

ДИСКУССИЯ

К ВОПРОСУ О БИОЛОГИЧЕСКОМ ФРАКЦИОНИРОВАНИИ ИЗОТОПОВ

ГАЛИМОВ Э. М.

Этой статьей я хотел бы обратить внимание на неубедительность представлений о биологическом фракционировании изотопов, развиваемых в ряде работ А. А. Ивлева с соавторами [1—11]. Эти работы не содержат новых экспериментальных фактов. Они основаны исключительно на интерпретации известных литературных данных.

Исходная позиция А. А. Ивлева с соавторами состоит в предположении, что все изотопные эффекты, наблюдаемые в живых организмах, обусловлены одной причиной — кинетическими изотопными эффектами при декарбоксилировании пирувата на стадии дыхания. Вот пример соответствующей формулировки: «Все наблюдаемые в фотосинтезирующих организмах изотопные эффекты (курсив мой — Э. Г.), проявляющие разные стороны метаболизма — ассимиляцию, дыхание, биосинтез. — взаимно обусловлены и объясняются на основе предлагаемого механизма.» ([1], стр. 104).

Модель Парка и Эпстайна [12], в соответствии с которой основное фракционирование изотопов углерода происходит на стадии фотосинтеза, А. А. Ивлевым и соавторами была сочтена ошибочной. Указывалось, в частности, что «данные по определению изотопного состава углерода карбоксильных групп не очень надежны.» ([1], стр. 87). Аналогичным образом были поставлены под сомнение выводы Абельсона и Хоеринга [13], выполнивших экспериментальное исследование изотопного состава биогенных аминокислот и пришедших к выводу о ведущей роли фракционирования изотопов при фотосинтезе. По мнению А. А. Ивлева с соавторами: «...в данном случае согласованность теоретических представлений и экспериментальных данных лишь кажущаяся.» ([1], стр. 88)

А. А. Ивлев с соавторами подчеркивают: «В отличие от других исследователей, объяснявших изотопный состав организмов селективной ассимиляцией легкого углерода при фотосинтезе, мы связываем его с процессом дыхания.» ([3], стр. 156).

Доказательству этого положения посвящена серия работ А. А. Ивлева с соавторами [1—5] и другие. В основе доказательств, при помощи которых якобы установлено, что в цикле Кальвина изотопные эффекты возникнут не могут» ([5], стр. 436) лежали рассуждения, опирающиеся на неправомерное отождествление изотопных эффектов с поведением изотопной метки и неправильная оценка кинетического изотопного эффекта при карбоксилировании рибулозодифосфата. Принципиальная ошибочность подхода А. А. Ивлева и С. Э. Шноля к интерпретации изотопных эффектов была показана нами в ответе [14] на их критическую статью [15]. Тем не менее, они продолжали публиковать работы, в которых по-прежнему все биологическое фракционирование рассматривалось как результат разделения изотопов при декарбоксилировании пирувата.

В первых работах А. А. Ивлев с соавторами не пытались оценить, получается ли действительное количественное соответствие между наблюдаемым в организмах распределением изотопов углерода и моделью фракционирования, в основе которой лежал бы постулированный механизм. Лишь в 1982 году А. А. Ивлев, Д. А. Князев и А. Г. Калошин рассмотрели предлагаемую ими схему количественно [6], однако, представленный в ней анализ выполнен некорректно. Например, утверждается, с одной стороны, что C_2 -фрагменты в эквимолярных соотношениях с C_3 -фрагментами поступают в цикл Кребса (стр. 676), с другой — поток $\Delta L_2'$ (представляющий по схеме поток C_2 -фрагментов в цикле Кребса) приравняется нулю. Ясно, что для оценки изотопного состава биомассы в целом и в отдельных фракциях, необходимо учесть материальный баланс, т. е. учесть количественное соотношение липидов, белков и углеводов в модели. Вместо этого авторы оценивают лишь максимально возможное обогащение легким изотопом липидов (поэтому поток C_2 -фрагментов в цикл Кребса приравнен нулю), а затем оценивают изотопный состав биомассы так, как если бы она состояла только из изотопно-легких липидов. Это искусственно, многократно завышает возможную величину изотопного эффекта. К этому следует добавить, что авторы статьи [6] принимают для кинетического изотопного эффекта декарбоксилирования пирувата величину $\sim 20\%$ ($\alpha \sim 0,98$). Они ссылаются при этом на монографию Л. Меландера [16], в которой на стр. 150 действительно приводится величина $\alpha \approx 0,981$ со ссылкой на старую экспериментальную работу Фридмана и Бегеляйзена (1950 г.). Этот результат, помимо того, что он получен при значительно меньшей точности измерений, чем возможно сегодня, относится к декарбоксилированию малоновой кислоты, а не пирувата, причем ферментативному декарбоксилированию и не при нормальных условиях, а при температуре $138^\circ C$. Между тем имеется работа Де Ниро и Эпстайна [17], в которой подробно изучено декарбоксилирование именно пирувата, причем ферментативное декарбоксилирование в присутствии пируватдекарбоксилазы и при температуре $25^\circ C$. В этой ра-

