

## МАГНИТНЫЙ ИЗОТОП МАГНИЯ УСКОРЯЕТ РЕАКЦИЮ ГИДРОЛИЗА АТФ МИОЗИНОМ

© 2016 г. В.К. Кольтовер, Р.Д. Лабынцева\*, В.К. Карандашев\*\*, С.О. Костерин\*

*Институт проблем химической физики РАН,  
142432, Черноголовка Московской области, просп. академика Семенова, 1*

*E-mail: koltover@icp.ac.ru*

*\*Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, 01601, Киев, ул. Леонтовича, 9, Украина*

*E-mail: kinet@biochem.kiev.ua*

*\*\*Институт проблем технологии микроэлектроники и особо чистых материалов РАН,  
142432, Черноголовка Московской области, ул. академика Осипьяна, 6*

Поступила в редакцию 30.10.15 г.

Представлены результаты экспериментов по влиянию различных изотопов магния, магнитного  $^{25}\text{Mg}$  и немагнитных  $^{24}\text{Mg}$  и  $^{26}\text{Mg}$ , на АТФазную активность изолированного субфрагмента-1 миозина. Скорость реакции с магнитным изотопом,  $^{25}\text{Mg}$ , оказалась в 2,0–2,5 раза больше, чем скорости той же реакции с немагнитными изотопами  $^{24}\text{Mg}$  или  $^{26}\text{Mg}$ . В отсутствие фермента, а именно в реакции спонтанного гидролиза АТФ в водном растворе, магнитно-изотопный эффект не наблюдался. Таким образом, обнаружен достоверный каталитический эффект магнитного изотопа  $^{25}\text{Mg}$  (ядерный спиновый катализ) в ферментативном гидролизе АТФ.

*Ключевые слова: стабильные изотопы, миозин, магнитно-изотопный эффект, надежность, АТФ, ядерный спиновый катализ.*

Известно, что клетки и ткани состоят из атомов химических элементов, многие из которых имеют стабильные изотопы двух типов – магнитные и немагнитные. Например, из трех стабильных изотопов магния,  $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{25}\text{Mg}$  и  $^{26}\text{Mg}$  с природным содержанием 78,7, 10,13 и 11,17%, изотоп  $^{25}\text{Mg}$  является магнитным изотопом (имеет ядерный спин  $I = 5/2$ ), тогда как изотопы  $^{24}\text{Mg}$  и  $^{26}\text{Mg}$  – немагнитные (ядерный спин  $I = 0$ ). Известно также, что магнитные изотопы создают внутренние магнитные поля, которые на расстояниях порядка длины химической связи могут превышать в 10–100 раз магнитное поле Земли ( $\approx 0,05$  мТл) [1]. Ранее были обнаружены магнитно-изотопные эффекты (МИЭ) магния в экспериментах с изотопно-обогащенными клетками [2–6]. Клетки дрожжей *S. cerevisiae*, обогащенные магнитным изотопом  $^{25}\text{Mg}$ , восстанавливаются после облучения коротковолновым ультрафиолетовым светом существенно быстрее, чем клетки, обогащенные немагнитным изотопом магния [3,4]. В экспери-

ментах с другой общепринятой клеточной моделью бактериями *E. coli* было обнаружено, что клетки, пересаженные в новую среду роста, существенно быстрее адаптируются к этой среде, если она содержит магнитный изотоп  $^{25}\text{Mg}$ , по сравнению с адаптацией к среде, содержащей немагнитные изотопы  $^{24}\text{Mg}$  или  $^{26}\text{Mg}$  [5]. Еще ранее при измерениях активности антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы в клетках *E. coli*, достигших стационарной фазы роста, было найдено, что активность супероксиддисмутазы в клетках, выросших на среде, обогащенной  $^{25}\text{Mg}$ , на 40% ниже, чем в клетках, выросших на среде, обогащенной немагнитным изотопом  $^{24}\text{Mg}$  [2].

Ион магния служит облигатным кофактором многих ферментов, прежде всего ферментов синтеза и гидролиза АТФ, главного источника энергии в клетках [7]. Один из наиболее изученных «молекулярных моторов» биоэнергетики – мышечный белок миозин. Этот фермент, осуществляя гидролиз концевой фосфатной связи в молекуле АТФ, использует освобождаемую энергию (в физиологических условиях около 0,54 эВ) для осуществления мышечного сокра-

Сокращения: МИЭ – магнитно-изотопный эффект,  $P_i$  – неорганический фосфат.

