

О.І. Райченко¹, В.С. Мосієнко², Ю.В. Яніш², О.П. Кузьменко², О.В. Дерев'янко¹

¹ Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ

² Інститут проблем матеріалознавства ім. І.М. Францевича НАН України, Київ

ФІЗИЧНІ АСПЕКТИ КРІОМАГНІТНОГО ВПЛИВУ НА МІКРООРГАНІЗМИ, СУСПЕНДОВАНІ У РІДИНАХ



У тканинах живих організмів під час перетворення води (цитоплазми) на лід руйнується структура клітини, але повна загибель всіх клітинних складових після одного кріоциклу, як правило, не відбувається. Дія магнітного поля не призводить до повної загибелі клітин (або мікроорганізмів). Після впливу комбінації субнульових температур та магнітного поля всі мікроорганізми *Bacillus cereus* гинуть, а кількість мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* (wild) та *Lactobacillus delbrueckii*, що залишилися живими, суттєво зменшується. Сполучення двох позитивних видів дій часто носить синергетичний характер. Встановлення цих та їм подібних результатів може сприяти розробці (або вдосконаленню) технологій збереження біологічних об'єктів без впливу небезпечних мікроорганізмів.

Ключові слова: кріомагнітна обробка організмів, девіталізація бактерій, накопичення дефектів, потік пошкоджень.

Метод кріообробки (заморожування/розморожування) біологічних об'єктів привертає все більшу увагу дослідників та лікарів. Зауважимо, що практично всі біохімічні реакції у живих істотах протікають у воді. Вода в організмі живої людини займає до 80 % маси. В живих об'єктах вода неоднорідна. Зокрема, в клітинних мембранах та в ДНК вода існує у вигляді тонкої плівки, що має структуру льоду [1]. Якщо піддати біологічну структуру дії субнульових температур, вся вода у тканинах перейде в твердотільний агрегатний стан (лід). Питомий об'єм кристалічного льоду на 10 % більший, ніж питомий об'єм води. За такої умови у процесі фазових переходів *рідина—кристал—рідина* принаймні частково деградує цитоплазма клітини. В результаті кріообробки води або електролітів можуть з'явитися віль-

ні радикали. Це пов'язують з появою на межі *лід—вода* «потенціалів замерзання». Як свідчать численні експерименти на культурах клітин тварин, повна загибель всіх клітинних елементів після одного кріоциклу, як правило, не відбувається [2]. Було помічено, що збільшення тривалості процесу заморожування призводить до зростання ступеню деструкції тканин. Експерименти свідчать, що головним деструктивним фактором при кріотерапії є швидкість розморожування (інше найменування цього методу в медицині — *кріохірургія*).

Відомо, що магнітні поля (МП) впливають на живі істоти. Різні мікроорганізми (бактерії, віруси, спори) неоднаково реагують на дію МП. Під час численних експериментів дія магнітного поля (наприклад, з магнітною індукцією 15 мТл) стимулювала ріст різних бактерій, а також грибів [3]. Дію МП на живі істоти треба розглядати, передусім, з точки зору дії МП на воду як базову речовину. Вода під дією МП

змінює деякі фізичні властивості (електропровідність, діелектричну проникність, густину), причому в окремих випадках спостерігається відома поліекстремальна залежність параметрів (властивостей), притаманних клітинам або всьому організму, від напруженості поля. Відзначено підвищення розчинної здатності води під дією МП. Так, розчинність карбонатів кальцію та магнію зростає в підданій магнітній обробці воді порівняно зі звичайною. Це явище пов'язують з індукуванням електричних струмів під час магнітної обробки води.

Також з точки зору спостереження живих об'єктів є важливим той факт, що у воді, підданій магнітній обробці, відбувається підвищення розчинності кисню, причому хімічна активність цього газу теж підвищується. Такою «активацією» кисню в «омагніченій» воді дослідники пояснюють появу бактерицидних властивостей, а також вплив такої води на кінетику деяких хімічних реакцій [4].