боте величина изотопного эффекта в реакции декарбоксилирования пирувата оказывается равной всего $6 \div 8\%$, что делает заведомо несостоятельной попытку приписать этому эффекту решающую роль в обогащении организмов легким изотопом (более, чем на 20%). При этом сам пируват на $\sim 2\%$ обеднен легким изотопом по сравнению с исходной глюкозой, что не вписывается в схему [6]. Существенно также, что экспериментально измеренный изотопный эффект по 1-му и 2-му атомам углерода, по которому происходит разрыв связи, оказывается неодинаковым (соответственно $14,1$ и $6,5\%$), в то время как в построениях Ивлева и др. используется симметричный изотопный эффект. Несмотря на произвольный выбор величины изотопного эффекта декарбоксилирования пирувата и допущения, направленные на получение максимального изотопного эффекта, А. А. Ивлеву с соавторами [6] не удалось получить по рассмотренной ими схеме величины обогащения клетки (фактически липидов) более 10% (вместо наблюдаемых в природе $20-25\%$). В действительности же, если учесть, что содержание липидов в организме не превышает 25% , и принять правильную величину изотопного фракционирования при декарбоксилировании пирувата ($6-8\%$), то обогащение клетки за счет рассматриваемого механизма, даже следуя пути расчета [6], не превысит $1-2\%$. Таким образом количественная проверка собственного предположения, которую следовало предпринять еще до публикации первой статьи на эту тему, показала непригодность выдвинутого авторами представления в качестве универсального объяснения *всех наблюдаемых в фотосинтезирующих организмах изотопных эффектов*. В статье [6] никакого указания на этот счет нет. И несмотря на это авторы отмечают, что схема может быть пригодна «для объяснения фракционирования в гетеротрофах. Больший же изотопные эффекты у автотрофов могут быть объяснены *умножением* (курсив мой — Э. Г.) однократных кинетических изотопных эффектов декарбоксилированием пирувата, происходящего при пульсации...» ([6] стр. 675). Очевидно, что умножение изотопных эффектов, которые не только по величине, но и по знаку не отвечают наблюдаемому разделению изотопов между основными биохимическими фракциями, не могло дать желаемого результата и для случая автотрофов.

Тем не менее Ивлев с соавторами опубликовали статью [7], в которой делается попытка получить искомое распределение изотопов между липидами, белками и углеводами посредством процедуры умножения. При максимально благоприятных для модели входных параметрах (в действительности нереальных) расчетное обогащение биомассы не превышает $-10,8\%$. Липиды обогащены легким изотопом на $-17,67\%$. Углерод белков получается несообразно тяжелым (обогащение на $-2,78\%$) и сильно отличающимся от углерода углеводов ($-10,47\%$). Для сравнения укажем измеренные значения изотопного состава углерода ($\delta^{13}\text{C}$, ‰) для конкретного объекта, например, клубней картофеля: липиды — $34,7\%$, белки — $26,6\%$, крахмал — $25,5\%$ [18]. Несмотря на явное несоответствие наблюдаемым фактам, Ивлев с соавторами заключают статью [7] выводом: «Модель правильно отражает наблюдаемое распределение изотопов между фракциями биомассы... модель позволяет объяснить наблюдаемую картину распределения изотопов углерода в клетке автотрофных организмов.»

Следующая статья тех же авторов [8] вновь посвящена попытке обосновать фракционирование изотопов в живой клетке в рамках модели с умножением кинетического изотопного эффекта при декарбоксилировании пирувата (по модели с «периодически затухающими колебаниями гликолитической цепи», как называют ее авторы), на этот раз — путем вариации входных параметров. Однако, перебрав все возможные комбинации числовых значений входных параметров, в том числе совершенно далекие от реальности, авторы ни в одном случае не смогли получить сходство с наблюдаемой на опыте картиной распределения углерода в биологических системах.

