Mg и ПМП 70–95 мТл обнаружены в количестве КОЕ бактерий *E. coli* и во внутриклеточном содержании элементов S, Mg, P. Процесс образования биоплёнок бактериями оказался магнитно-чувствительным: он стимулируется воздействием ПМП 20-35

мТл в совокупности с добавлением магнитного магния в питательную среду роста микробов. Все наблюдаемые биологические эффекты в бактериях *E. coli* являются результатом совместного действия слабых магнитных полей и магнитного изотопа магния ^{25}Mg .

Результаты исследований, приведенные в третьей главе, опубликованы в работах [4, 9, 10, 14, 19].

Глава 4 Совместное влияние изотопов цинка и постоянных магнитных полей на бактерии *E. coli*

Введение

В ферментативных реакциях принимают участие 13 различных ионов металлов [82-83]. Лидирующее положение по частоте встречаемости занимает магний, за ним следуют цинк и железо. При этом магний чаще всего связан с фосфатными группами субстратов и взаимодействует с ферментом лишь временно, в то время как другие металлы с ним устойчиво связаны. В предыдущих главах были описаны МИЭ магния в живых организмах на примере бактерий *E. coli*. Особый интерес представляет экспериментально обнаруженное совместное влияние ПМП и магнитных моментов изотопа магния ^{25}Mg . Бактерии оказались чувствительны не только к магнитно-полевому воздействию, но и изотопному составу магния. Например, культивирование в питательной среде М9 с магнитным магнием ^{25}Mg увеличивало константу скорости роста бактерий и их колониобразующую способность ([глава 1](#)). Совместные эффекты ПМП и магнитного изотопа магния были зарегистрированы в диапазоне 70-95 мТл в количестве КОЕ бактерий *E. coli* ([глава 3](#)). Цинк является структурным компонентом более чем 2700 ферментов, включая гидролазы, лигазы, изомеразы, оксиредуктазы и др. [121-123]; играет важную роль в процессах, влияющих на деление и дифференцировку клеток (репликация ДНК и синтез белка), участвует в активации антиоксидантной защиты клеток и способен предотвращать повреждение клеточных мембран [121-123]. Уже доказано *in vitro*, что магнитный изотоп цинка влияет на синтез АТФ и ДНК [9, 13]. Целью данной главы является поиск экспериментальных доказательств чувствительности бактерий *E. coli* к магнитным ядерным моментам изотопа цинка ^{67}Zn .

4.1 Ферментативные реакции с участием ионов цинка (обзор литературы)

Цинк является вторым по распространенности ионом металла в ферментах (рисунок 4.1). Он встречается во всех шести классах ферментов, при этом в 66% случаев обнаруживается в каталитических центрах гидролаз [82]. Причина высокой встречаемости цинка в ферментативном катализе заключается в особенном сочетании свойств ионов цинка. С одной стороны, цинк напоминает элементы группы II, аналогично магнию и кальцию, в том, что он также стабилен в состоянии окисления +2. Ион Zn^{2+} имеет радиус $0,74 \text{ \AA}$, такой же как у иона Mg^{2+} , и способен электростатически связываться с отрицательно заряженными группами. Однако по сравнению с Mg^{2+} и Ca^{2+} цинк Zn^{2+} имеет более высокое сродство к электронам и, таким образом, является более сильной кислотой Льюиса. В частности, при взаимодействии с водой цинк образует гидроксидный ион для атаки субстрата [124].

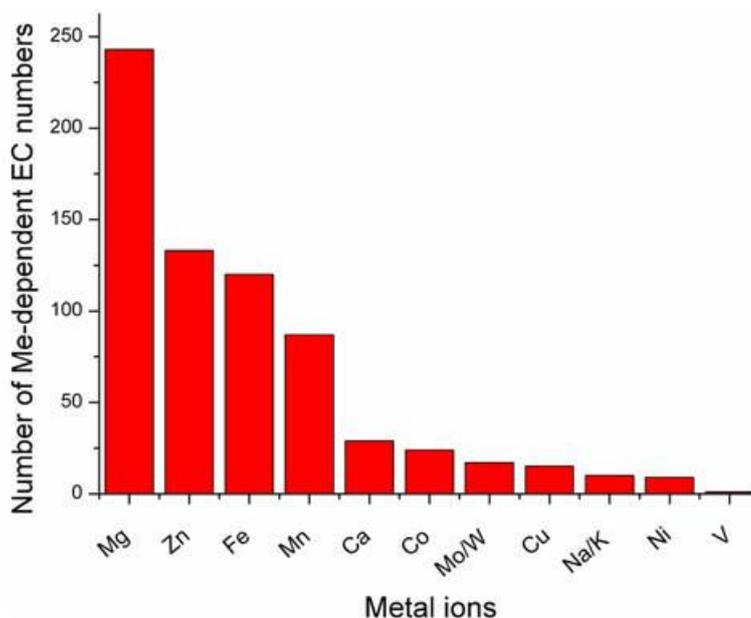


Рисунок 4.1 – Количество известных ферментов, в активных сайтах которых присутствуют металлы [82]

В некоторых ферментах ионы Zn^{2+} участвуют как в генерации атакующего нуклеофила, так и в повышении электрофильности субстрата, подвергающегося атаке, за счет поляризации связей P–O или C–O. Карбоксипептидаза А [125] и термолитин являются хорошо известными примерами, в которых ион Zn^{2+} выполняет обе функции. Другая важная функция Zn^{2+} в активных сайтах ферментов – стабилизация анионных групп интермедиатов. Электрофильная природа цинка приводит к смещению электронной плотности с анионных интермедиатов, эффективно снижая энергию активации некоторых химических реакций.

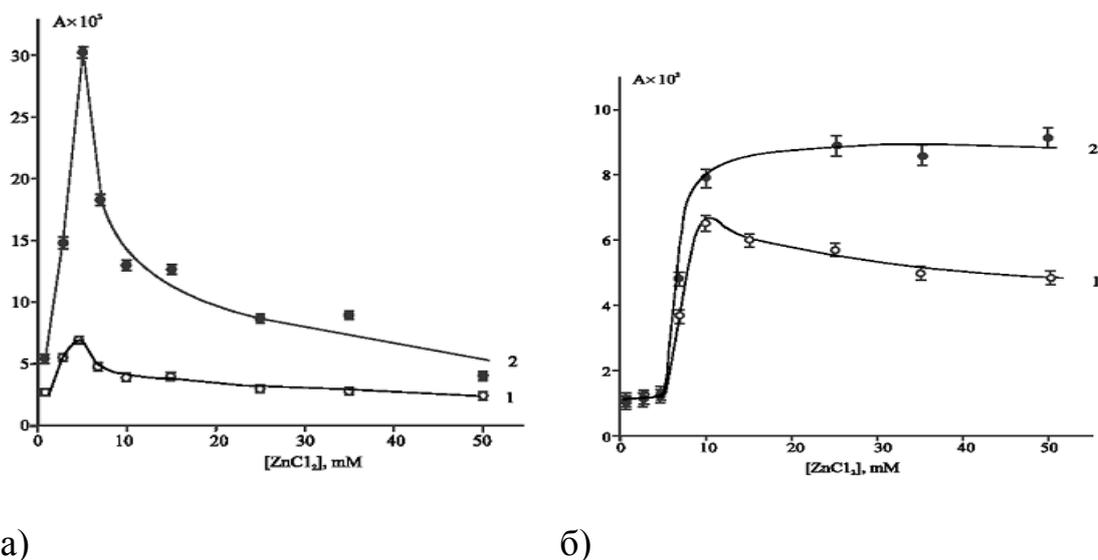
Цинк, находясь в активных сайтах ферментов, всегда участвует в связывании субстрата и зачастую изменяет координационную геометрию. Ион цинка может иметь координационные числа от четырех (в предпочтительной тетраэдрической геометрии) до шести. Стабильность цинка в водных растворах делает его идеальным кофактором в протеинах. В связанном состоянии цинк находится во многих белках и других факторах транскрипции [126-128]. Ионы цинка не инициируют губительные для клетки окислительно-восстановительные реакции, однако его избыток токсичен. Zn^{2+} может связываться в активных сайтах металл-зависимых ферментов, в нормальных условиях работающих с участием других ионов металлов [129-130]. То есть при избытке ионов цинка в клеточном пространстве, они случайным образом могут связываться с белками и ДНК, изменяя их структуру и активность.

Цинк «входит в состав важнейших ферментов: карбоангидраз, различных дегидрогеназ, фосфатаз, связанных с дыханием и другими физиологическими процессами, протеиназ и пептидаз, участвующих в белковом обмене, ферментов нуклеинового обмена (РНК- и ДНК-полимераз)» и других [131]. Он играет существенную роль в синтезе молекул мРНК на соответствующих участках ДНК (транскрипция), в стабилизации рибосом и биополимеров (РНК, ДНК, некоторые белки)» [131]. «При дефиците цинка возрастает проницаемость мембран, что свидетельствует о роли этого элемента в структуре мембран, в поддержании их интеграции. Цинк влияет на белковый синтез, на активность РНК-азы.

Обнаружены белки, содержащие цинк и участвующие в репликации ДНК и транскрипции. Цинк входит в состав одного из факторов регуляции транскрипции в соединении с остатками гистидина и цистеина («цинковые пальцы»)» [82, 130].

Гомеостаз ионов Zn^{2+} в прокариотах изучен не так хорошо, как в эукариотах. Больше всего работ в этом направлении проведено на модели бактерий *E. coli* [132] и *B. subtilis* [133]. В бактериях *E. coli* более ста цинк-зависимых металлопротеинов. Внутриклеточное содержание металл-ионов должно сохраняться на уровне оптимальной концентрации. Общая концентрация ионов цинка (свободных и связанных) в клетках *E. coli* была определена и составила $2 \cdot 10^5$ атомов на клетку, что соответствует миллимолярной концентрации [134-135]. До этого считалось, что большинство ионов существует в свободной, несвязанной форме в цитоплазме клетки. Но в работе [133] получено, что концентрация свободных ионов цинка в клетке колеблется около 10^{-15} М, что составляет примерно один свободный атом на клетку. Оказалось, что только 12 % связанных ионов были учтены при определении концентрации. В отличие от эукариот, прокариоты не имеют субклеточных органелл, накапливающих свободные ионы цинка. И до сих пор не выяснены механизмы распространения и накопления цинка в цитоплазме прокариотических клеток.

МИЭ в ферментативном фосфорилировании был сначала предсказан, а потом воспроизведён для ионов магнитного изотопа цинка $^{67}Zn^{2+}$ [9]. Скорость синтеза АТФ для ферментов креатинкиназы и пируваткиназы выше, когда в активном сайте фосфорилирующего фермента находится изотоп цинка, имеющий ядерный спин ^{67}Zn , по сравнению с немагнитным ядром ^{64}Zn (рисунок 4.2). Среди стабильных изотопов цинка только ядро ^{67}Zn имеет магнитный момент и спин (таблица 4.1) и является магнитным.



а)

б)

Рисунок 4.2 - Выход АТФ для креатинкиназы (а) и глицерофосфаткиназы (б) как функция концентрации $^{66}\text{ZnCl}_2$ (1) и $^{67}\text{ZnCl}_2$ (2) [9]

Таблица 4.1 – Стабильные изотопы цинка

Изотоп цинка	Спин ядра	Природное содержание изотопа, %
^{64}Zn	0	48,26
^{66}Zn	0	27,97
^{67}Zn	5/2	4,10
^{68}Zn	0	19,02
^{70}Zn	0	0,63

Изотопные ионы $^{67}\text{Zn}^{2+}$ с магнитными ядрами также влияют на синтез ДНК, подавляя ферментативную активность β -полимеразы [13]. В работах [136, 20-22, 25] проводилось исследование влияния магнитных изотопов магния, цинка и кальция на рост раковых клеток двух типов *in vivo*. Необходимо отметить, что для экспериментов использовались синтезированные порфирин-фуллереновые наночастицы, содержащие изотопные ионы металлов. Обнаружено, что наночастицы с магнитными изотопами ^{25}Mg , ^{43}Ca , ^{67}Zn индуцируют высокую цитотоксичность в раковых клетках по сравнению с природными аналогами и немагнитными изотопами соответствующих металлов (рисунок 4.3). Причина

такого эффекта связана, во-первых, с особенностью синтезированных наночастиц РМС16 [25-26]. Во-вторых, выяснено [22-25], что полимеразы, нагруженные ионами с магнитными ядрами, образуют короткие фрагменты ДНК (25-35 нуклеотидов), в то время как полимеразы с немагнитными ионами производят фрагменты нормальной длины 180-210 нуклеотидов. Аномально короткие сегменты ДНК могут активировать белок p53, который стимулирует апоптоз раковых клеток.

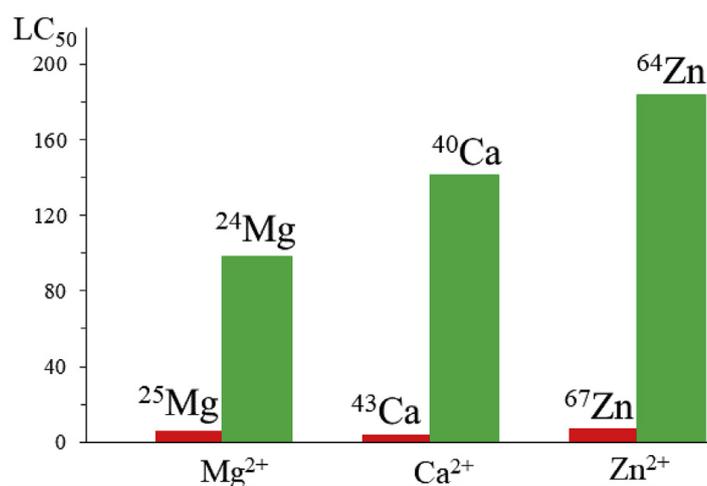


Рисунок 4.3 - Величины LD₅₀ для раковых клеток ретинобластомы, обогащенные магнитными (красные колонки) и немагнитными (зеленые колонки) ионами Mg²⁺, Ca²⁺ и Zn²⁺ [25]

В работах [14, 24] описан парный радикальный механизм, действующий при синтезе ДНК β -полимеразой. При низких концентрациях ионов металлов магнитные эффекты отсутствуют, т. е. доминирует нуклеофильный механизм; при концентрациях $\geq 0,5$ мМ включается механизм радикальной пары, который сопровождается магнитными эффектами, вызывающими гибель раковых клеток. Нет сомнений, что подобный механизм действует и при репликации ДНК, и при транскрипции РНК, потому что синтезы молекул ДНК и РНК абсолютно химически идентичны. Ионы с магнитными ядрами подавляют синтез ДНК, м-РНК и т-РНК, индуцируя гибель раковых клеток и контролируя все три ключевых процесса в клетке: репликацию, транскрипцию и трансляцию [20-25].

4.2 Материалы и методы

Аналогично экспериментальным исследованиям совместного влияния ПМП и изотопов магния на бактерии *E. coli*, в экспериментах с изотопами цинка использовался тот же музейный штамм K12TG1 и синтетическая питательная среда M9. Только вместо изотопов магния в среду добавлялись изотопы цинка в виде сульфата. Концентрация сульфата цинка подбиралась экспериментально для создания оптимальных условий роста, так как уже миллимолярные концентрации ионов цинка в среде приводят к подавлению роста клеток. Таким образом, состав среды M9, обогащенной «изотопами цинка следующий: 7,4 мМ NH₄Cl, 25 мкМ ^{64,66,67}ZnSO₄, 55,5 мМ глюкозы, 84,5 мМ Na₂HPO₄, 44,1 мМ KH₂PO₄, 17,1 мМ NaCl (Reachim, Москва, Россия). Среды различались только изотопной формой цинка в соли: немагнитные ⁶⁴Zn и ⁶⁶Zn, магнитный ⁶⁷Zn и природный изотоп Zn. После приготовления синтетической питательной среды M9 уровень pH (6,85±0,15) был одинаковым для всех сред во всех опытных сериях.

Изотопы цинка добавляли в среду в виде сульфата цинка ZnSO₄; концентрацию строго контролировали для всех сульфатов 25 мкМ. Для получения сульфатов использовали изотопно чистые оксиды: ⁶⁴ZnO, ⁶⁶ZnO и ⁶⁷ZnO (ФГУП "Электрохимприбор", г. Лесной, Россия) с чрезвычайно высоким изотопным обогащением: 99,3, 98,1 и 94,2 ат. % соответственно» [12, 13]. Информация о примесях оксидов изотопов цинка представлена в таблице 4.2.

Таблица 4.2 – Содержание изотопов и химических элементов в оксидах изотопов цинка (по данным паспортов оксидов изотопов цинка) [13]

Изотоп цинка	Содержание изотопов, ат. %		
	в ^{64}ZnO	в ^{66}ZnO	в ^{67}ZnO
^{64}Zn	99,30±0,10	98,10±0,10	94,20±0,30
^{66}Zn	0,50	1,05	0,74
^{67}Zn	< 0,05	0,30	1,56
^{68}Zn	0,20	0,54	3,46
^{70}Zn	< 0,05	0,01	0,04
Содержание химических элементов, вес. %			
Химический элемент	в ^{64}ZnO	в ^{66}ZnO	в ^{67}ZnO
K	< 0,0050	< 0,0010	< 0,0010
Na	< 0,0020	< 0,0010	< 0,0010
Ca	< 0,0050	0,0010	0,0020
Mg	< 0,0003	0,0010	0,0030
Fe	< 0,0050	0,0050	0,0030
Al	< 0,0003	0,0030	0,0050
Si	< 0,0050	0,0030	0,0060
Ni	0,0028	< ПО	< ПО
Cu	0,0034	0,0020	0,0010
Pb	< 0,0001	0,0010	< 0,0050
Cd	< 0,0001	< 0,0040	< 0,0050
* ПО – порог определения			

Бактерии предварительно инкубировались в бульоне LB (Sigma-Aldrich) после чего пересеивались на среды M9 со стабильными изотопами цинка ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn . В качестве контроля использовали питательную среду с природным изотопом Zn (смесь изотопов в их естественном соотношении). Культивировались бактерии в 96-луночных полистироловых планшетах в течение 7-8 часов при

температуре 37 °С в ПМП. Используемая установка описана в [пункте 3.2.2](#). Регистрировались ростовые показатели: скорость роста по кинетике роста, полученной турбидиметрическим методом ([см. пункт 1.2.3](#)), колониеобразующая способность с использованием методы серийных разведений и высева на питательный агар ([см. пункт 1.2.4](#)) [12, 13].

Диапазоны выбранных слабых магнитных полей составляли 2,2-78 мТл. Бактерии культивировали одновременно в 96 контрольных точках (для каждого из четырех изотопов цинка), соответствующих 21 стационарным ПМП в диапазоне 2,2-78 мТл, значения которых измеряли миллитесламетром (ТП2-2У, Фела-контрол, Санкт-Петербург, Россия) [12, 13].

Для создания аэробных условиях каждый час планшеты с бактериями *E. coli* в изотопных средах помещались на шейкер ST-3 ELMi (Рига, Латвия) на 5 мин при 200 об/мин. Таким образом, количество кислорода было достаточным для обеспечения аэробных условий культивирования, учитывая, что встряхивание производилось каждый час.

Элементное содержание бактериальной биомассы после культивирования в ПМП на средах с изотопами магния определялось с помощью масс-спектрометрии (ICP-MS X-7, Thermo Elemental, Thermo Fisher Scientific MA) и атомной эмиссии (ICAP-61, Thermo Jarrell Ash, Thermo Fisher Scientific MA) на содержание более 70 химических элементов ([см. пункт 1.2.2](#)) [12, 13].

При проведении исследований элементного содержания исходных питательных сред M9 с немагнитными $^{64,66}\text{Zn}$ и магнитным изотопом цинка ^{67}Zn не было обнаружено статистически достоверных различий для основных (K, Na, P, Zn, S) и примесных элементов (B, Ca, Mg, Ga, Rb, Sr, Sb). Результаты приведены на рисунке 4.4. Это означает, что проявление всех обнаруженных биологических эффектов изотопов цинка не связано с влиянием примесных элементов на метаболизм бактерий [12, 13]. Наблюдаемые различия связаны, прежде всего, с изменением хода метаболических процессов в бактериальных клетках в зависимости от типа (магнитный/немагнитный) изотопа Zn в питательных средах.

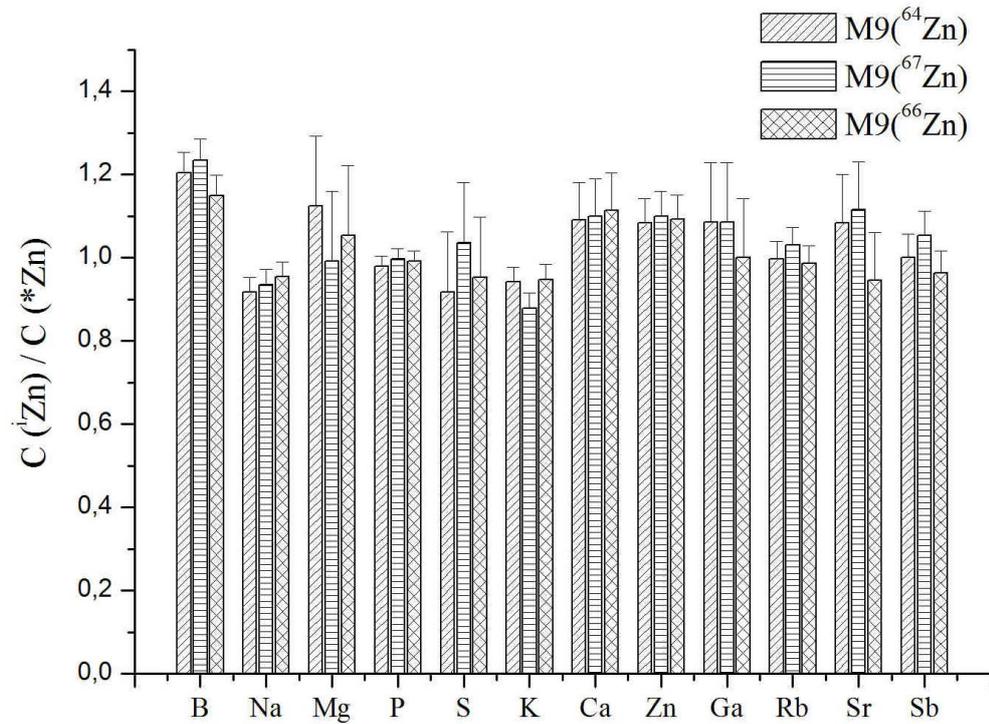


Рисунок 4.4 – Относительное содержание элементов питательных сред М9. $C(iZn)$ – концентрация элементов в средах М9, где i – обозначает атомную массу изотопа (64,67 или 66). $C(*Zn)$ – концентрация элементов в питательной среде М9, содержащей природный цинк. В качестве погрешности указана стандартная ошибка, $n=10$

Все экспериментальные данные представлены в виде среднего значения \pm SD. Для определения статистических различий использовался критерий Стьюдента. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$ ($n \geq 10$). Статистическая обработка и представление экспериментальных данных проводилась с помощью программного обеспечения Origin 8.0 (Версия 8.0; Microcal Software).

4.3 Влияние изотопов цинка на рост бактерий *E. coli*

Рост бактерий *E.coli* на питательных средах М9 с изотопами цинка происходит при недостатке питательных веществ. Выбранная питательная среда М9 сама по себе является минимальной. При этом для регистрации МИЭ цинка, мы полностью заменили сульфат магния на соль цинка, но в гораздо меньшей

концентрации. Увеличение концентрации цинка приводило к токсическим эффектам. Замещение солей магния сульфатом цинка в микромолярных концентрациях, подобранных экспериментально, позволяет получать качественную кинетику роста, но достигаемая плотность бактериальной культуры оказывается меньше в 2 раза. Бактерии достигают большей плотности при культивировании на стандартной среде М9 с ионами магния. Хорошо иллюстрируют это кривые, приведенные на рисунке 4.5, полученные в контрольных экспериментах.

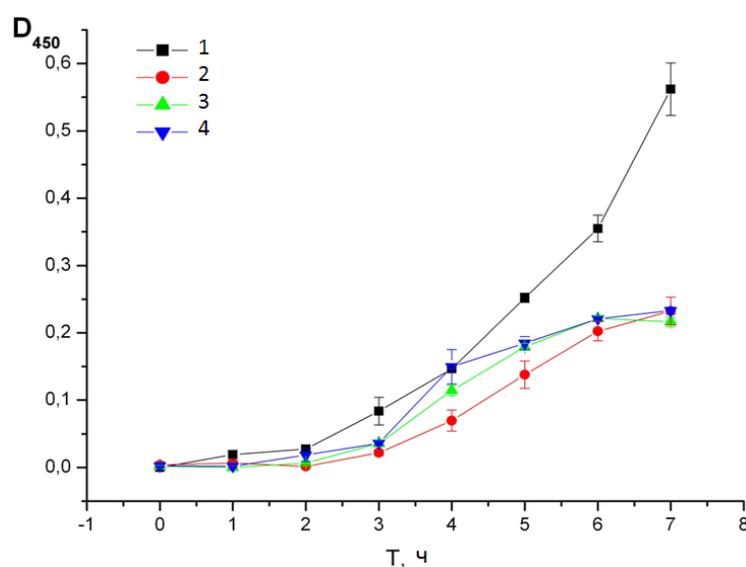


Рисунок 4.5 – Ростовые кривые клеток *E. coli*, выращенных на питательных средах М9 с изотопами цинка: 1 – питательная среда М9 (с природным магнием), 2 – с природным цинком, 3 – с 10 % магнитного изотопа ^{67}Zn , 4 – с ^{67}Zn . В качестве погрешности указана стандартная ошибка $n=10$

При исследовании влияния изотопов цинка на рост бактерий, кроме питательных сред, содержащих чистые изотопные формы цинка ($^{64,66,67}\text{Zn}$), использовались питательные среды со смесью изотопов с различным обогащением магнитным ^{67}Zn (в разных экспериментальных сериях 10, 25, 50 и 100 %). Полученные кинетические кривые представлены на рисунке 4.6. По ним

можно выделить следующие фазы роста: адаптационную (0-3 ч), экспоненциальную (3-7, 8 ч) и стационарную фазу (с 8-9 часа).

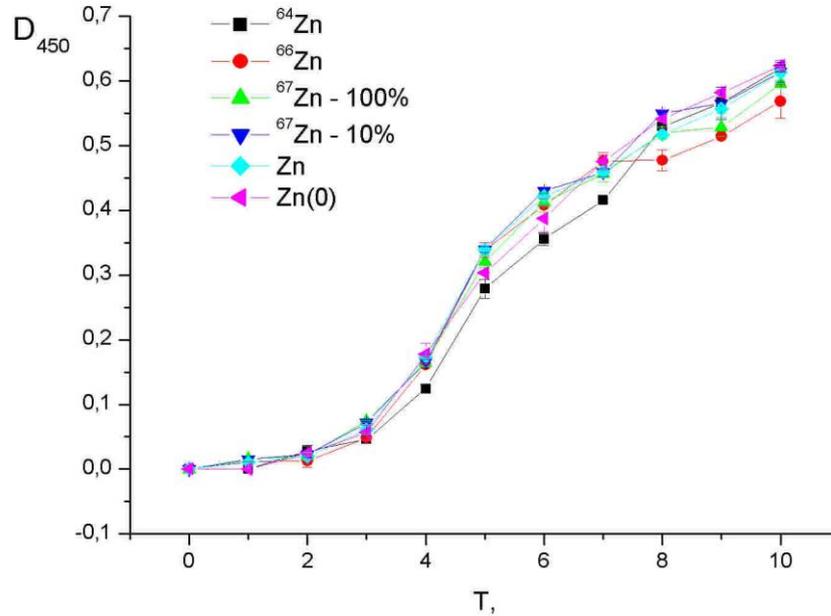


Рисунок 4.6 – Ростовые кривые клеток *E. coli*, выращенных на питательных средах М9 с изотопами цинка. Регистрация оптической плотности производилась на длине волны 450 нм

Для анализа ростовых кривых определялись значения констант скоростей роста и продолжительности адаптационной фазы. Статистически достоверных различий между константами скорости роста не обнаружено. Интересная зависимость получена для продолжительности адаптационной фазы роста (рисунок 4.7). При анализе кривой видно, что присутствие только магнитного изотопа цинка в питательной среде способствует быстрой адаптации клеток к новым условиям культивирования. Значения для времени лаг-фазы клеток *E. coli* на средах с немагнитными изотопами, с 10 % содержанием ^{67}Zn и «нулевой» средой статистически неразличимы. Это говорит об эффективности магнитного изотопа именно на начальной фазе роста культуры.

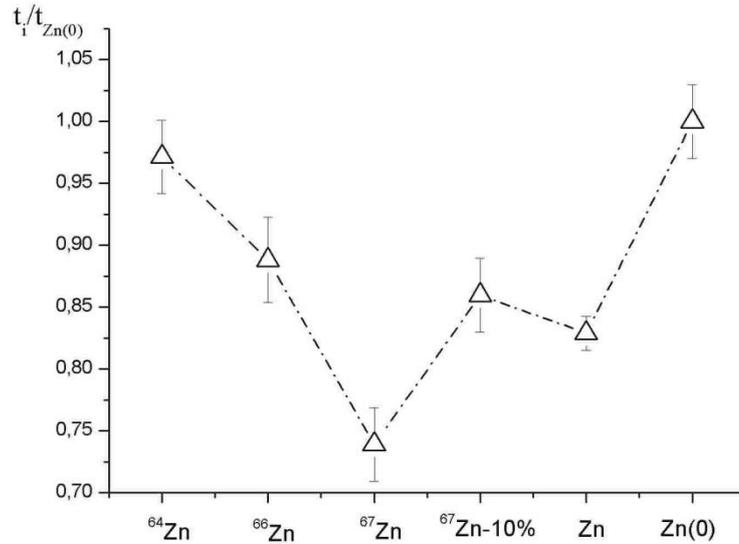


Рисунок 4.7 – Относительные значения продолжительности адаптационной фазы роста как функция изотопии цинка. t_i – продолжительность адаптационной фазы для клеток, выращенных на среде с i -м изотопом (^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn , $^{67}\text{Zn} - 10\%$, Zn – природный цинка, Zn (0) – «нулевая» (бесцинковая) среда); $t_{Zn(0)}$ – продолжительность адаптационной фазы для клеток, выращенных на бесцинковой среде. В качестве погрешности указана стандартная ошибка $n=10$

На рисунке 4.8 представлены зависимости числа КОЕ на стационарной фазе роста в зависимости от содержания изотопов цинка в среде М9. Не обнаружено статистически достоверных различий для бактерий, растущих в присутствии природного цинка, немагнитных изотопов $^{64,66}\text{Zn}$, 100 % содержания магнитного изотопа ^{67}Zn и без цинка. При этом количество КОЕ при обогащении питательной среды магнитным изотопом 10–50 % превышает в 1,5-2 раза количество КОЕ для других экспериментальных групп. То есть влияние ядерного магнитного момента ^{67}Zn на внутриклеточные ферментативные реакции существует, но не всегда положительно и зависит от соотношения магнитных и немагнитных ядер.

