

XV 538
39

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

БИОФИЗИКА

ЖУРНАЛ ОСНОВАН В 1956 ГОДУ

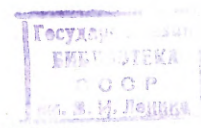
ВЫХОДИТ 6 РАЗ В ГОД

МОСКВА

ТОМ XVI, ВЫП. 3

МАЙ — ИЮНЬ

1971 г.



СОДЕРЖАНИЕ

Молекулярная биофизика

В. Я. Малеев, М. А. Семенов. Гиперхромизм нуклеиновых кислот в инфракрасной области	389
А. Плученничак, Е. В. Гусев, Г. М. Баренбойм. Ультрафиолетовая спектроскопия нуклеопротеидов. I. Определение вклада светорассеяния при регистрации электронных спектров поглощения на примере нуклеопротеидов	398
Е. М. Попов, В. З. Плетнев. Теоретический конформационный анализ циклических тетрадепептидов	407
И. С. Мейланов, Я. М. Золотовицкий, В. А. Бендерский. Фотоэффект на границе слоев хлорофилла с раствором электролита	415
Ф. Ф. Литвин, В. И. Звалинский. Полупроводимость фотосинтетических структур и ее связь с фотосинтезом	420
В. Б. Евстигнеев, Н. А. Садовникова, А. П. Костиков, З. П. Грибова, Л. П. Каюшин. Зависимость сигнала электронного парамагнитного резонанса при фотоокислении хлорофилла хиноном от кислотности среды	431

Биофизика клетки

Ю. А. Чизмаджев, В. С. Маркин, Р. Н. Куклин. Эстафетный перенос ионов через мембраны. II. Переменный ток	437
С. М. Безручко, Т. А. Аджимолаев, Н. И. Воженина, К. Г. Газарян. Влияние температуры на мембранный потенциал и включение H^3 -уридина и H^3 -лизина в клетках ганглиев тритонии	443
Л. Г. Магазаник, Г. А. Наследов. Потенциалы равновесия постсинаптической мембраны тонического волокна лягушки при изменении внеклеточной ионной среды	450
В. Г. Шахбазов, Г. С. Лобынцева. Биоэлектрические свойства ядра и ядрышка в клетках растений в связи с генотипом, физиологическим состоянием и действием высокой температуры	457
Г. Г. Демирчоглян, Х. О. Нагапетян, Л. А. Гаспарян. Вызванные светом потенциалы суспензии внешних сегментов фоторецепторов	462
А. Д. Макаров, И. М. Карташов. Некоторые особенности окисления и восстановления НАДФ хлоропластами	467
А. Ф. Ванин, А. А. Каспаров, Э. И. Матханов. Изменение спектров ЭПР печени мышей при интоксикации борной кислотой и четыреххлористым углеродом	472
А. В. Алесенко, Н. И. Дубинская, Е. Б. Буракова. Суточные колебания антиокислительной активности липидов и суточный ритм митозов органов интактных мышей	476

Биофизика сложных систем. Математические модели

А. М. Молчанов. Многобарьерный иммунитет	482
В. И. Кринский, Н. И. Кукушкин, М. Е. Саксон. Уменьшение латентности как критерий эффективности антиаритмических средств	488

- Б. И. Ходоров, Е. Н. Тимин.** Теоретический анализ механизмов проведения нервных импульсов по неоднородному аксону. V. Феномены Введенского в участках волокна с пониженной натриевой и калиевой проводимостью мембраны клеточных контактов (электрические свойства) 404
М. Б. Беркинблит, С. А. Ковалев, В. В. Смолянинов, Л. М. Чайлахян. Модель клеточных контактов (электрические свойства) 504
А. А. Петров. Об алгоритмах предварительной обработки сигналов в зрительном анализаторе 512
В. Л. Дунин-Барковский. Некоторые свойства группы параллельно работающих нейронов. I. Нейронный пул без связей 520
И. М. Родионов. I. Исследование эффективности нейрогенных сосудосуживающих влияний в зависимости от исходного радиуса сосудов 526
В. М. Эльясберг, Г. И. Грачев, Г. С. Кан, А. А. Карлов, В. Н. Косолапов. Моделирование процесса изменения внутриклеточного потенциала мышечного волокна в зависимости от активности моторного аксона мышцы открывателя клешни речного рака 534