шения [7–10]. Субфрагмент-1 миозина считается достаточной функциональной единицей миозина, поскольку сохраняет все его нативные свойства, а именно – каталитическую АТФазную активность и способность взаимодействовать с актином [8,9]. В настоящей работе представлены результаты экспериментов, в которых было изучено влияние различных изотопов магния на  $Mg^{2+}$ -зависимую АТФазную активность субфрагмента-1 миозина и показано, что магнитный изотоп,  $^{25}Mg$ , вдвое эффективнее, чем немагнитные изотопы магния, ускоряет реакцию ферментативного гидролиза АТФ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оксиды магния  $^{24}MgO$ ,  $^{25}MgO$  и  $^{26}MgO$  с изотопным обогащением, соответственно 99,8, 98,2 и 81,0 атом.%, были приобретены от предприятия «Электрохимприбор» («Росатом», Лесной Свердловской области). Из этих оксидов были приготовлены растворы хлоридов, соответственно,  $^{24}MgCl_2$ ,  $^{25}MgCl_2$  и  $^{26}MgCl_2$  с использованием концентрированной  $HCl$ . Хлорид магния природного изотопного состава ( $MgCl_2$ ) был приобретен в фирме Merck (Германия), остальные реактивы – Sigma-Aldrich (США).

Биохимические эксперименты выполнялись в отделе биохимии мышц Института биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев. Субфрагмент-1 миозина получали из гладкой мышцы (миометрия матки) свиней по стандартной методике [9,10]. Молекулярную массу (100 кДа) субфрагмента-1 определяли методом электрофореза в денатурирующих условиях, средний гидродинамический диаметр – методом фотонной корреляционной спектроскопии с использованием спектрофотометра ZetaSizer-3 (Malvern Instruments, Великобритания), оборудованного гелий-неоновым лазером LGN-111 ( $\lambda = 633$  нм,  $P = 25$  мВт) [11]. АТФазную активность субфрагмента-1 миозина измеряли при  $37^\circ C$  методом Фiske–Субарроу, как описано в работе [11]. В основе этой методики лежит реакция неорганического фосфата ( $P_i$ ) с молибдатом аммония в присутствии аскорбиновой кислоты, как восстановителя, с образованием окрашенного комплекса в количестве, пропорциональном концентрации  $P_i$ . Количество  $P_i$ , образовавшегося при гидролизе АТФ, определяли спектрофотометрически по поглощению при 820 нм с использованием предварительно полученных калибровочных графиков зависимости оптической плотности от концентрации  $P_i$  [10,11]. АТФазную активность определяли в реакционной среде, содержащей 20 мМ трис- $HCl$ -буфера (рН 7,2), 100 мМ  $KCl$ , 0,01 мМ  $CaCl_2$ ,

3 мМ АТФ и 5 мМ хлорида магния,  $^{24}MgCl_2$ ,  $^{25}MgCl_2$  или  $^{26}MgCl_2$  или, соответственно, 5 мМ хлорида магния природного изотопного состава. Реакцию начинали вводя в 1 мл реакционной среды раствор субфрагмента-1 миозина до конечной концентрации 20 мкг/мл, и останавливали через 1 мин добавлением 20% тетрахлоруксусной кислоты в количестве 1 мл на 1 мл реакционной среды для денатурации фермента. Для определения ферментативного (спонтанного) гидролиза АТФ использовали реакционные среды того же состава, содержащие все компоненты, за исключением фермента. Экспериментальные данные анализировали в программе «Statistica 4.5» с использованием стандартных методов дисперсионного анализа (ANOVA).

Эксперименты с животными выполняли в полном соответствии с Европейской конвенцией о защите животных, используемых для научных экспериментов и в других научных целях (Strasbourg, 18.III.1986), а также в полном соответствии с рекомендациями Первого национального конгресса Украины по биоэтике (2001 г.) и законами Украины, статья 26 «Правила обращения с животными, используемыми в научных экспериментах, при тестировании, учебном процессе, производстве биологических препаратов».

