

МАГНИТНО-ИЗОТОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ МАГНИЯ И ЦИНКА В ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЯХ ГИДРОЛИЗА АТФ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫМИ МОТОРАМИ

© 2020 г. В.К. Кольтовер*, Р.Д. Лабынцева**, В.К. Карандашев***

*Институт проблем химической физики РАН,

142432, Черноголовка Московской области, просп. Академика Семенова, 1

**Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, 01030, Киев, ул. Леонтовича, 9, Украина

***Институт проблем технологии микроэлектроники и особо чистых материалов РАН,

142432, Черноголовка Московской области, ул. Академика Осипьяна, 6

E-mail: koltover@icp.ac.ru

Поступила в редакцию 30.11.2019 г.

После доработки 04.03.2020 г.

Принята к публикации 06.03.2020 г.

Изучено влияние различных изотопов магния и цинка на ферментативную активность субфрагмента-1 миозина. В реакционной среде с магнитным изотопом магния (^{25}Mg) скорость ферментативного гидролиза АТФ вдвое выше, чем в среде с немагнитными изотопами (^{24}Mg или ^{26}Mg). Аналогичный магнитно-изотопный эффект обнаружен в экспериментах с изотопами цинка в качестве кофактора фермента. Скорость ферментативного гидролиза АТФ с магнитным изотопом цинка (^{67}Zn) на 40–50% выше, чем с немагнитными изотопами (^{64}Zn или ^{68}Zn). Магнитно-изотопные эффекты наблюдаются при физиологической концентрации (5 мМ) хлоридов магния и цинка. Каталитический эффект магнитного изотопа магния выявлен также в экспериментах с Mg-зависимой АТФазой плазматических мембран миометрия. Магнитно-изотопный эффект свидетельствует о том, что в хемомеханическом процессе, катализируемом «молекулярным мотором» за счет энергии гидролиза АТФ, имеется лимитирующая стадия, зависящая от электронного спинового состояния, и что ядерный спин изотопа ускоряет эту стадию. Обсуждаются механизмы ядерного спинового катализа.

Ключевые слова: ядерный спиновый катализ, миозин, АТФазная активность, биомолекулярные моторы, бионадежность, магнитно-изотопный эффект, магний, цинк.

DOI: 10.31857/S0006302920030084

Клетки и ткани состоят из атомов химических элементов, многие из которых имеют два типа стабильных изотопов – магнитные и немагнитные. Например, магний имеет три стабильных изотопа, ^{24}Mg , ^{25}Mg и ^{26}Mg , с относительным содержанием 78.7, 10.1 и 11.2% соответственно. Изотоп ^{25}Mg – магнитный, так как его атомное ядро имеет ядерный спин ($I = 5/2$), создающий магнитное поле; изотопы ^{24}Mg и ^{26}Mg – немагнитные, так как их ядра не имеют ядерного спина ($I = 0$) и соответственно не создают магнитное поле. Другой распространенный в живой природе элемент, цинк, имеет пять стабильных изотопов – ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn , ^{68}Zn и ^{70}Zn с относительным содержанием соответственно 48.6, 27.9, 4.1, 18.8 и 0.6%. Из них ^{67}Zn – магнитный изотоп (имеет ядерный спин, $I = 5/2$); остальные четыре изото-

па – немагнитные ($I = 0$). 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 (≈ 0.05 мТ) [1].

Недавно, в экспериментах с живыми клетками, обогащенными магнитным изотопом магния, были обнаружены магнитно-изотопные эффекты (МИЭ). Например, активность антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы в клетках *E. coli*, выросших на среде, обогащенной ^{25}Mg , на 40% ниже, чем в клетках, выросших на среде, обогащенной немагнитным изотопом магния [2]. Клетки дрожжей *S. cerevisiae*, обогащенные магнитным изотопом магния, восстанавливаются после облучения коротковолновым ультрафиолетовым светом или ионизирующей радиацией в два раза быстрее, чем клетки, обогащенные немагнитным изотопом магния [3]. В работах нашей группы был впервые обнаружен МИЭ маг-

Сокращение: МИЭ – магнитно-изотопные эффекты.

ния в реакции гидролиза АТФ, катализируемой одним из важнейших «молекулярных моторов» биоэнергетики — миозином [4, 5].

В настоящей работе представлены результаты наших экспериментов, в которых изучалась АТФ-гидролазная активность биомолекулярных моторов в присутствии, в качестве кофактора фермента, различных изотопов магния и цинка. В экспериментах с миозином обнаружены значительные по величине эффекты ускорения ферментативного гидролиза магнитными изотопами магния и цинка, по сравнению с немагнитными изотопами того же элемента (ядерный спиновый катализ). Небольшой каталитический эффект магнитного изотопа магния выявлен также в экспериментах с Mg-АТФазой, изолированной из плазматических мембран миометрия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали оксиды магния ^{24}MgO , ^{25}MgO и ^{26}MgO с изотопным обогащением 99,9, 98,8 и 97,7 атом. % и оксиды цинка ^{64}ZnO , ^{67}ZnO , и ^{68}ZnO , с изотопным обогащением 99,3, 94,2 и 98,9 атом. % соответственно производства ФГУП «Электрохимприбор» (Россия). Из этих оксидов были приготовлены растворы хлоридов, $^{24}\text{MgCl}_2$, $^{25}\text{MgCl}_2$, $^{26}\text{MgCl}_2$, $^{64}\text{ZnCl}_2$, $^{67}\text{ZnCl}_2$, $^{68}\text{ZnCl}_2$, с использованием концентрированной HCl аналитической чистоты по стандартной методике [6]. Хлориды магния и цинка природного изотопного состава (MgCl_2 , ZnCl_2) и другие реактивы, использованные в настоящей работе, были произведены компаниями Sigma-Aldrich (США), Perkin Elmer (США) и Merck (Германия).