Письма в редакцию

- А. Г. Безрукова, В. А. Палатов.** Изменение поглощения и флуоресценции растворов инсулина и тирозина в ультрафиолетовой области спектра под действием ионизирующей радиации 544
В. А. Беляков, В. Б. Евстигнеев. Хемилюминесценция при реакциях восстановления фотоокисленного хлорофилла 544
А. Г. Дудолов, К. С. Тринчер. Сегнетоэлектрические свойства внутриклеточной воды и их значение в магнитобиологии 547
И. Д. Дрынов, И. Г. Харитоненков. Исследование конкурентного взаимодействия ДНК и полифосфата с акридиновым оранжевым 551
Г. В. Гурская, С. Я. Карпухина, Г. М. Лобанова. Исследование кристаллической каталазы 553
А. И. Климов, В. И. Дещеревский. Изучение растворимости неполярных аминокислот в легкой и тяжелой воде в связи с термостабильностью белков 556
Е. А. Нейфах. Свободнорадикальный механизм сверхслабой хемилюминесценции, сопряженной с перекисным окислением ненасыщенных жирных кислот 560
В. М. Чумаков, Г. Л. Григорян, В. И. Сускина, Э. Г. Розанцев, А. Э. Калмансон. Исследование «спин-метки» в тканях животных 564
Г. А. Золенко. Аналоговое моделирование биоэлектрической активности процессами гетерогенного катализа 566
М. Б. Беркинблит, И. Дудзявичус, Л. М. Чайлахян. Зависимость скорости распространения импульса в нервном волокне от емкости его мембраны 569
Г. П. Потылицин. О сглаживании статистической зависимости между импульсной активностью и сверхмедленными колебаниями потенциала, протекающими в экстраклеточной среде нейрона 571

Рефераты депонированных рукописей

- И. М. Спектор.** Энергия активации и величина вариации функциональной активности (изучение эритроцитов и гемоглобина) 574

CONTENTS

Molecular Biophysics

- V. Ja. Maleev, M. A. Semyonov.** Hyperchromism of nucleic acids in the infrared region 389
A. Pluchennichak, E. V. Gusev, G. M. Barenboym. I. Rated determination of light scattering contribution when recording absorption electron spectra on nucleoproteins taken as an example 398
E. M. Popov, V. Z. Pletnev. Theoretical conformational analysis of cyclic tetradepsipeptides 407
I. S. Meylanov, Ya. M. Zolotovitsky, V. A. Bendersky. Photoeffect on the border of chlorophyll layers with electrolyte solution 415
F. F. Litvin, V. I. Zvalinsky. Semiconductance of photosynthetic structures and its connection with photosynthesis 420
V. B. Evstigneev, N. A. Sadovnikova, A. P. Kostikov, Z. P. Gribova, L. P. Kayushin. Dependence of electron spin resonance signal on medium acidity during quinon-photooxidation of chlorophyll 431

Cell Biophysics

- Yu. A. Chizmadzhev, V. S. Markin, R. N. Kuklin.** Relay-race transport of ions through the membrane. II. Alternating current 437
S. M. Bezruchko, T. A. Adzhimolaev, N. I. Vozhenina, K. G. Cazaryan. Temperature effect on membrane potential and inclusion of H³-uridine and H³-lyzine in the cells of Tritonium ganglia 443
L. G. Magazanik, G. A. Nasledov. Equilibrium potentials of postsynaptic membrane of frog tonic fibre during the change of extracellular ionic medium 450
V. G. Shakhbazov, G. S. Lobyntseva. On bioelectric properties of the plant cellular nucleus 457
G. G. Demirchoghlian, Kh. H. Nahapetian, L. A. Gasparian. Light-evoked potentials in suspension of outer segments of photoreceptors 462
A. D. Makarov, I. M. Kartashov. Some specifics of NADP oxidation and reduction by chloroplasts 467
A. F. Vanin, A. A. Kasparov, E. I. Matkhanov. Change in ESR spectra of mouse liver intoxicated with boric acid and carbon tetrachloride 472
A. V. Alesenko, N. I. Dubinskaya, E. B. Burlakova. Daily variations of antioxidant activity of lipids and daily rhythm of mitoses of intact mice organs 476

