

ЛЕТУТА Ульяна Григорьевна

Магнитно-изотопные эффекты магния в клетках *E.coli*

03.01.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Саратов 2012

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Оренбургский государственный университет» в Научно-образовательном центре биохимической физики наносистем.

Научный руководитель:

Бердинский Виталий Львович
доктор физико-математических наук,
заведующий кафедрой физики конденсированного состояния
ФГБОУ ВПО «Оренбургский государственный университет»

Официальные оппоненты:

Проскуряков Иван Игоревич
доктор физико-математических наук,
зав. лабораторией молекулярной спектроскопии
Института фундаментальных проблем биологии РАН

Щеголев Сергей Юрьевич
доктор химических наук, профессор,
директор Института биохимии и физиологии
растений и микроорганизмов РАН


Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки
Институт химической физики РАН

Защита состоится « 18 » 02 _____ 2013 года в 15:30 часов на заседании диссертационного совета (Д.212.243.05) при Саратовском государственном университете им. Н.Г. Чернышевского по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, корпус 3, физический факультет СГУ.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке им. В.А. Артисевич Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского.

Автореферат разослан “ _____ ” _____ 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук, профессор  В.Л. Дербов

Общая характеристика работы

Актуальность работы. Большинство химических элементов имеют стабильные изотопы, отличающиеся и массой, и магнитными характеристиками атомных ядер. Некоторые изотопы, например, ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{25}Mg , ^{31}P , характеризуются наличием ядерных спинов и ядерных магнитных моментов и называются магнитными. Все бесспиновые изотопы немагнитны.

Различия атомных масс и магнитных свойств изотопов являются причиной масс-зависимых и магнитно-изотопных эффектов, соответственно. Известно множество масс-зависимых изотопных эффектов, проявляющихся как изменение скорости протекания химических реакций (Griffiths, 1998). Магнитно-изотопные эффекты в химии характерны только для радикальных реакций (Бучаченко, 1978). Они обусловлены, главным образом, влиянием ядерного магнитного момента на спиновую эволюцию радикальных пар (РП), судьба которых (внутриклеточная рекомбинация или внеклеточные реакции) определяется действием спиновых запретов и правил отбора.

Вплоть до открытия магнитно-изотопных эффектов в биохимии (Бучаченко, 2008) – в реакциях ферментативного фосфорилирования, – возможное влияние магнитных изотопов на живые организмы не предполагалось. Это было обусловлено несколькими причинами, главная из которых – отсутствие в живых организмах радикальных реакций с участием радикальных пар. Существуют свободно-радикальные биохимические реакции, подобные цепным неразветвленным радикальным реакциям (Toraya, 2003). Но магнитные и спиновые эффекты в таких реакциях невозможны из-за отсутствия радикальных пар.

Открытие магнитного изотопного эффекта в реакциях ферментативного фосфорилирования для магнитного изотопа магния $^{25}\text{Mg}^{2+}$ (Бучаченко и др., 2004), а также для $^{67}\text{Zn}^{2+}$ (Бучаченко и др., 2010) и $^{43}\text{Ca}^{2+}$ (Бучаченко и др., 2011), показало, что скорость ферментативных реакций зависит от наличия ядерного магнитного момента у иона металла, находящегося в активном сайте фосфорилирующего энзима. До последнего времени все обнаруженные магнитно-изотопные эффекты ферментативного фосфорилирования наблюдались *in vitro* – на выделенных митохондриях и чистых ферментах, обогащенных изотопами. Однако открытым остаётся вопрос, лежащий в основе новой фундаментальной научной проблемы, –

вливают ли магнитные моменты атомных ядер на внутриклеточные процессы *in vivo*, на функционирование целого организма?

Основная цель работы: Установить влияние магнитного ^{25}Mg и немагнитных ^{24}Mg , ^{26}Mg изотопов магния на жизнедеятельность целого организма на примере прокариотических бактериальных клеток *Escherichia coli* и теоретически обосновать возможность проявления магнитно-изотопных эффектов в живых организмах.

Задачи:

– получить магнитно-полевые зависимости констант скоростей ферментативных ион-радикальных реакций для Δg -механизма и механизма сверхтонкого взаимодействия ядерного спина и спина электрона, индуцирующих синглет-триплетную конверсию;

– оценить возможность использования магнитно-полевых зависимостей этих констант для изучения механизма ферментативных реакций, для оценки констант скоростей элементарных актов ферментативных реакций и для определения химических и магнитных характеристик интермедиатов;

– получить экспериментальные зависимости роста бактериальных клеток *E.coli* в присутствии магнитного ^{25}Mg и немагнитных ^{24}Mg , ^{26}Mg изотопов магния в питательной среде;

– экспериментально оценить влияние магнитного изотопа магния ^{25}Mg на основные показатели роста и развития бактерий по сравнению с немагнитными изотопами ^{24}Mg , ^{26}Mg : константу скорости роста, колониобразующую способность, константу скорости отмирания бактериальной культуры;

– исследовать влияние внутриклеточного обогащения изотопами магния на жизнеспособность клеточной культуры и её биохимический состав.

Положения, выносимые на защиту:

1. Спинзависимые ион-радикальные ферментативные реакции могут быть «первичным магниторецептором» в живых организмах, не требующим существования специального органа. Продукты этих реакций «превращают» эффекты ядерного спина и магнитного поля в «биохимический отклик» живых организмов.

2. Внешнее постоянное магнитное поле увеличивает величину эффекта магнитных изотопов химических элементов за счёт сверхтонкого взаимодействия в

слабых полях. Такие эффекты могут проявляться только в ферментативных реакциях, идущих с переносом одного или нескольких электронов, то есть с образованием ион-радикальных пар.

3. Константа скорости роста и колониеобразующая способность бактерий *E.coli* увеличиваются в присутствии магнитного изотопа магния ^{25}Mg по сравнению с немагнитными изотопами.

4. Клетки *E.coli*, обогащенные магнитным изотопом магния ^{25}Mg , при пересеве на новую питательную среду оказываются более жизнеспособными по сравнению с бактериями, обогащенными немагнитными изотопами $^{24,26}\text{Mg}$.

5. От типа изотопа магния – магнитный/немагнитный – зависит внутриклеточный элементный состав микроорганизмов *E. coli*.

Научная новизна работы. В теоретической части работы рассмотрены два механизма синглет-триплетной конверсии ион-радикальных пар, образующихся в активном сайте ферментов во время реакции: Δg -механизм, обусловленный разностью g -факторов ион-радикалов, и СТВ-механизм, обусловленный сверхтонкими взаимодействиями неспаренных электронных спинов с ядерными спинами. Показано, что спинзависимые ион-радикальные ферментативные реакции в различных участках тел могут быть “первичным магниторецептором“ в живых организмах, не требующим создания специального органа. Продукты этих реакций “превращают” эффекты ядерного спина и магнитного поля в “биохимический отклик“ живых организмов. Получены зависимости скоростей ферментативных реакций от величины констант сверхтонких взаимодействий, от напряженности магнитного поля и от констант скоростей элементарных актов ферментативных реакций.

В ходе решения поставленной научной проблемы были получены экспериментальные результаты, доказывающие магнитно-изотопные эффекты магния ^{25}Mg *in vivo* в клетках *E.coli*: на константы скоростей роста и отмирания, на колониеобразующую способность и внутриклеточный элементный состав бактериальных клеток. Впервые экспериментально надежно и однозначно доказано, что магнитный изотоп ^{25}Mg , находясь в составе живых клеток, влияет на их рост, развитие и жизнедеятельность, а его биологические эффекты отличаются от эффектов немагнитных изотопов $^{24,26}\text{Mg}$.

