

И. Е. ЭЛЬПИНЕР и М. Д. СУРОВА

УСКОРЕНИЕ ПРОЦЕССОВ РАСПАДА БЕЛКА В ПОЛЕ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ ВОЛН

(Представлено академиком А. И. Опариным 28 VI 1954)

В работах (¹⁻³) было показано, что химические процессы, возникающие в поле ультразвуковых волн, обусловлены непрямым действием. Это означает, что ультразвук вызывает расщепление молекул воды с образованием реакционно-активных групп (OH , HO_2 , H и др.), которые немедленно взаимодействуют с молекулами растворенного вещества. Под этим углом зрения становятся понятными явления окисления, восстановления, деполимеризации и полимеризации, наблюдаемые при действии ультразвука на растворы неорганических и органических веществ. Эти же представления способствовали выявлению возможности регулирования кинетики химических процессов, протекающих в поле ультразвуковых волн (^{4, 5}). Что касается механизма разрушения белковых молекул, выявленного рядом исследователей, то до настоящего времени оставалось неясным, обусловлен ли он механическими силами, возникающими в поле ультразвуковых волн, или химическими процессами, происходящими вследствие взаимодействия с продуктами расщепления воды.

В настоящем сообщении будет показано, что распад белковых молекул, наблюдаемый в поле ультразвуковых волн, поддается регулированию. Путем прибавления тех или иных органических веществ к озвучиваемому раствору удастся ускорить или, наоборот, замедлить процесс распада белковых молекул. Последнее может быть объяснено с точки зрения непрямого действия ультразвуковых волн.

Нами изучалось действие ультразвука на растворы яичного и сывороточного альбумина, казеина и желатины. Озвучивание производилось при помощи ультразвукового генератора, в котором излучателем служила сферическая пьезокварцевая пластинка с фокусным расстоянием 10 см. Диаметр кварца 5 см, частота колебания 740 кц/сек, подводимое переменное напряжение 2800—3000 в.

Белковые растворы озвучивались в стеклянных колбах. Белки растворялись в фосфатном буфере рН 7,2. О влиянии ультразвука на белковые растворы мы судили по спектрофотометрическим данным. Для этой цели использовался спектрофотометр типа СФ-4. Спектры поглощения снимались в ультрафиолетовой области от 2300 до 3000 Å.

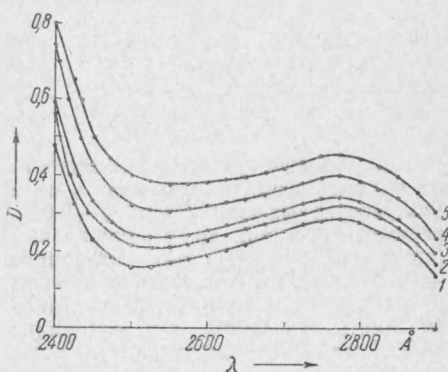


Рис. 1. Спектры поглощения 0,06% растворов яичного альбумина. 1 — до озвучивания; 2 — после озвучивания в течение 10 мин.; 3 — 20 мин.; 4 — 45 мин., 5 — 60 мин.

На рис. 1 приведены кривые поглощения 0,06% раствора яичного альбумина до и после озвучивания (продолжительность озвучивания 10, 20, 45 и 60 мин.). Полоса поглощения 2780 Å, характерная для белковых растворов, уменьшается по отношению к близлежащему минимуму в зависимости от продолжительности озвучивания. Сглаживание седла при 2780 Å на кривых поглощения, вероятно, связано с разрушением ароматических аминокислот (тирозин, триптофан, фенилаланин), входящих в состав белков. Увеличение оптической плотности всего озвученного бел-

кового раствора, обнаруженное в исследуемой области спектра (от 2400 до 3000 Å), говорит о более глубоких изменениях, претерпеваемых белковыми молекулами в поле ультразвуковых волн.

Прибавление к озвучиваемым растворам веществ, проникающих в кавитационные полости, таких, как этиловый эфир, приводит к угнетению процессов распада белка. На рис. 2 показано, что кривая поглощения, полученная при исследовании 0,06% раствора яичного альбумина до озвучивания, практически не отличается от кривой, полученной для такого же количества белка, озвученного в присутствии этилового эфира (0,01 мл этилового эфира на 10 мл белкового раствора, продолжительность озвучивания 45 мин.). Такая же закономерность обнаружена и при исследовании казеина и желатин.

По нашим данным, защитным действием обладает также глюкоза, присутствующая в растворе в относительно малых концентрациях. Инертными в этом отношении оказались следующие органические вещества:

мочевина (в небольших концентрациях), аланин, метионин, фенилаланин, лейцин и глутаминовая кислота.