Убедившись в невозможности объяснить общую обогащенность организмов легким изотопом только путем фракционирования изотопов при декарбоксилировании пирувата, т. е. по-существу, в несостоятельности главного положения, которое отстаивалось во всех предыдущих публикациях, А. А. Ивлев с соавторами были вынуждены в последних работах обратиться к отвергнутому прежде механизму фракционирования изотопов при фотосинтезе. При этом читатель с удивлением обнаруживает, что вывод о фракционировании изотопов при фотосинтезе, известный из основополагающих в этой области работ Парка и Эпстайна [12], следует якобы из теоретических построений А. А. Ивлева с соавторами.

Работа [10] открывается таким абзацем: «Анализ моделей фракционирования изотопов углерода в автотрофной клетке со стационарными потоками субстратов [1] и затухающими колебаниями в гликолитической цепи [2] привел к следующему выводу: наблюдаемое обогащение углерода биомассы клетки изотопом ^{12}C связано в основном с изотопными эффектами реакции карбоксилирования рибулодифосфата (РиДФ) при ассимиляции CO_2 ». Ссылки под номерами [1] и [2] в вышеприведенной цитате это только что обсуждавшиеся статьи Ивлева, Князева и Калошина — соответственно [7] и [8]. Получается, что роль изотопного эффекта карбоксилирования рибулодифосфата при ассимиляции CO_2 была выявлена в этих работах. Упоминание действительных авторов соответствующего исследования — Парка и Эпстайна, в статье [10] отсутствует. Отсутствует и оценка собственных «теоретических» доказательств, исходя из которых авторы длительное время утверждали, что подобный эффект не может иметь места. То, что это — не случайное упущение, становится ясным при ознакомлении со статьей [11]. Она начинается словами: «Математический анализ фракционирования изотопов углерода в процессе углеродного метаболизма привел к выводу о существовании в клетке по крайней мере двух независимых процессов разделения изотопов, один из которых связан с фотосинтетической фиксацией CO_2 , а другой — с дыханием [1—3]». Здесь вновь представление о разделении изотопов при фотосинтетической фикса-

ции CO_2 преподносится как результат математического анализа, выполненного Ивлевым с соавторами (номера [1—3] в приведенной цитате отвечают номерам [6—8] в нашем списке литературы). Правда, в статье 11 имеется ссылка на работу Парка и Эпстайна, но не в связи с приведенной цитатой, а совсем в другом контексте. Ивлев пишет: «Нетрудно видеть, что диффузия газообразных молекул CO_2 из воздуха в клетку и растворение ее в цитоплазме не могут быть причинами наблюдаемых изотопных различий при ассимиляции CO_2 , как полагалось ранее [10, 11], поскольку различия имеют место не только у наземных, но и водных растений. Следует исключить из числа возможных причин и изотопные эффекты, сопровождающие обратимую гидратацию CO_2 и гидратацию HCO_3^- , происходящих на карбоангидразе [12], поскольку изотопные эффекты возникали независимо от присутствия или отсутствия карбоангидразы [13, 14]. Так *методом исключения* можно прийти к выводу, что изотопные эффекты при ассимиляции CO_2 связаны с реакцией ферментативного карбоксилирования [15]. Результаты экспериментов по ферментативному карбоксилированию рибулозодифосфата подтверждают этот вывод. ([11], стр. 766)». Ссылка номер [11] в этой цитате это — ссылка на работу Парка и Эпстайна [12], а номер [15] — ссылка на работу Ивлева и Князева [9]. Таким образом работа Парка и Эпстайна [12] упоминается в связи с их якобы ошибочными представлениями о разделении изотопов в процессе «диффузии газообразных молекул CO_2 из воздуха в клетку». Вывод же о том, что изотопный эффект связан с реакцией ферментативного карбоксилирования, как можно видеть из статьи [11] сделан Ивлевым и Князевым. Сделан он «методом исключения».

