

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию на соискание ученой степени

доктора физико-математических наук Летуты Ульяны Григорьевны

на тему: «Магнитно-изотопные эффекты в бактериях *E. coli*»

по специальности 1.5.2. - «Биофизика» (03.01.02 – «Биофизика»)

Диссертационная работа У.Г. Летуты посвящена исследованию влияния изотопов с ненулевым ядерным спином ("магнитных изотопов") и внешних магнитных полей на ряд свойств одноклеточной бактерии *Escherichia coli* и происходящих в ней процессов. Фактически это работа по выявлению функционирования в клетках биохимических процессов, в которые вовлечены состояния радикальных пар (РП), т.е. взаимодействующих пар парамагнитных молекул, которые могут находиться в суммарном синглетном ($S = 0$) или триплетном ($S = 1$) состояниях. Присутствие в составе таких РП магнитных ядер или наличие внешних магнитных полей меняет пропорцию синглетных и триплетных состояний и таким образом влияет на выход продуктов реакций. Исследуемые в диссертации процессы хорошо изучены в случае широкого круга химических реакций. В последние годы они обнаружены также для ряда ферментативных реакций *in vitro*. Однако на целых организмах такие исследования ранее систематически не проводились, что позволяет считать работу У.Г. Летуты пионерской. В литературе известны многочисленные работы по изучению влияния постоянных магнитных полей на различные организмы. Как правило, эти работы носят чисто феноменологический характер и не несут под собой прочного теоретического фундамента. Представленную работу У.Г. Летуты выгодно отличает именно наличие надежно установленного (в рамках современного научного знания) механизма влияния магнитных полей. Необходимо отметить, что исследования эффектов магнитного поля представляют практический интерес, учитывая высокий уровень электромагнитного загрязнения в современных условиях. При этом поля в районе 50 Гц могут восприниматься быстрыми биохимическими реакциями

как постоянные. С этой точки зрения полученные в диссертационной работе результаты следует признать актуальными.

Диссертация У.Г. Летуты состоит из введения, описания результатов исследования, детального обсуждения результатов и заключительных выводов, и состоит из 6 глав. Список литературы насчитывает 224 наименования. Обзор литературных данных не вынесен в отдельную главу. Описание каждого нового исследования, проведенного У.Г. Летутой, предваряется обсуждением предшествующих работ в соответствующей области, что представляется вполне обоснованным.

Во Введении к диссертации рассматриваются сущность тех проблем, которые решаются в работе. Дается обоснование научной значимости решаемых проблем. Сформулированы цели и задачи исследования. Обсуждаются научная новизна поставленных задач, достоверность полученных результатов, научная и практическая значимость работы. Приводятся положения, выносимые на защиту.

Глава 1 посвящена изучению влияния изотопа ^{25}Mg с ядерным спином $I = 5/2$ на скорость роста клеток *E. coli* и их способность к образованию колоний после роста на среде, обогащенной этим изотопом. Эффекты ^{25}Mg исследованы в сравнении с немагнитными изотопами ^{24}Mg и ^{26}Mg для исключения кинетического изотопного эффекта. Впервые обнаружено статистически достоверное увеличение скорости роста клеток на 10 - 15% в присутствии магнитного изотопа, а также увеличение числа образуемых колоний в два раза. В ходе работы проводился необходимый подробный анализ элементного состава сред.

Во второй главе проведено исследование устойчивости *E. coli* к действию широкого ряда антибиотиков различных групп и влияния антибиотиков на морфологические параметры клеток в зависимости от изотопного состава ионов магния в среде. Также изучено влияние изотопного состава Mg на скорость роста клеток в присутствии антибиотиков и на способность образования бактериями биопленок. Обнаружено, что введение в среду изотопа ^{25}Mg для разных антибиотиков вызывает усиление или ослабление бактерицидного эффекта. Величина и знак влияния магнитного

изотопа сопоставлены с механизмом действия антибиотика на конкретные внутриклеточные процессы у *E. coli*. Для ряда антибиотиков обнаружен также синергизм влияния на морфологические параметры клеток антибиотика и магнитного изотопа магния.

