

УДК 678+544.34;544.45;544.47;577.15;577.34

ЯДЕРНЫЙ СПИНОВЫЙ КАТАЛИЗ В ЖИВОЙ ПРИРОДЕ

Л.В. Авдеева, В.К. Кольтовер

(Институт проблем химической физики РАН; e-mail: koltover@icp.ac.ru)

Выполнены эксперименты с клетками, обогащенными изотопами магния: магнитным (^{25}Mg) или немагнитными (^{24}Mg или ^{26}Mg). Обнаружено, что бактерии *E. coli* существенно быстрее адаптируются к среде роста, обогащенной изотопом ^{25}Mg , по сравнению с адаптацией к среде, обогащенной немагнитными изотопами магния. В экспериментах с другой общепринятой клеточной моделью, дрожжами *S. cerevisiae*, обнаружено, что клетки, обогащенные ^{25}Mg , восстанавливаются после УФ-облучения с константой скорости, вдвое большей, чем клетки, обогащенные немагнитным изотопом магния. Совместно с биохимиками Института биохимии им. Палладина НАН Украины (Киев) изучено влияние изотопов магния на АТФ-азную активность миозина, изолированного из миомерия, и обнаружено, что скорость ферментативного гидролиза АТФ с ^{25}Mg в 2,0–2,5 раза выше, чем с немагнитными изотопами (^{24}Mg или ^{26}Mg). Обсуждаются возможные механизмы магнитно-изотопных эффектов (ядерного спинового катализа) в биологических объектах.

Ключевые слова: биокатализ, ядерный спиновый катализ, стабильные изотопы, магнитно-изотопный эффект, надежность.

Биополимерные катализаторы, как и прочие клеточные структуры, состоят из атомов химических элементов, многие из которых имеют магнитные и немагнитные стабильные изотопы. Создаваемые атомными ядрами некоторых магнитных изотопов внутренние магнитные поля (на расстоянии порядка длины химической связи) превышают в 10–100 раз магнитное поле Земли (~0,05 мТ) [1]. Возникает вопрос, может ли магнитное поле атомного ядра повлиять на эффективность и надежность биокатализа? Особый интерес представляет магний, как один из наиболее распространенных элементов в живой природе, катион которого (Mg^{2+}), служит кофактором ферментов синтеза и гидролиза АТФ и других важных ферментов. Магний имеет три стабильных изотопа (^{24}Mg , ^{25}Mg и ^{26}Mg) с природным соотношением 78,7, 10,13 и 11,17%, из которых только ^{25}Mg является магнитным изотопом (имеет ядерный спин $I = 5/2$) и создает магнитное поле, тогда как ^{24}Mg и ^{26}Mg – немагнитные изотопы (ядерный спин $I = 0$) [1]. Нашей группой выполнены эксперименты с клетками, обогащенными различными изотопами магния. Совместно с украинскими биохимиками изучено влияние различных изотопов магния на фермент миозин. Обнаружены магнитно-изотопные эффекты, а именно: магнитный изотоп магния (^{25}Mg) выполняет кофакторные функции существенно эффективнее, чем немагнитные изотопы (^{24}Mg и ^{26}Mg).

Материалы и методы

Оксиды магния ^{24}MgO , ^{25}MgO и ^{26}MgO (с изотопным обогащением 99,8; 98,8 и 97,7 атом.% соответственно) произведены на предприятии «Электрохимприбор» («Росатом», Свердловская обл.).

Эксперименты с клетками *Escherichia coli* выполнены в микробиологической группе ИПХФ РАН и повторены в Оренбургском университете на кафедре микробиологии (заведующий кафедрой Д.Г. Дерябин) [2, 3]. Для изотопного обогащения бактерий были приготовлены три варианта жидкой питательной среды М9, содержавшей кроме глюкозы («Экохим», Россия) и других стандартных компонентов («Sigma-Aldrich») изотопы магния в виде $^{25}\text{MgSO}_4$, $^{24}\text{MgSO}_4$ или $^{26}\text{MgSO}_4$ в концентрации 2,2 мМ/л. Прочие экспериментальные условия (элементный состав среды роста, pH и т.д.) были идентичны. После преинкубации в течение 24 ч в среде М9, не содержавшей магния, одинаковые объемы суспензии клеток переносили в такую же среду, но с добавлением ^{24}Mg , ^{25}Mg или ^{26}Mg в виде соответствующего сульфата, а затем культивировали в условиях непрерывной аэрации на шейкере при 37°C. Каждый эксперимент проводили одновременно с тремя изотопами – по три образца клеточной культуры с каждым изотопом, т.е. в одних и тех же условиях параллельно исследовали 9 образцов. Эксперимент повторяли дважды с различными инокулятами. Кинетику роста клеточной культуры регистрировали путем изме-

рения оптической плотности при 600 нм (OD_{600}). Жизнеспособность клеток оценивали по способности формировать колонии на стандартной твердой питательной среде (агар-агар) в чашках Петри [2, 3].

Активность фермента супероксиддисмутазы (СОД) в клетках измеряли в начале стационарной фазы роста полярографически по стандартной методике.