Однако, и последняя схема [10], сводящая биологическое фракционирование изотопов не к одному, а к двум пунктам фракционирования, является несостоятельной и эклектичной. Введение значительного числа варьируемых параметров (F_1 , F_2 и т. п.) позволяет получить иллюзию какого-то соответствия наблюдаемым фактам. Так можно объяснить некоторые факты задним числом, но нельзя их правильно предсказать. Например, на рис. 3 в статье [10] показано ожидаемое распределение изотопов в молекуле оксалоацетата. Изотопный состав 2-го и 3-его атома углерода показан одинаковыми. Исходя из схемы [10], нет внутренней необходимости считать их разными. Между тем, сейчас имеются экспериментальные данные, которые показывают, что эти атомы имеют разный изотопный состав [19]. Другой пример. Согласно расчету [10] глутаминовая и аспаргиновая кислота на 5—7% изотопно-тяжелее исходного углерода, причем первая изотопно-тяжелее последней. На самом деле глутаминовая кислота в организмах вообще практически не обеднена легким изотопом и в 5 случаях из 6 не тяжелее, а легче аспаргиновой.

В соответствии со схемой [10] нечетные атомы углерода жирных кислот, происходящие от карбоксильного углерода ацетила, изотопно легче четных. Это сделано, чтобы получить соответствие с экспериментальными данными Монсона и Хейса [20]. Но есть случаи, когда карбоксильный углерод жирных кислот — изотопно-тяжелый [21], причем жирные кислоты, в которых обнаружен тяжелый карбоксильный углерод, такие же изотопно-легкие в целом, как и те, где обнаружен легкий карбоксильный углерод.

Важным свойством модели фракционирования изотопов при декарбоксилировании пирувата, по мысли Ивлева с соавторами, является то, что из нее следует одновременная обогащенность липидов легким, а аминокислот — тяжелым изотопом, поскольку последние образуются за счет поступления в цикл Кребса остаточного пирувата. Предполагается, что таким образом объясняется известная обогащенность белков тяжелым изотопом. Но это — ошибка. В действительности аминокислоты, связанные генетически с циклом Кребса, т. е. глутаминовая, аспаргиновая и их семейства не обогащены тяжелым изотопом. Обогащенность белков на 1—2% изотопом ^{13}C в основном связана с вкладом глицина, аланина, серина, которые относятся к числу наиболее изотопно-тяжелых аминокислот.

Все это говорит о том, что существует множество реакций и процессов, в которых имеет место фракционирование изотопов. Дело в принципиальной неплотности концепции, сводящей биологическое фракционирование изотопов углерода к одному — двум или даже к большему числу узлов. Попытки объяснить биологическое фракционирование изотопов начались именно с такого подхода. В 1960 году Парк и Эпстайн [12] считали, что главным барьером фракционирования является стадия фотосинтетической ассимиляции CO_2 , конкретно — реакция карбоксилирования рибулозодифосфата. Год спустя была опубликована работа [22], в которой был указан второй узел фракционирования — декарбоксилирование пирувата и обогащение за счет этого липидов легким изотопом углерода. Это, между прочим, та ступень, на которой сегодня стоят А. А. Ивлев с соавторами. Позже были выделены новые узлы фракционирования. В 1969 году Э. Дегенс [23], дальний предшественник А. А. Ивлева, выделил уже 7 барьеров фракционирования изотопов.

В действительности нет оснований связывать фракционирование изотопов с какими-либо отдельными реакциями, будь то карбоксилирование рибулозодифосфата или декарбоксилирование пирувата. Фракционирование изотопов в той или иной степени присуще практически всем биохимическим реакциям. В то же время при всей сложности процессов биологического фракционирования распределение изотопов в biomолекулах подчиняется определенным закономерностям, указывающим на существование общего для ферментативных реакций механизма разделения изотопов [24, 25].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ивлев А. А. // Успехи совр. биологии. 1976. Т. 81. Вып. 1. С. 84.
2. Ивлев А. А., Королева М. Я., Калошин А. Г. // Докл АН СССР. 1974. Т. 217. № 1. С. 224.