Элементный состав образцов анализировали методами атомной эмиссионной спектроскопии (ICP-AES) и масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS) в Институте проблем технологии микроэлектроники и особо чистых материалов РАН (ИПТМ РАН), как описано в работе [12]. Содержание Li, Na, Mg, Al, P, S, K, Ca, V, Mn, Fe, Cu, Zn, Sr и Ba определяли используя ICP-AES-спектрометр «iCAP-6500 Dual» (Thermo Scientific, США). Содержание B, Li, Be, Al, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Br, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Ru, Rh, Pd, 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 определяли используя спектрометр «X-Series II ICP-MS» (Thermo Scientific, США). Этот же масс-спектрометр использовали для определения изотопного состава магния в растворах. Для количественных измерений содержания элементов в растворах использовали эталонные растворы, содержащие от 10 мкг/л до 10 мг/л определяемого элемента [12].

**Таблица 1.** Изотопный состав магния в реакционных средах – растворах для измерений гидролиза АТФ

Изотоп	Изотопное обогащение, %			
	Природный Mg	$^{24}\text{MgCl}_2$	$^{25}\text{MgCl}_2$	$^{26}\text{MgCl}_2$
$^{24}\text{Mg}$	$79,2 \pm 0,4$	$99,8 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$	$16,8 \pm 0,3$
$^{25}\text{Mg}$	$10,1 \pm 0,1$	$0,11 \pm 0,02$	$98,2 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,1$
$^{26}\text{Mg}$	$10,7 \pm 0,2$	$0,08 \pm 0,02$	$0,5 \pm 0,1$	$81,0 \pm 0,3$

Примечание. Растворы содержали 20 мМ трис-НСl (рН 7,2), 10 мкМ CaCl<sub>2</sub>, 100 мМ KCl, 3 мМ АТФ и 5 мМ хлорида магния соответствующего изотопного состава. Представлены средние значения  $\pm$  среднее квадратичное отклонение ( $m \pm SD$ ); число независимых измерений в каждом растворе  $n = 5$ .

**Таблица 2.** АТФазная активность субфрагмента-1 миозина в реакционных средах с различными изотопами магния

Эксперимент	Mg-АТФазная активность, нмоль P <sub>i</sub> /мин/мг белка			
	Природный MgCl <sub>2</sub>	$^{24}\text{MgCl}_2$	$^{25}\text{MgCl}_2$	$^{26}\text{MgCl}_2$
I	$26,3 \pm 6,3$ ( $n = 3$ )	$27,0 \pm 4,6$ ( $n = 3$ )	$51,6 \pm 9,2$ ( $n = 3$ )	$25,4 \pm 8,4$ ( $n = 4$ )
II	$58,8 \pm 10,2$ ( $n = 4$ )	$65,4 \pm 3,8$ ( $n = 4$ )	$115,9 \pm 8,0$ ( $n = 4$ )	$63,7 \pm 3,3$ ( $n = 4$ )
III	$33,3 \pm 1,9$ ( $n = 3$ )	$42,8 \pm 3,9$ ( $n = 3$ )	$82,7 \pm 1,25$ ( $n = 3$ )	$37,0 \pm 1,1$ ( $n = 3$ )

Примечание. Растворы содержали 20 мМ трис-НСl (рН 7,2), 10 мкМ CaCl<sub>2</sub>, 100 мМ KCl, 3 мМ АТФ, 20 мкг/мл субфрагмента-1 миозина и 5 мМ хлорида магния соответствующего изотопного состава. Представлены средние значения  $\pm$  среднее квадратичное отклонение ( $m \pm SD$ ), полученные в трех независимых экспериментах с разными ферментными препаратами, выделенными их трех разных животных;  $n$  – число независимых измерений с изотопом каждого типа. Различия между средними значениями в экспериментах с магнитным изотопом  $^{25}\text{Mg}$  и средними значениями в экспериментах с немагнитными изотопами  $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{26}\text{Mg}$  или «природным» Mg статистически достоверны при  $P < 0,01$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа изотопного состава реакционных сред для измерений гидролиза АТФ свидетельствуют о высокой степени изотопного обогащения этих растворов, соответственно, изотопами  $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{25}\text{Mg}$  или  $^{26}\text{Mg}$  (табл. 1).

Результаты измерений АТФазной активности субфрагмента-1 миозина в средах с различными изотопами магния представлены в табл. 2. Были выполнены три независимых серии экспериментов с разными препаратами миозина, выделенными в разное время из трех разных животных. С каждым из этих ферментных препаратов выполняли не менее трех повторов с каждым изотопом магния и магнием природного изотопного состава.