Концентрации магния и цинка в исходных растворах измеряли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой, после чего все растворы выравняли по концентрации ионов соответственно магния и цинка. Изотопные составы растворов магния и цинка, а также их элементный состав определяли методами масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой и атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой в Аналитическом центре Института проблем технологии микроэлектроники и особо чистых материалов РАН (Черноголовка Московской области). Содержание примесных элементов Li, B, Na, Mg, Al, P, S, K, Ca, V, Mn, Fe, Cu, Zn, Sr и Ba определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой с использованием спектрометра iCAP-6500 Duo (Thermo Scientific, США). Содержание Li, Be, Al, P, 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 методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой с использованием спектрометра X-Series II (Thermo Scientific, США) по методикам, описанным ранее [7]. Определение Li, B, Al, P, V, Mn, Cu, Zn, Sr и Ba двумя независимыми методами позволяло контролировать правильность проведения анализа в каждом образце [7].

Биохимические эксперименты были выполнены в отделе биохимии мышц Института биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины (Киев, Украина). Субфрагмент-1 миозина получали из гладкой мышцы (миометрия) свиней по стандартной методике [8, 9]. Субфрагмент-1 миозина считается достаточной функциональной единицей миозина, поскольку сохраняет все его нативные свойства, а именно каталитическую АТФ-гидролазную активность и способность взаимодействовать с актином [8–10]. Mg^{2+} -зависимая АТФаза плазматической мембраны («базальная Ca^{2+} -независимая Mg^{2+} -АТФаза») была получена из гладкой мышцы по методике, описанной в работах [11, 12]. АТФ-гидролазную активность ферментов измеряли при температуре 37°C по количеству неорганического фосфата (P_i), отщепленного при гидролизе АТФ [13]. В основе этого метода («метод Фиске–Суббароу») лежит реакция неорганического фосфата с молибдатом аммония в присутствии аскорбиновой кислоты как восстановителя, в результате которой образуется окрашенный комплекс в количестве, пропорциональном количеству P_i , образованного при гидролизе АТФ [13]. Экспериментальные данные анализировали с использованием стандартных методов дисперсионного анализа (ANOVA) и программ MS Office и Statistica 4.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты анализа изотопного состава реакционных сред для измерений гидролиза АТФ представлены в табл. 1 (эксперименты с различными изотопами магния) и табл. 2 (эксперименты с различными изотопами цинка). Результаты свидетельствуют о высокой степени изотопного обогащения реакционных сред соответствующими изотопами магния (^{24}Mg , ^{25}Mg или ^{26}Mg) и цинка (^{64}Zn , ^{67}Zn или ^{68}Zn).

Результаты измерений АТФ-гидролазной активности субфрагмента-1 миозина в средах с различными изотопами магния представлены на рис. 1а. Активность определяли в стандартной реакционной среде, содержавшей 5 мМ (физиологическая концентрация) хлорида магния, а именно: $^{24}\text{MgCl}_2$, $^{25}\text{MgCl}_2$, $^{26}\text{MgCl}_2$ или MgCl_2 природ-

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

Изотоп	Изотопное обогащение, %			
	²⁴ MgCl ₂	²⁵ MgCl ₂	²⁶ MgCl ₂	MgCl ₂
²⁴ Mg	99.7 ± 0.1	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.03	79.2 ± 0.4
²⁵ Mg	1.3 ± 0.1	98.2 ± 0.2	0.46 ± 0.1	10.1 ± 0.1
²⁶ Mg	1.1 ± 0.1	0.22 ± 0.1	98.7 ± 0.3	10.7 ± 0.2

Примечание. Растворы содержали 20 мМ трис-НСl (рН 7.2), 0,01 мМ СаСl₂, 100 мМ КСl, 3 мМ АТФ и 5 мМ хлорида магния, соответственно, природного изотопного состава (MgCl₂), ²⁴MgCl₂, ²⁵MgCl₂ и ²⁶MgCl₂. Представлены средние значения ± среднее квадратичное отклонение (*m* ± *SD*); число независимых измерений в каждом растворе *n* = 5.

Таблица 2. Изотопный состав цинка в реакционных средах для измерений гидролиза АТФ

Изотоп	Изотопное обогащение, %		
	⁶⁴ ZnCl ₂	⁶⁷ ZnCl ₂	⁶⁸ ZnCl ₂
⁶⁴ Zn	99.2 ± 0.1	0.74 ± 0.02	0.48 ± 0.02
⁶⁶ Zn	0.54 ± 0.04	1.6 ± 0.02	0.42 ± 0.02
⁶⁷ Zn	0.063 ± 0.009	93.9 ± 0.1	0.27 ± 0.01
⁶⁸ Zn	0.20 ± 0.01	3.7 ± 0.03	98.8 ± 0.1
⁷⁰ Zn	0.006 ± 0.001	0.045 ± 0.003	0.027 ± 0.004

Примечание. Растворы содержали 20 мМ трис-НСl (рН 7.2), 0,01 мМ СаСl₂, 100 мМ КСl, 3 мМ АТФ и 5 мМ хлорида цинка, соответственно, ⁶⁴ZnCl₂, ⁶⁷ZnCl₂ и ⁶⁸ZnCl₂. Представлены средние значения ± среднее квадратичное отклонение (*m* ± *SD*); число независимых измерений в каждом растворе *n* = 5.

