

И. Е. ЭЛЬПИНЕР и А. В. ГЕРАСИМОВА

ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ ВОЛН НА ДЕПОЛИМЕРАЗУ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

(Представлено академиком А. И. Опариным 5 IX 1952)

В предыдущих исследованиях было показано, что в поле ультразвуковых волн подвергается распаду ряд важных в биологическом отношении веществ. Речь идет о распаде под влиянием ультразвуковых волн белков, аминокислот, протопорфиринов, гиалуроновой и хондроитинсерной кислот, нуклеиновых кислот и др. (1-5). Особенно чувствительными к ультразвуку оказались нуклеиновые кислоты. Деполимеризация этой кислоты выявлялась уже после нескольких минут ее озвучивания. Расщеплению подвергаются и отдельные компоненты, входящие в состав нуклеиновых кислот, — пуриновые и пиримидиновые основания (5). В настоящем сообщении приводятся данные, показывающие, что фермент деполимеразы дезоксирибонуклеиновой кислоты также оказался весьма чувствительным к ультразвуковым волнам.

Деполимеразу дезоксирибонуклеиновой кислоты была получена по методу Мак-Карти (7) из бычьей поджелудочной железы. В основном этот метод заключается в экстрагировании фермента из названной ткани и последующей очистке экстракта путем многократного его фракционирования сернокислым аммонием различного насыщения. В процессе такой обработки экстракт освобождается от присутствия протеолитических ферментов. Деполимеразу была получена в сухом виде; высушивание производилось в вакууме в замороженном состоянии. Очистка препарата (диализ) приводила к уменьшению его ферментативной активности. Фермент становился вновь активным после прибавления солей магния.

В качестве субстрата для проверки активности фермента нами была использована высокополимерная дезоксирибонуклеиновая кислота, полученная в виде натриевой соли из вилочковой железы теленка. Этот препарат был свободен от белка: биуретовая, миллонова и нингидриновая реакции давали отрицательные результаты.

Рис. 1 показывает, что полученная нами деполимеразу довольно быстро (в течение 30 мин.) значительно снижала относительную вязкость субстрата — дезоксирибонуклеиновой кислоты. Измерение вязкости производилось в вискозиметре Оствальда при атмосферном давлении. Вискозиметр погружался в водяной термостат, в котором строго поддерживалась температура 30°. Вначале определялась относительная вязкость водного раствора дезоксирибонуклеината натрия в отсутствие фермента. Затем к этому субстрату в вискозиметре прибавляли 0,82 γ фермента, активированного $MgCl_2$, и через определенные промежутки времени измерялась относительная вязкость изучаемого раствора.

Интересно, что скорость снижения относительной вязкости дезоксирибонуклеиновой кислоты резко замедляется или снижение вовсе не имеет места под влиянием деполимеразы, если названная кислота предварительно подвергалась действию ультразвуковых волн. (Частота генератора ультразвуковых волн 500 000 гц; излучающаяся интенсивность пьезокварцевого излучателя составляла приблизительно 6 вт/см².) Снижения относительной вязкости под влиянием деполимеразы не наблюдалось после 10-минутного озвучивания исследуемого раствора дезоксирибонуклеиновой кислоты. Это означает, что под действием 10-минутного озвучивания полинуклеотидные цепочки

