

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МАГНИТНОГО ИЗОТОПА МАГНИЯ-25 НА ПОСТРАДИАЦИОННОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ КЛЕТОК *SACCHAROMYCES* *CEREVISIAE*

В работе обнаружено, что магнитный изотоп ^{25}Mg существенно более эффективно, чем немагнитный изотоп ^{24}Mg способствует восстановлению клеток от лучевых повреждений. Полученные результаты демонстрируют принципиальную возможность создания радиопротекторов на основе соединений стабильного магнитного изотопа магния. Механизмы «магнитно-изотопного катализа» и его возможные биологические следствия – дело дальнейших исследований.

Ключевые слова: магнитный изотоп, немагнитный изотоп, восстановление, радиопротектор, клетка, магний.

У роботі виявлено, що магнітний ізотоп ^{25}Mg істотно більш ефективно, ніж немагнітний ізотоп ^{24}Mg сприяє відновленню клітин від променевих ушкоджень. Отримані результати демонструють принципову можливість створення радіопротекторів на основі сполук стабільного магнітного ізотопу магнію. Механізми «магнітно-ізотопного каталізу» і його можливі біологічні наслідки – справа подальших досліджень.

Ключові слова: магнітний ізотоп, немагнітний ізотоп, відновлення, радіопротектор, клітина, магній.

We found that the magnetic isotope ^{25}Mg significantly more effective than non-magnetic isotope ^{24}Mg promotes cellular repair of radiation damage. These results demonstrate the fundamental possibility of radioprotectors on the basis of a stable magnetic isotope compounds of magnesium. Mechanisms of the «magnetic isotope catalysis» and its possible biological consequences - business for further research.

Key words: magnetic isotope, non-magnetic isotope recovery, radioprotector, the cell magnesium.

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 служит 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]. Обнаружено, что клетки бактерий *Escherichia coli*, выросшие на магнитном изотопе ^{25}Mg , имеют более высокую жизнеспособность по сравнению с клетками, выращенными 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 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 MAT α ade2 Δ 248 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 ²⁴MgO и ²⁵MgO производства ФГУП «Электрохимприбор», Росатом, с изотопным обогащением, соответственно, 99.8 и 98.8 атом. процентов. Элементный состав растворов анализировался с помощью масс-спектрометра высокого разрешения с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS) «Element-2» (США). Клетки выращивали на стандартной питательной среде МЗ. В заранее приготовленную среду, не содержащую магния, объемом 3 мл вводили 0.1 мл клеточного инокулята, 0.1 мл этанола для стерилизации и

0.15 мл водного раствора сульфата магния-24 или магния-25; конечная концентрация магния в среде роста составляла 3.7 мМ/л. После трех суток 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 10⁵ клеток/мл) и облучали в этой среде жестким УФ светом ($\lambda = 240-260$ нм). 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. Выживаемость определяли методом подсчета макроколоний [9, 10]. Опыты ставились в двукратной повторности. Поскольку колонии клеток прорастали в темном термостате, то вклада фотореактивации ожидать не следует.

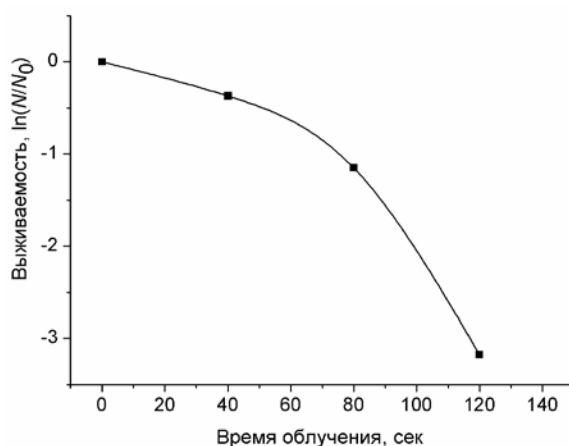


Рис. 1. Выживаемости клеток *S. cerevisiae* в зависимости от дозы УФ облучения. По оси ординат – логарифм выживаемости, КОЕ/мл, в процентах к колониеобразующей способности необлученного контроля. По оси абсцисс – время облучения.

В экспериментах с необлученными клетками нам не удалось обнаружить статистически достоверного изотопного эффекта: колониеобразующая способность клеток, обогащенных изотопом ²⁵Mg, лишь на 10 % превышала колониеобразующую способность клеток, обогащенных ²⁴Mg. Результаты экспериментов с облученными клетками представлены на рисунках. Доза облучения в экспериментах такого рода прямо пропорциональна времени облучения [9, 10]. Исходя из полученного графика дозовой зависимости (рис. 1), время облучения во всех экспериментах было выбрано, равным 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).

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

где D_{eff} – эффективная доза облучения,

D_0 – исходная доза облучения,

t – время восстановления,

β – константа скорости восстановления,

k – доля необратимых повреждений [9, 11].

Результаты расчетов кинетических параметров представлены в таблице 1. Из них видно, что клетки,

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 и соответственно увеличивается 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):

обогащенные магнитным изотопом магния, демонстрируют вдвое большую константу скорости пострадиационного восстановления по сравнению с клетками, обогащенными немагнитным изотопом магния. Доля необратимых лучевых повреждений при этом почти не изменяется.

