

УДК 577.152.3

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ИЗОТОПИИ МАГНИЕВОГО ПУЛА НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО СИНТЕЗА АТР, ПОДАВЛЕННОГО 1-МЕТИЛНИКОТИНАМИДОМ

Д.А. Кузнецов¹, Р.Н. Аляутдин², А.А. Маркарян², А.Г. Бердиева², П.З. Хасигов²,
Т.М. Гатагонова², С.А. Кцоева², М.А. Орлова³

¹Институт химической физики РАН им. Н.Н. Семенова, Москва

²Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова, Москва

³Химический факультет МГУ им М.В.Ломоносова, 119899, Москва,
Ленинские горы, 1, стр. 10; тел./факс (495) 939-31-87, тел. (495) 939-32-14;
эл. почта: orlova@radio.chem.msu.ru

АТР-генерирующая активность митохондрий и митохондриальной креатинкиназы (КК) исследована как функция изотопии магниевого пула инкубационной среды. В работе использованы системы *in vitro*, содержащие препараты изолированных митохондрий и фермента из миокарда крыс, получавших однократную инъекцию 1/2DL₅₀ 1-метилникотинамида (МНА).

Показано, что присутствие парамагнитных катионов изотопа ²⁵Mg ведет к значительной компенсации внутримитохондриального дефицита АТР, вызванного подавлением окислительного фосфорилирования с помощью МНА. Этот эффект практически недостижим в системах, магниевый пул которых представлен изотопами с нулевым ядерным спином (²⁴Mg, ²⁶Mg).

Восстановление митохондриального синтеза АТР в условиях МНА – индуцированного ингибирования NAD (NADP)-зависимых реакций осуществляется при участии КК, активность которой не подавляется МНА. Высокая эффективность восстановления этого процесса представляет собой спин-селективный феномен и достигается, в основном, в присутствии катионов ²⁵Mg²⁺.

Ключевые слова: митохондрии миокарда, креатинкиназа (КК), ²⁵Mg, 1- метилникотинамид (МНА)

ВВЕДЕНИЕ. 1–Метилникотинамид (МНА) - синтетический аналог предшественника нуклеотидных кофакторов ряда оксидоредуктаз - способен замещать молекулы никотинамида в реакциях формирования NAD и NADP *in vivo*. Это ведет к избирательному подавлению окислительного фосфорилирования в митохондриях, обусловленному абортивным транспортом электронов по цепи ферментов “тканевого дыхания”, включающей NAD- и NADP-зависимые дегидрогеназы [1, 2]. Данная особенность ингибитора позволяет рассматривать его как эффективный инструмент исследования резервных, т.е. не связанных с функционированием электрон-транспортных цепей, механизмов синтеза АТР [3]. Одним из таких механизмов служит регенерация АТР, обеспечиваемая митохондриальной и цитоплазматической креатинкиназами [1-3].

Это семейство ферментов (КФ 2.7.3.2.) осуществляет обратимый перенос фосфата с креатинфосфата на ADP; нуклеотид–связывающие сайты всех известных креатинкиназ содержат ион магния, присутствие которого в реакционной среде необходимо для нормальной каталитической активности [4]. Естественный пул изотопов магния представлен тремя стабильными ядрами – ²⁴Mg, ²⁵Mg и ²⁶Mg, из которых только ²⁵Mg обладает парамагнитными свойствами

благодаря некомпенсированному ядерному спину (спин $+5/2$, ядерный магнитный момент 0,85, распространение в природе 10%). Из этого следует, что влияние катионов $^{25}\text{Mg}^{2+}$ на активность креатинкиназы и, соответственно, на митохондриальный синтез АТФ, может отличаться от аналогичных эффектов $^{24}\text{Mg}^{2+}$ и $^{26}\text{Mg}^{2+}$ в том случае, если регуляция каталитической функции фермента включает магнитный изотопный эффект, т.е. спин-селективный характер вовлечения катиона – активатора во взаимодействие участников креатинкиназной реакции [5].

