



УДК 544.34;544.45;544.47;577.15;577.34

© 2011

Академик НАН Украины Д. М. Гродзинский, Т. А. Евстюхина,
В. К. Кольтовер, В. Г. Королев, Ю. А. Кутлахмедов

**Влияние магнитного изотопа магния-25
на пострадиационное восстановление клеток
*Saccharomyces cerevisiae***

*З трьох стабільних ізотопів магнію, ^{24}Mg , ^{25}Mg та ^{26}Mg (природне співвідношення приблизно 79, 10 та 11% відповідно), тільки ^{25}Mg є магнітним ізотопом (має ядерний спин $I = 5/2$), тоді як ^{24}Mg і ^{26}Mg — немагнітні ізотопи (ядерний спин $I = 0$). Показано, що магнітний ізотоп ^{25}Mg у порівнянні з немагнітним ізотопом ^{24}Mg ефективніше сприяє відновленню клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* після опромінення короткохвильовим ультрафіолетовим світлом. Таким чином, вперше у світі виявлено магнітний ізотопний ефект у радіаційній біології. Отримані результати свідчать про принципову можливість створення радіопротекторів на основі сполук стабільного магнітного ізотопу магнію.*

Жизнеспособность клеток и многоклеточных организмов определяется надежностью функционирования систем, защищающих и восстанавливающих субклеточные структуры и клетки от спонтанных и индуцированных повреждений [1]. Особую роль играют ферментативные системы восстановления (репарации) генетических структур [1, 2]. Общеизвестно, что для репарационных процессов, в том числе для репарации ДНК в клетках, необходимы молекулы АТФ, большинство которых синтезируется в процессе окислительного фосфорилирования. Обязательным кофактором этого процесса является ион Mg^{2+} . В природе существуют три стабильных изотопа магния — ^{24}Mg , ^{25}Mg и ^{26}Mg , относительное содержание которых приблизительно 79, 10 и 11%. Из них только ^{25}Mg является магнитным изотопом (имеет ядерный спин $I = 5/2$), тогда как ^{24}Mg и ^{26}Mg — немагнитные изотопы (ядерный спин $I = 0$) [3]. Недавно было показано, что магнитный изотоп магния по сравнению с его немагнитными изотопами служит более эффективным кофактором синтеза АТФ [4, 5]. Более того, было обнаружено, что клетки бактерий *Escherichia coli*, выросшие на магнитном изотопе ^{25}Mg , имеют более высокую жизнеспособность по сравнению с клетками, росшими на немагнитных изотопах ^{24}Mg и ^{26}Mg [6].

Для выяснения детальных механизмов этой новой, магнитной изотопии и возможной ее роли в живой природе представляет особый интерес изучение репарационных процессов

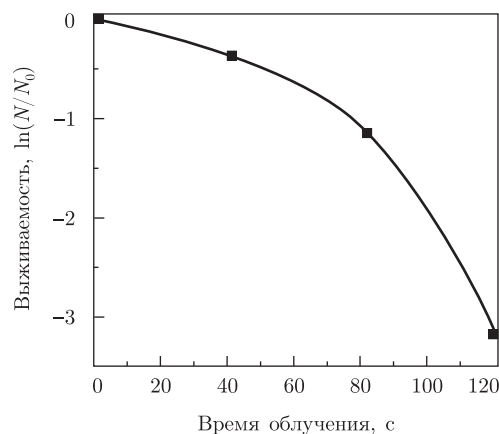


Рис. 1. Выживаемость клеток *S. cerevisiae* в зависимости от дозы УФ облучения. $\ln(N/N_0)$ — логарифм выживаемости, КОЕ/мл, процент к колониеобразующей способности необлученного контроля

восстановления клеток от лучевых повреждений. В условиях пострадиационного восстановления отчетливо проявляются результаты воздействия факторов среды, в том числе физиологически активных веществ, способных прямо или косвенно повлиять на эффективность и надежность работы биомолекулярных нанореакторов клетки [7, 8].

В настоящей работе показано, что магнитный изотоп ^{25}Mg по сравнению с немагнитным изотопом ^{24}Mg существенно эффективнее способствует восстановлению дрожжевых клеток после облучения коротковолновым ультрафиолетовым светом (УФ-С). Таким образом, впервые в мире обнаружен магнитный изотопный эффект в радиационной биологии.