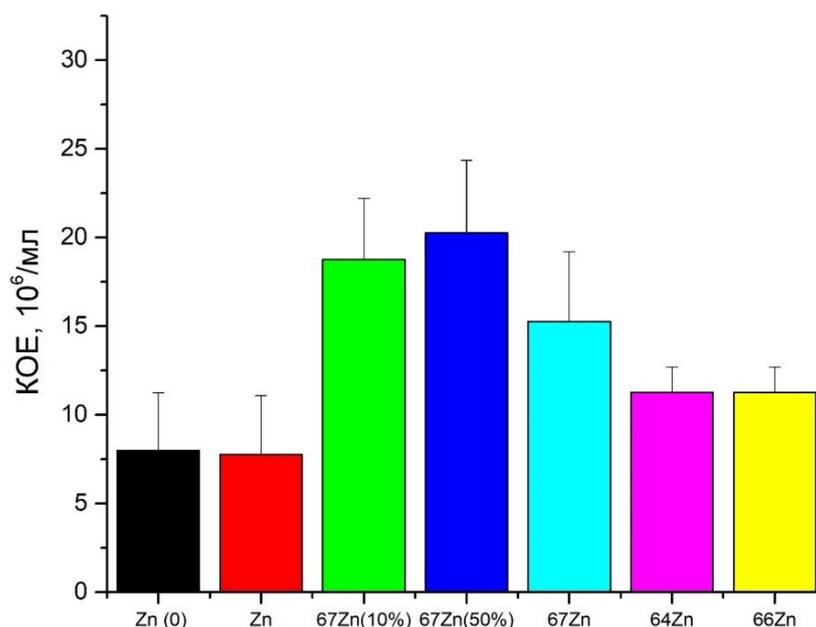


Рисунок 4.8 - КОЕ на стационарной фазе роста в зависимости от содержания изотопов цинка в среде М9. В качестве погрешности указана стандартная ошибка $n=10$

4.4 Влияние внешних постоянных магнитных полей и магнитных изотопов цинка на основные функциональные свойства микроорганизмов

При исследовании совместного влияния ПМП и изотопов цинка на бактерии *Escherichia coli* сначала был проведён контрольный эксперимент на среде М9 с природным цинком. На рисунке 4.9 представлены 21 кривая роста бактериальной культуры в различных ПМП.

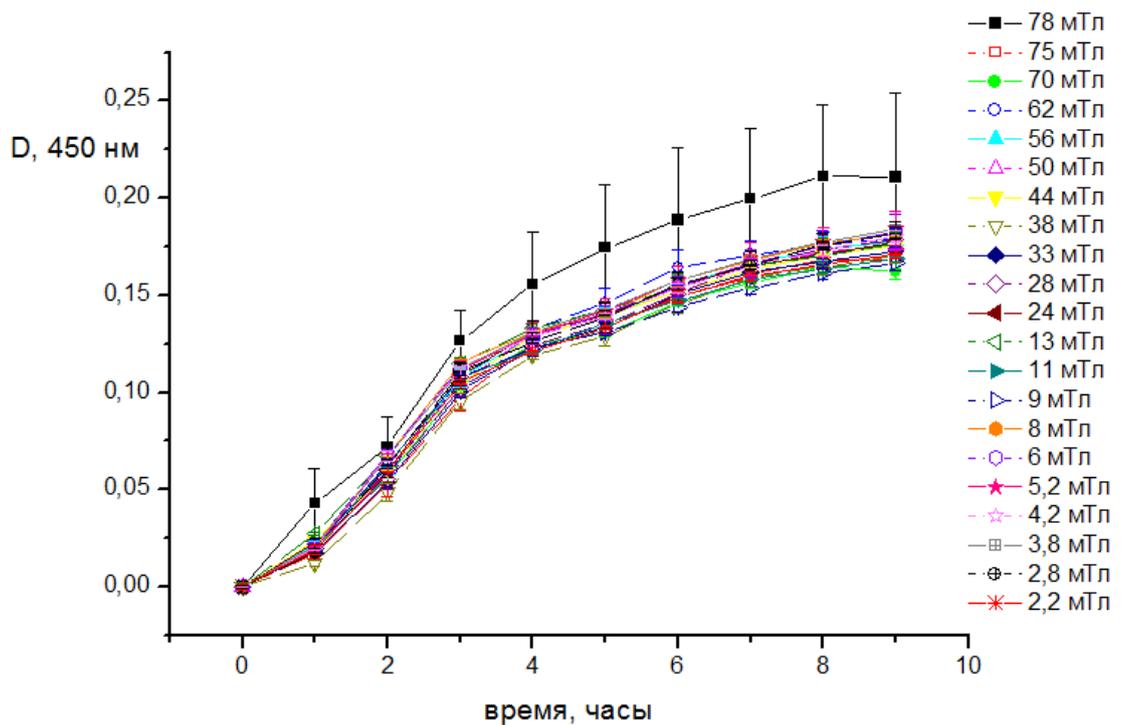


Рисунок 4.9 – Кривые роста для бактерий *E.coli* культивируемые в присутствии природного изотопа цинка Zn в ПМП от 2,2мТл до 78 мТл. В качестве погрешности указана стандартная я ошибка $n=10$

Полученные кривые роста бактерий на среде с природным цинком (рисунок 4.9), а также с изотопами цинка ^{64}Zn , ^{66}Zn и ^{67}Zn были обработаны (более 500 кривых) и найдены константы скорости роста. Аппроксимировался начальный участок ростовых кривых от 0 до 4 часов, который соответствуют экспоненциальному росту бактерий. Необходимо отметить, что инкубация бактерий в ПМП на средах М9 с изотопами цинка значительно сокращала фазу адаптации по сравнению с экспериментами без магнитных полей (рисунки 4.6–4.7). Полученные магнитно-полевые зависимости констант скоростей роста бактерий *E. coli* представлены на рисунке 4.10. На рисунке 4.11 приведены магнитно-полевые зависимости количества КОЕ бактерий *Escherichia coli*, инкубируемых в ПМП на питательных средах М9 с изотопами цинка.

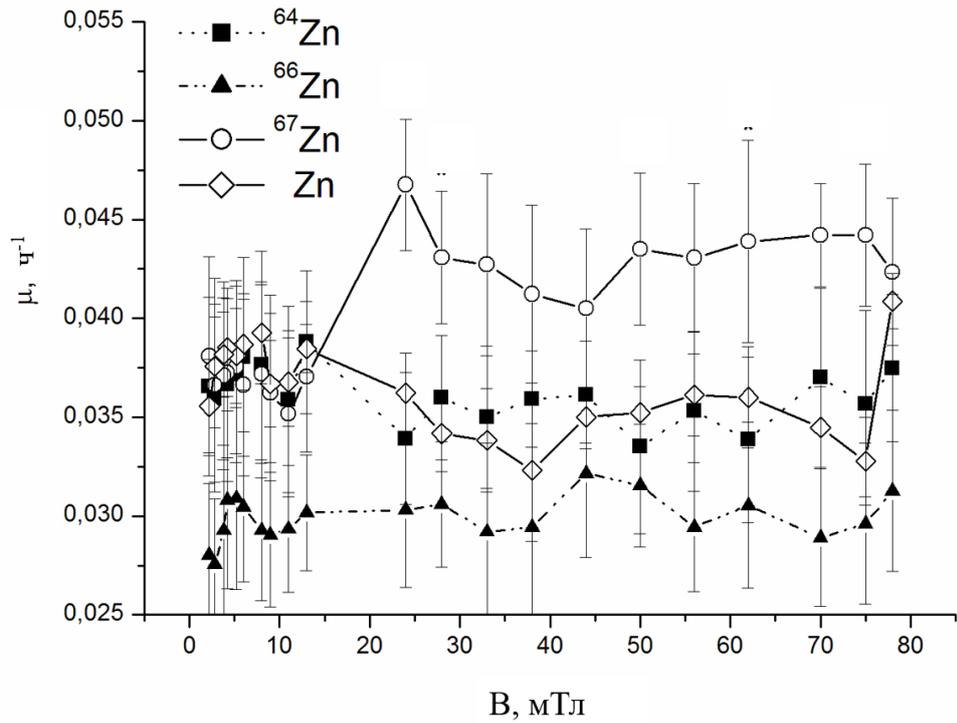


Рисунок 4.10 – Магнитно-полевые зависимости констант скоростей роста бактерий *E.coli*, выращенных в присутствии изотопов цинка в ПМП от 2,2 мТл до 75мТл. В качестве погрешности указана стандартная ошибка $n=10$

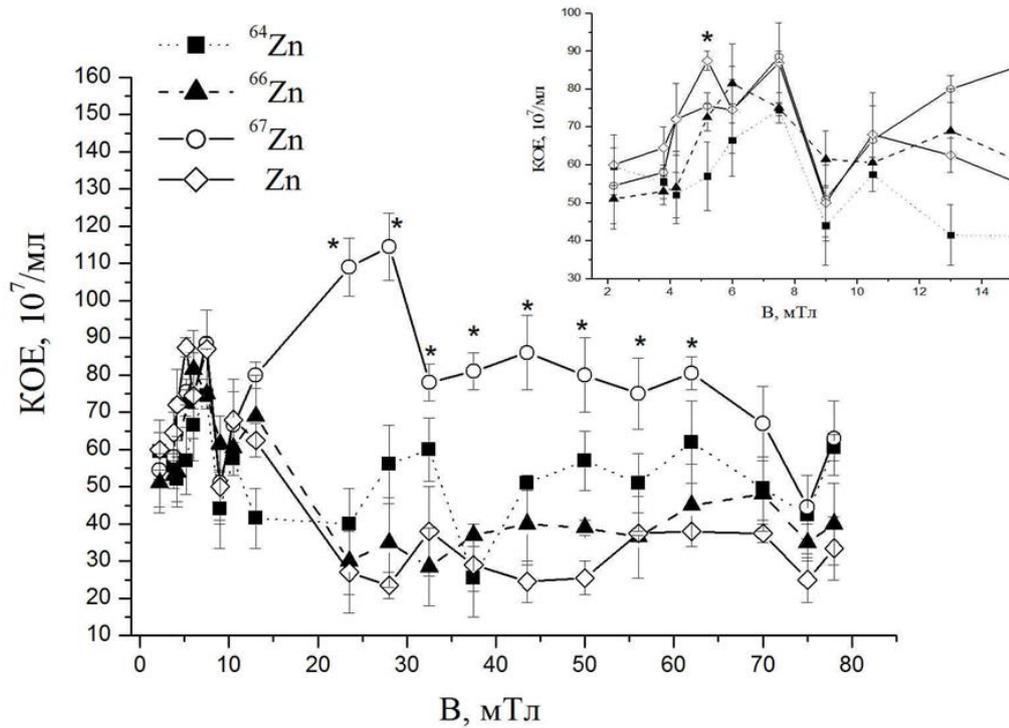


Рисунок 4.11 – Магнитно-полевые зависимости КОЕ клеток *E. coli*, выращенных в присутствии изотопов цинка в ПМП от 2,2 мТл до 75мТл. В качестве погрешности указана стандартная ошибка $n=10$

Можно выделить три диапазона ПМП (2,2–8, 25-35 и 35-78 мТл) с характерными особенностями роста бактериальной культуры. Сначала происходит увеличение количества КОЕ независимо от типа изотопа цинка (2,2–8 мТл). Похожие магнитно-полевые зависимости были получены нами ранее ([глава 3](#)) при совместном влиянии изотопов магния и ПМП на колониеобразующую способность. Вероятно, такой характер магнитно-полевой зависимости в этом диапазоне связан с влиянием ПМП на «внутриклеточные ферментативные ион-радикальные процессы с участием других магнитных ядер природных стабильных изотопов ([см. пункты 3.3-3.4](#)), например, ^{31}P , ^1H » [10]. Константы скорости роста в этом диапазоне ПМП изменяются незначительно. Явных статистически значимых различий не было обнаружено.

Во втором диапазоне ПМП от 25 до 35 мТл наблюдалось значительное увеличение (в 2-4 раза) колониеобразующей способности и констант скоростей роста бактерий, культивируемых в среде, содержащей магнитный изотоп цинка ^{67}Zn . Кривые роста для этого поля приведены на рисунке 4.12. Заметно, что кривая роста бактерий *E. coli*, культивируемых на среде с магнитным изотопом цинка ^{67}Zn , на начальном участке быстрее переходит в фазу экспоненциального роста, а также лежит выше других кривых. Это свидетельствует о чувствительности бактерий к совместному влиянию внешнего ПМП 24 мТл и магнитного изотопа цинка ^{67}Zn . Можно заметить, что кривые роста бактерий, выращенных на среде с немагнитным изотопом цинка ^{66}Zn и природным цинком, раньше выходят на стационарную фазу. Средняя плотность культуры на стационаре в 2 раза ниже по сравнению с бактериями, выращенными на среде М9 с изотопами ^{64}Zn , ^{67}Zn .

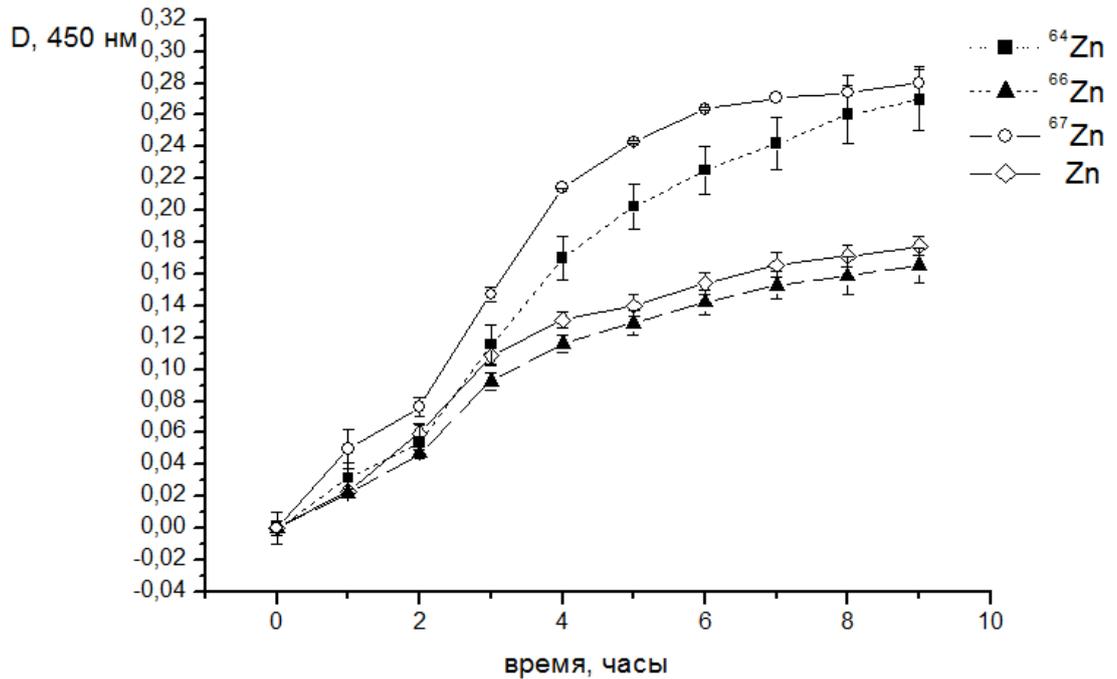


Рисунок 4.12 – Кривые роста для бактерий *E. coli* культивируемые в присутствии изотопов цинка в ПМП 24мТл. В качестве погрешности указана стандартная ошибка $n=3$

Различие в количестве КОЕ и константах скорости роста – это результат совместного влияния внешнего ПМП 24 мТл и магнитного изотопа цинка ^{67}Zn на внутриклеточные процессы, в которых участвует цинк, например пролиферация клеток и синтез белка [128-130]. Важно отметить, что увеличение колониобразующей способности бактерий, выращенных в аналогичных условиях с магнитным изотопом магния, обнаружено в другом диапазоне полей (см. пункт 3.4). Магнитные изотопы цинка ^{67}Zn и магния ^{25}Mg влияют на различные ферментативные процессы. Например, цинк участвует в работе РНК-полимеразы, супероксиддисмутазы, карбоксипептидазы и т.д. (см. пункт 4.1). Цинксодержащие вспомогательные белки участвуют в репликации нуклеиновых кислот [125]. Важно, что при отсутствии двухвалентных ионов магния в питательной среде, ионы цинка способны их заменять в ферментах, работающих с магнием. При этом эффективность фермента падает, а при значительных концентрациях ферментативная реакция ингибируется [129-130].

В третьем диапазоне магнитных полей 35-78 мТл число КОЕ и константы скоростей роста выше для бактерий, культивируемых в среде М9 с магнитным изотопом цинка ^{67}Zn , по сравнению с клетками, выращенными на средах, содержащих немагнитные изотопы $^{64,66}\text{Zn}$ и природный цинк Zn . Однако эти значения не превышают значений для второго диапазона, где число КОЕ и константы скорости роста максимальны.

4.5 Изменение внутриклеточного содержания бактерий *E. coli* в зависимости от внешних постоянных магнитных полей и изотопов цинка

По аналогии с внутриклеточным элементным содержанием в бактериях *E. coli*, выращенных на средах М9 с изотопами магния, можно выделить группу химических элементов, присутствующих во всех образцах в случае с изотопами цинка. Эта группа включает 18 элементов, из которых фосфор Р и сера S относятся к основным [119-120], натрий Na, магний Mg, калий К и кальций Ca – к жизненно-важным макроэлементам, остальные являются эссенциальными микроэлементами (Fe, Cu, Zn, Mo, Ni, Mn) [114]. «Из условно «токсичных» металлов в бактериях *E. coli* обнаружены алюминий Al и хром Cr» [12, 13]. Роль четырёх обнаруженных элементов в бактериальном метаболизме Sr, Rb, Ba, Ce пока недостаточно ясна [119-120]. После проведенного статистического анализа (n=10) внутриклеточного элементного содержания в микроорганизмах *E. coli*, культивируемых в ПМП с изотопами цинка, осталось шесть элементов: фосфор Р, калий К, натрий Na, кальций Ca, магний Mg и цинк Zn. Магнитно-полевые зависимости относительного внутриклеточного содержания именно этих элементов представляют интерес и имеют достоверные статистические различия. Магнитно-полевые концентрационные зависимости представлены на рисунках 4.13-4.18. Изменения концентраций других обнаруженных элементов (S, Fe, Cu, Mo, Ni, Mn, Al, Cr, Sr, Rb, Ba, Ce) находятся в пределах погрешности. Каких-либо

статистически достоверных различий в зависимости от изотопа цинка или напряженности внешнего ПМП не было выявлено [12, 13].

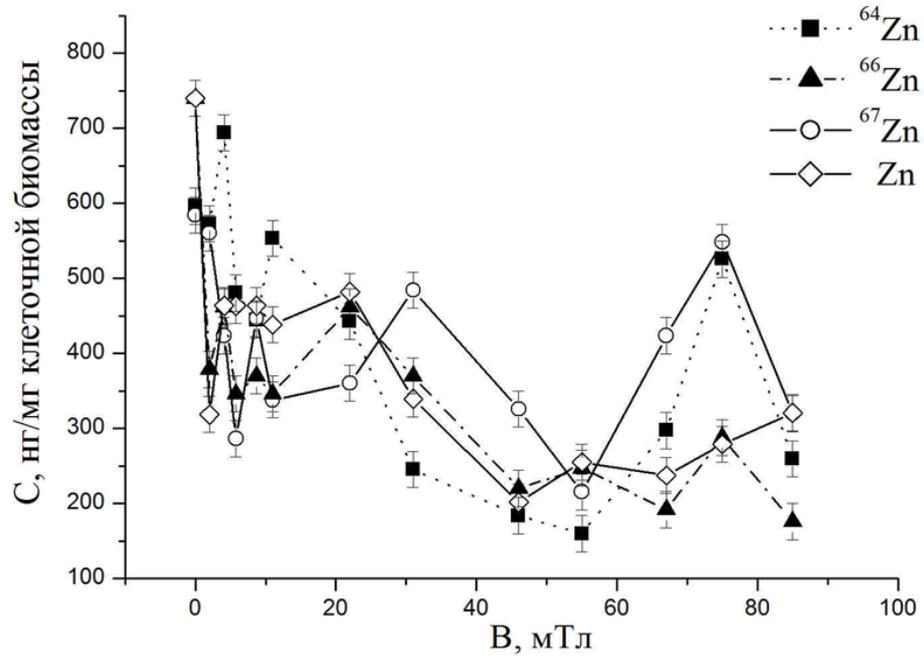


Рисунок 4.13 – Содержание калия К в бактериях *E.coli* после культивирования в ПМП в присутствии изотопов цинка. В качестве погрешности указана стандартная ошибка $n=10$

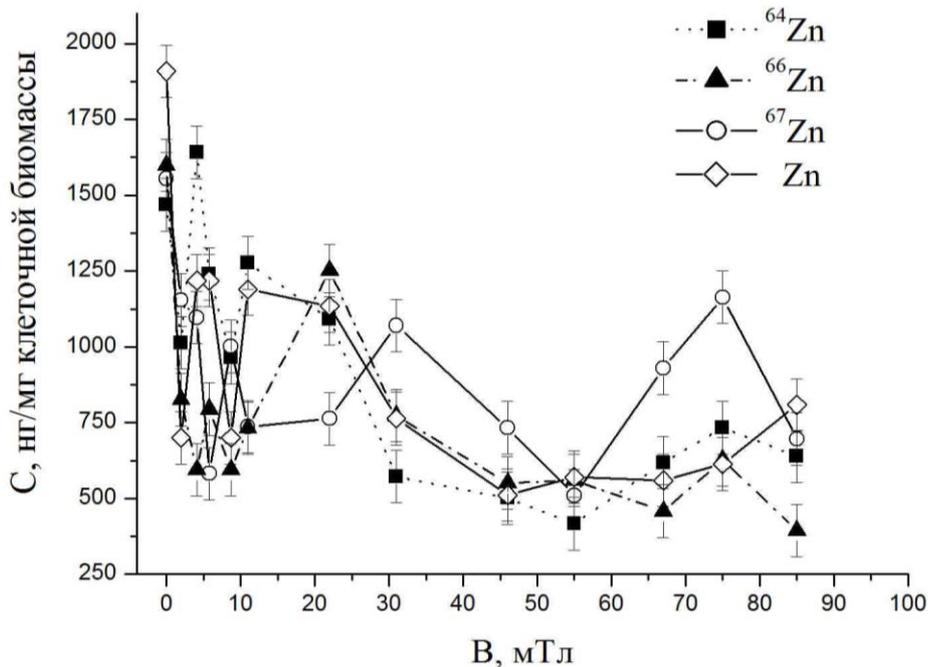


Рисунок 4.14 – Содержание натрия Na в бактериях *E.coli* после культивирования в постоянном магнитном поле в присутствии изотопов цинка. В качестве погрешности указана стандартная ошибка $n=10$

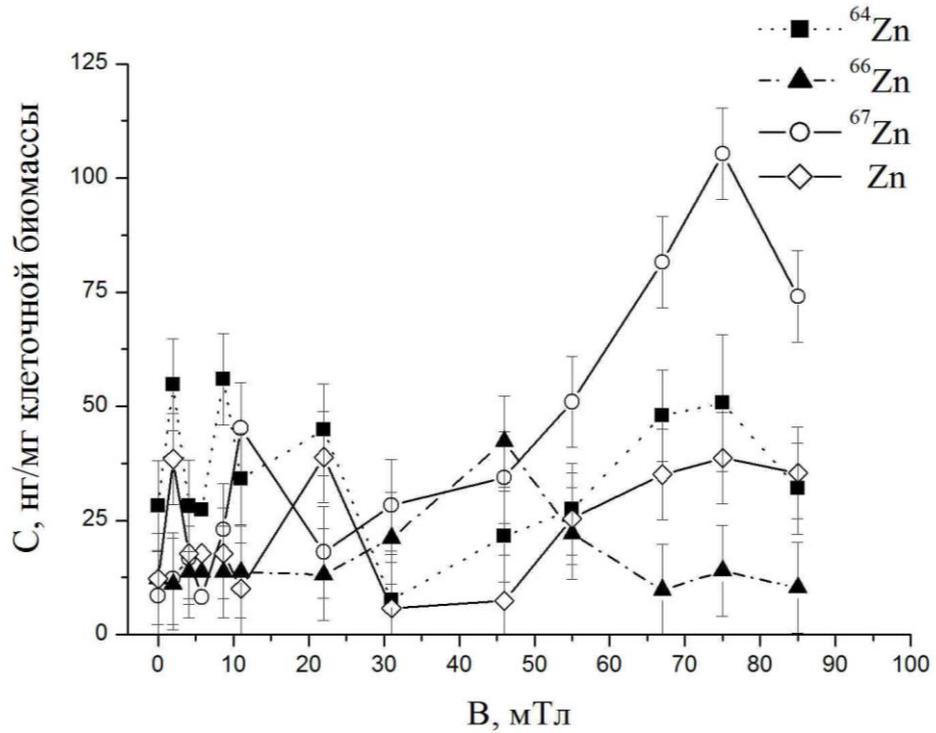


Рисунок 4.15 – Содержание кальция Са в бактериях *E. coli* после культивирования в ПМП в присутствии изотопов цинка. В качестве погрешности указана стандартная ошибка $n=10$

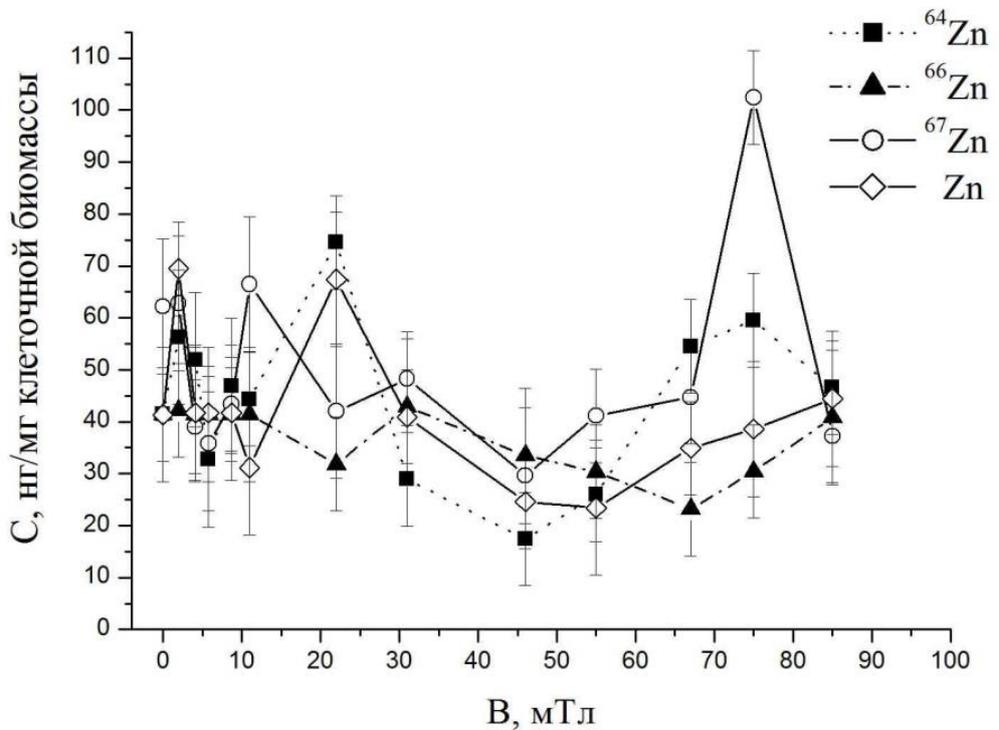


Рисунок 4.16 – Содержание магния Mg в бактериях *E. coli* после культивирования в ПМП в присутствии изотопов цинка. В качестве погрешности указана стандартная ошибка $n=10$

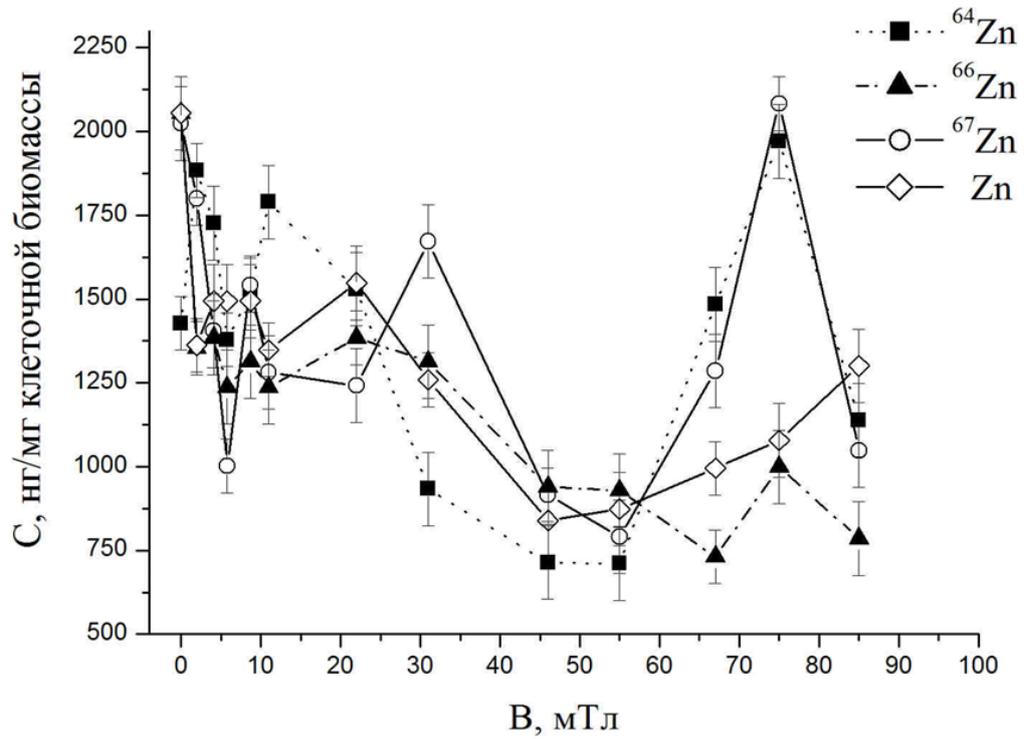


Рисунок 4.17 – Содержание фосфора P в бактериях *E.coli* после культивирования в ПМП в присутствии изотопов цинка. В качестве погрешности указана стандартная ошибка $n=10$

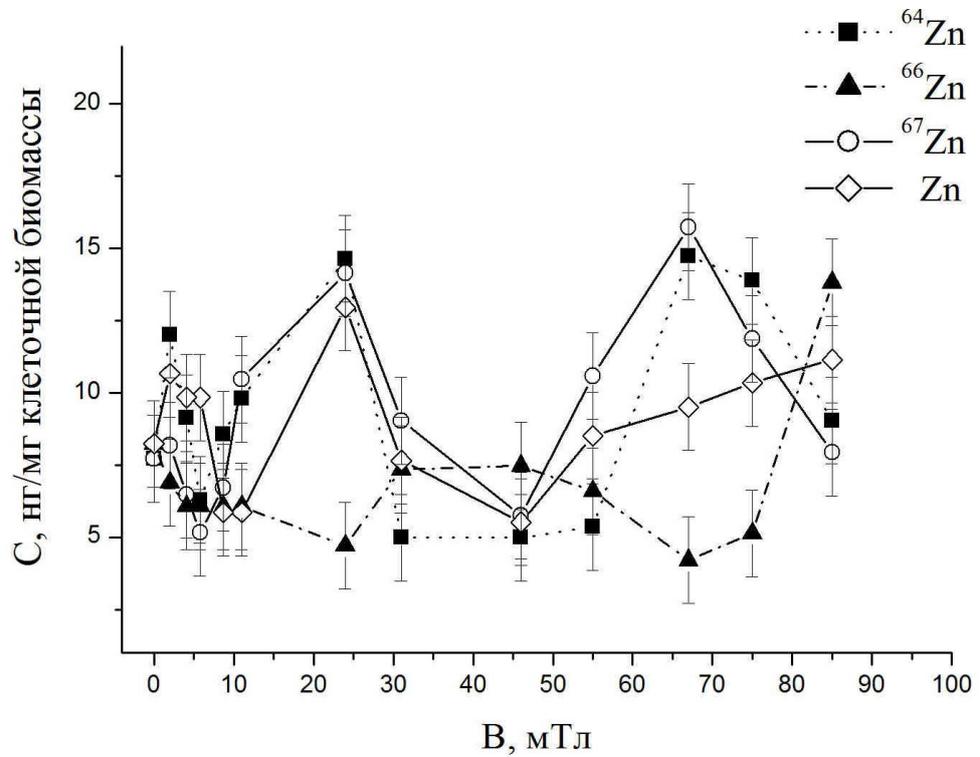


Рисунок 4.18 – Содержание цинка Zn в бактериях *E.coli* после культивирования в ПМП в присутствии изотопов цинка. В качестве погрешности указана стандартная ошибка $n=10$

Что можно сказать важного про эти химические элементы? Калий и натрий - важные электролиты в организме. Регулируют содержание воды внутри клеток, обеспечивая поддержание электрического потенциала в биомембранах и осмотического давления [114]. «Биохимические реакции синтеза ДНК и белков, гликолиза, окислительного фосфорилирования невозможны без участия магния, поскольку он является компонентом гуанозинтрифосфатазы, кофактором Na^+/K^+ -АТФазы, аденилатциклазы, фосфофруктокиназы» [119]. Этот микроэлемент выступает молекулярным стабилизатором РНК, ДНК, рибосом [119-120]. Цинк «участвует в метаболизме нуклеиновых кислот и синтезе белков: входит в состав ДНК- и РНК-полимеразы, тимидинкиназы, оказывает ингибирующее действие на рибонуклеазу, НАДФ-оксидазу, индуцирует биохимические реакции, действуя сам как фермент, расщепляя фосфодиэстеразные мостики РНК, стабилизируя структуру ДНК» [120]. Он необходим для всех фаз клеточного цикла. Наблюдается сходство магнитно-полевых зависимостей концентрации магния, кальция, фосфора в случае присутствия магнитного изотопа ^{67}Zn в питательной среде – наблюдается максимальная концентрация в поле 75 мТл.

