



УДК 544.34;544.45;544.47;577.15;577.34

В. К. Кольтовер, Р. Д. Лабынцева, А. А. Люлько,
В. К. Карандашев, член-корреспондент НАН Украины С. А. Костерин

Магнитный изотоп магния — ^{25}Mg ускоряет реакцию гидролиза АТФ миозином

Из трех стабильных изотопов магния — ^{24}Mg , ^{25}Mg и ^{26}Mg (природное соотношение приблизительно 79, 10 и 11% соответственно), только ^{25}Mg является магнитным изотопом (имеет ядерный спин $I = 5/2$), в то время как ^{24}Mg и ^{26}Mg — немагнитные изотопы (ядерный спин $I = 0$). Показано, что магнитный изотоп ^{25}Mg в сравнении с немагнитными изотопами ^{24}Mg и ^{26}Mg существенно активизирует (в 2–2,5 раза) реакцию ферментативного гидролиза АТФ миозином, полученным из гладкой мышцы матки. Каталитический эффект ядерного спина ^{25}Mg наблюдается при обычной физиологической концентрации MgCl_2 — 5 мМ. Таким образом, впервые получен документированный магнитный изотопный эффект в ферментативном катализе гидролиза АТФ миозином.

Атомы многих химических элементов, из которых построены биологические молекулы и клеточные структуры, имеют магнитные и немагнитные стабильные изотопы. В отличие от немагнитного изотопа, атомное ядро магнитного изотопа имеет ядерный спин, создающий магнитное поле. Например, из трех стабильных изотопов магния — ^{24}Mg , ^{25}Mg и ^{26}Mg , природное соотношение которых составляет приблизительно 79, 10 и 11%, ^{25}Mg является магнитным изотопом (ядерный спин $I = 5/2$), тогда как ^{24}Mg и ^{26}Mg — немагнитные изотопы (ядерный спин $I = 0$) [1]. Недавно было обнаружено, что магнитный и немагнитные изотопы Mg различаются по своему воздействию на живые клетки [2–5]. Так, оказалось, что клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, обогащенные магнитным изотопом ^{25}Mg , после облучения коротковолновым УФ светом восстанавливаются существенно эффективнее, чем клетки, обогащенные немагнитным изотопом ^{24}Mg [2, 3]. В экспериментах с другой общепринятой клеточной моделью — бактериями *Escherichia coli*, было установлено, что клетки, пересаженные в новую среду роста, существенно быстрее адаптируются к этой среде, если она содержит магнитный изотоп ^{25}Mg , по сравнению с адаптацией к среде, содержащей немагнитные изотопы ^{24}Mg или ^{26}Mg [4, 5]. Очевидно, что для ответа на вопрос, каким

образом магнитное поле атомного ядра влияет на жизнеспособность клетки, необходимы, в частности, эксперименты с изолированными ферментами.

Общеизвестно, что катион Mg (Mg^{2+}) — обязательный кофактор ферментов синтеза и гидролиза АТФ, он также выполняет регуляторные функции в случае других клеточных процессов [6]. Один из важнейших и наиболее изученных “молекулярных моторов” биоэнергетики — мышечный белок миозин. Этот фермент, осуществляя гидролиз концевой фосфатной связи в молекуле АТФ, использует освобождаемую энергию для осуществления мышечного сокращения, причем АТФазная активность миозина облигатно зависит от наличия ионов Mg [7], необходимых для связывания АТФ в активном центре фермента, а также играющих существенную роль в катализе гидролиза АТФ.

Мы изучили влияние катионов магнитного изотопа (^{25}Mg) и немагнитных изотопов (^{24}Mg , ^{26}Mg) магния на Mg^{2+} -зависимую АТФ-гидролазную активность каталитического фрагмента (субфрагмента-1) миозина, изолированного из миометрия, и впервые обнаружили магнитно-изотопный эффект в катализируемой им реакции гидролиза АТФ.