Complex System Biophysics. Mathematical Models

- A. M. Molchanov.** Multibarrier immunity 482
V. I. Krinsky, N. I. Kukushkin, M. E. Saxon. The latency decrease as a criterion for the efficiency of antiarrhythmic agents 488
B. I. Khodorov, E. N. Timin. Theoretical analysis of the mechanisms of nerve impulses propagation along a nonuniform axon. V. Vvedensky phenomena in the region of nerve fiber with decreased sodium and potassium conductances 494
M. B. Berkinblit, S. A. Kovalev, V. V. Smolyaninov, L. M. Chaylakhyan. Model of cell contacts (electric properties) 504
A. A. Petrov. On algorithms of preliminary data processing in the visual system 512
V. L. Dunin-Barkovsky. Some properties of the group of neurons working in parallel. I. Neuron pool without bonds 520
I. M. Rodionov. Study of the efficiency of neurogenic vessels narrowing the effects due to the initial radius of vessels 526

STUDY OF CRYSTALL CATALASE

G. V. GURSKAYA, S. Ya. KARPUKHINA, G. M. LOBANOVA

Institute of Crystallography, Acad. Sci. USSR, Moscow

The data are presented on crystallization and X-ray study of the enzyme catalase. The conditions are given for obtaining hexagonal and rhombic forms of crystals. The technique of the X-ray analysis is given.

ИЗУЧЕНИЕ РАСТВОРИМОСТИ НЕПОЛЯРНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ЛЕГКОЙ И ТЯЖЕЛОЙ ВОДЕ В СВЯЗИ С ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬЮ БЕЛКОВ

А. И. КЛИМОВ, В. И. ДЕЩЕРЕВСКИЙ

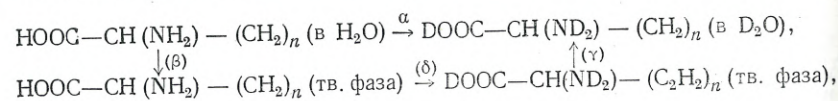
Физический факультет Московского государственного университета
имени М. В. Ломоносова,
Институт биологической физики АН СССР, г. Пущино (Московская область)

В работе изучены растворимости неполярных аминокислот алифатического ряда в легкой и тяжелой воде. С точностью до ± 5 кал/моль определены стандартные свободные энергии $\delta\Delta F$ переноса неполярных боковых радикалов аминокислот из H_2O в D_2O . Показано, что основной вклад в $\delta\Delta F$ обусловлен первой CH_2 -группой алифатической цепи («эффект экранировки полярных взаимодействий»). Вклад в $\delta\Delta F$ удаленных звеньев алифатической цепи (изменение гидрофобных взаимодействий) при 12° отрицателен, при 25° приблизительно равен нулю, а при 47° не превышает $+10$ кал/моль CH_2 -групп. Подобного усиления гидрофобных взаимодействий недостаточно для объяснения увеличения термостабильности белков в D_2O .

Рядом исследователей отмечено, что замещение H_2O на D_2O вызывает существенное увеличение термостабильности белков и полипептидов [1—9]. В качестве одного из возможных объяснений этого эффекта было выдвинуто предположение об усилении гидрофобных взаимодействий неполярных боковых радикалов аминокислот в тяжелой воде [10].

Чтобы оценить возможность такого механизма, надо определить изменение стандартной свободной энергии в процессе переноса неполярных (углеводородных) групп из легкой воды в тяжелую. С этой целью нами изучены растворимости α -аминокислот алифатического ряда в H_2O и D_2O .

Процесс (α) переноса аминокислоты из H_2O в D_2O может быть разбит на процессы (β), (γ) и (δ), представленные на схеме (1):



где $(\text{CH}_2)_n$ ($n=0,1,2,\dots$) обозначает неполярный боковой радикал (случай $n=0$ соответствует глицину). Схема (1) учитывает, что при растворении аминокислот в D_2O происходит дейтерирование лабильных водородов $-\text{NH}_2$ и $-\text{COOH}$ -групп (приводящее, с одной стороны, к соответствующему увеличению молекулярного веса аминокислоты, с другой, — к понижению концентрации D_2O в растворе). Кроме того, учитывается, что дейтерирование аминокислоты в твердой фазе может сказаться на энергии ее связей в кристалле.

Определить интересное нас изменение стандартной свободной энергии $\delta\Delta F$ в процессе переноса неполярной боковой группы из H_2O в D_2O можно лишь при следующих двух предположениях.