Выяснилось, что путем прибавления органических веществ можно не только угнетать, но и ускорять распад белковых молекул в поле ультразвуковых волн. Как видно из рис. 2, введение в озвучиваемый белковый раствор незначительного количества четыреххлористого углерода (0,008 мл на 10 мл белкового раствора) приводит к полному исчезновению характерной полосы поглощения и к значительному увеличению оптической плотности всего раствора.

Ускорение физико-химических процессов в присутствии CCl_4 наблюдалось нами и при изучении действия ультразвука на аминокислоты (фенилаланин, тирозин). На рис. 3 приведены кривые, показывающие, что в зависимости от продолжительности озвучивания увеличивается оптическая плотность раствора фенилаланина при относительном уменьшении характерных полос поглощения. Отмечено, что незначительные концентрации CCl_4 приводят к заметному увеличению оптической плотности раствора аналогично тому, что наблюдалось для белковых растворов. Скорость распада озвученных аминокислот в присутствии CCl_4 увеличивалась во много раз. Как видно из рис. 3, оптическая плотность фенилаланина, озвученного в течение 10 мин. в присутствии CCl_4 , была выше

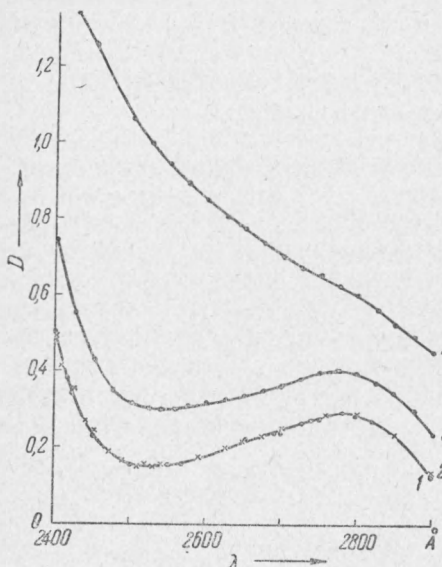


Рис. 2. Влияние органических веществ на распад яичного альбумина в поле ультразвуковых волн. 1 (точки) — 0,06% раствор альбумина до озвучивания; 2 (крестики) — 0,06% р-р альбумина + 0,01 мл эфира, озвучивание 45 мин.; 3 — 0,06% р-р альбумина, озвучивание 45 мин.; 4 — 0,06% р-р альбумина + 0,01 мл CCl_4 , озвучивание 45 мин.

оптической плотности раствора этой аминокислоты, подвергшейся озвучиванию в течение 30 мин. без CCl_4 .

При озвучивании тирозина мы также наблюдали уменьшение характерной полосы поглощения, а оптическая плотность раствора увеличивалась. При продолжительном озвучивании эффект более выражен.

В щелочной среде характерная полоса поглощения смещается в сторону более длинных волн (от 2770 до 2920 Å), что соответствует литературным данным ⁽⁹⁾. Смещение полосы поглощения в сторону длинных волн начиналось уже при растворении тирозина в буфере с pH 10. Как показано в табл. 1, в присутствии CCl_4 характерная полоса поглощения тирозина исчезает.

Таблица 1

Изменение оптической плотности (значения $D_{\text{макс}}$ и $D_{\text{мин}}$ абсорбционной кривой) раствора тирозина, подвергшегося действию ультразвука

Концентр. тирозина в %	pH буфера	До озвучивания			После озвучивания		
		$D_{\text{макс}}$	$D_{\text{мин}}$	ΔD	$D_{\text{макс}}$	$D_{\text{мин}}$	ΔD
0,005	11,28	0,82	0,36	0,46	0,92	0,57	0,35
0,005	10,50	0,65	0,32	0,33	0,77	0,53	0,24
0,001	10,9	0,37	0,21	0,16	0,53	0,44	0,09
0,005	9,2	0,48	0,3	0,18	0,60	0,47	0,13
0,001	7,20	0,39	0,25	0,14	0,52	0,40	0,12
0,001	7,20	0,39	0,25	0,14	Характерная полоса поглощения исчезла		
(в присутствии CCl_4)	—	—	—	—			

Измерения pH показали, что количество водородных ионов в растворах белков и аминокислот не меняется под действием ультразвуковых волн. Без изменений остается pH растворов и в присутствии CCl_4 . Напомним, что такое же количество (0,01 мл) CCl_4 , прибавленного к 10 мл дистиллированной воды, резко снижает pH последней ⁽⁵⁾. Резкое снижение pH воды объясняется тем, что в поле ультразвуковых волн имеет место расщепление CCl_4 , сопровождающееся выделением атомарного хлора. В случае белков и аминокислот CCl_4 не снижает pH растворов потому, что отщепляющийся атомарный хлор под действием ультразвука, повидимому, блокируется молекулами названных веществ. Последнее, вероятно, обуславливает увеличение скорости распада молекул белка и аминокислот, озвучиваемых в присутствии CCl_4 .