ного изотопного состава. Были выполнены три независимые серии экспериментов с разными препаратами миозина, выделенными в разное время из трех разных животных. С каждым из

этих препаратов выполняли от трех до восьми повторов с каждым изотопом магния и магнием природного изотопного состава. Во всех экспериментальных сериях наблюдался один и тот же

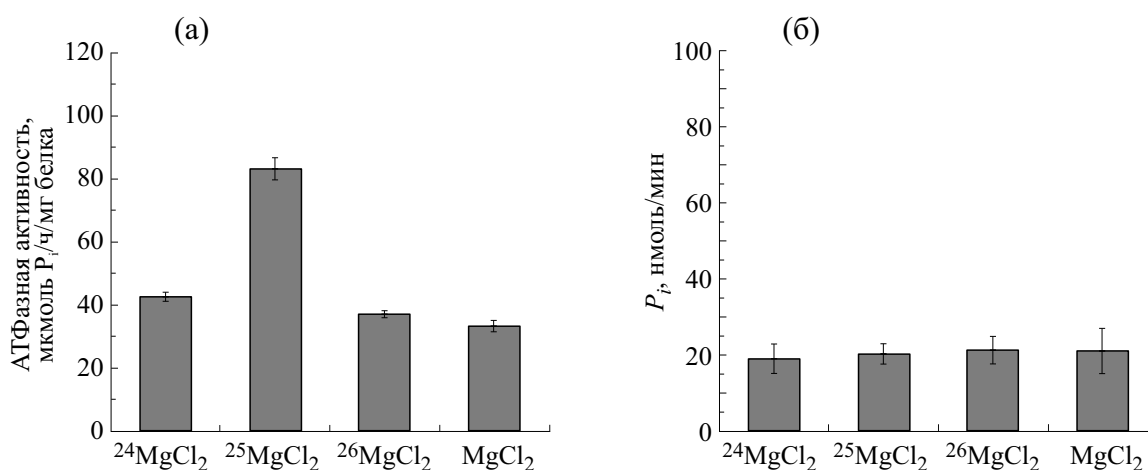


Рис. 1. (а) – АТФазная активность (*m* ± *SD*) субфрагмента-1 миозина (мкмоль P_i/ч/мг белка) в реакционных средах с различными изотопами магния. Растворы содержали 20 мМ трис-НСl (рН 7.2), 0,01 мМ СаСl₂, 100 мМ КСl, 3 мМ АТФ, субфрагмент-1 миозина (20 мкг белка/мл) и 5 мМ хлорида магния, соответственно ²⁴MgCl₂, ²⁵MgCl₂, ²⁶MgCl₂ и MgCl₂ природного изотопного состава. Различия между средними значениями в экспериментах с магнитным изотопом ²⁵Mg и средними значениями в экспериментах с немагнитными изотопами магния статистически достоверны при *P* < 0.01. (б) – Неферментативный гидролиз АТФ в водных растворах с ²⁴MgCl₂, ²⁵MgCl₂, ²⁶MgCl₂ и MgCl₂ природного изотопного состава. По данным работы [4].

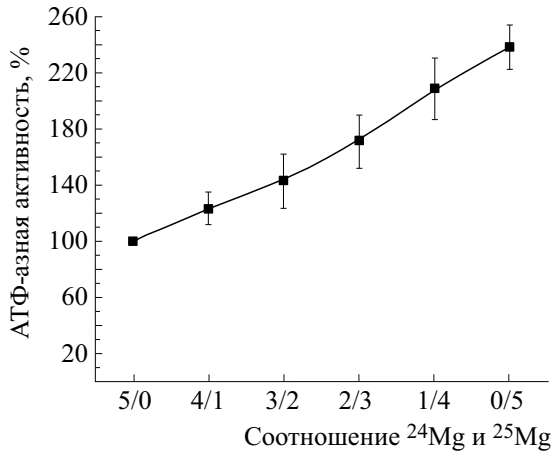


Рис. 2. АТФазная активность субфрагмента-1 миозина как функция доли содержания магнитного изотопа магния, ^{25}Mg , в реакционном растворе. Данные ($m \pm SD$) представлены в процентах к активности при 5 мМ $^{24}\text{MgCl}_2$, принятой за 100%.

магнитно-изотопный эффект, а именно: активность фермента в присутствии магнитного изотопа (^{25}Mg) была в два-два с половиной раза выше, чем активность фермента в присутствии немагнитного изотопа (^{24}Mg или ^{26}Mg). При этом не было обнаружено существенных различий активности фермента в экспериментах с немагнитными изотопами магния. Важно отметить, что МИЭ не наблюдается при неферментативном (спонтанном) гидролизе АТФ. В реакционных средах того же состава, содержащих все компоненты за исключением фермента, величина скорости гидролиза АТФ была одинаковой с $^{24}\text{MgCl}_2$, $^{25}\text{MgCl}_2$, $^{26}\text{MgCl}_2$ и MgCl_2 природного изотопного состава (рис. 16). МИЭ наблюдается только при ферментативном гидролизе АТФ.

На следующем рисунке представлены результаты измерений АТФ-гидролазной активности того же фермента в реакционных средах, содержащих $^{25}\text{MgCl}_2$ и $^{24}\text{MgCl}_2$ в различных соотношениях, т.е. доля магнитного изотопа (^{25}Mg) в растворе варьировала от 0 до 5 мМ, а доля немагнитного (^{24}Mg) соответственно от 5 до 0 мМ.

Можно видеть, что имеет место практически линейный рост скорости гидролиза АТФ с ростом доли содержания магнитного изотопа в реакционном растворе (рис. 2).