Эксперименты с изотопно-обогащенными клетками дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* выполняли в Петербургском институте ядерной физики НИЦ «Курчатовский институт», в отделении молекулярной и радиационной биологии (заведующий отделением В.Г. Королев) совместно с украинскими коллегами из Института клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев [4, 5]. Были приготовлены варианты стандартной жидкой питательной среды МЗ, содержащей различные изотопы магния в виде сульфатов магния в концентрации 3,7 мМ/л. После трех суток культивирования в условиях непрерывной аэрации при 30°C клетки отмывали от питательной среды, ресуспендировали в стерильном фосфатном буфере (рН 7,0) («голодная среда») и облучали в этой среде жестким УФ-светом ($\lambda = 240\text{--}260$ нм, $J = 100\text{--}300$ Дж/м²). Для изучения кинетики восстановления облученные клетки инкубировали при 30°C в той же «голодной среде» заданное время с высевом на агар в чашки Петри для оценки их способности к формированию колонии [4, 5].

Эксперименты по влиянию изотопов магния на субфрагмент-1 миозина, изолированного из гладкой мышцы (миометрий) свиней, выполнялись в Институте биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины в Киеве в отделе биохимии мышц (заведующий отделом акад. НАН Украины С.А. Костерин). Активность фермента измеряли в стандартных реакционных растворах, содержащих хлориды различных изотопов магния ($^{24}\text{MgCl}_2$, $^{25}\text{MgCl}_2$ или $^{26}\text{MgCl}_2$) в концентрации 5 мМ [6].

Элементный состав образцов анализировали методами атомной эмиссионной спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения в Институте проблем технологии микроэлектроники и особо чистых материалов РАН (руководитель аналитического центра В.К. Карандашев).

Результаты

Кинетические кривые роста бактериальной культуры клеток *E. coli* имели стандартный вид: период относительно медленной адаптации к новой среде роста («лаг-фаза»), переходящий в бы-

струю фазу экспоненциального роста («лог-фазу») и затем в стационарную фазу, в ходе которой рост клеток приостанавливается по мере истощения субстратов, прежде всего – глюкозы (рис. 1). Результаты количественной обработки кинетических данных представлены в табл. 1.

Из этих данных следует, что клетки, пересаженные в новую жидкую среду роста, существенно быстрее адаптируются к этой среде, если она содержит магнитный изотоп магния (^{25}Mg), чем в параллельных экспериментах с немагнитными изотопами ^{24}Mg или ^{26}Mg . При этом не обнаружено существенных различий для немагнитных изотопов ^{24}Mg и ^{26}Mg . В экспоненциальной фазе константы скорости роста клеточной культуры для всех трех изотопов магния оказались приблизительно одинаковыми.

Поразительный эффект магнитного изотопа был обнаружен при измерении активности антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы (СОД) в клетках, достигших стационарной фазы роста. Активность СОД в клетках, росших на среде, обогащенной ^{25}Mg , оказалась на 40% ниже, чем в клетках, выросших на среде, обогащенной немагнитным изотопом ^{24}Mg (рис. 2).

Известно, что в аэробно растущих клетках имеются два типа супероксиддисмутазы (Mn-СОД и Fe-СОД), и что уровень суммарной активности фермента определяется уровнем его субстрата (уровнем супероксидных радикалов – анион-радикалов кислорода, $\text{O}_2^{\cdot-}$) [7]. Клетки, обогащенные магнитным изотопом магния, по сравнению с клетками, обогащенными немагнитным изотопом,

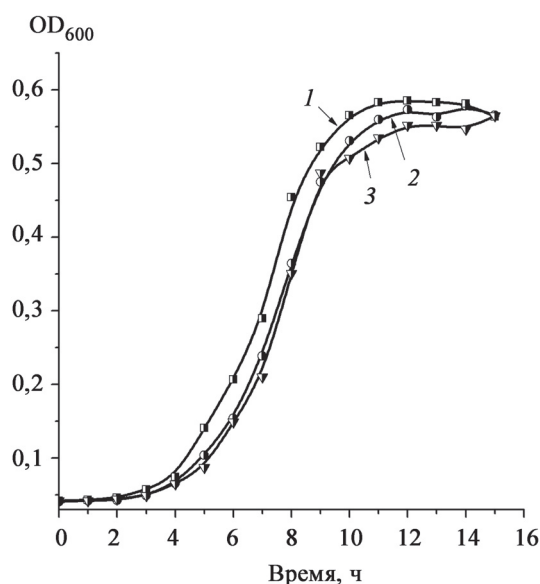


Рис. 1. Кинетические кривые роста клеток *E. coli* в жидких средах, обогащенных различными изотопами магния: 1 – магнитный $^{25}\text{MgSO}_4$, 2 – немагнитный $^{24}\text{MgSO}_4$, 3 – немагнитный $^{26}\text{MgSO}_4$

Т а б л и ц а 1

Количественные параметры роста клеток *E. coli* в зависимости от типа изотопа магния: T – длительность адаптационного периода (лаг-фазы), k – константа скорости роста в лог-фазе. Представлены результаты ($m \pm SD$) двух независимых экспериментов, в каждом из которых было по три образца с каждым изотопом ($N = 3$)