Показовим результатом в цьому розумінні є вивчення процесу кріоконсервації суспензій еритроцитів під впливом МП [5]. При заморожуванні суспензії еритроцитів крові людини еритроцити заморожувалися під захистом водного розчину поліетіленоксиду (концентрація 10%), іноді з додаванням NaCl. Найвища ефективність омагнічування досягається під дією МП під час еквілібрації та заморожування суспензій еритроцитів.

Дія накладеного на суспензію МП (з напруженістю порядку 2×10^5 А/м = 2500 Ерст) поліпшує збереження еритроцитів при кріоконсервації. Хоча причини такого поліпшення авторами цього дослідження не обговорюються, найбільш імовірним є глибока девіталізація шкідливих бактерій після кріомагнітної обробки. Такі бактерії іноді потрапляють до суспензії еритроцитів і погіршують умови її зберігання.

Мета пропонованої роботи полягає у з'ясуванні наслідків спільної дії процесу заморожування/розморожування та накладення МП на ряд суспензій мікроорганізмів. Результати таких експериментів можуть бути використані

при розробці деяких біотехнологій, а також при створенні засобів спільного впливу на патологічні клітини більш високоорганізованих живих істот, що актуально для медицини.

Тому важливо дослідити, чи відбудеться реакція мікроорганізмів, а якщо відбудеться — то якою вона буде, якщо провести суперпозицію їх кріо- та магнітної обробки.

Представлені нами дослідження комбінованого застосування субнульових температур та МП були здійснені на культурах бактерій, що, зокрема, зустрічаються у післяопераційних гнійних ранах (*стафілококи*) або у товстому кишечнику людини (*лактобактерії*) [6]. Бактерії родини *Bacillaceae* належать до спороутворюючих бактерій, які за довгий еволюційний процес виробили стійкий спосіб виживання: в разі несприятливих умов вони утворюють стійкі структури зі щільною багатшаровою оболонкою (*ендоспори*). За допомогою спороутворення бацити підвищують свою стійкість до фізичних, біологічних та хімічних факторів зовнішнього середовища, зберігаючись у анабіотичному стані протягом багатьох років. Спори витримують навіть висушування у вакуумі, наднизькі та досить високі температури (гинуть лише при 120 °С). Спори представників роду *Clostridium*, що також належить до родини *Bacillaceae*, опинившись у сприятливих умовах, відновлюють життєздатну генерацію з притаманними їй хвороботворними властивостями, стаючи причиною таких тяжких захворювань тварин та людей, як *ботулізм*, *правець*, *газова гангрена* (клостридії) або *сибірська виразка* (бацила) [7].

Тому особливо важливим в медичинській практиці є знешкодження саме спорових мікроорганізмів (бацил).

Нами досліджувалася динаміка росту популяцій бактерій під впливом певних чинників. Експерименти *in vitro* виконувалися з такими культурами:

- + *Bacillus cereus* у фізіологічному розчині;
- + *Staphylococcus aureus* (wild) у фізіологічному розчині;

† *Lactobacillus delbrueckii* в промисловому середовищі MRS.

Згідно з існуючою класифікацією [8] *Bacillus cereus* належить до групи грампозитивних бактерій (паличок та коків), що утворюють ендоспори. Вони є аеробними бактеріями, тобто спроможні використовувати кисень як кінцевий акцептор електронів; толерантні до концентрації кисню, рівної 21 % або вищої, ніж у атмосферному повітрі; факультативно анаеробні. *Bacillus cereus* широко розповсюджена у природі. Її мож-

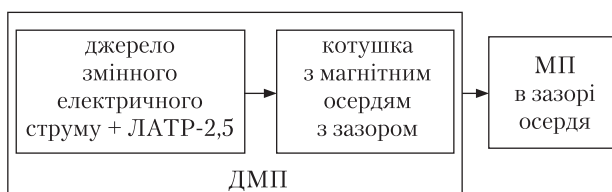


Рис. 1. Блок-схема пристрою для одержання магнітного поля (ДМП – джерело магнітного поля)