В следующих экспериментах было изучено влияние различных изотопов цинка на АТФ-гидролазную активность субфрагмента-1 миозина. Была использована стандартная реакционная среда, но содержащая хлорид цинка вместо хлорида магния, а именно: 5 мМ $^{67}\text{ZnCl}_2$ (магнитный

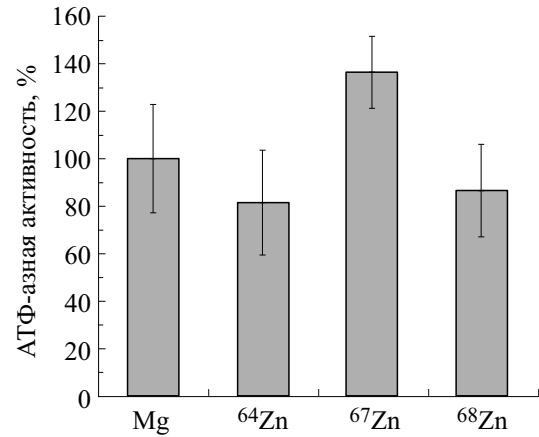


Рис. 3. АТФазная активность субфрагмента-1 миозина в реакционных средах, содержащих различные изотопы цинка. Растворы содержали 20 мМ трис-НСI (рН 7.2), 0.01 мМ CaCl_2 , 100 мМ KCl , 3 мМ АТФ, субфрагмент-1 миозина (20 мкг белка/мл) и 5 мМ хлорида цинка, соответственно $^{64}\text{ZnCl}_2$, $^{67}\text{ZnCl}_2$ или $^{68}\text{ZnCl}_2$. Данные ($m \pm SD$, $n = 3$) представлены в процентах к ферментативной активности в присутствии 5 мМ MgCl_2 природного изотопного состава, принятой за 100%. Различия между средними значениями в экспериментах с магнитным изотопом, ^{67}Zn , и средними значениями в экспериментах с немагнитными изотопами цинка статистически достоверны при $P < 0.05$.

изотоп цинка) или 5 мМ $^{64}\text{ZnCl}_2$, или $^{68}\text{ZnCl}_2$ (немагнитный изотоп цинка). Были выполнены две независимые серии экспериментов с ферментативными препаратами, изолированными из двух разных животных, не менее трех повторов с каждым изотопом цинка в экспериментах с каждым ферментативным препаратом. Результаты представлены на рис. 3. Известно, что ион Zn^{2+} в качестве кофактора миозина менее эффективен, чем Mg^{2+} [14, 15]. Действительно, активность фермента в присутствии немагнитных ионов цинка оказалась ниже, чем в присутствии ионов магния (рис. 3). В экспериментах с различными немагнитными изотопами цинка различий в скорости гидролиза АТФ нет. Однако с магнитным изотопом цинка (^{67}Zn), скорость гидролиза АТФ на 50–70% выше по сравнению со скоростью гидролиза АТФ в присутствии немагнитных изотопов цинка. Таким образом, в экспериментах с изотопами цинка также обнаружен эффект ускорения ферментативного гидролиза АТФ, аналогичный МИЭ, ранее обнаруженному нами в экспериментах с изотопами магния.

Кроме экспериментов с миозином были выполнены эксперименты с Mg^{2+} -зависимой АТФ-гидролазой плазматических мембран миометрия. Этот фермент, так называемая «базальная Mg^{2+} -

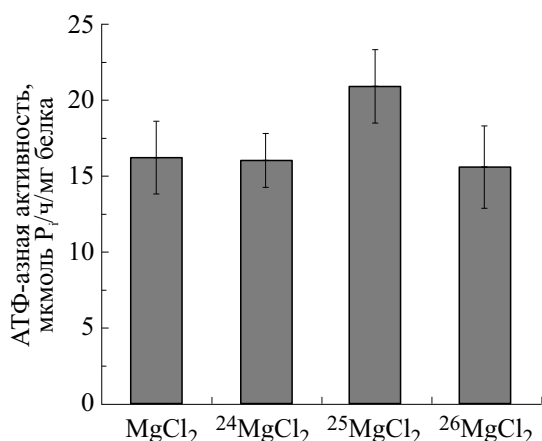


Рис. 4. Активность Mg^{2+} -зависимой АТФазы плазматических мембран миомерии (мкмоль P_i /ч/мг белка) в реакционных средах с различными изотопами магния. Растворы содержали 50 мМ трис-НСl (рН 7.4), 25 мМ NaCl, 125 мМ KCl, 0.1 мМ CaCl₂, 0.1 мМ ЭГТА, 10 мкг/мл белка, 3 мМ АТФ, 5 мМ хлорида магния, соответственно природного изотопного состава, ²⁴MgCl₂, ²⁵MgCl₂ или ²⁶MgCl₂. Различия между средними значениями в экспериментах с магнитным изотопом магния и в экспериментах с немагнитными изотопами магния ($m \pm SD$, $n = 4$) статистически достоверны при $P = 0.05$.

АТРаза» или «Ca²⁺-независимая Mg²⁺-АТРаза», играет важную роль в регулировании концентрации протонов вовне и внутриклеточном пространстве, а также в регулировании концентрации ионов Ca²⁺ в цитоплазме гладкомышечных клеток [11, 12]. Были выполнены три независимые серии экспериментов с препаратами этого фермента, выделенными из трех разных животных. Типичные результаты представлены на рис. 4. Скорость ферментативного гидролиза АТФ в реакционной среде, содержащей магнитный изотоп ²⁵Mg, в среднем на 15–20% выше, чем в средах с немагнитными изотопами. Таким образом, и в этих экспериментах выявлен каталитический эффект магнитного изотопа магния.