Несмотря на известную вариабельность средних значений АТФазной активности от одной экспериментальной серии к другой, во всех экспериментальных сериях наблюдался один и тот же эффект: АТФазная активность фермента в присутствии магнитного изотопа ( $^{25}\text{Mg}$ ) была в 2,0–2,5 раза выше, чем активность того же фермента в присутствии немагнитного изотопа

( $^{24}\text{Mg}$  или  $^{26}\text{Mg}$ ) или в присутствии обычной, природной смеси изотопов магния. Эффект наблюдался при физиологических концентрациях хлоридов магния (5 мМ). При этом не было обнаружено существенных различий в активности в случае использования немагнитных изотопов  $^{24}\text{Mg}$  и  $^{26}\text{Mg}$ .

Таким образом, в данной системе обнаружен достоверный магнитно-изотопный эффект. Важно отметить, что МИЭ наблюдается только при ферментативном гидролизе АТФ, но не наблюдается при спонтанном гидролизе АТФ, т.е. в тех же водных растворах, но без каталитического фрагмента миозина: величина скорости гидролиза АТФ в отсутствие фермента в растворах, содержащих 5 мМ  $^{24}\text{MgCl}_2$ ,  $^{25}\text{MgCl}_2$ ,  $^{26}\text{MgCl}_2$  или природного MgCl<sub>2</sub>, была равной  $18,6 \pm 4,1$ ,  $19,5 \pm 3,5$ ,  $19,9 \pm 4,4$  и  $19,9 \pm 6,3$  нмоль P<sub>i</sub>/мин соответственно.

Согласно данным атомной эмиссионной спектроскопии и масс-спектрометрии, элементный состав реакционных сред был одинаков при содержании примесных элементов не более нескольких микромолей на литр, независимо

от типа изотопа магния. Можно было бы предположить, что причиной различий служит разное содержание примесей каких-либо посторонних элементов, поступающих в реакционную среду с различными изотопами магния. Однако такое предположение исключается данными элементного анализа препаратов (табл. 3). Содержание большинства примесных элементов мало и приблизительно одинаково в растворах всех изотопов магния, независимо от типа изотопа (магнитный или немагнитный). Например, содержание брома составляет 2,2–2,6 мг/л, рубидия – около 0,086–0,097 мг/л, содержание других примесей не превышало 0,04 мг/л или было ниже предела обнаружения. Кроме того, следует принять во внимание, что не только оксиды магния, но и другие реактивы, необходимые для проведения экспериментов, содержат примеси, которые вводятся в реакционную среду в одинаковых количествах, значительно превышающих количества тех же примесей, вводимых с гораздо меньшими добавками изотопов магния.

Маловероятно и предположение, что обнаруженный нами эффект обусловлен не ядерным спином изотопа  $^{25}\text{Mg}$ , а эффектом какого-либо элемента, присутствующего в различных количествах в растворах разных изотопов магния. Например, примеси стронция в растворе с магнитным  $^{25}\text{Mg}$  больше, чем в растворе с немагнитным  $^{24}\text{Mg}$  (0,0046 и 0,0029 мг/л соответственно). Однако ферментативная активность была одна и та же в растворах с немагнитным  $^{24}\text{Mg}$ , немагнитным  $^{26}\text{Mg}$  и с природным  $\text{Mg}$ , несмотря на то, что в растворе с  $^{24}\text{Mg}$  содержание стронция равно 0,0029 мг/л, тогда как в растворах с  $^{26}\text{Mg}$  или природным  $\text{Mg}$  содержание стронция ниже предела обнаружения. Аналогично исключаются возможности артефактов от «сверхмалых доз» примесей других элементов.

В химии магнитно-изотопный эффект известен для многих элементов, имеющих магнитные и немагнитные изотопы, в том числе для углерода, кислорода, кремния, серы, германия, олова, ртути и урана [13–15]. Экспериментально МИЭ проявляется в том, что скорость и выход продуктов реакции с участием свободных радикалов и/или ион-радикальных пар существенно изменяются в зависимости от того, содержат ли исходные реагенты магнитный или немагнитный изотоп одного и того же элемента. МИЭ – прямое следствие закона сохранения момента импульса, фундаментального закона природы, который так же строг, как и закон сохранения энергии. В данном случае речь идет о законе сохранения электронного углового мо-

мента – электронного спина: суммарный электронный спин ( $S$ ) продуктов химической реакции должен быть равен суммарному спину исходных реагентов. Аналогичный спиновый запрет возникает при синглет-триплетных переходах в молекулах. Чтобы устранить запрет, наложенный законом сохранения спина, необходимо изменить спиновое состояние реагентов. Спиновая конверсия из синглетного в триплетное состояние может быть обеспечена путем спин-решеточной релаксации, например, благодаря спин-орбитальным взаимодействиям. Однако в органических радикалах спин-орбитальное взаимодействие слабое, и единственный путь обеспечения спиновой конверсии, в отсутствие парамагнитных ионов, это наложение магнитного поля, будь то внешнее поле или поле ядерного спина атомного ядра [13–15].