Научно-практическая значимость.

Полученные экспериментальные данные и проведенные теоретические расчёты влияния магнитных полей на живые организмы открывает широкие горизонты для исследования действия многих жизненно важных элементов, имеющих природные стабильные магнитные изотопы, на внутриклеточные процессы. Подобные исследования станут фундаментом для новых научных направлений в рамках биофизики, физико-химической молекулярной и клеточной биологии – спиновой биохимии и спиновой микробиологии.

В ходе выполнения работ разработана методика приготовления питательных сред и культивирования микроорганизмов в присутствии изотопов магния, позволяющая выращивать бактерии с высоким внутриклеточным содержанием изотопов и имеющая большую практическую значимость для дальнейших исследований магнитно-изотопных эффектов. Получены патенты на способ повышения жизнеспособности клеток *E.coli* и способ изотопного обогащения.

Личный вклад соискателя. Автор участвовал в постановке задач, в получении всех теоретических результатов, самостоятельно проводил все эксперименты и обрабатывал результаты, участвовал в апробации работы.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на следующих международных и российских конференциях: The 12th International symposium on spin and magnetic field effects in chemistry and related phenomena (Нидерланды, Нордвик, 10-15 мая 2011); 2, 3, 4th International conference on Magneto-science 2007 (Япония, Хиросима), 2009 (Нидерланды, Наймеген), 2011 (Китай, Шанхай&Сиань); IV, V Российско-Японский семинар «Магнитные явления в физикохимии молекулярных систем» (Оренбург, 2009-2010 гг.); 15-я, 16-ая, 18-ая Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (г. Москва, 2008-2012 гг.); 20, 21, 22, 23-й Международный симпозиум «Современная химическая физика» (г. Туапсе, 2008-2011 гг.). Работа выполнена в соответствии с грантами РФФИ № 09-03-09432, 10-03-01203, 10-04-96083, 11-03-09581 и в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы, ГК № 02.740.11.0703, П207, 14.740.11.1193.

Публикации. Основные результаты работы опубликованы в 3 статьях и 16 тезисах докладов международных и всероссийских конференций.

Объём и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, трёх глав, включая литературный обзор, оригинальные теоретические и экспериментальные результаты, выводов, списка цитируемой литературы. В конце каждой главы приведены основные результаты и выводы. Работа изложена на 106 страницах и содержит 46 рисунков.

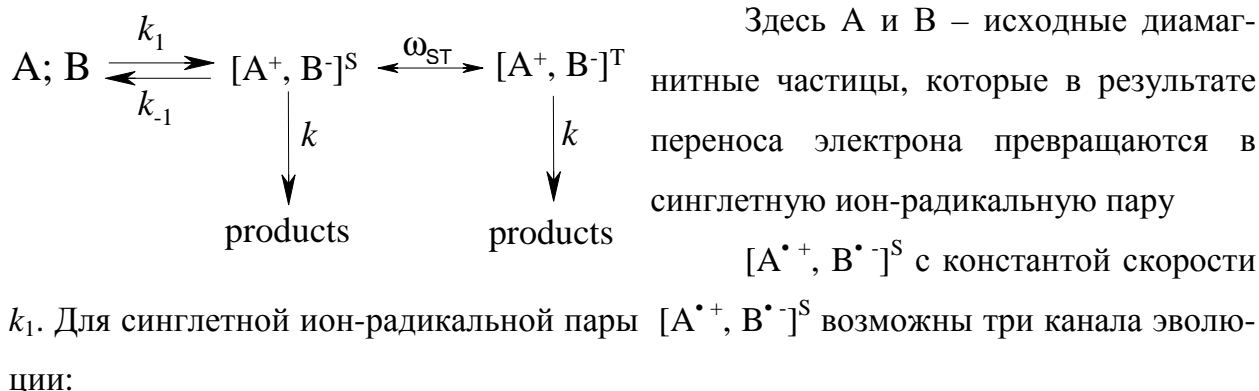
Содержание работы

Во Введении обоснована актуальность работы, приведена структура диссертации, поставлена цель исследования и сформулированы основные задачи.

В **Главе 1** дан обзор биологических функций магния, участвующего более чем в 300 ферментативных процессах. Представлены литературные данные о роли магния для жизнедеятельности всех живых организмов и функциональной значимости ионов магния для прокариотических микроорганизмов – бактерий. Описаны магнитно-изотопные эффекты в Mg-, Ca- и Zn-зависимых ферментативных реакциях. Приведены литературные данные, обосновывающие ион-радикальный механизм ферментативного фосфорилирования с участием ядерных спинов магнитных изотопов. Описаны уже существующие применения магнитно-изотопных эффектов магния в медицинской практике, например, для лечения гипоксии миокарда.

В **Главе 2** представлены результаты квантово-механических теоретических расчётов. Рассмотрены Δg- и СТВ-механизмы спиновой конверсии ион-радикальной пары (ИРП), образующейся в активном сайте ферментов.

Для анализа влияния магнитного поля на ферментативные реакции использовалась идеализированная кинетическая схема такой реакции.



- 1) обратный перенос электрона на акцептор с константой скорости k_{-1} ;

2) дальнейший перенос электрона или трансформация субстратов, приводящие к образованию продуктов с константой скорости k ;

3) спиновая эволюция, переводящая синглетную ИРП в триплетное состояние $[A^{\bullet+}, B^{\bullet-}]^T$ с частотой ω_{ST} , определяемой магнитными взаимодействиями неспаренных электронных спинов.

Аналогично системе кинетических уравнений, используемых в обычной химической кинетике, была построена система уравнений для спиновых матриц плотности ρ , характеризующих частицы на разных стадиях реакции.

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d\rho^{AB}}{dt} = -k_1\rho^{AB} + k_{-1}Tr(P_S\rho^I P_S) \\ \frac{d\rho^I}{dt} = -i\hbar^{-1}[H, \rho^I] - \frac{k_{-1}}{2}[P_S\rho^I + \rho^I P_S] - k\rho^I + k_1\rho^{AB} \\ \frac{d\rho^P}{dt} = k\rho^I \end{array} \right. \quad (1)$$

$$\left. \begin{array}{l} \frac{d\rho^I}{dt} = -i\hbar^{-1}[H, \rho^I] - \frac{k_{-1}}{2}[P_S\rho^I + \rho^I P_S] - k\rho^I + k_1\rho^{AB} \end{array} \right\} \quad (2)$$

$$\left. \begin{array}{l} \frac{d\rho^P}{dt} = k\rho^I \end{array} \right\} \quad (3)$$

Здесь ρ^{AB} – спиновая матрица плотности для исходных реагентов А и В в синглетном состоянии, а уравнение (1) описывает, соответственно, превращение исходных частиц, находящихся в активном сайте фермента; ρ^I – матрица плотности для ион-радикальных пар в синглетном и триплетном состоянии, а уравнение (2) описывает превращение ион-радикальных пар; ρ^P – матрица плотности для продуктов реакции, и уравнение (3) описывает образование продуктов реакции; P_S - оператор проектирования в синглетное состояние, H – спиновый гамильтониан ион-радикальной пары.

Для расчёта магнитнополевых зависимостей констант скоростей ферментативных реакций впервые использовано квазистационарное приближение, что позволило считать скорость образования продуктов ферментативной реакции приближенно равной скорости расходования исходных реагентов. Поэтому вместо расчёта суммарной константы k_p скорости образования продуктов рассчитывалась константа скорости исчезновения исходных частиц А или В. Таким образом, для расчёта констант скорости образования продуктов нам достаточно одного матричного элемента $\rho_{SS}^I = P_S\rho^I P_S$.