О действии ультразвука на белковые растворы мы судили по появ-

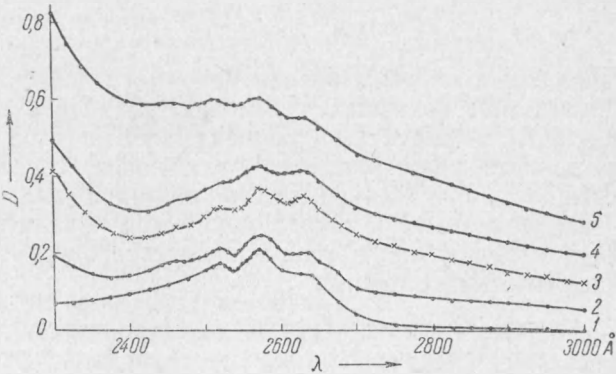


Рис. 3. Спектры поглощения 0,001 М раствора фенилаланина. 1 — до озвучивания; 2 — после озвучивания в течение 10 мин.; 3 — 20 мин.; 4 — 30 мин.; 5 — 0,001 М раствор фенилаланина + 0,01 мл CCl_4 , озвучивание 10 мин.

лению в озвучиваемом растворе восстанавливающих веществ (иодометрический метод). Оказалось, что в присутствии CCl_4 в озвучиваемом белковом растворе накапливается больше восстанавливающих веществ, чем без него.

Дальнейшие исследования показали, что CCl_4 остается инертным, если озвучивание растворов не приводит к разрушению молекул белка. При исследовании озвученных в присутствии CCl_4 растворов белка различной концентрации (0,06; 0,12; 0,24 и 0,48%) было установлено, что с увеличением концентрации уменьшается количество разрушенных молекул.

Если судить по спектрам поглощения рис. 4, то ультразвуковой эффект для 0,48% раствора казеина совершенно отсутствует.

Следует отметить, что независимо от того, производилось ли озвучивание 0,48% раствора казеина без CCl_4 или в его присутствии, интенсивность характерной полосы поглощения (2780 Å) не изменяется. Для целей спектрофотометрирования применялся 0,06% раствор белка. Эти кривые полностью совпадали с кривой поглощения 0,06% раствора казеина, не подвергавшегося озвучиванию. Прекращение разрушительного действия ультразвука с увеличением концентрации белка не имеет еще своего объяснения. Прекращение разрушительного действия ультразвука наблюдалось нами с увеличением концентрации раствора и в случаях тирозина (0,5%).

Итак, полученные нами данные об изменении кинетики распада белков и аминокислот в поле ультразвуковых волн могут быть расшифрованы только с точки зрения непрямого действия.

Наряду с этим экспериментально показано, что можно подобрать такие вещества, которые, реагируя с продуктами расщепления молекул воды, сами становятся источником радикалов, атомов и ионов, способствующих дальнейшему течению химических процессов, инициированных ультразвуковыми волнами. Возможность такого механизма значительно расширяет наши представления о характере процессов, вызываемых ультразвуком в биологических объектах.

Институт биологической физики
Академии наук СССР

Поступило
28 VI 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. Е. Эльпинер, ЖТФ, 21, 1205 (1951). ² И. Е. Эльпинер, Л. А. Blumenфельд, С. Э. Красовицкая, ДАН, 79, 495 (1951). ³ И. Е. Эльпинер, Журн. общ. биол., 15, 18 (1954). ⁴ И. Е. Эльпинер, Ц. Б. Кац, ДАН, 82, 61 (1952). ⁵ И. Е. Эльпинер, М. Д. Сурова, ДАН, 90, 1083 (1953). ⁶ М. А. Хенох, Е. М. Лапинская, ДАН, 80, 921 (1951). ⁷ Е. М. Лапинская, А. И. Миронова, М. А. Хенох, ДАН, 95, 109 (1954). ⁸ И. Е. Эльпинер, Бюлл. эксп. биол. и мед., 9, 208 (1950). ⁹ J. L. Grammer, A. Neuberg, Biochem. J., 37, 302 (1943).