Анализ полученных магнитно-полевых зависимостей содержания Р, К, Na, Са, Mg, Zn в бактериях (рисунки 4.13-4.18) позволяет выделить «три диапазона ПМП, в которых происходят значимые изменения внутриклеточного содержания большинства элементов: от 2,2 до 10 мТл, от 20 до 30 мТл, от 65 до 78 мТл. В первом диапазоне наблюдаются резкие изменения концентрации элементов – увеличение или уменьшение. В частности, это справедливо для элементов калия, натрия и фосфора. При этом их содержание в клетках, инкубируемых без дополнительного внешнего ПМП (на графиках это первая точка $B=0$ мТл), оказывается выше, чем при воздействии внешнего магнитного поля. Обнаружение магнитно-полевых эффектов именно в этом диапазоне было предсказано теоретически ([глава 6](#)) и коррелирует с данными колониеобразующей способности бактерий, выращенных в присутствии изотопов цинка ([см. пункт 4.4](#)), а также изотопов магния ([глава 3](#)) [12, 13].

Во втором выделенном диапазоне ПМП (20-30 мТл) было зарегистрировано незначительное увеличение содержания натрия, магния, фосфора в клетках *E. coli*, инкубируемых в присутствии магнитного цинка (рисунки 4.14, 4.16-4.17). Такой характер повышения внутриклеточного содержания качественно совпадает с магнитно-полевыми зависимостями количества КОЕ бактерий, выращенных в ПМП на питательных средах М9 с изотопами цинка. Важно, что внутриклеточное содержание цинка повышается в этом диапазоне по сравнению с ПМП от 2,2 до 20 мТл и от 30 до 60 мТл для всех бактерий за исключением тех, которые инкубировались в присутствии немагнитного изотопа ^{66}Zn . Это говорит об эффективном использовании бактериями ионов цинка. ПМП диапазона от 20 до 30 мТл влияет на работу ферментативных систем с участием цинка, например на процессы, связанные с репликацией ДНК или синтезом белка, которые жизненно важны для деления клеток [12, 13].

В диапазоне ПМП 65-78 мТл внутриклеточная концентрация большинства элементов увеличивается, если бактерии росли на питательной среде с магнитным изотопом цинка ^{67}Zn . Этот эффект является статистически достоверным для натрия, кальция и магния (рисунки 4.14-4.16). Для калия, фосфора и цинка (рисунки 4.13, 4.17-4.18) наблюдается, кроме того, повышение внутриклеточного содержания и для бактерий, инкубируемых на питательной среде М9 с немагнитным изотопом цинка ^{64}Zn . Именно в этом диапазоне ранее был зарегистрирован совместный эффект ПМП и магнитного изотопа магния ^{25}Mg в содержании АТФ в бактериях *E. coli* (глава 5) и в количестве КОЕ (см. пункт 3.4). Ионы магния являются эффективными участниками ион-радикальных реакций ферментативного синтеза АТФ [76]. Кроме того, Na, Ca, Mg, P участвуют в работе бактериальных АТФ-аз, и изменения их относительной концентрации в диапазоне от 65 до 78 мТл говорит о влиянии внешнего ПМП и магнитных моментов атомных ядер на ферментативные процессы синтеза АТФ [12, 13].

Интересно, что характер изменений внутриклеточной концентрации химических элементов в зависимости от магнитного поля и изотопов цинка одинаков для тех элементов, которые участвуют одних и тех же процессах.

Другими словами, наблюдается ионный синергизм. Например, основная функция одновалентных катионов K^+ и Na^+ – поддержание осмотического давления. И магнитно-полевые зависимости содержания калия и натрия (рисунки 4.13-4.14) в бактериях, которые культивировались в присутствии различных изотопов цинка, имеют схожий характер. В ещё одну группу можно объединить Ca, Mg и Zn (рисунки 4.15, 4.17-4.18). Магнитно-полевые зависимости внутриклеточного содержания этих элементов также схожи. Очевидно, объединить их можно по простому принципу – это двухвалентные ионы металлов Ca^{2+} , Mg^{2+} и Zn^{2+} . При этом кальций и магний входят в четвёрку жизненно важных макроэлементов [119-120]. В грамотрицательных бактериях оба эти иона играют значительную роль в стабилизации внешней и плазматической мембраны. Метаболизм ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} и Zn^{2+} зависит друг от друга, в том числе, и по принципу «мимикрии», хорошо известному в микробиологии. При биологической недоступности необходимых двухвалентных ионов внутриклеточные молекулярные комплексы способны использовать имеющиеся ионы такой же валентности, находящиеся в молекулярном окружении. Так многие ферментативные системы, использующие в своей работе ионы магния, способны функционировать с ионами цинка и наоборот [119-121].

Всё вышесказанное свидетельствует об изменении метаболизма бактериальных клеток в зависимости от типа изотопа цинка – магнитный/немагнитный, - и величины внешнего постоянного магнитного поля.

4.6 Заключение

Экспериментально доказано совместное влияние внешних ПМП и магнитного изотопа цинка ^{67}Zn на жизнедеятельность бактерий *E. coli*. Комбинированное действие изотопа ^{67}Zn и ПМП 25-35 мТ вызывает 2-4-кратное увеличение колониеобразующей способности и констант скорости роста бактерий *E. coli* по сравнению с немагнитными изотопами цинка $^{64,66}Zn$. Эффекты ПМП в диапазоне 2,2–8 мТл были обнаружены для всех бактерий независимо от изотопа

цинка, содержащегося в средах. Метаболизм основных элементов в бактериях *E. coli* зависит от внешних ПМП и изотопов цинка, содержащихся в питательной среде. Изменения внутриклеточного содержания P, K, Na, Ca, Mg, Zn наблюдаются в определенных диапазонах ПМП, для которых было обнаружено совместное влияние внешнего ПМП и магнитных моментов атомных ядер цинка или магния на рост и развитие бактерий. Характер этих изменений зависит от биологической функции химических элементов.

Полученные данные подтверждают существование стадий внутриклеточных процессов, чувствительных к внешним магнитным полям и магнитным моментам атомных ядер. Важно отметить, что магнитные изотопы цинка ^{67}Zn и магния ^{25}Mg индуцируют влияние на жизнеспособность *E. coli* в различных диапазонах ПМП.

Представленные в четвёртой главе результаты опубликованы в работах [11, 12, 13].

Глава 5 Магнитно-зависимый пул АТФ в бактериях *E. coli*

Введение

Аденозинтрифосфат, или АТФ, является основной макроэргической молекулой в живых организмах. Энергия, выделяющаяся при её расщеплении, используется во многих биологических процессах, включая ферментативные реакции синтеза ДНК и РНК. Управление внутриклеточной концентрацией (пулом) и синтезом АТФ – одна из интригующих проблем фундаментальной биофизики и медицины. Несмотря на большой объём экспериментальных данных о строении и молекулярной динамике АТФ-синтезирующих ферментов, до сих пор остаётся загадкой, каким образом механическое движение молекулярных машин – субъединиц фермента – трансформируется в химическую реакцию присоединения третьей фосфатной группы к АТФ [137-138]. И возможно ли повлиять на этот процесс с помощью внешних воздействий?

Один из возможных способов воздействия на синтез АТФ – это магнитные взаимодействия (внешние магнитные поля и магнитные изотопы). Так, например, внутриклеточное содержание АТФ увеличивалось в 3,5 раза после одного часа воздействия ПМП 17 мТл на бактерии *Escherichia coli* [139]. Магнитные поля также влияют на мембранно-ассоциированный синтез АТФ [140]. Ни в одной из этих работ не обсуждаются механизмы влияния магнитных взаимодействий на синтез АТФ в клетках. Воздействие внешнего ПМП и магнитных моментов атомных ядер химических элементов, например магнитных изотопов ^{31}P , ^{25}Mg , ^{67}Zn , на живые организмы возможно через последовательность элементарных актов ферментативных реакций с переносом электрона. Образующаяся в таких процессах ИРП служит «первичным приемником» магнитного поля и основным источником биологических магнитно-полевых и магнитно-изотопных эффектов. Подробная теория этих явлений будет рассмотрена в [главе 6](#). Магнитное поле или ядерные магнитные моменты способны индуцировать преобразование ИРП из первичного синглетного состояния в триплетное. Это приводит к снятию

спинового запрета и включения дополнительных реакционных каналов. Так изменяются и вероятности прямой и обратной ферментативной реакции и, следовательно, выход продукта [8].

Ион-радикальный механизм ферментативных реакций может объяснить природу и функционирование первичных биологических магнитосенсоров, трансформацию физических эффектов в биологические и физиологические реакции посредством биохимических процессов. Воздействие внешнего магнитного поля, и ядерных спинов магнитных изотопов способны влиять на физиологическое состояние клеток, органов и живых организмов посредством изменения скорости и выхода продуктов ферментативных реакций. Для ферментативного синтеза АТФ ион-радикальный механизм имеет экспериментальные подтверждения с участием ионов магнитных изотопов магния $^{25}\text{Mg}^{2+}$, цинка $^{67}\text{Zn}^{2+}$, кальция $^{43}\text{Ca}^{2+}$ [2-5, 9, 11] *in vitro*. Кроме того, константа скорости синтеза АТФ креатинкиназой растёт при включении внешнего ПМП только для фермента, обогащенного магнитным изотопом магния ^{25}Mg [6]. Обогащение фермента немагнитным изотопом магния ^{24}Mg не изменяет кинетических характеристик ферментативных реакций во внешнем магнитном поле [6]. Важно отметить, что существуют естественные факторы, препятствующие регистрации МИЭ в ферментативных реакциях синтеза АТФ. Наиболее важным является наличие парамагнитных ионов металлов, например, ионов Fe или Mn, как структурных компонент фермента, так и в качестве неконтролируемой примеси. Эти ионы разрушают синглет-триплетную эволюцию ИРП и, следовательно, препятствуют наблюдению магнитных эффектов. Конечно, это было причиной того, что ни изотопное, ни магнитно-полевое воздействие на синтез АТФ не было обнаружено в работе [141]. Использованные ими образцы MgCl_2 были сильно загрязнены ионами Fe [142].

Регистрация магнитно-изотопных и магнитно-полевых эффектов в синтезе АТФ в живых организмах не менее сложна. Скорость ферментативного синтеза зависит от множества физиологических и биохимических факторов. Оптимальными объектами для таких исследований будут простые одноклеточные

организмы (бактерии, дрожжевые клетки, водоросли и др.), в том числе классический объект микробиологии – бактериальные клетки *Escherihia coli*. Условия их роста и концентрация АТФ, как внеклеточная, так и внутриклеточная, тесно связаны. Концентрация внеклеточного АТФ максимальна в поздней логарифмической фазе роста и уменьшается после наступления стационарной фазы [143]. Содержание АТФ внутри клеток зависит от фазы роста бактерий (лаг-фаза, лог-фаза, стационарная фаза и гибель клеток) и так же достигает своего пика в конце логарифмического роста. Стрессовые условия роста увеличивают пул АТФ [143-144]. Изменение концентрации АТФ может индуцировать иммунный клеточный ответ, стимулируя синтез цитокинов, что говорит о более широком значении молекул АТФ для живых организмов, чем просто носитель энергии. Искусственное изменение содержания АТФ в питательной среде вызывает замедление роста кишечной палочки [143].

Цель данной главы – поиск экспериментальных доказательств магнитной чувствительности пула АТФ *in vivo* на примере бактерий *E. coli*. Эффективность магнитных изотопов магния ^{25}Mg и цинка ^{67}Zn *in vivo* уже не вызывает сомнения [10, 13]. Магнитный изотоп магния ^{25}Mg влияет на рост и жизнедеятельность бактерий, а его биологические эффекты отличаются от эффектов немагнитных изотопов $^{24,26}\text{Mg}$ [2, 3, 10]. В результате совместного влияния ПМП и магнитных изотопов магния ^{25}Mg и цинка ^{67}Zn колониеобразующая способность бактерий *E. coli* повышается (в диапазонах 0,8–15 и 76–93 мТл) и изменяется внутриклеточный элементный состав. Эти и другие магнитно-изотопные и магнитно-полевые эффекты были описаны в 1-4 главах. Экспериментальные исследования данной главы – это важная связующая нить между обнаруженными МИЭ *in vivo*, между МИЭ в ферментативном фосфорилировании *in vitro* [2-6] и моделью ферментативной магниточувствительности (6 глава). Только получив магнитно-полевые зависимости содержания АТФ в живых организмах, естественным путём обогащенных изотопами, можно сделать окончательный вывод о магнитной зависимости синтеза АТФ.

5. 1 Ион-радикальный механизм синтеза АТФ (обзор литературы)

Впервые ион-радикальный механизм ферментативного синтеза АТФ был предложен Бучаченко А.Л [5, 7, 8] для объяснения обнаруженного МИЭ магния ^{25}Mg [2-4]. Экспериментальные результаты убедительно демонстрировали, что и окислительное фосфорилирование, продуцируемое АТФ-синтазой, и субстратное фосфорилирование, управляемое киназами, в нативных митохондриях, зависят от ядерного спина магния (рисунок 5.1). Эти два типа фосфорилирования были разделены добавлением к митохондриям метилникотинамида, который, как известно, полностью подавляет окислительное фосфорилирование [2, 7].

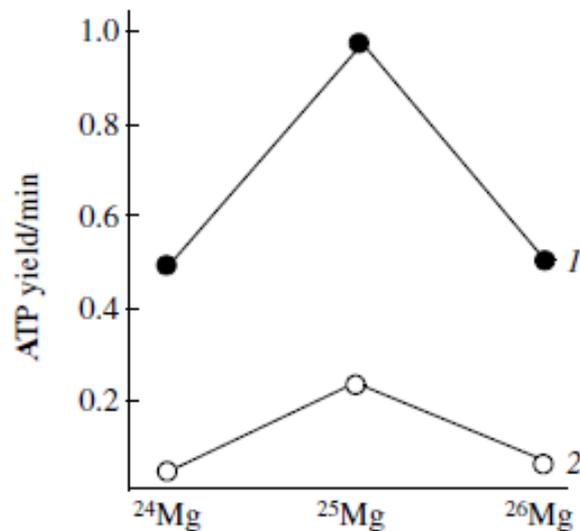


Рисунок 5.1 – Скорость синтеза АТФ как функция изотопии магния в нативных митохондриях (1) и в митохондриях с окислительным фосфорилированием, подавленным добавлением 1-метилникотинамида (2) [2]

Позже аналогичные зависимости были получены для митохондриальной креатинкиназы и фосфоглицераткиназы [3, 4]. При этом скорость синтеза АТФ линейно зависела от содержания магнитного $^{25}\text{Mg}^{2+}$ в общем пуле магния для обеих киназ (рисунок 5.2).

Замечательным и универсальным свойством фосфорилирующих ферментов является то, что они магний-зависимы; способность генерировать АТФ теряется, если каталитический участок фермента не имеет ионов магния Mg^{2+} . Общепринятый механизм фосфорилирования предполагает нуклеофильное присоединение неорганического фосфата (в АТФ-синтазе) или фосфатной группы субстрата (в киназах) к АДФ. С точки зрения этого механизма, ион Mg^{2+} должен быть организатором каталитического сайта, он удерживает реагенты на пути реакции и функционирует как помощник. При этом детали синтеза АТФ в каталитическом сайте АТФ-синтазы до сих пор не исследованы, как и факторы, способствующие переключению фермента с гидролиза на синтез АТФ [137-138].

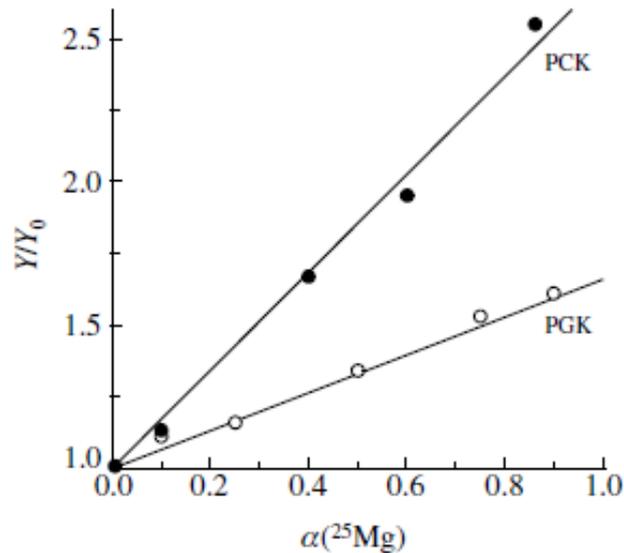


Рисунок 5.2 – Скорость фосфорилирования Y , отнесенная к скорости Y_0 продукции АТФ креатинкиназой (РСК) и фосфоглицераткиназой (РГК) только с $^{24}Mg^{2+}$, как функция содержания $^{25}Mg^{2+}$ общем пуле магния [7]

Открытие удивительного МИЭ магния в синтезе АТФ доказывает, что ферментативное фосфорилирование – это ион-радикальный спин-селективный процесс, в котором Mg^{2+} участвует в качестве реагента, а не скромного помощника. Ион-радикальный механизм ферментативного фосфорилирования, основанный на открытиях МИЭ магния [5, 7-8] и предложенный Бучаченко А.Л., приведен на рисунке 5.3 для частного случая АТФ-синтазы. Схема предполагает

перенос электрона с терминальной, ближайшей к иону Mg^{2+} , фосфат-анионной группы АДФ, что приводит к образованию первичной ИРП, состоящей из одновалентного катион-радикала Mg^+ и оксирадикала АДФ. Эта реакция показана на рисунке 5.3 как первая стадия.

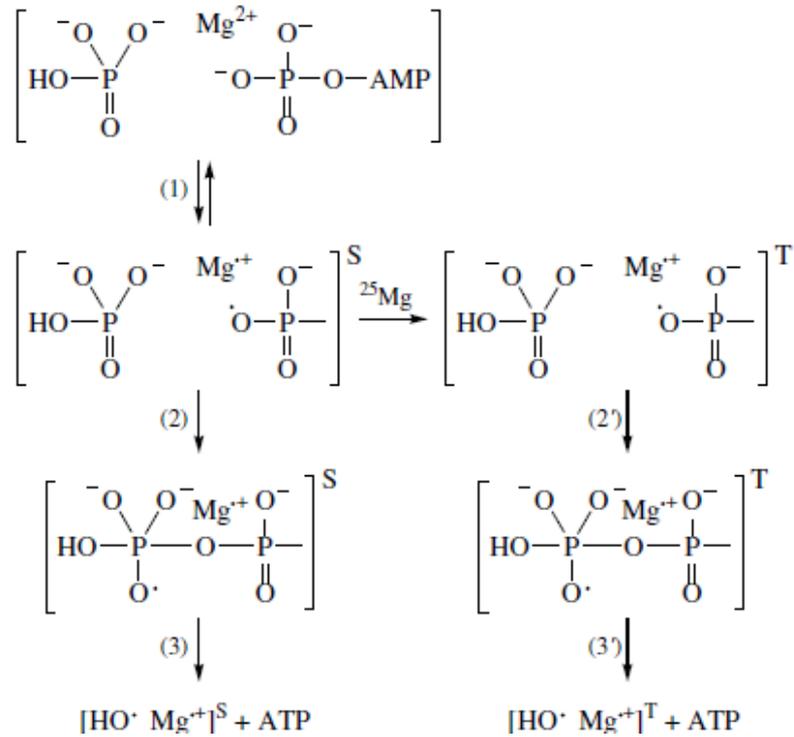


Рисунок 5.3 – Схема реакции фосфорилирования АТФ-синтазой [5]

Первичная ИРП, генерируемая переносом электрона, находится в синглетном спиновом состоянии. Следующим шагом происходит непосредственно само фосфорилирование, которое происходит как атака химической связи $P=O$ фосфата оксирадикалом АДФ (реакция (2)). Образующийся в этой реакции другой оксирадикал разлагается через расщепление химической связи $P-OH$ (реакция (3)) и генерирует АТФ в виде продукта и конечной ИРП ($HO\cdot \cdot Mg^+$), которая впоследствии регенерирует Mg^{2+} [5]. Скорость фосфорилирования АДФ по синглетному каналу (реакции (1)–(3)) ограничена спином, допускающим обратный перенос электрона в первичной ИРП. Эта реакция регенерирует исходные реагенты, что приводит к снижению

выхода АТФ. Однако в присутствии магнитного изотопа ^{25}Mg появляется новый, дополнительный канал фосфорилирования. Первичная ИРП, генерируемая в активном сайте фермента с $^{25}\text{Mg}^{2+}$, эволюционирует из синглетного состояния в триплетное, благодаря сверхтонкому взаимодействию (СТВ) магнитного момента неспаренного электрона и ядерного магнитного момента Mg^+ . Магнитное ядро магния превращает первичную синглетную пару в химически идентичную триплетную, в которой обратный перенос электрона запрещен по спину. Этот канал открыт только для фосфорилирования и обеспечивает дополнительный выход АТФ.

Этот механизм, альтернативный общепринятому нуклеофильному, учитывает важный и неопровержимый факт – магний-изотопную зависимость фосфорилирования. Ион Mg^{2+} является центральным реагентом, преобразующим механическую энергию неравновесных конформаций макромолекулы фермента в энергию связи Р–О в АТФ. Именно в этой точке происходит встреча конформационной механики молекулярной машины-фермента с химией [7]. Механика макромолекулы фермента преобразуется в энергию химической связи. Согласно новому механизму, ферментативный сайт представляет собой ядерный спин-зависимый нанореактор с двумя конкурирующими реакционными каналами – синглетным и триплетным. В присутствии иона $^{25}\text{Mg}^{2+}$ происходит СТВ неспаренного электронного спина с магнитным ядром магния и индуцируется синглет-триплетная конверсия ИРП. Таким образом реакция переключается на необратимый триплетный канал, что приводит к дополнительному выходу АТФ. Однако естественное содержание магнитного изотопа ^{25}Mg только 10%, остальная часть магния состоит из немагнитных изотопных ядер $^{24,26}\text{Mg}$. Однако даже в ферментативных сайтах с немагнитными ионами магния присутствует триплетный канал, поскольку всегда имеются магнитные ядра ^{31}P фосфатных оксирадикалов – партнеров иона магния. Константа СТВ для ^{31}P в оксирадикале составляет около 30 Гс по сравнению с константой СТВ ^{25}Mg – 212 Гс. Это значительно меньше, так что скорость синглет-триплетной эволюции ИРП, индуцированной ^{31}P , будет на порядок меньше [7]. Вклад триплетного канала в

выход АТФ более важен в ферментах с магнитным изотопом магния, чем с немагнитными.

Очевидно, что синглет-триплетная эволюция ИРП в активном сайте фосфорилирующего фермента может индуцироваться не только внутренним магнитным полем ядра изотопа магния ^{25}Mg , но и внешним ПМП. Доказательство этого утверждения в ферментативных реакциях *in vitro* было получено в работах [6, 16]. Измерялась скорость синтеза АТФ креатинкиназой с магнитными ^{25}Mg и немагнитными ядрами $^{24,26}\text{Mg}$ во внешнем ПМП (рисунок 5.4). Оказалось, что магнитное поле значительно стимулирует активность креатинкиназы (на 50% при 550 Гс) в присутствии магнитных ядер ^{25}Mg по сравнению с немагнитными изотопами магния.

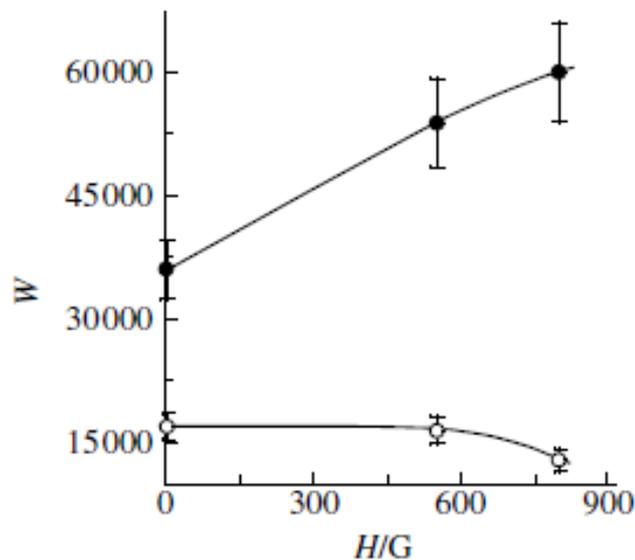


Рисунок 5.4 – Скорости синтеза АТФ для креатинкиназы с $^{24,26}\text{Mg}$ (пустые круги) и с ^{25}Mg (закрашенные круги) в зависимости от магнитного поля [6]

Позже были сначала предсказаны потом получены МИЭ цинка ^{67}Zn и кальция ^{43}Ca в ферментативном фосфорилировании [9, 11]. Так же, как и в случае с ионами магния, скорость синтеза АТФ повышалась в присутствии именно магнитных ядер в активных сайтах фермента. Это в очередной раз доказывает

справедливость ион-радикального механизма. Важно отметить, что МИЭ в гидролизе АТФ обнаружено не было [8].

Описанные эксперименты описанные были выполнены на модели *in vitro*. Будет ли проявляться магнитная зависимость синтеза АТФ на организменном уровне? Возможно ли зарегистрировать магнитно-изотопные и магнитно-полевые эффекты в синтезе АТФ в процессе роста и функционирования клеток не только как физиологический отклик организма, но и как изменение концентрации АТФ? Для ответа на этот вопрос были проведены экспериментальные исследования, описанные далее, на примере бактерий *E. coli*. Ключевой мишенью в таких экспериментах была бактериальная АТФ-синтаза, достаточно хорошо изученная и имеющая некоторые структурные особенности [145]. Вместе с тем детали ферментативной реакции синтеза АТФ в каталитическом сайте до сих пор неизвестны, что обусловлено сложностью создания физиологических условий *in vitro* для этого фермента [137].

5.2 Материалы и методы: биолюминесцентный метод измерения АТФ в бактериях

Для проведения экспериментальных исследований совместного влияния ПМП и изотопов магния на содержание АТФ в бактериях *E. coli* использовался музейный штамм K12TG1 и синтетическая питательная среда M9 ([см. пункты 1.2.1](#) и [4.2](#)). Бактерии предварительно инкубировались в бульоне LB (Sigma Aldrich) после чего пересеивались в среды M9 с изотопами магния или цинка. Культивировались бактерии в 96-луночных полистироловых планшетах в течение 7-8 часов при температуре 37 °C в ПМП. Используемая установка и условия культивирования описаны в [пунктах 3.2.1-3.2.2](#). Для получения достоверной картины влияния ПМП на содержание АТФ в бактериях *E. coli* был проведен контрольный эксперимент при росте бактерий на богатой питательной среде LB без добавления изотопов магния или цинка.

Содержание АТФ в клетках определялось в поздней логарифмической фазе или в начале стационарной фазы, после 7 ч инкубирования в ПМП. Впоследствии определялась концентрация АТФ в одной клетке, для чего общее содержание делилось на количество КОЕ, измеренное с помощью метода серийных разведений ([см. пункт 1.2.4](#)).

Внутриклеточное содержание АТФ в бактериальных клетках измерялось с помощью билюминесцентного метода. Для этого использовался высокочувствительный фотонный счетчик, регистрирующий интенсивность свечения в диапазоне от 10 до 800 тыс. имп./с – люминометр «ЛЮМ-01» (LUM-01, Люмтек, Москва). Чувствительность и стабильность люминометра ЛЮМ-01 не отличается от приборов того же класса фирмы «Berthold Detection Systems GmbH», Германия [147]. Концентрацию АТФ измеряли с помощью набора Люмтек (измерение общей концентрации АТФ в экстрактах клеток и тканей) (Люмтек, Москва, Россия) [10, 11, 13, 16].

В набор входят 4 раствора:

- АТФ-реагент "Люмтек", лиофилизированный [148-150];
- раствор для реконструкции АТФ-реагента;
- АТФ-контроль, лиофилизированный;
- раствор для разрушения клеток.

Для измерения пула АТФ реконструкцию АТФ-реагента проводили путем добавления 4 мл раствора для реконструкции (раствор выдерживали в течение 1 ч при комнатной температуре). Бактериальные клетки разрушали с помощью соответствующего раствора (ДМСО) для высвобождения АТФ (к 0,45 мл ДМСО добавляли 0,05 мл гомогената бактерий). После 0,1 мл полученной смеси переносили в кювету люминометра. Затем в кювету добавляли 0,02 мл реагента АТФ. Интенсивность билюминесценции принятого сигнала I_{\max} сравнивали с интенсивностью сигнала контрольного образца АТФ I_{Contr} . Для измерения интенсивности контроля АТФ 1 мл раствора для разрушения клеток помещали во

флаконе и добавляли контроль АТФ. Концентрацию АТФ бактериальной популяции рассчитывали по формуле [10, 11, 13, 16]

$$[\text{АТФ}]_{\text{клетки}} = 10 \cdot 10^{-8} \cdot (I_{\text{max}} / I_{\text{Contr}}), \text{ мол/л} \quad (5.1)$$

Для расчета внутриклеточного пула АТФ у отдельных бактерий концентрацию АТФ, измеренную биолюминесцентным методом, делили на количество бактериальных клеток, измеренное методом КОЕ [10, 11, 13, 16]. Для статистической обработки и представления данных использовался прикладной пакет Origin 8.0 (Microcal Software). Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$ ($n \geq 10$).

Для исключения вероятности влияния изотопов магния на интенсивность биолюминесценции был проведен контрольный эксперимент. Концентрация АТФ измерялась в бактериях *E. coli*, выращенных на бульоне LB в течение 16 часов при температуре 37°C. После разрушения бактерий раствором ДМСО, к образцам сначала добавляли изотопы магния в концентрации, эквивалентной среде M9 (2,2 мМ), затем АТФ реагент по описанной выше методике. После этого проводилось измерение люминесценции на приборе. Следует отметить, что концентрация клеток во всех образцах была одинаковой (10^7 кл/мл), поэтому показания прибора впоследствии не делились ни на значение контроля АТФ, ни на количество клеток. Образцы отличались только одним показателем – типом изотопа магния (магнитный ^{25}Mg или немагнитные $^{24,26}\text{Mg}$). Результаты приведены на диаграмме 5.5б. В качестве контроля использовались образцы без добавления изотопов (бактерии *E. coli*, выращенные на бульоне LB). Диаграмма, приведенная на рисунке 5.5а соответствует контрольному измерению без добавления бактериальных клеток.

Как видно из диаграмм, приведенных на рисунке 5.5, статистически значимых различий между разными экспериментальными группами не найдено. Это означает, что люциферин-люциферазная реакция не чувствительна к наличию ядерного спина у изотопа магния, что соответствует литературным данным [146].