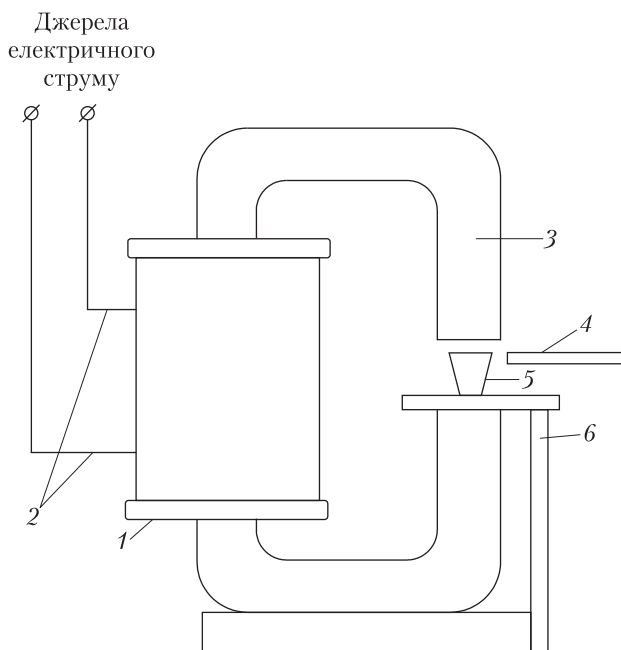


Рис. 2. Схематичне зображення конструкції комбінованого пристрою, що містить джерела магнітного поля 1,3 та кріовпливу (ДКВ) 4: 1 – котушка; 2 – електричні вводи котушки; 3 – феромагнітне осердя; 4 – джерело кріовпливу; 5 – кювета з піддослідним об'єктом; 6 – висувний столик для фіксації піддослідних об'єктів

на знайти у ґрунті, молоці, зернових культурах та інших сухих продуктах харчування.

Staphylococcus aureus життєздатна в аеробних умовах. Клітини її сферичні і зазвичай об'єднані в групи неправильної форми. В основному асоційовані зі шкірними покривами та слизовими оболонками теплокровних хребетних, але часто можуть зустрічатися і в харчових продуктах, пилу та воді.

Lactobacillus delbrueckii – це молочнокисла бактерія, яка належить до групи грампозитивних паличок, що не утворюють спор. Це факультативні анаероби; вони погано ростуть при вільному контакті з повітрям, краще – у газовому середовищі зі зниженим вмістом кисню; зазвичай ріст стимулюється в присутності 5 % CO_2 . Молочнокислі бактерії широко розповсюджені, зокрема дуже часто зустрічаються у продуктах тваринного та рослинного походження і в нормальній мікрофлорі травного тракту птахів та ссавців.

Для проведення означених експериментів було розроблено та запатентовано методику [9], а також створено та запатентовано комплексне обладнання [10], що складалося з електромагніту, постійних магнітів, кріодеструктора, чашки Петрі, термопари (мідь–константан), мілівольтметра Щ4313. Блок-схема джерела магнітного поля зображена на рис. 1. Схема комбінованого пристрою, в якому проводилася кріомагнітна обробка культур мікроорганізмів, зображена на рис. 2. Як рідке середовище для фізичного впливу на культури *Bacillus cereus* та *Staphylococcus aureus* (wild) використовувався фізіологічний розчин (0,9 % NaCl) з подальшим висіванням мікроорганізмів на м'ясо-пептонний агар (МПА) або, у випадку штаму *Lactobacillus delbrueckii*, – промислове середовище MRS. Тривалість спостереження за станом досліджуваних культур – 7 діб. Досліджені бактеріальні штами по-різному реагували на перелічені вище фізичні чинники (див. таблицю).

Сполучення кріовпливу і змінного магнітного поля (ЗМП) призвело до повної загибелі *Bacillus cereus*. Результати представлені на

рис. 3, де правий верхній квадрант — контроль; правий нижній квадрант — вплив ЗМП; лівий нижній квадрант — кріовплив; лівий верхній квадрант — кріомагнітний вплив.