Можно было бы предположить, что причиной обнаруженных магнитно-изотопных эффектов служит разное содержание примесей каких-либо посторонних элементов, поступающих в реакционную среду с различными изотопами магния или, соответственно, цинка. Однако такое предположение исключается данными элементного анализа сред, содержащих различные изотопы магния (табл. 3) и цинка (табл. 4). 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 или соответственно цинка. Например, содержа-

ние железа (Fe) в растворе с магнитным изотопом магния (²⁵Mg) почти в четыре раза больше, чем в растворе с немагнитным изотопом (²⁴Mg), но в два с половиной раза меньше, чем в растворе с другим немагнитным изотопом (²⁶Mg). Между тем активность фермента в растворе с немагнитным изотопом ²⁴Mg и в растворе с другим немагнитным изотопом ²⁶Mg практически одна и та же и вдвое ниже, чем активность фермента в растворе с магнитным изотопом магния. Аналогичным образом исключается возможность влияния других примесных элементов. Кроме того, следует принять во внимание, что не только исходные оксиды магния и цинка, но и другие реактивы, необходимые для проведения экспериментов, также содержат примеси, которые вводятся в экспериментальные среды, причем в количествах, значительно превышающих количества тех же примесей, вводимые с гораздо меньшими добавками магния и цинка.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, в наших экспериментах обнаружены магнитно-изотопные эффекты. А именно, ферментативный гидролиз АТФ, катализируемый миозином, изолированным из миомерии, и ферментативный гидролиз АТФ, катализируемый Mg-зависимой АТФазой плазматических мембран миоцитов, ускоряются ядерным спином магнитного изотопа. Имеет место ядерный спиновый катализ. Ранее аналогичный каталитический эффект ядерного спина изотопа ²⁵Mg, небольшой, но статистически достоверный, был обнаружен в экспериментах по влиянию различных изотопов магния на гидролиз АТФ, катализируемый H⁺-АТФазой (комплекс MF₀F₁), выделенной из митохондрий дрожжей и встроенной в липосомы [16]. Не удалось, однако, обнаружить магнитно-изотопные эффекты в экспериментах по изучению влияния различных изотопов магния на АТФ-зависимые реакции, катализируемые креатин-фосфаткиназой [17] и люциферазой [17]. Складывается впечатление, что ядерный спиновый катализ наблюдается в работе только тех ферментов, которые выполняют функцию молекулярного мотора, т.е. используют химическую энергию АТФ для выполнения механической работы или полностью, как миозин, или хотя бы частично, как митохондриальная H⁺-АТФаза и Mg-зависимая АТФаза плазматических мембран.

В химической и молекулярной физике магнитно-изотопные эффекты давно известны [19–21]. В химии МИЭ проявляются в том, что скорость и выход продуктов реакции с участием свободных радикалов и/или ион-радикальных пар

Таблица 3. Результаты анализа элементного состава реакционных сред с хлоридами различных изотопов магния

Элемент	Предел определения (DL), мг/л	Элементный состав, мг/л			
		природный Mg	²⁴ Mg	²⁵ Mg	²⁶ Mg
Li	0.00008	0.00027	0.00015	0.00017	0.00010
Be	0.00008	< DL	< DL	< DL	< DL
B	0.03	< DL	< DL	< DL	< DL
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	< DL	< DL	< DL	< DL
K	0.3	6360	6247	6280	6313
Ca	0.7	2.0	2.0	2.4	2.1
Sc	0.001	< DL	< DL	< DL	< DL
Ti	0.02	< DL	< DL	< DL	< DL
V	0.002	< DL	< DL	< DL	< DL
Cr	0.02	< DL	< DL	< DL	< DL
Mn	0.003	0.029	0.031	0.037	0.080
Fe	0.1	< DL	< DL	< DL	< DL
Co	0.003	< DL	< DL	< DL	< DL
Ni	0.007	< DL	< DL	< DL	< DL
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	< DL	< DL	< DL	< DL
Ge	0.002	< DL	< DL	< DL	< DL
As	0.002	< DL	< DL	< DL	< DL
Se	0.009	< DL	< DL	< DL	< DL
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	< DL	0.0029	0.0046	< DL
Y	0.0001	< DL	< DL	< DL	< DL
Zr	0.0001	0.0031	0.0013	0.0022	0.0028
Nb	0.0004	< DL	< DL	< DL	< DL
Mo	0.0003	0.0079	0.0093	0.0136	0.0168
Ru	0.0002	< DL	< DL	< DL	< DL
Rh	0.0002	< DL	< DL	< DL	< DL
Pd	0.0004	< DL	< DL	< DL	< DL
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	< DL	< DL	< DL	< DL
Sn	0.0002	0.00081	0.00027	0.00063	0.00100
Sb	0.0002	< DL	< DL	< DL	< DL
Te	0.0002	< DL	< DL	< DL	< DL
Cs	0.00004	< ПО	0.00006	0.00008	0.0001
Ba	0.001	0.0040	0.0045	0.0045	0.0043
La	0.0002	< DL	< DL	< DL	< DL
Ce	0.0008	< DL	< DL	< DL	< DL

Таблица 3. Окончание

Элемент	Предел определения (DL), мг/л	Элементный состав, мг/л			
		природный Mg	²⁴ Mg	²⁵ Mg	²⁶ Mg
Pr	0.00002	< DL	< DL	< DL	< DL
Nd	0.0003	< DL	< DL	< DL	< DL
Sm	0.00002	< DL	< DL	< DL	< DL
Eu	0.000007	< DL	< DL	< DL	< DL
Gd	0.00001	< DL	< DL	< DL	< DL
Tb	0.00001	< DL	< DL	< DL	< DL
Dy	0.00001	< DL	< DL	< DL	< DL
Ho	0.00001	< DL	< DL	< DL	< DL
Er	0.00001	< DL	< DL	< DL	< DL
Tm	0.00001	< DL	< DL	< DL	< DL
Yb	0.00001	< DL	< DL	< DL	< DL
Lu	0.00001	< DL	< DL	< DL	< DL
Hf	0.0001	0.00120	0.00078	0.00062	0.00062
Ta	0.0002	< DL	< DL	< DL	< DL
W	0.0003	< DL	< DL	< DL	< DL
Re	0.00001	< DL	< DL	< DL	< DL
Os	0.00002	< DL	< DL	< DL	< DL
Ir	0.00001	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
Pt	0.00003	< DL	< DL	< DL	0.00067
Au	0.0001	< DL	< DL	< DL	< DL
Hg	0.0003	< DL	< DL	< DL	< DL
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	< DL	< DL	0.00004
Th	0.00002	0.00060	0.00036	0.00027	0.00025
U	0.00002	< DL	< DL	< DL	< DL

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, в данном случае — электронного углового момента. Суммарный электронный спин (S) продуктов химической реакции должен быть равен суммарному электронному спину исходных реагентов. В физике аналогичный спиновый запрет возникает, например, при синглет-триплетных переходах в молекулах и твердом теле.