3. Ивлев А. А., Королева М. Я., Калошин А. Г. // Изв. АН СССР, сер. геол. 1975. № 10. С. 153.
4. Ивлев А. А., Королева М. Я. // Докл. АН СССР. 1974. Т. 214. № 1. С. 211.
5. Ивлев А. А., Калошин А. Г., Королева М. Я. // Мол. биология. 1975. Т. 9. № 3. С. 430.
6. Ивлев А. А., Князев Д. А., Калошин А. Г. // Биофизика. 1982. Т. 27. Вып. 4. С. 675.
7. Ивлев А. А., Князев Д. А., Калошин А. Г. // Известия ТСХА. 1983. № 2. С. 100.
8. Ивлев А. А., Князев Д. А., Калошин А. Г. // Известия ТСХА. 1983. Вып. 3. С. 113.
9. Ивлев А. А., Князев Д. А. // Известия ТСХА. 1983. Вып. 4. С. 105.
10. Ивлев А. А. // Биофизика. 1984. Т. 29. Вып. 6. С. 1018.
11. Ивлев А. А. // Физиол. растений. 1984. Т. 31. Вып. 4. С. 765.
12. Park R., Epstein S. // Geochim. Cosmochim. Acta. 1960. V. 21, N 1. P. 110.
13. Abelson P. H., Hoering T. G. // Proc. Nat., Acad. Sci. U. S. 1961. V. 47. N 5. P. 623.
14. Галимов Э. М. // Геохимия. 1978. № 10. С. 1571.
15. Ивлев А. А., Шноль С. Э. // Геохимия. 1978. № 10. С. 1561.
16. Меландер Л. Изотопные эффекты в скоростях реакций. М.: Мир. 1964.
17. De Niro M., Epstein S. // Science. 1977. V. 197. N 4300. P. 261.
18. Jacobson B. S. et al. // J. Gen. Phys. 1970. V. 35. P. 1.
19. Meinschein W. G., Hagemann G. D., Bromley B. // Abstr. 27th Intern. Geol. Congress. 1984. V. 5. P. 345.
20. Monson K. D., Hayes J. M. // Geochim. Cosmoch. Acta. 1982. V. 46. P. 139.
21. Vogler E. A., Hays J. M. // In: Organic Geochemistry. (A. G. Douglas and J. R. Maxwell, eds.) Pergamon Press. Oxford, N.-Y. 1980. P. 697.
22. Park R., Epstein S. // Plant. Physiol. 1961. V. 36. N 2. P. 133.
23. Degens E. // In: Organic Geochemistry (G. Eglington and M. T. Murphy, eds.) Springer. Heidelberg. 1969. P. 304.
24. Галимов Э. М. Природа биологического фракционирования изотопов. М.: Наука. 1981. 247 с.
25. Galimov E. M. Biological fractionation of isotopes. Ac. Press. N.-Y., London. 1985. P. 261.

Институт геохимии
и аналитической химии
им. В. И. Вернадского
АН СССР, Москва

Поступила в редакцию
11.VI.1985

О ДВУХ КОНЦЕПЦИЯХ, ОБЪЯСНЯЮЩИХ НЕРАВНОМЕРНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОТОПОВ УГЛЕРОДА В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

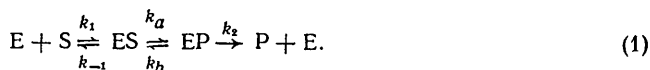
ИВЛЕВ А. А.

При исследовании распределения изотопов углерода в живом веществе принципиальным является вопрос о том, каковы причины изотопных эффектов, возникающих при метаболических превращениях, и чем обусловлена наблюдаемая изотопная неоднородность биомолекул. В литературе высказаны две точки зрения по этому вопросу.

Согласно одной из них, развиваемой Э. М. Галимовым [13, 14], распределение изотопов углерода в метаболитах определяется в основном термодинамическим изотопным эффектом, т. е. соотношения $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в молекулах отличаются от равновесных (в сторону уменьшения) на некоторый постоянный (для каждого организма) множитель. Другими словами, изотопный состав углерода в биомолекулах зависит только от природы связей, образуемых атомами углерода, и может быть описан при помощи термодинамической функции β -фактора (которая, как известно, не зависит от механизма метаболической реакции).

Согласно другой точке зрения, развиваемой нами [2, 3, 19—21], изотопные эффекты углерода в ферментативных реакциях имеют кинетическую природу, т. е. распределение изотопов углерода в биомолекулах определяется механизмом реакций и долей непрореагировавших субстратов. Допуская квазитермодинамическую природу распределения изотопов в биомолекулах, Э. М. Галимов, естественно, делает вывод о квазитермодинамической природе эффектов в ферментативных реакциях, причем, учитывая существенную необратимость многих реакций в клетке, он постулирует, что термодинамические изотопные эффекты могут возникать и в необратимых реакциях. Для обоснования этих утверждений он предлагает особый, присущий ферментативным реакциям механизм разделения изотопов, суть которого в следующем [1].