Изотоп магния	T , ч	k , ч ⁻¹
эксперимент I		
²⁴ MgSO ₄	3,0 ± 0,2	1,63 ± 0,02
²⁵ MgSO ₄	2,3 ± 0,3*	1,68 ± 0,05**
²⁶ MgSO ₄	3,4 ± 0,2	1,55 ± 0,06
эксперимент II		
²⁴ MgSO ₄	12,1 ± 0,9	2,0 ± 0,3
²⁵ MgSO ₄	9,8 ± 0,5*	2,3 ± 0,1**
²⁶ MgSO ₄	12,7 ± 0,8	2,1 ± 0,2

*Различия между средними значениями для магнитного изотопа и немагнитных изотопов статистически достоверны при $p \leq 0,02$; **различия между средними значениями для магнитного изотопа и немагнитных изотопов статистически недостоверны при $p \leq 0,5$.

не только быстрее входят в стационарную фазу, но и быстрее стареют в этой фазе в связи с истощением запаса субстратов питания. При старении клеток метаболизм замедляется и, соответственно, снижается уровень генерации супероксидных радикалов как побочных продуктов окислительного метаболизма [8].

Магнитно-изотопный эффект магния обнаружен в наших экспериментах и с другой общепринятой клеточной моделью – дрожжами *S. cerevisiae* [4, 5]. Мы изучали влияние различных изотопов магния на кинетику пострадиационного восстановления дрожжей. Выживаемость клеток, перенесенных в питательную среду (агар) сразу же после облучения, не превышала нескольких процентов. После облучения в такой дозе большинство клеток не успевает репарировать поврежденные генетические структуры до наступления митоза, и при клеточном делении возникают нежизнеспособные дочерние клетки. Инкубация в «голодной среде», в которой клетки не делятся, обеспечивает дополнительное время для репарационных процессов, что обеспечивает увеличение выживаемости.

Обнаружено, что клетки, обогащенные изотопом ²⁵Mg, восстанавливаются эффективнее, чем клетки, обогащенные изотопом ²⁴Mg. Для клеток, обогащенных изотопом ²⁵Mg, константа скорости восстановления оказалась равной $0,058 \pm 0,004$ ч⁻¹, тогда как для клеток, обогащенных ²⁴Mg, она была почти вдвое меньше ($0,032 \pm 0,003$ ч⁻¹), причем разли-

чие между средними значениями статистически достоверно при $p = 0,02$ [4, 5].

Согласно данным атомной эмиссионной спектроскопии и масс-спектрометрии, элементный состав ростовых сред был одинаков при содержании примесных элементов не более нескольких микромолей на 1 л (независимо от типа изотопа магния). Можно было бы предположить, что различия вызваны разным содержанием примесей каких-либо посторонних элементов, поступающих в среду роста с изотопами магния. Однако данные анализа исходных препаратов оксидов магния, представленные в табл. 2, исключают такое предположение.

Можно было бы также предположить, что причиной эффекта послужил не ядерный спин изотопа ²⁵Mg, а повышенное содержание примеси кальция в ²⁵MgO (в 1,6 раза больше, чем в ²⁴MgO). Однако тот же ²⁵MgO содержит кальция в четыре раза меньше, чем оксид другого немагнитного изотопа – ²⁶MgO. Эффект не может быть обусловлен и различием в содержании примеси железа. Содержание Fe в ²⁵MgO почти в 4 раза больше, чем в ²⁴MgO, но в 2,5 раза меньше, чем в ²⁶MgO. Между тем эффект немагнитного ²⁴Mg статистически не отличается от воздействия другого немагнитного изотопа – ²⁶Mg. Исключается также возможность влияния и других примесных элементов, по содержанию которых имеются различия между ²⁴MgO и ²⁶MgO.

Отдельного рассмотрения заслуживают никель и селен, так как в оксиде магнитного изотопа магния примесей этих элементов больше, по сравнению с оксидами немагнитных изотопов магния. Конечные концентрации этих элементов, вводимых в 1 л среды с оксидами ²⁴Mg, ²⁵Mg и ²⁶Mg, составляли для никеля соответственно $<0,15 \times 10^{-8}$; $0,30 \times 10^{-8}$ и $0,15 \times 10^{-8}$ М, а для селена $<1,1 \times 10^{-8}$; $2,2 \times 10^{-8}$ и $1,1 \times 10^{-8}$ М. Ионы Ni необходимы для бактерий, потребляющих водород в качестве источника энергии [9]. Однако *E. coli* к такой группе бактерий не относятся. Селен в анаэробных условиях роста культуры клеток *E. coli*, предположительно, повышает устойчивость формиака к дегидрированию [10]. Очевидно, что в нашем случае, когда клетки росли в аэробных условиях, этот фактор не имеет значения.