Магнитно-изотопный эффект однозначно свидетельствует о том, что в изучаемом процессе имеется «узкое место» — лимитирующая стадия, зависящая от электронного спинового состояния, и что ядерный спин магнитного изотопа ускоряет эту стадию. В химии для объяснения МИЭ обычно предполагается существование радикальной пары или ион-радикальной пары в качестве промежуточного продукта («узкого места») реакции

[20]. Известно, однако, что реакция гидролиза АТФ с образованием АДФ и P_i следует кислотно-основному механизму [22]. Соответственно, возникновение ион-радикальной пары в качестве интермедиата в этой реакции маловероятно. Действительно, МИЭ не наблюдается в неферментативном гидролизе АТФ. Иная ситуация, однако, может иметь место в случае гидролиза АТФ, катализируемого молекулярным мотором. Доказано экспериментально, что гидролиз АТФ инициирует электронно-конформационные взаимодействия в активном центре фермента. Благодаря энергии, освобождаемой при гидролизе АТФ, имеет место конформационное возбуждение, по существу, деформация макромолекулы [23, 24]. Более того, при гидролизе АТФ, катализируемом миозином, цикл генерации механического напряжения макромолекулы состоит, согласно квантово-механическим расчетам, из нескольких стадий [25]. На первой стадии γ -фосфат АТФ стабилизируется в состоянии диссоциированного

Таблица 4. Результаты анализа элементного состава реакционных сред с хлоридами различных изотопов цинка

Элемент	Предел определения (DL), мг/л	Элементный состав, мг/л		
		⁶⁴ Zn	⁶⁷ Zn	⁶⁸ Zn
Li	0,001	< DL	< DL	< DL
Be	0,0002	< DL	< DL	< DL
B	0,02	0,52	0,70	0,60
Na	0,3	0,57	1,0	0,77
Mg	0,05	< DL	0,069	< DL
Al	0,06	0,22	0,27	0,23
Si	0,6	< DL	< DL	< DL
P	0,6	< DL	< DL	< DL
S	2	< DL	< DL	< DL
K	0,1	< DL	< DL	< DL
Ca	0,3	< DL	< DL	< DL
Sc	0,008	< DL	< DL	< DL
Ti	0,01	< DL	< DL	< DL
V	0,003	< DL	< DL	< DL
Cr	0,01	< DL	< DL	< DL
Mn	0,003	< DL	< DL	< DL
Fe	0,09	< DL	< DL	< DL
Co	0,003	< DL	< DL	< DL
Ni	0,02	0,14	< DL	< DL
Cu	0,02	0,047	0,098	0,099
Ga	0,0004	< DL	< DL	< DL
As	0,06	< DL	< DL	< DL
Se	0,009	< DL	< DL	< DL
Rb	0,003	< DL	< DL	< DL
Sr	0,001	< DL	< DL	< DL
Y	0,001	< DL	< DL	< DL
Zr	0,002	< DL	< DL	< DL
Nb	0,001	< DL	< DL	< DL
Mo	0,000	< DL	< DL	< DL
Rh	0,001	< DL	< DL	< DL
Pd	0,001	< DL	< DL	< DL
Ag	0,002	< DL	< DL	< DL
Cd	0,001	< DL	< DL	< DL
Sn	0,004	< DL	< DL	< DL
Sb	0,001	< DL	< DL	< DL
Te	0,001	< DL	< DL	< DL
Cs	0,0002	< DL	< DL	< DL
Ba	0,001	0,0051	0,0025	0,010
La	0,0003	< DL	< DL	< DL
Ce	0,0003	< DL	< DL	< DL
Pr	0,0002	< DL	< DL	< DL
Nd	0,0007	< DL	< DL	< DL
Sm	0,0002	< DL	< DL	< DL
Eu	0,0001	< DL	< DL	< DL
Gd	0,0002	< DL	< DL	< DL

Таблица 4. Окончание

Элемент	Предел определения (DL), мг/л	Элементный состав, мг/л		
		^{64}Zn	^{67}Zn	^{68}Zn
Tb	0,0001	< DL	< DL	< DL
Dy	0,0001	< DL	< DL	< DL
Ho	0,0001	< DL	< DL	< DL
Er	0,0001	< DL	< DL	< DL
Tm	0,0001	< DL	< DL	< DL
Yb	0,0001	< DL	< DL	< DL
Lu	0,0001	< DL	< DL	< DL
Hf	0,0001	< DL	< DL	< DL
Ta	0,0003	< DL	< DL	< DL
W	0,0003	< DL	< DL	< DL
Re	0,00003	< DL	< DL	< DL
Ir	0,0001	< DL	< DL	< DL
Pt	0,0006	< DL	< DL	< DL
Au	0,0002	< DL	< DL	< DL
Hg	0,0009	< DL	< DL	< DL
Tl	0,0001	< DL	< DL	< DL
Pb	0,002	0,0024	0,019	0,0082
Bi	0,0001	< DL	< DL	< DL
Th	0,0003	< DL	< DL	< DL
U	0,0001	< DL	< DL	< DL