Магнитно-изотопный эффект в ферментативном гидролизе АТФ обнаружен нами впервые. Он свидетельствует, что в кинетике ферментативного гидролиза АТФ, катализируемого миозином, имеется лимитирующая стадия, которая ускоряется ядерным спином изотопа  $^{25}\text{Mg}$ . В химической физике свободнорадикальных реакций для объяснения МИЭ обычно предполагается существование радикальной пары или ион-радикальной пары в качестве промежуточного продукта («узкого места») [13–17]. Известно, однако, что реакция гидролиза АТФ с образованием АДФ и  $\text{P}_i$  следует кислотно-основному механизму и, соответственно, возникновение какой-либо ион-радикальной пары в качестве интермедиата в этой реакции маловероятно. Действительно, МИЭ не наблюдается в экспериментах по неферментативному гидролизу АТФ. Иная ситуация, однако, может иметь место в случае гидролиза АТФ, катализируемого миозином. Давно известно (доказано экспериментально), что гидролиз АТФ инициирует электронно-конформационные взаимодействия в активном центре фермента, в результате которых происходит конформационное возбуждение, по существу, деформация макромолекулы [18,19]. Согласно квантово-механическим расчетам цикл генерации механического напряжения при каталитическом гидролизе АТФ миозином состоит из нескольких стадий [20]. Продукты гидролиза, АДФ и  $\text{P}_i$ , остаются в активном центре фермента в близком контакте и освобождаются только после того, как миозин связывается с филаментами актина. Пока белок остается в переходном состоянии конформационного напряжения и продукты гидролиза, АДФ и  $\text{P}_i$ , связанные миозином, остаются в близком контакте, они могут образовать снова АТФ [20].

Таблица 3. Элементный состав реакционных сред для для измерений гидролиза АТФ

Элемент	Предел обнаружения (ПО), мг/л	Концентрация примесей, мг/л			
		Природный Mg	<sup>24</sup> Mg	<sup>25</sup> Mg	<sup>26</sup> Mg
Li	0,00008	0,00027	0,00015	0,00017	0,00010
Be	0,00008	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
B	0,03	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Na	0,3	158	149	135	137
Mg	0,1	154	159	142	139
Al	0,02	0,045	0,030	0,049	0,065
Si	0,3	0,17	0,17	0,15	0,13
P	0,5	224	229	227	230
S	2	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
K	0,3	6360	6247	6280	6313
Ca	0,7	2,0	2,0	2,4	2,1
Sc	0,001	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Ti	0,02	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
V	0,002	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Cr	0,02	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Mn	0,003	0,029	0,031	0,037	0,080
Fe	0,1	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Co	0,003	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Ni	0,007	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Cu	0,003	0,0056	0,0039	0,0067	0,011
Zn	0,009	0,065	0,050	0,070	0,063
Ga	0,001	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Ge	0,002	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
As	0,002	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Se	0,009	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Br	0,3	2,2	2,4	2,6	2,6
Rb	0,0003	0,0860	0,0936	0,0950	0,0969
Sr	0,002	< ПО	0,0029	0,0046	< ПО
Y	0,0001	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Zr	0,0001	0,0031	0,0013	0,0022	0,0028
Nb	0,0004	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Mo	0,0003	0,0079	0,0093	0,0136	0,0168
Ru	0,0002	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Rh	0,0002	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Pd	0,0004	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Ag	0,0002	0,00078	0,00068	0,00075	0,00109
Cd	0,0003	0,0037	0,0040	0,0043	0,0040
In	0,0001	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Sn	0,0002	0,00081	0,00027	0,00063	0,00100
Sb	0,0002	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Te	0,0002	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Cs	0,00004	ПО	0,00006	0,00008	0,0001
Ba	0,001	0,0040	0,0045	0,0045	0,0043
La	0,0002	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО

