



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УДМУРТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

БИОЛОГО-ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

КАФЕДРА ЭКОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ

КАЗАНКИН
Дмитрий Сергеевич

**Исследование влияния активированных растворов
на поведение живых клеток
методом знакопеременного клеточного электрофореза**

**Выпускная квалификационная
работа**

Зав. кафедрой
ст. преподаватель
Т.Г. Рысьева

Научный руководитель
к.б.н
Н.Е. Зубцовский

Научный консультант
к.ф.-м.н. В.Г. Широносов
Зав.каф. Биомедфизики

Ижевск
2001

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1. Электрохимическая активация растворов.....	5
1.2. Окислительно-восстановительный потенциал внутренних сред живых организмов.	8
1.3. Бесконтактно активированные растворы как способ влияния на биохимические процессы живых организмов.....	12
1.4. Гипотезы, объясняющие действие изменений окислительно-восстановительного потенциала на живые организмы.	15
1.5. Исследование клеток методом электрофореза.....	17
1.5.1. Исследования дрожжевых клеток.....	19
1.5.2. Исследования гетерогенности электрокинетических свойств.....	20
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	24
2.1. Культура клеток.	24
2.2. Метод бесконтактной активации воды.	26
2.3. Метод электрофореза.	27
2.3.1. Электрофоретическая ячейка и схема установки для микроэлектрофореза.	30
2.3.2. Методика установки ячейки и проведения опытов.	31
2.3.3. Стационарный уровень электрофоретической ячейки.	33
2.4. Применяемые формулы и математическая обработка результатов.	36
2.5. Схема и методика эксперимента.	37
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПЫТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	43
3.1. Опыты по бесконтактной активации водных растворов.....	43
3.2. Опыты по изучению влияния активированных и неактивированных сред на свойства культуры клеток методом микроэлектрофореза.	45
ВЫВОДЫ.....	71
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	73
ПРИЛОЖЕНИЕ	79

Введение

Данная работа относится к широко распространенным в биологии исследованиям, в которых изучается влияние различных физических или химических факторов на живые системы. В частности, исследуется влияние бесконтактно активированных водных растворов на живые клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Для регистрации изменений в физиологическом состоянии живых клеток, используется биологический подход определения функций системы через её свойства, которые можно непосредственно наблюдать. В качестве метода исследования клеток, в данной работе используется метод прижизненного знакопеременного клеточного микроэлектрофореза. Данный метод позволяет выяснить степень изменения свойств клеточной популяции и косвенно определить электрокинетические свойства клеточной поверхности, которые играют очень важную роль в жизнедеятельности клеток организмов любых типов. Вместе с тем метод еще недостаточно разработан и нуждается в дальнейшем совершенствовании, как самого прибора, так и методических подходов к работе.

Данная дипломная работа посвящена изучению влияния бесконтактно активированных жидких сред на биосистемы. Целью работы является исследование возможности влияния на биохимические реакции живых организмов физическими методами. В соответствии с этим в работе решается комплекс задач:

- 1) Разработать установку и методику электрокинетических исследований. Выяснить применимость метода знакопеременного клеточного микроэлектрофореза для определения уровня гетерогенности культуры клеток.
- 2) Обнаружить эффект влияния на живые клетки бесконтактно активированной воды по сравнению с неактивированной водой;

3) Провести исследования динамики клеток в бесконтактно активированной жидкости.

Новизна работы - исследуется возможность управления биохимическими реакциями живого организма посредством изменения окислительно-восстановительного потенциала внутренней среды клеток безреагентным путем, т.е. без добавления химических веществ на основе нового открытого эффекта - бесконтактной активации жидкостей в бездиафрагменных электролизерах. Сдвиг химического равновесия биохимических реакций клеток создается посредством отрицательного ОВП бесконтактно активированной воды, которая не содержит в себе чужеродных для организма компонентов и химических веществ.

В качестве клеточного тест-объекта используются клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Это наиболее доступный биологический материал, не требующий предварительного культивирования в лабораторных условиях.

Полученные данные могут служить основой для разработки новых методов культивирования, повышения жизнеспособности микроорганизмов, а также для совершенствования техники электрофореза.

Глава 1

Обзор литературы

1.1. Электрохимическая активация растворов

В процессе исследования электролиза различных водных систем в диафрагменном электролизёре было обнаружено неизвестное ранее явление сохранения в жидкости потенциальной энергии поляризации электрода. Т.е. у самой поверхности электродов свойства воды (pH , Eh) изменяются в аномальных соотношениях. Сущность явления заключается в возможности заметного изменения скорости и селективности многих химических реакций (с участием преимущественно жидкостей и газов), за счет использования в качестве катализатора химических реакций энергии метастабильного состояния веществ после неравновесного электрохимического воздействия. Это явление было названо авторами электрохимической активацией (ЭХА) жидких сред [4, 45].

В процессе экспериментальных исследований были выявлены особенности состояния электроактивированной жидкой среды:

1. После прекращения электролиза водная система некоторое время пребывает в метастабильном состоянии (аномальные значения pH и ОВП).
2. Электроактивированный раствор в некоторых химических реакциях изменяет не только их скорость, но и направление.
3. ЭХА среда, находящаяся в метастабильном состоянии, является неравновесной системой, постепенно проходит ряд псевдоустойчивых состояний по пути к достижению устойчивого термодинамического (ТД) равновесия. Процесс возвращения в состояние устойчивого ТД равновесия, называется электрохимической релаксацией среды [3, 4].

Одной из важных характеристик ЭХА воды является окислительно-восстановительный потенциал (ОВП, Eh), называемый также редокс-потенциал (от английского RedOx - Reduction/Oxidation), характеризует

степень активности электронов в ОВ реакциях, т.е. реакциях, связанных с присоединением или передачей электронов [81].

Формула для определения ОВП раствора:

$$E = E_0 + 0,42 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox]}{[Red]} - 2,3 \frac{RT}{F} pH \quad (1)$$

где E - стационарный ОВП раствора (В, НВЭ), содержащего в избытке компоненты системы $[Ox]:[Red]$; E_0 - стандартный ОВП (В, НВЭ) данной окислительно-восстановительной пары при нормальных условиях; R - газовая постоянная Больцмана; T - абсолютная температура, К; n - число переносимых электронов; F - число Фарадея [45, 48].

Измеряют ОВП платиновым электродом относительно стандартного хлорсеребряного электрода (ХСЭ) сравнения при помощи высокоомного милливольтметра. Числовые значения ОВП по шкале НВЭ приблизительно на 200 мВ ниже значений по шкале ХСЭ [45, 48].

Вода, обработанная только в анодной или только в катодной камере диафрагменного электрохимического реактора, называется соответственно анолитом и католитом [4, с. 233].

После обработки питьевой воды с минерализацией 0,3 - 1,5 г/л в анодной камере электрохимического реактора РПЭ установки "СТЭЛ" ее рН = 3...4; ОВП = +700...+1200 мВ. Катодная обработка воды обеспечивает рН = 10...11; ОВП = -500...-800 мВ [45]. Достичь таких же параметров воды простым добавлением химических веществ изменяющих рН и ОВП водных растворов невозможно. Это объясняется тем, что вода после обработки переходит в метастабильное состояние с повышенной реакционной способностью. Такое состояние обусловлено наличием высокоактивных соединений, но в большей степени, длительно существующими структурно-энергетическими возбуждениями [3].

То, что активация водных растворов не зависит от появления в них продуктов электрохимического синтеза, доказывается возможностью бесконтактной электрохимической активации. Феномен бесконтактной ЭХА теоретически предсказан в 1892 г. И.Л. Герловиным [11] на основе

разработанной им физической теории фундаментального поля. Экспериментальные данные по бесконтактной ЭХА впервые получены В.М. Бахиром в 1992 г. на основе диафрагменного электролизера [4, с 197-204].

Феномен бесконтактной активации жидкостей (БАЖ) заключается в изменении параметров (pH , Eh) водных растворов в герметичных емкостях, помещенных в электрохимически активированные среды (т.е. в водную среду, где происходит или происходил электролиз). В результате БАЖ изменяется ОВП и структура воды без изменения ее химического состава.

Как показали результаты экспериментов, при погружении в ЭХА-среды (католит) герметизированных емкостей, из аморфных материалов (лавсан, стекло, фторопласт), наполненных физиологическим раствором показатели ОВП в них достоверно менялись во всех случаях. В емкостях из лавсана и стекла знак ОВП физиологического раствора соответствовал знаку ЭХА-среды, а в капсулах из фторопласта знак ОВП менялся на противоположный знаку ЭХА-среды. Показатели pH достоверно изменялись в половине случаев: наиболее существенные изменения pH в капсулах из лавсана, в стеклянных ампулах изменения выражены в меньшей степени, а в капсулах из фторопласта pH не менялся [4, 45].

Через 2 ч после бесконтактной ЭХА, измененные pH и ОВП физиологического раствора, испытывали отчетливую тенденцию к релаксации.

Лавсан, стекло, фторопласт относятся к категории аморфных, диэлектрических, нефилтрующих и недиализирующих материалов. Поэтому изменения pH и ОВП водно-минеральной среды внутри герметизированных емкостей из этих материалов, при погружении их в ЭХА-растворы нельзя объяснить за счет проникновения внутрь продуктов электролиза или за счет прохождения электрического тока через содержимое герметизированных капсул или ампул [45].

Для выяснения природы феномена бесконтактной активации жидкостей на кафедре Биомедфизики УдГУ были проведены дополнительные опыты [68, 69, 70]. Эти опыты доказали возможность бесконтактной активации жидкостей в бездиафрагменном электролизере и наметили путь к пониманию ее причин. Применение электролизной камеры, не разделенной полупроницаемой перегородкой, существенно упрощает схему установки для БАЖ. Поэтому в данной работе используется бездиафрагменный электролизер.

Существуют и другие способы активации водных сред: механический, термический, акустический, магнитный, электрический и т. д. [4, с. 214; 45, с. 67; 55, с. 48; 28, с. 2; 29; 25-27; 3, с. 17; 61, с. 23; 1; 37].

1.2. Окислительно-восстановительный потенциал внутренних сред живых организмов

Термин ОВП по смыслу соответствует понятию “электрохимический потенциал”, обозначающему *“уровень свободной энергии системы относительно числа молей вещества в системе”* [35]. По определению “электрохимический потенциал” эквивалентен мере свободной энергии биохимических реакций, необходимой для отрыва электронов от донорных соединений с последующим присоединением их к химическому акцептору [45]. Другими словами, окислительно-восстановительный потенциал является показателем количества электронов и энергетического потенциала жидкости.

В соответствии с этим, в биохимии известно два общепринятых метода количественной оценки ОВ пар. С одной стороны, можно выписать значение ΔG для превращения восстановленной формы в окисленную форму кислородом (O_2). Соединение с большим отрицательным значением $-\Delta G$ будет хорошим восстановителем [36].

Второй способ выражения той же информации связан с использованием электродных потенциалов. Связь между энергии Гиббса с электродными потенциалами описывается формулой:

$$-\Delta G = nEF = (nE \times 96.487) \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1} = (nE \times 23,061) \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1} \quad (2)$$

где F – число Фарадея (заряд электрона, помноженный на число Авогадро, т.е. 96487 кулонов); E – измеренная разность электродных потенциалов двух полуэлементов (в вольтах); n – число молей электронов, перенесенных в ходе реакций, для обычных биохимических реакций равно 1 или 2 [36].

Электродные потенциалы важны еще и потому что их прямое измерение иногда позволяет подойти к изучению ОВ реакций внутри клеток [36].

По определению Г.В. Сумарукова [60] в живых системах (*in vivo*), в тканевых жидкостях существует стационарный ОВП ($\phi_{ст}$), который отражает *соотношение суммарных концентраций окисленных и восстановленных форм* и “служит мерой тенденции системы становиться окисленной или восстановленной”. Иными словами, стационарный ОВП отражает донорные или акцепторные свойства тестируемой живой системы относительно НВЭ [45, 47]. Возможно, что смещение стационарного ОВП в компартментах клетки является способом регулирования биохимических реакций в необходимом клетке направлении [9].

При внесении в раствор электролита какого-либо вещества в смеси его восстановленной и окисленной форм ОВП растворителя будут закономерно изменять отношение $[Ox]/[Red]$, если растворитель “в избытке”. Если же химическая добавка присутствует в растворителе в значительной концентрации, то соотношение $[Ox]/[Red]$ добавки будет изменять ОВП раствора [47, 48] в соответствии с формулой (1).

Вторая ситуация более характерна для живых систем. В настоящее время показано, что вода живой и мертвой клетки неодинаковы [10, 79]. Несмотря на большое процентное содержание воды (от 60 до 95 % [15]) в организмах количество свободной воды ограничено. По данным многих авторов, лишь от одной четверти до трети клеточной воды обладает той же подвижностью, что “обычная” вода. Остальная ее часть малоподвижна, как

говорят, "структурированна" [78, 82, 62]. Таких данных за последние годы становится все больше, и они заставляют пересмотреть многие устоявшиеся представления об организации клеточной цитоплазмы.

Интегральное значение ОВП внутренней среды клетки определяется соотношением всех электронакцепторных и электрондонорных компонент, и в этом случае частные соотношения окисленных и восстановленных форм будут подстраиваться под общее значение ОВП. Если биологический объект (например, изолированную клетку) поместить в среду со значением $ОВП = E$, то, в соответствии с формулой (1), в редокс-системах, характеризующихся $E_0 > E$, будут преобладать процессы восстановления, а при $E_0 < E$ будут преобладать процессы окисления. Таким образом, ЭХА-растворы создают относительно биологического объекта (или во внутренней среде биологического объекта) заданный электрондонорный или электронакцепторный фон [47, 60].

Данная закономерность экспериментально доказана. При помещении гомогенатов живых тканей в среды с различными заранее заданными ОВП $= E$ достигалось равенство $[Ox] = [Red]$ именно для тех редокс пар, которые имели $E_0 = E$ [73]. Это создает предпосылки для электрохимического управления биохимическими процессами.

В настоящее время в промышленности, с/х и медицине применяются технологические растворы, вода и физиологические растворы с определенными значениями pH и ОВП для управления процессами, происходящими в биосистемах.

В процессе окисления, восстановления, диссоциации или комплексообразования регулированием pH и E_h можно изменить потенциал, направление и скорость химических реакций, или при биохимической очистке воды – тормозить или ускорять жизнедеятельность бактерий, изменять каталитическую активность ферментов микробной клетки [19, 76]. При биологической очистке бытовых сточных воды в аэробных условиях белковый азот в результате аммонификации

разлагается, образуя азот аммонийных солей. Для окисления иона аммония в нитриты и нитраты E_h воды необходимо повысить до положительных значений. На практике это осуществляют аэрацией сточной воды воздухом, который повышает E_h до значений, наиболее оптимальных для функционирования нитрифицирующих бактерий (0,3...0,5 В) [22], а также является акцептором водорода и других промежуточных восстановительных соединений – продуктов жизнедеятельности микроорганизмов [6, 76].

В некоторых применениях (например, в обработке воды для бассейнов) ОВП является одним из основных параметров контроля качества воды. В частности потому, что позволяет оценить эффективность обеззараживания воды. Для иллюстрации приводится таблица 1 зависимости продолжительности жизни *E. Coli* от величины редокс-потенциала [81].

Таблица 1

ОВП (мВ)	Время жизни <i>E-Coli</i> , (мин)
450 - 500	167
500 - 550	6
550 - 600	1,7
700 - 750	0,2
750 - 800	0,05

Водный раствор гипохлорита натрия, обладающий аномально высокими значениями ОВП, приобретает свойства стерилизующей жидкости и применяется в медицине (хирургии, стоматологии и т.д.) для дезинфекции инвентаря [41].

Что касается медицинского применения, то, по крайней мере, для одной области терапевтических воздействий показана достоверная лечебная эффективность направленного снижения ОВП внутренней среды обширной группы живых существ от насекомых до млекопитающих. Еще в 1970 г. Г.В. Сумаруков систематизировал литературные данные и показал в эксперименте, что уменьшение ОВП тканей и органов, а также жидких биологических сред, сопровождается радиопротекторным действием независимо от того, каким именно методом вызвано снижение ОВП (гипоксия, введение антиоксидантов или выработка эндогенных радиопротекторов). При этом в организме происходит нейтрализация

окисленных продуктов за счет создания условий их взаимодействия с избытком восстановленных молекул. В результате снижается риск необратимых перекисных повреждений биосубстрата [60].

Необходимо отметить, что введение в организм восстановителей само по себе не гарантирует значительных отрицательных сдвигов ОВП в тканях. Попытки изменения и регулирования ОВП внутренних сред организма химическими способами труднопредсказуемы. Хотя существует ряд веществ вызывающих локальные уменьшения ОВП мышечной ткани на 140-170 мВ (цистеин, цистамин, тиомочевина, нитрит натрия, фруктоза, метионин и др.). Этиловый спирт уменьшает ОВП мышцы на 13 мВ, что подтверждает хорошо известное в быту слабое противолучевое действие этого вещества [60].

Как показывают расчеты, колебания ОВП во внутренних средах организма всего лишь на десятки мВ физиологически существенны. Следовательно, параметр ОВП должен занять свое место в ряду актуальных гомеостатических характеристик [45].

Но в целом проблема управления ОВП внутренней среды организма разработана слабо в связи с рядом методических трудностей. Прежде всего, технические возможности измерения ОВП в живом организме крайне ограничены [24]. Кроме того, общий набор медико-биологических методов воздействия на электронное равновесие организма в подавляющем большинстве случаев обходится без учета ОВП, что создает в данной области информационный вакуум [45].

1.3. Бесконтактно активированные растворы как способ влияния на биохимические процессы живых организмов

Помимо простоты получения, универсальности применения и значительного сокращения или полного исключения специальных химических реагентов, бесконтактно активированные растворы обладают самым существенным преимуществом перед традиционными – они экологически чисты и безопасны для человека и животных. В процессе их

приготовления в раствор не вносятся какие-либо химические или чужеродные организму вещества. После некоторого, достаточно продолжительного времени, бесконтактно активированный раствор теряет свою активность, и приближаются по свойствам к исходной воде [3].

Отрицательные значения ОВП бесконтактно активированной воды создают электрондонорный фон. Равновесие биохимических реакций в такой среде может быть сдвинуто в соответствии с формулой (1). Созданный в бесконтактно активированной среде электрондонорный фон, может использоваться клетками как энергетический резерв антиоксидантной защиты организма при неблагоприятном влиянии внешней среды. К примеру, было установлено, что при поении мышей, облученных смертельной дозой рентгеновского излучения, водой с $ОВП = -450$ мВ смертность уменьшилась с 96 % до 10 % по сравнению с контрольной, которой давали обычную (неактивированную) водопроводную воду с положительным ОВП [45, 48].

Работы в направлении изучения БАЖ ведутся и уже получены многообещающие результаты. Помимо БАЖ в ЭХА-средах, известен способ Киселева Б.И. бесконтактной активации растворов магнитным полем, УФО, лазером с дополнительным воздействием генератором акустических колебаний, меняющим структуру и размеры микрокластеров воды от ~ 20 диполей до $\sim 2-3$ [25 - 29]. Этот способ нашел широкое применение для лечения многих заболеваний [25 - 29] и укрепления иммунитета.

Прилуцким В.И. были проведены опыты на клеточных тест-объектах показывающих изменение их свойств при инкубировании в средах с различным Eh. Опыты проводились на клетках, обладающих собственной подвижностью (сперматозоиды быка, эвглена зеленая (*Euglena viridis*)). Было показано, что оптимальный диапазон Eh среды инкубирования по показателю подвижности сперматозоидов смещен в отрицательную сторону и составляет $Eh = -130 \dots 0$ мВ, ХСЭ. Для *Euglena viridis* хорошая

подвижность наблюдалась в диапазоне $E_h = -200 \dots +500$ мВ, ХСЭ. [45, 46]. Объясняется это тем, что в электрондонорной среде происходит сдвиг равновесия биохимических реакций, который, в результате, способствует накоплению восстановленных форм без угнетения тканевого дыхания, что эквивалентно анаболическому эффекту [45].

На основе опытов по электрофоретическому поведению клеток показано, что вода с пониженным ОВП обладает адаптивным действием на клетки микроводорослей [56] и клетки человека (букальный эпителий [58], эритроциты, нервные волокна [40]).

Применение бесконтактно активированных сред является новым и перспективным методом управления биохимическими реакциями клеток. Воздействие активированных веществ на живой организм состоит в изменении активностей ионов и молекул, участвующих в элементарных актах физико-химического воздействия и определяет скорость, энерговыделение, а в ряде случаев и направление реакций. Таким образом, применение активированных веществ для регулирования жизнедеятельности организмов обеспечивает чрезвычайно мягкое и эффективное воздействие на биологические процессы благодаря влиянию на первичные физико-химические реакции (передачу электрона, перенос протона), определяющие (через скорость, интенсивность энерговыделения) все последующие процессы [4, 45]. Воздействие на первичные процессы химических веществ (медикаментозные средства) практически невозможно без изменения химического состава внутренней среды, а это всегда приводит к побочным эффектам [8].