Биохимические исследования проводили в Институте биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины. Препарат субфрагмента-1 миозина получали из клеток гладкой мышцы матки свиньи по методике A. G. Weeds, R. S. Teylor [8] с модификациями, описанными в работе [9]. Субфрагмент-1 идентифицировали по молекулярной массе (около 100 тыс. кДа) [10], величине среднего гидродинамического диаметра (22 нм) (метод фотон-корреляционной спектроскопии с применением лазерного корреляционного спектрометра “Malvern Instruments “ZetaSizer-3” (Великобритания), оснащенного He-Ne лазером ЛГН-111 (мощность 25 мВт, $\lambda = 633$ нм) [11], удельная АТФ-гидролазная активность составляла 50–70 мкмоль P_i за 1 мин на 1 мг белка. АТФазную активность определяли при 37 °С в среде инкубации (объем 1 мл), содержащей (мМ): 20 трис-буфер (pH 7,2), 100 KCl, 0,01 $CaCl_2$, 5 $MgCl_2$, 4 АТФ; концентрация субфрагмента-1 миозина в среде инкубации составляла 20 мкг/мл, время инкубации — 1 мин. Контролем на неферментативный гидролиз АТФ служили пробы, содержавшие все компоненты среды инкубации, за исключением препарата ферментативного белка. Количество неорганического фосфата P_i , отщепленного от нуклеозидтрифосфата в ходе реакции гидролиза АТФ, определяли методом Fiske & Subbarow в модификации P. S. Chen [12]. Статистический анализ результатов проводили стандартными методами с помощью программного обеспечения “MS Office” и “Statistica 4.5”.

В экспериментах использовали оксиды магния ^{24}MgO , ^{25}MgO и ^{26}MgO с изотопным обогащением 99,8, 98,8 и 97,7 атом. % соответственно производства комбината “Электрохимприбор”, Россия. Из этих оксидов по стандартной методике были приготовлены растворы хлоридов магния $^{24}MgCl_2$, $^{25}MgCl_2$ и $^{26}MgCl_2$ в концентрации 100 мМ каждый. Элементный и изотопный состав растворов хлоридов магния и среды для определения АТФазной активности определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой с использованием квадрупольного масс-спектрометра X-7 (“Thermo Scientific”, США).

Результаты экспериментов по влиянию различных изотопов магния — магнитного изотопа ^{25}Mg и немагнитных изотопов ^{24}Mg и ^{26}Mg — на АТФазную активность субфрагмента-1 миозина миометрия представлены на рис. 1. Субфрагмент-1 миозина считается достаточной функциональной единицей миозина, поскольку в изолированном виде сохраняет все его нативные свойства, а именно — АТФазную активность и способность взаимодействовать с актином [7–10].

Были выполнены три серии независимых экспериментов с тремя препаратами фермента, выделенными в разное время из трех разных животных (общее количество экспери-

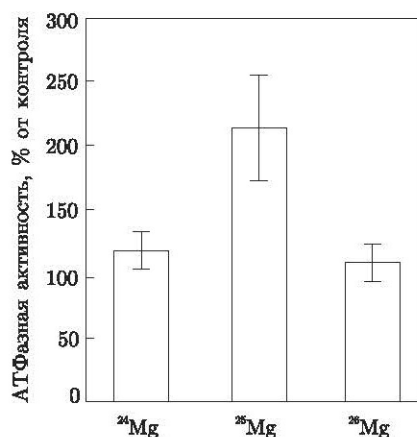


Рис. 1. АТФазная активность субфрагмента-1 миозина в присутствии различных изотопов магния (5 мМ $^{24}\text{MgCl}_2$, 5 мМ $^{25}\text{MgCl}_2$ или 5 мМ $^{26}\text{MgCl}_2$) ($M \pm m$, $n = 10$). За 100% принимали значение ферментативной активности в присутствии 5 мМ MgCl_2 природного изотопного состава, производства “Merck” (контроль). Отличия средних значений активности в опытах с ^{25}Mg (магнитный изотоп) по сравнению с полученными данными в опытах с ^{24}Mg и ^{26}Mg (немагнитные изотопы) и контролем статистически достоверны, $P < 0,01$

ментов $n = 10$). Несмотря на вариабельность средних значений АТФазной активности от одной экспериментальной серии к другой, во всех сериях наблюдались одни и те же изотопные эффекты. А именно, в каждой из независимых экспериментальных серий опытов активность фермента в присутствии магнитного изотопа ^{25}Mg оказалась в 2–2,5 раза выше, чем активность того же фермента в присутствии немагнитных изотопов ^{24}Mg и ^{26}Mg или обычной природной смеси изотопов магния. При этом не обнаружено существенных различий в АТФ-гидролазной активности в случае использования немагнитных изотопов ^{24}Mg и ^{26}Mg . Важно также подчеркнуть, что эффект наблюдается при стандартных, физиологических концентрациях хлоридов магния (5 мМ).