метафосфата ($\text{P}_\gamma\text{O}_3^-$). При этом продукты гидролиза, АДФ и P_i , остаются в активном центре фермента в близком контакте и освобождаются только после того, как миозин связывается с филаментами актина. Это согласуется с хорошо известным фактом обратимости реакции гидролиза АТФ миозином. До тех пор, пока продукты гидролиза остаются связанными миозином и в близком контакте, они могут снова образовать АТФ [25]. Можно предположить, что в условиях электронно-конформационного возбуждения макромолекулы в активном центре фермента имеет место перенос электронной плотности на АДФ или Mg^{2+} , например, от OH^- -группы связанной молекулы воды или от NH_2 -группы Glu-459 с образованием соответственной ион-радикальной пары. Затем следует нуклеофильная атака неорганического фосфата окси-анионом аденозиндифосфата с образованием АТФ. Стабильное спиновое состояние продукта, АТФ-Mg (в экспериментах с цинком соответственно АТФ-Zn), должно быть синглетным (электронный спин $S = 0$). Между тем ядерный спин ^{25}Mg (^{67}Zn) через сверхтонкое взаимодействие с неспаренным электроном ион-радикальной пары способен конвертировать эту пару, связанную миозином, в триплетное состояние ($S = 1$). Создавая

при этом спиновый запрет, ядерный спин изотопа ^{25}Mg (^{67}Zn) затрудняет нежелательную обратную реакцию синтеза АТФ, способствуя, таким образом, прямой реакции гидролиза АТФ. Гипотеза о ключевой роли виртуальной ион-радикальной пары в синтезе АТФ при окислительном фосфорилировании была высказана около 50 лет тому назад [26].

Возможно иное, альтернативное, объяснение ядерного спинового катализа в реакциях гидролиза АТФ, катализируемых «молекулярными моторами» [21]. Можно предположить, что энергия, выделяемая при гидролизе АТФ (~ 0.54 эВ), недостаточно велика для электронно-конформационного перехода макромолекулы в синглетное возбужденное состояние. Этой энергии достаточно для перехода в более низкое триплетное состояние ($S = 1$), но такой переход из основного состояния ($S = 0$) запрещен законом сохранения спина. Магнитный изотоп (^{25}Mg или соответственно ^{67}Zn) изменяет ситуацию, а именно: ядерный спин изотопа устраняет спиновый запрет. Таким образом, обеспечивая необходимую спиновую конверсию электронно-конформационного состояния макромолекулы в триплетное состояние (когерентные бозоны), магнитный изотоп ускоряет хемомеханический цикл ферментативной реакции [21]. Подобный механизм был предло-

жен в физике твердого тела для объяснения влияния магнитных полей на подвижность дислокаций [27].

Рассмотрим еще одно возможное объяснение каталитического эффекта ядерного спина изотопов $^{25}\text{Mg}/^{67}\text{Zn}$. Гидролиз АТФ, катализируемый молекулярным мотором, сопровождается значительной конформационной перестройкой макромолекулы. При этом имеют место процессы дегидратации и регидратации электрически заряженных аминокислотных групп. Между тем существуют два изомера молекул воды, различающиеся по взаимной ориентации ядерных спинов водорода, а именно: *орто*- H_2O с параллельной ориентацией протонных спинов и *пара*- H_2O с антипараллельной ориентацией протонных спинов. Согласно квантовой статистике, при комнатной температуре *орто*- H_2O составляет 75% общего объема [28]. Имеются основания полагать, что по сравнению с молекулами *пара*- H_2O молекулы *орто*- H_2O имеют преимущественное сродство к *L*-аминокислотам [29]. Если так, то перемещение преимущественно связанных молекул *орто*- H_2O при конформационном превращении макромолекулы затруднено, а спин-вращательные взаимодействия протонов слишком слабы, чтобы обеспечить должную эффективность *орто-пара*-переходов. Опять-таки, магнитный изотоп ^{25}Mg (или соответственно ^{67}Zn) способен существенно улучшить ситуацию, а именно — устранить проблему спинового запрета, обеспечив таким образом необходимую скорость конверсии изомеров воды.

В «молекулярных моторах», работающих на немагнитном изотопе магния, функцию спинового катализа могут выполнять в принципе ядерные спины водорода (^1H , $I = 1/2$) и фосфора (^{31}P , $I = 1/2$). Относительно высокая каталитическая активность магнитных изотопов магния и цинка обусловлена, очевидно, тем, что ядерные спины ^{25}Mg ($I = 5/2$) и ^{67}Zn ($I = 5/2$) в пять раз больше, чем ядерные спины ^1H и ^{31}P , и создают соответственно более сильные локальные магнитные поля (константа сверхтонкого взаимодействия ≈ 21 мТл) в активном центре фермента.

ВЫВОДЫ

В экспериментах с важнейшим молекулярным мотором биоэнергетики — миозином — обнаружены значительные по величине эффекты ускорения ферментативного гидролиза АТФ магнитными изотопами магния и цинка. Эффект ядерного спинового катализа выявлен также в экспериментах с Mg-зависимой АТФазой плазматической мембраны миометрия.

Детальные механизмы ядерного спинового катализа в молекулярных моторах являются задачей дальнейших исследований.