Кроме того, следует принять во внимание, что не только оксиды магния, но и другие реактивы, необходимые для проведения экспериментов, содержат примеси, которые вводятся в среду роста и другие экспериментальные среды в количествах, значительно превышающих количество тех же примесей, вводимых с гораздо меньшими добавками магния. Например, содержание железа в глюко-

Т а б л и ц а 2

Содержание примесных элементов (мас.%) в препаратах оксидов магния

Элемент	²⁴ MgO	²⁵ MgO	²⁶ MgO	Элемент	²⁴ MgO	²⁵ MgO	²⁶ MgO
Li	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	In	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Be	< 0,0005	< 0,0005	< 0,0005	Sn	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
B	< 0,001	0,008	0,0026	Sb	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Na	0,002	< 0,002	0,004	Te	< 0,0002	< 0,0002	< 0,0002
Al	0,0011	0,0008	0,031	I	< 0,0005	< 0,0005	< 0,0005
Si	< 0,005	< 0,005	< 0,005	Cs	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
P	< 0,005	< 0,005	< 0,005	Ba	< 0,0001	0,0003	0,0002
K	< 0,005	< 0,005	0,017	La	< 0,0001	< 0,0001	0,0003
Ca	< 0,005	0,008	0,34	Ce	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Sc	< 0,0002	< 0,0002	< 0,0002	Pr	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Ti	< 0,0004	< 0,0004	0,0015	Nd	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
V	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	Sm	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Cr	< 0,0005	< 0,001	0,0030	Eu	< 0,0001	< 0,0001	0,0002
Mn	0,0032	0,0020	0,059	Gd	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Fe	< 0,005	0,019	0,048	Tb	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Co	< 0,0001	< 0,0001	0,0011	Dy	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Ni	< 0,0001	< 0,0002	< 0,0001	Ho	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Cu	0,0029	0,0021	0,0004	Er	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Zn	0,0006	0,0005	0,0009	Tm	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Ga	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	Yb	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Ge	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	Lu	< 0,0001	< 0,0001	0,0003
As	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	Hf	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Se	< 0,001	< 0,002	< 0,001	Ta	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Br	< 0,005	< 0,005	< 0,005	W	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Rb	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	Re	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Sr	< 0,0001	< 0,0001	0,0002	Os	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Y	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	Ir	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Zr	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	Pt	< 0,0001	0,0031	0,0002
Nb	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	Au	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Mo	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	Hg	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Ru	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	Tl	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Rh	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	Pb	< 0,0001	< 0,0001	0,0015
Pd	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	Bi	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Ag	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	Th	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Cd	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	U	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

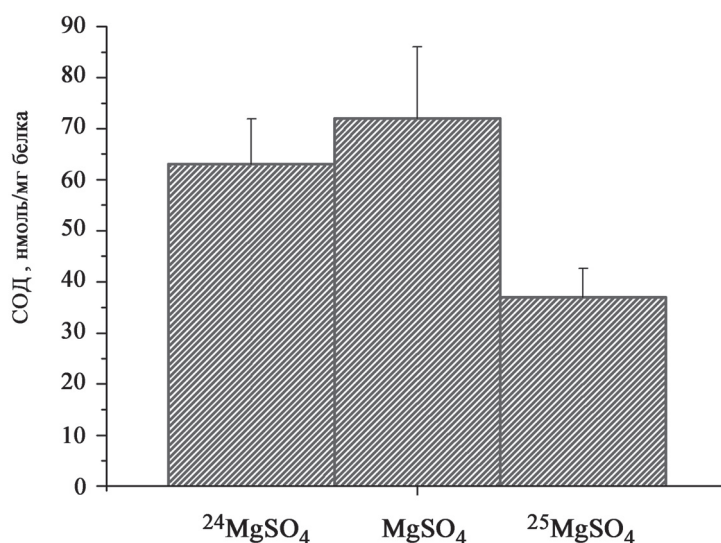


Рис. 2. Активность СОД в клетках *E. coli*, выращенных на средах с $^{24}\text{MgSO}_4$, MgSO_4 (природное содержание изотопов) или $^{25}\text{MgSO}_4$. Различия между средними значениями для магнитного изотопа ^{25}Mg и немагнитного изотопа ^{24}Mg статистически достоверны при $p \leq 0,01$

зе производства «Экохим» (Россия, ГОСТ 6038-79) составляет $\sim 0,002$ мас.%, в Na_2HPO_4 («Sigma-Aldrich», продукт # 71640, CAS # 7558-79-4) содержание железа составляет $\sim 0,0005$ мас.%, NaCl («Sigma-Aldrich», продукт # 71376, CAS # 7647-14-5) и NH_4Cl («Sigma-Aldrich», продукт # 31107, CAS # 12125-02-9) содержат $\sim 0,0001$ мас.% железа. Количество железа, вносимого с этими солями и глюкозой в 1 л экспериментальной среды, составляет $\sim 20 \times 10^{-5}$ г, тогда как с солями ^{24}Mg , ^{25}Mg и ^{26}Mg железа вносится соответственно не более $0,4 \times 10^{-5}$; $1,7 \times 10^{-5}$ и $4,3 \times 10^{-5}$ г. Те же реагенты, согласно сертификатам, содержат «тяжелые металлы», свинец и никель ($\sim 0,0005$ мас.% каждого). С этими реагентами в экспериментальный раствор вносится $\sim 70 \times 10^{-8}$ моль/л Pb и 110×10^{-8} моль/л Ni. Между тем с ^{26}MgO и ^{25}MgO , наиболее «загрязненными» из всех оксидов, в тот же раствор вносится всего лишь $0,65 \times 10^{-8}$ моль/л Pb и $0,30 \times 10^{-8}$ моль/л Ni. Таким образом, количество примесей, поступающих от основных компонентов, значительно превышает количество тех же примесей, поступающих в те же среды с изотопами магния. Важно и то, что примеси от основных компонентов в каждую из экспериментальных сред поступают в одинаковых количествах независимо от изотопа магния, содержащегося в этой среде.