Показано, что для квазистационарного приближения (при $t > (k_1)^{-1}$) количество синглетных ион-радикальных пар описывается выражением

$$\rho_{SS}^I(t) = (\rho_{cm}^I)_{SS} e^{-k_p t}, \quad (4)$$

где $(\rho_{cm}^I)_{SS}$ - амплитуда количества ион-радикальных пар в синглетном состоянии - находилась как решение системы алгебраических уравнений, получаемых из уравнения (2),

$$-i\hbar^{-1} [H, \rho_{cm}^I] - \frac{k_{-1}}{2} \{P_S \rho_{cm}^I + \rho_{cm}^I P_S\} - k \rho_{cm}^I + k_1 |S\rangle\langle S| = 0. \quad (5)$$

При подстановке решения (4) в уравнение (1) получается

$$\frac{k_p}{k_1} = 1 - \frac{k_{-1}}{k} (\rho_{cm}^I)_{SS} \quad (6)$$

Уравнение (6) устанавливает связь константы скорости k_p ферментативной реакции с константами элементарных процессов переноса электрона или разделения зарядов и с относительной «концентрацией» ион-радикальных состояний $(\rho_{cm}^I)_{SS}$. Даже малые изменения количества синглетных ИРП способны оказать сильное влияние на константу k_p и на скорость образования продуктов. Можно считать, что отношение констант k_{-1}/k играет роль «биохимического усилителя», способного существенно увеличить эффект даже малых изменений количества ИРП, вызываемых действием магнитного поля.

Использование квазистационарного приближения позволило получить выражение для магнитнополевой зависимости константы скорости магниточувствительного ферментативного процесса для Δg -механизма спиновой конверсии ИРП

$$\frac{k_p(\Delta\omega)}{k_1} = 1 - \frac{k_{-1}/k(2 + k_{-1}/k + (\Delta\omega/k)^2)}{(2 + k_{-1}/k)(1 + k_{-1}/k + (\Delta\omega/k)^2)} \quad (7)$$

На рис.1 показана магнитнополевая зависимость константы скорости магниточувствительного ферментативного процесса. Каждая из кривых на графике соответствует разным значениям отношения констант k_{-1}/k . Верхняя кривая соответствует наименьшему значению отношения, нижняя – наибольшему. Здесь снова проявляется действие отношения констант скоростей обратной реакции и образования продуктов как «биохимического усилителя».

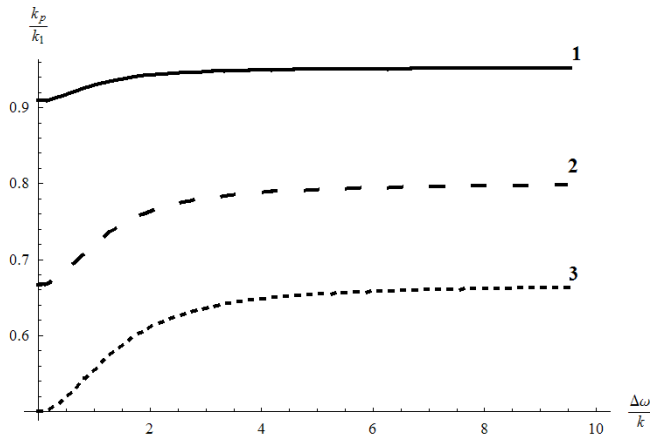


Рис. 1 Магнитнополевая зависимость $\frac{k_p(\Delta\omega)}{k_1}$. Кривая 1 соответствует значению отношения $k_{-1}/k = 0.1$, кривая 2 - $k_{-1}/k = 0.5$, кривая 3 - $k_{-1}/k = 1$

Эта зависимость $\frac{k_p(\Delta\omega)}{k_1}$ имеет монотонный характер и возрастает при увеличении напряженности магнитного поля. При стремлении магнитного поля к бесконечности отношение $\frac{k_p(\Delta\omega)}{k_1}$ достигает предельного значения

$$\frac{k_p(\Delta\omega \rightarrow \infty)}{k_1} = \frac{2}{2 + k_{-1}/k} \quad (8)$$

При определенных значениях констант k_{-1}/k данная зависимость выходит на насыщение, и дальнейшее увеличение поля не будет влиять на скорость образования продуктов.

Экспериментальные магнитнополевые зависимости удобнее относить к значениям величин, наблюдаемым в нулевом магнитном поле. В данном случае это эквивалентно нормированию функции (7) на величину $\frac{k_p(0)}{k_1} = \frac{k}{k + k_1}$. При такой нормировке магнитнополевая зависимость принимает вид:

$$\frac{k_p(\Delta\omega)}{k_p(0)} = 1 + \frac{k_{-1}(\Delta\omega)^2 / k^3}{(2 + k_{-1}/k)(1 + k_{-1}/k + (\Delta\omega/k)^2)} \quad (9)$$

Замечательная особенность этого выражения в том, что оно не зависит от константы скорости прямого переноса электрона k_1 . Несколько графиков магнитнополевых зависимостей, нормированных таким образом, представлены на рисунке 2. Относительные изменения увеличиваются с ростом отношения констант k_{-1}/k . Снова наблюдается эффективность влияния магнитного поля на организмы с большими значениями отношения k_{-1}/k . В клетках константа скорости k определяется не только свойствами фермента, но и зависит от многих других факторов, в

том числе, от скорости сопряженных реакций, температуры и т.д. Неблагоприятные внешние условия способны уменьшать константу скорости k и увеличивать отношение k_{-1}/k . Но в таком случае, согласно уравнению (6), будет возрастать эффективность влияния спин-зависимых стадий на протекание ферментативных реакций. Следовательно, влияния внешнего магнитного поля и ядерного спина должны ярче проявляться в живых организмах, находящихся в неоптимальных внешних условиях. Если же изменение условий интенсифицируют ферментативные процессы, то соответствующее увеличение константы скорости k будет проявляться как ослабление эффектов внешнего магнитного поля.

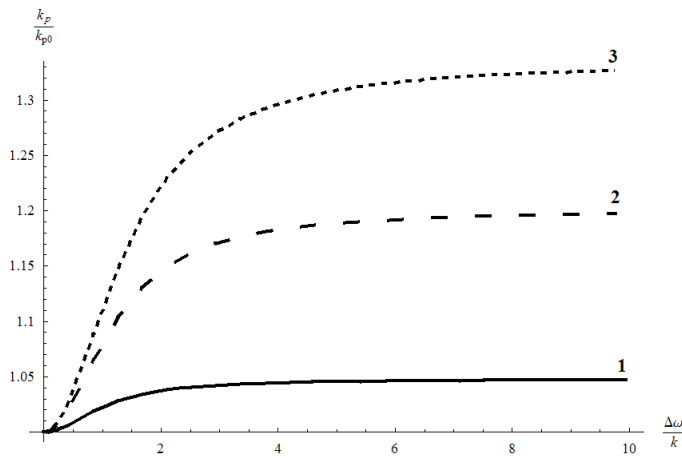


Рис. 2 Магнитнополевая зависимость, нормированная на значение в нулевом магнитном поле. Кривая 1 соответствует значению отношения $k_{-1}/k = 0.1$, кривая 2 - $k_{-1}/k = 0.5$, кривая 3 - $k_{-1}/k = 1$.

При анализе характерных точек, например, точки перегиба, получено, что уменьшение константы скорости k сдвигает магнитнополевую зависимость в сторону слабых магнитных полей. Очевидно, что в магнитных полях $H \gg H_{1/2}$ скорости магниточувствительных ион-радикальных ферментативных процессов будут слабо зависеть от изменений сильного магнитного поля.