Відомо, що різноманітність клітинних популяцій та їх змінюваність є основою стійкості проти різних зовнішніх впливів. Мабуть, через відносно невисоку здатність змінюватися відбувається повна загибель культури *Bacillus cereus*. На нашу думку, це свідчить про принципову можливість знищення популяцій інших мікроорганізмів шляхом кріомагнітної обробки. Зрозуміло, що девіталізація різних мікроорганізмів потребуватиме складових різної інтенсивності.

Якщо спиратися на теоретичну схему, розроблену для оцінок тривалості життя людини [11], що якоюсь мірою справедливо для різних живих істот, то можна на базі одержаних експериментальних спостережень виробити схему для деяких прогностичних оцінок. Звернімося до моделі накопичення дефектів в об'єкті, яким виступає тут бактерія з постійною інтенсивністю потоку пошкоджень. Цей варіант аналізу, в якому постійна інтенсивність потоку пошкоджень кількісно рівнозначна кількості «ударів» за одиницю часу, практично не залежить від стану організму.

Функція розподілу тривалості життя між істотами популяції є

$$f(t) = \frac{ck(\lambda + kt)^{n_{critical}-1}}{(n_{critical} - 1)!} e^{-(\lambda + kt)}, \quad (1)$$

де t — вік популяції чи індивідуума; c — нормуючий множник, який забезпечує, щоб сума



Рис. 3. Вплив змінного МП, заморожування (крио) та їх спільної дії на ріст культури *Bacillus cereus*

ймовірностей всіх можливих подій дорівнювала 1; k — інтенсивність потоку пошкоджень, що визначається як кількість отриманих ушкоджень за час дії зовнішнього (негативного в даному випадку) фактора, тобто $k = \frac{n}{\tau}$, де n — число (сумарна кількість) пошкоджень за час дії зовнішнього фактора; τ — час дії зовнішнього фактора; λ — ступінь критичного пошкодження організмів (середнє число випадкових пошкоджень в популяції) за визначенням є безрозмірна величина; $n_{critical}$ — критичне число пошкоджень, що залежить від жорсткості умов існування; $(n_{critical} - 1)$ — показник смертності.

Залежність параметрів бактеріальних штамів від видів фізичного впливу

Вплив	Кількість колоній на 1см ² поверхні щільного живильного середовища (МПА) через 7 діб		Оптична щільність культури у середовищі MRS через 7 діб
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (wild)	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Контроль інтактний	8 ± 1	74 ± 7	0,857
Кріовплив	0,5 ± 0,03	27 ± 3	0,860
Магнітний вплив	9 ± 1	77 ± 9	0,925
Кріомагнітний вплив	0	39 ± 3	0,640

Якщо розглядати кріомагнітну дію (вплив) як потік пошкоджень з постійною інтенсивністю і вважати дію кріо- та магнітного впливів незалежними, то в формулі (1) величину k можна представити як суму $k_c + k_m$, де k_c – параметр, що відображає вплив кріообробки, а k_m – параметр, що відображає вплив МП.

Використовуючи дані таблиці, прийнятно спростити формулу (1). Для всіх трьох культур час спостереження τ однаковий (7 діб). Прийmemo $t = \tau$, тобто час спостереження буде дорівнювати часу впливу зовнішніх факторів та терміну життя популяції чи індивідуума для всіх трьох культур. Виходячи з того, що $k = \frac{n}{\tau}$ (див. вище), маємо

$$f(t) = \frac{cn \left(\lambda + \frac{n}{\tau} t \right)^{n_{critical}-1}}{\tau (n_{critical} - 1)!} e^{-\left(\lambda + \frac{n}{\tau} t \right)} \quad (2)$$

Прийmemo також $\lambda = 0$ тому, що наявні культури мікроорганізмів не виявили видимих пошкоджень, або при спрощеному аналізі кількістю наявних пошкоджень можна знехтувати.