1. Химический потенциал любой аминокислоты как в твердой фазе (μ_T), так и в растворе (μ_0) представляет собой аддитивную функцию составляющих ее полярных и неполярных частей, т. е.

$$\mu_T = \mu_{T,\pm} + \mu_{T,\phi}; \quad \mu_0 = \mu_{0,\pm} + \mu_{0,\phi}.$$

2. Глицидовые (полярные) остатки аминокислот взаимодействуют с растворителем и друг с другом (в кристалле) так же, как и свободный глицин, т. е.

$$\mu_{T,\pm} = \mu_{T,\text{гли}}; \quad \mu_{0,\pm} = \mu_{0,\text{гли}}. \quad (3)$$

Поскольку неполярные группы не дейтерированы в D_2O , для их кристаллического состояния

$$\mu_{T,\phi}^D = \mu_{T,\phi}^H. \quad (4)$$

Легко показать, что из схемы (1) с учетом (2) и (4) для любой аминокислоты имеет место равенство

$$\mu_{0,\text{гли}}^D - \mu_{0,\text{гли}}^H + \mu_{0,\phi}^D - \mu_{0,\phi}^H = \mu_T^D - \mu_T^H - kT \ln \frac{X^D}{X^H}, \quad (5)$$

где X^D, X^H — мольные доли аминокислоты в насыщенных растворах D_2O и H_2O соответственно (считается, что коэффициенты активностей аминокислот в H_2O и D_2O одинаковы [10]). Вычитая из уравнения (5) аналогичное уравнение, записанное для глицина, получаем

$$\mu_{0,\phi}^D - \mu_{0,\phi}^H = kT \ln \frac{X_{\text{гли}}^D}{X_{\text{гли}}^H} = kT \ln \frac{X^D}{X^H}.$$

Отсюда интересное нас изменение стандартной свободной энергии при переносе одного моля неполярных групп аминокислоты из легкой воды в тяжелую определяется как

$$\delta\Delta F = RT \ln \frac{X_{\text{гли}}^D}{X_{\text{гли}}^H} - RT \ln \frac{X^D}{X^H}. \quad (6)$$

Методика. Испльзованные в работе аминокислоты имели классификацию «ч», кроме глицина «хч» и L-аланина (ч.д.а.). Растворение производилось в H_2O (тридистиллат из стекла) и в D_2O (концентрация 97,7%, удельная электропроводность $4 \cdot 10^{-6}$ мо-см). С целью предотвращения понижения концентрации D_2O в растворе наиболее растворимые аминокислоты (глицин, аланин, α -аминомасляная) подвергались предварительному дейтерированию путем перекристаллизации из D_2O .

Процесс растворения длился не менее суток. Кюветы — из органического стекла с завышающейся крышкой. Герметичность достигалась с помощью прокладки из тефлона. Кюветы с H_2O и D_2O имели общую термостатирующую рубашку. Точность поддержания температуры $\pm 0,1^\circ$. Использовали магнитную мешалку. Для быстрого выравнивания изотопного состава водорода в воде и в кристаллической аминокислоте растворы предварительно нагревали до 65° , а затем охлаждали до 5° . После установления нужной температуры, примерно в середине процесса растворения, в кювету опускали обратный стеклянный фильтр, предварительно выдержанный в термостате, и растворение продолжалось при опущенном фильтре. Пробы (0,2—1,0 мл) отбирали из внутренней полости фильтра шприцем и переносили на тефлоновую подложку, находящуюся на чашке весов. По кинетике высыхания пробы, экстраполяцией, определяли ее начальный вес. Для каждой аминокислоты при данной температуре отбирали по три—пять проб. Высушивали при 70° (удаление основной массы воды), а затем при 120° до постоянного веса. Взвешивание производили на полумикровесах марки ВМ-20-М. Относительная точность метода в определении растворимости составляет 0,3%.

Концентрацию D_2O в насыщенном растворе определяли с точностью до 0,01% на интерферометре ИТР-2 по показателю преломления [11а]. Перед определением концентрации D_2O раствор подвергали перегонке по методу, описанному в [11б]. При расчете данных для тяжелой воды учитывалось, что аминокислоты дейтерированы не полностью. Считалось, что процентное содержание дейтерированных аминокислот равно процентному содержанию дейтерия в тяжеловодном растворе (специально проделанный опыт подтвердил правильность такого предположения). Средние молекулярные веса тяжеловодного растворителя и дейтерированной аминокислоты определяются, таким образом, по формулам:

$$M_{D_2O} = \frac{20,029\alpha + 18,016(100 - \alpha)}{100}; \quad M_{\text{дейт.АК}} = M_{\text{АК}} + 0,03\alpha,$$

где α — процентное содержание D_2O в растворе. Полученные данные затем линейно экстраполировались к 100%-ной концентрации D_2O .