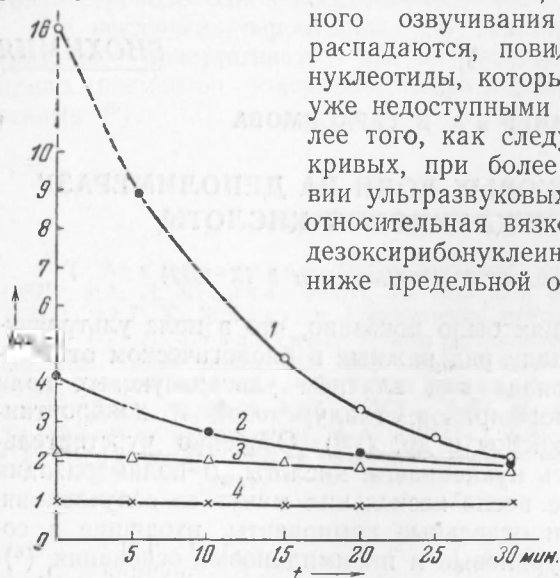


Рис. 1. Влияние деполимеразы дезоксирибонуклеиновой кислоты на 0,25% раствор дезоксирибонуклеината натрия, подвергавшегося предварительно действию ультразвуковых волн. η — относительная вязкость дезоксирибонуклеината натрия; t — продолжительность действия фермента; 1 — до озвучивания раствора, 2 — озвучивание в течение 5 мин., 3 — 10 мин., 4 — 30 мин.

распадаются, повидимому, на отдельные тетра-нуклеотиды, которые становятся, как известно, уже недоступными действию деполимеразы. Более того, как следует из приведенных на рис. 1 кривых, при более продолжительном воздействии ультразвуковых волн (экспозиция 30 мин.) относительная вязкость озвучиваемого раствора дезоксирибонуклеиновой кислоты значительно ниже предельной относительной вязкости нуклеиновых кислот, подвергавшихся действию фермента деполимеразы. Отсюда можно сделать заключение, что ультразвуковые волны обладают способностью вызывать более глубокие расщепления высокополимерных нуклеиновых кислот, чем соответствующий фермент.

Изложенные опыты свидетельствовали также о высокой активности и специфичности используемого нами фермента, что позволило перейти к изучению влияния на него ультразвуковых волн. Действию ультразвуковых волн подвергалось 0,4 мг деполимеразы дезоксирибонуклеиновой кислоты, растворенной в 10 мл боратного буфера (рН 7,45). Озвучивание фермента производилось в стеклянной колбе, которая погружалась в ультразвуковой фонтан. Генерация ультразвуковых волн осуществлялась в сосуде с трансформаторным маслом, который непрерывно омывался ледяной водой. Этим обеспечивалось озвучивание фермента при относительно низкой температуре окружающей среды. Температура масла во время озвучивания не повышалась выше 8—10°. Источником ультразвука служила пьезокварцевая сферическая пластинка с фокусным расстоянием в 10 см; излучающаяся интенсивность — 4 вт/см². Условия определения активности фермента такие же, как указано выше.

Как видно из рис. 2, предварительно озвученный фермент деполимеразы оказался полностью инертным в отношении снижения относительной вязкости дезоксирибонуклеиновой кислоты. Даже при относительно продолжительном взаимодействии фермента с субстратом снижения вязкости последнего не наступало. Незначительное снижение относительной вязкости субстрата отмечалось лишь в первые минуты после прибавления озвученного фермента. Это объясняется действием на вязкость субстрата хлористого магния, присутствующего здесь в качестве активатора фермента.

Инактивация фермента под влиянием ультразвуковых волн наступала довольно быстро. Потеря активности фермента выявлялась уже после 5-минутного его озвучивания. Однако этот эффект зависит от первоначальной активности фермента; чем больше активность фермента, тем больше экспозиция ультразвуковых волн, вызывающих его инактивацию.

Для выяснения механизма инактивирующего действия ультразвуковых волн исследуемый фермент озвучивался в присутствии таких веществ, которые обычно угнетают окислительные процессы, вызываемые этим физическим агентом.

Таковыми свойствами отличаются использованные нами метионин и лейцин⁽⁸⁾. Однако, как показывает табл. 1, озвучивание фермента (экспозиция 10 мин.) в присутствии названных веществ не приводит к защите его от разрушительного действия ультразвука. В озвучиваемом растворе эти вещества находились в избытке: 10 мг метионина или лейцина прибавляли к 10 мл водного раствора в котором содержалось 0,4 мг фермента деполимеразы. Само присутствие этих веществ (без озвучивания) не оказывало влияния на активность фермента.

