

УДК 577.37

ВЛИЯНИЕ D₂O НА ВИТАЛЬНУЮ ОКРАШИВАЕМОСТЬ И ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТЬ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ЛЯГУШКИ

В. И. ДЕЩЕРЕВСКИЙ, И. А. КОРНИЕНКО

*Физический факультет МГУ
Институт биологической физики АН СССР, Москва*

Начиная с работ Льюса (1934 г.) многочисленными исследованиями было установлено, что изменение изотопного состава воды в организме приводит к нарушению процессов жизнедеятельности. Как оказалось, организмы обладают различной чувствительностью к замене протиевой воды на дейтерную в зависимости от уровня организации. Для млекопитающих повышение концентрации D₂O в питьевой воде выше 30% приводит к целому ряду патологических изменений и даже смерти животного [1]. В клетках тканевых культур млекопитающих уже при небольших концентрациях (20%) тяжелой воды в среде отмечены патологические изменения: уменьшается число митохондрий, гипертрофируется аппарат Гольджи, уменьшается количество маленьких липидных гранул (липохондрий) и появляются крупные липидосохраняющие вакуоли [2].

Сравнительно мало работ посвящено изучению функциональных расстройств, наступающих под действием тяжелой воды. Исследования на тканевых культурах и оплодотворенных яйцах морского ежа показали, что в среде с высоким содержанием D₂O наступает быстрое расстройство механизмов клеточного деления, митотический процесс блокируется на любой стадии [3]. Исследования Каминера [4], проведенные на изолированном сердце лягушки с одновременной регистрацией электрограммы и механограммы сердца, показали, что перфузия вместо обычного рингеровского раствора раствором, приготовленным на 99%-ной дейтерной воде, приводит к диссоциации электрической и сократительной активности сердца. Сердечная мышца сохраняет способность к автоматической генерации и проведению потенциалов действия, однако ее сократительная способность полностью выпадает.

В согласии с результатами Каминера наши предварительные исследования на портняжной мышце лягушки показали, что под действием тяжелой воды повышается порог возбуждения и нарушается сократимость мышцы.

Приведенные данные, по-видимому, свидетельствуют о том, что тяжелая вода в силу присущих ей каких-то токсических свойств нарушает ряд физиологических процессов, связанных главным образом с сократительными свойствами внутриклеточных структур. Функциональные расстройства живых структур под действием различных повреждающих агентов наступают, как правило, одновременно с развитием комплекса неспецифических изменений протоплазмы (паранекроза). Д. Н. Насоновым с сотрудниками было показано, что развитие паранекротических изменений сопряжено с увеличением способности прото-

плазмы сорбировать витальные красители; избыток связанного клетками красителя служит количественным показателем глубины паранекротических изменений [5]. Мы использовали этот метод для исследования влияния D₂O на состояние цитоплазмы скелетных мышц лягушки.

Изменение сорбционных свойств изолированных портняжных мышц лягушки в тяжелой воде

Отпрепарированные портняжные мышцы лягушки *R. temporaria* выдерживали в рингеровском растворе (без соды) около 1 часа, а затем прокрашивали в течение 40 мин. при 18—19° в 0,02%-ном растворе нейтрального красного, разведенного на рингеровском растворе, содержащем 50 и 99% D₂O (опыт), и обычном рингеровском растворе (контроль). Затем краситель из мышц экстрагировали в определенном объеме 70%-ного подкисленного спирта, а вытяжки колориметрировали на фотоэлектроколориметре (ФЭК-М). Разность оптических плотностей (опыт — контроль) для парных мышц, отнесенную к оптической плотности контроля, усредняли и находили ошибку средней. Результаты представлены в табл. 1—3.

Таблица 1

Разница в окраске портняжных мышц правой и левой лапок лягушки	
№ опыта	Изменение окраски, %
1	-3,7
2	2,0
3	0,0
4	11,0
5	0,0
6	3,5
7	-2,5
8	-4,0
9	0,0
10	9,6
11	-8,0
12	-1,4
Среднее арифметическое	0,5±1,6

Таблица 2

Изменение сорбции красителя портняжными мышцами лягушки в 50%-ной тяжелой воде	
№ опыта	Изменение окраски, %
1	-46
2	-8
3	+10
4	-13
5	+21
6	-3
7	-19
8	+4
9	-8
10	+18
11	-6
12	-5
Среднее арифметическое	-3±3,7

Таблица 3

Изменение сорбции красителя портняжными мышцами лягушки в 95%-ной тяжелой воде	
№ опыта	Изменение окраски, %
1	-32
2	+3
3	-10
4	-29
5	-16
6	-4
7	+10
8	-14
9	-3
10	-3
Среднее арифметическое	-10±3,8

Табл. 1 позволяет оценить погрешность методики. В опыте, результаты которого представлены в этой таблице, все мышцы прокрашивались в обычном рингеровском растворе. За контроль условно принята левая мышца.