Любая ферментативная реакция может быть представлена схемой



Эффективный коэффициент разделения изотопов для приведенной схемы, согласно Э. М. Галимову, имеет вид

$$\alpha_e = \left[1 - k \left(\frac{\beta_P}{\beta_S} - 1 \right) \right] [1 + \lambda (\alpha_2 - 1)], \quad (2)$$

где первый множитель учитывает термодинамическую составляющую эффекта, второй — кинетическую. Полагая далее, что в подавляющем числе ферментативных реакций *in vivo* кинетическая составляющая несущественна, Э. М. Галимов получает выражение, отражающее суть его концепции:

$$\delta C_P^{13} - \delta C_S^{13} = (\alpha_e - 1) \cdot 10^3 = k \left(\frac{\beta_P}{\beta_S} - 1 \right) \cdot 10^3, \quad (3)$$

где β_P и β_S — термодинамические функции (β -факторы), характеризующие обменоспособность атомов в отношении разделения изотопов молекул продукта и субстрата; $\delta^{13}C_P$ и $\delta^{13}C_S$ — их изотопный состав; k — так называемый редуцирующий множитель, зависящий от констант скоростей на элементарных стадиях:

$$k = \frac{k_a/k_b}{1 + \frac{k_b}{k_2} + \frac{k_a}{k_2}}. \quad (4)$$

Прежде всего необходимо отметить, что кинетическая схема (1), постулирующая равновесное превращение $ES \rightleftharpoons EP$ в любой ферментативной реакции, неверна, поскольку известно [9], что превращение $ES \rightarrow EP$, включающее конформационную перестройку фермента, как правило, является наиболее медленной стадией и происходит вдали от равновесия. Поэтому принцип детального равновесия в этом случае не работает и, следовательно, термодинамические функции k описанию изотопных различий субстрата и продукта не применимы.

Во-вторых, выражение (2) эффективного коэффициента разделения для принятой схемы (1) неверно, поскольку не учтена конкуренция изотопных форм молекул субстрата за активные центры фермента. Строгое решение в общем виде кинетических уравнений для схемы (1) дает

$$\alpha_e = \frac{k_1}{k_1^*} \frac{k_a}{k_a^*} \frac{k_2}{k_2^*} \frac{(k_b^* k_{-1}^* + k_a^* k_2^* + k_2^* k_1^*)}{(k_b k_{-1} + k_a k_2 + k_2 k_1)}, \quad (5)$$

звездочка относится к изотопно-отличной форме.

Выражение (5) не сводимо к выражению (2), даже если принять введенные автором малообоснованные допущения ($k_b \gg k_2$, $k_{-1} \gg k_a$ и $k_2/k_2^* = 1$). Величина α_e и в этом случае не будет содержать ни редуцирующего множителя, ни кинетической составляющей эффекта, в то время как именно ими Э. М. Галимов объясняет расхождение предсказаний своей концепции с экспериментальными данными:

$$\alpha_e = \frac{k_1 k_a / k_1^* k_a^*}{k_{-1} k_b / k_{-1}^* k_b^*} = \alpha_{\text{тиэ}} (S/EP) = \frac{\beta_S}{\beta_{EP}}, \quad (6)$$

где $\alpha_{\text{тиэ}}$ — равновесный коэффициент разделения изотопов на стадиях превращения S в EP . Равновесный изотопный эффект (но нередуцированный, а полный), как ясно из (6), возникает лишь в том случае, если все стадии, включая и $EP \rightleftharpoons E + P$ являются равновесными. Ферментативная реакция в этом случае не отличалась бы от обычной химической реакции, протекающей равновесно, и $\alpha_e = \beta_S/\beta_P$, что весьма редко реализуется в биохимии.

В-третьих, даже если бы мы не знали о двух изложенных выше положениях термодинамической концепции, ее нельзя принять уже потому, что постулат о термодинамически упорядоченном распределении изотопов углерода в метаболитах требует принятия допущения о том, что механизм протекания всех ферментативных реакций в клетке с точностью до констант скоростей одинаков. В самом деле, из выражения (3) следует, что для обеспечения равновесного характера межмолекулярного и внутримолекулярного распределения изотопов величина редуцирующего множителя k должна быть строго, с точностью до 1% (с учетом различий β_S и β_P) постоянной и одинаковой. Но, как видно из (4), постоянство и равенство значений k означает одинаковость соотношений констант скоростей на элементарных стадиях всех ферментативных реакций клетки. Такое допущение противоречит результатам многочисленных экспериментальных исследований по кинетике ферментативных реакций и не может быть принято даже в качестве грубого приближения.