Поэтому возникает необходимость дальнейшего исследования свойств бесконтактно активированных растворов и изучения их влияния на биохимические реакции клеток.

1.4. Гипотезы, объясняющие действие изменений окислительно-восстановительного потенциала на живые организмы

Окислительно-восстановительный потенциал эквивалентен мере свободной энергии биохимических реакций, необходимой для отрыва электронов от донорных соединений с последующим присоединением их к химическому акцептору. Поэтому большинство авторов склоняется к точке зрения о том, что изменение ОВП внутренних сред влияет, прежде всего, на перенос заряда. Причем независимо от того, что считать базовым носителем этого заряда: электроны, как то считает классическая клеточная термодинамика [9], или протоны в представлении новых концепций биоэнергетики клетки [42].

В основном изменение E_h внутренней среды организма можно достичь введением различных лекарственных веществ. О механизме действия лекарственных средств, к которым относятся также различные модификации воды и ее растворов, а также источники целебных минеральных вод, водолечение (гидротерапия), электролизная вода живая и мертвая, ионизированная вода, вода, содержащая радиоактивные элементы, и др., в настоящее время практически мало известно с биологической и медицинской точки зрения. А. Сент-Дьердьи отмечает [52, 53], что существует связь между переносом заряда и действием лекарственных средств, поскольку некоторые из них могут служить донорами или акцепторами электронов.

Трудно предсказать биологический эффект такого переноса заряда, т.к. действие этих лекарственных веществ зависит не только от того, отдают ли они электроны или захватывают их, но и от места их воздействия. Например, клеточные мембраны, управляющие многочисленными функциями клетки, большей частью несут отрицательный заряд на внутренней своей стороне, а положительный на внешней. Поэтому электроны, отдаваемые на внутренней поверхности мембраны, увеличивают заряд, что ведет к гиперполяризации и вместе с тем к

торможению, тогда как электроны, отдаваемые на внешней стороне, уменьшают потенциал и, вероятно, вызывают возбуждение [8, 40].

Если вещество осуществляет свои биологические функции в результате присоединения или отдачи электронов, то оно должно обладать исключительными донорными или акцепторными свойствами [8, с. 40 – 41].

О роли процесса переноса заряда в фармакологической активности свидетельствует тот факт, что различные алкалоиды (например, хинин, никотин и др.) являются хорошими проводниками по отношению к йоду [8].

В работах Прилуцкого В. И. [45-48] приводится гипотеза, объясняющая действие электродонорных факторов активированной воды на митохондрии.

Известно, что за счет различия знаков зарядов (поляризации) на поверхностях мембраны митохондрии возникает разность потенциалов, провоцирующая транспорт протонов из межмембранного пространства (H^+ - резервуар) на внутреннюю поверхность внутреннего контура мембраны, обращенного к матриксу. Мембрана митохондрии оказывает сопротивление переносу протонов. Для преодоления этого сопротивления на внутреннем контуре митохондриальной мембраны необходим трансмембранный градиент ОВП не менее 200 мВ [45, 47].

По предположению, усиление электрондонорного фона вокруг митохондрии при диффузии воды с отрицательным значением E_h или при накоплении восстановленных химических соединений, создает эффект электронного давления на внешнюю оболочку митохондрии и стимулирует транспорт электронов в направлении матрикса. Это создает предпосылки для увеличения ΔE и "проталкивания" протонов на внутреннюю сторону мембраны с последующим усилением ресинтеза АТФ.

Возможно, при этом молекулы электроактивированной воды имеют преимущество перед обычными молекулами воды при их проникновении

внутри митохондрии. Механизм и конечные эффекты подобного воздействия являются многофазными и неоднозначными.

Таким образом, смещение электронного равновесия в биологических жидкостях, окружающих митохондрии, способно усиливать процессы энергогенеза. Сдвиг ОВП в сторону восстановительных (отрицательных) значений создает условия для активации тканевого дыхания и расхода энергии, который компенсируется накоплением восстановленных химических форм и, в конечном счете, преобладает анаболический эффект [45, 47].

1.5. Исследование клеток методом электрофореза

На поверхности клетки любого типа существует электрический заряд, который формируется за счёт:

- 1) диссоциации ионогенных групп молекул, входящих в состав цитоплазматической мембраны;
- 2) заряда клеточных белков;
- 3) работы Na/K насоса, играющего важную роль в формировании мембранного потенциала [72].

Заряд клеточной поверхности является неотъемлемым свойством любой клетки. Как известно, именно поверхность есть место, где совершаются многочисленные биологически важные явления [20]. Электрический заряд клеток играет важную роль в газообмене [65], адсорбции веществ из внешней среды [12, 63], образовании структуры клеточных скоплений [65, 32, 66, 50, 67] и во всех остальных физиологических проявлениях жизни. В средах, неблагоприятных для жизнедеятельности, поверхностный электрический заряд клеток может существенно изменяться [32, 50]. Это одно из проявлений приспособительной реакции клетки на изменившиеся условия среды. Например, при экстремальных значениях pH среды дрожжевые клетки снижают суммарный поверхностный заряд, тем самым ослабляется взаимное отталкивание клеток. В результате наблюдаются

скопления клеток на поверхности среды и пенообразование в ферментере [50].

Если поместить клетку в электрическое поле, то благодаря заряду поверхности клетка начнет двигаться к противоположно заряженному электроду. Свойства клеток, которые определяют ее способность взаимодействовать с электрическим полем названы **электрокинетическими свойствами (ЭКС)**. Электрокинетические свойства проявляются, прежде всего, в движении клетки или ее отдельных частей (мембрана, ядро, митохондрии и т.д.), под действием внешнего электрического поля, т.е. при электрофорезе. По определению, электрофорез - это движение частиц, находящихся во взвешенном состоянии в жидкой среде, под действием внешнего электрического поля [35]. В этом отношении следует различать понятие "методы электрофореза", которое означает "способы определения ЭКС клеток или частиц".

Линейная скорость электрофореза является основным ЭКС клетки и зависит, прежде всего, от её заряда. Но возникают затруднения при интерпретации результатов, полученных при непосредственных наблюдениях подвижности клеток в электрическом поле [54]. Эти затруднения в значительной мере устраняются с применением аналитических методов для определения ЭКС. Для этих целей наиболее широко используют метод микроэлектрофореза, основанный на измерении скорости движения *отдельных* клеток в поле постоянного электрического тока [65, 38, 20].

Микроэлектрофорез позволяет количественно оценить электрокинетические свойства (ЭКС) отдельных клеток или частиц:

1. Электрофоретическую подвижность (ЭФП) [38]. Под которой понимают отношение линейной скорости клетки к напряженности поля [13]. Или другими словами, движение клеток в среде под действием электрического поля напряженностью в 1 В/м [38, 66].

2. Электрокинетический потенциал (ЭКП или ζ -потенциал). Это падение потенциала в так называемой плоскости скольжения, разделяющей неподвижную часть ионов двойного электрического слоя, сцепленных с поверхностью клетки, от подвижной, окружающей клетку [38, 20].

3. Плотность поверхностного заряда (ПЗ) [38, 13].

В формулах применяемых для вычисления ЭФП, ЭКП, ПЗ частиц учитывается: напряженность электрического поля, скорость движения клетки, вязкость и диэлектрическая постоянная среды, ионная сила раствора и некоторые другие параметры которые зависят от используемых методов. Таким образом, при пересчете линейной скорости с учетом влияния условий, в которых она наблюдается, можно получить количественную оценку ЭКС, не зависящую от применяемой методики.

1.5.1 Исследования дрожжевых клеток

Удобным тест-объектом являются дрожжевые клетки. Многими исследователями выявляются некоторые закономерности в зависимости ЭКС от внешних условий и физиологического состояния дрожжевой культуры.

На примере 30 различных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в работе [77] показано, что при повышении значения pH раствора от pH 2,0 до 8,0 электрофоретическая подвижность клеток изменялась.

Болгарские ученые [83] показали изменение ЭКП дрожжей *Candida utilis* от +15 до -50 мВ в зависимости от изменения значения pH раствора от 3,3 до 7,8 при постоянной ионной силе растворов равной 4×10^{-3} .

Вопрос об электрокинетическом потенциале клеток при изучении переходных состояний изучен в работах [32, 66]. Значение ЭКП характеризует физиологическое состояние дрожжевых клеток. Установлено, что величина отрицательного ЭКП размножающихся клеток зависит от значения pH среды. При росте в хемостате при pH 5,0 он равен -

43 мВ, при рН 3,0 - 20 мВ, а при рН 2,2 - 10 мВ. При рН 2,0 клетки постепенно вымываются из ферментера, а их потенциал равен нулю.

Изменение скорости роста также влияет на величину электрокинетического потенциала поверхности дрожжевых клеток: с увеличением D от 0,1 до 0,3 ч⁻¹ он увеличивается от -43 мВ до -53 мВ, а при снижении D до 0,07 ч⁻¹ уменьшается до -32 мВ. Изменения показаний электрокинетического потенциала в переходные периоды имеют характер затухающих осцилляций [32, 66].

Выводы: Электрокинетические свойства клеток, и в частности ЭКП, являются отражением физиологического состояния клеток. Это доказано большим количеством работ проведенных на клетках самых разных типов. В большинстве случаев наблюдаются закономерности в изменении ЭКП. Например, кислотность среды влияет на ЭКП дрожжевых клеток. Причем в более адаптивных условиях дрожжевые клетки увеличивают отрицательное значение ЭКП. При увеличении скорости роста увеличивается электрофоретическая подвижность клеток, что является статистически достоверным. Таким образом, можно сделать общее заключение, что при любом изменении среды обитания и физиологического состояния клеток электрокинетические свойства поверхности клеток меняются в широких пределах, и эти изменения обнаруживаются методом электрофореза.

1.5.2. Исследования гетерогенности электрокинетических свойств

Помимо электрокинетических свойств отдельных клеток или их органелл, существует возможность исследования гетерогенности популяций микробных клеток. Это является одним из достоинств электрофоретических методов анализа.

На основе литературы и по результатам исследований дрожжевых клеток показано, что при изменении физиологического состояния и(или) условий среды происходит изменение электрокинетических свойств клеток. Метод микроэлектрофореза дает возможность различать

отдельные клетки по их ЭКС. При этом можно заметить, что величина ЭКС клеток внутри одной культуры не всегда является постоянной величиной. В этом отношении электрокинетические свойства клеток не отличаются от других свойств микроорганизмов. Например, варьирование размера клеток внутри микробиологической популяции может быть оценено количественно. То же самое можно сделать и в отношении электрокинетических свойств на основе данных электрофореза.

На основании анализа доступных литературных источников следует отметить, что в основном исследуется гетерогенность ЭКС микробных популяций.

Большую роль в изменении свойств популяции играет перестройка ее возрастной структуры. В ходе клеточного и жизненных циклов микроорганизмов свойства клеток - морфологические, биохимические, физиологические и др. значительно меняются [49]. На соотношение вариантов в популяции могут влиять метаболиты клетки [7]. Эти изменения отражаются на электрокинетических свойствах клеток. Ниже приведены данные, полученные на основе анализа ЭФП клеток, как общепринятых способов выражения ЭКС.

Выделенные из живых организмов клетки *Staphilococcus aureus* были гетерогенны по ЭФП [38]. Эта гетерогенность сохранялась при пересевах и тогда, когда клетки брали из одной колонии. Обработка этих клеток трипсином давала гомогенные по ЭФП клетки. Следовательно, причиной гетерогенности было различное количества белка на поверхности клеток. Гетерогенность клеток *Staphilococcus aureus* и *E.coli* увеличивалось при росте на среде, содержащей пенициллин. При споруляции клеток *Bac. Lichenoiformis* и прорастании спор этих клеток также наблюдали увеличение гетерогенности микробной культуры. При этом ЭФП спор была выше, чем ЭФП вегетативных клеток [38].

Что касается эукариотических организмов, то при исследовании ЭФП клеток *Chlorella* обнаружено появление гетерогенности ЭФП клеток

растущей культуры при воздействии на нее неблагоприятных факторов [18, 74]. Это указывает на связь электрокинетического потенциала клеток *Chlorella* с их функциональным состоянием. Кроме того, установлено [38], что активнорастущая D-форма этой микроводоросли имеет значительно большую ЭФП, чем медленно растущая L-форма. Таким образом, можно различать внутри смешанной популяции клетки различных форм.

Исследованиями сходными с определением гетерогенности популяции следует считать определение электрофизических характеристик микроорганизмов при их повреждении. Данные электроориентационных измерений можно использовать для количественной оценки степени повреждения бактериальной популяции.

Для этого в работе [38] сопоставлены данные о жизнеспособности бактериальных клеток при их тепловом повреждении. Результаты, полученные методом серийных разведений с последующим высевом на плотные питательные среды и подсчетом выросших колоний, сравнивались с результатами анализа электроориентационных спектров тех же клеток. Способы, основанные на электроориентационных измерениях, выявляют повреждение клеток так же хорошо, как и общепринятый способ посева на плотные питательные среды (при температурах 45 °C и ниже).

Следует отметить, что чрезвычайная изменчивость клеток биологического происхождения (в норме и патологии), их участие в сложнейших реакциях обмена, обеспечивающих жизнедеятельность, с точки зрения электрокинетических явлений изучена недостаточно. Можно полагать, что такие исследования будут способствовать приобретению более глубоких знаний о биологических системах [14].

Вывод: Неблагоприятные факторы среды, либо переходные процессы внутри популяции (пересев на новые среды, размножение, изменение возраста культуры и т.д.) увеличивают гетерогенность электрокинетических свойств клеток внутри популяции. В стабильных

условиях существования, как правило, наблюдаются однородные по ЭКС клетки.

Электрокинетические свойства дрожжевых клеток являются отражением их физиологического состояния. Несомненным преимуществом микроэлектрофореза является возможность зафиксировать изменения электрокинетических свойств клеток в реальном времени. Именно поэтому он был выбран в качестве метода исследования клеток при воздействии на них воды с бесконтактно измененным значением E_h .

Глава 2

Материалы и методы

2.1. Культура клеток

Описание культуры

В качестве тест-объекта использовались прессованные хлебопекарные дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*) ГОСТ 171-81.

Преимущества данного объекта в том, что он легко доступен, не требует предварительного лабораторного культивирования. Для восстановления жизнеспособности требуется разведение клеток в воде. Недостатки применения данной культуры в том, что вместе с клетками в раствор попадают различные вещества, входящие в состав брикета. В результате, приходится работать со средами неизвестного и переменного химического состава. На практике эта проблема может быть не слишком серьезной, тем не менее, точное знание условий предварительного роста исследованных клеток дает часть необходимой информации для адекватной интерпретации биохимических и биофизических особенностей их поведения. Для приведения клеточной суспензии в условия более или менее постоянного состава среды использовалось разбавление суспензии дистиллированной водой.

Требования к культуре, исходя из задач эксперимента

Следует отметить, что интерпретация экспериментов с периодической культурой достаточно сложна, поскольку в течение всей инкубации условия и, следовательно, свойства микроорганизмов непрерывно изменяются. Кроме того, возможность размножения клеток может сильно сказываться на результатах опыта.

Из литературных источников известно, что: 1) при изменении скорости роста наблюдалось изменение ЭКП клеток [20, 17] 2) в фазе активного размножения происходит увеличение ЭКП у бактерий и дрожжей [16, 66]; 3) когда клеточная популяция находится в переходных состояниях

наблюдается колебательное изменение ЭФП [32, 65]; 4) в зависимости от физиологического состояния клетки электрокинетические свойства различны [38].

Исходя из литературных данных и по результатам первоначальных опытов, были сформулированы требования к условиям модельной среды для временной культуры клеток: 1) необходимо создать стабильные условия, поддерживающие жизнедеятельность клеток по возможности на минимальном уровне; 2) свести к минимуму процессы роста и 3) исключить размножение клеток. Подобные условия достигались сильным разведением клеточной суспензии дистиллированной водой. При этом создаются необходимые условия для проведения исследования:

1. Малая ионная сила раствора приводит к увеличению электрокинетического потенциала.
2. Находясь в состоянии слабого отрицательного осмотического шока, клетка затрачивает дополнительную энергию на поддержание гомеостаза, следовательно, усиливается действие мембранных структур и митохондрий. Осмотический статус клетки влияет на плотность поверхностного заряда.
3. Клетка находится в состоянии голодания по источнику углерода. Такой лимитирующий фактор приводит к увеличению гетерогенности популяции. Различия свойств клеток внутри популяции можно зарегистрировать с помощью электрофореза.
4. В результате экспозиции в такой среде исключается проникновение в клетку чужеродных веществ или факторов способных повлиять на метаболизм реагентным путем. Этим обеспечивается чистота опыта.
5. Увеличивается точность эксперимента, т.к. при малой ионной силе проводимость раствора небольшая и при электрофорезе клеток токи не достигают величин, которые могут вызвать нежелательные явления на поверхности электродов (электролиз, газовыделение, растворение материала электрода и т.д.).

Размножение

В данной работе культивирование микроорганизмов не требовалось. Для получения клеточной суспензии клеточная масса разводилась водой перед опытом по мере надобности.

Дрожжи имеют низкую константу Михаэлиса для питательных веществ, поэтому рост культуры прекращался в связи с исчерпанием источника углерода. Почкующиеся клетки дрожжей не наблюдались.

2.2. Метод бесконтактной активации воды

В рамках данной работы, для изменения E_h микробиологических сред проводилась бесконтактная активация дистиллированной воды в бездиафрагменном электролизере. Схема опыта представлена на рис.1.

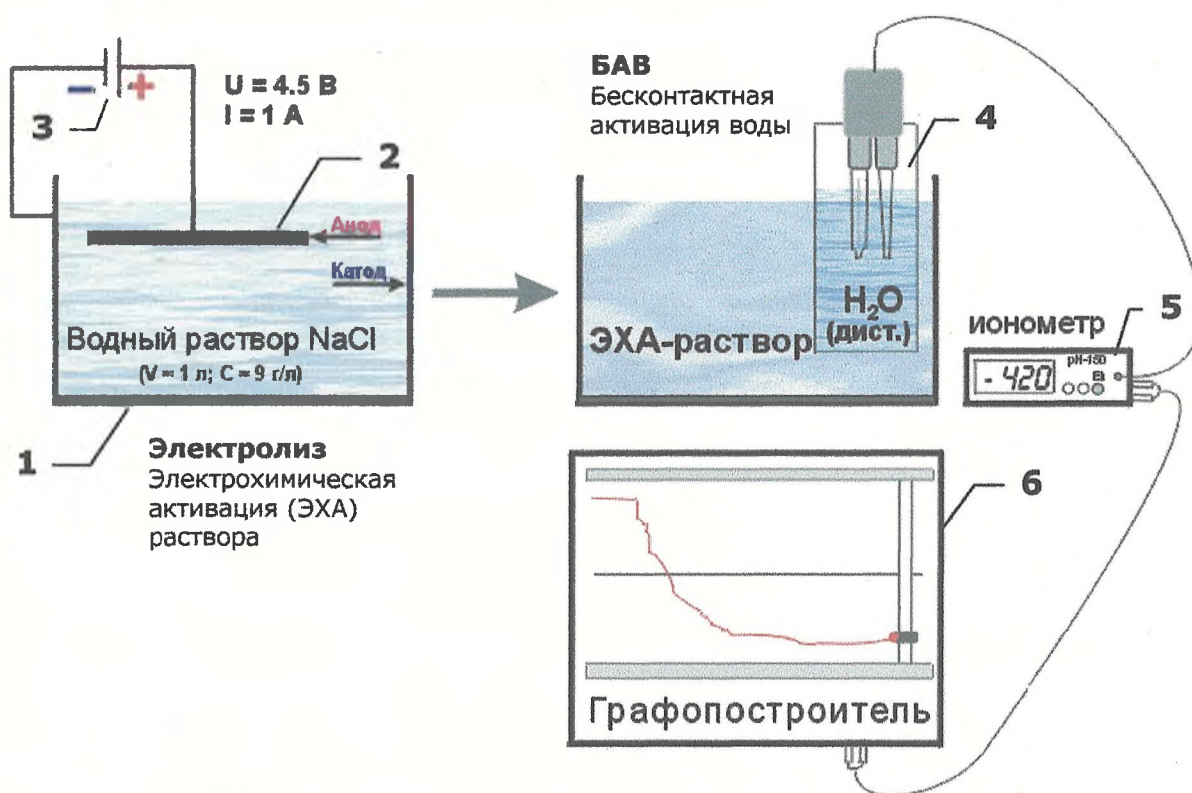


Рис. 1. Принципиальная схема опыта по бесконтактной активации воды.