Использование МНА могло бы помочь в выяснении возможной роли изотопии пула магния и составляющих его изотопов в восстановлении угнетенной АТФ–генерирующей деятельности митохондрий. Попытки стимулировать сниженную интенсивность работы митохондрий миокарда при острых ишемических состояниях и после значительных физических нагрузок с помощью аспартата магния продемонстрировали 20-25%-ную коррекцию индекса АТФ/АДФ в ткани сердечной мышцы кролика [3]. Это, а также все сказанное выше, делает интересным поиск ответа на вопрос о том, зависит ли АТФ-генерирующая функция митохондрий миокарда в условиях фармакологического подавления окислительного фосфорилирования от парамагнитных свойств катионов магния – иначе говоря от определяющего магнитный изотопный эффект изотопа ^{25}Mg . Задача такого поиска и была поставлена нами в настоящей работе.

МЕТОДИКА. В работе были использованы 3-месячные крысы-самцы линии SHR весом 180-200 г, содержащиеся на стандартной диете и голодавшие в течение суток перед экспериментом. В каждом опыте использовали сердца 8 животных.

Препараты MgCl_2 , включавшие один из изотопов Mg 99,99% чистоты, были получены методом рутинной кислотной обработки образцов ^{24}MgO , ^{25}MgO и ^{26}MgO (Центр изотопных исследований РАН, Обнинск). Все компоненты буферных систем, в т.ч. MgCl_2 немодифицированного изотопного состава, соответствовали аналитической степени чистоты (“Serva Heidelberg”, Германия). Кристаллический (3х) 1-метилникотинамид (МНА), произведенный лабораторией “Upstate Biotechnologies” (USA), предоставлен проф. Л. Де Сотта (Университет “La Sapienza”, Рим, Италия). Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) был получен от “Bio Rad” (США).

МНА растворяли в физиологическом растворе и вводили животным внутрибрюшинно в дозе 200 мг/кг ($1/2\text{DL}_{50}$) и забивали декапитацией через 8 часов после инъекции. Животные контрольной группы получали инъекцию чистого физраствора.

Выделение митохондрий миокарда проводили с использованием дифференциального центрифугирования обработанного трипсином гомогената [6]. Осадки митохондрий промывали 5 раз 10-кратным избытком 0,25 М сахарозы для удаления возможной примеси цитоплазматической креатинкиназы. Окончательные осадки митохондрий суспендировали в 10 мл гомогенизационного буфера, содержащего 10 мМ HEPES (pH 7,40), 0,3 М сахарозу, 0,2 мМ ЭДТА, 1мг/мл ЧСА и разделяли на две порции: первую (А) использовали затем для определения параметров окислительного фосфорилирования в изолированных митохондриях, вторую (В) - для анализа активности митохондриальной креатинкиназы.

Суспензию А хранили при 0°C не более 4 часов перед экспериментом.

Суспензию В (20 мг белка/мл) разводили в 3 раза охлажденной бидистиллированной водой и полученный лизат центрифугировали при 12000 g в течение 50 мин, при +4°C [7]. Осадки отбрасывали, супернатанты отбирали и сразу же использовали для определения активности креатинкиназы.

Определение общего количества белка митохондрий проводили с помощью биуретового метода Gornall и соавт. [8]. Содержание магния в растворах определяли методом атомной адсорбционной спектрофотометрии [9] с использованием системы Farr Spec LQ400 (“Farrand Optical”, США).

Суммарную скорость окислительного фосфорилирования определяли по модифицированной методике Sobol и соавторов [10], используя для инкубации

митохондрий среду следующего состава: 0,25 М сахараза, 10 мМ трис (pH 6,00), 5 мМ фосфат калия, 0,15 мМ ЭДТА, 20 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂ (немодифицированного изотопного состава по магнию либо препарат, содержащий только один из стабильных изотопов Mg - см. выше), 12,5 мМ креатинфосфат, 2,5 М глутамат, 2 мМ малат. В пробы объемом 1,5 мл добавляли по 1,5 мг белка митохондрий и начинали инкубацию (37°C) при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке в течение 3 мин. Затем реакцию инициировали добавлением ADP и АТР до конечных концентраций 1,2 мМ и 0,15 мМ соответственно. Образцы инкубировали при 37°C в течение 20 мин при интенсивном перемешивании. Реакцию остановили добавлением холодной HClO₄ до конечной концентрации 7%. Осадки белка отделяли центрифугированием на холоде при 8000 об/мин, 10 мин. Супернатанты собирали, нейтрализовали титрованием 6 М K₂CO₃ в присутствии бромтимолового синего, замораживали при -20°C и далее определяли в них содержание ADP и АТР методом ЖХВД в обращенной фазе (сорбент S5CN-ODS: 10-65% линейный градиент пиридина; 25°C; колонка Altex 2000; 1800 p.s.i.; Compaq 680 ES HPLC Auto Analytic System) как это описано нами ранее [11]. При этом рассчитывали величины индексов ADP/АТР, принимая во внимание ранее установленный факт неизменности внутримитохондриального пула ADP при переходе митохондрий от состояния покоя к активному окислительному фосфорилированию [12-14]. Целостность изолированных митохондрий в суспензии А контролировали с помощью растровой электронной микроскопии [12].