Для механизма сверхтонкого взаимодействия ядерного спина с электронным спином гамильтониан имеет вид:

$$H = g_1 \beta H S_z^1 + g_2 \beta H S_z^2 + a \overline{S_2 I} = \omega_1 S_z^1 + \omega_2 S_z^2 + a \overline{S_2 I}, \quad (10)$$

где a - константа сверхтонкого взаимодействия соответствующего ядерного спина.

Для СТВ-механизма спиновой конверсии ИРП решение системы (1)-(3) с применением квазистационарного приближения принимает вид

$$\frac{k_p(\omega)}{k_1} = 1 + \frac{k_1 k_{-1}}{8k^2} \frac{a^2}{a^2 + \omega^2} - \frac{k_1 k_{-1}}{2} \left[\frac{1}{k^2} + \frac{a^2}{4(k^2 + a^2 + \omega^2)(a^2 + \omega^2)} + \frac{k^2 + a/2 + \omega^2}{k^4 + (a\omega/2)^2 + k^2(\omega^2 + a^2)} \right], \quad (11)$$

Для построения магнитно-полевой зависимости констант скоростей ферментативного процесса были введены следующие обозначения

$$\mu = \frac{k}{a}; \mu_1 = \frac{k_1}{a}; \mu_{-1} = \frac{k_{-1}}{a}; \nu = \frac{\omega}{a}. \quad (12)$$

Тогда

$$\frac{k_p}{k_1} = 1 + \frac{\mu_1 \mu_{-1}}{8\mu^2} \frac{1}{\nu^2 + 1} - \frac{\mu_1 \mu_{-1}}{2} \left[\frac{1}{\mu^2} + \frac{1}{4(\mu^2 + \nu^2 + 1)(\nu^2 + 1)} + \frac{\mu^2 + \nu^2 + 1/2}{\mu^4 + (\nu/2)^2 + \mu^2(\nu^2 + 1)} \right]. \quad (13)$$

График получаемой магнитно-полевой зависимости представлен на рисунке 3.

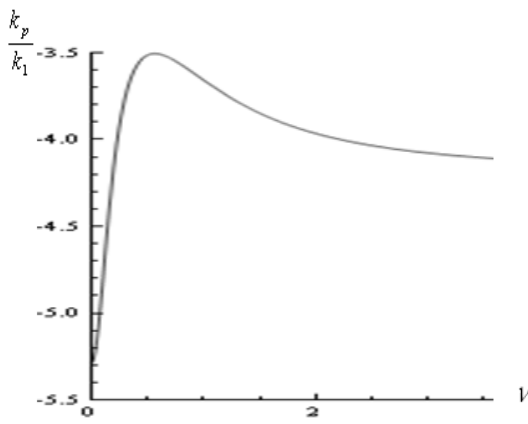


Рис. 3 Магнитнополевая зависимость $\frac{k_p(\omega)}{k_1}$. Кривая соответствует следующим значениям $\mu = 0.1, \mu_1 \mu_{-1} = 0.1$

Магнитнополевая зависимость $\frac{k_p(\omega)}{k_1}$, как видно из рисунка 3, быстро возрастает при $\nu \ll 1$, то есть для малых значений величины ω или слабых магнитных полей. Далее следует максимальное значение и медленный спад до определенного значения. То есть, при $\omega \rightarrow \infty$ данная зависимость выходит на насыщение и выражение (13) принимает вид:

$$\frac{k_p(\infty)}{k_1} = 1 - \frac{k_1 k_{-1}}{2k^2} \frac{8k^2 + a^2}{4k^2 + a^2} \quad (14)$$

Очевидно, что характер магнитнополевой зависимости константы скорости ферментативной реакции будет зависеть от соотношения констант прямого и обратного переноса электрона k_1 и k_{-1} и участвующего в процессе ядерного спина, то есть константы сверхтонкого взаимодействия. Для описания характера магнитно-полевой зависимости преобразуем выражение (13) следующим образом:

$$\left(\frac{k_p}{k_1} - 1 \right) \frac{2k^2}{k_1 k_{-1}} = \frac{1}{8} \frac{1}{\mu^2 + \nu^2 + 1} - \frac{1 + 8\mu^2}{1 + 4\mu^2} - \frac{2\mu^2(1 - 2\mu^2)}{1 + 4\mu^2} \frac{1}{\mu^2 + \nu^2 + 3\mu^2/(1 + 4\mu^2)} \quad (15)$$

В полученном выражении первое и третье слагаемые представляют собой кривые Лоренца – обычную и «перевернутую» (рисунок 4 а) и б) соответственно). Второе слагаемое представляет некую поправку, так как не зависит от магнитного поля.

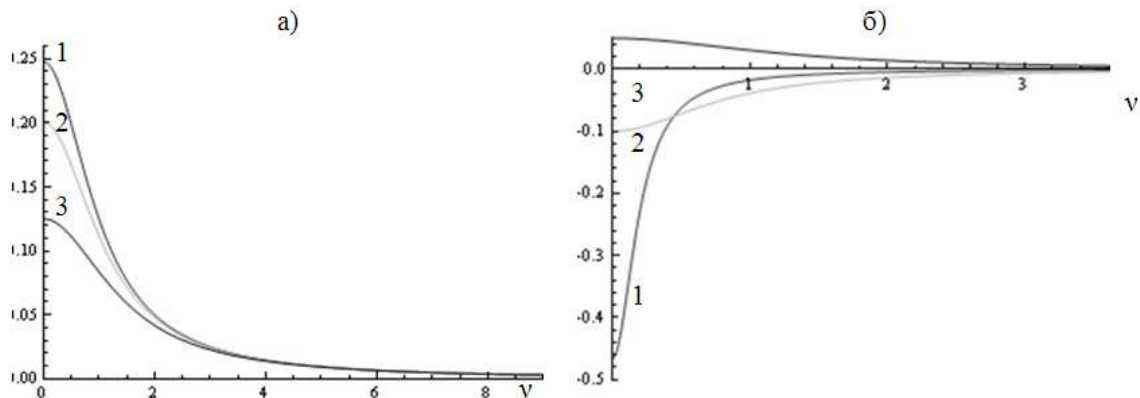


Рис. 4 Кривые Лоренца, описывающие слагаемые магнитно-полевой зависимости констант скорости ферментативной реакции (15). Кривая 1 соответствует значению $\mu=0.1$; кривая 2 - $\mu=0.5$; кривая 3 - $\mu=1$

Максимальное значение кривых определяется соотношением константы сверхтонкого взаимодействия ядра и константы скорости самой реакции k/a . При $k \approx a$ и $k > a$ магнитно-полевая зависимость принимает вид прямой. Для таких условий наблюдение магнитно-полевых эффектов в ферментативных реакциях становится невозможным. Для значений $k < a$ магнитно-полевые эффекты в ферментативных реакциях могут быть обнаружены в слабых магнитных полях, где магнитно-полевая зависимость принимает вид, приведенный на рисунке 3.

Суммарное действие внешнего магнитного поля на конкретный живой организм будет зависеть: от внутриклеточного природного магнитно-изотопного содержания химических элементов; от степени участия таких изотопов в физико-химических стадиях ферментативных процессов; от условий протекания ферментативной реакции, прямым или косвенным образом влияющих на её константу скорости.

В **Главе 3** описаны полученные магнитно-изотопные эффекты магния *in vivo* в клетках *E.coli*, свидетельствующие о влиянии ядерного спина магнитного изотопа ^{25}Mg на внутриклеточные ферментативные процессы.