АТФ – главный источник энергии в клетках, поэтому можно предположить, что МИЭ в живых клетках обусловлен более высокой эффективностью синтеза АТФ «топливно-силовыми» нанореакторами в клетках, обогащенных магнитным

изотопом магния. Один из наиболее изученных «молекулярных моторов» биоэнергетики – мышечный белок миозин. Фермент осуществляет гидролиз концевой фосфатной связи в молекуле АТФ: $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$. При этом выделяется энергия (в физиологических условиях $\sim 0,54$ еВ), которая используется для совершения работы – мышечного сокращения. АТФ-азная активность миозина облигатно зависит от наличия ионов Mg^{2+} , необходимых для связывания АТФ в активном центре фермента, а также играющих существенную роль в катализе гидролиза АТФ [7].

На рис. 3 представлены результаты экспериментов по влиянию различных изотопов магния на АТФ-азную активность субфрагмента-1 миозина. Субфрагмент-1 миозина считается достаточной функциональной единицей миозина, поскольку сохраняет все его нативные свойства (АТФ-азную активность и способность взаимодействовать с актином). Выполнено несколько серий независимых экспериментов с препаратами фермента, выделенными в разное время из гладкой мышцы разных животных (свиней). Несмотря на вариабельность средних значений АТФ-азной активности от одной экспериментальной серии к другой, во всех экспериментальных сериях наблюдался один и тот же эффект. А именно, активность фермента в присутствии магнитного изотопа (^{25}Mg) была в 2,0–2,5 раза выше, чем активность того же фермента в присутствии немагнитного изотопа (^{24}Mg или ^{26}Mg) или в присутствии природной смеси изотопов магния. При этом не обнаружено существенных различий в

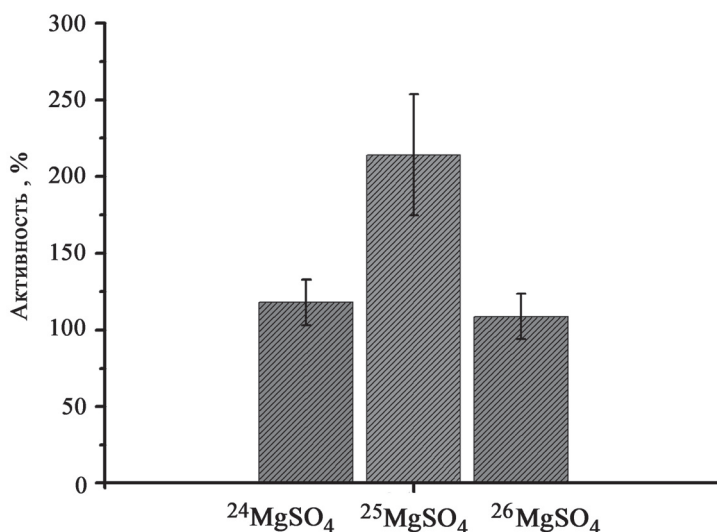


Рис. 3. АТФ-азная активность субфрагмента-1 миозина, изолированного из гладкой мышцы (миометрия) в реакционных растворах, содержащих различные изотопы магния, 5 мМ $^{24}\text{MgCl}_2$, $^{25}\text{MgCl}_2$ или $^{26}\text{MgCl}_2$. Величина активности приведена в процентах от активности фермента в растворе, содержащем 5 мМ MgCl_2 (природное содержание изотопов) [6]

активности в случае использования немагнитных изотопов ^{24}Mg и ^{26}Mg . Эффект наблюдается при физиологических концентрациях хлоридов магния (5 мМ). Важно отметить, что при спонтанном гидролизе АТФ, т.е. в отсутствие фермента, магнито-изотопный эффект не наблюдается [6].

Обсуждение результатов

В химии магнито-изотопный эффект (МИЭ) известен для многих элементов, имеющих магнитные и немагнитные изотопы, в том числе для углерода, кислорода, кремния, серы, германия, олова, ртути и урана [11–13]. 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. Этот эффект – прямое следствие закона сохранения момента импульса, фундаментального закона природы, который также строг, как и закон сохранения энергии. В данном случае речь идет о законе сохранения электронного углового момента (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, в том числе в макромолекулах [11–13].

Чтобы устранить запрет, наложенный законом сохранения спина, необходимо изменить спиновое состояние реагентов. Спиновая конверсия из

синглетного состояния в триплетное может быть обеспечена путем спин-решеточной релаксации, например, благодаря спин-орбитальным взаимодействиям в присутствии многоэлектронных парамагнитных ионов (типа $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$). Однако в органических радикалах спин-орбитальное взаимодействие слабое, и единственный метод обеспечения спиновой конверсии в отсутствие парамагнитных ионов – наложение магнитного поля (внешнее поле или поле ядерного спина атомного ядра). МИЭ – кинетический феномен, однозначно свидетельствующий о том, что в изучаемом процессе имеется спин-селективное «узкое место», и скорость процесса лимитируется спиновой эволюцией системы [12, 13].