Можно было бы предположить, что причиной различий в АТФазной активности субфрагмента-1 миозина в присутствии магнитного изотопа ^{25}Mg и немагнитных изотопов ^{24}Mg и ^{26}Mg является различие в содержании примесей каких-либо посторонних элементов, поступающих с хлоридами разных изотопов магния в реакционную среду. Однако такого рода артефакты, вызванные примесями, мало вероятны. Согласно данным масс-спектрометрии, содержание примесей в базовых растворах хлорида магния не превышало одного микромоля на литр, а содержание таких элементов, как литий, бериллий, ванадий, хром, марганец, кобальт, молибден, ртуть, редкоземельные элементы и ураниты, не превышало нескольких наномолей на литр или было даже ниже порога определения (табл. 1). Из табл. 1 можно видеть также, что $^{25}\text{MgCl}_2$ и $^{26}\text{MgCl}_2$ содержат, например, одинаковые количества примеси свинца, тогда как $^{24}\text{MgCl}_2$ содержит этой примеси в 5 раз меньше. Между тем по влиянию на активность фермента изотопы ^{24}Mg и ^{26}Mg не отличаются один от другого, тогда как эффект ^{25}Mg вдвое больше, чем у немагнитных изотопов. По тем же причинам можно игнорировать и другие примеси. Более того, следует принять во внимание, что исходные (базовые) растворы хлорида магния, концентрации 100 мМ каждый, разбавлялись в 20 раз для получения конечной концентрации хлорида магния — 5 мМ, в среде инкубации для определения АТФазной активности. Соответственно, количество примесей, поступавших в эту среду с добавками изотопов магния, было существенно меньше, чем количество тех же примесей, поступавших в эту же среду из других реактивов. Так, например, согласно

Таблица 1. Элементный состав примесей в среде для определения АТФазной активности (данные масс-спектрометрии с использованием квадрупольного масс-спектрометра X-7 ("Thermo Scientific", США))

Элемент	Порог определения (ПО), мкг/л	Исходный раствор (до введения хлорида магния), мкг/л	Добавка из раствора		
			²⁴ MgCl ₂ , мкг/л	²⁵ MgCl ₂ , мкг/л	²⁶ MgCl ₂ , мкг/л
1	2	3	4	5	6
Li	0,009	0,67	0,0274	0,0258	0,0487
Be	0,002	<ПО	<ПО	0,0127	0,0088
B	1	12	4,5	7,0	5,3
Na	18	173000	9	25,4	49,2
Al	1	74	3,1	2,4	18,0
Si	46	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО
P	36	275000	<ПО	<ПО	<ПО
S	56	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО
K	19	6166000	<ПО	<ПО	12,8
Ca	14	12600	27,5	300	162
Sc	0,1	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО
Ti	1	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО
V	0,1	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО
Cr	1	64	<ПО	<ПО	<ПО
Mn	0,1	15	4,4	3,6	39
Fe	15	260	<ПО	<ПО	10,2
Co	0,1	<ПО	<ПО	<ПО	0,28
Ni	0,6	23	<ПО	0,36	<ПО
Cu	0,2	8	3,1	1,0	12,1
Zn	0,4	130	4,2	1,8	3,0
Ga	0,1	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО
Ge	0,1	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО
As	0,1	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО
Se	0,5	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО
Br	14	3500	<ПО	<ПО	<ПО
Rb	0,013	123	0,0203	0,0170	0,0204
Sr	0,1	30	0,32	1,6	0,29
Y	0,006	<ПО	<ПО	<ПО	0,0079
Zr	0,014	<ПО	0,0319	0,0484	0,856
Nb	0,008	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО
Mo	0,016	50,0	0,0532	0,0456	0,0284
Ru	0,011	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО
Rh	0,008	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО
Pd	0,012	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО
Ag	0,004	<ПО	0,0059	0,0073	0,0043
Cd	0,007	0,45	0,0433	1,03	0,414
In	0,002	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО
Sn	0,017	0,44	0,0569	0,0532	0,0587
Sb	0,007	0,48	0,0600	0,0467	0,0258
Te	0,008	<ПО	<ПО	<ПО	<ПО
Cs	0,001	0,033	<ПО	<ПО	<ПО
Ba	0,05	11	0,0009	0,0017	0,0145
La	0,004	<ПО	0,0050	<ПО	0,436
Ce	0,003	<ПО	0,0044	<ПО	0,0530
Pr	0,0005	<ПО	0,0005	<ПО	0,0037
Nd	0,002	<ПО	0,002	0,002	0,030
Sm	0,002	<ПО	0,002	<ПО	0,0150
Eu	0,0004	<ПО	<ПО	0,00085	0,189

скорость реакции. Соответственно, различаются скорости реакций радикалов, содержащих магнитные и немагнитные ядра (см., например, [13, 14]).