Данная статья подготовлена на основе доклада, сделанного на VI Съезде биофизиков России (Сочи, 2019) [30].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Т.А. Веклич за выполненные эксперименты с АТФазой плазматической мембраны миометрия. Авторы глубоко признательны академику НАН Украины С.А. Костерину (зав. отделом биохимии мышц, ИБХ НАН) и его коллегам за плодотворное сотрудничество.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема АААА-А19-119092390041-5).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Encyclopedia of nuclear magnetic resonance*, ed. by D. M. Grant and R. K. Harris (Wiley, Chichester, 1996).
2. Л. В. Авдеева и В. К. Кольтовер, Вестн. МГУ, сер. 2 (химия), **57** (3), 145 (2016).
3. L. V. Avdeeva, T. A. Evstyukhina, V. K. Koltover, et al., Nucl. Phys. At. Energy **20** (3), 271 (2019).
4. В. К. Кольтовер, Р. Д. Лабынцева, В. К. Карандашев и С. О. Костерин, Биофизика **61** (2), 239 (2016).
5. V. K. Koltover, R. D. Labyntseva, and S. O. Kosterin, in: *Myosin: Biosynthesis, Classes and Function*, ed. by D. Broadbent (Nova Science Publ., N.-Y., 2018), pp. 135–158.
6. Ю. В. Карякин и И. И. Ангелов, *Чистые химические вещества* (Химия, М., 1974).
7. V. K. Karandashev, A. N. Turanov, T. A. Orlova, et al., Inorg. Mater. **44**, 1491 (2008).
8. S. A. Burgess, S. Yu, M. L. Walker, et al., J. Mol. Biol. **372**, 1165 (2007).

9. Р. Д. Лабынцева, А. А. Бевза, О. В. Бевза и др., Укр. биохим. ж. **84**, 34 (2012).
10. A. H. Iwane, K. Kitamura, M. Tokunaga, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**, 46 (1997).
11. Т. А. Веклич, А. А. Шкрабак, Н. Н. Слитченко и др., *Биохимия* **79**, 532 (2014).
12. Т. А. Веклич, Ю. Ю. Мазур и С. А. Костерин, Укр. биохим. ж. **87**, 5 (2015).
13. P. S. Chen, T. Y. Toribara Jr., and H. Warner, *Analyt. Chem.* **28** 1756 (1956).
14. R. D. Labyntseva, T. V. Ulianenko, and S. O. Kosterin, *Ukr. Biochem. J.* **70**, 71 (1998).
15. A. A. Bevza, R. D. Labyntseva, O. V. Bevza, et al., *Ukr. Biochem. J.* **82**, 22 (2010).
16. V. K. Koltover, P. Graber, V. K. Karandashev, et al., in: *Abstr. Book of 11th Int. Conf. "Biocatalysis: Fundamentals and Applications"* (Innovations and High Technologies MSU Ltd, Moscow, 2017), pp. 50–51.
17. D. Crotty, G. Silkstone, S. Poddar, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 1437 (2012).
18. Д. А. Смирнова, В. К. Кольтовер, С. В. Носенко и др., *Вестн. МГУ. Сер. 2 (Химия)*, **59**, 266 (2018).
19. Я. Б. Зельдович, А. Л. Бучаченко и Е. Л. Франкевич, *Успехи физ. наук* **155** (1) (1988).
20. A. L. Buchachenko and R. G. Lawler, *Acc. Chem. Res.* **50** (4) 877 (2017).
21. V. K. Koltover, *J. Mol. Liquids* **235**, 44 (2017).
22. D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry* (Freeman, N.-Y., 1996).
23. М. В. Волькенштейн, *Общая биофизика* (Наука, М., 1978).
24. Д. С. Чернавский и Н. М. Чернавская, «Белок–машина». *Биологические макромолекулярные конструкции* (Янус-К, М., 1999).
25. F. A. Kiani and S. Fischer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111** (29) 2947 (2014).
26. Л. А. Блюменфельд и В. К. Кольтовер, *Молекуляр. биология* **6** (1), 161 (1972).
27. М. В. Бадялевич, В. В. Кведер, В. И. Орлов, and Ю. А. Осипян, *Phys. Stat. Sol. (c)* **2** (6), 1869 (2005).
28. V. I. Tikhonov and A. A. Volkov, *Science* **296**, 2363 (2001).
29. Y. Scolnik, I. Portnaya, U. Cogan, et al., *Phys. Chem.—Chem. Phys.* **8** (3), 333 (2006).
30. В. К. Кольтовер, Р. Д. Лабынцева, В. К. Карандашев и др., в сб: *Тез. докл. VI Съезда биофизиков России* (Сочи, 2019), т. 2, сс. 208–209.

Magnetic-Isotope Effects of Magnesium and Zinc in the Enzymatic ATP Hydrolysis Reactions Driven by the Molecular Motors

V.K. Koltover*, R.D. Labyntseva**, and V.K. Karandashev***

**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, Kiev, 01030 Ukraine*

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

The effects of different isotopes of magnesium and zinc on the enzyme activity of myosin subfragment-1 have been explored. The rate of the enzymatic ATP hydrolysis in the reaction media enriched with the magnetic isotope, ^{25}Mg , is twice as high as it is in the reaction media enriched with the nonmagnetic isotopes, ^{24}Mg or ^{26}Mg . A similar effect of nuclear spin catalysis has been detected in the experiments with isotopes of zinc as a cofactor of the enzyme. The rate of the enzymatic ATP hydrolysis with the magnetic ^{67}Zn increases by 40–50 percent compared to that with the nonmagnetic ^{64}Zn or ^{68}Zn . The magnetic-isotope effects are observed at the physiological concentration of magnesium and zinc chlorides (5 mM). The catalytic effect of the magnetic magnesium isotope ^{25}Mg has been revealed in the experiments with the Mg-dependent ATPase of plasma membranes from the myometrium. The observation of the magnetic isotope effects indicates that there is a spin-selective rate-limiting step in the chemo-mechanical process driven by the “molecular motor” which uses energy from ATP hydrolysis and that nuclear spin catalysis causes acceleration of this stage. Some possible mechanisms of the nuclear spin catalysis are discussed.

Keywords: nuclear spin catalysis, myosin, ATPase activity, biomolecular motors, bioreliability, magnetic-isotope effect, magnesium, zinc