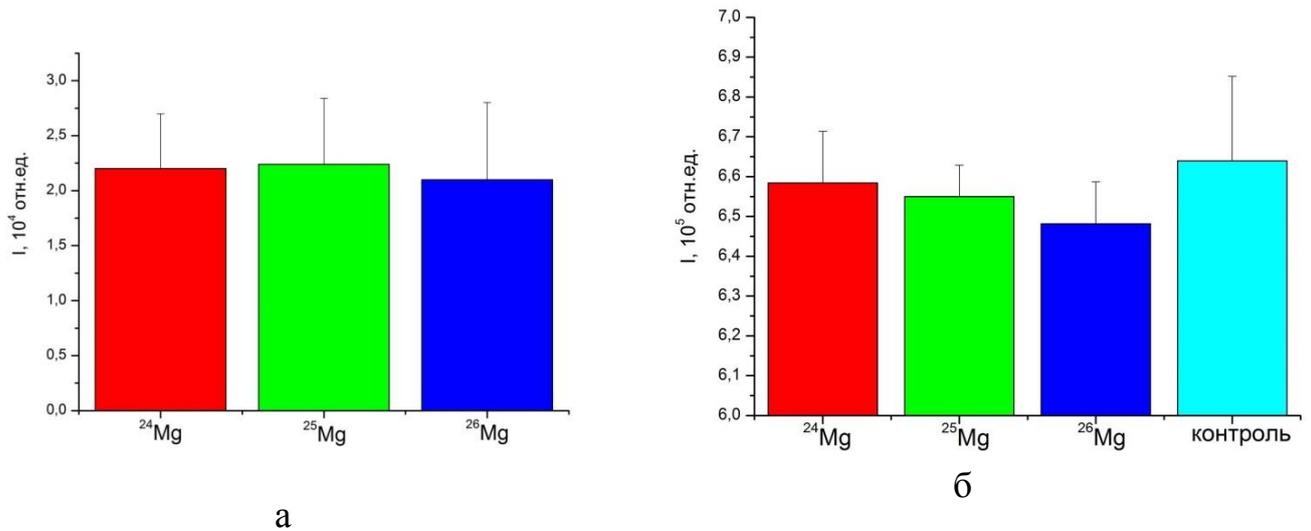


Рисунок 5.5 – а) Влияние изотопов магния на люциферин-люциферазную реакцию. В качестве погрешности указана стандартная ошибка $n=5$, б) измерение внутриклеточной концентрации АТФ в бактериях *E. coli*, выращенных на LB-бульоне. Растворы изотопов магния, соответствующие концентрации в среде М9, добавлялись перед измерением люминесценции. В качестве погрешности указана стандартная ошибка $n=5$

5.3 Магнитно-полевые эффекты в содержании АТФ в бактериях *Escherichia coli*

Магнитно-полевая зависимость внутриклеточной концентрации АТФ в бактериях *E. coli* для контрольного эксперимента при условии роста без добавления изотопов магния или цинка представлена на рисунке 5.6. Было проведено 6 экспериментальных серий, с двумя или тремя повторами внутри каждой серии. Среднее содержание АТФ в одной бактериальной клетке в выбранных условиях роста составило 10^{-19} моль, что согласуется с литературными данными [147]. Наблюдались два характерных диапазона зависимости содержания АТФ в *E. coli* от ПМП: 0-10 и 15-98 мТл.

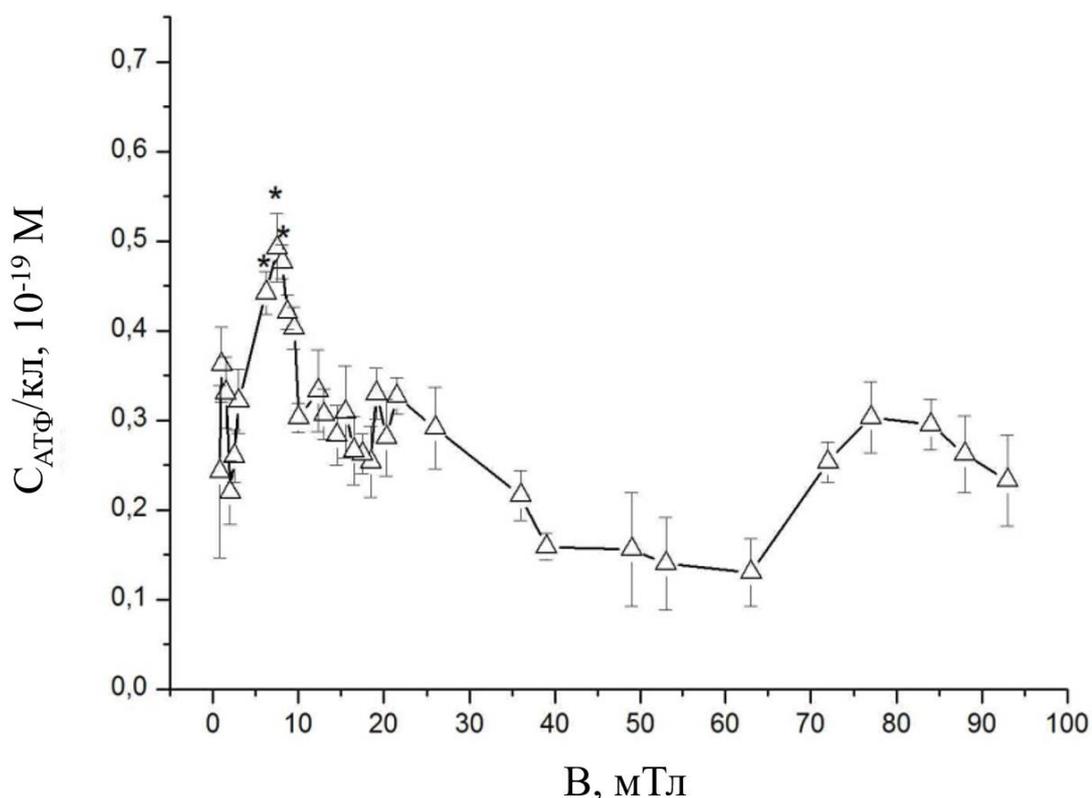


Рисунок 5.6 – Магнитно-полевая зависимость пула АТФ бактерий *E. coli*, культивируемых на среде LB. Диапазон ПМП 0-98 мТл. В качестве погрешности указана стандартная ошибка $n=14$

В первом диапазоне пул АТФ достигает максимального значения, в два раза превышающего концентрацию АТФ для бактерий, культивируемых в геомагнитном поле (первая точка на кривой). Много исследователей ошибочно выбирают сильные магнитные поля для регистрации магнитно-полевых эффектов в живых организмах [116-118]. «Обычно обнаруживаемые в таких случаях эффекты не могут объяснить магнитную чувствительность живых организмов в слабом магнитном поле техногенной природы и их реакцию на изменения этого поля» [8]. «Совместные эффекты внешних ПМП и магнитных моментов атомных ядер могут наблюдаться и регистрироваться именно в слабых постоянных магнитных полях, сила которых меньше величины констант СТВ, согласно теоретическим расчетам (глава 6)» [8]. Первичным приемником внешнего магнитного поля в таком случае является спин-зависимая стадия элементарных актов ферментативных процессов. Магниточувствительность этих ступеней

обусловлена участием частиц с ядерными магнитными моментами, например, ^{31}P или ^{25}Mg , и их сверхтонким взаимодействием с электронным спином и внешним магнитным полем. Эти изотопы присутствуют во всех живых организмах независимо от условий роста. «Необходимым условием таких магниточувствительных ферментативных реакций является перенос электронов и образование ИРП. Ядерные магнитные моменты стабильных изотопов и внешние ПМП способны индуцировать переход ИРП из исходного синглетного состояния в триплетное [5, 7, 8]. Вероятности прямого и обратного электронных процессов зависят от полного спинового состояния такой пары. Например, синглет-триплетная эволюция пары «ион магния $^{25}\text{Mg}^+$ – оксирадикал АДФ» в активном центре АТФ-синтазы (см. пункт 5.1) приводит к увеличению вероятности прямой реакции образования АТФ. Эффекты магнитного поля в содержании АТФ для контрольных образцов, регистрируемые в диапазоне 0,1-10 мТл, являются ожидаемыми [8], и обусловлены участием природных магнитных ядер ^{31}P и др.» [5, 7] Изменения в бактериальном росте *E. coli* были обнаружены в том же диапазоне ПМП (глава 3-4). Увеличение колониеобразующей способности и скорости роста бактерий наблюдалось при воздействии ПМП 0-10 мТл независимо от наличия магнитных изотопов магния или цинка в питательной среде. Эти эффекты магнитного поля указывают на справедливость теоретических предсказаний и наличие магниточувствительных ферментативных реакций, протекающих по ион-радикальному механизму.

Для пула АТФ во втором диапазоне 15–95 мТл не было зарегистрировано значимых магнитно-полевых эффектов.

5.4 Совместное влияние магнитного поля и магнитного изотопа магния ^{25}Mg на содержание АТФ в бактериях *E. coli*

Экспериментальные магнитно-полевые зависимости внутриклеточной концентрации АТФ в бактериях *E. coli*, культивируемых в ПМП на средах М9 с

изотопами магния ^{24}Mg , ^{25}Mg , ^{26}Mg и природным магнием Mg представлены на рисунке 5.7. Можно выделить два характерных диапазона изменения содержания АТФ в зависимости от ПМП: 0,8-16 и 70-98 мТл.

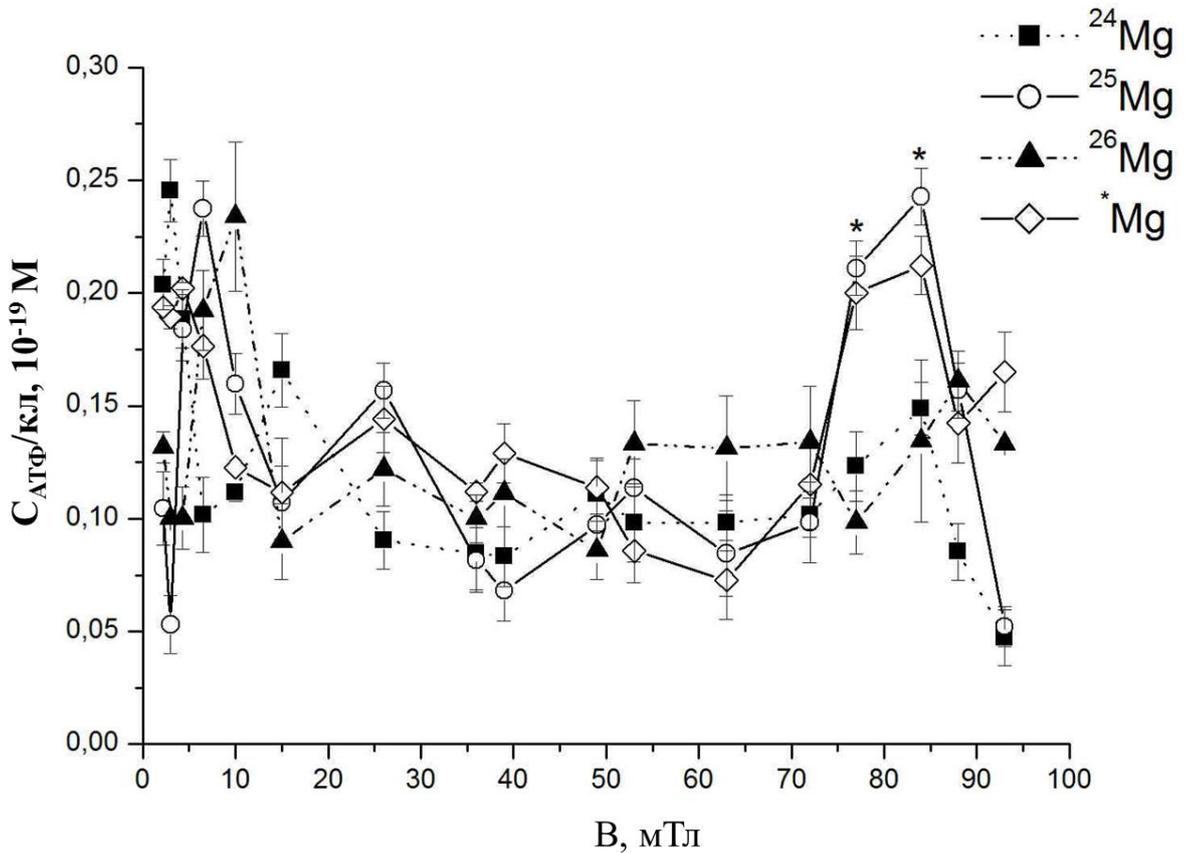


Рисунок 5.7 – Магнитно-полевые зависимости внутриклеточного содержания АТФ бактериях *E. coli*, выращенных на среде М9 с изотопами магния ^{24}Mg , ^{25}Mg , ^{26}Mg и природным магнием Mg. Данные приведены в расчёте на одну клетку. Диапазон магнитных полей 0,8-98 мТл. В качестве погрешности указана стандартная ошибка $n=10$

В первом диапазоне магнитно-полевые эффекты в пуле АТФ были зарегистрированы для всех бактерий независимо от изотопа магния в среде. В диапазоне ПМП от 16 до 70 мТл не было обнаружено статистически значимых эффектов внутриклеточных изменений АТФ в бактериальных клетках.

Совместное влияние внешнего ПМП и магнитного изотопа магния ^{25}Mg на пул АТФ было обнаружено в диапазоне 70-98 мТл.

Рассмотрим каждый диапазон детальнее. Увеличение внутриклеточного содержания АТФ в диапазоне от 0,8 до 16 мТл наблюдалось для всех бактерий, обогащенных и магнитным ^{25}Mg , и немагнитными изотопами $^{24,26}\text{Mg}$, а также природным магнием $^*\text{Mg}$. При этом максимальное значение в каждой экспериментальной группе достигалось в разных точках. Вероятно, это результат различной эффективности магнитных и немагнитных изотопов магния как внутриклеточных элементов. При этом могут суммироваться несколько эффектов: магнитно-полевые, магнитно-изотопные и изотопные масс-зависимые. Этот диапазон представляет особый интерес, и полученные данные для него коррелируют с магнитно-полевыми зависимостями пула АТФ в контрольных образцах ([см. пункт 5.3](#)). При этом влияние ПМП от 0,8 до 10 мТл было обнаружено и на скорость роста бактерий, и на колониеобразующую способность, и на внутриклеточный элементный состав, независимо от присутствия определенного изотопа магния или цинка в среде ([главы 3-4](#)).

Совместное действие магнитного изотопа магния ^{25}Mg и ПМП на внутриклеточное содержание АТФ в бактериях *E. coli* было зарегистрировано в диапазоне 70-98 мТл. Содержание АТФ в этих клетках увеличивается в 2-3 раза только для тех микроорганизмов, которые росли на питательной среде с магнитным изотопом магния ^{25}Mg . Интересно, что даже 10%-ное присутствие магнитных ядер в питательной среде (среда М9 с природным магнием $^*\text{Mg}$) позволило зарегистрировать увеличение пула АТФ. Такой значительный совместный эффект магнитного поля и магнитных ядер магния можно объяснить исключительно с помощью ион-радикального механизма ферментативных реакций, имеющих магниточувствительные стадии. И внешнее магнитное поле, и магнитные моменты изотопа магния ^{25}Mg (за счёт СТВ) индуцируют синглет-триплетную конверсию ИРП в активных сайтах фосфорилирующих ферментов, тем самым повышая скорость синтеза АТФ по сравнению со случаями работы ферментов в присутствии немагнитных изотопов магния $^{24,26}\text{Mg}$. Полученные

результаты согласуются с магнитно-полевыми зависимостями синтеза АТФ крестинкиназой в ПМП (рисунок 5.4) для магнитного и немагнитных изотопов магния [6].

При исследовании совместного влияния ПМП и изотопов магния и цинка на рост и метаболизм бактерий *E. coli* (главы 3-4) в этом же диапазоне были обнаружены эффекты:

- в колониеобразующей способности клеток, культивируемых на средах М9 с изотопами магния (см. пункт 3.4);
- во внутриклеточном содержании Na, Ca, Mg, P бактерий, культивируемых на средах М9 с изотопами магния и цинка (см. пункты 3.5, 4.5).

Важно отметить, что все эти элементы Na, Ca, Mg, P связаны с работой бактериальных АТФ-аз [151-153]. Увеличение их концентрации свидетельствует о работе большего количества АТФ-синтезирующих ферментов и доказывает, что магнитно-полевые и магнитно-изотопные эффекты в диапазоне ПМП 70-98 мТл связаны со стимулированием синтеза АТФ в бактериях *E. coli*. Таким образом, на модели *in vivo* показано, что синтез АТФ является магниточувствительным процессом; его эффективность зависит от диапазона используемых магнитных полей и наличия магнитного момента у ядра изотопа магния.

5.5 Магнитно-полевые и магнитно-изотопные эффекты цинка в пуле АТФ бактерий *E. coli*

На рисунке 5.8 представлены магнитно-полевые зависимости внутриклеточного содержания АТФ в бактериях *E. coli*, культивируемые на средах с магнитным ^{67}Zn , немагнитными изотопами $^{64,66}\text{Zn}$ и природным цинком Zn. Можно выделить три диапазона магнитных полей, в которых происходят изменения пула АТФ в бактериях: 2,2–8, 25-35 и 60-80 мТл.

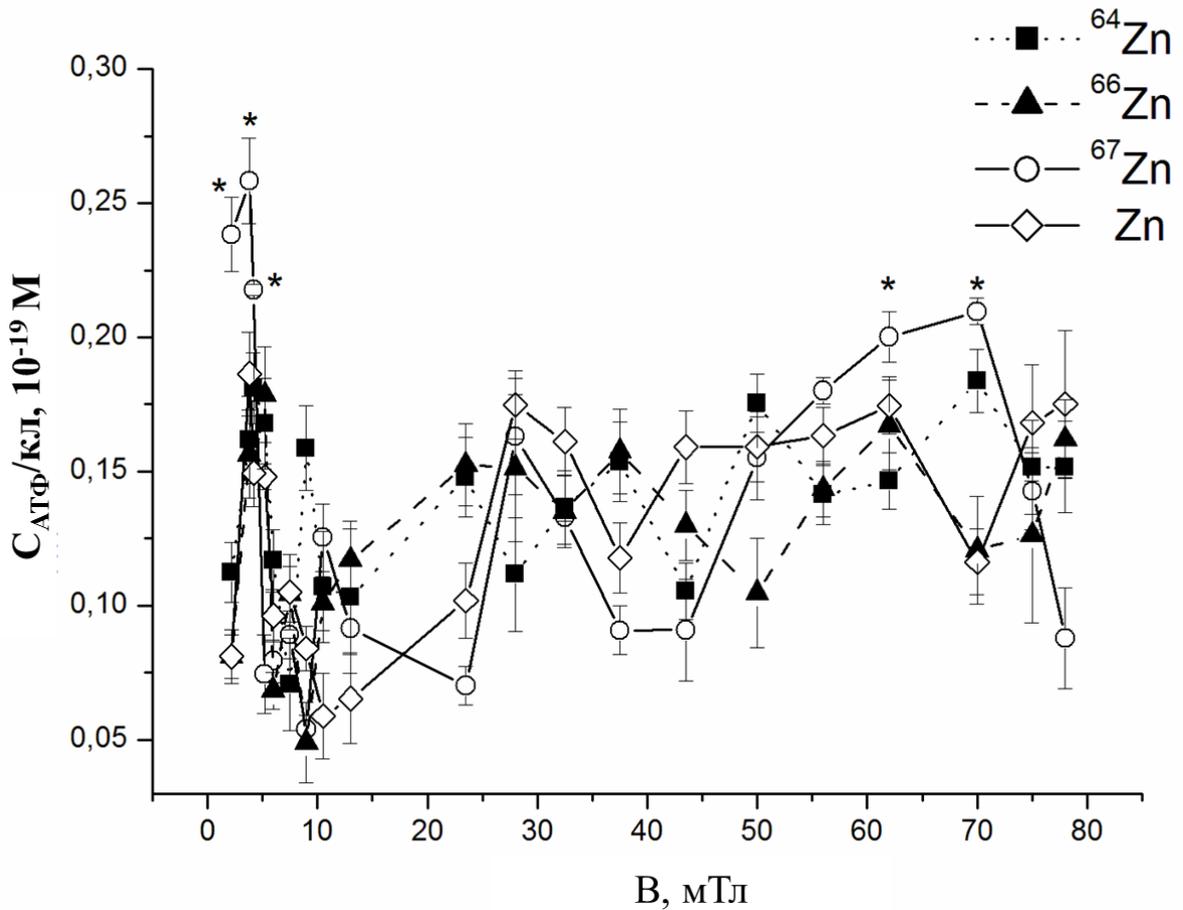


Рисунок 5.8 – Магнитно-полевые зависимости внутриклеточного содержания АТФ в бактериях *E. coli*, культивируемых на среде М9 с изотопами цинка. Данные приведены в расчёте на одну клетку. В качестве погрешности указана стандартная ошибка $n=10$

В первом диапазоне содержание внутриклеточного АТФ повышалось независимо от типа изотопа цинка для всех экспериментальных групп, так же, как и для бактерий, культивируемых на средах с изотопами магния. Однако для бактерий, инкубируемых на среде с магнитным изотопом цинка ^{67}Zn , зарегистрировано значительное повышение концентрации АТФ в диапазоне 2,2–4,2 мТл в 2-3,5 раза по сравнению с клетками, растущими на средах с немагнитными формами цинка. Во втором диапазоне ПМП 25-35 мТл концентрация АТФ незначительно возросла, но статистических различий между разными экспериментальными группами зарегистрировано не было. Это означает,

что совместные эффекты ПМП и магнитного изотопа цинка ^{67}Zn в количестве КОЕ и константах скоростей роста, обнаруженные в этом диапазоне ([см. пункт 4.4](#)), связаны с другими магниточувствительными ферментативными процессами, а не с синтезом АТФ.

В третьем диапазоне ПМП от 60 до 70 мТл зарегистрировано незначительное увеличение внутриклеточной концентрации АТФ в бактериях, культивируемых на среде с магнитным цинком ^{67}Zn . Именно в этом диапазоне обнаружен совместный эффект магнитного поля и магнитного изотопа магния ^{25}Mg в пуле АТФ бактерий *E. coli* ([см. пункт 5.4](#)). Универсальным свойством фосфорилирующих ферментов является магний-зависимость. Способность генерировать АТФ теряется, если каталитический сайт фермента не имеет ионов магния. При отсутствии ионов магния в среде двухвалентные ионы цинка Zn^{2+} могут замещать его в различных реакциях [119, 121], включая синтез АТФ. Метаболизмы ионов Mg^{2+} и Zn^{2+} зависят друг от друга, в том числе, и по принципу «мимикрии» [119], хорошо известному в микробиологии. В случае биологической недоступности необходимых двухвалентных ионов внутриклеточные молекулярные комплексы способны использовать имеющиеся в среде ионы одинаковой валентности. Однако влияние ионов цинка на содержание АТФ в диапазоне магнитных полей 60-80 мТл значительно меньше, и, соответственно, обнаруженный совместный магнитно-полевой и магнитно-изотопный эффект цинка меньше (не выше 15%).

5.6 Заключение

Пульс АТФ в бактериях *Escherichia coli* является магнитно-зависимым индикатором жизни микроорганизма. Он зависит от напряженности внешнего ПМП и наличия ядерного магнитного момента у изотопа магния или цинка, содержащегося в питательной среде. Максимальная концентрация АТФ была зарегистрирована при культивировании бактерий на среде с магнитным изотопом магния ^{25}Mg в ПМП 70-90 мТл, что говорит об усилении МИЭ внешним

магнитным полем и может использоваться как средство управления внутриклеточным синтезом АТФ. Влияние ПМП 2,2-10 мТ стимулирует рост бактериальных клеток и изменение внутриклеточной концентрации АТФ независимо от изотопа магния или цинка в питательной среде. При этом немагнитные изотопы магния или цинка и магнитные поля, отличные от диапазонов 2,2–10 и 70–90 мТл, могут быть использованы для снижения концентрации АТФ.

Магнитная зависимость пула АТФ в бактериях *E. coli*, обнаруженная в ходе исследований [пятой главы](#), свидетельствует о чувствительности ферментативного синтеза АТФ и к внешним магнитным полям, и ядерным магнитным моментам изотопов химических элементов, и полностью согласуется с экспериментальными результатами *in vitro* [2-4, 6] и моделью ферментативной магниточувствительности [1, 5, 8]. Представленные в пятой главе результаты опубликованы в работах [7, 10, 13, 16, 19].

Глава 6 Физические механизмы магнитно-изотопных и магнитно-полевых эффектов в живых организмах

Введение

Многочисленные исследования с различной степенью надёжности показали, что магнитные поля способны влиять на все живые организмы: от бактерий и до человека [93-97]. Например, чувствительность человека к вариациям магнитного поля Земли проявляется как изменение артериального давления, и известно под термином «геомагнитная чувствительность» [154-155]. Влияние сильных магнитных полей на организм человека давно и тщательно исследуется в связи с повсеместным использованием магнитно-резонансной томографии (МРТ) [156-157]. Способность ощущать магнитное поле Земли и его направление рассматривается как возможное объяснение способности некоторых видов животных совершать длительные целенаправленные путешествия, например, перелетных птиц *Erithacus rubecula*, рыб *Oncorhynchus nerka*, морских черепах *Caretta caretta*, саламандр *Notophthalmus viridescens* [96, 158]. Один из механизмов магнитной чувствительности связывают с наличием магнитосом у некоторых видов прокариот, например бактерий *Magnetospirillum magnetotacticum*, [94, 98]. Магнитосомы – это органеллы, имеющие кристаллические образования в виде магнетита Fe_3O_4 [159]. Однако, подобные органы не были обнаружены у животных. «Не исключено, что вместо единого универсального механизма существуют несколько различных физико-химических механизмов, объясняющих влияние внешнего магнитного поля на живые системы» [8]. Существуют механизмы биомагнитной чувствительности, обусловленные протеканием различных биохимических ферментативных процессов [99, 160]. Вопрос о существовании первичного рецептора внешнего магнитного поля, справедливый для всех организмов, пока остаётся открытым.

В данной главе рассматриваются возможные механизмы, обуславливающие чувствительность живых организмов к внешним постоянным магнитным полям

([пункт 6.1](#)). Отдельного внимания заслуживают механизмы, способные объяснить не только чувствительность к внешним магнитным полям, но и к магнитным моментам ядер изотопов химических элементов. Нами предложена простая модель ферментативной магниточувствительности, способная качественно объяснить некоторые из полученных экспериментальных результатов магнитно-полевых и магнитно-изотопных эффектов в бактериях *E. coli*, описанных в 1-5 главах ([пункт 6.2](#)).

6.1 Существующие механизмы влияния постоянных магнитных полей на живые организмы (лит. обзор)

Чтобы объяснить разнообразие экспериментальных магнитно-полевых эффектов, необходимы физико-химические модели, обеспечивающие теоретическую основу для понимания подобных явлений. Такие модели фактически существуют, по меньшей мере, 20 лет и описаны в многочисленных обзорах [[91-99](#), [115](#), [157-175](#)]. Например, в одном из недавних обзоров Бинги [[173](#)] приводит следующую классификацию существующих моделей:

1. «Феноменологические модели: сложное поведение решений уравнений типа химической кинетики, стохастический резонанс как усилительный механизм в магнитобиологии и другие случайные процессы, магниточувствительные фазовые переходы в биофизических системах, «радиотехнические» модели (биологические структуры и ткани изображаются в виде эквивалентных электрических цепей).

2. Макроскопические модели: биомагнетит в магнитном поле и ферромагнитное загрязнение, джоулево тепло и вихревые электрические токи, сверхпроводимость на уровне клеточных структур и альфа-спиральных белковых молекул, магнитогидродинамика.

3. Микроскопические модели: движение заряженных частиц и частиц со спином в магнитном поле, в том числе резонансные, осцилляторные и

интерференционные эффекты, а также реакции с участием свободных радикалов и коллективные возбуждения многочастичных систем» [173].

Однако в мировой литературе в настоящее время выделяют четыре наиболее признанные модели влияния постоянных магнитных полей на биологические структуры [115, 164, 174-175]:

- 1) ферримагнетизм;
- 2) ионно-циклотронный резонанс, описывающий взаимодействие ионов с окружающей средой, включая связывание иона с макромолекулярным лигандом;
- 3) квантовая когерентность, которая способна объяснить биомагнитные эффекты, обусловленные парамагнитным поведением электронов или ионов;
- 4) радикально-парный механизм.

Рассмотрим каждый из этих механизмов.

Ферримагнетизм [175-182]

Модель магниторецепции, называемая ферримагнетизмом, предполагает взаимодействие внешнего магнитного поля с железо-содержащими молекулами. Наиболее распространены включения биогенного магнетита (Fe_3O_4) или сульфида железа (Fe_3S_4), являющиеся рецептором магнитного поля у некоторых видов бактерий [176-177]. Первая интерпретация модели – магнитотаксис – предполагает выстраивание магнитосом (клеточных структур, содержащих магнетит) вдоль оси подвижности бактерий, создавая магнитный диполь, ориентирующийся по линиям геомагнитного поля. Вторая интерпретация модели предполагает непосредственное взаимодействие рассеянных по клетке ферримагнитных включений с внешним магнитным полем. Например, если такие включения имеются в ионных каналах, то создаваемые ими магнитные моменты в слабых магнитных полях способны изменить поток ионов через канал. Однако эти теоретические предположения, высказанные ещё в 1992 году [178], до сих пор не подтверждены экспериментально. Сообщается, что частицы магнетита могут оказывать значительное влияние на динамику фотогенерированных свободных

радикалов [179]. Магнетит был впоследствии обнаружен в некоторых видах водорослей, в клетках растений, а также в древесной золе [180-182].

Однако модель ферримагнетизма не способна объяснить магнитно-полевые эффекты в бактериях, не содержащих магнетита, а уж тем более магнитно-изотопные эффекты, экспериментально обнаруженных в данной диссертации (1-5 глава).

Ионно-циклотронный резонанс или ионный параметрический резонанс [183-189]

Попытка объяснения магнитно-полевых эффектов в биологии с помощью модели ионного-циклотронного резонанса, обозначаемая ICR, неоднократно предпринималась многими исследователями. Основная идея её заключается в том, что появление и регистрация эффектов магнитного поля возможны на частотах циклотронного резонанса для заряженных частиц (например, ионов), имеющих заряд q и массу m . Тогда частота циклотронного резонанса определяется формулой $f = Bq/(2\pi m)$. Поскольку резонансная частота зависит от удельного заряда q/m задействованных ионов, то можно вводить переменные магнитные поля с частотами, специфичными для таких ионов, например для Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} и т.д. Предполагается, что любая биологическая реакция будет зависеть от соотношения частоты переменного электромагнитного поля и напряженности ПМП.

В соответствии с моделью ICR, ионы Ca^{2+} должны ускоряться циклотронным резонансом, генерируемым электромагнитным полем, наложенным на геомагнитное поле [183]. Это приводит к увеличению потока ионов по кальциевым каналам. Таким образом, модель ICR предполагает изменение равновесия биохимических реакций при наложении двух магнитных полей (постоянного и переменного). Преимущества модели состоят в предсказании частотных «окон», где возможно наблюдать эффекты магнитного поля. Например, для ионов Ca^{2+} прогнозировался резонанс на частоте около 50-60 Гц (используемые во всем мире частоты линий электропередач) [186-187].