Электролизная камера (1) представляет собой цилиндрическую ёмкость диаметром 16 см и высотой 6 см из нержавеющей стали медицинского применения (марка 12Н18Х9Т), которая одновременно служит катодом. В качестве анода (2) используется диск диаметром 10 см и толщиной 2 мм из титана с покрытием ОРТ (электрохимически стойкий сплав сложного состава, содержащий оксид рутения, платину, серебро и др.). В

электролизную камеру заливался слабый раствор соли NaCl ($V=\text{const}=1$ л, $C=\text{const}=9$ г/л) который подвергается электролизу при параметрах тока $I = 1$ А, $U = 4,5$ В. Напряжение на электродах обеспечивается источником питания постоянного тока Б5-49 (3). Анод в форме диска размещается в камере горизонтально, на глубине 1 см от поверхности жидкости.

Электролиз с указанными выше параметрами и раствором проводится в течение 15 минут, после чего анод вынимался из камеры. В результате электролиза в растворе создавалась электрохимически активированная неравновесная среда с $E_h \approx + 700$ мВ. При помещении в такую среду непроницаемой ёмкости с водным раствором в последнем возможно протекание бесконтактной активации жидкости (БАЖ).

Для бесконтактной активации в данной работе использовались герметичные одноразовые ёмкости из полиэтилена (4) с толщиной стенки $\approx 0,1$ мм, и размерами 6×12 см. В ёмкость помещалась дистиллированная вода объемом $V = 40$ мл. Ёмкость с водой погружалась в ЭХА-среду электролизной камеры через 3 мин после прекращения в ней электролиза. При этом исключалась возможность непосредственного контакта этих двух сред. В дистиллированной воде измерялся E_h с помощью ионметра рН-150, и результаты непрерывно записывались на двухкоординатном самопишущем приборе.

2.3 Метод электрофореза

В данной работе используется разновидность метода электрофореза, которая для краткости именуется как "знакопеременный электрофорез".

Сущность метода очень кратко можно охарактеризовать с помощью его полного названия: "метод прижизненного знакопеременного клеточного микроэлектрофореза". Расшифровка этого названия представляет собой описание данного метода.

В данном случае "прижизненный" и "клеточный" означает, что для исследования используются живые клетки (микроводоросли, дрожжи, бактерии и т. д.), в отличие от методов, в которых изучаются

биологические частицы неклеточного строения, а так же вирусы и инертные частицы, покрытые исследуемым веществом (белки, антитела и т. д.). Возможность прижизненного исследования является преимуществом метода, поскольку позволяет вести наблюдения клеток непосредственно в процессе их жизнедеятельности.

Слово "знакопеременный" отражает специфику данного метода, которая отличает его от остальных. В обычных методах электрофореза, клетки, под действием постоянного поля проходят определенное расстояние ($s = \text{const}$) и фиксируется время их движения. Чем больше заряд клетки, тем меньше время движения.

Иной принцип лежит в основе знакопеременного метода. Время действия тока *одной направленности* является постоянной величиной ($t = \text{const}$), а фиксируется расстояние, которое проходит клетка. Чем больше поверхностный заряд клетки, тем большее расстояние она проходит. После этого заряд на электродах меняется и между ними возникает электрический ток *противоположной направленности*. Клетка в любом случае движется к электроду заряд которого противоположен собственному заряду клетки, но при смене знаков на электродах *направление движения* меняется на противоположное. В результате можно наблюдать возвратно-поступательные колебания клеток в такт колебаниям направленности внешнего поля. Таким образом, частота колебаний клеток равна частоте смены знаков на электродах, но амплитуда колебания может быть различной в зависимости от заряда клетки. Под амплитудой колебания клеток в данном методе понимается расстояние, которое проходит клетка в поле зрения микроскопа под действием $1/2$ периода смены направленности поля. За один период смены знаков на электродах клетка движется в прямом и обратном направлении. В случае отсутствия течений в электрофоретической камере она возвращается в то же место, откуда начинала свое движение.

Поскольку для наблюдения клеток применяется микроскоп, то данный метод следует называть "микроэлектрофорезом", в отличие от метода подвижной границы, когда можно невооруженным глазом определить смещение суспензии клеток, например эритроцитов, в капилляре, под действием поля. Можно кратко перечислить преимущества микроэлектрофореза, которые наиболее важны для данной работы: 1) при использовании высокого увеличения, обеспечивается большая чувствительность измерений 2) форма, размер и ориентация частиц могут быть определены одновременно с электрофоретической подвижностью; 3) наблюдения проводятся при низкой концентрации частиц, так что взаимодействие между ними исключено; 4) возможно измерение различий в электрофоретической подвижности отдельных клеток. На основании этого можно сделать выводы о гетерогенности ЭКС свойств популяции исследуемых клеток [38].

Для создания знакопеременного поля используется устройство аналогичное "устройству для оценки электрокинетических свойств клеток букального эпителия", запатентованного М.С. Гончаренко, Е.А. Ерещенко, Д.Л. Хавжу в 1994 году. В данной работе использовался прецизионный прибор (генератор сигналов специальной формы программируемый Г6-31) работающий по тому же принципу.

Преимуществами метода являются простота, невысокая стоимость, возможность определения электроповерхностных свойств при различных физиологических состояниях исследуемых клеток.

Вместе с тем метод еще недостаточно разработан и нуждается в дальнейшем совершенствовании как самого прибора, так и методических подходов к работе. Но уже сейчас с помощью него получено много экспериментальных данных [40, 43, 56 - 59, 72].

2.3.1. Электрофоретическая ячейка и схема установки для микроэлектрофореза

Для определения ЭКС клеток использовалась упрощенная горизонтальная прямоугольная одноразовая электрофоретическая ячейка. Конструкция ячейки представлена на рис.2.

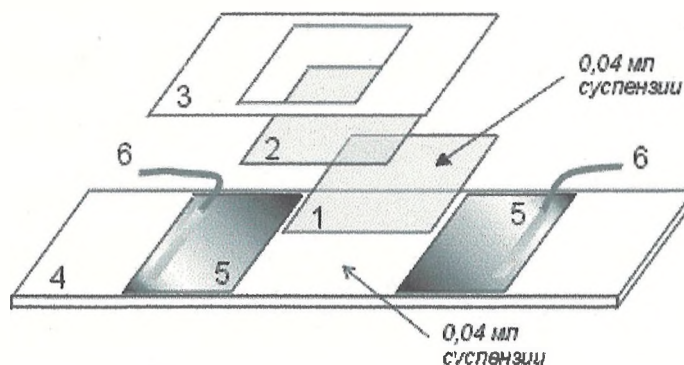


Рис. 2. Конструкция камеры для исследования электрокинетических свойств микрочастиц, взвешенных в жидкостях. Вид камеры в разобранном виде.

Основанием ячейки является стандартное предметное стекло (4) на котором фиксированы серебряные электроды (5). Расстояние между электродами $l = 2.5$ см. На предметном стекле, между электродами располагается электрофоретическая камера одноразового использования. Она образована двумя покровными стёклами (1 и 2), одинаковыми по размеру. Первое стекло (1) образует дно ячейки, второе (2) - верхнюю стенку. Сверху вся система накрывается бумажным фильтром (3)

Установленная на предметном столике микроскопа данная камера, с помощью проводов (6) подключается к электрической цепи. Схема подключения знакопеременного генератора и измерительных приборов представлена на рис. 3.

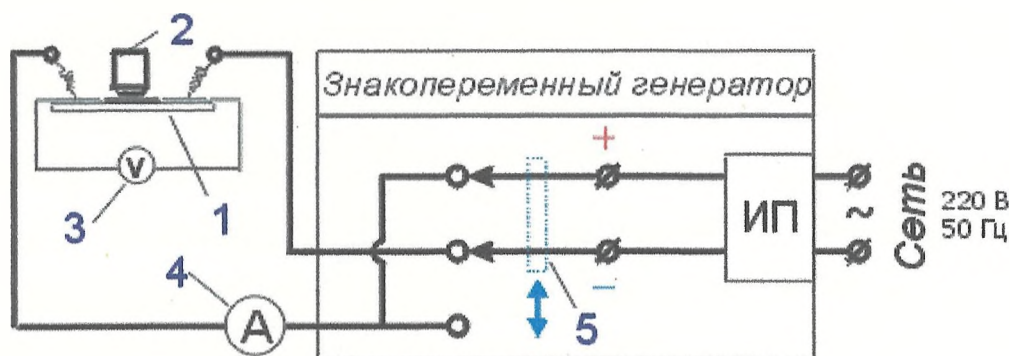


Рис. 3. Принципиальная схема установки для электрокинетических исследований. 1 - электрофоретическая ячейка; 2 - объектив микроскопа; 3 - вольтметр; 4 - микроамперметр; 5 - автоматический переключатель полюсов на электродах камеры; ИП - источник питания.

При подаче на электроды знакопеременного электрического тока ($U=10$ В, частота 10^{-1} Гц, амплитуда - меандр), клетки находящиеся в камере совершают вынужденные колебания. Амплитуда колебаний прямо пропорциональна скорости движения клеток, которая в свою очередь прямо пропорционально зависит от поверхностного заряда клетки. В результате клетки с различными электрокинетическими свойствами отличаются по величине амплитуды колебаний, при одинаковой частоте смены направления поля. На этом основано определение гетерогенности свойств клеток и примерное определение величины электрофоретической подвижности.

2.3.2. Методика установки ячейки и проведения опытов

Поскольку данная глава может послужить технико-методическим обоснованием для последующих разработок и опытов, считаю необходимым обратить особое внимание на приемы и отдельные детали работы, которые могут оказать влияние на результаты подобных исследований.

Электрофоретическая камера в данном методе является одноразовой и готовится к каждому опыту по единой схеме. На предметное стекло, между электродами, наносили 0,04 мл исследуемой суспензии клеток, накрывали каплю первым покровным стеклом. На первое покровное стекло также

наносилось 0,04 мл исследуемой жидкости с клеточным тест-объектом и накрывалось вторым покровным стеклом. Раствор не выходит за пределы камеры за счет поверхностного натяжения жидкости. Система из двух покровных стекол удерживается между собой, и образует электрофоретическую камеру, в которой обеспечивается равенство объема жидкости от опыта к опыту.

Сверху, на стекла, помещается стандартный фильтр, для предотвращения испарения, создания контакта жидкости с электродами, а также разделения суспензии и веществ выделяющихся на электродах. Стандартный фильтр - это рамка из фильтровальной бумаги, смоченная в исследуемом растворе. Ширина рамки соответствует ширине предметного стекла, длина подбирается таким образом, чтобы оба электрода приблизительно на $1/3$ были покрыты краями бумаги. Вырезанный прямоугольник в центре, немного меньший по размеру, чем покровное стекло, позволяет рассматривать клетки в микроскоп.

Возможность применения фильтровальной бумаги в качестве фильтра для устранения перехода материала электродов в раствор показана в работе [85], при этом воспроизводимые результаты наблюдались в течении более чем 5 дней. При проведении экспериментов в данной работе, стандартные бумажные фильтры менялись через каждые 3 пробы.

Чтобы клетки не прилипали к поверхности стекла предметные и покровные стекла очищались 70% этанолом и высушивались на фильтровальной бумаге.

После установки электрофоретической ячейки включается электрическая цепь, и производятся измерения амплитуды колебаний клеток в поле зрения микроскопа по окулярной линейке. Отсчет амплитуды производился обязательно по одному и тому же краю клетки.

Иногда во время измерения кинетики наблюдаются течения жидкости, вызванные неравномерным испарением воды с поверхности фильтра. Вообще течения жидкости в электрофоретических ячейках является

серьезной методической проблемой в исследованиях подобного рода. Способам их устранения уделяется много внимания в монографиях по электрофорезу [38, 20].

Т.к. при смене знаков движение клетки меняется на противоположное, то можно легко учитывать влияние течений, которые изменяют истинную картину движения клеток, т.к. в результате возвратно-поступательных движений клетки каждый раз возвращаются не в то же самое место, откуда они начинали свое движение. Для устранения подобных ошибок в таблице наблюдения фиксировалось 3 показания: L_1 - первое зафиксированное положение клетки, L_2 - положение клетки в результате одного смещения под действием $1/2$ периода смены знаков на электродах, L_3 - положение клетки через 1 период смены знаков. В случае отсутствия течений значения L_1 и L_3 - совпадают. Смещение клетки под воздействием $1/2$ периода смены знаков на электродах вычисляется по формуле:

$$L_0 = \frac{|L_2 - L_1| + |L_2 - L_3|}{2}$$

Таким образом, течения жидкости в камере учитываются, что является преимуществом данного метода.

2.3.3. Стационарный уровень электрофоретической ячейки

В электрофоретических ячейках любых типов существуют различия в скорости электрофореза на разном удалении от стенок камеры. Это обусловлено влиянием на скорость частицы электроосмоса (движения жидкости под действием электрического поля относительно заряженной поверхности стенок ячейки). На рис. 4 показано распределение скоростей электроосмоса и электрофореза.

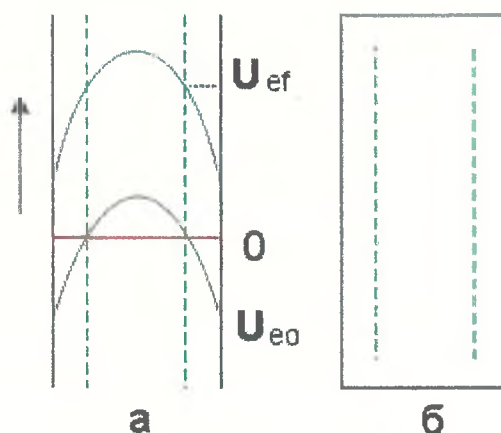


Рис. 4. Распределение скоростей электроосмоса (1) и электрофореза (2) (а) в электрофоретической ячейке прямоугольного сечения (б).

Стационарные уровни показаны пунктиром [20].

На рисунке обозначено (красная линия), что на определенном расстоянии от стенок камеры скорость электроосмоса обращается в нуль. При этом наблюдаемая скорость частицы совпадает с истинной скоростью электрофореза. Этот уровень был назван стационарным (зеленый пунктир). В случае плоской ячейки этих уровней два, они расположены на глубине, составляющей 0,21 и 0,79 от толщины ячейки, независимо от ее толщины и скорости электроосмоса [20].

В соответствии с литературными источниками разные авторы применяют ячейки различных конструкций, причем глубина колеблется: 0,07 мм - исследование бактерий [80], 0,1 мм - большинство исследований [38, 65, 20] 0,4 мм - дрожжи [66] 0,6 мм - капли масла [84], размеры могут превышать эти значения.

Одним из преимуществ данного метода является малая толщина камеры электрофоретической ячейки. Расчет поперечного сечения камеры:

Размеры покровных стекол: $2 \times 2 \text{ см} = 0,02 \times 0,02 \text{ м}$

Объем камеры: $0,04 \text{ мл} = 4 \times 10^{-8} \text{ м}^3$

Глубина камеры: $\frac{4 \times 10^{-8}}{0,02 \times 0,02} = 1 \times 10^{-4} \text{ м} = 0,1 \text{ мм}.$

Стационарные уровни ячейки, в данной работе, примерно сопоставимы с размерами дрожжевых клеток. Стационарный уровень будет располагаться

на расстоянии $0,1 \text{ мм} \times 0,21 = 0,021 \text{ мм} = 21 \text{ мкм}$ от нижней стенки камеры. Примерные размеры дрожжевых клеток $10 - 20 \text{ мкм}$ [51]. Клетки дрожжей имеют плотность большую, чем у воды и поэтому оседают на дно. Учитывая, что они не прилипают ко дну камеры, можно заключить, что клетки находятся на стационарном уровне данной ячейки, а значит, наблюдаемая скорость частиц является действительной скоростью электрофореза. Следует отметить, что в применяемой камере положение стационарного уровня подвержено незначительным колебаниям от опыта к опыту. Так как глубина камеры может изменяться в зависимости от объема жидкости между стеклами. Данная особенность не является серьезной проблемой в работах ставящих своей целью изучение гетерогенности популяции, качественного определения ЭФП клеток, или приближенной количественной оценке подвижных клеток в поле зрения микроскопа. Более того, это является преимуществом метода, поскольку стационарный уровень можно настраивать в соответствии с размерами клеток простым изменением объема суспензии между стеклами камеры. Для определения величины ЭКП клеток требуется дальнейшее совершенствование метода.

В процессе опытов было замечено, что при быстрой установке ячейки и измерении амплитуды первое значение выбивалось из общей картины (больше в $1,5 \dots 2$ раза). Данная погрешность, несомненно, является объектной ошибкой и объясняется тем, что клетки располагаются не на стационарном уровне камеры. Поэтому после установки препарата и перед включением прибора выдерживалось время $\sim 20 \text{ с}$ для оседания клеток. Выполняя это условие можно считать, что фокусировка микроскопа на плоскость, в которой расположены клетки одновременно, означает фокусировку на стационарный уровень электрофоретической камеры.

2.4. Применяемые формулы и статистическая обработка результатов

Цель статистической обработки - извлечение из полученных данных заключенной в них информации, получение на основании проведенного исследования объективных и убедительных выводов [30].

Определение понятий, которые применяются для описания данных:

Измерение - одно значение амплитуды колебаний для одной клетки.

Проба - несколько измерений сделанных в одной электрофоретической камере.

Опыт - несколько исследованных проб одной и той же суспензии клеток.

В 1 пробе, как правило, 15 (реже 12) измерений. Для каждой пробы определяли: среднее арифметическое $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$ (3); стандартное отклонение

$S = \sqrt{\frac{1}{n} \sum (x_i - \bar{x})^2}$ (4); ошибку среднего $S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n-1}}$ (5); и коэффициент вариации.

Коэффициент вариации.

При наложении на клеточную суспензию электрического знакопеременного поля заряженные объекты, совершают колебательные движения, с одинаковой частотой 10^{-1} Гц, но с различной амплитудой колебания (A), которая прямо пропорциональна скорости движения (V) клетки. Скорость движения, при прочих равных условиях, зависит от заряда поверхности клетки. Разброс значений внутри одной пробы объясняется различием электроповерхностных свойств клеток и в некоторой степени различием их внутренних свойств. Чем более разнородные клетки составляют популяцию, тем больше будет размах вариации амплитуды колебаний при одинаковых внешних условиях. Существует несколько способов учета степени варьирования признака. В данной работе применяется коэффициент вариации:

$$CV = 100 \frac{S}{\bar{x}} \% \quad (6)$$

где S - стандартное отклонение, $\bar{x}$ - среднее арифметическое [30].

Преимущества данного коэффициента: Величина коэффициента вариации не именованная, выражается в процентах и не зависит от величины амплитуды. Т.е. данный коэффициент отражает только внутригрупповые причины варьирования свойств клеток и практически не зависит от особенностей применяемой электрофоретической камеры. Это очень важно, т.к. в соответствии с методикой данной работы необходимо сравнивать результаты, полученные в различных одноразовых ячейках.

2.5. Схема и методика эксперимента

Для обнаружения и определения эффекта влияния бесконтактно активированной воды на живые клетки, Было проведено 3 серии опытов. Целью первых опытов было обнаружить эффект влияния бесконтактно активированной воды на живые клетки. Вторые опыты имели цель сравнить степень влияния активированной и неактивированной воды на клетки. Третий тип опытов уточняет закономерность влияния активированных и неактивированных растворов.

Опыт №1 Измерение варьирования амплитуды колебания клеток в процессе бесконтактной активации среды. Определялась зависимость величины варьирования амплитуды колебания для клеток *Saccharomyces cerevisiae* от значения Eh среды, который изменялся в процессе культивирования микроорганизмов.

Опыт проводился по схеме представленной на Рис. 5.

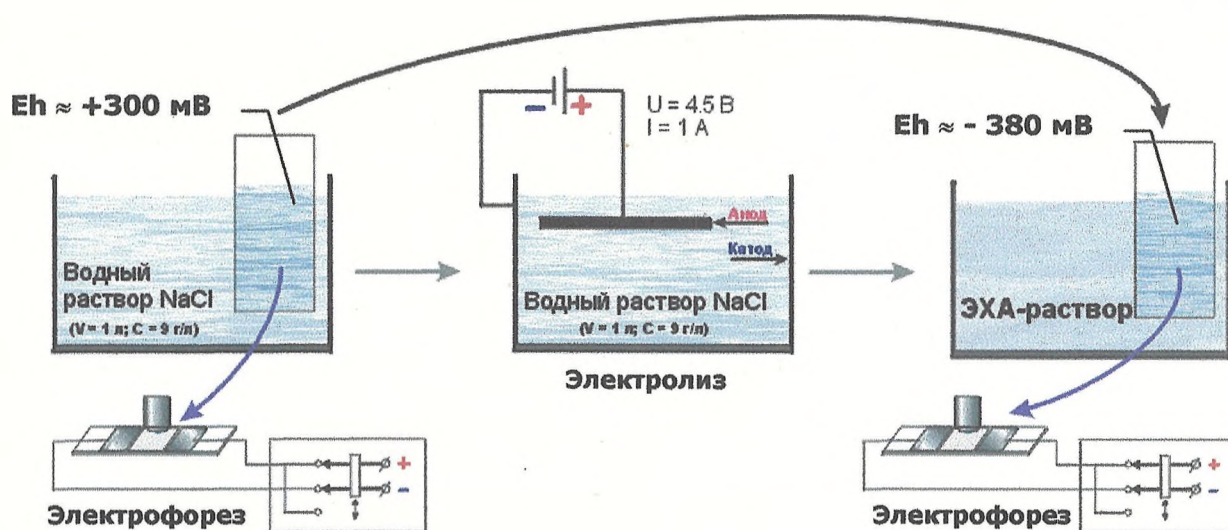


Рис. 5. Принципиальная схема опыта по определению влияния Eh среды на величину варьирования амплитуды колебания клеток *Saccharomyces cerevisiae*.