Результаты и обсуждение. Полученные в работе результаты представлены в таблице. Наши данные по растворимости аминокислот в H_2O хорошо согласуются с литературными [12]. Ошибка в определении $\delta\Delta F$ составляет ± 5 кал/моль.

Растворимость аминокислот в легкой и тяжелой воде и изменение стандартной свободной энергии при переносе неполярных боковых радикалов аминокислот из H₂O в D₂O

Аминокислота	t, °C	$\chi^H \cdot 10^{-3}$	$\chi^D \cdot 10^{-3}$	χ^H/χ^D	$\delta\Delta F$
Глицин	12	43,54	43,27	1,006	3
	25	57,03	56,72	1,005	3
	35	63,05	63,05	1,000	0
	47	82,63	82,82	0,993	-1
L-аланин	12	23,90	27,39	1,055	30
	25	32,73	31,52	1,033	22
	35	36,25	35,10	1,033	20
	47	40,91	39,85	1,027	17
L- α -аминомасляная кислота	12	33,14	36,62	1,042	23
	25,3	33,46	37,40	1,028	16
	35	40,11	33,76	1,035	21
	45,3	42,05	40,89	1,027	17
L-н-валин	12	14,01	13,51	1,037	20
	25	13,65	13,24	1,031	22
	33	13,63	13,10	1,040	24
	47	13,93	13,36	1,043	27
DL-н-лейцин	12	1,299	1,271	1,021	12
	25	1,531	1,504	1,051	29
	35	1,813	1,720	1,054	32
	47	2,319	2,173	1,037	41
L-н-лейцин	25	2,523	2,436	1,037	21
DL-лейцин	25	1,375	1,325	1,033	22

Из таблицы видно, что в пределах экспериментальной ошибки (0,6%) глицин одинаково растворим в H₂O и D₂O. Для остальных аминокислот во всем исследованном интервале температур $\delta\Delta F > 0$, как и должно быть при усилении гидрофобных взаимодействий в тяжелой воде по сравнению с легкой. Однако тогда же следовало бы ожидать возрастания величины $\delta\Delta F$ с ростом длины углеводородного радикала [10]. Из таблицы же видно, что при 25° эти величины для различных аминокислот практически одинаковы. Это означает, что изменения стандартной свободной энергии переноса обусловлены «экранировкой полярных взаимодействий». Дело в том, что изотопное замещение водорода может вызвать изменение взаимодействий полярных (глициловых) групп аминокислот как с растворителем, так и друг с другом в кристалле. Одинаковая растворимость дейтерированного глицина в D₂O и протонированного в H₂O в свете этого предположения может означать только взаимную компенсацию этих изменений, т. е. если дейтерированный кристалл сильнее «удерживает» глицин, то в растворе же сродство глицина к D₂O больше, чем к H₂O. Предположим, что добавление к глицину углеводородного радикала не меняет полярных взаимодействий в кристалле, поскольку они обусловлены направленными водородными связями (как показано в [14], в кристаллах аминокислот алифатического ряда все водородные связи направлены). Полярные же взаимодействия глициловой группы с водой могут иметь ненаправленный, «объемный» характер, причем значительная часть энергии приходится на взаимодействие с ближайшим слоем воды. В этом случае присоединение к глицину углеводородного радикала приведет к оттеснению части молекул воды из первого слоя и компенсация изменений полярных взаимодействий в кристалле и в растворе будет неполной. Это и приводит к появлению положительной свободной энергии при переносе аминокислоты из H₂O в D₂O. Очевидно, что «эффект экранировки» должен слабо зависеть от длины неполярной боковой цепи.

При температурах, отличных от 25°С, величины $\delta\Delta F$ зависят от числа звеньев в боковой цепи аминокислот, причем при 12° стандартная свободная энергия переноса уменьшается в ряду от аланина к норлейцину, а при 35 и 47°, наоборот, возрастает в этом ряду. Видимо, это объясняется тем, что кроме полярной части аминокислот («эффект экранировки») на величину $\delta\Delta F$ влияют удаленные звенья углеводородного радикала. Такой вклад в $\delta\Delta F$ может быть интерпретирован как изменение гидрофобных взаимодействий в D₂O: при низких температурах они ослабляются, а при высоких — усиливаются по сравнению с таковыми в H₂O. В районе 25° вклад удаленных

звеньев боковой цепи в $\delta\Delta F$ приблизительно равен нулю, поэтому при этой температуре величина $\delta\Delta F$ определяется лишь эффектом экранировки и почти не зависит от длины углеводородного радикала.