Материалы и методы

В качестве объекта исследований использовалась культура клеток *Escherichia coli* – музейный штамм K12TG1. Бактерии *E.coli* выращивались в минимальных синтетических питательных средах M9, содержащих на 1 л дистиллированной воды: NH_4Cl – 2 г, $^{24,25,26}\text{MgSO}_4$ – 260 мг, глюкоза – 10 г, Na_2HPO_4 – 12 г, KH_2PO_4 – 6 г, NaCl – 1 г. Питательные среды различались только изотопной формой содержащегося в сульфате магния – немагнитные ^{24}Mg , ^{26}Mg , магнитный ^{25}Mg и природный изотоп $^*\text{Mg}$ магния. При приготовлении синтетической питательной среды M9 строго контролировался $\text{pH} = 6.85 \pm 0.15$. Для приготовления сульфатов магния использовались изотопно-чистые оксиды ^{24}MgO , ^{25}MgO и ^{26}MgO производства ФГУП «Электрохимприбор» с рекордно высоким изотопным обогащением 99.8, 98.8 и 97.7 атомных процентов, соответственно.

Музейный штамм *Escherichia coli* предварительно инкубировался в Lb-бульоне (Sigma Aldrich Co.) в течение 16 часов при температуре 37 °C. После клетки *E.coli* пересеивались в среды M9 с ^{24}Mg , ^{25}Mg , ^{26}Mg , соответственно. В качестве контроля использовалась питательная среда с природным содержанием изотопов $^*\text{Mg}$, то есть смесь изотопов в их природном соотношении. В одной из экспериментальных серий раствор с подобным соотношением изотопов был приготовлен искусственно из сульфатов изотопов магния для дополнительного контроля чистоты эксперимента.

При культивировании бактериальных клеток поддерживалась постоянная аэрация путём помещения сред с культурой бактерий на шейкер ST-3 ELMi. Скорость вращения платформы – 200 об/мин. Ростовые кривые (зависимости оптической плотности суспензий, характеризующей рост бактериальной культуры, от времени культивирования) получались турбидиметрическим методом с помощью измерения оптической плотности суспензий каждый час на спектрофлуориметре «SOLAR 2203» на следующих длинах волн: 450, 492, 540 и 620 нм. Все исходные среды M9 исследовались масс-спектральными (X-7, Thermo Elemental, США) и атомно-эмиссионными (ICAP-61, Thermo Jarrell Ash, США) методами анализа на

содержание следующих элементов: Li, Be, B, Na, Mg, Al, Si, P, S, K, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Br, Rb, Sr, Y, Zr, Mo, Nb, Ru, Rh, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Te, Cs, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Th и U (ИПТМ РАН). Результаты исследований приведены на рисунке 5(а, б). Достоверных различий в содержании основных и примесных элементов в питательной среде не обнаружено. Это означает, что проявление обнаруженных биологических эффектов изотопов магния не связано с влиянием примесных элементов на жизнедеятельность бактерий. Наблюдаемые различия связаны, в первую очередь, с изменением хода метаболических процессов в бактериальных клетках в зависимости от типа – магнитный/немагнитный – изотопа магния.

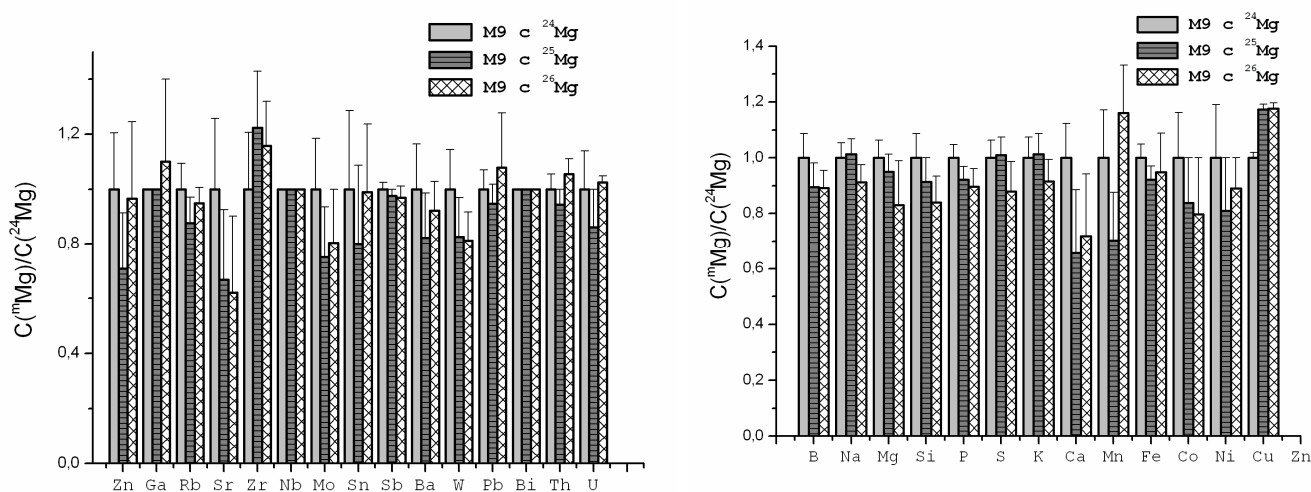


Рис. 5 Относительное содержание элементов питательных сред М9; $C(^m\text{Mg})$ – концентрация элементов в средах М9, где m – обозначает атомную массу изотопа (24,25 или 26), добавляемого в соответствующую питательную среду. $C(^{24}\text{Mg})$ – концентрация элементов в питательной среде М9, содержащей изотоп магния ^{24}Mg .

Для исследования влияния изотопов магния на стационарную фазу роста и на фазу отмирания бактериальной культуры применялся метод измерения колониобразующих единиц (КОЕ) с применением серийных разведений. Подсчёт КОЕ производился после 16 часов инкубации бактерий на Lb-агаре при 37°C .

После 20 часов культивирования в магний-изотопных средах М9 клетки *E.coli* были пересеяны (в эквивалентных количествах) на аналогичную среду М9, но совершенно не содержащую искусственно добавляемого магния, т.е. концентрация ионов магния Mg^{2+} составляла 0 моль/л (состав среды NH_4Cl – 2 г. глюкоза –

10 г, Na_2HPO_4 – 12 г, KH_2PO_4 – 6 г, NaCl – 1 г). Колониеобразующая способность измерялась через 24, 48, 72 часа после начала культивирования. Данный эксперимент уникален, так как на его результаты не могли повлиять различия в содержании примесных элементов в М9 – так как среда, в которой росла культура, одинакова для всех клеток. Этот простой эксперимент позволил определить, какой из изотопов магния наиболее эффективен для роста бактерий уже в качестве внутриклеточного элемента.

Все экспериментальные данные статистически обрабатывались с помощью прикладного программного пакета Origin 8.0 с применением критерия Стьюдента.

В результате проведения 10 независимых экспериментальных серий, 4 из которых были «double blind» (в каждой серии было минимум 2 повтора для каждого изотопа), были получены ростовые кривые для клеток *E.coli* (рисунок 6), отражающие различное влияние изотопов магния (магнитных и немагнитных) на рост микроорганизмов. Адаптационная фаза роста бактерий *E.coli* на средах с немагнитными изотопами магния $^{24,26}\text{Mg}$ длилась не менее часа, как видно на экспериментальных ростовых кривых. Оптическая плотность культуры клеток *E.coli*, растущих на среде с магнитным изотопом магния ^{25}Mg , уже на первом часу увеличилась вдвое, что свидетельствует об увеличении количества бактериальных клеток – микроорганизмы при пересеве на среду с ^{25}Mg не нуждаются в длительной адаптации к новым условиям. Это означает, что магнитный изотоп магния оказывается более эффективным на начальном этапе роста бактериальной культуры по сравнению с немагнитными изотопами.