Эксперименты выполнялись с клетками *S. cerevisiae*, диплоидный штамм ПГ-3032 (*MAT α ade2Δ248 leu2-3,112 ura3-160,188 trp1 Δ:kan^r*). Феноменология пострадиационного восстановления клеток этого типа хорошо изучена, процесс восстановления растянут во времени и легко модифицируется [9, 10]. Растворы сульфатов магния готовили из оксидов ^{24}MgO и ^{25}MgO производства ФГУП “Электрохимприбор”, Росатом, с изотопным обогащением 99,8 и 98,8 ат.% соответственно. Элементный состав растворов анализировали с помощью масс-спектрометра высокого разрешения с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS) “Element-2” (США). Клетки выращивали на стандартной питательной среде М3. В заранее приготовленную среду, не содержащую магния, объемом 3 мл вводили 0,1 мл инокулята клеток, 0,25 мл водного раствора сульфата магния-24 или магния-25 в 40% этаноле; конечная концентрация магния в среде роста составляла 3,7 мМ/л. После 3 сут культивирования в условиях непрерывной аэрации при 30 °С клетки отмывали от питательной среды (центрифугирование, 2 мин, 3000 об./мин), ресуспендировали в стерильном фосфатном буфере, рН 7,0 (“голодная” среда восстановления, концентрация 10^5 клеток/мл) и облучали в этой среде жестким УФ светом ($\lambda = 240 \div 260$ нм, 100–300 Дж/м²). Для определения кинетики восстановления облученные клетки инкубировали при 30 °С в той же “голодной” среде восстановления с периодическим высевом на стандартную питательную среду в чашки Петри с помещением их в темный термостат. Выживаемость определяли методом подсчета макроколоний [9, 10]. Опыты ставились в двукратной повторности.

Результаты экспериментов с облученными клетками приведены на рис. 1, 2. Доза облучения в экспериментах такого рода прямо пропорциональна времени облучения [9, 10]. Исходя из полученного графика дозовой зависимости (рис. 1) было выбрано время облучения во

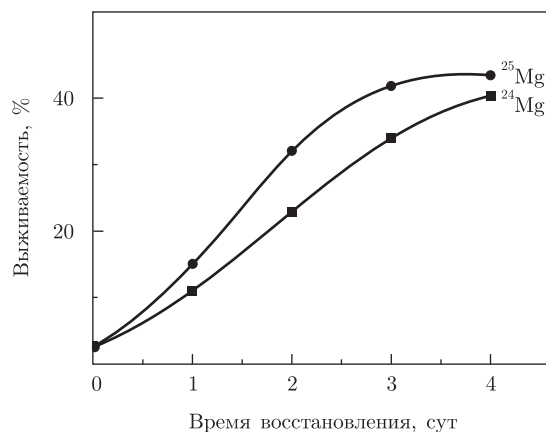


Рис. 2. Кинетика пострадиационного восстановления клеток *S. cerevisiae*, обогащенных различными изотопами магния. По оси ординат — выживаемость, КОЕ/мл, процент к колониеобразующей способности необлученного контроля, по оси абсцисс — время инкубации в “голодной” среде, сут

всех экспериментах — 140 с, что соответствовало дозе облучения 190 Дж/м². Выживаемость клеток, перенесенных на агар сразу же после облучения в этой дозе, не превышала нескольких процентов (рис. 2). Большинство клеток не успевает репарировать поврежденные генетические структуры до наступления митоза, и при их делении возникают нежизнеспособные дочерние клетки. Инкубация в “голодной среде”, в которой клетки не делятся, обеспечивает дополнительное время для репарационных процессов, а соответственно, увеличивается их выживаемость.

Из приведенных на рис. 2 кинетических кривых видно, что клетки, обогащенные изотопом ²⁵Mg, восстанавливаются эффективнее, чем клетки, обогащенные изотопом ²⁴Mg. Известно, что кинетика пострадиационного восстановления дрожжевых клеток описывается функцией уменьшения со временем эффективной дозы облучения (модель Новика–Сцилларда):

$$D_{\text{eff}}(t) = D_0[k + (1 - k) \exp(-\beta t)],$$

где D_{eff} — эффективная доза облучения; D_0 — исходная доза облучения; t — время восстановления; β — константа скорости восстановления; k — доля необратимых повреждений [9, 11].