Таким образом, можно полагать, что величина стандартной свободной энергии переноса аминокислот из H₂O в D₂O является суммой двух членов:

$$\delta\Delta F = (\delta\Delta F)_{\text{экр}} + (\delta\Delta F)_{\text{ГФ}}$$

где $(\delta\Delta F)_{\text{экр}}$ — определяется различиями во взаимодействиях полярных групп с молекулами H₂O и D₂O (эффект экранировки), а $(\delta\Delta F)_{\text{ГФ}}$ — различиями в степени структурированности легкой и тяжелой воды вблизи неполярных боковых групп (гидрофобные взаимодействия [13]). При этом температурная зависимость величины $(\delta\Delta F)_{\text{ГФ}}$ такова, что при низких температурах она отрицательна, и, проходя через ноль в районе 25°, становится положительной при высоких температурах. Усиление гидрофобных взаимодействий в D₂O по сравнению с H₂O при 47° может быть количественно оценено на основании наших данных величиной в 5—10 кал/моль —CH₂-групп. На примере РНКазы можно показать (подобно тому, как это сделано в [5]), что сдвиг температуры денатурации этого белка за счет указанного усиления гидрофобных взаимодействий не должен превышать 1°. Экспериментально же наблюдаемый сдвиг термостабильности рибонуклеазы в D₂O равен 4° [5]. Следовательно, должны существовать какие-то иные механизмы повышения термоустойчивости белков в тяжелой воде. Возможно, что такой механизм связан с явлениями, аналогичными «эффекту экранировки», т. е. с изменениями взаимодействий заряженных поверхностных групп белка с молекулами D₂O по сравнению с H₂O. Однако этот вопрос требует дальнейшего детального рассмотрения.

Изучение растворимости аминокислот в легкой и тяжелой воде при 25° проводили также Крешек, Шнейдер и Шерага [10], которые пришли к выводу о значительном возрастании величины $\delta\Delta F$ с ростом длины цепи углеводородного радикала (при 25° они получили величину, равную приблизительно 20 кал/моль —CH₂-групп). Указанные результаты значительно отличаются от наших. По-видимому, это связано с тем, что они не учитывали изотопного обмена дейтронов воды с лабильными протонами аминокислот, что привело к неправильному определению мольных долей веществ в растворе. Представленные в той же работе данные по растворимости углеводов в H₂O и D₂O указывают на то, что величины $\delta\Delta F$ для углеводородных цепей отрицательны и с повышением температуры стремятся к нулю или даже меняют знак на обратный. Этот их вывод качественно согласуется с обнаруженной нами закономерностью по влиянию удаленных (выходящих за зону действия полярной группы) звеньев боковой цепи на величину $(\delta\Delta F)_{\text{ГФ}}$; чем ниже температура, тем более отрицательной становится величина $(\delta\Delta F)_{\text{ГФ}}$.

* * *

Авторы благодарны В. И. Брускову за ряд ценных замечаний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kalvin M., Hermans J., Scheraga H. A., J. Amer. Chem. Soc., **81**, 5048, 1959.
2. Harrington N., Arch. Biochem. Biophys., **92**, 100, 1964.
3. Rigby B., Biochim. Biophys. Acta, **62**, 183, 1962.
4. Hatori A., Crespi N., Katz J., Biochemistry, **4**, 1225, 1965.
5. Scheraga H. A., Ann. N. Y. Acad. Sci., **84**, 608, 1960.
6. Дещеревский В. И., Биофизика, **10**, 708, 1965.
7. Александров В. Я. и др., Цитология, **6**, 667, 1964.
8. Kanarek L. et al., Arch. Intern. Physiol. Biochem., **70**, 408, 1962.
9. Appel P., Yang J., Biochemistry, **4**, 1244, 1965.
10. Kreshek G., Schneider H., Scheraga H. A., J. Phys. Chem., **69**, 3132, 1965.
11. Шатенштейн А. И. и др., Изотопный анализ воды, Изд-во АН СССР, М., 1957 г.: а) стр. 210; б) стр. 134.
12. Справочник по растворимости, **1**, Изд-во АН СССР, М.—Л., 1961.
13. Nemethy G., Scheraga H. A., J. Chem. Phys., **36**, 3401, 1962.
14. Гурская Г. В., Структуры аминокислот, «Наука», М., 1966.