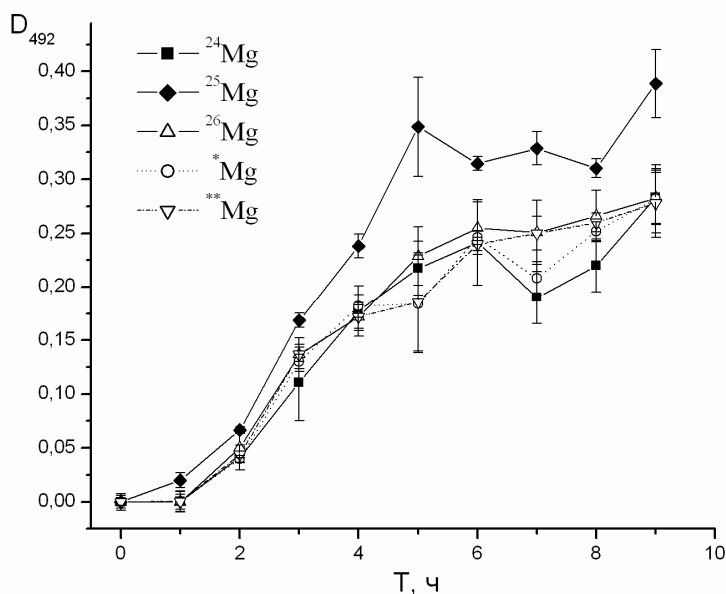


Рис. 6 Ростовые кривые клеток *E. coli*, выращенных на питательных средах М9 с изотопами магния. ^{24}Mg , ^{25}Mg и ^{26}Mg – пит. среда М9 с соответствующим изотопом магния; *Mg – с природным магнием; **Mg – с магнием, полученным из смеси изотопов в их природном соотношении. Регистрация оптической плотности производилась на длине волны 492 нм.

С помощью линейной и экспоненциальной аппроксимации ростовых кривых были определены характерные параметры – продолжительность адапционной фазы (рисунок 7) и константа скорости роста бактериальной культуры (рисунок 8).

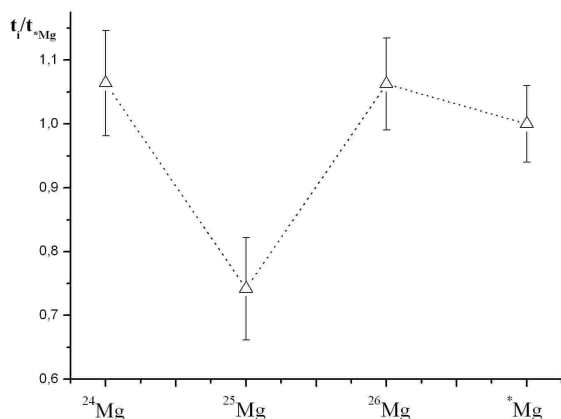
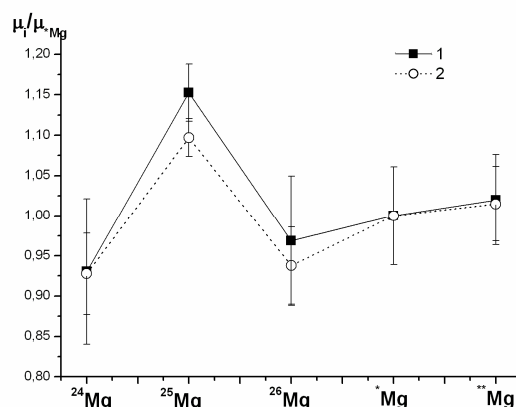


Рис. 7 Относительные значения продолжительности адапционной фазы роста как функция изотопии магния. t_i – продолжительность адапционной фазы для клеток, выращенных на среде с i -м изотопом (^{24}Mg , ^{25}Mg , ^{26}Mg , *Mg); t_{*Mg} – продолжительность адапционной фазы для клеток, выращенных на среде с природным магнием *Mg.

Рис. 8 Относительные значения констант скорости роста для клеток как функция изотопии магния. μ_i – константа скорости роста для клеток, выращенных на среде с i -м изотопом (^{24}Mg , ^{25}Mg , ^{26}Mg , *Mg или **Mg); μ_{*Mg} – константа скорости роста для клеток, выращенных на среде с природным магнием *Mg. Константы найдены с помощью экспоненциальной (1) и линейной (2) аппроксимации.



Как видно из графика (рис. 8), независимо от способа аппроксимации константа скорости роста для бактерий, растущих на средах с ^{25}Mg , оказывается достоверно выше на 10-15 % по сравнению с клетками, потребляющих в качестве питательного субстрата немагнитные изотопы магния. Качественно полученные экспериментальные зависимости совпадают с данными по влиянию магнитного изотопа магния на скорость ферментативного фосфорилирования (Бучаченко, 2004). Бактериальная культура при пересеве в среду М9 попадает в совершенно новые для неё условия, что является своеобразным стрессовым фактором. Во время короткой адаптации и начала экспоненциальной фазы функциональные системы перестраиваются для инициации активного деления. Именно на этом этапе скорость синтеза АТФ играет решающую роль – запуск большинства процессов, связанных с ростом

и делением клетки, требует расхода энергии. То есть, полученный магнитно-изотопный эффект изотопа магния определяется, в том числе, и скоростью накопления бактериями достаточного количества макроэнергических молекул АТФ, необходимого для активной жизни.

Другим важным микробиологическим показателем, характеризующим рост бактериальной культуры, является колониобразующая способность (КОЕ). При подсчёте КОЕ на стационарной фазе роста и фазе отмирания бактерий были получены результаты, представленные на рисунке 9. Данные экспериментальные зависимости подтверждают полученную кинетику роста микроорганизмов – на среде с магнитным изотопом ^{25}Mg колониобразующая способность клеток *E.coli* выше в 1,5-2 раза в различных экспериментальных сериях по сравнению с немагнитными изотопами $^{24,26}\text{Mg}$ вплоть до третьего дня культивирования (рисунок 9). Присутствие ^{25}Mg в питательной среде в виде трофического субстрата увеличивает жизнеспособность клеточной культуры. Её определяет накопленный клетками магний за цикл роста до стационарной фазы – после пересева таких клеток на новую питательную среду именно содержащийся в них магний становится основным источником двухвалентных ионов, необходимых для активации жизнеобеспечивающей деятельности многих ферментов.

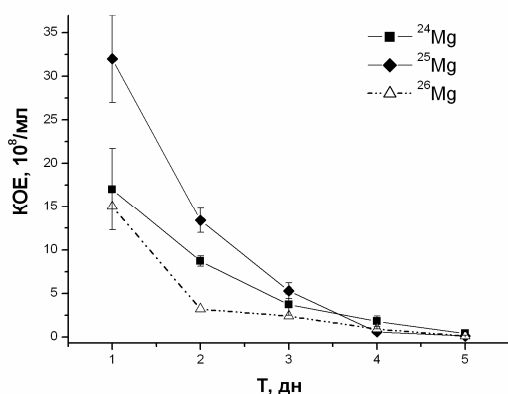


Рис. 9 КОЕ клеток *E.coli* на начальной фазе отмирания, выращенных на питательных средах М9 с изотопами магния ^{24}Mg , ^{25}Mg , ^{26}Mg .

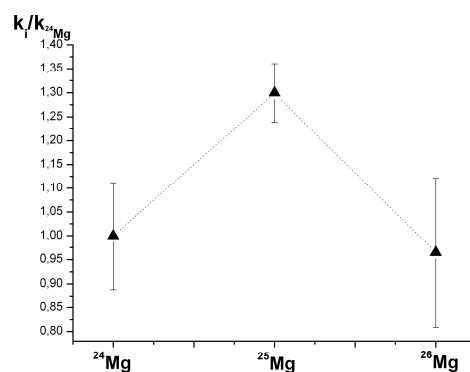


Рис. 10 Относительные значения констант скоростей отмирания клеток *E.coli*, как функция изотопии магния. k_i – константа скорости отмирания для клеток, выращенных на среде с *i*-м изотопом (^{24}Mg , ^{25}Mg или ^{26}Mg); $k_{^{24}\text{Mg}}$ – константа скорости отмирания для клеток, выращенных на среде с изотопом магния ^{24}Mg .