Элемент	Предел обнаружения (ПО), мг/л	Концентрация примесей, мг/л			
		Природный Mg	<sup>24</sup> Mg	<sup>25</sup> Mg	<sup>26</sup> Mg
Ce	0,0008	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Pr	0,00002	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Nd	0,0003	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Sm	0,00002	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Eu	0,000007	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Gd	0,00001	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Tb	0,00001	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Dy	0,00001	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Ho	0,00001	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Er	0,00001	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Tm	0,00001	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Yb	0,00001	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Lu	0,00001	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Hf	0,0001	0,00120	0,00078	0,00062	0,00062
Ta	0,0002	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
W	0,0003	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Re	0,00001	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Os	0,00002	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Ir	0,00001	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Pt	0,00003	< ПО	< ПО	< ПО	0,00067
Au	0,0001	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Hg	0,0003	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Tl	0,00001	0,0088	0,0091	0,0091	0,0094
Pb	0,0008	0,038	0,037	0,039	0,039
Bi	0,00003	0,00006	< ПО	< ПО	0,00004
Th	0,00002	0,00060	0,00036	0,00027	0,00025
U	0,00002	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО

Примечание. Растворы содержали 20 мМ трис-НСI (рН 7,2), 10 мкМ СаСI<sub>2</sub>, 100 мМ КСI, 3 мМ АТФ, 5 мМ хлорида магния соответствующего изотопного состава.

Можно предположить, что в условиях электронно-конформационного возбуждения макромолекулы миозина в активном центре фермента имеет место перенос электронной плотности на АДФ<sup>3-</sup> или Mg<sup>2+</sup>, например, от группы ОН-связанной молекулы воды или NH<sub>2</sub>-группы Glu459 с образованием соответственной ион-радикальной пары. Затем следует нуклеофильная атака неорганического фосфата окси-анионом с образованием АТФ. Стабильное спиновое состояние продукта (АТФ-Mg) должно быть синглетным – электронный спин  $S = 0$ . Между тем ядерный спин <sup>25</sup>Mg через сверхтонкое взаимодействие с неспаренным электроном ион-радикальной пары конвертирует эту пару, связанную миозином, в триплетное состояние ( $S = 1$ ). Создавая данный спиновый запрет, ядерный

спин изотопа <sup>25</sup>Mg затрудняет нежелательную обратную реакцию синтеза АТФ, способствуя, таким образом, прямой реакции гидролиза АТФ. Гипотеза о роли виртуальной ион-радикальной пары в синтезе АТФ при окислительном фосфорилировании была высказана более 40 лет тому назад [21].

Альтернативно, каталитический эффект ядерного спина <sup>25</sup>Mg может быть объяснен следующим образом. Энергия, освобождаемая при гидролизе АТФ и составляющая  $\approx 0,54$  эВ, недостаточно велика для электронно-конформационного возбуждения макромолекулы миозина в синглетное состояние. Этой энергии достаточно для получения низколежащего триплетного состояния, но переход из основного со-

стояния ( $S = 0$ ) в триплетное состояние ( $S = 1$ ) запрещен законом сохранения спина. Магнитный изотоп  $^{25}\text{Mg}$  изменяет ситуацию. Ядерный спин  $^{25}\text{Mg}$  устраняет проблему спинового запрета, обеспечивая, таким образом, необходимую спиновую конверсию в триплетное состояние. Подобный механизм был предложен для объяснения влияния магнитных полей на подвижность дислокаций в твердом теле [22].

Рассмотрим еще одно возможное объяснение обнаруженного нами каталитического эффекта ядерного спина  $^{25}\text{Mg}$ . При конформационном переходе происходит регидратация атомных групп макромолекулы, сопровождаемая перестройкой системы водородных связей воды. Известны два изомера молекул воды, различающихся между собой по взаимной ориентации ядерных спинов водорода, а именно: *орто*- $\text{H}_2\text{O}$  с параллельной ориентацией протонных спинов и *пара*- $\text{H}_2\text{O}$  с антипараллельной ориентацией протонных спинов. Согласно квантовой статистике, при комнатной температуре *орто*- $\text{H}_2\text{O}$  составляет 75% общего объема [23]. Имеются основания полагать, что, по сравнению с молекулами *пара*- $\text{H}_2\text{O}$ , молекулы *орто*- $\text{H}_2\text{O}$  имеют преимущественное сродство к L-аминокислотам [23]. Если это так, то перемещение преимущественно связанных молекул *орто*- $\text{H}_2\text{O}$  при конформационных переходах макромолекулы затруднено. Между тем спин-вращательные взаимодействия протонов слишком слабы, чтобы обеспечить должную эффективность *орто/пара*-переходов. Соответственно, можно предположить, что магнитный  $^{25}\text{Mg}$  способен существенно улучшить ситуацию, а именно – устранить проблему спинового запрета, обеспечив, таким образом, необходимую скорость конверсии изомеров воды.