Активность митохондриальной креатинкиназы определяли в суспензии В путем хроматографической (ЖХВД) оценки [11] количества меченного [γ -³²P]АТР, образованного за 1 минуту (30°C) в оптимальных условиях [15, 16] инкубации с [³²P]креатинфосфатом (160-180 мКи/ммоль, "New England Nuclear", США) в среде трис-HCl (pH 6,35), 20 мМ MgCl₂, 12,5 мМ АТР, 80 мкг белка, 15 мМ фосфат калия, 160 мМ [³²P]креатинфосфат, 160 мМ ADP при общей продолжительности инкубации 30 мин [15, 16]. Препарат белка, вносимый в данном случае в инкубационную смесь, представлял собой водный раствор ацетонового осадка, полученного из лизата митохондрий (В), фракционированного предварительно сульфатом аммония (40-70% насыщения) [12, 15]. Одновременно с ЖХВД-определением количества АТР оценивали соотношение площадей хроматографических пиков метилированного (S') и интактного (S) NAD [11], S'/S, с помощью анализатора хроматограмм Shimadzu Planigraph PLS – 90E [11, 16].

Статистической обработке подвергали результаты восьми измерений. Величины стандартных квадратичных отклонений от средневзвешенных значений и достоверность различий значений "контроль-опыт" определяли непараметрическим методом Даннета по версии для n≤8 [17] с помощью процессинга программы Bio Quart 6M – 800 [17] (Sigma Database Treatment Software DTS'2001, Sigma, США) в аналитическом блоке HP600/RX7 ("Hewlett Packard", США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Воздействие сверхслабых внешних магнитных полей на каталитическую активность ферментов наиболее выражено тогда, когда активные центры последних содержат координированные атомы (ионы) металлов [18, 19]. Предполагается, что в этих случаях сверхслабые электромагнитные излучения резонансно взаимодействуют с широким спектром парамагнетиков, включая фрагменты субстрат-связывающих структур в ферментных белках [19, 20]. Поскольку парамагнитные свойства атомов, целых молекул и их фрагментов прямо зависят от их спинового состояния, нельзя исключить и влияния на работу ферментов со стороны внутримолекулярных магнитных полей, локальными (точечными) источниками которых могут служить, в частности, изотопы металлов с некомпенсированным ядерным спином. Такое влияние означало бы вклад магнитного изотопного эффекта, т.е. спин-селективного контроля активности [5], в формирование механизма биокатализа. Подобная возможность уже убедительно продемонстрирована в экспериментах на

ДЕЙСТВИЕ МАГНИЯ НА СИНТЕЗ АТФ

простых химических системах, различающихся по спиновым характеристикам компонентов и их изотопии [5, 21-24].

Одним из способов подтвердить или опровергнуть существование такой возможности для биосистем является исследование их функционирования *in vitro* в присутствии катионов-активаторов, различающихся исключительно по ядерному спину. В качестве объектов такого исследования нами были выбраны изолированные митохондрии миокарда, многие из ферментов которых являются Mg^{2+} -зависимыми (пермеазы, протеинкиназы, креатинкиназа, эстеразы L-аминокислот и др.), а также креатинкиназа (КК) этих митохондрий – фермент субстратного фосфорилирования АДФ, содержащий Mg^{2+} в составе нуклеотид-связывающего сайта [4, 7, 12]. АТФ-генерирующую активность митохондрий и КК мы оценивали как вероятную функцию изотопии магниевого пула инкубационной среды (см. раздел “Методика”).

Из наших данных (табл.) видно, что насыщение митохондриального фонда свободных нуклеотидов метилированными производными NAD, наступающее как результат введения МНА (S'/S), приводит к ожидаемому [1-3] подавлению скорости синтеза АТФ.

Таблица. Влияние стабильных изотопов магния на синтез АТФ митохондриями и митохондриальной креатинкиназой миокарда крыс, подвергнутых однократному воздействию 0,5 DL₅₀ 1-метилникотинамида.