Звідси при врахуванні прийнятої умови, що $t = \tau$ (див. вище), формула (2) набуде вигляду

$$\begin{aligned} f(\tau) &= \frac{cn(n)^{n_{critical}-1}}{\tau ((n_{critical} - 1)!)} e^{-n} = \\ &= \frac{cn^{n_{critical}}}{\tau ((n_{critical} - 1)!)} e^{-n} = \\ &= \frac{cn^{n_{critical}}}{\tau ((n_{critical} - 1)!e^n)}. \end{aligned} \quad (3)$$

Тобто далі виникне можливість визначити мінімальну кількість ушкоджень, які повинна отримати популяція чи індивідуум, щоб бути знищеними за обумовлений період τ .

Можна припустити, що при наявності більшої кількості і більш диференційованих даних, аналогічних наведеним у таблиці, і після деяких спрощень буде забезпечена можливість приблизно обчислювати частини популяції мі-

кроорганізмів, що будуть мати ту або іншу тривалість життя під комплексним кріомагнітним впливом. Конкретна популяція мікроорганізмів буде характеризуватися своїми значеннями параметрів, що входять до формули (3). Проте слід пам'ятати, що реальні процеси можуть виявитися відмінними від таких, що підпорядковуються правилам адитивності. Це продемонстровано, зокрема, в нашій роботі (нагадаємо насамперед реакцію бактерій *Bacillus cereus* на кріомагнітний вплив), що демонструє синергетичний характер змін цієї популяції.

Наступним кроком у вдосконаленні арсеналу супресорних впливів для знищення шкідливих мікроорганізмів може бути доповнення кріомагнітної технології іншими чинниками як фізичної, так і нефізичної природи, що, треба сподіватися, знизить можливість виживання найбільш стійкої субпопуляції того або іншого з оброблюваних мікроорганізмів, оскільки антибіотики все частіше демонструють недостатню ефективність щодо патогенних бактерій.

ВИСНОВКИ

При проведенні експериментів на культурах трьох видів бактерій, в ході яких були використані кріогенний, магнітний та кріомагнітний впливи, встановлено:

1. Кількість живих мікроорганізмів в дослідній популяції *Bacillus cereus* після кріовпливу різко зменшується, після магнітного впливу залишається практично незмінною, а після кріомагнітного впливу всі мікроорганізми девіталізуються. Виявляється, що результат спільної обробки не є адитивним результатом поодиноких обробок. Означена спільна обробка має характер синергетичного процесу.

2. Кількість живих мікроорганізмів в дослідній популяції *Staphylococcus aureus (wild)* після кріовпливу різко (приблизно в 3 рази) зменшується, після магнітного впливу залишається практично незмінною, а після кріомагнітного впливу суттєво (приблизно вдвічі) зменшується.

3. Оптична щільність суспензії *Lactobacillus delbrueckii* після кріовпливу практично не змі-

нюється, після магнітного впливу трохи зростає (приблизно на 8%), а після криомагнітного впливу суттєво зменшується (приблизно на 25%).