В биохимии магнитно-изотопный эффект был впервые обнаружен в экспериментах с митохондриями, изолированными из сердца крыс. Оказалось, что окислительное фосфорилирование идет с изотопом  $^{25}\text{Mg}$  в два–три раза эффективнее, чем с  $^{24}\text{Mg}$  и  $^{26}\text{Mg}$  [24]. Поскольку в природе преобладают немагнитные изотопы магния (78,7%  $^{24}\text{Mg}$ , 11,17 %  $^{26}\text{Mg}$ ), чтобы детектировать МИЭ, авторам цитированной работы пришлось сначала удалять из митохондрий природный магний комплексоном ЭГТА с последующим добавлением хлоридов нужного изотопа магния. Однако при такой обработке митохондрий вряд ли возможно избежать нежелательных структурно-функциональных изменений в них. Аналогичный МИЭ был обнаружен этой же группой при изучении ферментов креатинфосфаткиназы и фосфоглицераткиназы: выход АТФ оказался вдвое выше с магнитным

$^{25}\text{Mg}$ , чем в аналогичных реакциях с немагнитными  $^{24}\text{Mg}$  и  $^{26}\text{Mg}$  (см. обзорные работы [14,15]). Однако в аналогичных экспериментах с креатинфосфаткиназой британской группе не удалось обнаружить МИЭ [25].

Та же российская группа сообщила о магнитно-изотопных эффектах магния и цинка при изучении изолированной ДНК-полимеразы. В экспериментах с изолированными магний- и цинк-зависимыми бета-полимеразами было обнаружено, что их ферментативная активность ингибируется магнитными изотопами магния и цинка соответственно [26]. Известно, что для синтеза олигонуклеотидной цепи ДНК-полимераза использует энергию АТФ, выделяемую в сопряженной реакции гидролиза тринуклеотидов, катализируемой этим же ферментом [7]. Обнаруженный нами эффект ускорения гидролиза АТФ миозином позволяет предположить, что причиной замедления синтеза ДНК послужил кинетический дисбаланс, обусловленный влиянием ядерного спина магнитного изотопа на кинетику ферментативного гидролиза АТФ.

В «молекулярных моторах», работающих на немагнитных изотопах магния, функцию спинового катализа могут выполнять ядерные спины фосфора ( $^{31}\text{P}$ ) и протонов ( $^1\text{H}$ ). Относительно высокая каталитическая активность  $^{25}\text{Mg}$  обусловлена, по-видимому, тем, что у ядра изотопа  $^{25}\text{Mg}$  спин в пять раз больше, чем у ядра водорода и фосфора, а также особенностями локализации иона  $\text{Mg}^{2+}$  в активном центре фермента, благодаря которым ядерный спин магния создает сравнительно большое локальное магнитное поле (константа сверхтонкого взаимодействия  $\approx 21$  мТл). Детальные физико-химические механизмы МИЭ и биологические механизмы усиления ядерного спинового катализа в живых клетках – задачи дальнейших исследований.

Статья подготовлена на основе доклада на V Съезде биофизиков России, 4–10 октября 2015 года, г. Ростов-на-Дону. Результаты предварительных экспериментов были опубликованы в работе [27].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-00593а).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Encyclopedia of nuclear magnetic resonance*, Ed. by D. M. Grant and R. K. Harris (Wiley, Chichester, 1996).
2. Г. Н. Богатыренко, Е. А. Кудряшова, Л. В. Туманова и В. К. Кольтовер, в сб. *Тезисы V международного конгресса «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине»* (Санкт-Петербург, 2009), с. 92.