Теоретическая несостоятельность термодинамической концепции и является причиной того, что в большинстве случаев ее выводы противоречат имеющимся экспериментальным данным по фракционированию изотопов углерода в опытах *in vitro* и по распределению изотопов в метаболитах.

Ни в одной из многих изученных *in vitro* однонаправленных ферментативных реакций экспериментально наблюдаемые изотопные эффекты не соответствуют термодинамическим. В реакциях ферментативного карбоксилирования в широком диапазоне условий (рН, t , °C, Me^{+n} -кофактор) на карбоксилазах, выделенных из разных организмов, даже знак эффекта противоположен термодинамическому [5, 6]. В существенно необратимых реакциях ферментативного декарбоксилирования установлена зависимость величины, а в некоторых случаях и знака эффекта от условий, определяющих лимитирующую скорость стадию [7—9]. Эти факты доказывают кинетическую, а не термо-

динамическую природу изотопных эффектов в необратимых ферментативных реакциях.

Не соответствует предсказываемому термодинамической концепцией и наблюдаемое внутримолекулярное распределение изотопов в аминокислотах [10], жирных кислотах [11, 12], глюкозе крахмала растений [13], т. е. в основных метаболитах клетки. Она не может объяснить, почему карбоксильные группы разных аминокислот и жирных кислот, выделенных из одного и того же организма, различаются вплоть до изменения знака, т. е. в пределах, намного превышающих возможные пределы изменения редуцирующего множителя. Если же суммировать имеющийся в литературе экспериментальный материал по внутримолекулярным изотопным различиям метаболитов, то окажется, что в 19 из 26 изученных метаболитов, выделенных из 15 организмов, экспериментально наблюдаемые распределения изотопов не соответствуют термодинамическим [10—13] и лишь в 7 компонентах [13—17] из 7 организмов обнаружены изотопные различия фрагментов, которые формально соответствуют термодинамическим. Однако это соответствие не является доказательством их термодинамической природы, поскольку оно может быть объяснено и в предположении кинетической природы эффектов [2, 3].

Не может объяснить термодинамическая концепция и найденную в опытах Де Ниро и Эпстайна [22] зависимость изотопного состава липидов от природы углеродного субстрата, на котором выращивался организм.

По-прежнему единственным аргументом Э. М. Галимова остается корреляция β_{Σ} -фактор — $\delta^{13}\text{C}$ -соединения. Мы неоднократно отмечали [19, 20], что большая погрешность расчета β_{Σ} -фактора по предложенному автором методу, превышающая различия, которым придается физический смысл, делает этот аргумент несостоятельным. Но даже если предать себе, что точность расчета β_{Σ} удовлетворительна, легко показать, что наличие корреляции еще не доказывает квазитермодинамической природы изотопного распределения. Например, для пар аминокислот аланина и изолейцина, глицина и лейцина, выделенных из белковых фракций соответственно *Chlorella* и *Euglena* [10], соблюдается положительная корреляция величин $\delta^{13}\text{C}$ -аминокислот и их β_{Σ} -факторов, т. е. большему значению β_{Σ} -фактора отвечает более высокое содержание тяжелого изотопа углерода.

β_{Σ} -фактор	<i>Chlorella</i>		<i>Euglena</i>	
	Аланин	Изолейцин	Глицин	Лейцин
$\delta^{13}\text{C}$ -аминокислоты	1,167	1,158	1,176	1,158
	-10,3	-19,6	-12,8	-23,5

Согласно термодинамике, более высокое содержание изотопов углерода в аланине и глицине — результат большего вклада тяжелого изотопа углерода карбоксильной группы ($\text{RCOOH} > \beta_{\text{R}}$) в общее содержание углерода аминокислот. На самом деле, как видно из экспериментальных данных:

	<i>Chlorella</i>		<i>Euglena</i>	
	Аланин	Изолейцин	Глицин	Лейцин
$\delta^{13}\text{C}_{\text{COOH}}$	-7,3	-7,4	-11,6	-13,6
$\delta^{13}\text{C}_{\text{R}}$	-11,8	-22,0	-14,1	-25,6

обогащенность аланина и глицина изотопом ^{13}C связана в основном с тяжелым изотопным составом их радикального углерода. Это противоречит термодинамическому распределению, но хорошо объясняется с кинетических позиций [21].