Поступила в редакцию
19.XI.1969

STUDY OF SOLUBILITIES OF NONPOLAR AMINO ACIDS IN LIGHT AND HEAVY WATER IN CONNECTION WITH THE THERMOSTABILITY OF PROTEINS

A. I. KLIMOV, V. I. DESHCHEREVSKY

Faculty of Physics, M. V. Lomonosov Moscow State University;
Institute of Biological Physics, Acad. Sci. USSR, Pushchino
(Moscow region)

The solubilities of aliphatic amino acids in heavy and light water have been investigated at 12, 25, 35 and 47°C. Standard free energies $\Delta\Delta F$ of transfer of nonpolar side chains of the amino acids from H₂O to D₂O have been determined with the accuracy ± 5 cal/mole. Major contribution into $\Delta\Delta F$ is shown to be connected with the first—CH₂—group in the aliphatic chain (the «effect of screening of the polar interactions»). The contribution of the rest—CH₂—groups into $\Delta\Delta F$ (change of hydrophobic interactions in D₂O) is negative at 12°, is about zero at 25° and at 47° C does not exceed +10 cal per mole—CH₂—groups. Such strengthening of hydrophobic interactions is not sufficient to explain the increase of proteins thermostabilities in D₂O.

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ СВЕРХСЛАБОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ, СОПРЯЖЕННОЙ С ПЕРЕКИСНЫМ ОКИСЛЕНИЕМ НЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Е. А. НЕЙФАХ

Институт химической физики АН СССР, Москва

Кинетика хемилюминесценции биологических объектов (липооксигеназная система, субклеточные структуры, гомогенаты органов и тканей) коррелирует со скоростью перекисного окисления НЖК. Спектры хемилюминесценции близки, и их максимумы лежат в области 555 мкм. При липооксигеназном катализе и при окислении НЖК митохондрий печени крысы обнаружено появление перекисных свободных радикалов. Кинетика хемилюминесценции при липооксигеназном катализе коррелирует с $(ROO\cdot)^2$. Содержание эндогенных перекисей липидов в органах и тканях нормальных животных и опухоленосителей коррелирует с \sqrt{I} , где I — интенсивность спонтанной хемилюминесценции. Механизм хемилюминесценции изученных объектов определяется рекомбинацией перекисных радикалов ненасыщенных липидов.

В настоящее время становится все более очевидным, что сверхслабая хемилюминесценция (СХЛ) в животном и растительном мире представляет собой широко распространенное явление. Несмотря на то, что биологическая роль этого свечения остается пока неясной, оно может быть использовано для получения информации о вызывающих его химических реакциях. Особая ценность исследования СХЛ состоит в возможности автоматически и с высокой чувствительностью регистрировать кинетику биохимической реакции без вмешательства в ее ход. В связи с этим исследование природы и механизма биологической СХЛ является весьма актуальной задачей.

С этой целью было предпринято систематическое исследование СХЛ в различных биологических объектах путем сочетания независимых методов, регистрирующих окисление ненасыщенных жирных кислот (НЖК) молекулярным кислородом. По мере усложнения объектов изучалась ферментативная система (липооксигеназа соевых бобов), субклеточные структуры (митохондрии и микросомы), гомогенаты тканей и органы животных. Исследование СХЛ проводили либо на установке с ФЭУ-38, работающей в электрометрическом режиме (липооксигеназа, субклеточные структуры и гомогенаты), либо на установке с ФЭУ-51, работающей в квантометрическом режиме (органы и ткани усилённых животных). Такие установки с термостатируемыми кюветами и фотоумножителями, охлаждаемыми твердой углекислотой, описаны в [1]. Свечение органов изучали аналогично [2], для чего животных предварительно усыпляли внутримышечным введением 250 мг/кг циклонала (эта доза не влияет на СХЛ), исследуемую ткань или орган обнажали и промывали физиологическим раствором. Животное укрепляли в штативе и ограничивали от ФЭУ диафрагмой с отверстием в 1 см². Исследование СХЛ сочетали с изучением кинетики перекисного окисления,

проводимым для липооксигеназного катализа по диеновой конъюгации линолеата при E_{233} и образованию кетопроизводных при E_{277} , а для субклеточных структур и гомогенатов — по накоплению гидроперекисей, определяемых с тиофлуоресцином при E_{585} , и малонового диальдегида, определяемого с тиобарбитуровой кислотой при E_{535} . В органах животных эндогенные перекиси липидов определяли по описанной нами высокочувствительной методике [3]. В процессе перекисного окисления эндогенных НЖК в митохондриях или липооксигеназного катализа отбирали пробы для исследований методом ЭПР. Пробы помещали в стандартные кварцевые кюветы (суспензию митохондрий быстро осаждали на дно кювет центрифугированием) и фиксировали жидким