Приготавливалась суспензия с разведением 1 г клеточной массы на 1000 мл дистиллированной воды. Для этого 0,2 мл начальной суспензии (1 г на 5 мл H_2O) разводилось в 40 мл дистиллированной воды. Полученная культура клеток в герметичной емкости помещалась в раствор $NaCl$ ($C = 9$ г/л, $V = 1$ л), который имитировал ЭХА-раствор. Культура клеток находилась в среде с $Eh(\text{среды}) = +300$ мВ. Несколько проб по $\approx 0,1$ мл каждая, исследовались с шагом в 20...50 минут (в зависимости от опыта) методом электрофореза. Затем ёмкость с клеточной суспензией переносили в ЭХА-раствор $NaCl$ ($C = 9$ г/л, $V = 1$ л), который предварительно подвергался электролизу $t = 15$ мин с параметрами тока $I = 1$ А, $U = 4,5$ В. Погружение ёмкости с культурой клеток производилось через 3 минуты после прекращения электролиза. В результате бесконтактной активации происходило изменение Eh среды. Изменение Eh раствора измерялось с помощью ионметра рН 150 и записывалось на двухкоординатном графопостроителе. Эти изменения представлены на графиках. При этих условиях также производился отбор проб по $\approx 0,1$ мл каждая с шагом в 10...50 минут (в зависимости от опыта), для исследования методом электрофореза.

Опыт №2 Сравнение варьирования амплитуды колебания клеток в контрольной среде со стандартным значением E_h и в среде с бесконтактно измененным значением E_h . Сравнивались опытные и контрольные суспензии клеток, которые находились в растворах одинакового химического состава, но с разными значениями E_h среды.

Опыт проводился по схеме представленной на Рис. 6.

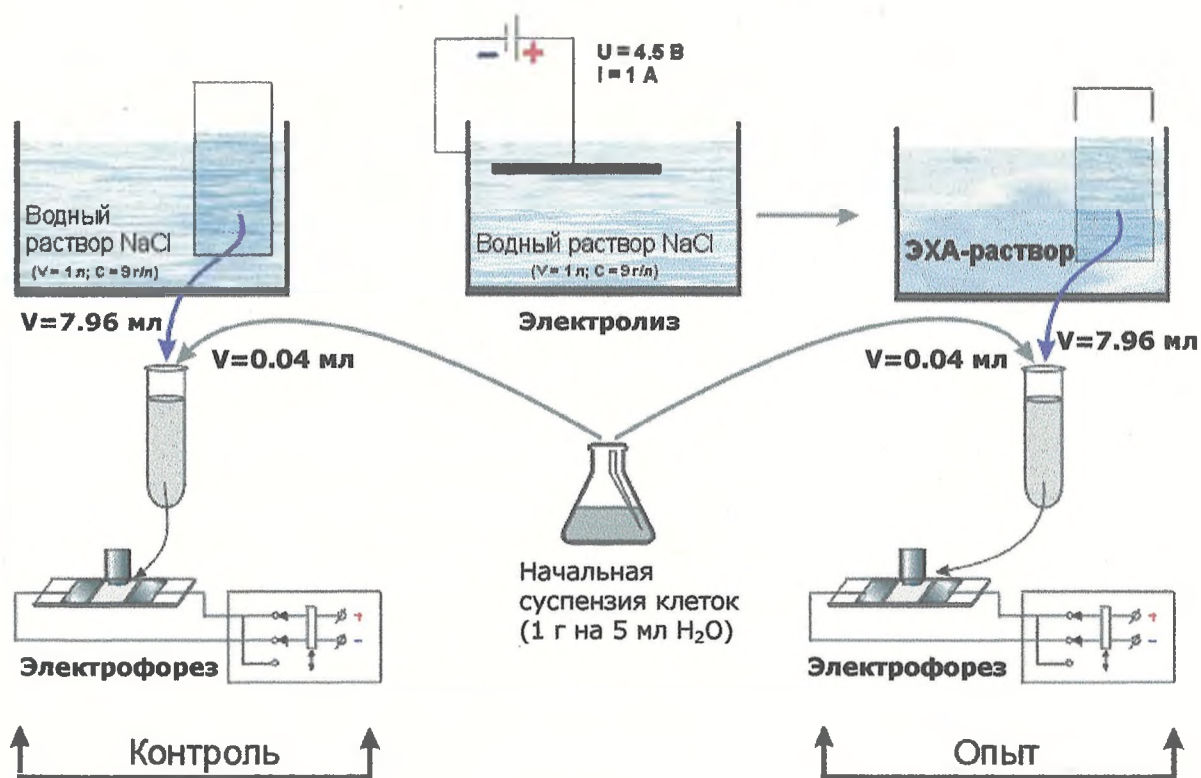


Рис. 6. Принципиальная схема опыта по сравнению варьирования амплитуды колебания клеток в контрольной среде со стандартным значением E_h и в среде с бесконтактно измененным значением E_h .

Начальная суспензия клеток разводилась из расчета 1 г клеточной массы на 5 мл H_2O .

Для получения дистиллированной воды со смещенным значением E_h в электролизной камере в течение 15 минут происходил электролиз водного раствора $NaCl$ ($V = 1$ л, $C = 9$ г/л). После электролиза, в ЭХА-раствор помещалась герметичная полиэтиленовая емкость с дистиллированной водой $V = 40$ мл. Бесконтактная активация воды продолжалась 15 минут, за это время E_h изменялся с +300 до - 380 мВ. После БАЗ из полиэтиленовой ёмкости извлекалось 7,96 мл воды, которой разводилось

0,04 мл начальной суспензии. Полученная культура клеток являлась опытной.

Для получения контрольной культуры клеток 0,04 мл исходной суспензии разводили в 7,96 мл дистиллированной воды взятой из полиэтиленовой емкости помещенной в водный раствор NaCl ($V = 1\text{ л}$, $C = 9\text{ г/л}$), который имитировал ЭХА-раствор.

Из пробирок с контрольной и опытной культурой клеток попеременно извлекали пробы по $\approx 0,1$ мл каждая, для исследования методом электрофореза.

Опыт №3. Исследовались разные культуры клеток в неактивированной и активированной воде независимо друг от друга (в разные дни) для: 1) определения зависимости варьирования амплитуды колебания клеток от времени нахождения культуры в неактивированной среде; 2) определения зависимости варьирования амплитуды колебания клеток от времени нахождения культуры в активированной среде

Начальная суспензия клеток разводилась из расчета 1 г клеточной массы на 5 мл H_2O . В первом случае 0,04 мл начальной суспензии разводилось в 7,96 мл дистиллированной воды со стандартным значением $E_h \approx +300\text{ мВ}$. Во втором случае 0,04 мл начальной суспензии разводилось в 7,96 мл активированной дистиллированной воды со смещенным значением $E_h \approx -380\text{ мВ}$. Способ активации, как и предыдущих опытах.

Из культур клеток находящихся в соответствующих средах, через небольшие промежутки времени (10...30 мин) производился отбор проб по $\approx 0,1$ мл каждая, для исследования методом электрофореза.

Схемы опытов представлены на Рис. 7 и 8.

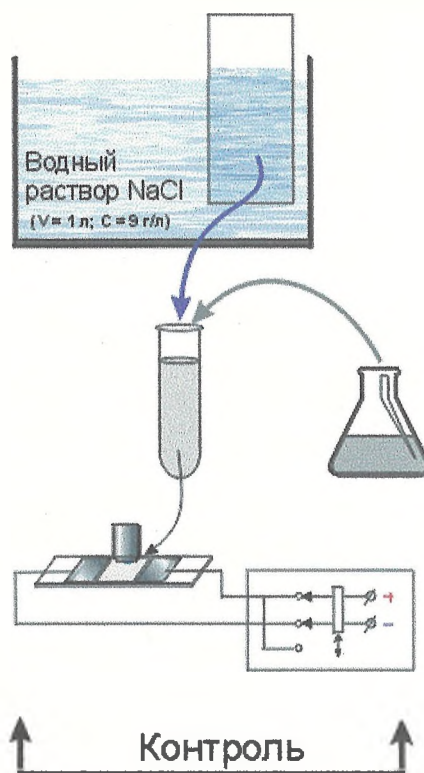


Рис. 7. Принципиальная схема опыта по определению зависимости варьирования амплитуды колебания клеток от времени нахождения культуры в неактивированной среде.

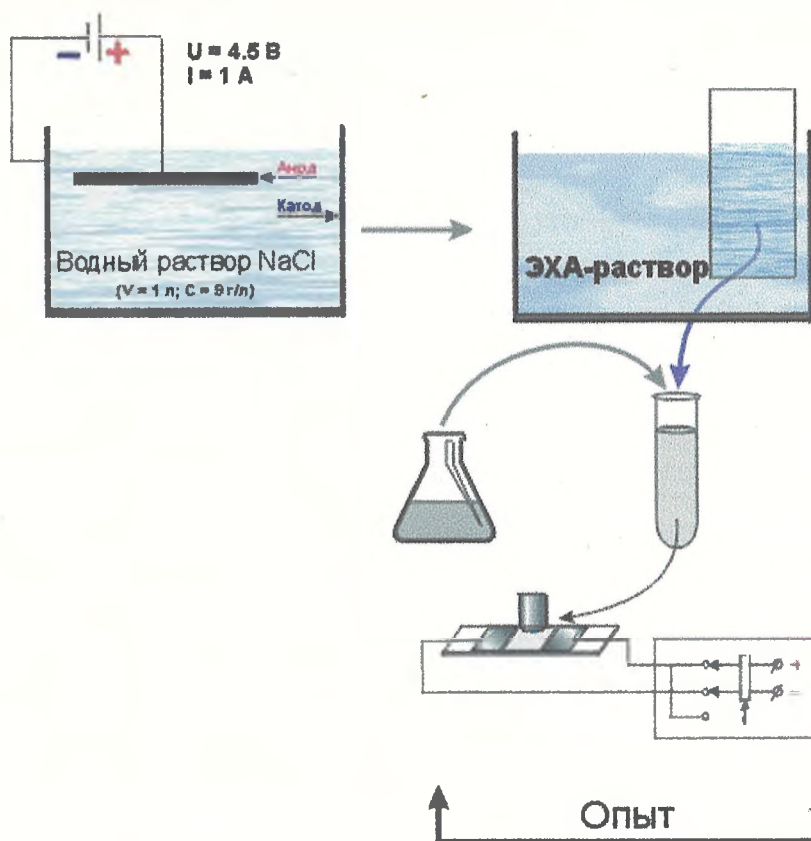


Рис. 8. Принципиальная схема опыта по определению зависимости варьирования амплитуды колебания клеток от времени нахождения культуры в активированной среде.

Глава 3.

Результаты опытов и их обсуждение

3.1. Опыты по бесконтактной активации водных растворов

В рамках данной работы были проведены опыты по бесконтактной активации воды. Описание и схема опыта приведена в разделе 2.2. Были получены следующие результаты:

Типичная картина изменения Eh дистиллированной воды представлена на Рис. 9. В данном случае график отражает усредненные данные по результатам 18 опытов:

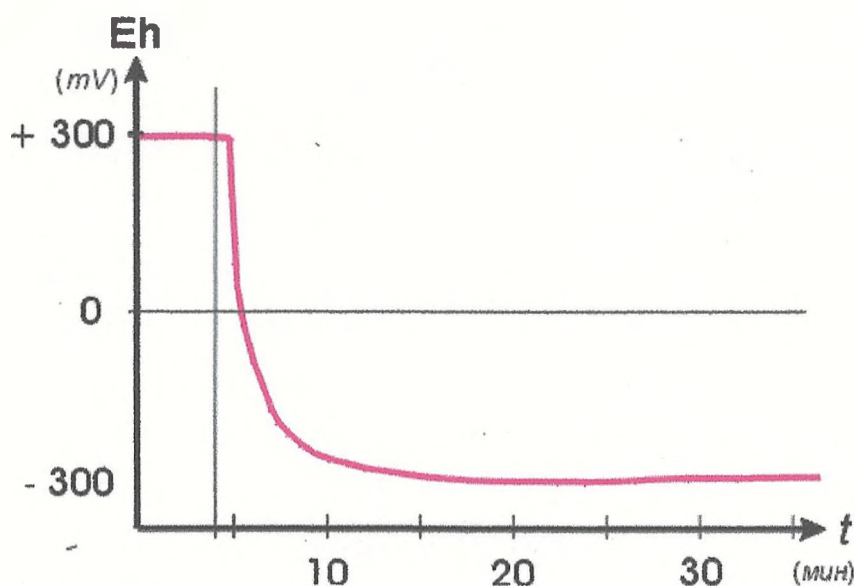


Рис. 9. Зависимость ОВП дистиллированной воды от времени бесконтактной активации (вертикальная линия - момент погружения ёмкости в ЭХА-раствор).

Если извлечь емкость из ЭХА-раствора, то наблюдается релаксация ОВП. На Рис. 10 приводится график изменения Eh после прекращения влияния ЭХА-раствора.

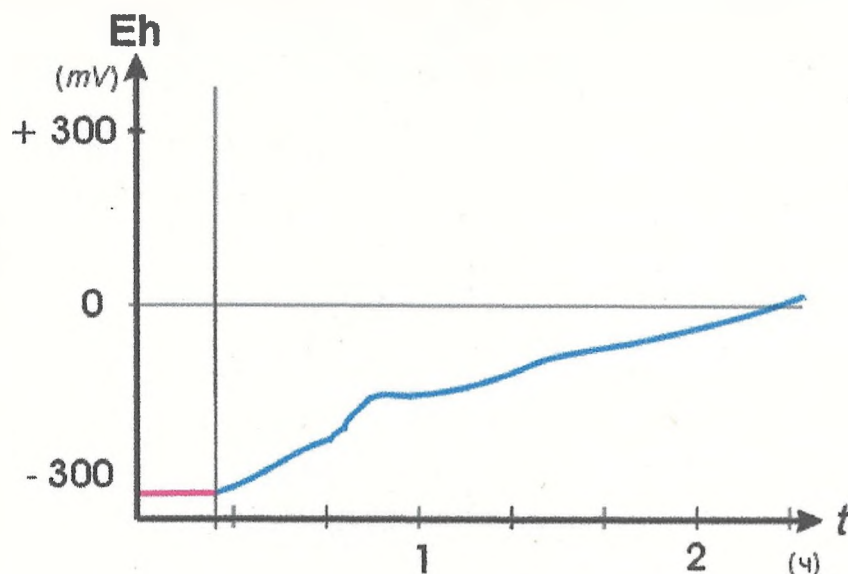


Рис. 10. Зависимость ОВП активированной дистиллированной воды от времени, после прекращения бесконтактного воздействия ЭХА-раствора (вертикальная линия обозначает момент извлечения ёмкости из ЭХА-раствора).

Следует обратить внимание на шкалу времени при сравнении графиков. Процесс активации происходит достаточно быстро 0,5... 10 мин. в то время как релаксация может продолжаться несколько часов.

Обсуждение и выводы:

Процесс бесконтактной активации зависит от многих внешних факторов, которые не поддаются учету. При сохранении общих закономерностей, характер протекания и результаты бесконтактной активации варьируют от опыта к опыту. Например, выход отрицательного значения E_h на плато не имеет четких временных границ (может находиться в пределах 0,5...20 минут). Отрицательное максимальное значение E_h для дистиллированной воды, которое может быть достигнуто при одинаковых условиях, так же может значительно колебаться в пределах -250...-540 мВ. Время релаксации зависит от условий хранения жидкости.

Существует множество различных гипотез объясняющих механизмы активации и релаксации жидкостей. В задачи данной работы не входило исследование глубоких физических основ данного явления, поэтому данные гипотезы здесь не приводятся. В данной работе феномен БАЖ

используется для получения микробиологических сред с измененными значениями E_h . В соответствии с задачами эксперимента эмпирически найдены условия необходимые для получения требуемых сред:

1. Для достижения стабильного уровня $E_h \approx +700$ мВ в бездиафрагменном электролизере необходимо затратить время не более 15 минут. В результате электролиза при указанных параметрах нагрев среды составляет $\Delta t = 0,5$ °С за 20 минут электролиза. Поэтому время электролиза ограничено 15 минутами. За этот период величина нагрева среды не превышает погрешности применяемого термометра и в силу незначительности ей можно пренебречь.
2. Для достижения стабильного уровня $E_h \approx -370$ мВ при бесконтактной активации дистиллированной воды в герметичной емкости необходимо затратить время не менее 10 минут. Максимальное время выхода E_h на плато составляет в среднем 10 минут, поэтому время БАВ в большинстве опытов составляла 15 мин.
3. Более или менее повторяемые результаты достигаются перемешиванием дистиллированной воды при БАВ.

3.2. *Опыты по изучению влияния активированных и неактивированных сред на свойства культуры клеток методом электрофореза*

Для обнаружения и определения эффекта влияния бесконтактно активированной воды на живые клетки, Были проведены 3 серии опытов. Результаты опытов приводятся ниже.

Опыт №1 Измерение варьирования амплитуды колебания клеток в процессе бесконтактной активации среды. Определялась зависимость величины варьирования амплитуды колебания для клеток *Saccharomyces cerevisiae* от значения E_h среды, который изменялся в процессе культивирования микроорганизмов.

Результаты представлены на рис. 11-13. На графиках показан коэффициент вариации амплитуды колебания клеток в зависимости от E_h среды, в которой находятся клетки. В ходе опыта E_h меняется в результате

бесконтактной активации суспензии клеток. Значение ОВП среды отмечено на этом же графике по вспомогательной оси.