На первый взгляд, возникновение свободнорадикальной пары в качестве промежуточного продукта (“интермедиата”) в реакции гидролиза АТФ представляется маловероятным. Действительно, экзотермическая реакция гидролиза АТФ с образованием АДФ и неорганического фосфата в водном растворе идет по обычному кислотно-основному механизму. Иная ситуация, однако, возникает при ферментативном гидролизе АТФ. Фермент, будь то миозин, транспортная АТФаза, ДНК полимераза или иной “молекулярный мотор”, гидролизует не АТФ, но комплекс АТФ с ионом Mg^{2+} [7]. В активном центре миозина катион Mg координируется с боковыми цепями аминокислотных остатков Thr-186 и Ser-237 миозина, β - и γ -фосфатными группами молекулы АТФ (с образованием β, γ -бидентатного комплекса) и с активными молекулами воды, одна из которых осуществляет нуклеофильную атаку на γ -фосфат АТФ. Mg^{2+} вступает во взаимодействие с отрицательно заряженными фосфатными группами АТФ, поляризует их и, таким образом, облегчает нуклеофильную атаку на терминальный γ -фосфат [7–11]. Кроме того, в активном центре миозина имеются сульфгидрильные группы, при титровании которых гидролитическая активность фермента ингибируется [7].

Известно также, что при ферментативном гидролизе АТФ возникают электронно-конформационные взаимодействия и неравновесная возбужденная конформация макромолекулы [15]. Так как энергия, выделяющаяся при гидролизе молекулы АТФ, невелика ($\approx 0,54$ эВ), то эта возбужденная конформация характеризуется, по-видимому, низко лежащим триплетным состоянием. Можно предположить, что при электронно-конформационном возбуждении макромолекулы в активном центре фермента происходит перенос электронной спиновой плотности от электронно-донорной гидроксильной группы триптофана или серина либо сульфгидрильной группы миозина на комплекс Mg^{2+} –АТФ. Принимая во внимание известные факты, что титрование, например, сульфгидрильных групп приводит к ингибированию фермента [7], надо полагать, что возникновение ион-радикальной пары ведет к снижению гидролитической активности. Между тем спонтанная релаксация триплетного состояния (суммарный электронный спин $S = 1$) в основное синглетное состояние ($S = 0$) запрещена законом сохранения спина. Магнитное поле ядерного спина ^{25}Mg , воздействуя на электронный спин ион-радикальной пары, снимает спиновый запрет и, таким образом, ускоряет переход комплекса из триплетного состояния в основное синглетное. Благодаря этому освобождается “занятая” гидроксильная или сульфгидрильная группа и, соответственно, ускоряется реакция гидролиза АТФ. По сути дела, ядерный спин ускоряет подготовку фермента к приему и гидролизу следующей молекулы АТФ.

Таким образом, нами обнаружен магнитно-изотопный эффект Mg^{2+} (ядерный спиновый катализ) в реакции гидролиза АТФ, катализируемой миозином. Выяснение деталей механизмов ядерного спинового катализа в ферментативном гидролизе АТФ — задача дальнейших исследований.

1. *Encyclopedia of nuclear magnetic resonance* / Eds. D. M. Grant, R. K. Harris. — Chichester: Wiley, 1996. — Vol. 8. — P. 6490.
2. Гродзинский Д. М., Евстюхина Т. А., Кальтовер В. К. и др. Влияние магнитного изотопа магния-25 на пострадикационное восстановление клеток *Saccharomyces cerevisiae* // Доп. НАН України. — 2011. — № 12. — С. 153–157.