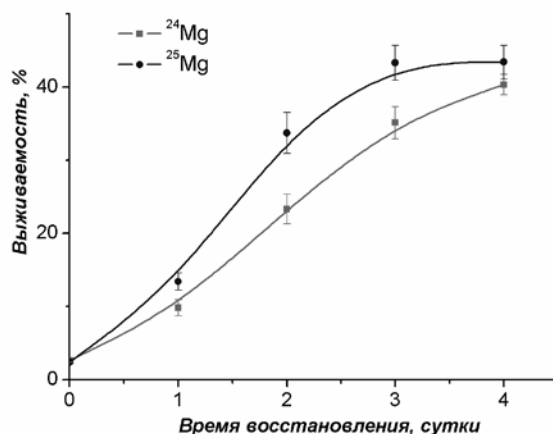


Рис 2. Кинетика пострадиационного восстановления клеток *S. cerevisiae*, обогаченных различными изотопами магния. По оси ординат – выживаемость, КОЕ/мл, в процентах к колониеобразующей способности необлученного контроля. По оси абсцисс – время инкубации в «голодной» среде в сутках

Таблиця 1

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

Изотоп магния	β , час ⁻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 $P = 0.02$.

Можно было бы предположить, что причиной эффекта служит различие в содержании примесей каких-нибудь 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. Кроме, количества примесей, поступавших в среду роста от других реактивов, существенно превышало количества тех же примесей от 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 ²⁵Mg по сравнению с ²⁴Mg.

Следовательно, активизация процесса восстановления клеток от лучевых поражений обусловлена магнитно-изотопным эффектом, а именно, тем, что изотоп ²⁵Mg имеет магнитный момент (ядерный спин) в отличие от изотопа ²⁴Mg. 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, а именно: окислительное фосфорилирование идет с магнитным изотопом ²⁵Mg в 2-3 раза эффективнее, чем с немагнитными ²⁴Mg и ²⁶Mg [5]. Для объяснения этого эффекта было пред-

положено [4, 5], что в активном центре АТФ-синтазы происходит перенос электрона от аниона фосфатной группы АДФ к иону Mg²⁺ с образованием ион-радикальной пары – Mg⁺-фосфатный радикал. Благодаря сверхтонкому взаимодействию, магнитный момент ядра ²⁵Mg 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 Mg²⁺ 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 в настоящее время в доступной литературе нет 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 служит более высокая эффективность синтеза АТФ «топливно-силовыми» нанореакторами клеток.

Таким образом, в нашей работе обнаружено, что магнитный изотоп ²⁵Mg существенно более эффективно, чем немагнитный изотоп ²⁴Mg способствует восстановлению клеток от лучевых повреждений.

Полученные результаты демонстрируют принципиальную возможность создания радиопротекторов на основе соединений стабильного магнитного изотопа магния. Механизмы «магнитно-изотопного катализа» и его возможные биологические следствия – дело дальнейших исследований.

Авторы благодарны В. К. Карандашеву (Институт проблем технологии микроэлектроники и особочис-

тых материалов РАН, Черноголовка, Московская обл.) за проведение элементного анализа образцов. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Национальной академии наук Украины (Международный конкурс российско-украинских проектов, грант 10-04-90408-Укр а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Гродзинский Д. М., Войтенко В. П., Кутлахмедов Ю. А., Кольтовер В. К. Надежность и старение биологических систем. – Киев: Наукова 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 – т. 48 (1) – с. 59-66.
3. Young E. A., Galy A. //Rev. Mineral. Geochem. – 2004. – V. 55. – p. 197-230.
4. Бучаченко А. Л. Новая изотопия в химии и биохимии. – М.: Наука, 2007. – 190 с.
5. Buchachenko A. L., Kouznetsov D. A., Breslavskaya N. N., Orlova M. A. // J. Phys. Chem. B – 2008 – v. 112 (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. конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине», тезисы 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 // ДАН СССР. – 1980. – Т. 254. № 3. – С. 760-763.
8. Koltover V. K. Bioantioxidants: The systems reliability standpoint. //Toxicology and Industrial Health. – 2009. – v 25 (4-5). – p 295-299.
9. Корогодин В. И. Проблемы пострадиационного восстановления. – М.: Атомиздат, 1966 – 486 с.
10. Королев В. Г. Эксцизионная репарация поврежденных оснований ДНК. AP- эндонуклеазы и ДНК-полимеразы. // Генетика. 2005. – V. 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. – V. 35. – P. 591-600.
12. Ramesh A., Winkler W. C. // RNA Biol. 2010. – V. 7. – P. 77-83.

Рецензенты: Гудков И. М., д.б.н., профессор;
Томілін Ю. А., д.б.н., професор

© Гродзинский Д. М., Евстюхина Т. А.,
Кольтовер В. К., Королев В. К.,
Кутлахмедов Ю. А., 2011

Стаття надійшла до редколегії 06.06.2011 р.