Модель ICR также очень полезна для понимания экспериментальных ситуаций, в которых используются только постоянные магнитные поля. Например, сообщается, что ПМП могут влиять на конформацию хроматина в *Escherichia coli* в той же степени, что и переменные электромагнитные поля [188]. Другим примером может быть магнитная чувствительность *E. coli* к реакции «аномальной зависимости вязкости от времени», которая была изучена в ПМП 0-110 мкТл. Обнаруженные эффекты предположительно объясняются связыванием ионов с белковыми комплексами, которые вращаются со скоростью около 18 об/с, тем самым создавая характерные полосы частот для отклика [115]. Существуют работы, где носителем вращающихся зарядов является ДНК, клеточные компоненты, связывающие ионы (ДНК- и РНК-полимеразы, АТФаза и прокариотические жгутики) [95, 163].

Важно отметить, что для проявления эффектов магнитного поля, обусловленных моделью ICR, необходимо использовать переменные поля с частотой порядка 50 Гц и ПМП всего 65 мкТл (например, для ионов Ca^{2+}). Такие экспериментальные условия трудновыполнимы и могут приводить к большому количеству непредсказуемых ошибок. Кроме того, до сих пор нет надёжных экспериментальных доказательств модели ICR.

Квантовая когерентность [190-200]

Квантовая когерентность состоит в согласованности и коррелированности микрочастиц, образующих некую макросистему. Это явление связано с корпускулярно-волновым дуализмом, когда каждая микрочастица описывается волной де Бройля, имеющей и амплитуду, и фазу. В применении к биологическому веществу квантовая когерентность фактически означает сосуществование двух фаз в объемной воде, которые пространственно разделены неадиабатическим переходом. В работе [190] была предложена когерентная структура чистой воды с помощью делокализованных протонов. Похожая модель воды, обеспечивающая квантовую когерентность на супрамолекулярном уровне, была предложена в работе [192-193]. Модель постулирует, что при комнатной температуре (300 К), вода состоит из некогерентной фазы (60-70%) и когерентных

областей (30-40%), т.е. сферических кластеров радиусом 50 нм и внешней границы раздела (пограничной области) шириной 4-5 нм. В пределах областей когерентности все молекулы воды находятся в когерентном колебании в фазе с большим классическим электромагнитным полем. Широко принятая доля когерентных областей 30-40% в воде при комнатной температуре, приводящая к длине когерентности λ , равной 50-100 нм, обеспечивает интерпретацию нескольких экспериментов *in vitro* [194-197].

Аналогичная модель, которая также основана на предположении о линейно упорядоченных когерентных цепочках воды, была предложена лабораторией Фесенко [198]. Также опубликованы работы, авторы которых рассматривают микротрубочки [199] и ДНК [200] как одномерные когерентные системы («квантовая проволока»).

Механизм радикальной пары [201-209]

Влияние магнитного поля на радикальную реакцию происходит из фундаментальных основ спиновой химии. Они касаются природы химической связи, которая образуется в результате обмена двумя электронами между атомами или группами атомов (радикалами), и того, что происходит, когда связь разрывается. Электроны обладают магнитным моментом и спином. В соответствии с законами квантования при взаимодействии двух электронов спины могут быть ориентированы либо параллельно, либо антипараллельно. Чтобы образовалась химическая связь, спины должны быть ориентированы антипараллельно. Спиновое состояние такой пары называется синглетным $S=0$. Подавляющее большинство молекул, включая биологические молекулы, имеют это состояние с наименьшей энергией. Состояние радикальной пары, когда электронные спины ориентированы параллельно, называется триплетным $S=1$.

Таким образом, описываемый механизм возник из предположения, что биохимические реакции, в которых участвуют спин-коррелированные пары радикалов, должны быть чувствительны к внешним магнитным полям. Взаимодействие неспаренных электронных спинов с внешним магнитным полем способно изменить спиновое состояние пары, индуцировав синглет-триплетную

эволюцию, что приводит к изменению констант скоростей самой реакции. Особенностью этого механизма является возможность влияния на радикально-парные реакции также и внутренних магнитных полей, создаваемых магнитными ядрами изотопов химических элементов (сверхтонкое взаимодействие). Другие механизмы магнитно-полевых эффектов, перечисленные ранее, не принимают во внимание существование таких магнитных ядер в живых организмах и их участия в биохимическом отклике на магнитно-полевое воздействие.

Самой известной биологической реакцией, включающей спиновую селективность и, следовательно, чувствительность к магнитному полю, является выход триплетов и интенсивность излучения реакционного центра фотосинтеза [201]. Известны и многочисленные примеры для ферментативных реакций с промежуточными стадиями, в которых образуются радикальные пары [202-205]. Появляется все больше свидетельств связи магниторецепции организмов с присутствием фотогенерированных пар радикалов [167]. Приводятся экспериментальные доказательства, что магниторецепция перелетных птиц зависит от наличия криптохрома (рецептора синего света) в сетчатке, образующего радикальные пары при фотовозбуждении [206-208].

Таким образом, из существующих на сегодняшний день механизмов биологических магнитно-полевых эффектов только радикально-парный механизм способен объяснить и влияние внешних постоянных магнитных полей на внутриклеточные реакции, и магнитно-изотопные эффекты в бактериях *E. coli*, описанные в данной диссертации.

Осталось только сказать пару слов, почему магнитные взаимодействия, значительно меньшие тепловой энергии kT , могут изменять выход продуктов реакций пары радикалов. Такие реакции необычны тем, что их химия контролируется спинами электронов, не находящимися в термическом равновесии. Поскольку спиновая система пары радикалов довольно слабо взаимодействует со своим окружением, она в значительной степени термически изолирована от «остального мира», и поэтому требуется относительно много времени - возможно, микросекунда или больше – для достижения равновесия. В

течение этого времени даже слабые взаимодействия могут влиять на квантовую динамику спина и, следовательно, на реакционную способность радикалов [164, 166, 8]. Один из авторов приводит сравнение магнитных взаимодействий со стрелочным переключателем железнодорожных путей [209]: переключатель (магнитные взаимодействия) не могут остановить или запустить поезд (реакцию), но способны направить его по другому пути (синглетный или триплетный реакционный канал).

6.2 Модель ферментативной магниточувствительности

Один из возможных механизмов биологической магниточувствительности – это радикально-парный механизм, обусловленным магнитной чувствительностью спин-зависимых биохимических реакций [5, 8, 17, 18, 202-205], и описанный в [пункте 6.1](#). Он имеет некоторый теоретический базис и экспериментальные подтверждения как для химических [30-31, 161], так и для ферментативных реакций [162-205]. «Биологические МИЭ магния, цинка и кальция *in vitro* указывают на возможную спин-зависимую природу ферментативной магниточувствительности» [2-19]. «Магнитные изотопы, являясь носителями ядерных магнитных моментов ^{25}Mg , ^{43}Ca и ^{67}Zn , повышают скорость синтеза АТФ фосфорилирующими ферментами (АТФ-синтаза, креатинкиназа, глицерофосфаткиназа) и снижают скорость синтеза ДНК *in vitro*» [2-4, 8-11, 13, 14-16]. Применение внешнего магнитного поля повышает эффективность магнитного изотопа [6, 13]. В наших экспериментах *in vivo* было показано, что магнитный изотоп ^{25}Mg положительно влияет на рост бактериальной культуры *E. coli* [2, 3]. Биологические эффекты магнитного изотопа магния отличаются от эффектов немагнитных изотопов ^{24}Mg и ^{26}Mg . «Эти эффекты свидетельствуют о влиянии магнитных моментов атомных ядер на жизнедеятельность всего организма через последовательность внутриклеточных ферментативных процессов, в которых магнитные ядра принимают участие, включая синтез АТФ» [8]. Подробнее эти работы описаны в главах 1-5.

Ключевая идея, лежащая в основе модели магниточувствительности живых организмов в данной диссертации, вытекает из описанных экспериментальных результатов [2-19]. Она заключается в следующем: ферментативные реакции, идущие с участием магнитных ядер изотопов химических элементов, являются магниточувствительными. Подробно механизм для синтеза АТФ ферментом АТФ-синтазой рассмотрен в [пункте 5.1](#), а схема реакций с учётом синглетного и триплетных каналов фосфорилирования приведена на рисунке 5.3. Аналогичные схемы реакций, способные объяснить МИЭ магния в ферментативном фосфорилировании [2-9], были предложены для работы креатинкиназы и глицерофосфаткиназы и подробно описаны в работах [8]. Предположительно, в активном сайте фермента (например, в АТФ-синтазе) образуются радикальные парные состояния (ион-радикальные пары) в синглетном состоянии ($S=0$) (так как ИРП образуется из диамагнитных молекул). ИРП образуются благодаря переносу электрона. Магниточувствительность спиновых состояний ИРП обусловлена взаимодействием электронных спинов с магнитными полями (зеemanовские взаимодействия, так называемый Δg -механизм) и с магнитными моментами окружающих ядер через сверхтонкие взаимодействия (механизм СТВ).

Оба вида взаимодействия могут вращать электронные магнитные моменты и электронные спины, превращая начальные синглетные состояния в триплетные. Обратный перенос строго запрещен для триплетных ион-радикальных состояний, поэтому синглет–триплетная конверсия уменьшает вероятность обратной реакции, увеличивая вероятность прямой ферментативной реакции и, как следствие, выхода продукта. Таким образом, магнитные взаимодействия (внешние магнитные поля и магнитные моменты атомных ядер) индуцируют синглет-триплетную эволюцию ИРП в активном сайте фермента, включают дополнительные реакционные каналы, тем самым влияя на выход продуктов ферментативных процессов, *in vitro* и *in vivo*.

Обычно магнитные поля и магнитные взаимодействия влияют на соотношения скоростей различных каналов жидкофазных радикальных реакций и способны изменять выходы продуктов реакции [30]. Ферментативные реакции

характеризуются высокой специфичностью. Они не допускают одновременного образования различных молекул. Поэтому единственным параметром, на который могут влиять магнитные поля и магнитные взаимодействия, является скорость ферментативной реакции, производящей только один продукт. Электроны являются движущими агентами всех химических реакций, в том числе и ферментативных. Перенос электронов (смещение электронной плотности) приводит к смещению других частей молекул за счет кулоновских взаимодействий. Радикальное парное состояние или ИРП образуется, если электронная плотность смещается от одной молекулы к другой. В случае с АТФ-синтазой перенос электрона происходит с фосфат-анионной группы АДФ на магний ([пункт 5.1](#)), и образуется первичная ИРП, состоящая из одновалентного катион-радикала Mg^+ и оксирадикала АДФ.

«Для анализа влияния ядерного спина и магнитного поля на ферментативные реакции можно рассмотреть идеализированную кинетическую схему, предложенную для описания магнитного изотопного эффекта магния в ферментативной реакции синтеза АТФ [5, 8] (рисунок 6.1). В этой схеме А и В – исходные диамагнитные партнеры в активном сайте фермента. В диамагнитных молекулах электронные спины могут находиться только в коррелированном синглетном состоянии. Партнер В – это атом двухвалентного металла в активном центре фермента, например магния Mg, который может иметь ядерный магнитный момент и ядерный спин (например, ^{25}Mg имеет ядерный спин $I = 5/2$) или нет (^{24}Mg или ^{26}Mg) и являющийся акцептором электрона. Для ферментативного синтеза АТФ роль партнера А выполняет молекула АДФ (донор электрона) [5, 8]. После переноса электрона от А к В образуется ИРП в синглетном состоянии $[A^{*+}, B^{\bullet-}]^S$ (или $[Mg^{*+} АДФ^{\bullet-}]^S$ в случае синтеза АТФ АТФ-синтазой) с константой скорости k_1 » [56, 1, 5].

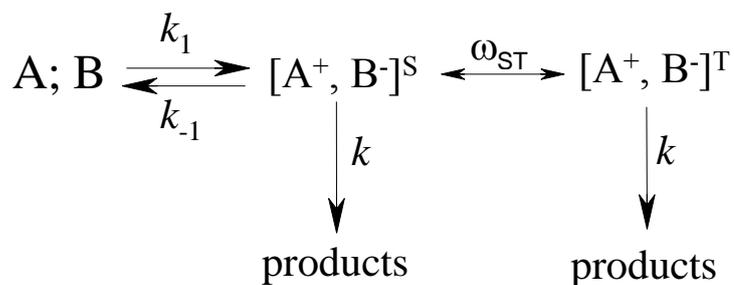


Рисунок 6.1 – Кинетическая схема, предложенная для описания МИЭ магния в ферментативной реакции синтеза АТФ. А и В – исходные диамагнитные партнеры в активном центре фермента [5]

«Для синглетной ИРП возможны три канала эволюции $[A^{\bullet+}, B^{\bullet-}]^S$.

(1) обратный перенос электрона на А с константой скорости k_{-1} ,

(2) последующий перенос электрона или трансформация субстратов, приводящие к образованию продуктов с константой скорости k , характеризующей «внутреннюю производительность» фермента,

(3) спиновая эволюция, переводящая синглетную ИРП $[A^{\bullet+}, B^{\bullet-}]^S$ в триплетное состояние $[A^{\bullet+}, B^{\bullet-}]^T$ с частотой ω_{ST} , определяемой магнитными взаимодействиями неспаренных электронных спинов. Строго говоря, синглет-триплетную конверсию нельзя описывать константой скорости, так как это обратимый периодический процесс. Спиновая эволюция может быть индуцирована зеемановским взаимодействием неспаренных электронных спинов на оксирадикале АДФ и магнии Mg^+ с внешним магнитным полем (Δg -механизм) или сверхтонким взаимодействием ядерного спина $^{25}Mg^+$ с неспаренным электроном, если в активном сайте оказался магнитный изотоп магния» [56, 1, 5].

Предполагается, что как синглетные, так и триплетные ИРП превращаются в продукты ферментативной реакции с постоянной скоростью k . Мы принимаем константу скорости k одинаковой для синглетных и триплетных ИРП. На данном этапе нет серьезной аргументации считать, что константы скорости должны различаться. Кроме того, в результате работы АТФ-синтазы образуется только

один продукт – АТФ. То есть синглетный и триплетный канал не допускают образования различных продуктов, как это может происходить в других радикально-парных ферментативных реакциях [202-205]. Также в работе [166] показано, что различие вкладов синглетного и триплетного канала становится наиболее существенно, когда ферментативная реакция рассматривается в качестве «природного компаса», предположительно объясняющая навигацию птиц.

Наиболее важным отличием триплетных ИРП является строгий спиновый запрет обратного переноса электронов. Как следствие, это уменьшает количество исходных диамагнитных и незаряженных частиц. Другими словами, из триплетной ИРП невозможен обратный перенос электрона и регенерация исходных диамагнитных частиц. Спиновый запрет является следствием принципа Паули и закона сохранения углового момента. «Константа скорости ферментативной реакции k зависит от многих факторов, влияющих на состояние клеток, субклеточных структур и ферментов. Поэтому эта константа может отличаться от константы скорости, измеренной *in vitro* для изолированного фермента. Предположительно, продукты этой ферментативной ион-радикальной реакции могут участвовать в последующих внутриклеточных реакциях и таким образом определять магнитную чувствительность живых организмов, вызывая определенный физиологический отклик, доступный для экспериментальной регистрации *in vivo*» [1, 5].

Аналогично системе кинетических уравнений, используемой в обычной химической кинетике, была построена система уравнений (6.1-6.3) для матриц спиновой плотности ρ , характеризующих частицы и их спиновые состояния на разных стадиях реакции. Формализм матрицы плотности – стандартный формализм квантово-механических расчётов, который позволяет находить средние значения квантово-механических величин, например, вероятность синглетного состояния частиц [31, 161, 210, 212]. Для описания совместной химической и спиновой эволюции ИРП используется уравнение Лиувилля для спиновой матрицы плотности $\rho(t)$ [31]. Уравнение Лиувилля выводится из фундаментального уравнения Неймана для необратимых процессов [210], в

частности для спин-зависимых процессов [161]. Для данной модели это уравнение дополняется слагаемыми, описывающими образование ИРП из исходных диамагнитных молекул в синглетном состоянии, и их исчезновение:

$$\frac{d\rho}{dt} = -i\hbar^{-1}[H, \rho] - k_{-1}[P_s\rho - \rho P_s] - k\rho + \left(\frac{\partial\rho}{\partial t}\right)_{\text{обр}}$$

Здесь первое слагаемое описывает спиновую эволюцию ИРП, второе – исчезновение ИРП в результате спин-зависимого процесса регенерации исходных диамагнитных молекул с константой скорости k_{-1} , третье слагаемое – образование продуктов, последнее слагаемое – образование ИРП. В приведенном уравнении не учитывается спиновая релаксация ИРП по следующим причинам. Во-первых, в феноменологических теориях спиновая релаксация может быть описана слагаемым с характерным временем T

$$\left(\frac{\partial\rho}{\partial t}\right)_{\text{обр}} = -\frac{\rho}{T}$$

В этом случае учёт релаксации сводится к преобразованию константы скорости k и не изменяет расчёты: $k \rightarrow k+1/T$. Во-вторых, времена релаксации, оцененные по ЭПР для органических радикалов в растворителях с низкой вязкостью, составляют порядка 0,1-1 мкс, что значительно больше, чем время жизни органических радикалов (не более 100 нс), и, следовательно, недостаточно времени для влияния релаксации на спиновое «перемешивание» [161, 212]. Другими словами, процессы релаксации могут существенно изменить форму магнитно-полевого эффекта только при временах жизни ИРП порядка 1 мкс. В-третьих, до сих пор нет надёжной теоретической модели спиновой релаксации для радикальной пары с участием ядерного спина, которая бы показывала полное совпадение с экспериментальными результатами [212, 213-214].

Таким образом, используя уравнение Лиувилля, мы можем записать следующую систему уравнений, характеризующих изменения частиц на различных стадиях ферментативной реакции, идущей по ион-радикальному механизму:

$$d\rho^{AB} / dt = -k_1\rho^{AB} + k_{-1}Tr(P_S\rho^I P_S) \quad (6.1)$$

$$d\rho^I / dt = -i\hbar^{-1}[H, \rho^I] - (k_{-1} / 2)\{P_S\rho^I + \rho^I P_S\} - k\rho^I + k_1\rho^{AB} \quad (6.2)$$

$$d\rho^P / dt = k\rho^I \quad (6.3)$$

«В этих уравнениях ρ^{AB} обозначает спиновую матрицу плотности для исходных реагентов А и В в синглетном состоянии, ρ^I – спиновую матрицу плотности образовавшихся ИРП, а ρ^P матрицу продуктов реакции. P_S представляет собой оператор проектирования в синглетное состояние ($P_S = |S\rangle\langle S|$), а H спиновый гамильтониан ИРП. В уравнении (1) первое слагаемое описывает превращение диамагнитных частиц А и В в синглетную ИРП $[A^{*\cdot}, B^{\cdot*}]^S$; второе – их регенерацию в результате обратного переноса электрона из синглетных ион-радикальных состояний. В уравнении (6.2) первое слагаемое отвечает за синглет-триплетную конверсию ИРП, индуцируемую спиновым гамильтонианом H , второе слагаемое – обратный перенос электрона, третье – исчезновение ИРП с образованием продуктов, а последнее характеризует генерацию ион-радикальных состояний на первой стадии ферментативной реакции. Уравнение (6.3) описывает рождение продуктов, в результате превращений и синглетных, и триплетных ИРП» [56, 1, 5].

Начальные условия для системы уравнений (6.1–6.3) следующие: в начальный момент $t = 0$ существуют только диамагнитные частицы – доноры и акцепторы электронов А и В; начальное состояние спинов электронов, участвующих в реакции, является синглетным, а ИРП и продукты ферментативной реакции отсутствуют. Следовательно,

$$\rho^{AB}(0) = \rho_e(0) \otimes \rho_n(0); \rho^I(0) = 0; \rho^P(0) = 0, \quad (6.4)$$

где $\rho_e(0) = |S\rangle\langle S|$ - это матрица плотности электронных спинов исходных частиц А и В (синглетное состояние), а $\rho_n(0)$ - спиновая матрица плотности исходных частиц, имеющих ядерный спин. Для одного ядерного спина, $I = 1/2$

$$\rho_n(0) = (1/2)\{|\alpha\rangle\langle\alpha| + |\beta\rangle\langle\beta|\}. \quad (6.5)$$

Если каждая ИРП производит одну молекулу продукта, то в реакции, описываемой вышеприведенной схемой 1, сохраняется суммарное число участников: исходных пар А и В, ИРП и продуктов. Сохранение числа частиц участников следует и из систем уравнений (6.1-6.3). Взяв сумму левых частей этих уравнений, можно показать, что

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} \text{Tr}(\rho^{AB}(t) + \rho^I(t) + \rho^P(t)) &= 0 \\ \rho^{AB}(t) + \rho^I(t) + \rho^P(t) &= 1. \end{aligned} \quad (6.6)$$

Правило сохранения числа частиц показывает, что

$$\text{Tr}(d\rho^P / dt) = -\text{Tr}(d\rho^{AB} / dt + d\rho^I / dt) \quad (6.7)$$

Если образование ион-радикальных состояний в активном сайте фермента является лимитирующей стадией реакции и каждый акт образования ИРП приводит к синтезу продукта, то мы можем использовать квазистационарное приближение для решения уравнения (6.2). Таким образом, будем считать, что $d\rho^I / dt = 0$.

В этом случае скорость образования продуктов ферментативной реакции примерно равна скорости расходования исходных реагентов.

$$\text{Tr}(d\rho^P / dt) = -\text{Tr}(d\rho^{AB} / dt) \quad (6.8)$$

Поэтому вместо расчёта суммарной константы k_p скорости образования продуктов можно рассчитать константу скорости исчезновения исходных частиц А или В.

Квазистационарное приближение позволяет заменить неоднородное дифференциальное уравнение (6.2) простым алгебраическим уравнением.

$$-i\hbar^{-1}[H, \rho^I] - k_{-1}\{P_S \rho^I + \rho^I P_S\}/2 - k\rho^I + k_1\rho^{AB}(t) = 0 \quad (6.9)$$

$$\rho^{AB}(t) = \rho^{AB}(0)e^{-k_p t},$$

тогда все элементы матрицы ρ^I могут быть найдены в виде $\rho_{ij}^I(t) = \rho_{ij}^Q e^{-k_p t}$.

В этом случае количество синглетных ИРП описывается выражением

$$\rho_{SS}^I(t) = \rho_{SS}^Q e^{-k_p t} = P_S \rho^Q P_S e^{-k_p t}, \quad (6.10)$$

где ρ^Q можно рассматривать как «амплитуду» количества ИРП; находится как решение новой системы алгебраических уравнений, получаемой из (6.9).

$$-i\hbar^{-1}[H, \rho^Q] - k_{-1}\{P_S \rho^Q + \rho^Q P_S\}/2 - k\rho^Q + k_1\rho^{AB}(0) = 0 \quad (6.11)$$

Система алгебраических уравнений (6.11) решается точно только для простейших гамильтонианов H , например, в случае зеемановских взаимодействий электронных магнитных моментов в ион-радикалах. Если использовать собственные вектора гамильтониана $|\Phi_i\rangle, |\Phi_j\rangle$ и если $k_{-1} < k$, то решение матричных уравнений (6.11) имеет простую форму:

$$\rho_{ij}^0 = \frac{k_1 \langle \Phi_i | \rho^{AB}(0) | \Phi_j \rangle}{k + i\omega_{ij}} \quad (6.12)$$

В этом уравнении ω_{ij} частота спиновой эволюции ИРП (синглет-триплетной конверсии), определяемая гамильтонианом H . После подстановки (6.10) в уравнение (6.1), получаем

$$\frac{k_p(H)}{k_1} = 1 - \frac{k_{-1}}{k} \rho_{SS}^0(H). \quad (6.13)$$

При больших значениях константы скорости k или при предельно малых концентрациях ИРП $\rho_{SS}^0 \approx 0$, константа скорости магниточувствительного ферментативного процесса $k_p(H)$ достигает максимального гипотетического значения:

$$k_p(H) = k_1 \quad (6.14)$$

При этом скорость ферментативных реакций не зависит от напряженности магнитного поля и равна скорости прямого переноса электронов.

Для начала рассмотрим механизм синглет-триплетной конверсии ИРП в активном сайте ферментов, обусловленный зеемановскими магнитными взаимодействиями электронных магнитных моментов - Δg -механизм. Спиновый гамильтониан H для Δg -механизма спиновой эволюции ИРП имеет вид

$$\hbar^{-1}H = g_1\beta HS_z^1 + g_2\beta HS_z^2 = \omega_1 S_z^1 + \omega_2 S_z^2, \quad (6.15)$$

где H обозначает напряженность внешнего ПМП, g_1 и g_2 соответственно представляют собой g -факторы ион-радикалов $A^{\bullet+}$ and $B^{\bullet-}$, и $\omega_i = g_i\beta H$ - частоты

прецессии электронного спина в партнерах ИРП. Гамильтониан (9) способен индуцировать только преобразование $|S\rangle \Leftrightarrow |T_0\rangle$; другие переходы $|S\rangle \Leftrightarrow |T_+\rangle$ и $|S\rangle \Leftrightarrow |T_-\rangle$ запрещены. Этот факт уменьшает количество алгебраических уравнений и облегчает решение системы (6.11). Используя $|S\rangle, |T_0\rangle$ в качестве базисных векторов, получаем систему алгебраических уравнений для матричных элементов $\rho_{SS}^0, \rho_{ST_0}^0, \rho_{T_0S}^0, \rho_{T_0T_0}^0$ и находим их.

$$\begin{cases} -i\frac{\Delta\omega}{2}(\rho_{ST_0}^0 - \rho_{T_0S}^0) - k\rho_{T_0T_0}^0 = 0 \\ -i\frac{\Delta\omega}{2}(\rho_{SS}^0 - \rho_{T_0T_0}^0) - (k + \frac{k_{-1}}{2})\rho_{T_0S}^0 = 0 \\ -i\frac{\Delta\omega}{2}(\rho_{T_0T_0}^0 - \rho_{SS}^0) - (k + \frac{k_{-1}}{2})\rho_{ST_0}^0 = 0 \\ -i\frac{\Delta\omega}{2}(\rho_{T_0S}^0 - \rho_{ST_0}^0) + k_{-1}\rho_{SS}^0 = -k_1\rho_{SS}^0(0) \end{cases} \quad (6.16)$$

Для нахождения матричного элемента ρ_{SS}^0 можно использовать метод Крамера $\rho_{SS}^0 = \Delta_{\rho_{SS}^0} / \Delta$. Здесь Δ – ненулевой определитель системы, $\Delta_{\rho_{SS}^0}$ является определителем матрицы, образованной заменой первого столбца на столбец начального спинового состояния ИРП. В результате расчетов можно получить

$$\rho_{SS}^0 = \frac{k_1 k}{k(k + k_{-1}) + (\Delta\omega)^2}, \quad (6.17)$$

И константа скорости k_p находится как

$$\frac{k_p}{k_1} = 1 - \frac{k k_{-1}}{k(k + k_{-1}) + (\Delta\omega)^2} \quad (6.18)$$

Здесь $\Delta\omega = \Delta g\beta\hbar / \hbar$ представляет собой разность частот спиновой прецессии у партнеров ИРП, определяющую зависимость от магнитного поля $k_p(H)$. При

отсутствии магнитного поля, т. е. $\Delta\omega = 0$, выражение (6.18) принимает вид, типичный для химической кинетики.

$$\frac{k_p(0)}{k_1} = \frac{k}{k + k_{-1}} \quad (6.19)$$

Эта формула подтверждает правильность предыдущих предположений и расчетов. Для сильных магнитных полей и если $(\Delta\omega) \gg [k(k + k_{-1})]^{1/2}$ получаем $k_p(\infty)/k_1 = 1$. Тогда константа скорости k_p становится независима от магнитного поля. Для таких сильных магнитных полей спиновая конверсия достаточно быстра, чтобы уравнивать количества синглетных и триплетных состояний ИРП в активных сайтах ферментов.

Связь константы скорости ферментативной реакции с константами элементарных процессов переноса электронов или разделения зарядов и относительной «концентрацией» ИРП в синглетном состоянии ρ_{SS}^0 описывает уравнение (6.13). «Равенство (6.14) означает, что ферментативный процесс будет протекать со скоростью образования ИРП, т. е. со скоростью прямого переноса электронов от молекулы-донора к акцептору. Уменьшение количества синглетных ИРП, вызванное их превращением в триплетные, очевидно, увеличивает константу скорости ферментативной реакции и, как следствие, скорость выхода продуктов» [5, 8].

Наличие ядерного магнитного момента $I \neq 0$ в партнерах ИРП способно влиять на синглет–триплетную конверсию как качественно, так и количественно. СТВ электрона и ядерных спинов «включают» каналы спиновой эволюции $|S\rangle \Leftrightarrow |T_+\rangle$ и $|S\rangle \Leftrightarrow |T_-\rangle$, которые увеличивают количество S-T переходов. Для анализа влияния ядерного спина и ядерного магнитного момента в ИРП на магниточувствительную ферментативную кинетику могут быть использованы следующие гамильтонианы [31, 212]

$$\hbar^{-1}H = \hbar^{-1}H_A + \hbar^{-1}H_B = \omega_1 S_z^1 + \omega_2 S_z^2 + a \vec{S}_2 \vec{I} \quad (6.20)$$

В этих уравнениях фигурирует константа СТВ с ядерным спином $I=1/2$. Для простоты далее будем считать, что электронные спины в партнерах ИРП не взаимодействуют через диполь–дипольные и обменные взаимодействия. Во-первых, введение этих взаимодействий в гамильтониан не позволяет найти решение уравнений (6.1-6.3) в точном виде [211]. Во-вторых, учёт таких взаимодействий в численных расчётах магнитно-полевой зависимости константы скорости ферментативной реакции, идущей по ион-радикальному механизму, показал незначительное влияние диполь-дипольного и обменного взаимодействий на форму кривой [211, 216]. Зеемановские частоты спинов электронов практически не различаются в слабом магнитном поле ($\omega < a$), поэтому примем $\omega_1 = \omega_2 = \omega = g\beta H$. В этом случае собственные значения гамильтониана (6.20) являются суммами собственных значений спиновых гамильтонианов независимых радикалов. Собственные состояния $|\Phi_i\rangle, |\Phi_j\rangle$ являются тензорным произведением собственных векторов гамильтониана H_A и H_B .

Если использовать для расчётов собственные векторы $|\Phi_i\rangle$ и собственные значения E_i спин-гамильтониана H , то все матричные элементы можно найти как

$$\rho_{ij}^o(t) = k_1 \frac{\langle \Phi_i | \rho^{AB}(0) | \Phi_j \rangle}{k + i\omega_{ij}} = k_1 \frac{\{\rho^{AB}(0)\}_{ij}}{k + i\omega_{ij}}. \quad (6.21)$$

$$\text{Далее можно получить } \rho_{SS}^o = Tr_n \{ \hat{P}_S \rho^o \hat{P}_S \} = k_1 Tr_n \sum_{ij} \frac{\langle S | \Phi_i \rangle \langle \Phi_i | \rho^{AB}(0) | \Phi_j \rangle \langle \Phi_j | S \rangle}{k + i\omega_{ij}}.$$

Тогда

$$\rho^{AB}(0) = \rho_e(0) \otimes \rho_n(0) = (1/2) \{ |S\alpha_n\rangle \langle S\alpha_n| + |S\beta_n\rangle \langle S\beta_n| \}$$

$$\rho_{SS}^o = k_1 \sum_{ij} \frac{|\langle S\alpha_n | \Phi_i \rangle|^2 |\langle \Phi_j | S\alpha_n \rangle|^2}{k + i\omega_{ij}} + k_1 \sum_{lm} \frac{|\langle S\beta_n | \Phi_l \rangle|^2 |\langle \Phi_m | S\beta_n \rangle|^2}{k + i\omega_{lm}}, \quad (6.22)$$

где индексы (i,j) обозначают спиновые состояния $|\Phi_j\rangle$ с полным суммарным спином $S_z + I_z = +1/2$, а индексы (l,m) спиновые состояния $|\Phi_l\rangle$ с полным суммарным спином $S_z + I_z = -1/2$.