Инкубационная смесь		S'/S	АТФ/АДФ	Скорость синтеза АТФ	
				Изолированные митохондрии, нмоль АТФ/мин/мг белка	Митохондриальная креатинкиназа, имп [^{32}P]АТФ/мин/мг белка $\times 10^{-3}$
контроль	^{24}Mg	-	60 \pm 7	497 \pm 32	8,8 \pm 0,06
	^{25}Mg	-	156 \pm 11	979 \pm 38	21,9 \pm 0,10
	^{26}Mg	-	68 \pm 9	510 \pm 29	9,3 \pm 0,06
	*Mg	-	92 \pm 8	668 \pm 34	13,8 \pm 0,08
	Mg не добавлен	-	24 \pm 5	227 \pm 16	Не определяется
опыт	^{24}Mg	18,8 \pm 2,6	40 \pm 6	42 \pm 6	9,1 \pm 0,07
	^{25}Mg	19,1 \pm 2,4	54 \pm 7	216 \pm 18	20,1 \pm 0,09
	^{26}Mg	18,9 \pm 2,5	42 \pm 6	54 \pm 8	8,9 \pm 0,07
	*Mg	18,8 \pm 2,4	39 \pm 5	47 \pm 6	12,6 \pm 0,07
	Mg не добавлен	18,9 \pm 2,6	26 \pm 4	22 \pm 5	Не определяется

Примечания: контроль – митохондрии миокарда интактных животных; опыт - митохондрии миокарда животных, получивших инъекцию МНА.

S'/S , АТФ/АДФ – параметры внутримитохондриального гомеостаза.

*Mg – естественный пул изотопов магния.

В аликвотах каждого из образцов, инкубировавшихся при 4°C, значения скорости синтеза АТФ не отличались от фоновых.

При этом его частичное восстановление достигается лишь в случае инкубации митохондрий с парамагнитными катионами $^{25}Mg^{2+}$. Ионы магния с нулевым спином ($^{24}Mg^{2+}$ и $^{26}Mg^{2+}$) практически не оказывают влияния на образование АТФ в митохондриях в условиях ингибирования NAD(P)-зависимого окислительного фосфорилирования, в то время как активирующее воздействие

этих же ионов на синтез АТФ в митохондриях интактных животных хорошо выражено, хотя и заметно ниже, чем аналогичный эффект $^{25}\text{Mg}^{2+}$. Никаких достоверных различий ($p > 0,05$) между величинами активности КК из митохондрий животных контрольной и подопытной групп не установлено; активирующий эффект парамагнитных $^{24}\text{Mg}^{2+}$ и $^{26}\text{Mg}^{2+}$ во всех случаях был примерно одинаков и почти вдвое меньшим, чем амплитуда активации, достигаемой парамагнитным $^{25}\text{Mg}^{2+}$.

Таким образом, дефицит АТФ, вызванный избирательным подавлением окислительного фосфорилирования, может быть в значительной мере компенсирован активацией синтеза АТФ по пути субстратного (ADP + креатинфосфат) фосфорилирования, обеспечиваемого митохондриальными трансферазами, особая роль среди которых принадлежат, по-видимому [7, 10, 25], КК, активность которой не зависит от присутствия антиметаболитов никотинамида (табл.). Данный путь реактивации образования АТФ является не только Mg^{2+} -зависимым, но и спин-селективным, что видно из явных (для всех исследованных случаев $p > 0,05$) различий между величинами амплитуд активации, зарегистрированных для парамагнитных ($^{25}\text{Mg}^{2+}$) и непарамагнитных ($^{24}\text{Mg}^{2+}$, $^{26}\text{Mg}^{2+}$) катионов (табл.). Этот вывод представляется нам обоснованным, помимо прочего, и в связи с тем, что применявшиеся нами концентрации хлорида магния известны как оптимальные для обеспечения "дыхания" изолированных митохондрий и АТФ-генерирующей ($\text{pH} < 7,0$) [11, 12] активности КК [12-15].

Необходимо отметить, что особо выраженный активирующий эффект изотопа ^{25}Mg в отношении ферментных систем был обнаружен впервые в экспериментах по изучению ассимиляции $^{12}\text{CO}_2$ и $^{13}\text{CO}_2$ с участием Mg^{2+} -зависимой рибулозо-5-бис-фосфат-карбоксилазы/оксидазы (RuBisCo) из листьев шпината [24]. До настоящего времени это описание спин-селективной регуляции функции фермента, содержащего Mg^{2+} в активном центре, оставалось единственным.