Ион Mg^{2+} служит обязательным кофактором ферментативного гидролиза АТФ миозином. Однако в активном центре любой АТФ-гидролазы, в том числе миозина, в $[\text{ADP}^{3-} \text{Mg}^{2+}]$ и неорганический фосфат (P_i , $\text{H}_2\text{P}_i\text{O}_4^-$) гидролизуется комплекс $[\text{ATP}^{4-} \text{Mg}^{2+}]$, а не АТФ [7]. Обнаруженный магнито-изотопный эффект свидетельствует о том, что в кинетике ферментативного гидролиза АТФ, катализируемого миозином, имеется лимитирующая стадия, которая ускоряется ядерным спином изотопа ^{25}Mg . В химической физике свободнорадикальных реакций для объяснения МИЭ предполагается существование радикальной пары или ион-радикальной пары в качестве промежуточного продукта («узкого места»). Известно, однако, что реакция гидролиза АТФ с образованием ADP и P_i протекает по кис-

лотно-основному механизму, и возникновение какой-либо ион-радикальной пары в качестве интермедиата в этой реакции маловероятно. Действительно, МИЭ не наблюдается в экспериментах по неферментативному гидролизу комплексов АТР– Mg^{2+} [6].

Иная ситуация возникает в случае гидролиза АТР, катализируемого миозином. Давно известно (доказано экспериментально), что гидролиз АТР инициирует электронно-конформационные взаимодействия в активном центре фермента, в результате которых происходит изменение конформации макромолекулы фермента. Благодаря энергии, освобождаемой при гидролизе АТР (~0,54 еВ), имеет место конформационное возбуждение, по существу, деформация макромолекулы [14]. Согласно квантово-механическим расчетам молекулярной динамики, цикл генерации механического напряжения при каталитическом гидролизе АТР миозином состоит из нескольких стадий [15]. На первой стадии γ -фосфат АТР стабилизируется в состоянии диссоциированного метафосфата ($P_{\gamma}O_3^-$). Продукты гидролиза (ADP 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 АТР миозином. Реакция гидролиза АТР обратима до тех пор, пока белок остается в переходном состоянии конформационного напряжения (postrecovery-prepower stroke conformation) [15]. До тех пор, пока продукты гидролиза (ADP и P_i) остаются связанными миозином и в близком контакте, они могут снова образовать АТР. Можно предположить, что в условиях электронно-конформационного возбуждения макромолекулы миозина в активном центре фермента имеет место перенос электронной плотности на ADP^{3-} или Mg^{2+} от группы OH^- связанной молекулы воды или NH_2 -группы Glu459 с образованием соответствующей ион-радикальной пары. Затем следует нуклеофильная атака неорганического фосфата оксианионом с образованием АТР. Стабильное спиновое состояние продукта (АТР–Mg) должно быть синглетным, т.е. электронный спин $S = 0$. Между тем ядерный спин ^{25}Mg через сверхтонкое взаимодействие с неспаренным электроном ион-радикальной пары конвертирует эту пару, связанную миозином, в триплетное состояние ($S = 1$). Создавая этот спиновый запрет, ядерный спин изотопа ^{25}Mg затрудняет нежелательную обратную реакцию синтеза АТР, способствуя, таким образом, прямой реакции гидролиза АТР. Гипотеза о

ключевой роли виртуальной ион-радикальной пары в синтезе АТР при окислительном фосфорилировании была высказана около 50 лет тому назад [16]. Квантово-химические расчеты [13] свидетельствуют о возможности такого механизма при соответствующем времени спин-спиновой и спин-решеточной релаксации.

Каталитический эффект ядерного спина ^{25}Mg можно объяснить также следующим образом. Энергия, освобождаемая при гидролизе АТР (~0,54 еВ) недостаточно велика для электронно-конформационного возбуждения макромолекулы миозина в синглетное состояние. Этой энергии достаточно для получения низко лежащего триплетного состояния, но переход из основного состояния ($S = 0$) в триплетное состояние ($S = 1$) запрещен законом сохранения спина. Магнитный изотоп ^{25}Mg изменяет ситуацию. Ядерный спин ^{25}Mg устраняет проблему спинового запрета, обеспечивая необходимую спиновую конверсию в триплетное состояние [17]. Подобный механизм был предложен для объяснения влияния магнитных полей на подвижность дислокаций в твердом теле [18].

Рассмотрим еще одно возможное объяснение обнаруженного нами каталитического эффекта ядерного спина ^{25}Mg . При конформационном переходе изменяется положение многих атомных групп макромолекулы. При этом имеют место процессы дегидратации и регидратации электрически заряженных групп. Известно, что существуют два изомера молекул воды, различающиеся между собой по взаимной ориентации ядерных спинов водорода, а именно: *ortho*- H_2O с параллельной ориентацией протонных спинов и *para*- H_2O с антипараллельной ориентацией протонных спинов. Согласно квантовой статистике, при комнатной температуре *ortho*- H_2O составляет 75% от общего объема [19]. Имеются основания полагать, что по сравнению с молекулами *para*- H_2O молекулы *ortho*- H_2O имеют преимущественное сродство к L-аминокислотам [20]. Если так, то перемещение преимущественно связанных молекул *ortho*- H_2O при конформационных переходах макромолекулы затруднено. Спин-вращательные взаимодействия протонов слишком слабы, чтобы обеспечить должную эффективность *ortho/para*-переходов. Магнитный ^{25}Mg способен существенно улучшить ситуацию – устранить проблему спинового запрета, обеспечив необходимую скорость конверсии изомеров воды.