3. Д. М. Гродзинский, Т. А. Евстюхина, В. К. Кольтовер и др., Докл. АН Украины, № 12, 153 (2011).
4. V. K. Koltover, V. G. Korolev, and Y. A. Kutlakhmedov, in *Ionizing Radiation: Applications, Sources and Biological Effects* (Nova Science Publishing, New York, 2012), pp. 117–128.
5. В. К. Кольтовер, У. Г. Шевченко, Л. В. Авдеева и др., Докл. РАН **442** (2), 272 (2012).
6. В. К. Кольтовер, Биофизика **58** (2) 257 (2013).
7. А. Б. Рубин, *Биофизика* (Университет, Москва, 1999), т. 2.
8. С. А. Костерин, *Транспорт кальция в гладких мышцах* (Наук. думка, Киев, 1990).
9. S. A. Burgess, S. Yu, M. L. Walker, et al, J. Mol. Biol. **372**, 1165 (2007).
10. Р. Д. Лабынцева, А. А. Бевза, О. В. Бевза и др., Укр. биохим. журн. **84**, 34 (2012).
11. P. S. Chen, T. Y. Toribara, Jr., and H. Warner, *Analyt. Chem.* **28**, 1756 (1956).
12. V. K. Karandashev, A. N. Turanov, T. A. Orlova, et al., *Inorg. Mater.* **44**, 1491 (2008).
13. Я. Б. Зельдович, А. Л. Бучаченко и Е. Л. Франкевич, *Успехи физ. наук* **155** (1), (1988).
14. А. Л. Бучаченко, *Новая изотопия в химии и биохимии* (Наука, М., 2007).
15. A. L. Buchachenko, *J. Phys. Chem. B* **117**, 2231 (2013).
16. В. К. Кольтовер, Изв. РАН. Сер. хим., № 5, 1029 (2014).
17. V. K. Koltover, in: *Physics of Liquid Matter: Modern Problems* (Springer Cham, Heidelberg, New York, Dordrecht, London, 2015), pp. 357–368.
18. М. В. Волькенштейн, *Общая биофизика* (Наука, Москва, 1978).
19. Д. С. Чернавский и Н. М. Чернавская, «Белок–машина». *Биологические макромолекулярные конструкции* (Янус-К, Москва, 1999).
20. F. A. Kiani and S. Fischer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111** (29), 2947 (2014).
21. Л. А. Блюменфельд и В. К. Кольтовер, *Молекуляр. биология* **6** (1), 161 (1972).
22. М. В. Бадывевич, В. В. Кведер, В. И. Орлов, and Yu. A. Ossipyuan, *Phys. Stat. Sol. (c)* **2** (6), 1869 (2005).
23. Y. Scolnik, I. Portnaya, U. Cogan, et al., *Phys. Chemistry – Chem. Physics* **8** (3), 333 (2006).
24. А. Л. Бучаченко, Д. А. Кузнецов, С. Б. Архангельский и др. Докл. РАН **396**, 828 (2005).
25. D. Crotty, G. Silkstone, S. Poddar, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 1437 (2012).
26. A. L. Buchachenko, A. P. Orlov, D. A. Kouznetsov, and N. N. Breslavskaya, *Nucl. Acids Res.* **41**, 8300 (2013).
27. В. К. Кольтовер, Р. Д. Лабынцева, А. А. Люлько и др., Докл. АН Украины, № 1, 163 (2014).

## Magnetic Magnesium Isotope Accelerates ATP Hydrolysis Catalyzed by Myosin

**V.K. Koltover\***, **R.D. Labyntseva\*\***, **V.K. Karandashev\*\*\***, and **S.O. Kosterin\*\***

*\*Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,  
prosp. Akademika Semenova 1, Chernogolovka, Moscow Region, 142432 Russia*

*\*\*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, ul. Leontovicha 9, Kyiv, 01601 Ukraine*

*\*\*\*Institute of Microelectronics Technology and High Purity Materials, Russian Academy of Sciences,  
ul. Akademika Ossipyana 6, Chernogolovka, Moscow Region, 142432 Russia*

In this paper, we present the results of experimental studies on the influence of different magnesium isotopes, the magnetic  $^{25}\text{Mg}$  and nonmagnetic  $^{24}\text{Mg}$  and  $^{26}\text{Mg}$  on ATP activity of the isolated myosin subfragment-1. The reaction rate in the presence of magnetic  $^{25}\text{Mg}$  isotope turned out to be 2.0–2.5 times higher than that using nonmagnetic  $^{24}\text{Mg}$  and  $^{26}\text{Mg}$  isotopes. No magnetic isotope effect was observed in the absence of the enzyme as in spontaneous ATP hydrolysis in aqueous solution. Hence, a significant catalytic effect of the magnetic  $^{25}\text{Mg}$  isotope (nuclear spin catalysis) was observed in the enzymatic hydrolysis of ATP.

*Key words: stable isotopes, myosin, magnetic isotope effect, reliability, ATP, nuclear spin catalysis*