Результаты, представленные в табл. 2 и 3, свидетельствуют о том, что сорбция красителя в тяжелой воде не увеличивается, а уменьшается. Уменьшение сорбции в 50%-ной тяжелой воде мало достоверно, в 95%-ной — более достоверно. Результаты этих опытов показывают, что тяжелая вода во всяком случае не вызывает паранекротических изменений мышечной ткани. Напротив, уменьшение сорбции красителя может быть связано с увеличением стабильности внутриклеточных структур при замене H₂O на D₂O. Хороший показатель стабильности внутриклеточных структур — их теплоустойчивость. В связи с этим мы провели исследование влияния тяжелой воды на теплоустойчивость сократительных структур мышечной ткани.

Изменение теплоустойчивости изолированных портняжных мышц лягушки под влиянием тяжелой воды

За меру теплоустойчивости сократительных структур можно принять минимальную температуру, при которой начинается тепловая контрактура мышцы.

Мышцу в пробирке с рингеровским раствором, приготовленным на тяжелой или легкой воде, укрепляли в сосуде, подключенном к водяному термостату. Один ее конец фиксировали на дне пробирки, а другой прикрепляли к устройству, записывающему изотоническое сокращение мышцы на ленте самописца. Теплоустойчивость измеряли в условиях

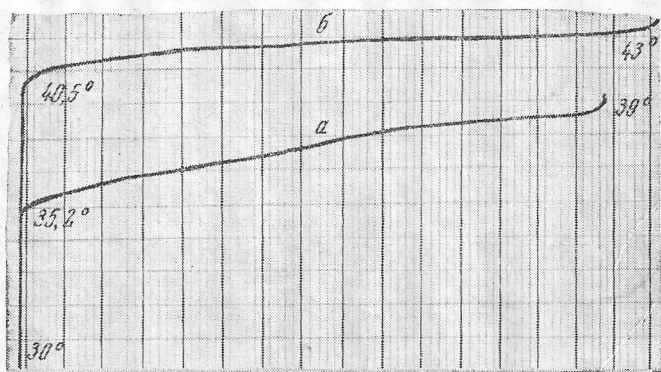


Рис. 1. Тепловая контрактура портняжной мышцы лягушки в легкой (а) и тяжелой (б) воде

Сокращение мышцы вызывает отклонение пера самописца в горизонтальном направлении

линейного возрастания температуры. Температура в сосуде повышалась с постоянной скоростью $1,3^{\circ}$ в минуту, одинаковой для всех опытов. Точность регистрации температуры начала контрактуры $0,1^{\circ}$. До начала нагревания мышцы выдерживали в рингеровском растворе, разведенном на D_2O (опыт) и на H_2O (контроль). Разность теплоустойчивостей опыт—контроль для парных мышц усредняли и находили ошибку средней.

Результаты первых же опытов показали, что тепловая контрактура мышц, выдержанных в 95%-ной тяжелой воде, существенно не отличается от контрольных, но протекает при более высоких температурах; теплоустойчивость повышается в среднем на $5,6^{\circ}$ (рис. 1).

Результаты аналогичных опытов с различными концентрациями D_2O сведены в табл. 4.

График зависимости средних сдвигов теплоустойчивости от концентрации тяжелой воды имеет S-образную форму.

Для выяснения зависимости величины эффекта от времени нахождения мышцы в тяжеловодном рингеровском растворе (95% D_2O) был поставлен ряд опытов, в которых это время варьировалось от 5 мин. до 18 час. Средний сдвиг теплоустойчивости во всех случаях был одинаковым ($5,6^{\circ}$). Полное исключение предварительного выдерживания также не меняло величины сдвига. Это означает, что процессы, ответственные за повышение теплоустойчивости в тяжелой воде, развиваются за время, меньшее длительности опыта определения теплоустойчивости (5—6 мин.). Для определения минимального времени, необходимого для проявления эффекта тяжелой воды, методика исследования была несколько изменена.