В биохимии МИЭ был впервые обнаружен в работах А.Л. Бучаченко и его сотрудников. В экспериментах с митохондриями, изолированными из сердца мышей, они обнаружили, что окислительное фосфорилирование идет с изотопом ^{25}Mg

в 2–3 раза эффективнее, чем с ^{24}Mg и ^{26}Mg [21]. Поскольку в природе преобладают немагнитные изотопы магния (78,7% ^{24}Mg и 11,17% ^{26}Mg), то для детектирования МИЭ авторам цитированной работы [21] пришлось сначала удалять из митохондрий природный магний комплексоном ЭГТА с последующим добавлением хлоридов нужного изотопа магния. При такой обработке избежать нежелательных структурно-функциональных изменений в митохондриях невозможно [22]. Аналогичные эффекты обнаружены при изучении ферментов креатинфосфаткиназы и фосфолицераткиназы: выход АТР оказался вдвое выше с магнитным ^{25}Mg , чем в аналогичных реакциях с немагнитными ^{24}Mg и ^{26}Mg (см. обзорные работы [12, 13]). Однако в аналогичных экспериментах с креатинфосфаткиназой британским ученым не удалось обнаружить МИЭ [23]. Российские авторы [13] обратили внимание на высокое содержание примеси железа в оксиде ^{25}MgO (2% от веса магния, который использовался британской группой). Изотопные препараты «Росатома», используемые в российских работах, имеют существенно более высокую степень очистки (в частности, они содержат в 200–1000 раз меньше примесей железа). Между тем в большой концентрации парамагнитные ионы железа, «не убивая» самого ион-радикального механизма синтеза АТР, элиминируют ядерно-спиновую селективность процесса, потому что в этом случае синглет-триплетная конверсия обеспечивается сильным спин-орбитальным взаимодействием, а не зеемановским сверхтонким взаимодействием электронного спина с ядерным. Следовательно, становится невозможным наблюдение эффектов магнитных изотопов или внешних магнитных полей [13].

Получены данные о магнитно-изотопных эффектах магния и цинка при изучении изолированной ДНК-полимеразы. В экспериментах с Mg- и Zn-зависимыми изолированными бета-полимеразами было обнаружено, что их фермен-

тативная активность ингибируется магнитными изотопами магния и цинка [24]. Известно, что для синтеза олигонуклеотидной цепи ДНК-полимеразы использует энергию АТР, выделяемую в сопряженной реакции гидролиза тринуклеотидов, катализируемой этим же ферментом [7]. Принимая во внимание обнаруженный недавно МИЭ ускорения гидролиза АТР миозином [6], можно предположить, что причиной замедления синтеза ДНК послужил кинетический дисбаланс, обусловленный влиянием ядерного спина магнитного изотопа на кинетику ферментативного гидролиза АТР.

В «молекулярных моторах», работающих на немагнитных изотопах магния, функцию спинового катализа могут выполнять ядерные спины фосфора (^{31}P) и протонов (^1H). Относительно высокая каталитическая активность ^{25}Mg , вероятно, обусловлена тем, что у ядра изотопа ^{25}Mg спин в 5 раз больше, чем у ядер водорода и фосфора, а также особенностями локализации иона Mg^{2+} в активном центре фермента, благодаря которым ядерный спин магния создает сравнительно большее локальное магнитное поле (константа сверхтонкого взаимодействия ~ 21 мТ). Изотоп ^{25}Mg оказался удачной «лампочкой» для «освещения» деталей химического механизма ферментативного катализа.

Таким образом, в настоящее время экспериментально доказано, что МИЭ имеют место не только в химии, но и в биологии. Детальное изучение физико-химических механизмов МИЭ в биокатализе (как и выяснение биологических механизмов усиления ядерного спинового катализа в живых клетках) – задача дальнейших исследований.

Статья подготовлена на основе доклада на международной конференции «Биокатализ-2015», Москва, 21–26 июня 2015 г.