Соотношение величин активирующих эффектов, индуцированных исследованными изотопами магния и препаратами, содержащими естественный пул этих изотопов (табл.), говорит об отсутствии препятствий проникновению катионов внутрь митохондрий [12], возникающих иногда при несоблюдении оптимальных условий их выделения и инкубации [1, 3, 25].

Результаты данной работы могут помочь в разработке новых подходов к пониманию природы непредсказуемых нелинейных биологических процессов – таких как горметические формы дозовых зависимостей (hormetic models – см. [26-27]) в радиобиологии, фармакологии, токсикологии – т.е. процессов, характеризующихся противоположной направленностью эффектов малых (сверхмалых) и всех прочих доз фермент-модулирующих воздействий [2, 12, 26-28]. Так, парадоксальная активация митохондриальной трансляции в мозге мышей, получавших сверхмалые дозы метилртути, описанная нами ранее [27] и отвечающая основным критериям горметической модели [26], возможно, связана со спин-селективными эффектами минорных изотопов ^{199}Hg и ^{201}Hg . Активирующее воздействие малых концентраций этих парамагнитных ядер в отношении креатинкиназы яда *Vipera xanthia* было обнаружено недавно как горметический феномен, не проявляющийся при тестировании непарамагнитных изотопов ^{200}Hg и ^{202}Hg [28]. Это, равно как и данные, представленные в таблице, позволяет надеяться на серьезное углубление современных представлений о механизмах регуляции ферментативного катализа в ходе дальнейших исследований спин-селективных биохимических реакций.

Попытка создания теоретической модели, объясняющей механизм изменений функциональных состояний глобулярных белков, наступающих вследствие изотопных замещений внутри доменов, отвечающих за взаимодействие с молекулами среды, предпринята недавно в работе [29]. По мнению её авторов, однако, очевидный недостаток экспериментального материала резко ограничивает

прогностические возможности модели. Восполнению этого пробела и служит программа, в рамках которой была осуществлена наша работа [24-28].

Предварительный характер полученных нами результатов и спин-селективность описанных здесь Mg^{2+} -зависимых эффектов диктуют необходимость продолжения исследований роли изотопии в регуляции функций биологических молекул.

Авторы выражают глубокую признательность академику РАН А.Л. Бучаченко (ИХФ РАН, Москва) за постоянный интерес к работе и ценные замечания, сделанные при обсуждении ее результатов.