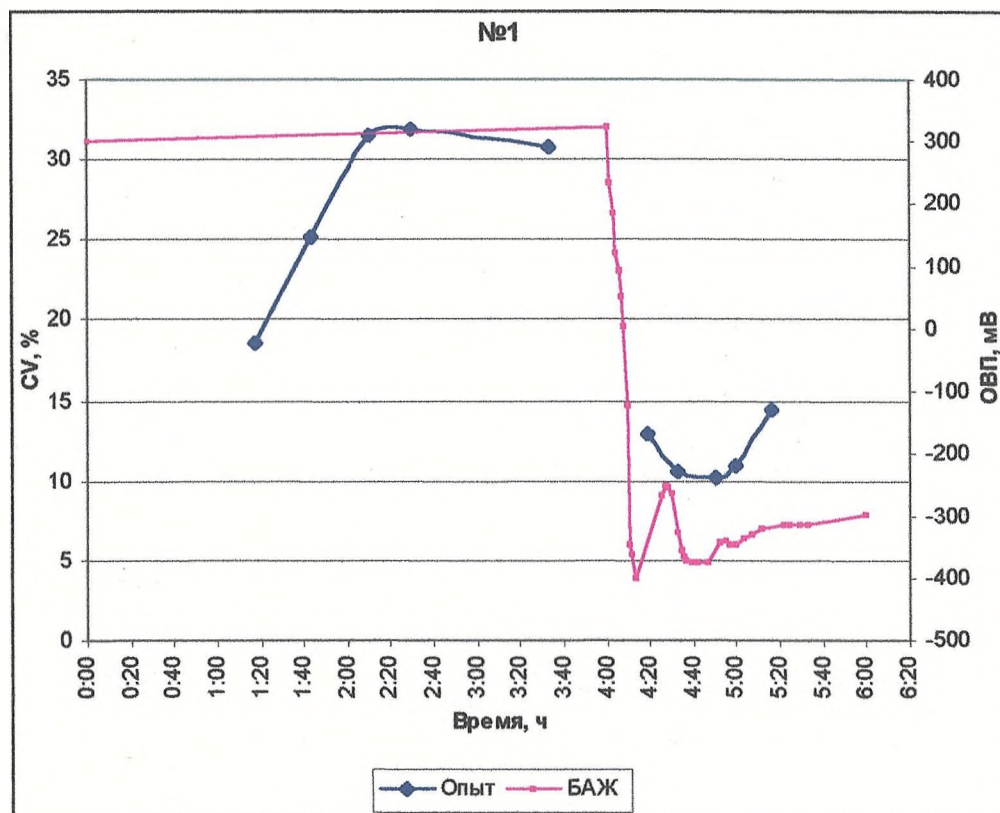


Рис. 11. Изменение коэффициента вариации амплитуды колебания клеток в процессе бесконтактной активации среды. Дата опыта: 04.05.2001

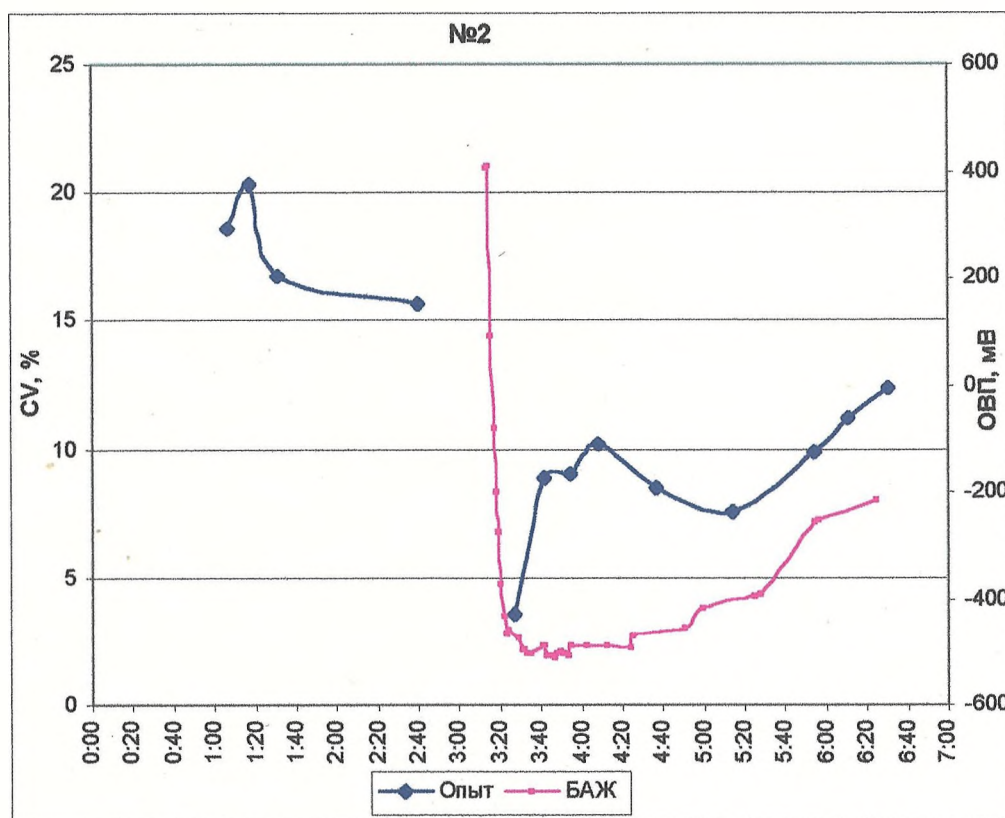


Рис. 12. Изменение коэффициента вариации амплитуды колебания клеток в процессе бесконтактной активации среды. Дата опыта: 02.06.2001

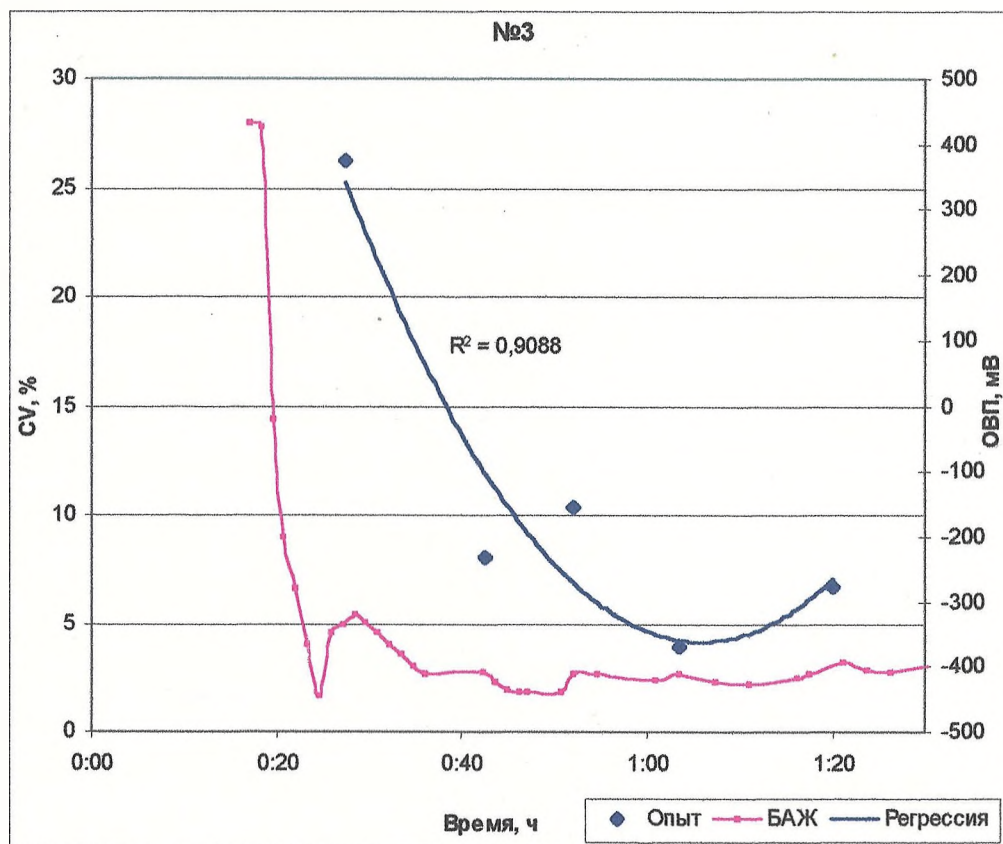


Рис. 13. Изменение коэффициента вариации амплитуды колебания клеток в процессе бесконтактной активации среды. Дата опыта: 29.05.2001

Выводы по результатам измерения варьирования амплитуды колебания клеток в процессе бесконтактной активации среды

1. Наблюдается уменьшение коэффициента вариации при снижении ОВП среды в область отрицательных значений. Величина изменения коэффициента вариации составляет от 5 до 17%. Существует повторяемость данного изменения от опыта к опыту.
2. Изменения коэффициента вариации происходят в очень короткий промежуток времени после погружения емкости с суспензией в ЭХА-раствор. (этому не соответствует первая точка на рис.13, график №3)

Опыт №2 Сравнение варьирования амплитуды колебания клеток в контрольной среде со стандартным значением Eh и в среде с бесконтактно измененным значением Eh.

В данной серии опытов сравнивались опытные и контрольные суспензии клеток, которые находились в растворах одинакового химического состава, но с разными значениями Eh среды. Обращает на себя внимание тот факт, что уровень гетерогенности культуры клеток в опыте, как правило, ниже уровня гетерогенности культуры клеток в контроле. Причем данная закономерность повторяется от опыта к опыту.

На рис.14-24 представлены графики показывающие различия в коэффициенте вариации клеток между контрольной и опытной культурой клеток.

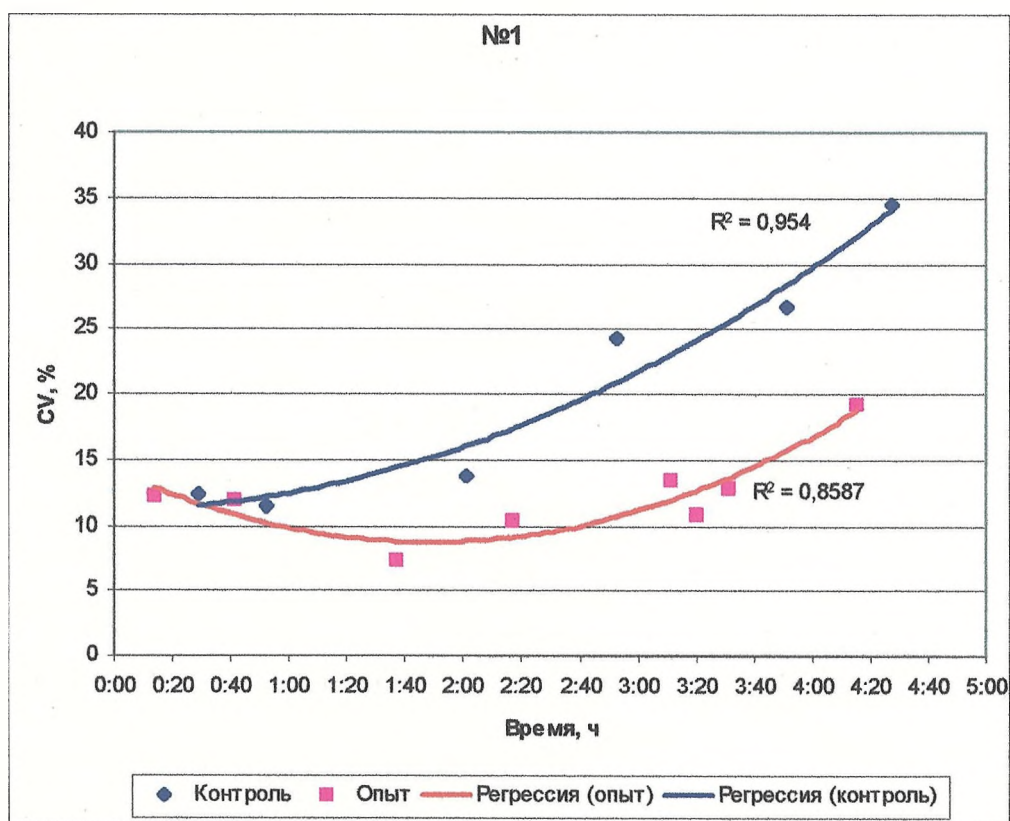


Рис. 14. Сравнение коэффициента вариации амплитуды колебания клеток в среде со стандартным значением Eh (контроль) и в активированной среде с бесконтактно измененным значением Eh (опыт). Дата опыта: 31.05.2001 (Примечание: В данном опыте емкости с суспензиями клеток (V=40 мл) постоянно находятся в растворах NaCl (контрольная - в неактивированной среде, опытная - в ЭХА-растворе). Таким образом, уровень Eh в каждой суспензии поддерживается на сравнительно постоянном уровне)

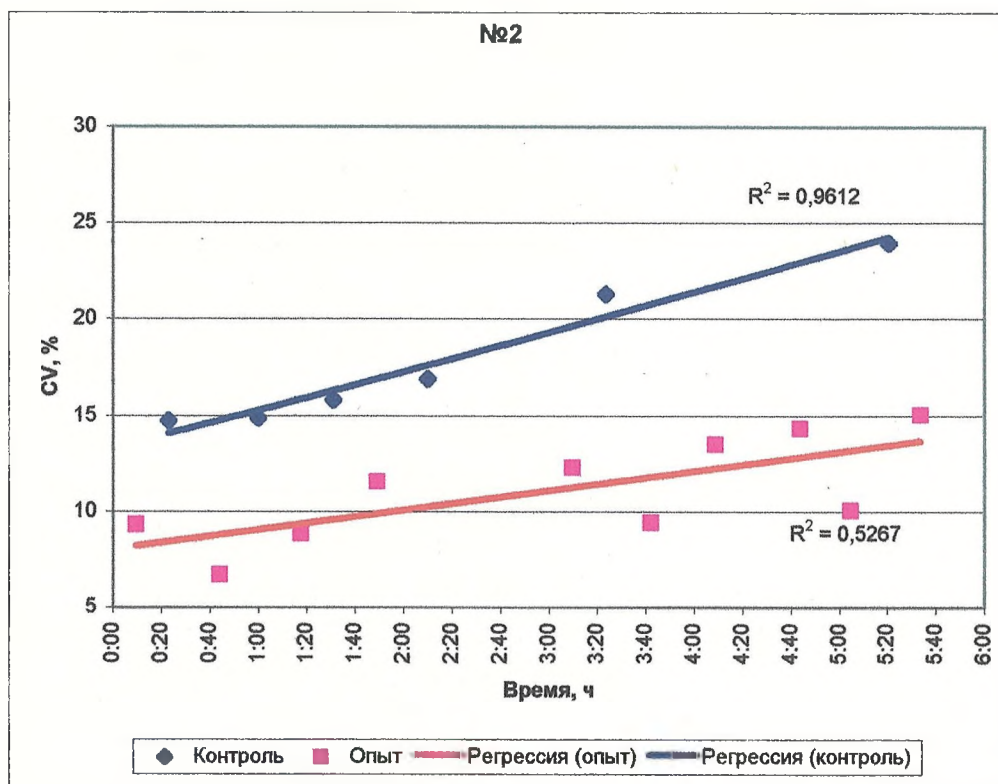


Рис. 15. Сравнение коэффициента вариации амплитуды колебания клеток в среде со стандартным значением Eh (контроль) и в активированной среде с бесконтактно измененным значением Eh (опыт). Дата опыта: 30.05.2001

(Примечание: В данном опыте емкости с суспензиями клеток ($V=40$ мл) постоянно находятся в растворах NaCl: контрольная - в неактивированной среде, опытная - в ЭХА-растворе. Таким образом, уровень Eh в каждой суспензии поддерживается на сравнительно постоянном уровне)

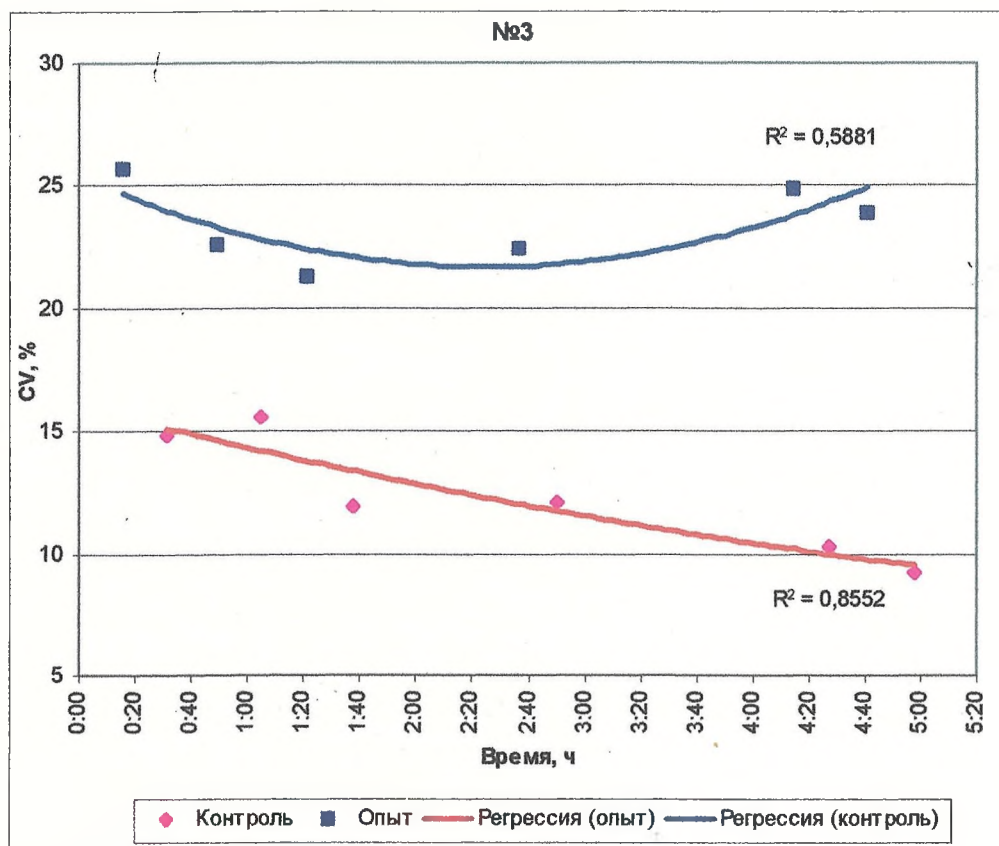


Рис. 16. Сравнение коэффициента вариации амплитуды колебания клеток в среде со стандартным значением Eh (контроль) и в активированной среде с бесконтактно измененным значением Eh (опыт). Дата опыта: 29.05.2001

(Примечание: В данном опыте емкости с суспензиями клеток ($V=40$ мл) постоянно находятся в растворах NaCl: контрольная - в неактивированной среде, опытная - в ЭХА-растворе. Таким образом, уровень Eh в каждой суспензии поддерживается на сравнительно постоянном уровне)

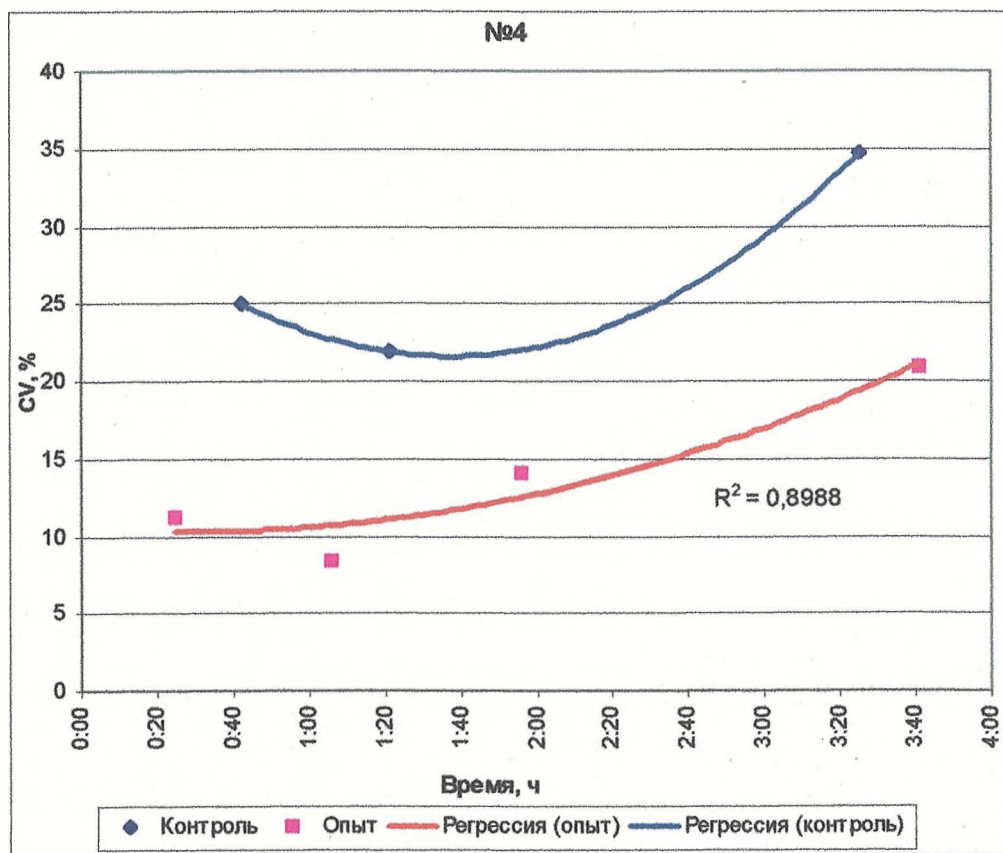


Рис. 17. Сравнение коэффициента вариации амплитуды колебания клеток в среде со стандартным значением E_h (контроль) и в активированной среде с бесконтактно измененным значением E_h (опыт). Дата опыта: 26.05.2001

(Примечание: В данном опыте емкости с суспензиями клеток ($V=40$ мл) постоянно находятся в растворах NaCl: контрольная - в неактивированной среде, опытная - в ЭХА-растворе. Таким образом, уровень E_h в каждой суспензии поддерживается на сравнительно постоянном уровне)