Спиновый гамильтониан H – это сумма независимых спиновых гамильтонианов H_1 и H_2 партнёров ИРП $[A^{\bullet+}, B^{\bullet-}]$. Предполагается, что ион-радикал $A^{\bullet+}$ имеет один несвязанный электрон $S_1 = 1/2$ и не имеет ядерного магнитного момента, также спиновый гамильтониан H_1 имеет собственные векторы $|\varphi_1^i\rangle$ и собственные значения E_1^i ($i=1,2$):

$$\begin{aligned} H_1 &= \omega_1 \widehat{S}_{1z}, \quad E_1^1 = \omega_1 / 2, \quad |\varphi_1^1\rangle = |\alpha_1\rangle \\ E_1^2 &= -\omega_1 / 2, \quad |\varphi_1^2\rangle = |\beta_1\rangle \end{aligned} \quad (6.23)$$

Ион-радикал $B^{\bullet-}$ имеет один несвязанный электрон $S_2 = 1/2$ и ядерный спин $I = 1/2$; спиновый гамильтониан H_2 имеет собственные векторы $|\varphi_2^j\rangle$ и собственные значения E_2^j ($j=1-4$):

$$\begin{aligned} \widehat{H}_2 &= \omega_2 \widehat{S}_{2z} + a \widehat{S}_2 \widehat{I}_n, \quad E_2^1 = \omega_2 / 2 + a / 4, \quad |\varphi_2^1\rangle = |\alpha_2 \alpha_n\rangle, \\ E_2^2 &= (\Omega - a / 2) / 2, \quad |\varphi_2^2\rangle = \text{Cos } \mathcal{G} |\alpha_2 \beta_n\rangle + \text{Sin } \mathcal{G} |\beta_2 \alpha_n\rangle, \\ E_2^3 &= (-\Omega - a / 2) / 2, \quad |\varphi_2^3\rangle = -\text{Sin } \mathcal{G} |\alpha_2 \beta_n\rangle + \text{Cos } \mathcal{G} |\beta_2 \alpha_n\rangle, \\ E_2^4 &= -\omega_2 / 2 - a / 4, \quad |\varphi_2^4\rangle = |\beta_2 \beta_n\rangle, \end{aligned} \quad (6.24)$$

где $\Omega = (a^2 + \omega^2)^{1/2}$, $\text{Cos } 2\mathcal{G} = \omega / (\omega^2 + a^2)^{1/2}$, и $\text{Sin } 2\mathcal{G} = a / (\omega^2 + a^2)^{1/2}$.

Тогда, собственные значения и собственные векторы спинового гамильтониана (6.20)

$$\begin{aligned}
|\Phi_1\rangle &= |\varphi_1^1\rangle|\varphi_2^1\rangle = |\alpha_1\rangle|\alpha_2\alpha_n\rangle \\
E_1 &= E_1^1 + E_2^1 = \omega + a/4 \\
|\Phi_2\rangle &= |\varphi_1^1\rangle|\varphi_2^2\rangle = |\alpha_1\rangle(\text{Cos } \mathcal{G}|\alpha_2\beta_n\rangle + \text{Sin } \mathcal{G}|\beta_2\alpha_n\rangle) \\
E_2 &= E_1^1 + E_2^2 = \omega/2 - a/4 + \Omega/2 \\
|\Phi_3\rangle &= |\varphi_1^1\rangle|\varphi_2^3\rangle = |\alpha_1\rangle(-\text{Sin } \mathcal{G}|\alpha_2\beta_n\rangle + \text{Cos } \mathcal{G}|\beta_2\alpha_n\rangle) \\
E_3 &= E_1^1 + E_2^3 = \omega/2 - a/4 - \Omega/2 \\
|\Phi_4\rangle &= |\varphi_1^1\rangle|\varphi_2^4\rangle = |\alpha_1\rangle|\beta_2\beta_n\rangle \\
E_4 &= E_1^1 + E_2^4 = \omega/2 - \omega/2 + a/4 = a/4 \\
|\Phi_5\rangle &= |\varphi_1^2\rangle|\varphi_2^1\rangle = |\beta_1\rangle|\alpha_2\alpha_n\rangle \\
E_5 &= E_1^2 + E_2^1 = -\omega/2 + \omega/2 + a/4 = a/4 \\
|\Phi_6\rangle &= |\varphi_1^2\rangle|\varphi_2^2\rangle = |\beta_1\rangle(\text{Cos } \mathcal{G}|\alpha_2\beta_n\rangle + \text{Sin } \mathcal{G}|\beta_2\alpha_n\rangle) \\
E_6 &= E_1^2 + E_2^2 = -\omega/2 - a/4 + \Omega/2 \\
|\Phi_7\rangle &= |\varphi_1^2\rangle|\varphi_2^3\rangle = |\beta_1\rangle(-\text{Sin } \mathcal{G}|\alpha_2\beta_n\rangle + \text{Cos } \mathcal{G}|\beta_2\alpha_n\rangle) \\
E_7 &= E_1^2 + E_2^3 = -\omega/2 - a/4 - \Omega/2 \\
|\Phi_8\rangle &= |\varphi_1^2\rangle|\varphi_2^4\rangle = |\beta_1\rangle|\beta_2\beta_n\rangle \\
E_8 &= E_1^2 + E_2^4 = -\omega + a/4.
\end{aligned} \tag{6.25}$$

Для СТВ-механизма спиновой эволюции ИРП устойчивое решение уравнения (6.10) с гамильтонианом (6.20) принимает вид

$$\begin{aligned}
\rho_{ss}^0 &= \frac{k_1}{2k} - \frac{k_1}{8k} \frac{a^2}{a^2 + \omega^2} + \frac{k_1 k}{8} \frac{a^2}{(k^2 + a^2 + \omega^2)(a^2 + \omega^2)} + \\
&+ \frac{2k_1 k}{4} \frac{(k^2 + a\omega/2 + \omega^2)}{k^2(k^2 + a\omega/2 + \omega^2) + (a\omega/2)^2}
\end{aligned} \tag{6.26}$$

Соответствующее уравнение магнитно-полевой зависимости константы скорости магниточувствительного ферментативного процесса можно вывести из уравнения (6.13) и уравнения (6.26) в следующем виде

$$\frac{k_p(H)}{k_1} = 1 + \frac{k_{-1}}{8k} \frac{a^2}{a^2 + \omega^2} - \frac{k_{-1}}{2} \left[\frac{1}{k} + \frac{ka^2}{4(k^2 + a^2 + \omega^2)(a^2 + \omega^2)} + \frac{k(k^2 + a^2/2 + \omega^2)}{k^4 + (a\omega/2)^2 + k^2(\omega^2 + a^2)} \right]. \quad (6.27)$$

При отсутствии магнитного поля, т. е. при $H = 0$ и $\omega = 0$, уравнение (6.27) преобразуется в следующее уравнение

$$\frac{k_p(0)}{k_1} = 1 - \frac{k_{-1}}{k} + \frac{3}{8} \frac{k_{-1}}{k} \frac{a^2}{k^2 + a^2}. \quad (6.28)$$

«Увеличение константы СТВ у партнеров ИРП в активном сайте фермента увеличивает константу скорости $k_p(0)$ для ферментативной реакции, как следует из уравнения (6.28). Для небольших констант СТВ a ($|a| \ll k$), увеличение скорости ферментативной реакции k_p пропорциональна квадрату константы СТВ: $k_p(0) \sim a^2$. Для больших констант СТВ $|a| \gg k$, константа скорости ферментативной реакции k_p становится независимой от a » [8].

Если СТВ-механизм спиновой эволюции ИРП является основным, то в сильных магнитных полях $\omega \gg a$, константа скорости $k_p(H)$ стремится к значению

$$\frac{k_p(\infty)}{k_1} = 1 - \frac{k_1 k_{-1}}{2k^2} \frac{8k^2 + a^2}{4k^2 + a^2}, \quad (6.29)$$

которое не зависит от магнитного поля.

Как правило, константы СТВ для органических радикалов довольно малы (1-10 мТл) [30, 164]. Поэтому эксперименты в сильных магнитных полях либо не позволяют наблюдать магнитную чувствительность живых организмов, либо не доказывают существование спин-зависимых ферментативных процессов, объясняющих такую чувствительность. Следовательно, нет необходимости проводить экспериментальные исследования магнитной чувствительности живых организмов в сильных полях.

Для дальнейшего анализа СТВ-механизма и построения графиков удобно ввести безразмерные переменные $\mu = k/a$; $\mu_1 = k_1/a$; $\mu_{-1} = k_{-1}/a$; используя константу СТВ a в качестве шкалы для оценки кинетических констант k , k_1 , k_{-1} и магнитного взаимодействия $\nu = \omega/a = g\beta H/a$. После ряда преобразований мы получаем следующее уравнение.

$$\frac{k_p(H)}{k_1} = 1 - \frac{\mu_{-1}(1+8\mu^2)}{2\mu(1+4\mu^2)} + \frac{\mu_{-1}}{8\mu} \frac{1}{(1+\mu^2+\nu^2)} - \frac{\mu\mu_{-1}}{(1+4\mu^2)^2} \frac{1-2\mu^2}{\nu^2+4\mu^2(1+\mu^2)/(1+4\mu^2)} \quad (6.30)$$

Используя новые обозначения, была построена зависимость константы скорости ферментативной реакции от магнитного поля для СТВ-механизма спиновой эволюции ИРП при следующих параметрах $\mu = 0,2$, $\mu_1 = 0,5$ и $\mu_{-1} = 0,01$ (рисунок 6.1).

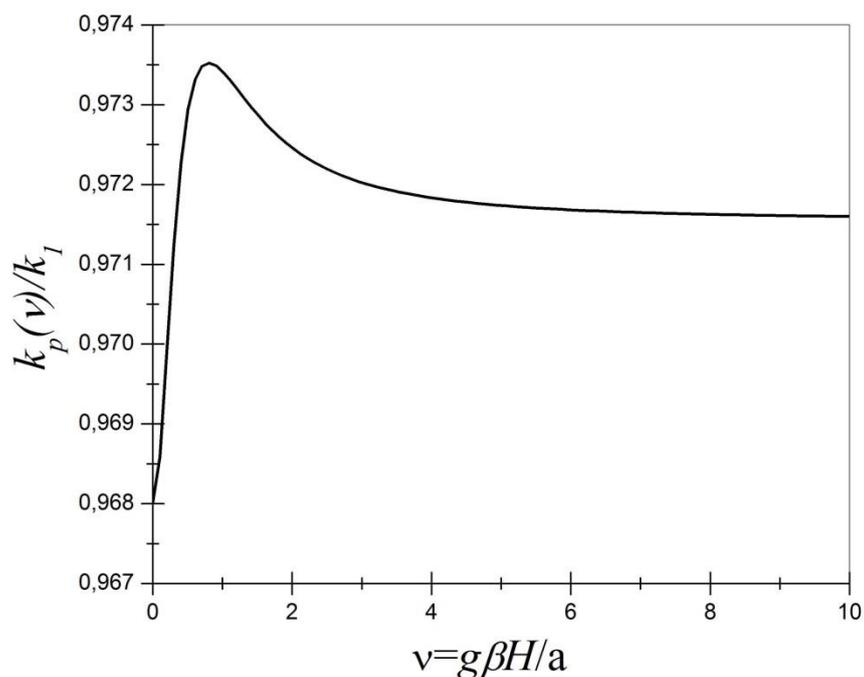


Рисунок 6.1 – Магнитно-полевая зависимость $k_p(v)/k_1$ для $\mu=0,2$, $\mu_1=0,5$, $\mu_{-1}=0,01$ [5, 8]

В уравнении (6.30) магнитно-полевая зависимость константы скорости $k_p(H)$ описывается только слагаемыми, зависящими от параметра $v = g\beta H/a$. Каждое из слагаемых представляет функцию.

Из уравнения (6.30) следует, что магнитно-полевая зависимость $k_p(v)/k_1$ может быть представлен в виде суммы трех слагаемых:

$$F_0 = 1 - \frac{\mu_{-1}}{2\mu} \left(\frac{1+8\mu^2}{1+4\mu^2} \right), \quad (6.31)$$

$$F_1(v) = \frac{\mu_{-1}}{8\mu} \left(\frac{1}{v^2 + \mu^2 + 1} \right), \quad (6.32)$$

$$F_2(v) = -\frac{\mu\mu_{-1}}{(1+4\mu^2)^2} \frac{(1-2\mu^2)}{v^2 + 4\mu^2(1+\mu^2)/(1+4\mu^2)}. \quad (6.33)$$

Первое слагаемое F_0 в уравнении (6.30) не зависит от v , т. е. от напряженности магнитного поля H , и определяет величину константы скорости

ферментативной реакции $k_p(\infty)/k_1$ в сильном магнитном поле $g\beta H \gg (k^2 + a^2)^{1/2}$, когда $F_1(v)$ и $F_2(v)$ равны нулю. Магнитно-полевая зависимость константы скорости $k_p(H)/k_1$ описывается функциями $F_1(v)$ и $F_2(v)$, графики которых представлены на рисунках 6.2-6.3. (значения μ_1 и μ_{-1} были одинаковыми, параметр μ варьировался).

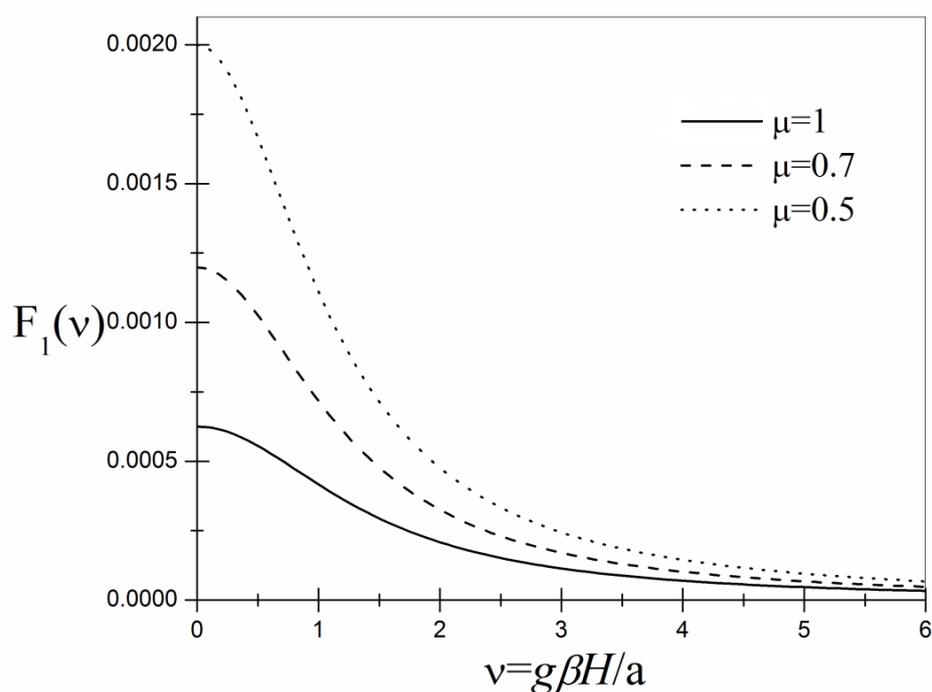


Рисунок 6.2 – График функции $F_1(v)$, описывающей компоненту магнитно-полевой зависимости константы скорости ферментативной реакции $k_p(H)$ для различных значений $\mu = k/a$ [5, 8]

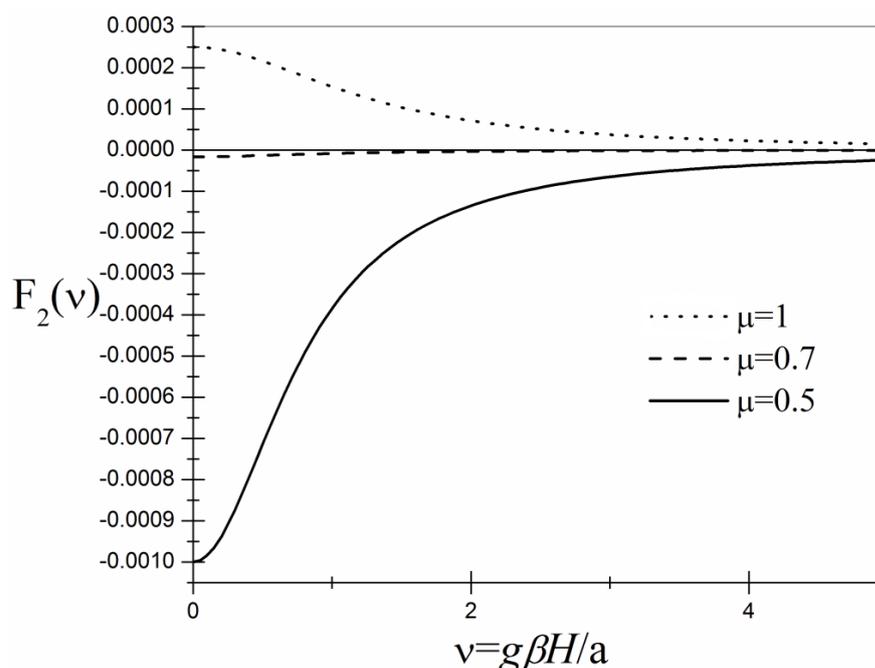


Рисунок 6.3 - График функции $F_2(v)$, описывающей компоненту магнитно-полевой зависимости константы скорости ферментативной реакции $k_p(H)$ для различных значений $\mu = k/a$ [5, 8]

Функция $F_1(v)$ представляет из себя лоренцевскую кривую с полушириной $v_{1/2} = 1 + \mu^2$ или $g\beta H_{1/2} = \sqrt{a^2 + k^2}$, которая зависит и от константы СТВ, и от константы скорости k превращения ИРП в продукты. Увеличение магнитного поля ($v = g\beta H/a$) от нуля до бесконечности приводит к падению функции $F_1(v)$ от исходного значения до нуля

$$F_1(0) = \frac{\mu_{-1}}{8\mu(1 + \mu^2)} = \frac{k_{-1}a^2}{8k(k^2 + a^2)}. \quad (6.34)$$

Функция $F_1(v)$ описывает снижение скорости ферментативной реакции $k_p(H)/k_1$ в магнитных полях $H \geq (k^2 + a^2)^{1/2} / g\beta$.

Вклад третьего слагаемого $F_2(v)$ заключается в определении магнитно-полевой зависимости в слабом магнитном поле $H < a / g\beta$. Функция представляет

собой «перевернутую» лоренцевскую кривую (рисунок 6.5), полуширина которой определяется выражением $\nu_{1/2}^2 = 4\mu^2 \frac{1+\mu^2}{1+4\mu^2}$, или $\omega_{1/2} = g\beta H_{1/2} = 2k \sqrt{\frac{1+\mu^2}{1+4\mu^2}}$.

Если $k \gg a$ ($\mu^2 = (k/a)^2 \gg 1$), то $H_{1/2} = k/g\beta$; если $k \ll a$ ($\mu^2 \ll 1$), тогда $H_{1/2} = 2k/g\beta$. В обоих случаях полуширина константы скорости $k_p(H)$ определяется только кинетическим параметром k . Однако если $k \approx a$, то полуширины функций $F_1(\nu)$ и $F_2(\nu)$ совпадают, и тогда невозможно зарегистрировать магнитно-полевые эффекты, что происходит в магнитных полях, напряженности которых превышают значения константы СТВ.

Так как функция $F_1(\nu)$ при $H \ll a/g\beta$ изменяется слабо, в то время как $F_2(\nu)$ претерпевает сильные изменения, «высоту» второй функции, по факту $F_1(\nu)$, можно принять за величину магнитно-полевого эффекта ферментативной реакции.

При построении кинетической модели рассматривалось участие только одного ядерного спина. Однако в активных сайтах ферментов реальные неспаренные электроны могут взаимодействовать с несколькими ядерными спинами, например, ^{31}P . Также они могут взаимодействовать с ядрами, имеющими спин $I > 1/2$. Примером таких ядер является магнитный изотоп магния ^{25}Mg со спином ядра $I = 5/2$. В этих случаях СТВ в активных сайтах ферментов способно увеличивать эффективность фермента в магнитных полях. Диапазон поля зависит от типа фермента и магнитных ядер, присутствующих в активном сайте. Сумма этих функций коррелирует с полученной численно магнитно-полевой зависимостью константы ферментативного фосфорилирования $k_p(H)$ [215-216]. Для этих расчетов использовалась аналогичная кинетическая схема ферментативной ион-радикальной реакции, но более сложная модель ИРП, имеющая одно или два ядра ^{31}P (спин $I=1/2$) и одно ядро ^{25}Mg (спин $I=5/2$) и учитывающая обменное взаимодействие. Несмотря на эти различия моделей ИРП, результаты численных расчетов [215-216] и наши аналитические зависимости дают хорошее согласие для выражения констант скорости $k_p(H)$ от магнитного поля.

«Совместные эффекты магнитного поля и ядерного спина будут наиболее сильными именно в слабых магнитных полях, напряженность которых меньше константы СТВ. Простые оценки показывают, что ферментативные ион-радикальные процессы с константой скорости $k \sim 10^4\text{--}10^5 \text{ с}^{-1}$ позволяют определять магнитно-полевые зависимости констант скоростей реакции $k_p(H)$ в диапазоне магнитных полей $H \sim 0,1\text{--}10 \text{ мТл}$, что сопоставимо со слабыми техногенными магнитными полями» [5, 8].

Для получения результатов в аналитическом виде были рассмотрены только процессы одноэлектронного переноса. Однако энзимология знает много процессов, где требуется несколько электронов. Такие многоэлектронные процессы подчиняются многоспиновым правилам отбора [217]. Кроме того, приведенный анализ не может быть применен к ферментативным процессам с участием парамагнитных ионов. Они играют важную роль в электронной транспортной цепи, но могут индуцировать быструю парамагнитную релаксацию, разрушающую спиновую корреляцию в ИРП.

Приведенная модель объясняет некоторые экспериментальные магнитно-полевые эффекты в ферментативных реакциях и биологических процессах. Например, содержание внутриклеточного АТФ у бактерий *E. coli* увеличилось до 3,5 раз после 1 ч воздействия слабого постоянного магнитного поля (17 мТл) [139]. Включение внешнего слабого магнитного поля повышает эффективность магнитного изотопа магния в ферментативном синтезе АТФ [6]. Аналогичные зависимости магнитного поля были получены для пула АТФ в бактериях *E. coli*, подробно описанные в [главе 5](#). Ферментативные реакции синтеза АТФ протекают через образование ИРП за счет переноса электронов или смещения электронной плотности в активном сайте фосфорилирующих ферментов, например, АТФ-синтазы [5, 7, 8].

Для оценки диапазона магнитных полей, в которых возможно наблюдать эффекты в ферментативных реакциях следует определить присутствующие в активном сайте магнитные ядра, степень их участия, а также константы СТВ. Значения констант СТВ органических радикалов, содержащих стабильные

природные магнитные изотопы ^1H и ^{13}C , находятся в диапазоне 0,1-4 мТл [218-219]. Поэтому оптимальный диапазон наблюдения влияния магнитного поля на ферментативные процессы в соответствии с нашей моделью составляет 0-100 мТл. Именно этот диапазон использовался в наших экспериментальных исследованиях (3-5 главы). Полученные экспериментальные магнитно-полевые зависимости пула АТФ, колониеобразующей способности и констант скоростей роста бактерий *E. coli* качественно совпадают с теоретическими зависимостями для констант скорости ферментативной реакции. Аналогичные эффекты были обнаружены при анализе литературы в слабом магнитном поле для ферментативной активности α -амилазы (0-200 мТл) [220]; эндоглюканазы (5-70 мТл) [221]; супероксиддисмутазы, а также пероксидазы и каталазы (2,9–4,6 мТл) [222-223]. Многие эффекты магнитных полей были обнаружены на клеточном уровне в том же самом диапазоне 0–100 мТл [91] для остеобластов, фибробластов, эндотелиальных клеток, стволовых клеток костного мозга крыс, микроорганизмов *E. coli*, *A. alternate*, *F. oxysporum* и др. При этом многие исследования влияния сильного ПМП (0,2–10 Тл) на клеточном уровне не показали существенных различий [224]. «Изучив более 40 источников, Миякоши пришел к выводу, что само по себе сильное ПМП влияет очень слабо или совсем не влияет на рост клеток или генетическую токсичность» [8]. Однако в сочетании с другими внешними факторами, такими как ионизирующее излучение и некоторые химические вещества, магнитное поле изменяет регистрируемые показатели витальности живых организмов.

6.3 Заключение

Был проведён анализ существующих физических моделей влияния слабых постоянных магнитных полей на живые организмы. Только одна из существующих моделей способна объяснить и магнитно-полевые, и магнитно-изотопные эффекты в клетках – это модель радикально-парного механизма ферментативных реакций. На основе неё нами была предложена простая модель ферментативной магниточувствительности, постулирующая, что ферментативные реакции, идущие по ион-радикальному механизму с участием магнитных изотопов химических элементов, могут быть «рецепторами» внешнего магнитного поля. Был проанализирован Δg -механизм и СТВ-механизм спиновой конверсии ИРП в активных центрах ферментов, их влияние на выход продукта ферментативных реакций; произведён расчет магнитно-полевых зависимостей констант скоростей ферментативных реакций, а также проведена оценка эффектов и диапазона магнитных полей, в которых могут наблюдаться биологические эффекты. Экспериментальные магнитно-полевые зависимости пула АТФ, колониеобразующей способности и констант скоростей роста бактерий *E. coli*, приведённые в 3-5 главах диссертации, качественно совпадают с теоретическими зависимостями для констант скоростей ферментативных реакций.

Предположительно, биологические магнитно-полевые зависимости в слабых магнитных полях определяются кинетическими характеристиками ферментов. Оба механизма спиновой эволюции (Δg -, и СТВ-механизм) предсказывают независимость ферментативных ион-радикальных реакций и биологической магниточувствительности от магнитного поля в сильных полях, например, в постоянных магнитных полях МРТ–сканеров (0,35-9,4 Тл). Результаты, описанные в шестой главе, опубликованы в работах [1, 5, 8, 19].

Заключение

В данной диссертационной работе обнаружено, что микроорганизмы чувствительны к наличию ядерного магнитного момента изотопа магния и цинка. Добавление магнитного изотопа магния ^{25}Mg в питательную среду приводит к внутриклеточному обогащению, стимулирует рост бактерий и повышает их жизнеспособность. Основные физиологические свойства бактерий, такие как устойчивость к антибиотикам и образование биопленок, также изменяются в зависимости от типа изотопа магния – магнитного или немагнитного. Изменяется внутриклеточный элементный состав и концентрация АТФ при магнитно-изотопном обогащении бактерий *E. coli*. Магнитную природу обнаруженных эффектов доказывает отсутствие достоверных различий в регистрируемых показателях между немагнитными изотопами магния ^{24}Mg и ^{26}Mg . Данные о различном влиянии магнитных и немагнитных изотопов на бактерии в процессе роста получены впервые.

Доказано, что возможно усиление МИЭ с помощью внешних ПМП. Обнаруженные эффекты магнитного изотопа и магнитного поля в концентрации АТФ (увеличение в 2-3 раза) свидетельствуют о чувствительности пула в бактериях *E. coli* и к внешним постоянным и к внутренним, создаваемым магнитными ядрами изотопов, магнитным полям.

Построена простая модель ион-радикального механизма с минимальным набором параметров, которая описывает роль магнитных изотопов и магнитных взаимодействий во внутриклеточных процессах, связанной с изменением констант скоростей ферментативных реакций за счёт взаимодействия ядерного спина магнитного изотопа с неспаренными электронными спинами ближнего молекулярного окружения (для двух механизмов спиновой эволюции ИРП: СТВ и Δg). Ферментативные реакции, сопровождающиеся образованием ИРП с участием магнитных изотопов, могут быть магниточувствительными стадиями биологических внутриклеточных процессов.

Результаты настоящего исследования могут быть использованы в биофизике и медицине для контроля скорости ферментативных реакций в слабых постоянных магнитных полях с помощью обогащения магнитными изотопами жизненно важных химических элементов *in vivo*. Разработанные методы внутриклеточного изотопного обогащения бактерий могут быть использованы для проведения аналогичных исследований влияния других стабильных изотопов на живые организмы, а также для получения биополимеров с высокой степенью естественного изотопного обогащения.

Основные результаты и выводы

1. Рост бактерий *E. coli* на питательной среде, содержащий магнитный изотоп магния ^{25}Mg , увеличивает скорость роста на 15 % и количество КОЕ на стационарной фазе в 1,5–2 раза, сокращает продолжительность адаптационной фазы на 30 % по сравнению с клетками, инкубируемыми на среде с немагнитными изотопами $^{24,26}\text{Mg}$ и природным магнием. Бактерии способны фракционировать изотопы по магнитному признаку.

2. Обнаружены МИЭ ^{25}Mg в резистентности бактерий *Escherichia coli* к антибиотикам из групп хинолонов/фторхинолонов, ансамицинов, аминогликозидов и линкозамидов, что свидетельствует о магнитной чувствительности внутриклеточных систем, ответственных за синтез белка (аминогликозиды и линкозамиды) и синтез ДНК и РНК (хинолоны/фторхинолоны, ансамицины).

3. Усиление МИЭ возможно с помощью внешнего постоянного магнитного поля: КОЕ клеток *E. coli*, инкубируемых на среде с магнитным изотопом магния ^{25}Mg , было выше в 4 раза, чем КОЕ бактерий, культивируемых на среде с немагнитными ^{24}Mg и ^{26}Mg изотопами, в постоянных магнитных полях 76-85 мТл. Совместный эффект магнитного поля и магнитного изотопа цинка ^{67}Zn был зарегистрирован в ПМП 25-35 мТл в количестве КОЕ бактерий. В этом же диапазоне магнитное поле и магнитный изотоп магния ^{25}Mg стимулировали образование биоплёнок бактериями *E. coli*.

4. Слабые постоянные магнитные поля 0,8-10 мТл повышают жизнеспособность бактериальной культуры независимо от типа изотопа магния или цинка в питательной среде.

5. Обнаружено проявление внутриклеточного ионного синергизма в бактериях *E. coli* в зависимости от содержащегося в среде изотопа магния или цинка. Так, в присутствии магнитного изотопа магния ^{25}Mg изменяется внутриклеточная концентрация двухвалентных ионов Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , а также Na,

К, Р, S. Внутриклеточное содержание Na, K, Zn и Mn изменяется для бактерий, выращенных на среде с магнитным изотопом магния ^{25}Mg во внешнем постоянном магнитном поле 76 мТл.

6. Доказана магнитная чувствительность концентрации АТФ в бактериях *E. coli*. Пул АТФ повышается в 2–3 раза только для тех микроорганизмов, которые были выращены на среде M9 с магнитным изотопом магния ^{25}Mg в постоянных магнитных полях 70–95 мТл. В этом диапазоне также были обнаружены совместные эффекты постоянных магнитных полей и магнитных изотопов ^{25}Mg и ^{67}Zn во внутриклеточном содержании элементов Na, Ca, Mg, P, участвующих в работе АТФ-аз бактерий.

7. Показано качественное совпадение экспериментальных магнитно-полевых зависимостей внутриклеточной концентрации АТФ и теоретических магнитно-полевых зависимостей констант скоростей роста, рассчитанных с использованием модели ион-радикальной спин-селективной ферментативной реакции с участием магнитного ядра изотопа.