3. Koltover V. K., Korolev V. G., Kutlakhmedov Y. A. Antioxidant prophylaxis of radiation stress // Ionizing Radiation: Applications, Sources and Biological Effects / Eds. E. Belotserkovsky, Z. Ostaltsov. – New York: Nova Science Publishers, Inc., 2012. – P. 117–128.
4. Кольтовер В. К., Шевченко У. Г., Авдеева Л. В. и др. Магнитно-изотопный эффект магния в живой клетке // Докл. АН. – 2012. – **442**, № 2. – С. 272–274.
5. Кольтовер В. К. Ядерный спиновый катализ в нанореакторах живых клеток // Биофизика. – 2013. – **58**, № 2. – С. 257–263.
6. Romani A. M. P. Cellular magnesium homeostasis // Arch. Biochem. Biophys. – 2011. – **512**, No 1. – P. 1–23.
7. Страйер Л. Биохимия: В 3-х т. Т. 3. – Москва: Мир, 1985. – 400 с.
8. Weeds A. G., Taylor R. S. Separation of subfragment-1 isoenzymes from rabbit skeletal muscle myosin // Nature. – 1975. – **257**, No 1. – P. 54–56.
9. Лабинцева Р. Д., Бевза А. А., Бевза О. В., Черенок С. О., Кальченко В. І., Костерін С. О. Структурно-функціональні основи міжмолекулярної взаємодії калікс[4]арену C-97 із субфрагментом-1 міозину міометрія // Укр. біохім. журн. – 2012. – **84**, № 1. – С. 34–44.
10. Iwane A. H., Kitamura K., Tokunaga M. et al. Myosin subfragment – 1 fully equipped with factors essential for motor function // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1997. – **230**, No 1. – P. 46–80.
11. Burgess S. A., Yu S., Walker M. L. et al. Structures of smooth muscle myosin and heavy meromyosin in the folded, shutdown state // J. Mol. Biol. – 2007. – **372**, No 5. – P. 1165–1178.
12. Chen P. S., Toribara Jr. T. Y., Warner H. Microdetermination of phosphorus // Analyt. Chem. – 1956. – **28**, No 11. – P. 1756–1758.
13. Зельдович Я. Б., Бучаченко А. Л., Франкевич Е. Л. Магнитно-спиновые эффекты в химии и молекулярной физике // Успехи физ. наук. – 1988. – **155**, № 1. – С. 3–45.
14. Koltover V. K. Stable magnetic isotopes as a new trend in biomedicine // Biomedicine, Rijeka: InTech-Europe. – 2012. – С. 105–122. Available from: <http://www.intechopen.com/books/biomedicine>.
15. Волкенштейн М. В. Общая биофизика. – Москва: Наука, 1978. – 592 с.

Институт проблем химической физики РАН,
Черноголовка, Россия

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

Институт проблем технологии микроэлектроники
и особо чистых материалов РАН,
Черноголовка, Россия

Поступило в редакцию 18.07.2013

В. К. Кольтовер, Р. Д. Лабинцева, А. О. Люлько, В. К. Карандашев,
член-корреспондент НАН України С. О. Костерін

Магнітний ізоотоп магнію — ^{25}Mg прискорює реакцію гідролізу АТФ міозином

З трьох стабільних ізоотопів магнію — ^{24}Mg , ^{25}Mg та ^{26}Mg (природне співвідношення приблизно 79, 10 та 11% відповідно), тільки ^{25}Mg є магнітним ізоотопом (має ядерний спин $I = 5/2$), тоді як ^{24}Mg і ^{26}Mg — немагнітні ізоотопи (ядерний спин $I = 0$). Показано, що магнітний ізоотоп ^{25}Mg порівняно з немагнітними ізоотопами ^{24}Mg та ^{26}Mg істотно активує (в 2–2,5 раза) реакцію ензиматичного гідролізу АТФ міозином, одержаним з гладенького м'яза матки. Каталітичний ефект ядерного спіна ^{25}Mg спостерігається при звичайній фізіологічній концентрації MgCl_2 — 5 мМ. Таким чином, вперше одержано документований магнітний ізоотопний ефект у ферментативному каталізі гідролізу АТФ міозином.

V. K. Koltover, R. D. Labyntseva, A. A. Lul'ko, V. K. Karandashev,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine S. A. Kosterin

Magnetic isotope of magnesium ^{25}Mg accelerates the reaction of ATP hydrolysis catalyzed by myosin

Among three stable magnesium isotopes ^{24}Mg , ^{25}Mg , and ^{26}Mg with natural abundance 79, 10, and 11%, only ^{25}Mg has the nuclear spin ($I = 5/2$) and, therefore, the nuclear magnetic moment. Two other isotopes, ^{24}Mg and ^{26}Mg , are spinless ($I = 0$) and, hence, have no magnetic moment. In this work, we have revealed that magnetic isotope ^{25}Mg , by comparison to nonmagnetic isotopes ^{24}Mg and ^{26}Mg , essentially stimulates, by 2–2.5 times, the enzyme ATP hydrolysis reaction catalyzed by myosin isolated from smooth muscles of uterus. The catalytic effect of the nuclear spin of ^{25}Mg has been observed at the usual physiological concentrations of MgCl_2 , at 5 mM. Thus, we have, for the first time, documented the magnetic isotope effect in the enzyme hydrolysis of ATP by myosin.