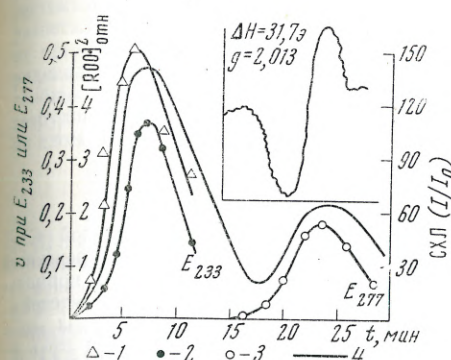


Рис. 1

Рис. 1. Корреляция скорости липооксигеназного катализа с образованием перекисных радикалов и СХЛ

1 — относительная концентрация перекисных радикалов линолеата в квадрате $(ROO\cdot)^2$ отн; 2 — скорость диеновой конъюгации линолеата (E_{233}); 3 — скорость накопления кетопроизводных линолеата (E_{277}); 4 — интенсивность («скорость») СХЛ. Врезка: спектр ЭПР перекисного радикала линолеата

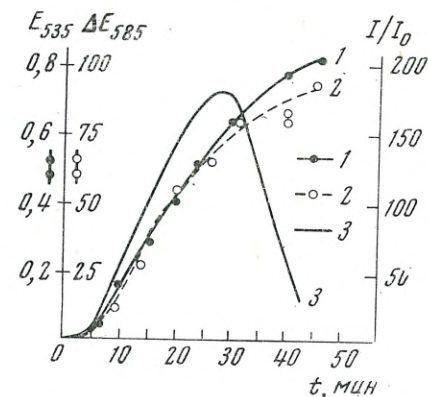


Рис. 2

Рис. 2. Корреляция СХЛ с перекисным окислением эндогенных НЖК в митохондриях мозга крысы

1 — относительная концентрация малонового диальдегида; 2 — относительная концентрация гидроперекисей липидов; 3 — интенсивность СХЛ

зотом. Запись спектров ЭПР на спектрометре JES-P-10 (фирма «JEOL») * и спектрометре ИХФ-2 проводили при T образца -100° .

На рис. 1 представлена кинетика перекисного окисления линолеата, катализируемого липооксигеназой сои (линолеат: кислород-оксидоредуктаза, К.Ф.1.13.1.13), зарегистрированная по интенсивности СХЛ, скорости накопления конъюгированных гидроперекисей и вторичных кетокислот, а также по накоплению перекисных радикалов. Видно, что максимальной скорости накопления гидроперекисей соответствует максимальная интенсивность СХЛ, сопровождающей липооксигеназный катализ, а накопление позднее образующихся кетокислот вызывает повторную вспышку СХЛ. Обнаружение симбатности скоростей липооксигеназного катализа и интенсивности СХЛ делает возможным самостоятельное использование хемилюминесцентного метода для изучения этого фермента. Он выгодно отличается от принятых спектрофотометрических и титрометрических методов тем, что позволяет с высокой чувствительностью автоматически регистрировать скорости перекисного окисления. В специально подобранных условиях удается обнаружить появление радикалов, спектр которых представляет собой слабо асимметричный синглет с шириной линии 31,7 э и g -фактором 2,013 (см. рис. 1). Ширина сигнала ЭПР уменьшается до 23 э, если использовать в три раза более активный фермент, но в два раза более низкой, чем в предыдущем случае, концентрации, т. е. ширина сигнала зависит от концентрации специфического белка-фермента, на поверхности которого осуществляется катализ. Усиряющее влияние белковой подложки на спектры ЭПР рассмотрено в [4]. По форме сигнала, идентифицированы как перекисные при инициированном окислении углеводов [1]. Другим свидетельством перекисной природы обнаруженных радикалов является корреляция скорости перекисного окисления линолеата и относительной концентрации обнаруженных радикалов. При отсутствии в системе одного из трех компонентов (фермент, субстрат, кислород) ни СХЛ, ни появление радикалов не может быть обнару-

* Приношу благодарность В. А. Шабалкину и В. М. Цибрикину за большую помощь при работе с липооксигеназой на спектрометре ЭПР.