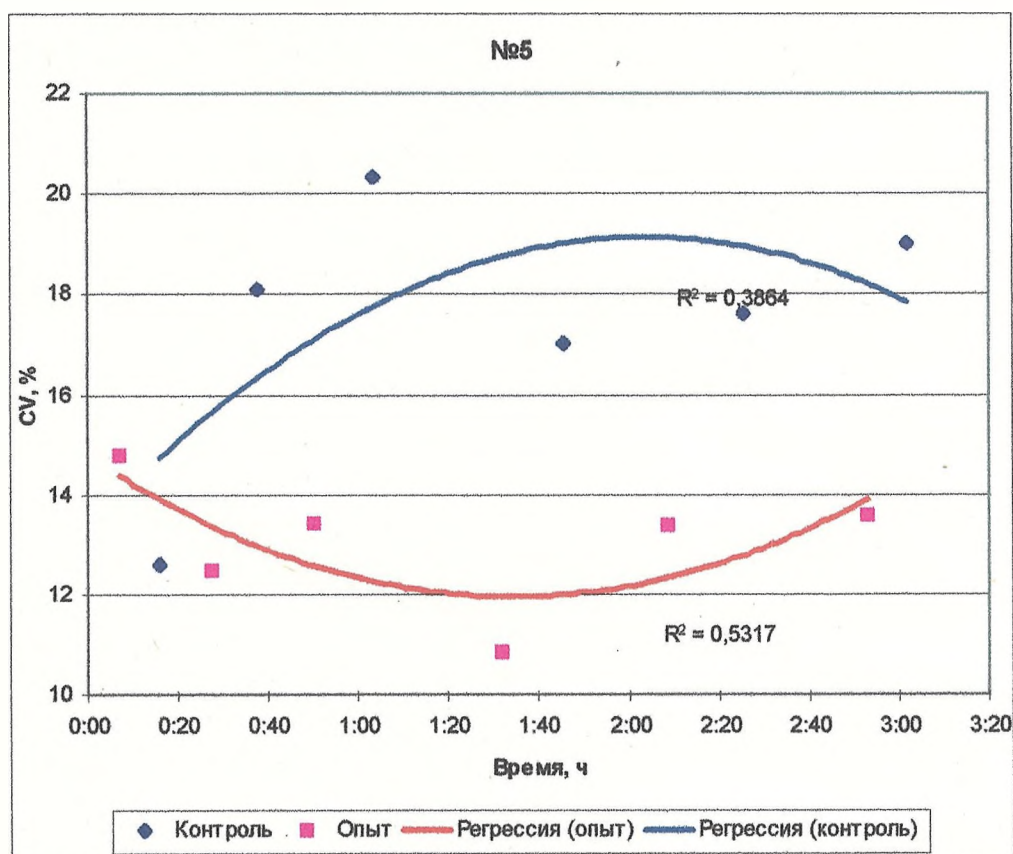


Рис. 18. Сравнение коэффициента вариации амплитуды колебания клеток в среде со стандартным значением Eh (контроль) и в активированной среде с бесконтактно измененным значением Eh (опыт). Дата опыта: 11.05.2001

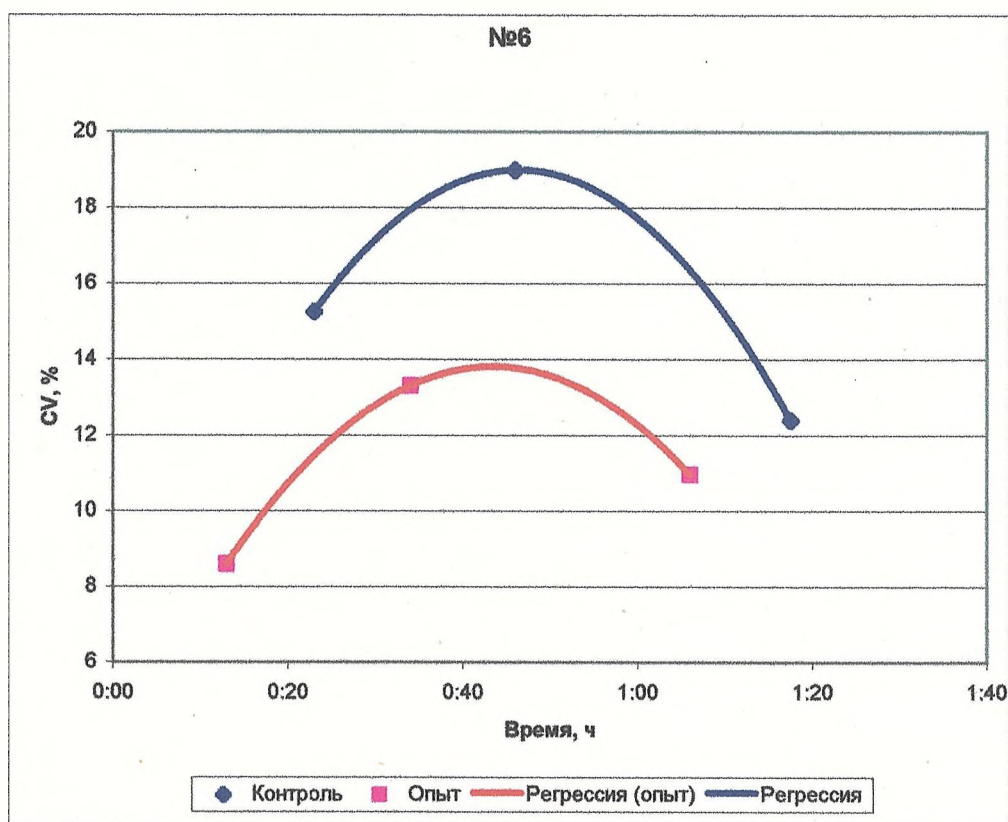


Рис. 19. Сравнение коэффициента вариации амплитуды колебания клеток в среде со стандартным значением Eh (контроль) и в активированной среде с бесконтактно измененным значением Eh (опыт). Дата опыта: 11.05.2001
(2)

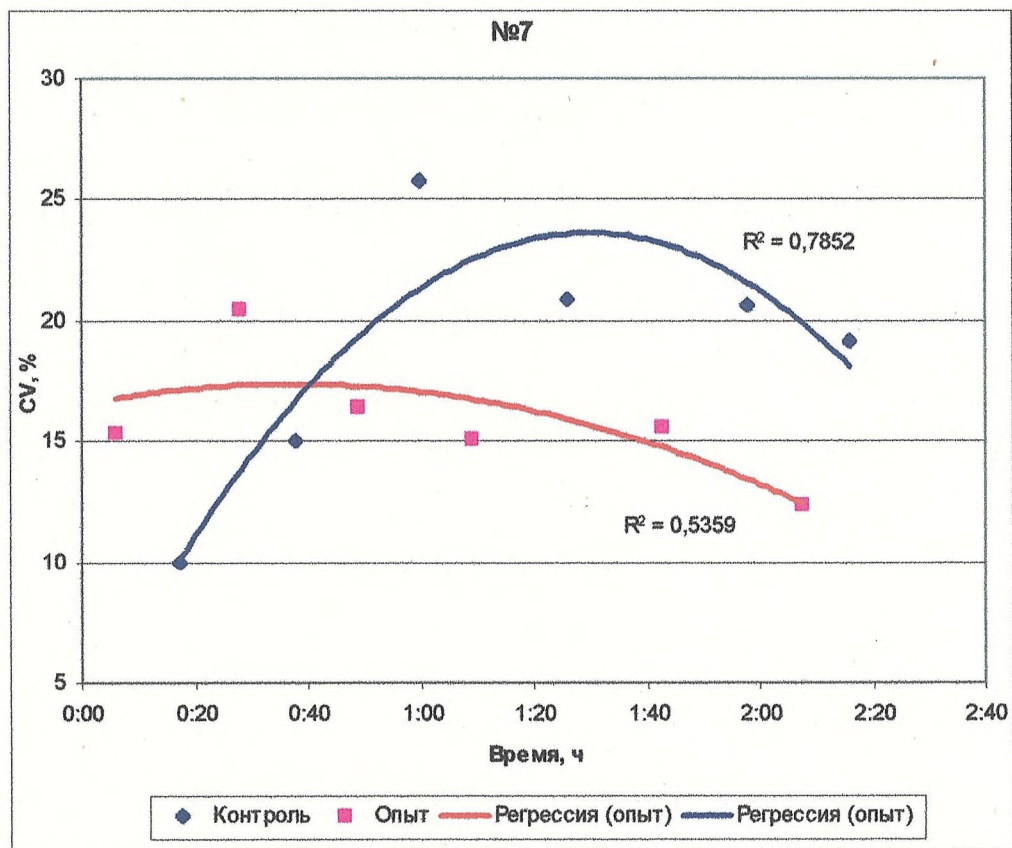


Рис. 20. Сравнение коэффициента вариации амплитуды колебания клеток в среде со стандартным значением Eh (контроль) и в активированной среде с бесконтактно измененным значением Eh (опыт). Дата опыта: 10.05.2001

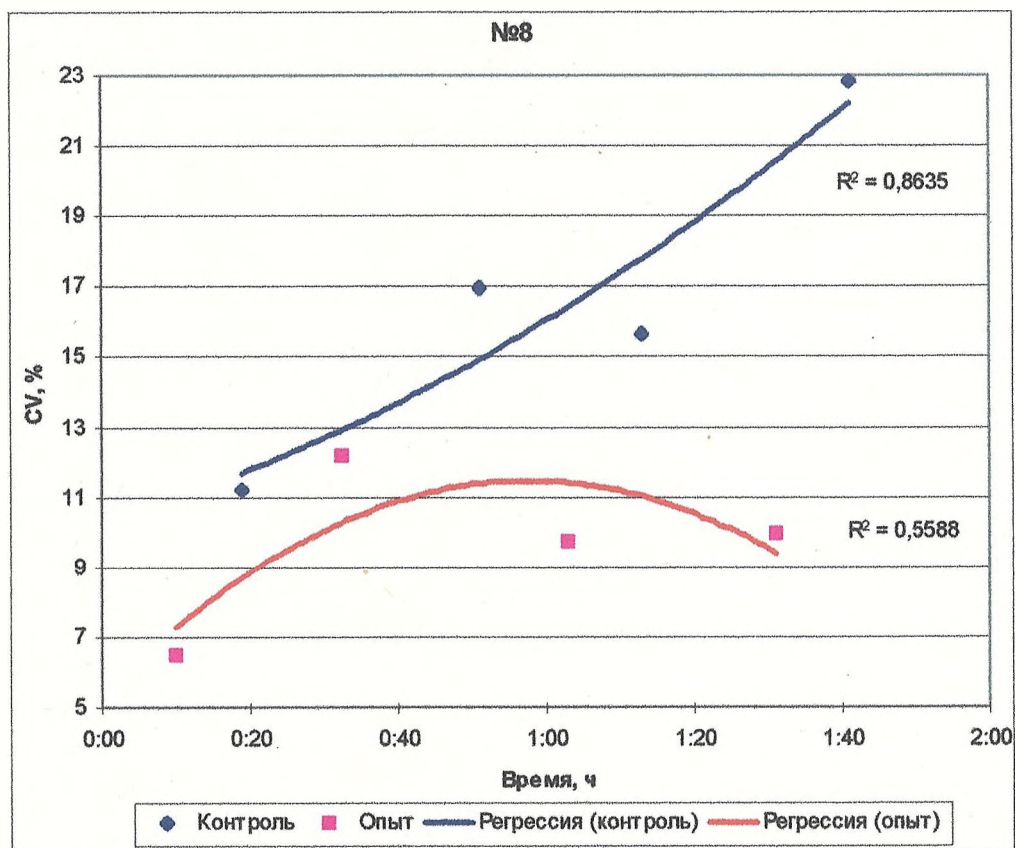


Рис. 21. Сравнение коэффициента вариации амплитуды колебания клеток в среде со стандартным значением E_h (контроль) и в активированной среде с бесконтактно измененным значением E_h (опыт). Дата опыта: 08.05.2001

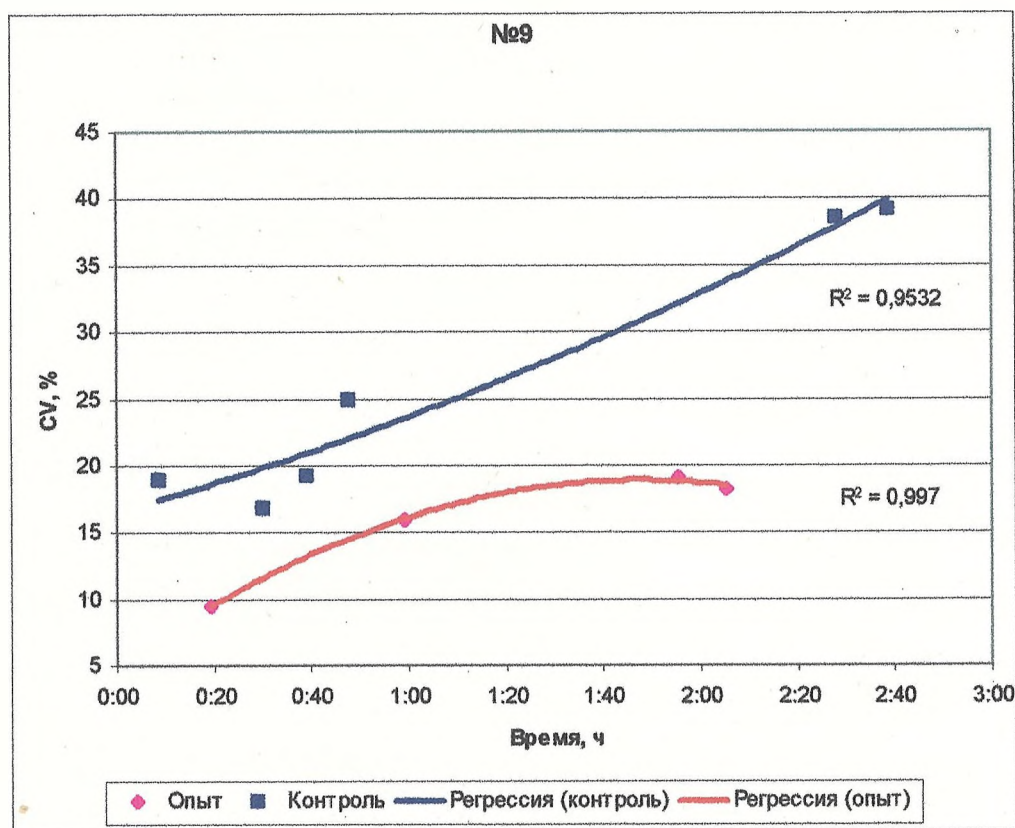


Рис. 22. Сравнение коэффициента вариации амплитуды колебания клеток в среде со стандартным значением Eh (контроль) и в активированной среде с бесконтактно измененным значением Eh (опыт). Дата опыта: 07.05.2001

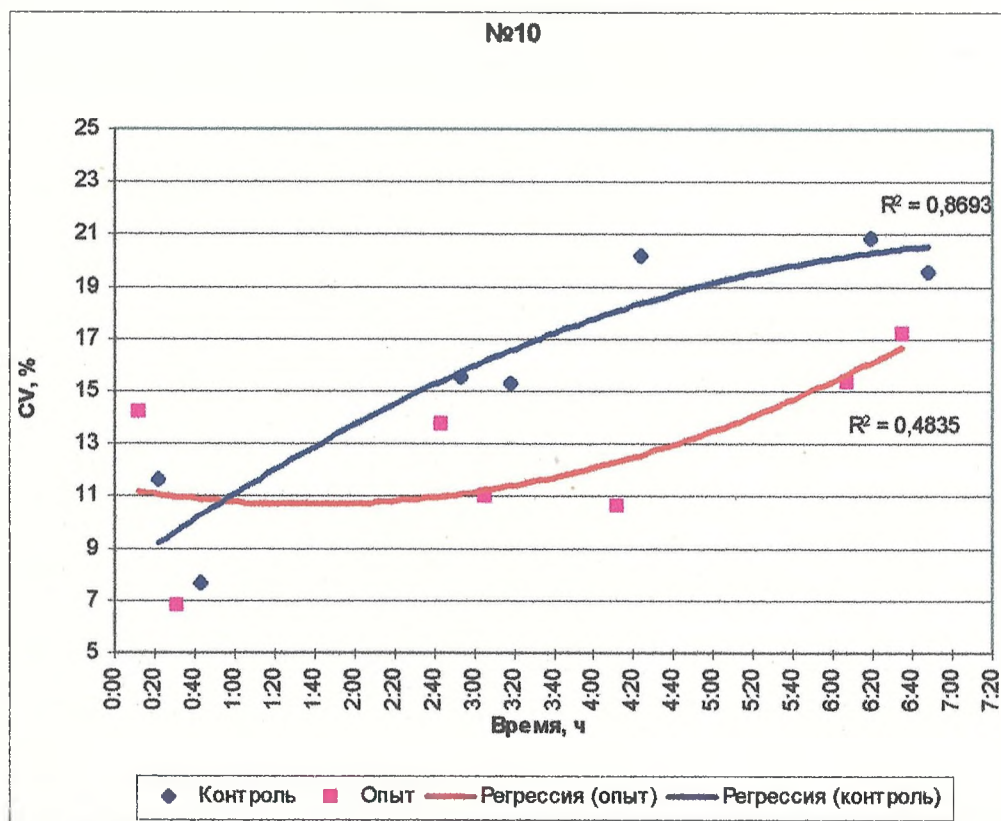


Рис. 23. Сравнение коэффициента вариации амплитуды колебания клеток в среде со стандартным значением Eh (контроль) и в активированной среде с бесконтактно измененным значением Eh (опыт). Дата опыта: 08.05.2001
(2)

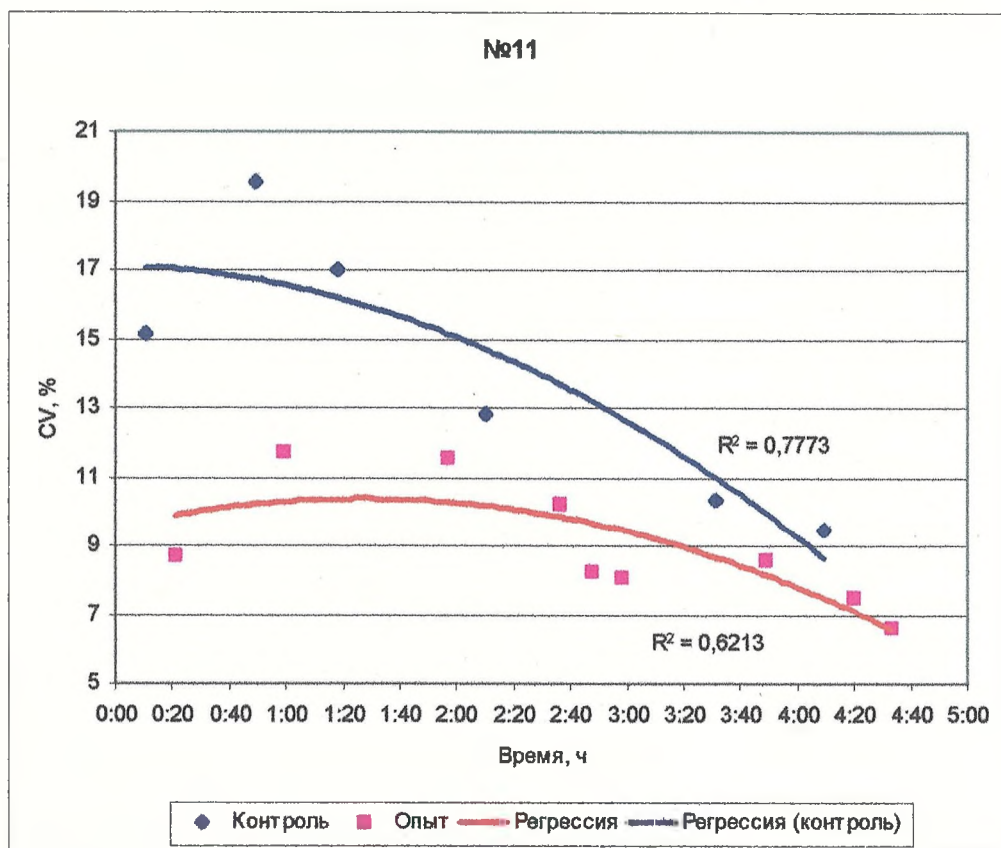


Рис. 24. Сравнение коэффициента вариации амплитуды колебания клеток в среде со стандартным значением Eh (контроль) и в активированной среде с бесконтактно измененным значением Eh (опыт). Дата опыта: 05.05.2001

Выводы по результатам сравнения варьирования амплитуды колебания клеток в контрольной среде со стандартным значением E_h и в среде с бесконтактно измененным значением E_h :

1. По результатам опытов выявлено достоверное различие коэффициента вариации (CV%) электрокинетических свойств (ЭКС) клеток в синхронных культурах.
2. Коэффициент вариации по ЭКС клеток увеличивается в зависимости от времени нахождения клеток в неблагоприятной среде. Такая закономерность хорошо прослеживается в 9 случаях из 11 для контрольных культур клеток. Что касается опыта, то такая общая закономерность отсутствует. В 5 случаях из 11 наблюдается незначительно увеличение коэффициента вариации. В остальных случаях картина обратная или проследить тенденцию не удастся. Таким образом, при одинаковых лимитирующих факторах в случае опыта их действие в некоторой степени скомпенсирована пониженным значением ОВП среды.
3. Определены лимиты (границы) в пределах которых изменяется коэффициент вариации ЭКС клеток, результаты представлены в таблице 2:

Таблица 2

Лимиты коэффициента вариации (CV) ЭКС клеток

	№ опыта	Контроль (CV,%)		Опыт (CV,%)	
		min	max	min	max
	1	12	35	8	20
	2	15	24	8	12
	3	22	25	9	15
	4	21	35	10	21
	5	14	19	12	14
	6	12	19	8	14
	7	10	24	12	15
	8	11	22	7	12
	9	17	40	9	19
	10	9	20	10	17
	11	9	18	6	11
Lim	min	9	18	6	11
	max	22	40	12	21

Для контрольной культуры клеток, по результатам 11 опытов:

Минимальные значения коэффициента вариации составляют от 9 до 22%

Максимальные значения коэффициента вариации составляют от 18 до 40%

Для опытной культуры клеток, по результатам 11 опытов:

Минимальные значения коэффициента вариации составляют от 6 до 12%

Максимальные значения коэффициента вариации составляют от 11 до 21%

Чтобы оценить размеры варьирования показателя CV по результатам 11 опытов, определен размах вариации ($\text{Lim}_{(\max)} - \text{Lim}_{(\min)}$):

Размах вариации для контрольной суспензии клеток: 9...18%

Размах вариации для опытной суспензии клеток: 5...9%

Показатель электрокинетических свойств клеток (т.е. амплитуда колебания в знакопеременном поле), изменяется (варьирует) от объекта к объекту. Но степень варьирования этого показателя для клеток в опыте составляет 5...9%, по сравнению с контролем 9...18%. На основании этого можно заключить, что в опытной культуре воздействие отрицательного ОВП повышает адаптивность клеток к неблагоприятным условиям внешней среды.