Константа скорости отмирания бактериальной культуры, культивируемой на питательной среде с магнитным изотопом магния ^{25}Mg , оказывается выше по сравнению с немагнитными изотопами $^{24,26}\text{Mg}$ (рисунок 10). Это означает, что изменение хода метаболических процессов на стадии роста влечёт за собой неизбежные изменения и на стадии отмирания культуры. Константа скорости определялась как показатель убывающей экспоненциальной функции при аппроксимации кривых отмирания.

Необходимо отметить, что практически во всех экспериментах не наблюдалось достоверных различий между немагнитными изотопами магния ^{24}Mg и ^{26}Mg . Это говорит именно о магнитной природе обнаруженных эффектов изотопа ^{25}Mg , не связанных с различием атомных масс изотопов.

После 20 часов культивирования на магний-изотопных средах бактерии были обогащены по соответствующему изотопу магния до 99,5 % по сравнению с исходной бактериальной культурой, выращенной на питательном бульоне Lb, как видно из данных таблицы 1.

Таблица 1 – Соотношение изотопов магния (%) в клетках *E.coli* после цикла культивирования на изотопных средах М9*

Изотоп	исходная культура	Клетки, выращенные на среде М9 с ^{24}Mg	Клетки, выращенные на среде М9 с ^{25}Mg	Клетки, выращенные на среде М9 с ^{26}Mg
^{24}Mg	87,8	99,5	6,6	10,0
^{25}Mg	5,9	0,23	92,5	1,6
^{26}Mg	6,3	0,23	0,87	88,4

* Погрешность определения от 1.2 % отн. для 95 % до 15 % для 0.5%

Цикл культивирования бактерий на питательных средах, содержащих изотопы магния в качестве питательного субстрата, приводит к практически полному замещению внутриклеточного магния на конкретный изотоп. Поэтому пересев таких изотопно-обогащенных клеток на питательную среду с нулевой концентрацией ионов магния покажет, насколько каждый из изотопов эффективен в качестве внутриклеточного элемента.

Измерение колониеобразующей способности при проведении такого эксперимента показало, что бактерии, обогащенные магнитным изотопом магния ^{25}Mg ,

формировали большее количество жизнеспособных колоний по сравнению с немагнитными изотопами магния $^{24,26}\text{Mg}$ в течение трёх дней (рисунок 11). С вероятностью, соответствующей степени обогащения бактерий изотопом магния (таблица 1), внутриклеточные системы, в том числе ферментативные, будут использовать именно конкретный изотоп. То есть все процессы, идущие в клетках, обогащенных по магнитному изотопу магния ^{25}Mg , с вероятностью 92,5 % будут использовать именно его в качестве активного элемента. Увеличение колониеобразующей способности бактерий, содержащих ^{25}Mg , свидетельствует о более эффективной работе ферментативных систем, использующих магний.

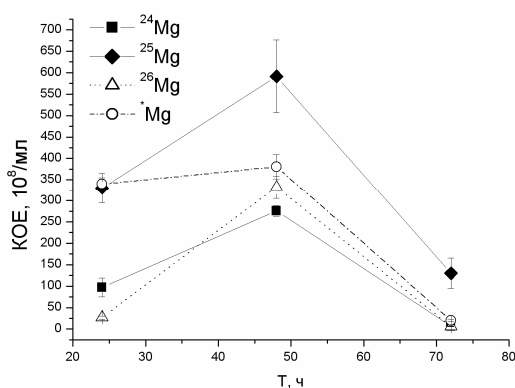


Рис. 11 КОЕ клеток *E.coli*, обогащенных изотопами магния ^{24}Mg , ^{25}Mg , ^{26}Mg природным магнием *Mg, которые культивировались на питательной среде М9 с концентрацией ионов магния 0 ммоль/л

После цикла культивирования на питательных средах М9 с магнитным ^{25}Mg и немагнитными $^{24,26}\text{Mg}$ изотопами магния, клетки *E.coli* многократно исследовались с помощью масс-спектральных методов. Впервые была обнаружена зависимость между содержащимся в среде изотопом магния и внутриклеточным элементным составом зрелых микроорганизмов. На рисунках 12-14 приведены полученные экспериментальные данные.

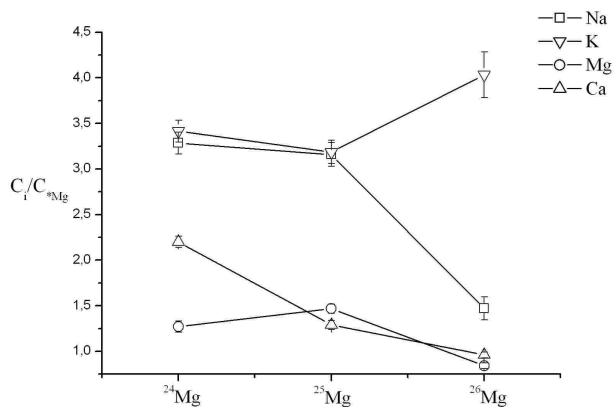


Рис. 12 Относительное содержание макроэлементов Na, K, Mg, Ca в клетках *E.coli*, после цикла культивирования на средах М9 с изотопами магния.

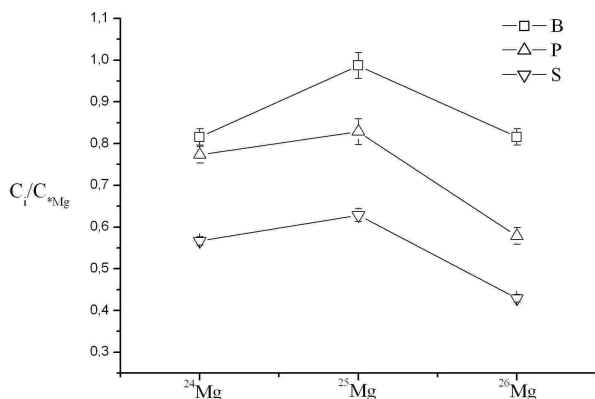


Рис. 13 Относительное содержание роэлементов В, Р, S в клетках *E.coli*, после цикла культивирования на средах М9 с изотопами магния.

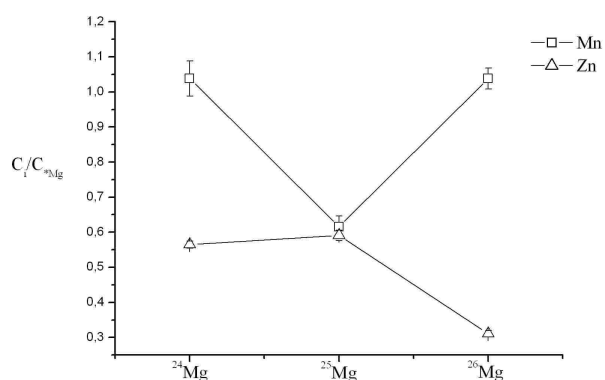


Рис. 14 Относительное содержание макроэлементов Mn, Zn в клетках *E.coli*, после цикла культивирования на средах М9 с изотопами магния.