Авторы глубоко признательны Е.С. Тарасевич-Лаухиной за неоценимую помощь при постановке первых экспериментов с изотопно-обогащенными клетками.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 14-04-00593а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grant D.M., Harris R.K. (Eds.). Encyclopedia of nuclear magnetic resonance. Chichester, Wiley, 1996.
2. Богатыренко Т.Н., Кудряшова Е.А., Туманова Л.В., Кольтовер В.К. Влияние различных изотопов магния на уровень активности супероксиддисмутазы при изучении кинетики роста *Escherichia coli*. // Сб. V междунар. конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине». СПб., 2009. С. 92.
3. Кольтовер В.К., Шевченко У.Г., Авдеева Л.В., Ройба Е.А., Бердинский В.Л., Кудряшова Е.А. Докл. АН. 2012. Т. 442. № 2. С. 272.
4. Koltover V., Kutlakhmedov Y., Grodzinsky D. // Mol. Biol. Cell. 2011. Vol. 22. P. 441.
5. Koltover V.K., Korolev V.G., Kutlakhmedov Y.A. Antioxidant prophylaxis of radiation stress / Ionizing Radiation: Applications, Sources and Biological Effects. N.Y., 2012. P. 117.
6. Кольтовер В.К., Лабынцева Р.Д., Карандашев В.К., Костерин С.О. // Биофизика. 2016. Т. 61. № 2 (в печати).
7. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. N.Y., 2008.

8. Гуськова Р.А., Виленчик М.М., Кольтовер В.К. // Биофизика. 1980. Т. 25. № 1. С. 102.
9. Bartha R, Ordal E.J. // J. Bact. 1965. Vol. 89. P. 1015.
10. Enoch K.G, Lester R.L. J. Bact. 1972. Vol. 110. P. 1032.
11. Зельдович Я.Б., Бучаченко А.Л., Франкевич Е.Л. // Усп. физ. наук. 1988. Т. 155. № 1. С. 3.
12. Бучаченко А.Л. Новая изотопия в химии и биохимии. М., 2007.
13. Buchachenko A.L. // J. Phys. Chem. B. 2013. Vol. 117. P. 2231.
14. Волькенштейн М.В. Общая биофизика. М., 1978. 592 с.
15. Kiani F.A., Fischer S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. Vol. 111. N 29. P. 2947.
16. Блюменфельд Л.А., Кольтовер В.К. // Мол. биол. 1972. Т. 6. № 1. С. 161.
17. Кольтовер В.К. // Изв. АН. Сер. хим. 2014. № 5. С. 1029.
18. Badylevich M.V., Kveder V.V., Orlov V.I., Ossipyan Yu.A. // Phys. Stat. Sol. (c). 2005. Vol. 2. N 6. P. 1869.
19. Tikhonov V.I., Volkov A.A. // Science. 2001. Vol. 296. P. 2363.
20. Scolnik Y, Portnaya I., Cogan U., Tal S., Haimovitz R., Fridkin M., Elitzur A.C., Deamer D.W., Shinitzky M. // Phys. Chemistry – Chem. Physics. 2006. Vol. N 3. P. 333.
21. Бучаченко А.Л., Кузнецов Д.А., Архангельский С.Б., Орлова М.А., Маркарян А.А., Бердиева А.Г., Хасизов П.З. // Докл. АН. 2004. Т. 396. С. 828.
22. Nohl H., Koltover V., Stolze K. // Free Radical Res. Com. 1993. Vol. 18. N 3. P. 127.
23. Crotty D., Silkstone G., Poddar S., Ranson R., Prina-Mello A., Wilson M.T., Coey J. M. D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2012. Vol. 109. P. 1437.
24. Buchachenko A.L., Orlov A.P., Kuznetsov D.A., Bre-slavskaya N.N. // Nucl. Acids Res. 2013. Vol. 41. N 17. P. 8300.

Поступила в редакцию 01.12.15

NUCLEAR SPIN CATALYSIS IN LIVING NATURE

L.V. Avdeeva, V.K. Koltover

(Institute of Problems of Chemical Physics)

In chemistry, there is the so-called magnetic isotope effect: the reactions show different rates and different yields of products according to whether the reagents contain magnetic or nonmagnetic isotopes. Our group has first performed the experiments with cells enriched with different stable isotopes of magnesium, magnetic ^{25}Mg versus nonmagnetic ^{24}Mg or ^{26}Mg . It was revealed that adaptation of bacteria *E. coli* to the growth media, enriched with magnetic ^{25}Mg , proceeds faster as compared to the growth media, enriched with nonmagnetic ^{24}Mg or ^{26}Mg . Furthermore, with another commonly accepted cell model, yeast *S. cerevisiae*, it was revealed that the rate constant of post-radiation recovery of the cells after UV irradiation is twice higher for the cells enriched with ^{25}Mg than for the cells enriched with the nonmagnetic isotope. In collaboration with Ukrainian colleagues from Palladin Institute of Biochemistry in Kiev, the effects of different isotopes of magnesium on ATP hydrolysis driven by myosin isolated from myometrium were studied. The enzyme activity has turned out to be 2.0–2.5 times higher in the reaction media enriched with ^{25}Mg as compared to the activity of the same enzyme in the reaction media enriched with the spinless ^{24}Mg or ^{26}Mg . Some possible mechanisms of the magnetic isotope effects (nuclear spin catalysis) in the biological objects are discussed.

Key words: biocatalysts, nuclear spin catalysis, stable isotopes, magnetic-isotope effect, reliability.

Сведения об авторах: Авдеева Лидия Владимировна – мл. науч. сотр. ИПХФ РАН, канд. хим. наук (tuman@cat.icp.ac.ru); Кольтовер Виталий Кимович – гл. науч. сотр. ИПХФ РАН, докт. биол. наук, канд. физ.-матем. наук (koltover@icp.ac.ru).