В контрольной среде действие лимитирующих факторов на клетки ничем не скомпенсировано, поэтому наблюдается устойчивая и повторяющаяся картина постепенного снижения адаптивности клеток и увеличения гетерогенности культуры по ЭКС.

Опыт №3. Исследовались разные культуры клеток в неактивированной и активированной воде независимо друг от друга (в разные дни)

Т.к. опыты производились независимо друг от друга, в разное время и с использованием различных культур клеток, сравнивать числовые значения коэффициента вариации сложно.

В связи с этим особый интерес представляет общая тенденция изменения гетерогенности популяции со временем в зависимости от среды, в которой находятся клетки.

В сильно разбавленной среде на основе обычной дистиллированной воды с $E_h = +300$ мВ, наблюдается постепенное **увеличение гетерогенности** культуры клеток, что связано с неблагоприятными условиями обитания (лимитирование по источнику углерода и слабый отрицательный осмотический шок)

В сильно разбавленной среде, на основе бесконтактно активированной воды с $E_h = -270... - 470$ мВ, наблюдается постепенное **уменьшение гетерогенности** культуры клеток, несмотря на действие перечисленных лимитирующих факторов.

На рис. 25-27 представлены графики отражающие зависимость варьирования амплитуды колебания клеток от времени нахождения культуры в неактивированной среде;

На рис. 28-30 представлены графики отражающие зависимость варьирования амплитуды колебания клеток от времени нахождения культуры в активированной среде

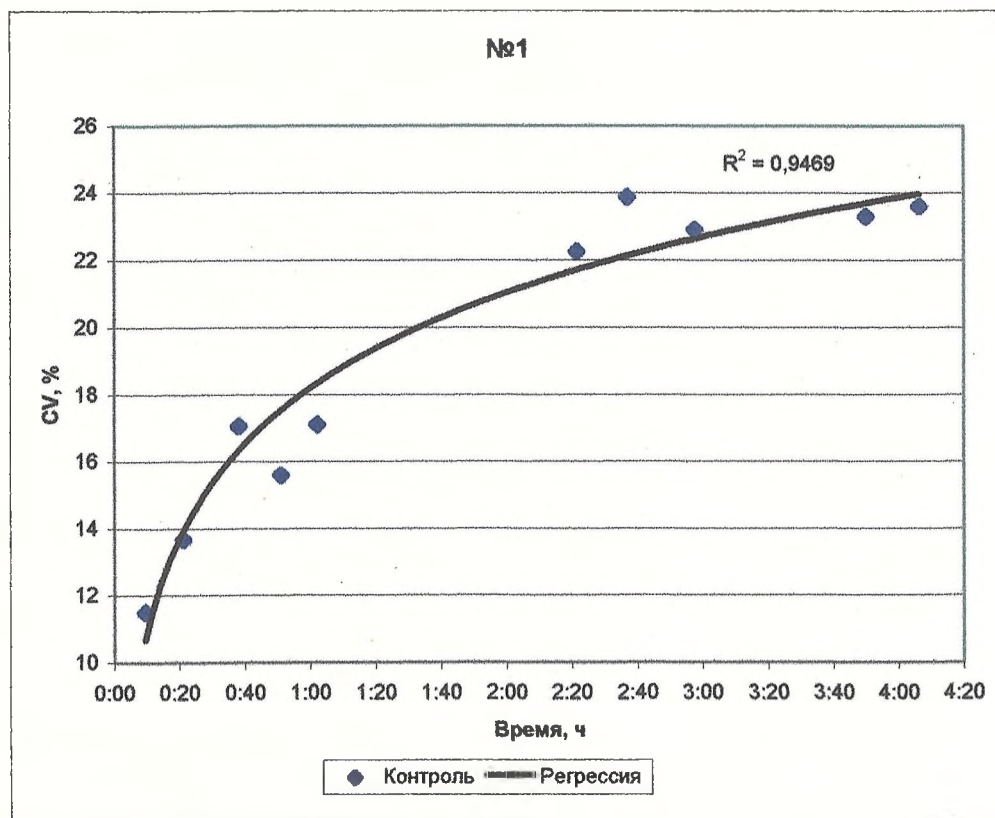


Рис. 25. Зависимость коэффициента вариации амплитуды колебания клеток *Saccharomyces cerevisiae* от времени нахождения в контрольной среде со стандартным значением E_h (+290...+350 мВ). Дата опыта: 12.05.2001

(примечание: время $t = 0:00$ соответствует моменту разведения исходной суспензии в контрольной среде)

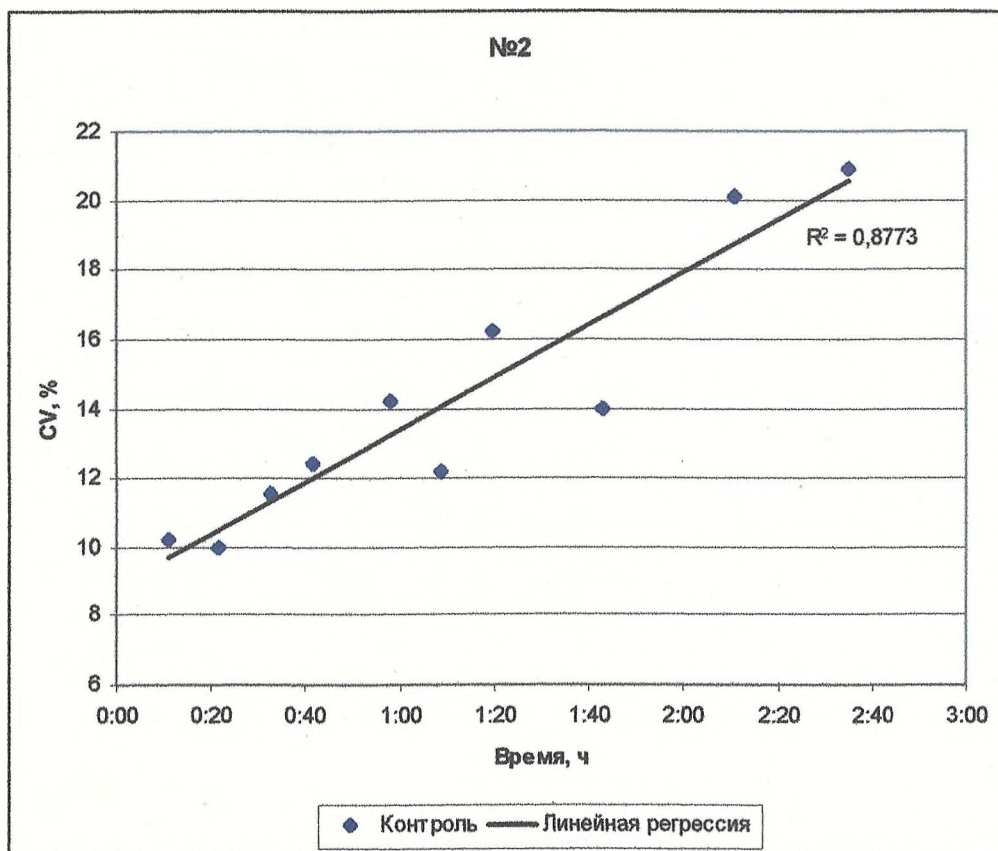


Рис. 26. Зависимость коэффициента вариации амплитуды колебания клеток *Saccharomyces cerevisiae* от времени нахождения в контрольной среде со стандартным значением E_h (+290...+350 мВ). Дата опыта: 12.05.2001

(примечание: время $t = 0:00$ соответствует моменту разведения исходной суспензии в контрольной среде)

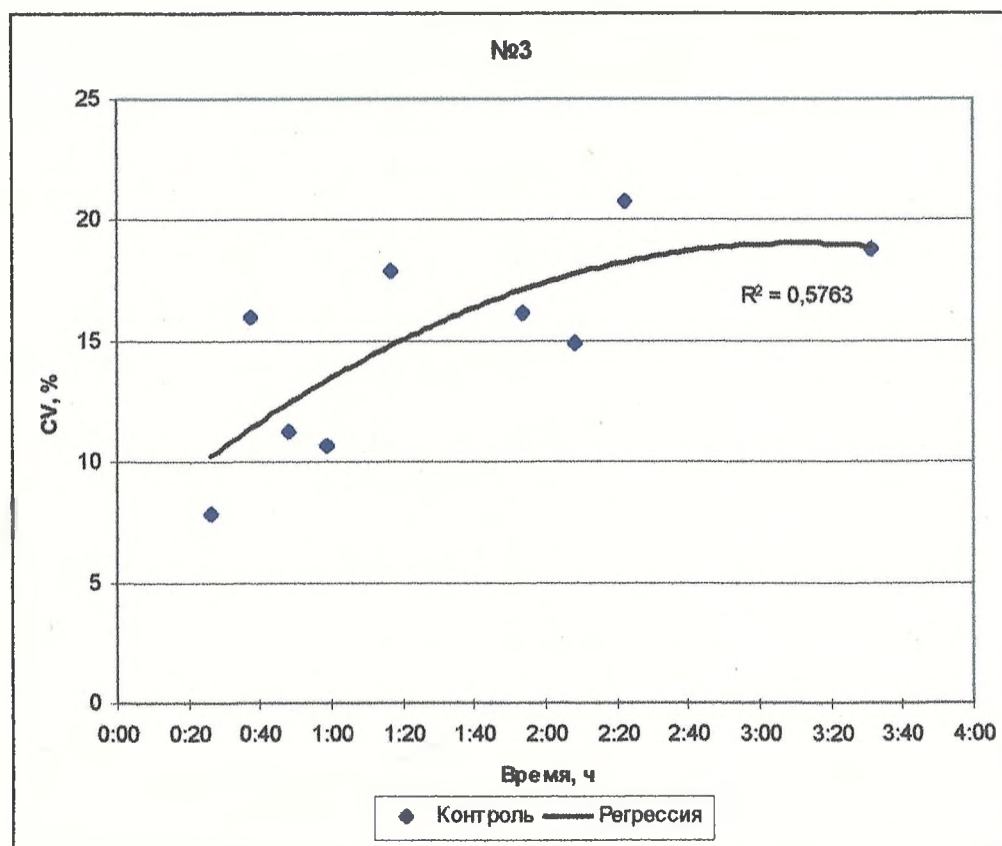


Рис. 27. Зависимость коэффициента вариации амплитуды колебания клеток *Saccharomyces cerevisiae* от времени нахождения в контрольной среде со стандартным значением E_h (+290...+350 мВ). Дата опыта: 18.05.2001

(примечание: время $t = 0:00$ соответствует моменту разведения исходной суспензии в контрольной среде)

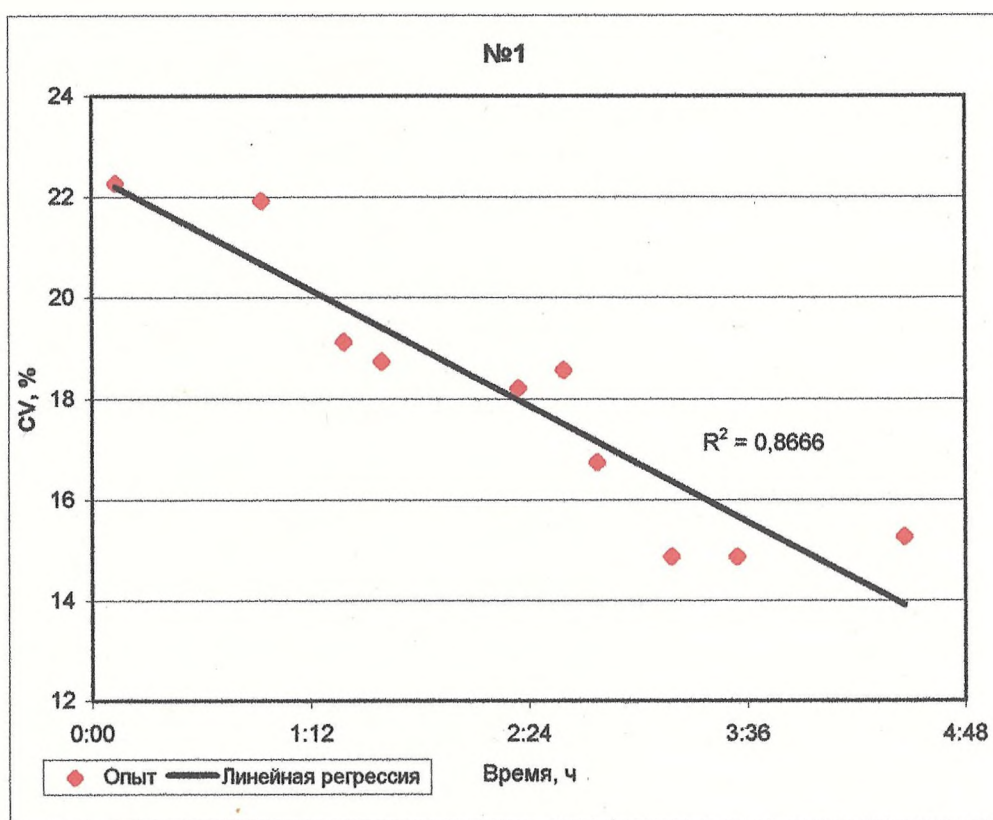


Рис. 28. Зависимость коэффициента вариации амплитуды колебания клеток *Saccharomyces cerevisiae* от времени нахождения в активированной среде с бесконтактно измененным значением Eh (-270... -540 мВ). Дата опыта: 19.05.2001

(примечание: время $t = 0:00$ соответствует моменту разведения исходной суспензии в активированной среде)

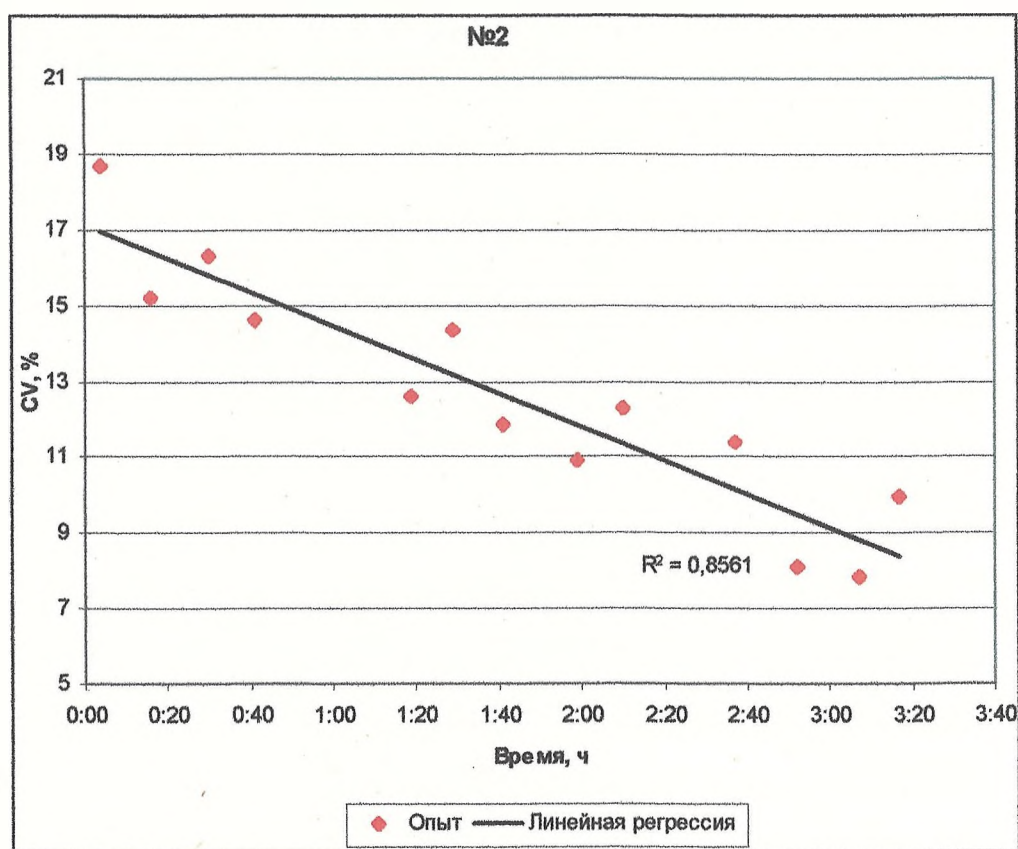


Рис. 29. Зависимость коэффициента вариации амплитуды колебания клеток *Saccharomyces cerevisiae* от времени нахождения в активированной среде с бесконтактно измененным значением Eh (-270...-540 мВ). Дата опыта: 26.04.2001

(примечание: время $t = 0:00$ соответствует моменту разведения исходной суспензии в активированной среде)

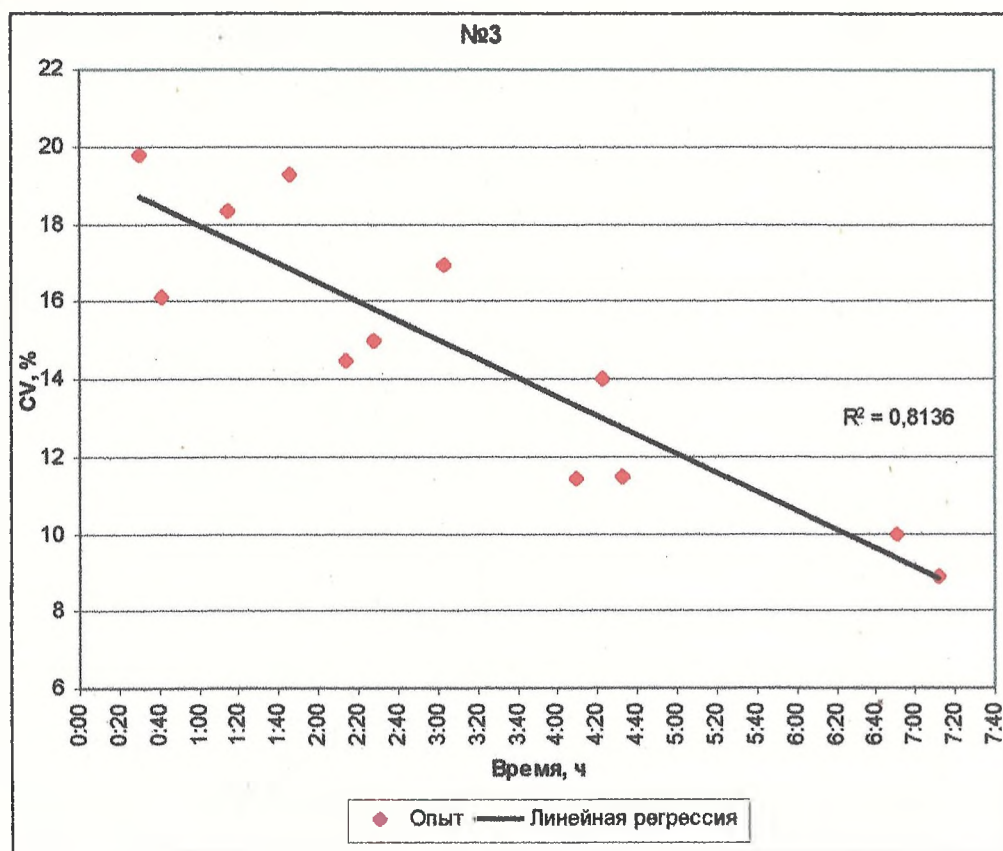


Рис. 30. Зависимость коэффициента вариации амплитуды колебания клеток *Saccharomyces cerevisiae* от времени нахождения в активированной среде с бесконтактно измененным значением E_h (-270...-540 мВ). Дата опыта: 04.04.2001

(примечание: время $t = 0:00$ соответствует моменту разведения исходной суспензии в активированной среде)

Выводы по исследованию разных культуры клеток в неактивированной и активированной воде независимо друг от друга:

1. На графиках представлены случаи, в которых изменение вариации достаточно хорошо описывается линейной регрессией. Стоит отметить, что в большинстве экспериментов наблюдались нелинейные зависимости, но общая тенденция изменений все же сохранялась. Представленные графики построены на большем числе измерений, чем остальные, поэтому точнее отражают общую картину различного действия активированных растворов на живые клетки.