Опыты проводили при постоянной температуре 38°. Это выше средней теплоустойчивости мышцы, находящейся в обычной воде (35°), и ниже средней теплоустойчивости в тяжелой воде (41°). Замену легководородного рингеровского раствора на дейтерный производили одновременно с помещением мышцы в термостатированный сосуд. Почти сразу мышца начинает сокращаться. Однако это сокращение быстро

Таблица 4

Зависимость сдвига теплоустойчивости портяжной мышцы лягушки от концентрации D_2O

Концентрация D_2O , %	Число опытов	Средний сдвиг теплоустойчивости и ошибка средней, градусы
20	10	0,4±0,2
50	10	2,8±0,2
80	10	5,5±0,4
95	15	5,6±0,2

прекращается, что свидетельствует о том, что тяжелая вода проникла в клетку и оказала стабилизирующее действие (рис. 2, б). Мышца успевает сократиться не более чем на $1/15$ обычного контрактурного укорочения. Средний отрезок времени от момента замены рингеровского раствора до прекращения сокращения равен 60 ± 9 сек.

Подобным образом было определено время исчезновения эффекта D_2O при замене тяжеловодного рингеровского раствора на обычный. В среднем через 90 ± 9 сек. после смены растворов мышца

начинает сокращаться, что свидетельствует об уменьшении концентрации тяжелой воды в мышечных волокнах ниже уровня, необходимого для стабилизации мышечных структур при данной температуре (38°) (рис. 2, а).

Обсуждение

Существенное увеличение теплоустойчивости под влиянием D_2O подтверждает предположение об увеличении стабильности клеточных структур в тяжелой воде. Высокая скорость проявления действия и независимость эффекта от времени выдерживания мышц позволяют оценить вероятность осуществления различных механизмов повышения стабильности клеточных структур в тяжелой воде.

Увеличение стабильности биологических структур (устойчивости к тепловому повреждению) может быть результатом усиления компенсаторных процессов или выделения специальных стабилизаторов. В настоящее время известны адаптивные изменения теплоустойчивости, связанные, по-видимому, с таким механизмом (температурное «закаливание» [6]). Для включения данного механизма необходимо повреждающее воздействие и требуется время для его проявления. В нашем случае этот механизм едва ли имеет место, так как тяжелая вода не вызывает повреждения структур и эффект ее воздействия проявляется одновременно с обменом внутриклеточной воды.

Другой возможный механизм повышения теплоустойчивости — изменение сил некоторых типов связей, ответственных за стабилизацию макромолекул и их комплексов. Устойчивость макромолекулярных

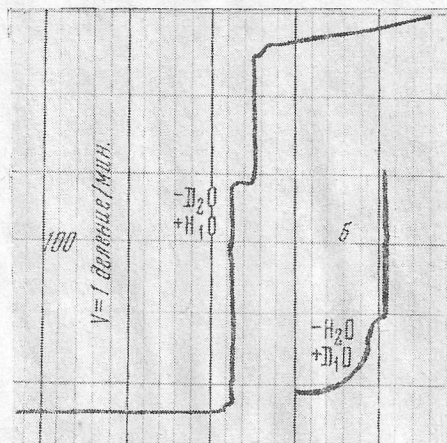


Рис. 2. Изменение теплоустойчивости портяжной мышцы лягушки при замене D_2O на H_2O (а); H_2O на D_2O (б)

структур в растворе определяется изменением полной свободной энергии ΔF при конфигурационных переходах «нативное — денатурированное» состояние или высотой активационного барьера перехода ΔF^* . ΔF и ΔF^* зависят как от баланса энергии внутримолекулярных связей, так и от взаимодействия макромолекул с растворителем. При замене растворителя могут изменяться энергии внутримолекулярных связей (внутренние водородные и солевые связи) и связей, обусловленных взаимодействием макромолекул с растворителем (водородные связи с молекулами воды и гидрофобное связывание неполярных участков макромолекул).