Список использованных источников

1. Bowen H.J.M. Biological fractionation of isotopes // *Int J Appl Radiat & Isot.*, 1960, 7, 261–272
2. Buchachenko A.L., Kouznetsov D.A., Shishkov A.V. Spin biochemistry: magnetic isotope effect in the reaction of creatine kinase with CH_3HgCl // *J. Phys. Chem.*, 2004, 108, 707-710.
3. Buchachenko A.L., Kouznetsov D.A., Arkhangelsky S.E., Orlova M.A., Markaryan A.A. Spin biochemistry: magnetic ^{24}Mg - ^{25}Mg - ^{26}Mg isotope effect in mitochondrial ADP phosphorylation // *Cell Biochem. Biophys.*, 2005, 43, 243-252.
4. Buchachenko A.L., Kouznetsov D.A., Arkhangelsky S.E., Orlova M.A., Markaryan A.A. Magnetic isotope effect of magnesium in phosphoglycerate kinase phosphorylation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2005, 102, 10793-10796.
5. Buchachenko A.L., Kuznetsov D.A., Berdinsky V.L. New mechanisms of biological effects of electromagnetic fields // *Biophysics*, 2006, 51(3), 489-496.
6. Buchachenko A.L., Kouznetsov D.A. Magnetic field affects enzymatic ATP synthesis // *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 12868-12869.
7. Buchachenko A.L., Kuznetsov D.A. How mechanical energy of phosphorylating enzymes transforms into the energy of chemical bond? // *Mendeleev Commun.*, 2008, 18, 63-66.
8. Buchachenko A.L. *Magnetic Isotope Effect in Chemistry and Biochemistry*. Nova Science Publishers, New York, 2009.
9. Buchachenko A.L., Chekhonin V.P., Orlov A.P., Kouznetsov D.A. Zinc- related magnetic isotope effect in the enzymatic ATP synthesis: a medicinal potential of the nuclear spin selectivity phenomena // *Int. J. Mol. Med. Adv. Sci.*, 2010, 6, 34-37.
10. Buchachenko A.L., Kouznetsov D.A., Breslavskaya N.N. Ion-radical mechanism of enzymatic ATP synthesis: DFT calculations and experimental control // *J. Phys. Chem. B*, 2010, 114, 2287-2292.

11. Buchachenko A.L., Kuznetsov D.A., Breslavskaya N.N., Shchegoleva L.N., Arkhangelsky S.E. Calcium induced ATP synthesis: Isotope effect, magnetic parameters and mechanism // *Chem Phys Lett.*, 2011, 505, 130–134.
12. Buchachenko A.L., Kuznetsov D.A., Breslavskaya N.N. Chemistry of enzymatic ATP synthesis: an insight through the isotope window // *Chem. Rev.*, 2012, 112, 2042-2058.
13. Buchachenko A.L., Orlov A.P., Kuznetsov D.A., Breslavskaya N.N. Magnetic isotope and magnetic field effects on the DNA synthesis // *Nucleic Acids Res.*, 2013, 41, 8300-8308.
14. Buchachenko A.L., Orlov A.P., Kuznetsov D.A., Breslavskaya N.N. Magnetic control of the DNA synthesis // *Chem. Phys. Lett.*, 2013, 586, 138-142.
15. Buchachenko A.L. Mass-independent isotope effects // *J. Phys. Chem. B*, 2013, 117, 2231-2238.
16. Buchachenko A.L. *Magneto-Biology and Medicine*. Nova Science Publishers, New York, 2014.
17. Buchachenko A.L., Kouznetsov D.A. Magnetic control of enzymatic phosphorylation // *J. Phys. Chem. Biophys.*, 2014, 4, 142-151.
18. Buchachenko A.L. Magnetic field-dependent molecular and chemical processes in biochemistry, genetics and medicine // *Russ Chem Rev*, 2014, 83, 1–12.
19. Buchachenko A.L., Lawler R.G. New possibilities for magnetic control of chemical and biochemical reactions. // *Acc. Chem. Res.*, 2017, 50, 877-884.
20. Bukhvostov A.A., Dvornikov A.S., Ermakov K.V., Kurapov P.B., Kuznetsov D.A., Retinoblastoma case: shall we get A paramagnetic trend in chemotherapy? // *Arch. Canc. Res.*, 2017, 5, 158-160.
21. Bukhvostov A.A., Dvornikov A.S., Ermakov K.V., Kurapov P.B., Kuznetsov D.A., Retinoblastoma: magnetic isotope effects might make a difference in the current anti-cancer research strategy // *Acta Med.*, 2017, 60, 93-96.
22. Bukhvostov A.A., Dvornikov A.S., Ermakov K.V., Kurapov P.B., Kuznetsov D.A., Bivalent metal paramagnetics to suppress the DNA polymerase beta in human retinoblastoma cells. // *Int. J. Canc. Biol. Clin. Oncol.*, 2017, 1, 34-38

23. Bukhvostov A.A., Shatalov O.A., Buchachenko A.L., Kuznetsov D.A., $^{43}\text{Ca}^{2+}$ -Paramagnetic impact on DNA polymerase beta function as it relates to a molecular pharmacology of leukemias // *Der Pharm. Lett.*, 2013, 18–26.
24. Buchachenko A., Bukhvostov A., Ermakov K., Kuznetsov D. Nuclear spin selectivity in enzymatic catalysis: A caution for applied biophysics // *Arch Biochem Biophys*, 2019, 30, 667, 30-35.
25. Buchachenko A.L., Bukhvostov A.A., Ermakov K.V., Kuznetsov D.A. A specific role of magnetic isotopes in biological and ecological systems. Physics and biophysics beyond // *Prog Biophys Mol Biol*, 2020, 155, 1-19.
26. Amirshahi N., Alyautdin R., Sarkar S., Rezayat S., Orlova M., Trushkov I., Buchachenko A.L., Kuznetsov D.A. New porphyrin adduct: a promising nanotool for medicinal use // *Int. J. Nanosci.*, 2008, 7, 113–123.
27. S. Rezayat, S. Boushehri, B. Salmanian, A. Omidvari, S. Tarighat, S. Esmaeli, S. Sarkar, N. Amirshahi, R. Alyautdin, M. Orlova, I. Trushkov, A.L. Buchachenko, D.A. Kuznetsov, The porphyrin-fullerene nanoparticles to promote the ATP over production // *Eur. J. Med. Chem.* (2009) 44 1554–1569.
28. Amirshahi N., Alyautdin R., Sarkar S., Rezayat S., Orlova M., Trushkov I., Buchachenko A.L., Kuznetsov D.A. Fullerene-based low toxic particle to treat hypoxia // *Arch. Med. Res.*, 2008, 39, 549–559.
29. Buchachenko A.L., Nikiforov G.A. Isotope fractionation induced by magnetic interactions // *Dokl. Akad. Nauk. USSR* 1976.228, 379-382.
30. Бучаченко А.Л., Сагдеев Р.З., Салихов К.М. Магнитные и спиновые эффекты в химических реакциях / Под ред. Ю.Н.Молина. - Новосибирск: Наука, 1978.
31. Salikhov K.M., Molin Y.N., Sagdeev R.Z., Buchachenko A.L. Spin polarization and magnetic effects in radical reactions. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 1984. 419 p.
32. Osburn M.R., Dawson K.S., Fogel M.L., Alex L. Sessions fractionation of hydrogen isotopes by sulfate- and nitrate-reducing bacteria // *Front Microbiol*, 2016, 7, 1166
33. Katz J.J., Crespi H.L. Deuterated organisms: cultivation and uses // *Science*, 1966, 151, 1187–1194

34. Chakrabarti G., Kim S., Gupta M.L.J., Barton J.S., Himes R.H. Stabilization of tubulin by deuterium oxide // *Biochemistry*, 1999, 38, 3067–3072.
35. Cioni P., Strambini G.B. Effect of heavy water on protein flexibility // *Biophys J*, 2002, 82, 3246–3253.
36. Yang X.Y., Chen W.P., Rendahl A.K., Hegeman A.D., Gray W.M., Cohen J.D. Measuring the turnover rates of Arabidopsis proteins using deuterium oxide: an auxin signaling case study // *Plant J*, 2010, 63(4), 680–695.
37. Mosin O.V., Ignatov I. Isotope effects of deuterium in bacterial and microalgae cells at growth on heavy water (D₂O) // *Water Chem Eco*, 2012, 3, 83–94.
38. Mosin O., Ignatov I. Isotopic effects of deuterium in various biological objects as the cells of methylotrophic, chemoheterotrophic, photoorganotrophic microorganisms and green algae // *J Health Med Nurs*, 2015, 11, 99-122.
39. Mosin O., Ignatov I., Skladnev D., Shvets V. Studying of phenomenon of biological adaptation to heavy water // *Eur J Mol Biotechnol*, 2014, 6, 180–209.
40. Sideris E.G., Mukherjee R., Vomvoyanni V. Effect of deuterium water on the mitotic cycle, the deoxyribonucleic acid stability, and the frequency of radiation induced chromosome aberrations in barley // *Radiat Res*, 1975, 61, 457–467.
41. Vanatulu K., Paalme T., Vilu R., Burkhardt N., Jünemann R., May R., Rühl M., Wadzack J., Nierhaus K.H. Large-scale preparation of fully deuterated cell components: ribosomes from *Escherichia coli* with high biological activity // *Eur J Biochem*, 1993, 216, 315–321.
42. Berry D., Mader E., Lee T.K., Wuebken D., Wang Y., Zhu D., Palatinszky M., Schintlmeister A., Schmid M.C., Hanson B.T., Shterzer N., Mizrahi I., Rauch I., Decker T., Bocklitz T., Popp J., Gibson C.M., Fowler P.W., Huang W.E., Wagner M. Tracking heavy water (D₂O) incorporation for identifying and sorting active microbial cells // *P Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(2), E194–E203.
43. Crespi H.L. The isolation of deuterated bacteriorhodopsin from fully deuterated *Halobacterium halobium* // *Methods Enzymol*, 1982, 88, 3–5.

44. Creek D.J., Chokkathukalam A., Jankevics A., Burgess K.E.V., Breitling R., Barrett M.P. Stable isotope-assisted metabolomics for network-wide metabolic pathway elucidation // *Anal Chem*, 2012, 84(20), 8442–8447.
45. Mackay G.M., Zheng L., van den Broek N.J., Gottlieb E. Analysis of cell metabolism using LC-MS and isotope tracers // *Methods Enzymol*, 2015, 561, 171–196.
46. Zhang X., Gillespie A.L., Sessions A.L. Large D/H variations in bacterial lipids reflect central metabolic pathways // *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106, 12580–12586.
47. Mueller D., Heinzle E. Stable isotope-assisted metabolomics to detect metabolic flux changes in mammalian cell cultures // *Curr Opin Biotechnol*, 2013, 24(1), 54–59.
48. McCready R.G.L., Laishley E.J., Krouse H.R. The use of stable sulfur isotope labelling to elucidate sulfur metabolism by *Clostridium pasteurianum* // *Arch. Microbiol.*, 1976, 109, 315–317.
49. Surkov A., Böttcher M., Kuever J. Stable sulfur isotope fractionation during the reduction of thiosulfate by *Dethiosulfovibrio russensis* // *Arch Microbiol*, 2000, 174, 448–451.
50. Mueller D., Heinzle E. Stable isotope-assisted metabolomics to detect metabolic flux changes in mammalian cell cultures // *Curr Opin Biotechnol*, 2013, 24(1), 54–59.
51. McLauchlan K.A., Steiner U.E., The spin-correlated radical pair // *Mol. Phys.*, 1991, 73, 241-263.
52. Woodward J.R., Radical pairs in solution // *Prog. React. Kinet. Mech.*, 2002, 27, 165-207.
53. Buchachenko A.L., Experimental testing of molecular dynamic function of pairs by the isotope selectivity of radical recombination // *Russ. Chem. Bull.*, 1995, 44, 1571-1577.
54. Adam B., Sinayskiy I., Petruccione F. An open quantum system approach to the radical pair mechanism // *Sci. Rep.*, 2018, 8, 1-10.
55. Step E.N., Buchachenko A.L., Turro N.J. Magnetic effects in the photolysis of micellar solutions of phenacyl-phenylsulfone // *Chem. Phys.*, 1992, 162, 189-204.
56. Летуа У. Г. Магнитно-изотопные эффекты магния в клетках *E.coli* : диссертация кандидата физико-математических наук : 03.01.02 / Летуа Ульяна

- Григорьевна; [Место защиты: Саратов. гос. ун-т им. Н.Г. Чернышевского].- Оренбург, 2012.- 110 с.
57. Варфоломеев С. Д., Гуревич К. Г. Биокинетика. Практический курс М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999 —720с ил. ISBN 5-8183-0050-1.
58. Gerhardt Ph. Manual of methods for general bacteriology. Washington, WA: American Society for Microbiology, 1981. p 536.
59. Goldman E; Green LH. Practical Handbook of Microbiology. Second Edition. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor and Francis Group, 2008. p 864.
60. Reynolds J. 2015. "Serial Dilution Protocols".www.microbelibrary.org. Last accessed 15 November 2015.
61. Krupyanskii Y. F. Architecture of Nucleoid in the Dormant Cells of *Escherichia coli* // Russ. J. Phys. Chem. B 2021, 15, 326–343.
62. Frenkiel-Krispin D., Ben-Avraham I., Englander J., Shimoni E., Wolf S.G., Minsky A. Nucleoid restructuring in stationary-state bacteria // Mol Microbiol., 2004, 51(2), 395-405.
63. Krause K.M., Serio A.W., Kane T.R., Connolly L.E. Aminoglycosides: An Overview // Cold Spring Harb Perspect Med, 2016, 6, a02702.
64. Floss H.G., Yu T.W. Rifamycin-mode of action, resistance, and biosynthesis // Chem Rev., 2005, 105(2), 621-32.
65. Zhanel G.G., Wiebe R., Dilay L., Thomson K., Rubinstein E., Hoban D.J., Noreddin A.M., Karlowsky J.A. Comparative review of the carbapenems // Drugs., 2007, 67(7), 1027-52.
66. Spížek J., Řezanka T. Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications // Biochemical Pharmacology, 2017, 133, 20-28.
67. Spratt B.G. The mechanism of action of penicillin // Sci Prog., 1978, 65(257), 101-28.
68. Chopra I., Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance // Microbiol Mol Biol Rev., 2001, 65(2), 232-60.

69. Aldred K.J., Kerns R.J., Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance // *Biochemistry.*, 2014, 53(10), 1565-74.
70. Marshall W.F., Blair J.E. The cephalosporins // *Mayo Clin Proc.*, 1999, 74(2), 187-95.
71. МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам // *Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия*, 2004, 6(4), 306-359.
72. Merritt J.H., Kadouri D.E., O'Toole G.A. Growing and Analyzing Static Biofilms// *Curr. Protoc. Microbiol.*, 2005, 00(1), 1B.1.1-1B.1.17.
73. Hooper D.C., Jacoby G.A. Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance // *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 2016, 6(9), a025320.
74. Hopkins K.L., Davies R.H., Threlfall E.J. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments // *Int J Antimicrob Agents.*, 25(5), 358-73.
75. Loiko N., Danilova Y., Moiseenko A., Kovalenko V., Tereshkina K., Tutukina M., El-Registan G., Sokolova O., Krupyanskii Y. Morphological peculiarities of the DNA-protein complexes in starved *Escherichia coli* cells // *PLoS One*, 15(10), e0231562.
76. Ramirez M.S., Nikolaidis N., Tolmasky M.E. Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: the AAC(6')-Ib paradigm // *Front Microbiol*, 2013, 4, 121.
77. Ramirez M.S., Tolmasky M.E. Amikacin: uses, resistance, and prospects for inhibition // *Molecules*, 2017, 22, 2267–2290.
78. Li Y., Green K.D., Johnson B.R., Garneau-Tsodikova S. Inhibition of aminoglycoside acetyltransferase resistance enzymes by metal salts // *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59, 4148–4156.
79. Bock A.K., Glasemacher J., Schmidt R., Schönheit P. Purification and characterization of two extremely thermostable enzymes, phosphate acetyltransferase and acetate kinase, from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima* // *J Bacteriol*, 1999, 181, 1861–1867.

80. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications // *Antimicrob Resist*, 2002, 34, 482–492.
81. Bist P., Rao D.N. Identification and mutational analysis of Mg²⁺ binding site in EcoP15I DNA methyltransferase: involvement in target base eversion // *J Biol Chem*, 2003, 278, 41837–41848.
82. Andreini C., Bertini I., Cavallaro G., Holliday G.L., Thornton J.M. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles // *J Biol Inorg Chem*, 2008, 13, 1205–1218.
83. Andreini C., Bertini I., Cavallaro G., Holliday G.L., Thornton J.M. Metal-MACiE: a database of metals involved in biological catalysis // *Bioinformatics*, 2009, 25(16), 2088–2089.
84. Mingeot-Leclercq M.P., Glupczynski Y., Tulkens P.M. Aminoglycosides: Activity and resistance // *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43, 727–737.
85. Wilson D.N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance // *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12, 35–48.
86. Ramirez M.S., Tolmasky M.E. Aminoglycoside modifying enzymes // *Drug Resist Updat*, 2010, 13, 151–171.
87. Papp-Wallace K.M., Endimiani A., Taracila M.A., Bonomo R.A. Carbapenems: past, present, and future // *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(11), 4943-60.
88. Peter M. Hawkey, Mechanisms of q uinolone action and microbial response // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 51(1), 29–35.
89. Zhou G., Li L., Shi Q., Ouyang Y., Chen Y., Hu W. Efficacy of metal ions and isothiazolones in inhibiting *Enterobacter cloacae* BF-17 biofilm formation // *Can J Microbiol*, 2014, 60(1), 5–14.
90. Solano C., Echeverz M., Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing // *Curr Opin Microbiol.*, 2014, 18, 96-104.
91. Albuquerque W.W., Costa R.M., Fernandes Tde. S., Porto A.L. Evidences of the static magnetic field influence on cellular systems // *Prog Biophys Mol Biol.*, 2016, 121(1), 16-28.

92. Zhang X., Yarema K., Xu A. Biological effects of static magnetic fields Springer, Singapore ISBN: 978-981-10-3579-1 220 p.
93. Presman A.S. Electromagnetic Fields and Life. New York, NY: Springer Science+Business Media, 1970. p 336.
94. Blakemore R. Magnetotactic bacteria // Science, 1975, 190, 377–379.
95. Binhi V.N. Magnetobiology underlying physical problems. Tokyo, Japan: Academic Press, 2002. p 473.
96. Wiltschko W., Wiltschko R. Magnetic orientation and magnetoreception in birds and other animals // Journal of Comparative Physiology A, 2005, 191(8), 675-693.
97. Pazur A., Schimek C., Galland P. Magnetoreception in microorganisms and fungi // Central European Journal of Biology, 2007, 2(4), 597–659.
98. Schüler D. Magnetoreception and magnetosomes in bacteria. Vol. 3. Berlin, Germany: Springer, 2007. p 319.
99. Lohmann K.J. Q&A: Animal behaviour: Magnetic-field perception // Nature, 2010, 464(7292), 1140-1142.
100. Kimball G.C. The Growth of yeast in a magnetic field // J Bacteriol., 1938, 35(2), 109-22.
101. Lee F.W., Lee F.C. On the influence of a rotating magnetic field upon growth // Science, 1923, 58(1505), 352-353.
102. Gordon D.A. Sensitivity of the homing pigeon to the magnetic field of the earth // Science, 1948, 108(2817), 710-711.
103. Rosen A.D. Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems // Cell Biochem. Biophys, 2003, 39, 163–173.
104. Rosen A.D., Effect of a 125 mT static magnetic field on the kinetics of voltage activated Na⁺ channels in GH3 cells // Bioelectromagnetics, 2003, 24, 517–523.
105. Buffett B.A. Tidal dissipation and the strength of the Earth's internal magnetic field // Nature, 2010, 468, 952–954.
106. Gao W., Liu Y., Zhou J., Hongjun P. Effects of a strong static magnetic field on bacterium *Shewanella oneidensis*: an assessment by using whole genome microarray // Bioelectromagnetics, 2005, 26, 558–563.

107. Ji W., Huang H., Deng A., Pan C., Effects of static magnetic field on *Escherichia coli* // *Micron*, 2009, 40, 894–898.
108. Kohno M., Yamazaki M., Kimura I., Wada M. Effect of static magnetic fields on bacteria: *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* // *Pathophysiology*, 2000, 7, 143–148.
109. Morrow A.C., Dunstan R.H., King B.V., Roberts T.K., Metabolic effects of static magnetic fields on *Streptococcus pyogenes* // *Bioelectromagnetics*, 2007, 28, 439–445.
110. Potenza L., Ubaldi L., De Sanctis R., De Bellis R., Cucchiaroni L., Dachà M. Effects of static magnetic field on cell growth and gene expression in *Escherichia coli* // *Mutation Res.*, 2004, 561, 53–62.
111. Triampo W., Dounghawee G., Triampo D., Wong-Ekkabut J., Tang I.M. Effects of static magnetic field on growth of leptospire, *Leptospira interrogans* serovar canicola: immunoreactivity and cell division // *J. Biosci. Bioeng.*, 2004, 98, 182–186.
112. Ji W., Huang H., Deng A., Pan C. Effects of static magnetic fields on *Escherichia coli* // *Micron*, 2009, 40(8), 894-8.
113. Mousavian-Roshanzamir S., Makhdoumi-Kakhki A. The inhibitory effects of static magnetic field on *Escherichia coli* from two different sources at short exposure time // *Rep Biochem Mol Biol.*, 2017, 5(2), 112-116.
114. Stansell M.J., Winters W.D., Doe R.H., Dart B.K. Increased antibiotic resistance of *E. coli* exposed to static magnetic fields // *Bioelectromagnetics*, 2001, 22(2), 129-37.
115. Galland P., Pazur A. Magnetoreception in plants // *Journal of Plant Research*, 2005, 118(6), 371-389.
116. Horiuchi S., Ishizaki Y., Okuno K., Ano T., Shoda M. Drastic high magnetic field effect on suppression of *Escherichia coli* death // *Bioelectrochemistry*, 2001, 53, 149–153.
117. Yoshie S., Ikehata M., Hirota N., Takemura T., Minowa T., Hanagata N., Hayakawa T. Evaluation of mutagenicity and comutagenicity of strong static magnetic fields up to 13 Tesla in *Escherichia coli* deficient in superoxide dismutase // *J Magn Reson Imaging*, 2012, 35, 731–736.
118. Zhang Q.M., Tokiwa M., Doi T., Nakahara T., Chang P.W., Nakamura N., Hori M., Miyakoshi J., Yonei S. Strong static magnetic field and the induction of mutations

through elevated production of reactive oxygen species in *Escherichia coli* // Int J Radiat Biol, 2003, 79, 281–286.

119. Wackett L.P., Dodge A.G, Ellis L.B.M. Microbial genomics and the periodic table // Appl Environ Microbiol, 2004, 70, 647–655.

120. Nies D.H., Silver S. Molecular microbiology of heavy metals. Germany, Berlin Heidelberg: Springer Science & Business Media. 2007.

121. Bandaraa H.M.H.N., Nguyena D., Mogaralaa S., Osińskib M., Smyth H.D.C., Magnetic fields suppress *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and enhance ciprofloxacin activity // Biofouling, 2015, 31(5), 443-457,

122. Baltaci A.K., Yuce K., Mogulkoc R. Zinc metabolism and metallothioneins // Biol Trace Elem Res, 2018, 183(1), 22-31.

123. Salem A., Hafedh A., Rached A., Mohsen S., Khémaïs B.R. Zinc prevents hematological and biochemical alterations induced by static magnetic field in rats // Pharmacol Rep, 2005, 57(5), 616-622.

124. Vallee B.L., Coleman J.E., Auld D.S. Zinc fingers, zinc clusters, and zinc twists in DNA-binding protein domains // Proc Natl Acad Sci U S A., 1991, 88(3), 999-1003.

125. Christianson D.W., Lipscomb W.N. Carboxypeptidase A // Acc. Chem. Res. 1989, 22(2), 62–69

126. Matthews B.W., Weaver L. H. Binding of lanthanide ions to thermolysin // Biochemistry, 1974, 13(8), 1719-1725

127. Lu M., Fu D. Structure of the zinc transporter // Science, 2007, 317, 1746-1748.

128. Vallee B.L., Falchuk K.H. The biochemical basis of zinc physiology // Physiol. Rev., 1993, 73, 79-118.

129. Maret W. Zinc biochemistry, physiology, and homeostasis-recent insights and current trends // Biometals, 2001, 14, P.187-190.

130. Coleman J.E. Zinc proteins: Enzymes, storage proteins, transcription factors and replication proteins // Annu. Rev. Biochem., 1992, 61, 897-946.

131. Vallee B.L., Auld D.S. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins // Biochemistry, 1990, 29(24), 5647-59.

132. Hantke K. Bacterial zinc uptake and regulators // *Curr. Opin. Microbiol.*, 2005, 8, 196-202.
133. Moore C.M., Helman J. D. Metal ion homeostasis in *Bacillus subtilis* // *Curr. Opin. Microbiol.*, 2005, 8, 188-195.
134. Outten C.E., O'Halloran T.V. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis // *Science*, 2001, 292, 2488-2492.
135. Banci L. L., Bertini S., Ciofi-Baffoni L.A., Finnely C.E., Outten L., O'Halloran T.V. A new zinc-protein coordination site in intracellular metal trafficking: Solution structure of the Apo and Zn(II) forms of ZntA // *J. Mol. Biol.*, 2002, 323, 883-897.
136. Orlova M.A., Osipova E.Yu., Roumiantsev S.A. Effect of ⁶⁷Zn-Nanoparticles on Leukemic Cells and Normal Lymphocytes // *British Journal of Medicine & Medical Research*, 2012, 2(1), 21-30.
137. Weber J., Senior A.E. ATP synthase: what we know about ATP hydrolysis and what we do not know about ATP synthesis // *Biochim Biophys Acta*, 2000, 31, 1458(2-3):300-309.
138. Романовский Ю. М., Тихонов А. Н. Молекулярные преобразователи энергии живой клетки. Протонная АТФ-синтаза – вращающийся молекулярный мотор // *УФН*, 2010, **180**, 931–956.
139. Filipič J., Kraigher B., Tepus B., Kokol V., Mandic-Mulec I. Effects of low-density static magnetic fields on the growth and activities of wastewater bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida* // *Bioresource Technol.*, 2012, 120, 225–232.
140. Hunt R.W., Zavalin A., Bhatnagar A., Chinnasamy S., Das K.C. Electromagnetic biostimulation of living cultures for biotechnology, biofuel and bioenergy applications // *Int J Mol Sci.*, 2009, 10(10), 4515-58.
141. Crotty D., Silkstone G., Poddar S., Ranson R., Prina-Mello A., Wilson M., Coey J.M.D. Reexamination of magnetic isotope and field effects on adenosine triphosphate production by creatine kinase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2012, 109, 1437-1442.
142. Arkhangel'skii S.E., Karpov YuA., Glavin G.G., Kuznetsov D.A., Buchachenko A.L. Isotope catalysis and isotope analysis // *Russ. J. Phys. Chem. B*, 2013, 7, 8-10.

143. Schneider D.A., Gourse R.L. Relationship between growth rate and ATP concentration in *Escherichia coli*: a bioassay for available cellular ATP // J Biol Chem., 2004, 279(9), 8262-8.
144. Cole H.A., Wimpenny J.W., Hughes D.E. The ATP pool in *Escherichia coli*. I. Measurement of the pool using modified luciferase assay // Biochim Biophys Acta., 1967, 143(3), 445-53.
145. Nakanishi-Matsui M., Sekiya M., Futai M. ATP synthase from *Escherichia coli*: Mechanism of rotational catalysis, and inhibition with the ϵ subunit and phytopolyphenols // Biochim Biophys Acta, 2016, 1857(2), 129-140.
146. Smirnova D.V., Koltover V.K., Nosenko S.V., Strizhova I. A., Ugarova N. N. Firefly luciferase bioluminescence as a tool for searching magnetic isotope effects in ATP-dependent enzyme reactions // Moscow Univ. Chem. Bull., 2018, 73, 158–165.
147. Lomakina G.Y., Modestova Y.A., Ugarova N.N. Bioluminescence assay for cell viability // Biochemistry, 2015, 80(6), 701-713.
148. Ugarova N.N., Brovko L.Y., Trdatyan I.Y., Rainina E.I. Bioluminescent methods of analysis in Microbiology // Prikladnaya biochemiya i micriobiologiya, 1987, 23, 14–24.
149. Патент РФ № 2268943. Угарова Н.Н., Малошенок Л. Г., Мороз Н. А., Ломакина Г. Ю. 2004. Реагент для определения аденозин-5'-трифосфата.
150. Патент РФ № 2420594. Угарова Н.Н., Кокшаров М.И., Ломакина Г. Ю. 2009. Реагент для определения аденозин-5'-трифосфата.
151. Vinogradov A.D. Mitochondrial ATP synthase: fifteen years later // Biochemistry (Mosc)., 1999, 64(11), 1219-29.
152. Nath S. A. Novel conceptual model for the dual role of FOF1-ATP Synthase in cell life and cell death // Biomol Concepts., 2020, 11(1), 143-152.
153. Walker J.E. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown // Biochem Soc Trans., 2013, 41(1), 1-16.
154. Thoss F., Bartsch B. The geomagnetic field influences the sensitivity of our eyes // Vision Research, 2007, 47, 1036–1041.

155. Zenchenko T.A., Rekhtina A.G., Poskotinova L.V., Zaslavskaya R.M., Goncharov L.F. Comparative analysis of the response of microcirculation parameters and blood pressure to geomagnetic activity in healthy people // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2010, 152(4), 402–405.
156. Schenck J.F. Safety of strong, static magnetic fields // *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 2000, 12, 2–19.
157. Hartwig V., Giovannetti G., Vanello N., Lombardi M., Landini L., Simi S. Biological effects and safety in magnetic resonance imaging: a review // *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2009, 6, 1778–1798.
158. Rodgers C.T., Hore P.J. Chemical magnetoreception in birds: the radical pair mechanism // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(2), 353–360.
159. Erglis K., Wen Q., Ose V., Zeltins A., Sharipo A., Janmey P., Cebers, A. Dynamics of magnetotactic bacteria in a rotating magnetic field // *Biophys. J.*, 2007, 93, 1402e-1412.
160. Johnsen S., Lohmann K.J. The physics and neurobiology of magnetoreception // *Nature Reviews Neuroscience*, 2005, 6(9), 703–712.
161. Steiner U.E., Ulrich T. Magnetic field effects in chemical kinetics and related phenomena // *Chemical Reviews*, 1989, 89, 51–147.
162. Goodman E.M., Greenebaum B., Marron M.T. Effects of electromagnetic fields on molecules and cells // *Int Rev Cytol.* 1995;158:279-338. doi: 10.1016/s0074-7696(08)62489-4. PMID: 7721540.
163. Binhi V.N., Alipov Y.D., Belyaev I.Y. Effect of static magnetic field on *E. coli* cells and individual rotations of ion-protein complexes // *Bioelectromagnetics*, 2001, 22(2), 79-86.
164. Grissom Ch. B. Magnetic Field Effects in Biology: A Survey of Possible Mechanisms with Emphasis on Radical-Pair Recombination *Chemical Reviews* 1995 95 (1), 3-24
165. Binhi V.N., Prato F.S. A physical mechanism of magnetoreception: Extension and analysis // *Bioelectromagnetics*, 2017, 38(1), 41-52.

166. Hore P. J., Mouritsen H. The Radical-pair mechanism of magnetoreception // *Annu Rev Biophys*, 2016, 5(45), 299-344.
167. Mouritsen H., Ritz T. Magnetoreception and its use in bird navigation // *Curr Opin Neurobiol.*, 2005, 15(4), 406-14.
168. Montoya R.D. Magnetic fields, radicals and cellular activity // *Electromagn Biol Med.*, 2017, 36(1), 102-113.
169. Clites B.L., Pierce J.T. Identifying cellular and molecular mechanisms for magnetosensation // *Annu Rev Neurosci.*, 2017, 25;40, 231-250.
170. Scaiano J.C., Cozens F.L, McLean J. Model for the rationalization of magnetic field effects in vivo. Application of the radical-pair mechanism to biological system // *Photochem Photobiol.*,1994, 59(6), 585-9.
171. Turro N. J., Kraeutler B. Magnetic field and magnetic isotope effects in organic photochemical reactions. A novel probe of reaction mechanisms and a method for enrichment of magnetic isotopes // *Accounts of Chemical Research*, 1980, 13 (10), 369-377.
172. Villa M., Mustarelli P., Caprotti M. Biological effects of magnetic fields // *Life Sci.* 1991, 49(2), 85-92.
173. Binhi V.N., Savin A.V. Effects of weak magnetic fields on biological systems: physical aspects // *Physics-Uspekhi*, 2003, 46(3), 259-291.
174. Zhang X., Yarema K., Xu A. *Biological Effects of Static Magnetic Fields*. Springer, Singapore , 2017 - 220 p. ISBN 978-981-10-3579-1
175. Clites B.L., Pierce J.T. Identifying cellular and molecular mechanisms for magnetosensation // *Annu Rev Neurosci.*, 2017, 40, 231-250.
176. Lefèvre C.T., Bazylinski D.A. Ecology, diversity, and evolution of magnetotactic bacteria // *Microbiol Mol Biol Rev.*, 2013, 77(3), 497-526.
177. Lin W., Bazylinski D.A., Xiao T., Wu L.F., Pan Y. Life with compass: diversity and biogeography of magnetotactic bacteria // *Environ Microbiol.*, 2014, 16(9), 2646-2658.
178. Kirschvink J.L., Kobayashi-Kirschvink A., Woodford B.J. Magnetite biomineralization in the human brain// *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89, 7683–7687.