Работа проведена при финансовой поддержке Fondazione Cesare Alba (United European Centre for Biomedical Research, Varese, Italy), грант № SQ40081194-A/02-03.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Okada O., Telashima S., Satoh M., Namura S., Matsushita I.* (2000) J. Japan Pharm. Soc., **58**, 211-219.
2. *Velaidi A.* (2003) Antimetabolites in mitochondrial function studies. In: *Toxic Agents in Biomedical Research* (Sanai, R. & Amirkanian, T, Eds.) pp. 44-60, Guilan Press: Rasht-Tehran.
3. *Hranic G., Milutinovic Z.* (2002) *Acta Biol. Med. Slovenica*, **8**, 601-608.
4. *Mahajan V.B., Pai K.S., Lau A., Cunningham, D.D.* (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**, 12062-12067.
5. *Buchachenko A.L.* (2001) J. Phys. Chem., **A105**, 9995-10011.
6. *Jacobus W.E., Saks A.* (1982) Arch. Biochem. Biophys., **219**, 167-178.
7. *Belousova L.A., Lipskaya T.Y., Temple V.D., Rostovtsev A.P.* (1983) In: *Advances in Myocardiology* (Chazov E.I., Smirnov V.N., Dhalla T.S., eds.) Vol. 3, pp. 585-595, University Park Press: Baltimore.
8. *Gornall A.G., Bardawill C.L., David M.M.* (1949) J. Biol.Chem., **177**, 751-766.
9. *Moudy J.S., Barthelrough T.D.* (1986) J. Pharm. Chem., **19**, 610-618.
10. *Sobol S., Conrad A., Hebisch S.* (1994) Mol. Cell. Biochem., **133/134**, 105-113.
11. *Kouznetsov D.A., Govorkov A.V., Zavijalov N.V., Sabileva T.M., Richter V., Drawczek J.A.* (1986) J. Biochem. Biophys. Methods, **13**, 53-56.
12. *Sieliwanowicz B., Skrob L., Mlody A.* (1990) In: *Mitochondria* (Novotny R. and Bolek K., eds.) pp. 109-132, Jagellonski University Press: Krakow.
13. *Sobol S., Konrad A., Keller M., Hebisch S.* (1992) Biochim. Biophys Acta, **1100**, 27-32.
14. *Davis E.J., Lumerg L.* (1975) J. Biol. Chem., **250**, 2275-2282.
15. *Кузнецов Д.А., Орлова М.А., Бердиева А.Г., Хасигов П.З.* (2003) Биомед. химия, **49**, 213-218.
16. *Lowenhaupt K., Troll S.J., Ornelli T., Moulin-Rochas D., Kouznetsov, D.A.* (2003) Canad. J. Gen. Pathol., **38**, 1008-1017.
17. *Sarcar L.S., Lemke T.* (1980) Biostatistics. Alba Regia: Szeged-Budapest.
18. *Grissom C.B.* (1995) Chem. Rev., **95**, 3-24.
19. *Алкоев И.Г., Пащовкина М.С., Долгачева Л.П., Семенова Т.П., Калмыков ВЛ.* (2002) Радиц. биол. радиоэкол., **42**, 322-330.
20. *Lottrell O.J., Thaler S., O'Neal D.* (2003) Mol. Cell. Pathol., **18**, 441-456.
21. *Hummel K., Martle K., Martle M.G.* (1989) J. Mol. Catal., **54**, L1.
22. *Buchachenko A.L.* (1984) Progr. React. Kinet., **13**, 164-178.
23. *Buchachenko A.L.* (1993) Russ. Chem. Rev., **62**, 1073-1082.
24. *Ivanov A.A.* (2002) *Biofractionation of Carbone Isotopes and Photosynthesis*. Turin Polytechnical University Press: Turin-Varese-Milan.
25. *Липская Т.Ю., Савченко М.С.* (2003) Биохимия, **68**, 82-95.
26. *Calobrese E.J., Baldwin L.A.* (2003) Nature, **421**, 691-693.

27. Kousnetsov D.A. (1986) *Neurochem. Res.*, **12**, 751-754.
28. Buchachenko A.L, Kousnetsov D.A., Shishkov A.V. (2004) *J. Phys. Chem.*, **108**, 707-710.
29. Schlichte, J., Fredrich J., Parbel M., Scheer H. (2001) *J. Chem. Phys.*, **114**, 9638-9644.

Поступила: 15. 08. 2003.

**THE EFFECT OF MAGNESIUM POOL ISOTOPY ON REACTIVATION OF
MITOCHONDRIAL ATP SYNTHESIS SUPPRESSED BY 1-METHYL-NICOTINE AMIDE**

**D.A. Kouznetsov¹, R.N. Alyautdin², A.A. Markaryan², A.G. Berdieva², P.Z. Khasigov²,
T.M. Gatagonova², S.A. Ktsoeva², M.A. Orlova³**

¹N.N. Semenov Institute for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia.

²I.M. Sechenov Moscow Medical Academy, Moscow, Russia.

³School of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1, bld. 10,
Moscow, 119899 Russia; tel.: (495) 939-31-87, tel. (495) 939-32-14; e-mail: orlova@radio.chem.msu.ru

The ATP – generating activity of both rat myocardial mitochondria and intramitochondrial creatine phosphokinase (CPK) was examined as a function of the incubation medium magnesium pool isotopy. The *in vitro* systems tested were prepared from the hearts of animals treated with single injection of 1-methyl-nicotine amide (MNA) suppressing the NAD(P)-dependent reactions *in vivo*.

The presense of the ²⁵Mg paramagnetic cations leads to essential compensation of intramitochondrial ATP deficiency caused by the MNA induced blockade of oxidative phosphorylation. This effect is merely unreachable in those systems where the magnesium pool consists of isotopes with a zero nuclear spin (²⁴Mg, ²⁶Mg).

The reactivation of mitochondrial ATP synthesis described here involves CPK activity which does not depends on MNA. In this case, a high efficiency of this reactivation seems to be a spin selective phenomenon which requires, predominantly, ²⁵Mg²⁺ cations.

Key words: myocardial mitochondria, creatine kinase (CK), ²⁵Mg, 1-methyl-nicotine amide (MNA).