Согласно результатам расчетов кинетических параметров (табл. 1), клетки, обогащенные магнитным изотопом магния, имеют вдвое большую константу скорости пострадиационного восстановления по сравнению с клетками, обогащенными немагнитным изотопом магния. Доля необратимых лучевых повреждений при этом почти не изменяется.

Таблица 1. Значения параметров β (константа скорости восстановления) и k (доля необратимых повреждений) кинетических кривых пострадиационного восстановления клеток *S. cerevisiae*, обогащенных различными изотопами магния

Изотоп магния	β , ч ⁻¹	k
²⁴ Mg	0,032 ± 0,003	0,70 ± 0,14
²⁵ Mg	0,058 ± 0,004*	0,61 ± 0,12**

*Различие между средними значениями статистически достоверно при $P = 0,02$.

**Различие между средними значениями статистически недостоверно при $P \leq 0,05$.

Можно было бы предположить, что причиной эффекта служит различие в содержании примесей каких-либо посторонних элементов, поступающих в среду роста вместе с различными изотопами магния. Однако, согласно данным масс-спектрометрии, элементный состав сред был одинаков для всех образцов при содержании примесных элементов не более нескольких микромолей на литр, независимо от типа изотопа магния. Количество примесей, поступавших в среду роста из других реактивов, существенно превышало количество тех же примесей из изотопов магния. Более того, содержание примесей в среде роста было одинаково во всех экспериментах, независимо от типа изотопа магния. Поэтому примеси не могут служить причиной более высокой эффективности изотопа ^{25}Mg по сравнению с ^{24}Mg .

Следовательно, активизация процесса восстановления клеток от лучевых поражений обусловлена магнитно-изотопным эффектом, а именно тем, что изотоп ^{25}Mg имеет магнитный момент (ядерный спин) в отличие от изотопа ^{24}Mg . В химии магнитно-изотопный эффект известен для многих элементов, имеющих магнитные и немагнитные изотопы, связан с законом сохранения электронного углового момента (спина) в химических реакциях и считается доказательством участия в реакции пары парамагнитных частиц — радикалов или ион-радикалов [4]. В биохимии магнитно-изотопный эффект был обнаружен в экспериментах с митохондриями, изолированными из сердца мышей: оказалось, что окислительное фосфорилирование с магнитным изотопом ^{25}Mg идет в 2–3 раза эффективнее, чем с немагнитными ^{24}Mg и ^{26}Mg [5]. Для объяснения этого эффекта было предположено, что в активном центре АТФ-синтазы происходит перенос электрона от аниона фосфатной группы АДФ к иону Mg^{2+} с образованием ион-радикальной пары — Mg^+ -фосфатный радикал. Благодаря сверхтонкому взаимодействию, магнитный момент ядра ^{25}Mg изменяет электронный угловой момент этой пары, переводя ее из исходного синглетного состояния (полный электронный спин $S = 0$) в относительно долгоживущее триплетное состояние ($S = 1$), в котором выход реакции синтеза АТФ, соответственно, возрастает [4, 5].

Ионы Mg^{2+} служат не только кофакторами синтеза и гидролиза АТФ. От них, например, зависят структурно-функциональные свойства РНК различных типов, активность РНК-полимераз и рибонуклеаз и др. Существуют специализированные белки, регулирующие гомеостаз и транспорт ионов магния в клетках [12]. Однако до настоящего времени не обнаружено иных примеров магнитно-изотопных эффектов в каких-либо ферментативных процессах, за исключением синтеза АТФ в цитированных выше работах [4, 5]. Поскольку пострадиационное восстановление клеток требует синтеза целого ряда стрессовых белков, то можно предположить, что кинетика восстановления лимитируется наличием АТФ как главного источника энергии в клетке. Соответственно, причиной магнитно-изотопного эффекта в наших экспериментах является более высокая эффективность синтеза АТФ “топливно-силовыми” нанореакторами клеток.

Таким образом, нами впервые в мире обнаружено, что магнитный изотоп ^{25}Mg существенно более эффективно, чем немагнитный изотоп ^{24}Mg , способствует восстановлению клеток от лучевых повреждений. Полученные результаты свидетельствуют о принципиальной возможности создания радиопротекторов на основе соединений стабильного магнитного изотопа магния. Механизмы “магнитно-изотопного катализа” и его возможные биологические следствия — дело дальнейших исследований.