179. Scaiano J.C., Monahan S., Renaud J. Dramatic effect of magnetite particles on the dynamics of photogenerated free radicals // *Photochem Photobiol*, 1997, 65, 759–762.
180. Gajdardziska-Josifovska M., Schofield M.A., Robertson D., McClean R., Kean W.F., Sommer C. Botanical iron biominerals: electron diffraction and microscopy identification // *Microsc Microanal*, 2002, 8, 752–753.
181. McClean R.G., Kean W.F. Contributions of wood ash magnetism to archaeomagnetic properties of fire pits and hearths // *Earth Planet Sci Lett*, 1993, 119, 387–394.
182. McClean R.G., Schofield M.A., Kean W.F., Sommer C.V., Robertson D.P., Toth D., Gajdardziska-Josifovska M. Botanical iron minerals: correlation between nanocrystal structure and modes of biological self-assembly // *Eur J Mineral*, 2001, 13, 1235–1242.
183. Liboff A.R. Geomagnetic cyclotron resonance in living cells // *Biol Phys*, 1985, 9, 99–102.
184. Liboff A.R. Electric field ion cyclotron resonance // *Bioelectromagnetics*, 1997, 8, 85–87.
185. Liboff A.R., Cherng S., Jenrow K.A., Bull A. Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase activity is altered by 20 μ T magnetostatic fields // *Bioelectromagnetics*, 2003, 24, 2–38.
186. Sandweiss J. On the cyclotroc resonance model of ion transport // *Bioelectromagnetics*, 1990, 11, 203–205.
187. Durney C.H., Rushforth C.K., Anderson A.A. Resonant AC-DC magnetic fields: calculated response // *Bioelectromagnetics*, 1988, 9, 315–336.
188. Belyaev I.Y., Matronchik A.Y., Alipov Y.D. The effect of weak static magnetic and alternating magnetic fields on the genome conformational state of *E. coli* cells: the evidence for model of phase modulation of high frequency oscillations // In: Allen MJ (ed) *Charge and field effects in biosystems*, vol 4. World Scientific, Singapore, 1994, pp 174–184
189. Volpe P. Interactions of zero-frequency and oscillating magnetic fields with biostructures and Biosystems // *Photochem Photobiol Sci*, 2003, 2, 637–648.

190. Chatzidimitriou-Dreismann C.A., Braendas E.J. Proton delocalization and thermally activated quantum correlations in water: complex scaling and new experimental results // *Ber Bunsen Ges*, 1991, 95, 263–72.
191. Zhadin M.N., Fesenko E.E. Ionic cyclotron resonance in biomolecules // *Biomedical Science*, 1990, 1, 245–250.
192. Preparata G. *Coherence in matter*. World Scientific, Singapore 1995.
193. Del Giudice E., Fleischmann M., Preparata G., Talpo G. On the “unreasonable” effects of ELF magnetic fields upon a system of ions // *Bioelectromagnetics*, 2002, 23, 522–530.
194. Zhadin M.N. Combined action of static and alternating magnetic fields on ion motion in a macromolecule: theoretical aspects // *Bioelectromagnetics*, 1998, 19, 279–292.
195. Zhadin M.N. Review of Russian literature on biological action of DC and low-frequency AC magnetic fields // *Bioelectromagnetics*, 2001, 22, 27–45.
196. Zhadin M.N., Novikov V.V., Barnes F.S., Pergola N.F. Combined action of static and alternating magnetic fields on ionic current in aqueous glutamic acid solution // *Bioelectromagnetics*, 1998, 19, 41–45.
197. Pazur A. Characterization of weak magnetic field effects in an aqueous glutamic acid solution by nonlinear dielectric spectroscopy and voltammetry // *Biomagn Res Technol*, 2004, 2, 8–19.
198. Ponomarev O.A., Fesenko E.E. The properties of liquid water in electric and magnetic fields // *Biofizika*, 2000, 45, 389–398.
199. Mavromatos N.E. Quantum-mechanical coherence in cell microtubules: a realistic possibility? // *Bioelectrochem Bioenerg*, 1999, 48, 273–284.
200. Bieberich E. Probing quantum coherence in a biological system by means of DNA amplification // *BioSystems*, 2000, 57, 109–124.
201. Hoff A.J., Rademaker H., van Grondelle R., Duysens L.N.M. On the magnetic field dependence of the yield of the triplet state in reaction centers of photosynthetic bacteria // *Biochim Biophys Acta*, 1977, 460, 547–554.

202. Harkins T.T., Grissom C.B. Magnetic field effects on B12 ethanolamine ammonia lyase: evidence for a radical mechanism // *Science*, 1994, 263, 958–960.
203. Banerjee R. Radical carbon skeleton rearrangements: catalysis by coenzyme B12-dependent mutases // *Chemical Reviews*, 2003, 103(6), 2083–2094.
204. Toraya T. Radical catalysis in coenzyme B12-dependent isomerization (eliminating) reactions // *Chemical Reviews*, 2003, 103(6), 2095–2127.
205. Fontecave M., Ollagnier-de-Choudens S., Mulliez E. Biological radical sulfur insertion reactions // *Chemical Reviews*, 2003, 103(6), 2149–2166.
206. Möller A., Sagasser S., Wiltschko W., Schierwater B. Retinal cryptochrome in a migratory passerine bird: a possible transducer for the avian magnetic compass// *Naturwissenschaften*, 2004, 91, 585–588.
207. Mouritsen H., Janssen-Bienhold U., Liedvogel M., Feenders G., Stalleicken J., Dirks P., Weiler R. Cryptochromes and neuronal-activity markers colocalize in the retina of migratory birds during magnetic orientation // *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101, 14294–14299.
208. Giovani B., Byrdin M., Ahmad M., Brettel K. Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor // *Nat Struct Biol*, 2003, 6, 489–490.
209. Rodgers C.T. Magnetic field effects in chemical systems // *Pure Appl Chem.*, 2009, 81, 19–43.
210. Блум К. Теория матрицы плотности и ее приложения, М.: Мир, 1983. - 248 с.
211. Sampson C., Keens R.H., Kattnig D.R. On the magnetosensitivity of lipid peroxidation: two- versus three-radical dynamics // *Phys Chem Chem Phys.*, 2019, 21(25), 13526-13538.
212. Wagner-Rundell N. Electron spin relaxation effects on radical recombination reactions in weak magnetic fields. A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy, 2008, University of Oxford, 320 p
213. Pileio G. Relaxation theory of nuclear singlet states in two spin-1/2 systems // *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 2010, 56(3), 217–231.
214. Levitt MH. Singlet nuclear magnetic resonance // *Annual Review of Physical Chemistry*, 2012, 63, 89–105.

215. Buchachenko A.L., Lukzen N., Pedersen B. On the magnetic field and isotope effects in enzymatic phosphorylation // *Chem Phys Lett*, 2007, 434, 139–143.
216. Pedersen B., Mojazaa M., Lukzen N.N. The effect of dipolar interaction on the magnetic isotope effect // *Chemical Physics Letters*, 2010, 496, 212–216.
217. Arifullin M.R., Berdinskii V.L. Spin states of multielectron systems and the action of multi-spin bans // *Russ J Phys Chem A*, 2013, 87, 1186–1190.
218. Brocklehurst B. Magnetic field and radical reactions: Recent developments and their role in nature // *Chem Soc Rev*, 2002, 31, 301–311.
219. Бучаченко А.Л., Вассерман А.М., Стабильные радикалы. Электронное строение, реакционная способность и применение. М., 1973. 408 с
220. Yan L., Zhu Y., He S., Cao Z. Effect of static magnetic field on activity of immobilized α -amylase // *Chin Sci Bull*, 1997, 42, 127–130.
221. Gemishev O., Dimova P., Panova N., Evstatieva Y. Effect of static magnetic field on synthesis of endoglucanase by *trichoderma reesei*-M7 // *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2009, 2013, 848–851.
222. Celik O., Büyükuslu N., Atak C., Rzakoulieva A. Effects of magnetic field on activity of superoxide dismutase and catalase in *glycine max* (L.) Merr. Roots. // *Polish Journal of Environmental Studies*, 2009, 18(20), 175–182.
223. Atak C., Celik O., Olgun A., Alikamanoglu S., Rzakoulieva A. Effect of magnetic field on peroxidase activities of soybean tissue culture // *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2014, 21, 166–171.
224. Miyakoshi J. Effects of static magnetic fields at the cellular level // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2005, 87, 213–222.

Список публикаций автора в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах Web of Science, Scopus, RSCI, РИНЦ

1. **Шевченко У.Г.**, Бердинский В.Л. Ферментативные процессы как механизм биологической магниторецепции // Химическая физика. 2011, Т. 30, № 6, С. 78-83. Переводная версия: **Shevchenko U.G.**, Berdinskii V.L. Enzymic processes as a mechanism of biological magnetoreception // Russian Journal of Physical Chemistry B, 2011, 5(3), P. 519-524. [DOI: 10.1134/S1990793111020230](https://doi.org/10.1134/S1990793111020230) **SJR=0.266²**
2. Кольтовер В.К., **Шевченко У.Г.**, Авдеева, Ройба Е.А., Бердинский В.Л., Кудряшова Е.А. Магнитно-изотопный эффект магния в живой клетке // Доклады Академии Наук, 2012, Т. 442, № 2, С. 272. Переводная версия: Koltover V.K., **Shevchenko U.G.**, Avdeeva L.V., .Berdinsky V.L., Kudryashova E.A. Magnetic-isotope effect of magnesium in the living cell // Doklady Biochemistry and Biophysics, 2012, 442(1), P. 12–14 [DOI: 10.1134/S1607672912010048](https://doi.org/10.1134/S1607672912010048) **SJR = 0.263**
3. **Шевченко У.Г.**, Авдеева Е.И., Бердинский В.Л. Биологические эффекты магнитного изотопа магния ²⁵Mg в клетках *E. coli* // Химическая физика, 2012, Т. 31, № 7, С. 62. Переводная версия: **Shevchenko, U.G.**, Avdeeva E.I., Berdinskii V.L. Biological effects of the ²⁵Mg magnetic isotope in *E. coli* cells // Russian Journal of Physical Chemistry B, 2012, 6(4), P. 531–537. [DOI: 10.1134/S1990793112040069](https://doi.org/10.1134/S1990793112040069) **SJR =0.266**
4. **Легута У.Г.**, Авдеева Е.И., Бердинский В.Л. Магнитно-полевые эффекты в бактериях *E. coli* в присутствии изотопов Mg // Известия наук. Серия химическая, 2014, № 5, С. 1102. Переводная версия: **Letuta U.G.**, Avdeeva E.I., Berdinsky V.L. Magnetic field effects in bacteria *E. coli* in the presence of Mg isotopes // Russian Chemical Bulletin, 2014, 63(5), P. 1102–1106. [DOI: 10.1007/s11172-014-0555-1](https://doi.org/10.1007/s11172-014-0555-1) **SJR = 0.268**
5. **Легута У. Г.**, Бердинский В.Л. Ферментативные механизмы биологической магниточувствительности: эффекты ядерного спина // Известия Академии наук.

² Приведен показатель SJR (<https://www.scopus.com/>)

Серия химическая, 2015, № 7, С. 1547-1551. Переводная версия: **Letuta U.G., Berdinskii V.L.** Enzymatic mechanisms of biological magnetic sensitivity: Nuclear spin effects // *Russian Chemical Bulletin*, 2015, 64(7), P. 1547–1554 [DOI: 10.1007/s11172-015-1039-7](https://doi.org/10.1007/s11172-015-1039-7) **SJR = 0.268**

6. **Легута У. Г.,** Веккер А. С., Корнилова Т. А., Грязнов А. А., Чеплаков И. А. Магнитно-изотопное влияние магния ^{25}Mg на резистентность бактерий *E. coli* к антибиотикам // Доклады академии наук, 2016, Т. 469(4), С. 501-503. Переводная версия: **Letuta U.G., Vekker A.S., Kornilova T.A., Gryaznov A.A., Cheplakov I.A.** Magnetic isotope effect of magnesium ^{25}Mg on *E. coli* resistance to antibiotics // *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2016, 469(1), P. 281–283 [DOI: 10.1134/S1607672916040128](https://doi.org/10.1134/S1607672916040128) **SJR = 0.263**

7. **Легута У. Г.,** Авдеева Е. И. Магнитно-зависимый пул аденозитрифосфата в бактериях *E. coli* // Доклады академии наук, 2017, Т. 474, № 3, С. 378-381. Переводная версия: **Letuta U.G., Avdeeva E.I.** Magnetic-dependent ATP pool in *Escherichia coli* // *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2017, 474(1), P. 196–199. [DOI: 10.1134/S1607672917030085](https://doi.org/10.1134/S1607672917030085) **SJR = 0.263**

8. **Letuta U.G., Berdinskiy V.L., Udagawa C., Tanimoto Y.** Enzymatic mechanisms of biological magnetic sensitivity // *Bioelectromagnetics*, 2017, 38(7), P. 511–521. [DOI: 10.1002/bem.22071](https://doi.org/10.1002/bem.22071) **SJR = 0.435**

9. **Легута У. Г.,** Легута С. Н., Бердинский В. Л. Влияние слабых магнитных полей и изотопов магния на бактерии *E. coli* // Биофизика, 2017, Т.62(6), С. 1134-1141. Переводная версия: **Letuta U.G., Letuta S.N., Berdinskiy V.L.** The Influence of low magnetic fields and magnesium isotopes on *E. coli* Bacteria // *Biophysics (Russian Federation)*, 2017, 62(6), P. 935–941. [DOI: 10.1134/S0006350917060112](https://doi.org/10.1134/S0006350917060112) **SJR = 0.198**

10. **Letuta U.G., Berdinskiy V.L.** Magnetosensitivity of bacteria *E. coli*: Magnetic isotope and magnetic field effects // *Bioelectromagnetics*, 2017, 38(8), P. 581–591 [DOI: 10.1002/bem.22073](https://doi.org/10.1002/bem.22073) **SJR = 0.435**

11. **Легута У. Г.,** Шайлина Д. М. Магниточувствительность бактерий *E.coli* в присутствии изотопов цинка // Доклады Академии наук, 2018, Т. 479, № 5, С. 585-588. Переводная версия: **Letuta U.G., Shailina D.M** Magnetosensitivity of *E. coli*

Bacteria in the Presence of Zinc Isotopes// Doklady Biochemistry and Biophysics, 2018, 479(1), P. 111–113. [DOI: 10.1134/S1607672918020175](https://doi.org/10.1134/S1607672918020175) **SJR = 0.263**

12. Лету́та У. Г., Бердинский В. Л. Влияние магнитного поля и изотопов цинка на колониобразующую способность и элементный состав бактерий *E. coli* // Известия Академии наук. Серия химическая, 2018, № 9, С. 1732-1737. Переводная версия: **Letuta U.G., Berdinskiy V.L.** Effects of the magnetic field and zinc isotopes on the colony forming ability and elemental composition of *E. coli* bacterial cells // Russian Chemical Bulletin, 2018, 67(9), P. 1732–1737. [DOI: 10.1007/s11172-018-2283-4](https://doi.org/10.1007/s11172-018-2283-4) **SJR = 0.268**

13. **Letuta U.G., Berdinskiy V.L.** Biological effects of static magnetic fields and zinc isotopes on *E. coli* bacteria // Bioelectromagnetics, 2019, 40(1), P. 62–73 [DOI: 10.1002/bem.22162](https://doi.org/10.1002/bem.22162) **SJR = 0.435**

14. Лету́та У. Г., Тихонова Т. А. Влияние магнитных полей и магнитного изотопа ^{25}Mg на образование биопленок бактериями *E. coli* // Доклады Академии наук, 2019, Т. 484, № 6, С. 768-771. Переводная версия: **Letuta U.G., Tikhonova T.A.** Magnetic fields and magnetic isotope ^{25}Mg effects on biofilms formation by bacteria *E. coli* // Doklady Biochemistry and Biophysics, 2019, 484(1), P. 85–87 [DOI: 10.1134/S160767291901023X](https://doi.org/10.1134/S160767291901023X) **SJR = 0.263**

15. **Letuta U.G., Tikhonova T.A.** The magnetic isotopes effect of magnesium ^{25}Mg on the physiological properties of bacteria *E. coli* // Journal of Physics: Conference Series, 2020, 1443(1), 012016. [DOI: 10.1088/1742-6596/1443/1/012016](https://doi.org/10.1088/1742-6596/1443/1/012016) **SJR = 0.210**

16. **Letuta U.G.** Magnetic isotopes of ^{25}Mg and ^{67}Zn and magnetic fields influence on adenosine triphosphate content in *Escherichia coli* // Journal of Physics: Conference Series, 2020, 1443(1), 012015. [DOI: 10.1088/1742-6596/1443/1/012015](https://doi.org/10.1088/1742-6596/1443/1/012015) **SJR = 0.210**

17. Лету́та У. Г., Биндер А. С., Тихонова Т. А. Влияние изотопов магния на чувствительность бактерий *E. coli* к антибиотикам // Микробиология, 2020, Т. 89, № 3, С. 284-289. Переводная версия: **Letuta U.G., Binder A.S., Tikhonova T.A.** Effect of magnesium isotopes on antibiotic sensitivity of *E. coli* // Microbiology (Russian Federation), 2020, 89(3), P. 273–277. [DOI: 10.1134/S0026261720030091](https://doi.org/10.1134/S0026261720030091) **SJR = 0.352**

18. **Letuta U.G.** Combined effect of magnesium isotopes and antibiotics on morphology of *E. coli* // Journal of Physics: Conference Series, 2020, 1611(1), 012021. [DOI: 10.1088/1742-6596/1611/1/012021](https://doi.org/10.1088/1742-6596/1611/1/012021) **SJR =0.210**
19. **Letuta U.G.** Magnesium magnetic isotope effects in microbiology // Archives of Microbiology, 2021, 203(5), 1853-1861. [DOI: 10.1007/s00203-021-02219-4](https://doi.org/10.1007/s00203-021-02219-4) **SJR = 0.648.**

Список публикаций автора в рецензируемых научных изданиях РИНЦ без импакт-фактора

1. Авдеева Е.И., **Летуца У.Г.** Влияние магнитного поля на колониобразующую способность *Escherichia coli* в присутствии изотопов магния // Вестник ОГУ, 2015, № 13, С. 98-102.
2. **Letuta U.G.**, Shailina D.M. Sensitivity of *E. coli* cells to low static magnetic fields // Актуальные вопросы биологической физики и химии, 2018, Т. 3, № 1, С. 98-104.

Патенты

1. Пат. 2499042 РФ, Способ изотопного обогащения клеток *E.coli* / **Шевченко У. Г.**, Карандашев В. К., Авдеева Е. И., Бердинский В. Л., Алиджанов Э. К.; опубл. 20.11.2013, Бюл. № 32. – 6 с.
2. Пат. 2476593 РФ, Способ повышения продуктивности микроорганизмов *E.coli* / **Шевченко У. Г.**, Бердинский В. Л., Авдеева Е. И., Алиджанов Э. К.; опубл. 27.02.2013, Бюл. № 6. – 9 с.

Тезисы международных и всероссийских конференций

1. **Shevchenko U.G.** Spin-depended enzymatic processes as the origin of biological magnetoreception // The 12th International Symposium on Spin and Magnetic Field Effects in Chemistry and Related Phenomena "Spin Chemistry Meeting 2011", Noordwijk, Netherlands, 2011. - P. 110.

2. Royba E.A., **Shevchenko U.G.**, Brudastov Yu.A. *Escherichia coli* - test-organism for studying of biological magnetic isotope effects // The 12th International Symposium on Spin and Magnetic Field Effects in Chemistry and Related Phenomena "Spin Chemistry Meeting 2011", Noordwijk, Netherlands, 2011. - P. 108.
3. **Шевченко У.Г.** Биологические магнитно-полевые и магнитно-изотопные эффекты магния // Сб. тезисов XXIII симпозиума "Современная химическая физика". - 2011. - С. 143.
4. **Shevchenko U.**, Berdinskiy V., Avdeeva E. Biological magnesium magnetic isotope and magnetic field effects on *E. coli* cells // Proc. of The 4th International conference on Magneto-science. - 2011. - P. 50.
5. **Shevchenko U. G.**, Avdeeva E. I., Berdinskiy V. L. Biological magnetic izotope and magnetic field effects of Mg^{2+} and Zn^{2+} on *E. coli* cells // Physics and Chemistry of Elementary Chemical Processes: book of abstracts VIII International Voevodsky conference, 15-19 July 2012, Novosibirsk - С. 70.
6. **Shevchenko U. G.**, Berdinskiy V. L. Electron transfer enzymatic processes and their role in biological magnetoreception // Magnetic Resonance and Magnetic Phenomena in Chemical and Biological Physics: The School for Young Scientists, 16-21 July 2012, Novosibirsk/ Institute of Chemical Kinetics and Combustion, SB RAS International Tomography Center, SB RAS. - 2012. - С. 44.
7. **Легута У. Г.** Биологические эффекты магнитных изотопов ^{25}Mg и ^{67}Zn в бактериях *E. coli* / Легута У. Г., Авдеева Е. И. // Современная химическая физика : сб. аннот. XXV конф. 20 сент.-1 окт. 2013 г., Туапсе. - С. 39.
8. Авдеева Е. И., **Легута У. Г.** Магнитно-полевые эффекты изотопа цинка ^{67}Zn и магния ^{25}Mg в бактериальных клетках // Современная химическая физика: сб. аннот. XXV конф. 20 сент.-1 окт. 2013 г., Туапсе. - С. 52.
9. Avdeeva E. I., **Letuta U. G.**, Berdinskiy V. L. Magnetic field effects in *E.coli* cells in the presence of the isotope Mg // Российско-японская конференция «Химическая физика молекул и полифункциональных материалов»: материалы конф., 29-31 окт. 2014 г./ Orenburg State University; Hiroshima University., 2014. - С. 19.

10. **Легута У. Г.**, Авдеева Е. И., Бердинский В. Л. Магнитные эффекты в бактериальных клетках *E. coli* // Современная химическая физика: сб. XXVI симп. 20 сент.-1 окт. 2014 г., Туапсе. - С. 96-97.
11. **Letuta U. G.**, Avdeeva E. I., Berdinskiy V. L. Magnetic spin effects in bacteria *E. coli* // The 14th International Spin Chemistry meeting : book of abstracts / Saha institute of Nuclear Physics, Kolkata, India. - 2015. - С. 65.
12. **Letuta U. G.**, Vekker A. S., Kornilova T. A., Gryaznov A. A. Spin effects of Mg isotopes on antibiotic resistance of *E. coli* // The 14th International Spin Chemistry meeting : book of abstracts / Saha institute of Nuclear Physics, Kolkata, India. - 2015. - С. 64.
13. **Легута У. Г.**, Грязнов А. А., Веккер А. С., Корнилова Т. А., Чеплаков И. А. Антибиотикорезистентность *E. coli* в присутствии магнитного и немагнитных изотопов магния // Современная химическая физика: сб. тез. XXVII симп. 20 сент.-1 окт. 2015 г., Туапсе. - С. 257.
14. Авдеева Е. И., **Легута У. Г.**, Бердинский В. Л. Магнитно-полевые и магнитно-изотопные эффекты ^{25}Mg на кинетику роста бактериальных клеток *E. coli* // V съезд биофизиков России : материалы докл. : в 2 т. - Ростов-на-Дону, 2015. - Т. 2. - С. 273.
15. Авдеева Е. И., **Легута У. Г.**, Бердинский В. Л. Магнитно-полевые эффекты изотопа магния ^{25}Mg в бактериальных клетках // Современная химическая физика : сб. аннот. XXVII симп. 20 сент.-1 окт. 2015 г., Туапсе. - С. 48.
16. Vekker A. S., **Letuta U. G.** Magnetic isotope effect of ^{25}Mg in the bacterial resistance of *Escherichia coli* to quinolones/fluoroquinolones antibiotics // The 13th Nano Bio Info Chemistry Simposium and The 8th Japanese-Russian Seminar on Chemical Physics of Molecules and Polyfunctional Materials Program : abstract book / Hiroshima University., 2016. - P. 5.
17. **Letuta U. G.**, Avdeeva E. I. Magnetic-dependent ATP pool in *E. coli* // The 13th Nano Bio Info Chemistry Simposium and The 8th Japanese-Russian Seminar on Chemical Physics of Molecules and Polyfunctional Materials Program : abstract book / Hiroshima University., 2016. - P. 4.

18. Авдеева Е. И., **Лету́та У. Г.** Магнитно-зависимый пул АТФ в бактериях *E. coli* // Современная химическая физика : сб. тез. XXVIII симп. 19-30 сент. 2016 г., Туапсе. - С. 273.
19. Веккер А. С., **Лету́та У. Г.** Магнитно-изотопный эффект ^{25}Mg в резистентности бактерий *Escherichia coli* к антибиотикам группы хинолонов // Современная химическая физика : сб. тез. XXVIII симп. 19-30 сент. 2016 г., Туапсе. - С. 178.
20. **Letuta U.**, Shailina D., Berdinskiy V. Magneto-sensitivity of bacterial cells *E. coli* // ICMS: proceedings of 7th. International Conference on Magneto-Scienc, oct. 23-27 2017 г., Reims, Franct / Universiti de Reims Champagne-Ardenne. - Reims, 2017. - С. 18-19.
21. **Letuta U.**, Kornilova T., Binder A. Magnetic isotope effects of magnesium ^{25}Mg in resistance of *-E coli* to antibacterial drugs // ICMS: proceedings of 7th. International Conference on Magneto-Scienc, oct. 23-27 2017 г., Reims, Franct / Universiti de Reims Champagne-Ardenne. - Reims, 2017.- С. 75.
22. . Berdinskiy V. L, **Letuta U. G.**, Tanimoto Y., Udagava C. Spin dependent biological magnetosensitivity // ICMS: proceedings of 7th. International Conference on Magneto-Scienc, oct. 23-27 2017 г., Reims, Franct / Universiti de Reims Champagne-Ardenne. - Reims, 2017. - С. 39.
23. **Лету́та У. Г.** Магниточувствительность бактерий *E. coli* // Современная химическая физика : сб. тез. XXIX симп. 17-28 сент. 2017 г., Туапсе. - С. 75.
24. **Letuta U. G.** Magnetic effects on elemental composition of bacterial cells *E. coli* // Chemical Physics of Molecules and Polyfunctional Materials : proceedings of Russian-Japanese conference, oct. 30-31 2018 г., Orenburg / Orenburg State University; Hiroshima University. - С. 36.
25. Tikhonova T. A., **Letuta U. G.**, Tkachenko E. A. Magnetic fields and magnetic isotope ^{25}Mg effects in biofilms formation by *E. coli* bacteria // Chemical Physics of Molecules and Polyfunctional Materials : proceedings of Russian-Japanese conference, oct. 30-31 2018 г., Orenburg - С. 77.

26. Бердинский В. Л., **Легута У. Г.**, Шан Пен, Дачуан Ин, Илангован Р. Спинозависимые механизмы биологической ферментивной магниточувствительности // Современная химическая физика: сб. тез. XX Симп., 16-27 сент. 2018 г., Туапсе - С. 44 .
27. **Легута У. Г.**, Тихонова Т. А. Влияние изотопов магния на физиологические свойства бактерий *E. coli* // Физико-технические проблемы в науке, промышленности и медицине (ФТПНПМ-2019) : сб. науч. тр. Междунар. науч.-практ. конф, 30 сент.- 4 окт. 2019 г., Томск - С. 135..
28. **Легута У. Г.** Влияние магнитных изотопов магния и цинка на концентрацию АТФ *in vivo* // Физико-технические проблемы в науке, промышленности и медицине (ФТПНПМ-2019) : сб. науч. тр. Междунар. науч.-практ. конф, 30 сент.- 4 окт. 2019 г., Томск - С. 136.
29. **Легута У. Г.**, Тихонова Т. А. Влияние магнитных моментов магния ^{25}Mg на резистентность бактерий к антибиотикам широкого спектра действия // Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2019 : материалы XIV Междунар. науч. конф., посвящ 60-летию каф. биофизики физич. фак. МГУ им. М. В. Ломоносова, 21- 24 нояб. 2019 г., Москва - С. 95.
30. Тихонова Т. А., **Легута У. Г.** Влияние магнитных полей и магнитного изотопа ^{25}Mg на образование биопленок бактериями // VI Съезд биофизиков России: сб. науч. тр., 16 сент.- 21 сент. 2019 г., Сочи : в 2 т. - Т. 1. - С. 194.
31. **Легута У. Г.** Управление синтезом АТФ с помощью слабых магнитных полей и магнитных изотопов ^{25}Mg и ^{67}Zn *in vivo* // VI Съезд биофизиков России: сб. науч. тр., 16 сент.- 21 сент. 2019 г., Сочи : в 2 т. - Т. 2. - С. 50-51.
32. **Letuta U. G.** Control of bacterial sensitivity to quinolones by magnetic magnesium // Физико-технические проблемы в науке, промышленности и медицине. Российский и международный опыт подготовки кадров: сб. тез. докл. X Междунар. науч.-практ. конф., 9-11нояб. 2020 г., Томск - С. 99-100.
33. **Letuta U. G.** Improving fluoroquinolones effectiveness with magnesium izotope ^{25}Mg // Изотопы: технологии, материалы и применение : сб. тез. докл. VI

Междунар. науч. конф. молодых ученых, аспирантов и студентов, 26-29 окт. 2020 г., Томск - Р. 97.

34. Летуа У. Г. Потенцирование хинолонов с помощью магнитного изотопа магния ^{25}Mg // Современная химическая физика: сб. тез. XXXII Симпозиума, 19-28 сент. 2020 г., Туапсе., 2020. - С. 142.

35. Бердинский В. Л., Каепкулова Э. И., Летуа У. Г. Сверхтонкое взаимодействие в молекулярных ферментативных комплексах // Современная химическая физика: сб. тез. XXXII Симпозиума, 19-28 сент. 2020 г., Туапсе., 2020 - С. 93.

Благодарности

За помощь в проведении экспериментов автор благодарен студентам и аспирантам кафедры биофизики и физики конденсированного состояния Оренбургского государственного университета Авдеевой Е. И., Биндер А. С., Тихоновой Т. А., Грязнову А. А. За проведение элементного и изотопного анализа автор благодарит к.х.н. Карандашева В. К. и сотрудников Аналитического сертификационного испытательного центра Института проблем технологии микроэлектроники и особочистых материалов РАН (АСИЦ ИПТМ РАН). Особую благодарность автор выражает заведующему кафедрой биофизики и физики конденсированного состояния Оренбургского государственного университета Бердинскому В.Л. за творческое вдохновение, всестороннюю поддержку, терпение и помощь на всех этапах работы.

Значительное влияние на автора и его научный путь оказали работы и смелые идеи основоположника магнитной изотопии в химии и биохимии – академика Бучаченко А. Л. Автор искренне благодарен ему за конструктивные вопросы и плодотворное обсуждение.