Нелишне заметить, что тесные корреляции, обнаруженные Галимовым с сотр. [1] на примере липидной фракции ряда организмов, не подтверждаются рассмотрением изотопных распределений метаболитов, изученных другими авторами [10, 22].

Проведенный анализ показывает, что теоретические положения квазитермодинамической концепции нельзя считать достаточно обоснованными, а ее предсказания не подтверждаются экспериментальными данными. В то же время имеющиеся данные легко объясняются в рамках кинетической концепции, рассматривающей распределение изотопов углерода в метаболитах как следствие кинетических изотопных эффектов в ферментативных реакциях с учетом реализующихся в клетке путей биосинтеза и последовательности протекания метаболических процессов [2, 3]. Определяющая роль при этом отводится изотопным эффектам, имеющим место в реакциях, происходящих в стратегических пунктах метаболической схемы: в начале метаболических путей (реакция карбоксилирования рибулозодифосфата) и в местах ключевых разветвлений (реакция декарбоксилирования пирувата).

Только комплексное изучение механизмов разделения изотопов в процессе ферментативных реакций с учетом временной и пространственной организации метаболизма, а также маршрутов биохимических превращений может привести к выяснению закономерностей распределения изотопов углерода в «живом» веществе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галимов Э. М. Природа биологического фракционирования изотопов. М.: Наука, 1981. 247 с.
2. Ивлев А. А. Биофизика, 1985, т. 30, с. 506.
3. Ивлев А. А. Автореф. докт. дис. М., 1985, 40 с.
4. Блюменфельд Л. А. Проблемы биологической физики. М.: Наука, 1977. 336 с.

5. *Estep M. L. F., Tabita F. R., Parker P. L., Baalen Ch. V.* Plant Physiol., 1978, v. 61, p. 680.
6. *Roeske C. A., O'Leary M. H.* Biochemistry, 1985, v. 24, p. 1603.
7. *O'Leary M. H.* Biochem. Biophys. Res. Comm., 1976, v. 73, p. 614.
8. *O'Leary M. H., Richards D. T., Hendrickson D. N.* J. Am. Chem. Soc., 1970, v. 92, p. 4435.
9. *Yordan F., Kuo D. J., Monse E. U.* J. Am. Chem. Soc., 1978, v. 100, p. 287.
10. *Abelson P. H., Hoering T. C.* Proc. Nat. Acad. Sci, 1961, v. 47, p. 623.
11. *Voglar E. A., Hayes J. M.* Adv. in Org. Geochem., N. Y.: Pergamon Press, 1979, p. 697.
12. *Monson K. D., Hayes J. M.* Geochim. et Cosm. Acta, 1982, v. 46, p. 139.
13. *Галимов Э. М., Кодина Л. А., Генералова В. Н.* В кн.: Органическая геохимия нефтей, газов и органического вещества докембрия. М.: Наука, 1981. с. 159.
14. *Галимов Э. М., Кодина Л. А., Генералова В. Н.* Геохимия, 1978, с. 11.
15. *Meinschein W. G., Kinaldi G. G. L., Hayes J. M., Schoellar D. A.* Biomed. Mass Spectr., 1974, v. 1, p. 172.
16. *Rinalch G. G. L., Meinschein W. G., Hayes J. M.* Biomed. Mass Spectr., 1974, v. 1, p. 412.
17. *Meinschein W. G., Hegeman G. D., Bromley B. N.* 27-й Международный геологический конгресс. Тезисы. 1984, т. 5, сек. 11, с. 345.
18. *De Niro M. J., Epstein S.* Science, 1977, v. 197, p. 261.
19. *Ивлев А. А., Шюль С. Э.* Геохимия, 1978, с. 1571.
20. *Ивлев А. А., Лобышев В. И.* Биофизика, 1984, т. 29, с. 347.
21. *Ивлев А. А.* Биохимия, 1985, т. 50, с. 1607.
22. *Blair N., Leu A., Munez E., Olsen J., Kwong E., Des-Murais D.* Appl. Environ. Microb., 1985, V. 50, p. 996.

Всесоюзный научно-исследовательский
геологоразведочный нефтяной
институт, Москва

Поступила в редакцию
6.VI.1986