В Главе 3 описываются результаты изучения воздействия на клетки бактерий постоянных магнитных полей в диапазоне 1,8 - 100 мТл. Исследовались следующие свойства: скорость роста бактерий, образование клеточных колоний, внутриклеточный элементный состав. Измерения проводили при различном изотопном составе среды и на двух средах различного состава, минимальной среде М9 и бульоне LB, богатом питательными веществами. Адекватный анализ результатов столь многофакторного эксперимента провести затруднительно, однако некоторые надежные результаты и выводы автору получить удалось. Так, впервые измерена зависимость скорости роста клеток от магнитного поля при выращивании на богатом бульоне. Обнаружено, что поля выше 50 мТл подавляют рост, а слабые (1,8 – 10 мТл), напротив, ускоряют. Способность к образованию колоний в этих условиях носит сложный немонотонный характер. В экспериментах в минимальной среде максимальный эффект магнитного поля на скорость роста зарегистрирован при 2,2 мТл. При этом на его величину влияет изотопный состав ионов магния в среде (максимум с ^{25}Mg). Обнаружено влияние выращивания клеток в магнитном поле на содержание таких важных внутриклеточных элементов как K, Na, S, P, Mg. Это свидетельствует о глубоком влиянии магнитного поля на метаболизм *E. coli*. Все полученные в третьей главе результаты подтверждают гипотезу о протекании в клетках реакций, в ходе которых одной из стадий является состояние радикальных пар.

Цинк является вторым после магния элементом по встречаемости в качестве кофактора в ферментативных реакциях. Как и в случае Mg, у Zn, среди прочих, имеется три стабильных изотопа ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn , из которых только ^{67}Zn имеет ненулевой ядерный магнитный момент $I = 5/2$. Из экспериментов с изолированными ферментами известно, что ^{67}Zn заметно влияет на их активность, увеличивая активность киназ и модифицируя

активность ДНК- и РНК-полимераз. Исходя из этого, в Главе 4 проведены эксперименты по влиянию изотопного состава цинка на свойства культуры *E. coli*. Как и в гл. 3, эти свойства исследованы также в магнитных полях диапазона 2,2 – 78 мТл с использованием минимальной среды. Изучены скорости роста бактерий, их способность к образованию колоний и изменение внутриклеточного содержания ряда основных химических элементов. Показано, что магнитный изотоп Zn и магнитные поля влияют на указанные свойства. Это является дополнительным доказательством участия стадии РП в биохимических процессах *E. coli*.

Влияние ядер с ненулевым спином и магнитных полей на протекание ферментативных реакций было впервые экспериментально продемонстрировано при исследовании синтеза АТФ изолированными митохондриями. АТФ - одна из важнейших молекул, участвующих во множестве биохимических процессов. Поэтому важно было проверить, сохраняется ли магнитная зависимость синтеза АТФ в целой клетке. Такой проверке посвящена Глава 5. Измерения концентрации АТФ проведены с помощью чувствительной люциферин-люциферазной реакции, на которую, как было показано ранее, не влияет изотопный состав Mg. Измеренная этим методом концентрация АТФ в клетках зависит от величины магнитного поля, в котором проводилось их выращивание. Как и во многих экспериментах, описанных в предыдущих главах, наиболее яркая полевая зависимость наблюдается в диапазоне 0 - 10 мТл. При выращивании клеток на средах с разным заданным изотопным составом Mg оказалось, что максимальные значения эффекта достигаются в разных точках поля. Аналогичные эксперименты, проведенные с изотопами Zn дали схожие результаты, однако максимальные значения синтеза в полях 2 - 4 мТл в случае магнитного изотопа значительно превосходили уровень АТФ, достигаемый для немагнитных изотопов Zn. На основе полученных данных сделан вывод о проявлении РП-стадии синтеза АТФ не только в экспериментах *in vitro*, но и в целых клетках.