2. В активированных средах наблюдался пониженный уровень гетерогенности популяции и(или) его снижение за время наблюдения, а в обычных средах высокий уровень гетерогенности и(или) повышение за время наблюдения.
3. Снижение гетерогенности культуры клеток, при тех же лимитирующих факторах свидетельствует о снижении уровня неблагоприятности среды для клеток.

Обсуждение результатов: по результатам проведенных опытов необходимо объяснить полученные факты:

1. Причину снижения гетерогенности в опытной культуре клеток в результате действия активированной воды.
2. Причину продолжения снижения гетерогенности культуры (в некоторых случаях) или отсутствие выравнивания по гетерогенности с контрольной культурой после окончания действия отрицательного ОВП в результате релаксации воды.

Повышение адаптивности клеток в неблагоприятных условиях при воздействии активированной воды на клетку можно объяснить в рамках единой гипотезы. Подходы к объяснению могут быть различными, но сущность воздействия сводится к одному: искусственному предоставлению клетке дополнительного источника энергии, которая используется для повышения адаптивности в неблагоприятных условиях.

С точки зрения биофизики основа основ жизни – устойчивое неравновесие, то есть живой организм или отдельная клетка должны обладать запасом свободной энергии, который создается постоянным обменом веществ с окружающей средой. В этом отношении активированная вода отличается от обычной только "уровнем свободной энергии" [35]. При воздействии ее на живой организм происходит передача этой энергии на нужды клетки.

В рамках биологического подхода существует известная гипотеза Прилуцкого объясняющая механизм действия активированной воды на митохондрии клетки. В соответствии с этой гипотезой можно достаточно просто объяснить экспериментальные факты.

Усиление электрондонорного фона вокруг митохондрии при диффузии активированной воды создает эффект внешнего электронного давления. Это увеличивает трансмембранный потенциал и усиливает транспорт электронов внутрь митохондрии. Поскольку этот транспорт совмещен с синтезом АТФ, то энергетические ресурсы клетки увеличиваются. Следовательно, адаптивность клетки возрастает.

При этом в окислительно-восстановительных реакциях гликолиза и дыхания преобладают реакции с образованием восстановленных форм веществ, следовательно, за время действия активированной воды происходит накопление восстановленных промежуточных продуктов биохимических реакций. После релаксации активированной воды эти вещества вступают в реакции окисления гликолиза. В результате вырабатывается энергия АТФ, которая так же используется клеткой для поддержания гомеостаза. Благодаря этому действие активированной воды на культуру клеток не ограничивается временем релаксации воды.

Следует признать, что данные выводы являются только попыткой объяснить истинные причины влияния активированных сред на живые клетки. По результатам проведенных экспериментов сделать окончательные и правильные выводы сложно. Поэтому возникает необходимость продолжения работ по данной теме.

Выводы

В данной работе изучалось влияние бесконтактно активированных водных растворов на живые клетки *Saccharomyces cerevisiae*. По результатам проделанной работы можно сделать следующие выводы:

1. Впервые экспериментально обнаружен факт влияния бесконтактно активированных растворов на электрокинетические свойства клеток.

2. Разработана методика исследования влияния бесконтактно активированной воды на электрокинетические свойства клеток для использования ее в изучении поведения клеток культуры в активированных средах.

3. Результаты экспериментов показали, что величина коэффициента вариации электрокинетических свойств (ЭКС) для контрольной суспензии клеток лежит в пределах 9...40%, для опытной - в пределах 6...21%. Это свидетельствует о том, что опытная культура в меньшей степени поддается тенденции к увеличению гетерогенности ЭКС, по сравнению с контрольной культурой клеток.

4. Коэффициент вариации ЭКС клеток при экспозиции их в контрольной среде (на основе дистиллированной воды со стандартным значением E_h) изменяется в пределах от 9% до 18%. В то время как для опытных клеток этот же показатель изменяется от 5 до 9%. Сниженный уровень изменения коэффициента вариации ЭКС клеток свидетельствует о большей однородности электрокинетических свойств клеток в опытной культуре по сравнению с контрольной.

5. В опытной культуре воздействие отрицательного ОВП повышает адаптивность клеток к неблагоприятным условиям внешней среды (в т.ч. лимитирование по источнику углерода, слабый отрицательный осмотический шок). При этом действие неблагоприятных факторов среды в некоторой степени может быть скомпенсировано понижением значения ОВП среды.

6. Результаты работы могут быть использованы в областях, где требуется создание адаптивных условий для получения культуры клеток с заданными однородными свойствами (биотехнология, медицина, микробиология, водоочистка и т.д.).

Список литературы

- 1 Алехин С.А., Байбеков И.М. "Живая" вода - миф или реальность. // Эл. вариант: Журнал МИС-РТ. сб. № 6. ч. 1. 1999. <http://www.ikar.udm.ru/>
- 2 Балакирева С.Ю. Исследование некоторых биофизических свойств клеточной поверхности. Изд-во СГУ. 1985. 24 с.
- 3 Бахир В.М. Медико-технические системы и технологии для синтеза ЭХА растворов. -М.: ВНИИИМТ НПО "ЭКРАН". 1998. 65 с.
- 4 Бахир В.М. Электрохимическая активация. Ч.1. ВНИИИМТ. Москва. 1992. 401 с.
- 5 Бергельсон Л.Д. Биологические мембраны: факты и гипотезы. М.: Наука, 1975
- 6 Бочкарев Г.Р. Попов И.В. Ростовцев В.И. и др. Опытные-промышленные испытания установки для умягчения воды электрохимическим способом // водоснабжение и санитарная техника, 1982. №4 с. 7-8
- 7 Браун В. Генетика бактерий. М.:1968.
- 8 Бут А.И. Электронно-ионные процессы водных структур живых организмов и продуктов их переработки. М.: 1992.
- 9 Вестерхофф Х., ван Дам К. Термодинамика и регуляция превращений свободной энергии в биосистемах: Пер.с англ.- М.: Мир, 1992. 686 с.
- 10 Воейков В.Л., Решетов П.Д., Набиев И.Р. и др. "Физико-химические методы изучения биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов" Пред. и с предисловием акад. Иванова В.Т.. М.: Наука. 1992.
- 11 Герловин И.Л. Основы единой теории всех взаимодействий в веществе. Энергоатомиздат. Ленинград. 1990.
- 12 Гершанович В.Н. Транспорт веществ в бактериальные клетки. // Природа. 1981. №7. с. 85-91
- 13 Гонян С. А. Поверхностный заряд клеток при их различных функциональных состояниях // Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Ереван. 1992.
- 14 Григоров О.П. Электрокинетические явления // М.: Изд. МГУ.: 1973. 168 с.
- 15 Грин Н., Стаут У., Тейлор Д., Биология: в 3-х т., т.1 с.153
- 16 Гузев В.С. Звягинцев Д.Г. Электрокинетические свойства клеток микроорганизмов и их систематика. - Микробиология, 1973, т.42, с.708-712
- 17 Гузев В.С., Звягинцев Д.Г. Микроэлектрофорез в микробиологии. - В кн.: Микробные метаболиты. М.:Изд-во МГУ, 1979, с. 150-164

- 18 Дегтярева Т.В., Кузнецов А.М., Степанов Г.В., Терешкова Г.М. Поведение клеток хлореллы в неоднородном переменном электрическом поле. - В кн.: управляемый биосинтез и биофизика популяций. Красноярск, 1969, с. 69-70
- 19 Доливо-Добровольский Л.Б., Кульский Л.А., Накорчевская В.Ф. Химия и микробиология воды, К., 1971
- 20 Духин С.С., Дерягин Б.В. Электрофорез // М, Изд-во Наука, 1976.
- 21 Зайцев И.Д., Креч Э.И. Применение и познание временно активированной воды. // Химическая промышленность 1989. №4. С.44-47.
- 22 Захарьевский М.С. Оксредметрия Л., 1967
- 23 Зенин С.В. О механизме активации воды // 2-й Международный симпозиум "Электрохимическая активация в медицине, сельском хозяйстве, промышленности", сб. докл.-М; ВНИИМТ АО НПО "Экран". 1999. ч.1.
- 24 Исайкин В. А. Методика и техника измерений поверхностных биопотенциалов внутри организма человека. // Измерительная техника 1987, №12, с. 43-45
- 25 Киселев Б. И. Метод адаптивного лечения // Медицинская газета №6. 1999.
- 26 Киселев Б. И. Аквацит - К: Первая проба сил против ВИЧ // Медицинская газета №19. 1993.
- 27 Киселев Б. И. Метод адаптивного лечения (искусственный источник биополя в медицине), Санкт-Петербург, 1997.
- 28 Киселев Б.И. Метод адаптивного лечения (искусственный источник биополя в медицине). С.-Петербург; "Комплекс". вып. 1. 1997.- с. 9. // Эл. вариант <http://www.ikar.udm.ru/akdmed.htm>
- 29 Киселев Б.И. Способ обработки физиологического раствора Киселева Б.И. а.с. № 1827274, кл. А61 № 5/06 от 13.10.1992.
- 30 Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: "Высш.школа" 1973. 343 с.
- 31 Либерман Е.А., Минина С.В., Шкловская-Корди Н.Е. Электричество и управление живой клеткой. М.: Знание, 1978. 63 с.
- 32 Лирова С.А., Шкоп Я. Я., Цвид Е. Е, Измерение электрокинетических свойств поверхности дрожжевых клеток в переходных режимах. // Микробиология, 1982, т.51, №1, с. 12-16
- 33 Лоцилов В.И. Информационно-волновая медицина и биология. - М.: Аллегро-пресс, 1998. - 256 с., илл.
- 34 Луста К.А. Фихте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов / Ред. В.К. Ерошин. Пущино: ОНТИ НЦБИ АН СССР. 1990. 186 с.
- 35 Международный энциклопедический словарь (МЭС 891)
- 36 Мецлер Д. Биохимия изд. М.: "Мир", 1980 В 3-х т, т.1 с.229

- 37 Минаков В.В., Широносков В.В., Широносова Г.И. "Изумруд-СИ" - универсальная бытовая установка для получения: активированных растворов и питьевой воды с заданным составом и свойствами. Сб. тез. и докл. 2-го Международного симпозиума. Электрохимическая активация в медицине, с/х, промышленности -М.; 28-29. 11.1999. Ч 2. с. 333. // Эдвариант: Журнал МИС-РТ. сб. №15-12. 1999. <http://web.uni.udm.ru/common/biomed/2msex2.htm>
- 38 Мирошников А.И., Фомиченков В.М., Иванов А.Ю. Электро-физический анализ и разделение клеток. М.: Наука. 1986.
- 39 Научные работы: Методика подготовки и оформления. / Сост. И.Н. Кузнецов - Мн.: Амалфея, 1998. - 272 с.
- 40 Паксютов О.А., Чучков В.М., Голендухин А.Н., Людков Г.Г. Прижизненные реакции нервных волокон на активированную воду // Электрохимическая активация - 97. Первый международный симпозиум "Электрохимическая активация в медицине, сельском хозяйстве, промышленности", Доклады и тезисы. В 2-х частях. Часть II, М.: ВНИИИМТ. 1997. С. 64-65
- 41 Паничева С.А. Новые технологии дезинфекции и стерилизации сложных изделий медицинского назначения. М.: 1998.
- 42 Петракович Г.Н. Ядерные реакции в живой клетке // Русская Мысль.- 1993.- № 3-12.- с. 66-73.
- 43 Петухова Л.Е. Векторная биомеханика клеток // Труды молодых ученых России сб. мат. III Медицинского конгресса, Ижевск, Россия, окт. 4-7, 2000 г.
- 44 Позмогова И.Н., Шкоп Я.Я., Цвид Е.Е. и др. Хемостатное культивирование дрожжей *Candida utilis* при нестационарных температурных условиях. - Микробиология, 1982, т.51, с. 236-239
- 45 Прилуцкий В. И., Бахир В. М. Электрохимически активированная вода: аномальные свойства, механизм биологического действия. М.: ВНИИИМТ АО НПО "Экран". 1997.
- 46 Прилуцкий В.И. Пределы выживания изолированных клеток в электрохимически активированных (ЭХА) средах // Электрохимическая активация - 99. Второй международный симпозиум "Электрохимическая активация в медицине, сельском хозяйстве, промышленности", Москва 28-29 октября 1999 г. Доклады и тезисы. В 2-х частях. Часть II, М.: всероссийский научно-исследовательский и испытательный институт медицинской техники. 1999. 122с.
- 47 Прилуцкий В.И. Механизм действия электроактивированной воды на функцию митохондрии // Электрохимическая активация - 99. Второй международный симпозиум "Электрохимическая активация в медицине, сельском хозяйстве,

- промышленности", Москва 28-29 октября 1999 г. Доклады и тезисы. В 2-х частях. Часть II, М.: всероссийский научно-исследовательский и испытательный институт медицинской техники. 1999. 122с.
- 48 Прилуцкий В.И. Электрохимически активированная вода: аномальные свойства, механизм биологического действия // Активированная вода. №3. 1996.
 - 49 Работнова И.Л. Тактика оптимизации микробиологических процессов // Антибиотики и мед.биотехнология. 1986. т.31. №7. с.508-513.
 - 50 Работнова И.Л., Лирова С.А., Ризенберг Д. Прикл. биохим. и микробиол., 1977, т.13, с. 377
 - 51 Руководство к практическим занятиям по микробиологии. / под ред. Егорова Н.С. - 3-е изд., перераб. и доп. - М.: изд-во МГУ. 1995. 224с.,ил.
 - 52 Сент-Дьерди А. Биоэлектроника. Исследование в области клеточной регуляции, защитных механизмов и рака. М.: 1971
 - 53 Сент-Дьерди А. Биоэнергетика. М.: 1960.
 - 54 Сигал В.Л., Лунько А.А., Осадчий П.В. К вопросу о точности измерений электрофоретической подвижности эритроцитов // Лаб. Дело. 1984. №3. с.191.
 - 55 Синюков В.В. Вода: известная и неизвестная. М.: Знание. 1987. 176 с.
 - 56 Соловьев А.А., Голендухин А.Н., Глушкова Т.Г., Людков Г.Г. Экспресс-метод определения физиологичности воды // 1-й Международный симпозиум "Электрохимическая активация в медицине, сельском хозяйстве, промышленности", сб. докл.-М; ВНИИМТ АО НПО "Экран". 1997. С. 78-80
 - 57 Соловьев А.А., Голендухин А.Н., Людков Г.Г. Экспресс-метод определения общей токсичности воды // 1-й Международный симпозиум "Электрохимическая активация в медицине, сельском хозяйстве, промышленности", сб. докл.-М; ВНИИМТ АО НПО "Экран". 1997. с. 62-64.
 - 58 Соловьев А.А., Голендухин А.Н., Людков Г.Г., Шамшурин И.В. Действие активированной воды на клетки человека, биокинетика клеток // 1-й Международный симпозиум "Электрохимическая активация в медицине, сельском хозяйстве, промышленности", сб. докл.-М; ВНИИМТ АО НПО "Экран". 1997. С. 61-62
 - 59 Соловьев А.А., Никитин Е.Н., Шкляев А.Е., Видинеев И.П., Ильин А.И., Измestьев К.В. Биоэлектрические показатели эритроцитов человека в оценке состояния организма // Труды молодых ученых России сб. мат. III Медицинского конгресса, Ижевск, Россия, окт. 4-7, 2000 г.
 - 60 Сумаруков Г.В. Окислительное равновесие и радиочувствительность организмов. Атомиздат. Москва. 1970. с.4.

- 61 Ткаченко Ю.П., Семенова Н. А. Секреты магнитной энергии. 1992. 24 с.
- 62 Уоттерсон Д.Г. Роль воды в функции клетки // Биофизика, 1991, т.36, вып.1, с. 5-30.
- 63 Физикохимия мембранных процессов. / Тимашев С.Ф. М.: Химия, 1988, 240 с.
- 64 Фомченков В.М., Мирошников А.И., Иванов А.Ю., Кувшинникова В.В. Диэлектрофоретическое поведение клеточных суспензий. // Электрон.обработ.материалов. 1975. №2. с.60-64
- 65 Харамоненко С.С., Ракитянская А.А. Электрофорез клеток крови в норме и патологии. Минск: Беларусь. 1974. 143 с.
- 66 Цвид Е.Е., Шкоп Я.Я., Позмогова И.Н., Шульговская Е.М. Электрокинетические свойства микроорганизмов в зависимости от условий культивирования. Микробиология, 1981, т.50, с. 659-664.
- 67 Чижевский А.Л. Электрические и магнитные свойства эритроцитов. Киев: Наук. Думка, 1975. 93 с.
- 68 Широносков В.Г., Широносков Е.В. Вода, излучение, жизнь. Сб. тез. докл. 7-го Международного симпозиума. Информационно-технологическое и медицинское обеспечение защиты населения и окружающей среды в чрезвычайной ситуации. Кипр- Проторас, 29.04-6.05 2000. -М.; 2000. с. 42-44.
- 69 Широносков В.Г., Широносков Е.В. Опыты по бесконтактной электрохимической активации воды, с. 66-68, 2-й Международный симпозиум "Электрохимическая активация в медицине, сельском хозяйстве, промышленности", сб. докл.-М; ВНИИИМТ АО НПО "Экран". 1999. I ч. - с. 300.
<http://www.ikar.udm.ru/2msexal.htm>
- 70 Широносков В.Г., Широносков Е.В. Устройство для бесконтактной активации жидкости, а. с. № 2000108654/12(009166) приоритет от 10.04.2000.
- 71 Шиян А.А. Способ определения функционального состояния популяции клеток: лимфоциты // Биофизика, 1999, т.44, вып.6, с. 1036-1067
- 72 Шкляев А.Е., Шишкин А.В. Электрофоретическая подвижность эритроцитов в растворах рибоксина у больных хроническим дуоденитом и язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки // Труды молодых ученых России сб. мат.Ш Медицинского конгресса, Ижевск, Россия, окт. 4-7, 2000 г.
- 73 Штрауб Ф.Б. Биохимия. АН Венгрии, Будапешт. 1985, с.181
- 74 Щербакова Г.Я. О дисперсии дзета-потенциала клеток хлореллы // Биофизика, 1971, т.16, с.1048-1051
- 75 Робертс Э. Де, Новинский В., Саэс Ф. Биология клетки. М.: "Мир", 1973. 488 с.
- 76 Электрохимическая технология изменения свойств воды / Рогов В.М., Филипчук В.Л. - Львов: Выща шк. Изд-во при Львов. Ун-те, 1989. 128 с.

- 77 Beavan M.J., Belk D.M., Stewart G.G., A.H. Rose. *Canad. J. Microbiol.*, 1979, v.25, N 8, p. 888
- 78 Berenyi E., Szendro Z., Rozsahegyi P., Bogner P., Sulyok E. Postnatal changes in water content and proton magnetic resonance relaxation times in newborn rabbit tissues. // *Pediatr. Res.* 1996. V. 39. P. 1091-1098
- 79 Clegg J.S. Properties and metabolism in aqueous cytoplasm and its boundaries. // *Am. J. Physiol.* 1984. V. 246. P. R133-151
- 80 Guillermond, N. Choucroun. *Compt. rend.*, 203, 255 (1936)
- 81 <http://www.water.ru/>
- 82 Korrekt-news Информационный, научно-популярный журнал / электронное издание - <http://www.nsk.su/~emed/kn-12.html>
- 83 Mileva E., Atmadzhov P., Strenz A. *Folia Med.*, 1978, v.20, p.429
- 84 R. Ellis. *Z. phys. Chem.*, 78, 321 (1912)
- 85 H.W. Douglas. *J. Appl. Bacteriol.*, 20, 390 (1957)

Приложение

Принятые сокращения

БАЖ - бесконтактно активированная жидкость
БАВ - бесконтактно активированная вода
ДП - диэлектрическая проницаемость
ДЭС - диэлектрический слой.
ОВ - окислительно-восстановительных
ОВП - окислительно-восстановительный потенциал
ПЗ - поверхностный заряд.
ТД - термодинамический
ЭКП - электрокинетический потенциал.
ЭКС - электрокинетические свойства
ЭП - электрическая проводимость
ЭФП - электрофоретическая подвижность
ЭХА - электрохимически активированные
НВЭ - нормальный водородный электрод
ХСЭ - хлорсеребряный электрод.
УФО - ультрафиолетовое облучение