Автори висловлюють щире подяку Черненку Л.І. за його увагу до цієї роботи, сприяння експериментам та доброзичливу критику.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дыкун И., Дыкун Ю., Мельник А. Человек — живой кристалл // В кн.: XII Междунар. конф. «Теоретические и клинические аспекты применения биорезонансной и мультирезонансной терапии», ч. II. — М.: «ИМЕДИС», 2007. — С. 394—403.
2. Афанасьева Н.И., Шевцов В.Ч., Мужичук А.В. Перспективы применения криохирургии в онкологии // Международный медицинский журнал. — 2002. — № 1—2. — С. 156—159.
3. Бинги В.Н. Магнитобиология. Эксперименты и модели. — М.: Ин-т общей физики РАН, «МИЛТА», 2002. — 592 с.
4. Химия — традиционная и парадоксальная. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1985. — 312 с.
5. Стусь Л.К., Стибуль Т.Ф., Куракса В.М. Влияние постоянного, переменного и импульсного магнитного поля на некоторые параметры криоконсервации суспензии эритроцитов // «Криобиология и криомедицина». Республ. межведомств. сборник. Институт проблем криобиологии и криомедицины. — № 15. — 1984. — С. 25—27.
6. Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий группы *Bacillus subtilis — mesentericus* из организма человека и животных. — К., 1980. — С. 26.
7. Денков В. На грани жизни / Пер. с болг. И.М. Сабуровой. — М.: Знание, 1988. — 192 с.
8. *Bergey's manual determinative bacteriology* // Edition 8th. Editors: P.E. Wachnahan, K.E. Gibbons — Baltimore: Williams S., 1974. — 1268 p. (Переклад видання на російській мові: Определитель бактерий Берджи. Под ред. Дж. Хоулта, И. Крига, П. Смита, Дж. Стейли и С. Уильямса, т. 1. — М.: Мир, 1997).
9. Райченко О.І., Мосієнко В.С., Черненко Л.І. та ін. Спосіб девіталізації мікроорганізмів в рідких середовищах. Патент України № 91475, 26.07.2010. Бюл. № 14, 2010.
10. Райченко О.І., Мосієнко В.С., Черненко Л.І. та ін. Комбінований пристрій для девіталізації мікроорганізмів. Патент України № 48632, 25.03.2010. Бюл. № 6, 2010.
11. Гаврилов Л.А., Гаврилова Н.С. Биология продолжительности жизни. — М.: Наука, 1991. — 278 с.

А.И. Райченко, В.С. Мосиенко, Ю.В. Яниш,
А.П. Кузьменко, Е.В. Деревянко

ФИЗИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КРИОМАГНИТНОГО ВЛИЯНИЯ НА МИКРООРГАНИЗМЫ, СУСПЕНДИРОВАННЫЕ В ЖИДКОСТЯХ

В тканях живых организмов во время превращения воды (цитоплазмы) в лед разрушается структура клетки, но полная гибель всех клеточных составляющих после одного криоцикла, как правило, не происходит. Действие магнитного поля не приводит к полной гибели клеток (или микроорганизмов). После влияния комбинации субнулевых температур и магнитного поля все микроорганизмы *Bacillus cereus* гибнут, а количество оставшихся в живых микроорганизмов *Staphylococcus aureus (wild)* и *Lactobacillus delbrueckii* существенно уменьшается. Сочетание двух видов воздействия зачастую носит синергетический характер. Установление этих и им подобных результатов может оказать содействие разработке (или усовершенствованию) технологий сохранения биологических объектов без влияния вредных микроорганизмов.

Ключевые слова: криомагнитная обработка организмов, девитализация бактерий, накопление дефектов, поток повреждений.

O.I. Raichenko, V.S. Mosienko, Yu.V. Yanish,
O.P. Kuz'menko, O.V. Derov'yanko

THE PHYSICAL ASPECTS OF CRYOMAGNETIC INFLUENCE TO MICROORGANISMS, WHICH ARE SUSPENDED IN FLUIDS

In tissue of alive organisms during transformation of water (cytoplasm) to ice the structure of a cell is fails but the total loss of all cell-like composite constituents after the one cryo-cycle, as a rule, does not happen. The effect of the magnetic field (MF) does not result to the total loss of cells (or microorganisms). After influence of a combination of sub-zero temperatures and MF all microorganisms *Bacillus cereus* are perished but the amount of microorganisms *Staphylococcus aureus (wild)* and *Lactobacillus delbrueckii*, which are stayed in alive decreases essentially. The combination of two called exposures have synergetic pattern often. The establishment of these and similar outcomes could assist to development (or improvement) of technologies for biological objects preservation without harmful microorganisms influence.

Key words: cryomagnetic processing of organisms, devitalization of bacteria, accumulation of defects, stream of damages.

Надійшла до редакції 14.10.10