Авторы выражают благодарность В. К. Карандашеву (Институт проблем технологии микроэлектроники и особочистых материалов РАН, Черноголовка, Московская область) за проведение элементного анализа образцов.

Работа выполнена при поддержке НАН Украины и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 10-04-90408-Укр_а и 10-03-01203а).

1. Гродзинский Д. М., Войтенко В. П., Кутлахмедов Ю. А., Кольтовер В. К. Надежность и старение биологических систем. – Киев: Наук. думка, 1987. – 172 с.
2. Михеев А. Н., Овсянникова Л. Г., Сытник С. В., Дяченко А. И., Гродзинский Д. М. Регенерационные механизмы онтогенетической радиоадаптации у растений // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2008. – **48**, № 1. – С. 59–66.
3. Young E. A., Galy A. The isotope geochemistry and cosmochemistry of magnesium // Rev. Mineral. Geochem. – 2004. – **55**. – P. 197–230.
4. Бучаченко А. Л. Новая изотопия в химии и биохимии. – Москва: Наука, 2007. – 190 с.
5. Vuchachenko A. L., Kouznetsov D. A., Breslavskaya N. N., Orlova M. A. Magnesium isotope effects in enzymatic phosphorylation // J. Phys. Chem. B. – 2008. – **112**, No 8. – P. 25–48.
6. Богатыренко Т. Н., Кудряшова Е. А., Туманова Л. В., Кольтовер В. К. Влияние различных изотопов магния на уровень активности супероксиддисмутазы при изучении кинетики роста *Escherichia coli* // V Междунар. конгр. “Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине”: Тез. докл. – Санкт-Петербург, 2009. – С. 92.
7. Кольтовер В. К., Кутлахмедов Ю. А., Афанасьева Е. Л. Восстановление клеток от лучевых повреждений с помощью антиоксидантов и надежность биологических систем // Докл. АН СССР. – 1980. – **254**, № 3. – С. 760–763.
8. Koltover V. K. Bioantioxidants: The systems reliability standpoint // Toxicol. and Industr. Health. – 2009. – **25**, No 4–5. – P. 295–299.
9. Корогодин В. И. Проблемы пострадиационного восстановления. – Москва: Атомиздат, 1966. – 486 с.
10. Королев В. Г. Экзационная репарация поврежденных оснований ДНК. АП-эндонуклеазы и ДНК-полимеразы // Генетика. – 2005. – **41**, № 10. – С. 1301–1309.
11. Novick A., Szilard L. Experiments on light-reactivation of ultra-violet inactivated bacteria // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1949. – **35**. – P. 591–600.
12. Dann C. E., Wakeman C. A., Sieling C. L. et al. Structure and mechanism of a metal-sensing regulatory RNA // Cell. – 2007. – **130**, No 5. – P. 878–892.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев
Петербургский институт ядерной физики РАН,
Гатчина, Ленинградская обл., Россия
Институт проблем химической физики РАН,
Черноголовка, Московская обл., Россия

Поступило в редакцию 19.05.2011

Academician of the NAS of Ukraine **D. M. Grodzinsky, T. A. Evstyukhina, V. K. Koltover, V. G. Korolev, Yu. A. Kutlakhmedov**

Effect of the magnetic isotope of magnesium, ^{25}Mg , on post-radiation recovery of *Saccharomyces cerevisiae*

Among three stable magnesium isotopes, ^{24}Mg , ^{25}Mg , and ^{26}Mg with natural abundance 79, 10, and 11%, only ^{25}Mg has the nuclear spin ($I = 5/2$) and, therefore, the nuclear magnetic moment. Two other isotopes are spinless ($I = 0$) and, hence, have no magnetic moment. We have revealed that magnetic isotope ^{25}Mg , by comparison to nonmagnetic isotope ^{24}Mg , essentially stimulates the recovery process in the yeast cells, *Saccharomyces cerevisiae*, after UV irradiation. Thus, we have first documented the magnetic isotope effect in radiation biology. This finding opens up the way to the development of novel radio-protectors based on the stable magnetic isotopes.