Напомним, что «защитное» или «конкурирующее» действие этих аминокислот обуславливается, повидимому, тем, что они взаимодействуют с возникающими в озвучиваемом водном растворе валентно-ненасыщенными свободными радикалами, обладающими большой реакционной способностью⁽⁹⁾. Есть основание считать, что в поле ультразвуковых волн источником свободных радикалов, а также атомарного водорода служат продукты расщепления молекул воды, осуществляемого в кавитационных пузырьках. Вещества, обладающие большим средством к окисляющим или восстанавливающим продуктам расщепления водных молекул, больше подвергаются химическим превращениям, чем присутствующие в этом растворе другие вещества, отличающиеся относительной инертностью в этом отношении.

	Относит. вязкость 0,15% раствора дезоксирибонуклеината натрия через 30 мин. после прибавления фермента, в растворе которого присутствовало постороннее вещество		
		метионин	лейцин
До озвучивания . . .	1,07	1,07	1,07
После озвучивания . .	4,97	4,57	4,66

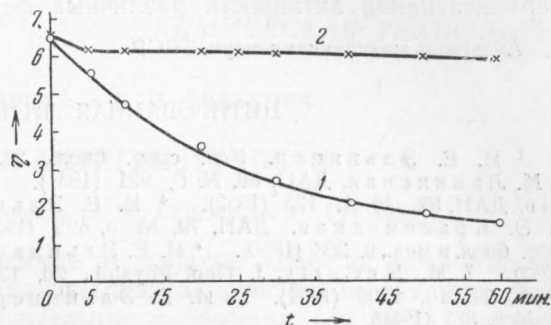


Рис. 2. Влияние ультразвуковых волн на активность деполимеразы дезоксирибонуклеиновой кислоты (субстрат — 0,15% раствор дезоксирибонуклеината натрия). η — относительная вязкость дезоксирибонуклеината натрия; t — продолжительность действия фермента: 1 — до озвучивания фермента, 2 — после озвучивания

Таблица 1

Этим объясняется, что процесс распада пуриновых и пиримидиновых оснований⁽⁶⁾ угнетается в присутствии метионина и лейцина, окисление иода задерживается в присутствии триптофана⁽⁹⁾ и т. д. Имеются указания, что фермент гиалуронидаза не разрушается в поле ультразвуковых волн, если в озвучива-

Этим объясняется, что процесс распада пуриновых и пиримидиновых оснований⁽⁶⁾ угнетается в присутствии метионина и лейцина, окисление иода задерживается в присутствии триптофана⁽⁹⁾ и т. д. Имеются указания, что фермент гиалуронидаза не разрушается в поле ультразвуковых волн, если в озвучива-

емом растворе присутствуют вещества, легко подвергающиеся в этих условиях процессу окисления. В этом отношении, как было показано, деполимераза отличается от гиалуронидазы, что отражает, видимо, различие механизмов ферментативной активности обоих названных ферментов.

Итак, полученные нами данные могут быть использованы не только для суждения о механизме биологического действия ультразвуковых волн, но и открывают новые возможности в деле изучения механизма ферментативной активности различных ферментов.

Академия медицинских наук СССР

Поступило
23 VI 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. Е. Эльпинер, Усп. совр. биол., **30**, 113 (1950). ² М. А. Хенох, Е. М. Лапинская, ДАН, **80**, № 6, 921 (1951). ³ И. Е. Эльпинер, С. М. Бычков, ДАН, **82**, № 1, 123 (1952). ⁴ И. Е. Эльпинер, Л. А. Блюменфельд, С. Э. Красовицкая, ДАН, **79**, № 3, 495 (1951). ⁵ И. Е. Эльпинер, Бюлл. эксп. биол. и мед., **9**, 208 (1950). ⁶ И. Е. Эльпинер, Ц. Б. Кац, ДАН, **82**, № 4, 611 (1952). ⁷ М. McCarty, J. Gen. Physiol., **29**, 123 (1946). ⁸ И. Е. Эльпинер, ЖТФ, **21**, 10, 1205 (1951). ⁹ И. Е. Эльпинер, М. Ф. Колесникова, ДАН, **75**, № 6, 837 (1950).