На рисунках 12-14 использовались следующие обозначения: C_i – содержание элемента в клетках, выращенных на среде с i -м изотопом (^{24}Mg , ^{25}Mg , ^{26}Mg); C_{*Mg} – содержание элемента в исходной клеточной культуре, выращенной на питательной среде с природным соотношением изотопов магния.

Полученные зависимости элементного состава от присутствия изотопов магния в питательной среде представляют особый интерес. Отсутствие описаний подобных эффектов в литературе не позволяет сделать достоверные выводы о механизме подобного влияния. Очевидно, что роль магнитных изотопов в клетках не сводится к ускорению отдельных ферментативных процессов. Магнитно-изотопное обогащение клеток и изменение биологических процессов включает процессы внутриклеточной регуляции, что приводит к удалению одних химических элементов и накоплению других.

Основные результаты и выводы:

1. Показано, что спинзависимые ион-радикальные ферментативные реакции могут быть “первичным магниторецептором“ в живых организмах без создания специального органа. Продукты этих реакций “превращают” эффекты ядерного спина и магнитного поля в “биохимический отклик“ живых организмов.

2. Получены зависимости скоростей ферментативных реакций от величины констант сверхтонких взаимодействий, от напряженности магнитного поля и от констант скоростей элементарных актов ферментативных реакций для двух механизмов спиновой конверсии: Δg -механизма, обусловленного разностью g -факторов ион-радикалов, и СТВ-механизма, обусловленного сверхтонкими взаимодействиями неспаренных электронных спинов с ядерными спинами.

3. Внешнее постоянное магнитное поле должно увеличивать величину эффекта магнитных изотопов химических элементов за счёт сверхтонкого взаимодействия в области слабых полей.

4. Получены надежные экспериментальные данные, доказывающие влияние магнитных моментов ядер изотопов магния на биологические процессы в клетках *Escherichia coli*. Константа скорости роста и колониеобразующая способность бактерий выше в присутствии магнитного изотопа магния ^{25}Mg по сравнению с немагнитными изотопами.

5. Получены экспериментальные данные о влиянии внутриклеточного обогащения изотопами магния на жизнеспособность клеточной культуры и её биохимический состав. Бактерии, обогащенные магнитным изотопом магния ^{25}Mg , при пересеве на новую питательную среду оказываются более жизнеспособными по сравнению с бактериями, обогащенными немагнитными изотопами $^{24,26}\text{Mg}$.

6. Однозначно доказано магнитное происхождение обнаруженных магнитно-изотопных эффектов: все они обусловлены различиями магнитных свойств ядер изотопов магния, а не различиями их масс.

Основное содержание диссертации опубликовано в следующих работах:

1. **Шевченко У.Г.**, Бердинский В.Л. Ферментативные процессы как механизм биологической магниторецепции // Хим. физика. — 2011. — Т. 30, № 6. — С. 78–83.
2. Кольтовер В.К., **Шевченко У.Г.**, Авдеева Л.В., Ройба Е.А., Бердинский В.Л., Кудряшова Е.А. Магнитно-изотопный эффект магния в живой клетке // Доклады Академии наук. — 2012. — Т. 442, № 2. — С. 272–274.
3. **Шевченко У.Г.**, Авдеева Е.И., Бердинский В.Л. Биологические эффекты магнитного изотопа магния ^{25}Mg в клетках *E.coli* // Хим. физика. — 2012. — Т. 31, № 7. — С. 1-8.
4. **Shevchenko U.G.**, Berdinskiy V.L. Enzymatic phosphorylation as example of magnetosensitive spindependent process // ICMS2007, Hiroshima, Japan, 11–15 Nov. 2007. — P. 133.
5. **Shevchenko U.G.**, Berdinskiy V.L. Enzymatic phosphorylation as example of magnetosensitive spindependent process // 15-я Междунар. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2008", Москва, 8–11 апр. 2008 г. — С. 704.
6. **Shevchenko U.G.**, Koltover V.K., Deryabin D.G., Berdinsky V.L. Magnesium isotope effect on enzymatic phosphorylation and growth of *E. coli* cells // IV Российско-Японский семинар "Магнитные явления в физикохимии молекулярных систем", г. Оренбург, 2009 г. — С. 21.
7. **Шевченко У.Г.**, Кольтовер В.К., Дерябин Д.Г., Бердинский В.Л. Влияние изотопов магния на рост и развитие клеток *E. coli* // 21-й Междунар. симпозиум "Современная химическая физика", г. Туапсе, 2009 г. — С. 167.
8. **Shevchenko U.G.**, Koltover V.K., Deryabin D.G., Berdinsky V.L. Magnesium isotope effect on enzymatic phosphorylation and growth of *E. coli* cells // 3d International Conference on Magneto science, Netherlands, Nijmegen, 2009. — P. 123.
9. **Shevchenko U.G.**, Royba E.A., Tarasova N.V. The Mg^{2+} and Zn^{2+} concentration effects on *E. coli* growth // V Российско-Японский семинар "Магнитные явления в физикохимии молекулярных систем", г. Оренбург, 2010 г. — С. 79.
10. Royba E.A., **Shevchenko U.G.**, Koltover V.K., Berdinskiy V.L. Magnetic magnesium isotope effect on antibiotic resistance // V Российско-Японский семинар

"Магнитные явления в физикохимии молекулярных систем", г. Оренбург, 2010 г. — С. 76.

11. **Шевченко У.Г.**, Ройба Е.А., Иванова М.А. Влияние концентраций ионов металлов Mg^{2+} и Zn^{2+} на фазы роста *E. coli* // 22-й Междунар. симпозиум "Современная химическая физика", г. Туапсе, 2010 г. — С. 284.

12. Ройба Е.А., **Шевченко У.Г.**, Кольтовер В.К., Бердинский В.Л. Магнитные изотопные эффекты магния *in vivo* // 22-й Междунар. симпозиум "Современная химическая физика", г. Туапсе, 2010 г. — С. 247–248.

13. Ройба Е.А., **Шевченко У.Г.** *Escherichia coli* — тест-организм для исследования магнитно-изотопных эффектов в биологии // Материалы Междунар. науч. форума "Ломоносов-2011", г. Москва, 2011 г.

14. Авдеева Е.И., **Шевченко У.Г.**, Ройба Е.А. Влияние магнитного и немагнитных изотопов на жизнедеятельность клеток *Escherichia coli* // Материалы Междунар. науч. форума "Ломоносов-2011", г. Москва, 2011 г.

15. **Shevchenko U.G.** Spin-dependent enzymatic processes as the origin of biological magnetoreception // The 12th International Symposium on Spin and Magnetic Field Effects in Chemistry and Related Phenomena "Spin Chemistry Meeting 2011", Noordwijk, Netherlands, 2011. — P. 110.

16. Royba E.A., **Shevchenko U.G.**, Brudastov Yu.A. *Escherichia coli* — test-organism for studying of biological magnetic isotope effects // The 12th International Symposium on Spin and Magnetic Field Effects in Chemistry and Related Phenomena "Spin Chemistry Meeting 2011", Noordwijk, Netherlands, 2011. — P. 108.

17. Авдеева Е.И., **Шевченко У.Г.**, Карандашев В.К. Влияние изотопов магния и постоянного магнитного поля на элементный состав бактерий *E. coli* // 23-й Междунар. симпозиум "Современная химическая физика", г. Туапсе, 2011 г.

18. **Шевченко У.Г.** Биологические магнитно-полевые и магнитно-изотопные эффекты магния // Сб. тезисов XXIII симпозиума "Современная химическая физика". — 2011. — С. 143.

19. **Shevchenko U.**, Berdinskiy V., Avdeeva E. Biological magnesium magnetic isotope and magnetic field effects on *E. coli* cells // Proc. of The 4th International conference on Magneto-science. — 2011. — P. 50.