В Главе 6 приведено обсуждение различных известных из литературы механизмов влияния магнитного поля на живые организмы. Сделан вывод,

что зависимость этих процессов от ядерного магнитного момента может возникать только в рамках механизма радикальных пар. Далее приводится теоретическая модель, описывающая магниточувствительность ферментативных процессов, протекающих с участием стадии РП. Для описания совместной химической и спиновой эволюции радикальных пар используется уравнение Лиувилля для спиновой матрицы плотности - широко распространенный подход к решению таких задач. Спиновая эволюция описывается гамильтонианом, входящим в это уравнение. Получены решения для двух видов гамильтониана - при отсутствии взаимодействия ядерных и электронных спинов (когда спиновая эволюция определяется разностью g -факторов партнеров РП) и при наличии сверхтонкого взаимодействия, но для случая слабых полей, когда разностью g -факторов можно пренебречь. В последнем случае принято упрощение о наличии в РП единственного магнитного ядра с $I = 1/2$. Это упрощение в таких задачах встречается достаточно часто; оно позволяет получить решение уравнения Лиувилля в аналитическом виде. Данное упрощение влияет на количественный результат, однако позволяет получить качественное описание процесса с допустимой надежностью и наглядностью. Полученная в рамках этого приближения зависимость выхода ферментативной реакции от магнитного поля хорошо описывает экспериментально полученные результаты предыдущих глав диссертации в слабых полях (1,8 – 10 мТл).

Оценивая в целом диссертацию У.Г. Летуты необходимо отметить очень большой объем проделанных исследований, высокую степень достоверности и надежности полученных результатов, аккуратную статистическую обработку данных. В некоторых экспериментах (например, в измерениях кривых роста бактерий) повторность достигала 100. Представленная работа является важным шагом в развитии нового перспективного научного направления – исследования чувствительности организмов к магнитным полям. Хотя такие эффекты были достаточно глубоко изучены *in vitro*, было совсем неочевидно, что их можно обнаружить *in vivo*, когда функционируют мощные системы поддержания гомеостаза

живого организма. Разработанные У.Г. Летутой подходы позволяют обнаруживать наличие стадий радикальной пары в ферментативных процессах живого организма, а также использовать физические факторы для регуляции этих процессов.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Материалы работы У.Г. Летуты достаточно полно отражены в 21 журнальной публикации автора и 35 тезисах отечественных и международных конференций.

Представленная диссертационная работа, однако, не вполне свободна от отдельных недостатков, а также оставляет определенные вопросы:

- почти во всех представленных зависимостях различных параметров от магнитного поля присутствует особенность в районе 70 - 80 мТл. Ее природа остается непонятной;

- методика измерений с использованием 96-луночных планшетов позволила проводить эксперименты в максимально идентичных условиях с использованием одной и той же культуры. Тем не менее, к недостаткам такого подхода следует отнести необходимость изъятия планшетов на время их встряхивания и измерения оптической плотности. При этом их содержимое попадает в новые температурные условия, а при исследовании влияния магнитного поля - в магнитное поле Земли. Как это могло повлиять на результаты измерений?

- величина константы СТВ имеет большое значение для наблюдаемых эффектов, к тому же СТВ зависит от того соединения, в которое входит магнитное ядро. Откуда взято значение СТВ ^{25}Mg 221 Гс (с. 163)?

В тексте также присутствуют досадные неточности, например, электронный спин нетрадиционно обозначен буквой I (с. 20); на с. 197 использован термин "несвязанный электрон".

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.2. - «Биофизика» (Физико-

математические науки) ((03.01.02 – «Биофизика») (Физико-математические науки)), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Летута Ульяна Григорьевна несомненно заслуживает присуждения ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 1.5.2. - «Биофизика» (Физико-математические науки) ((03.01.02 – «Биофизика») (Физико-математические науки)).

Официальный оппонент:

доктор физико-математических наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник, и.о. заведующего лабораторией молекулярной спектроскопии Федерального государственного бюджетного учреждения науки, "Федеральный исследовательский центр "Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук", обособленное подразделение Институт фундаментальных проблем биологии РАН

Проскураков Иван Игоревич

02.02.2022

Контактные данные:

тел.: +7(496) 773 2880, e-mail: pros@issp.serpukhov.su

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.01.02 – Биофизика

Адрес места работы:

142290, г. Пушкино Московской обл., ул. Институтская, 2

Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», обособленное подразделение Институт фундаментальных проблем биологии РАН

Тел.: +7(496) 773 2880, e-mail: pros@issp.serpukhov.su

Подпись Проскуракова И.И. удостоверяю

Зав. канцелярией Института фундаментальных проблем биологии Российской академии наук обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН

Левыкина С.Н.