Существующие данные об изменении длин водородных связей при замене H на D [7; 8] свидетельствуют о том, что все типы водородных связей, в том числе связь N—H... O—C в α -спирали, при дейтеризации ослабевают. Исключение составляют водородные связи между молекулами воды [9—11]. Таким образом, стабилизацию нативных конфигураций некоторых макромолекул в тяжелой воде [12] нельзя объяснить изменением энергии внутренних водородных связей, хотя ослабление внешних водородных связей и усиление связей между молекулами воды может играть заметную роль. В нашем случае этот вывод подтверждается сравнением кинетики замещения водорода на дейтерий в белках [13] с кинетикой повышения теплоустойчивости мышц в D₂O. Значительная часть водородных атомов сравнительно несложной молекулы рибонуклеазы обменивается достаточно медленно (20 час.). Высокая скорость стабилизирующего действия D₂O и независимость величины эффекта от времени в интервале от 5 мин. до 18 час. свидетельствуют о том, что в механизме повышения теплоустойчивости могут играть роль только быстрообменивающиеся водородные связи.

Недавние работы Свайна и Бадера [14], а также Немети и Шераги [15] делают вероятным предположение об усилении в тяжелой воде солевых связей и гидрофобных взаимодействий неполярных участков макромолекул. Это связано с различными свойствами легкой и тяжелой воды как растворителей.

Высокая скорость проявления эффекта D₂O, соизмеримая со скоростью обмена клеточной воды, согласуется с представлениями об участии этих типов связей в механизме повышения теплоустойчивости мышцы в тяжелой воде.

Уменьшение сорбции красителя мышцами в тяжелой воде, полученное в наших опытах, можно объяснить уменьшением числа свободных зарядов на коллоидах протоплазмы, способных связать молекулы красителя, вследствие увеличения вероятности замыкания солевых мостиков между поверхностными зарядами молекул и общего уменьшения поверхности коллоидов.

Белки актомиозинового комплекса имеют около 30% аминокислот с длинными неполярными остатками [16]. Усиление гидрофобных взаимодействий и солевых связей в тяжелой воде может привести к «гиперстабилизации» этого комплекса, к нарушению сократительной функции. Усиление гидрофобного связывания может также нарушить структуру мембран клетки, так как липиды играют важную роль в их организации.

Эти представления могут в какой-то степени объяснить функциональные расстройства [3; 4] и цитологические изменения [2], возникающие в клетке под действием тяжелой воды.

Исследование физиологических эффектов влияния D₂O предоставляет новую возможность изучения роли внутриклеточной воды как фактора, влияющего на стабильность и функциональную активность клеточных структур.

Выводы

1. В тяжелой воде сорбция витального красителя портняжной мышцей лягушки уменьшается.
2. Увеличение концентрации тяжелой воды повышает теплоустойчивость мышцы.
3. Повышение теплоустойчивости мышцы в D_2O обусловлено различием свойств тяжелой и легкой воды как растворителей.

Поступила в редакцию
22.II.1963

ЛИТЕРАТУРА

1. Katz J., Sec. Unit. Nat. Internat. Conf. in the Peaceful Uses of Atomic Energy 24, 25
2. Rothstein, Hartzell, Hanson, Kritchevsky, Ann. N. Y. Acad. Sci. 84, 1960
3. Gross, Spindel, Science 131, 37, 1960
4. Kammer B., Nature 185, 172, 1960
5. Насонов Д. Н., Местная реакция протоплазмы и распространяющееся возбуждение. Изд. АН СССР, 14, 1962
6. Александров В. Я., Ботан. ж. 41, 939, 1956
7. Hydrogen Bonding. Pergamon Press, 1959
8. Tomita K., Rich A., J. Mol. Biol. 4, 83, 1962
9. Kirshenbaum, Phys. Prop and Anal. of Heavy Water
10. Wang I., J. Amer. Chem. Soc. 73, 4181, 1951
11. Long, Kemp, J. Amer. Chem. Soc. 58, 1829, 1936
12. Scheraga H. A., Ann. N. Y. Acad. Sci. 84, 608, 1960
13. Schildkraut C., Scheraga H., J. Amer. Chem. Soc. 82, 58, 1960
14. Swain C., Bader R., Tetrahedron 10, 3/4, 1960
15. Nemety, Scheraga, J. Chem. Phys. 36, 12, 1962
16. Иванов И. И., Юрьев В. А., Биохимия и патобиохимия мышц. Медгиз, Л., 109, 1961