

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Webb S. I., Booth A. D. Absorption of microwaves by microorganisms // Nature.— 1969.— 222, N 5199.— P. 1199—1200.
2. Андреев Е. А., Белый М. У., Ситко С. П. Проявление собственных характеристических частот организма человека // Докл. АН УССР. Сер. Ю.— 1984.— № 10.— С. 60—64.
3. Fröhlich H. Biological coherence and response to external stimuli.— Berlin: Springer, 1988.— 268 p.
4. Фундаментальные и прикладные аспекты применения миллиметрового электромагнитного излучения в медицине: Тез. докл. I Всесоюз. симпоз. с междунар. участием (10—13 мая 1989 г., Киев).— Киев, 1989.— 404 с.
5. Малцев В. Я., Кашин В. А. Колебательно-релаксационные состояния биополимеров в миллиметровом диапазоне. Теория и эксперимент // Мед.-биол. аспекты мм-излучения.— М.: Изд-во ин-та радиоэлектроники АН СССР, 1987.— С. 175—181.
6. Millimeter wave and Far-infrared spectroscopy on biological systems / L. Genzel, F. Kremer, A. Poglitsch, G. Bechtold // Eds H. Fröhlich, F. Kremer.— Berlin: Springer, 1983.— P. 58—70.
7. Индуцированные миллиметровым излучением изменения в колебательных спектрах β -аланина / Л. И. Бережинский, Г. И. Довбешко, Г. С. Литвинов, М. П. Лисица // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1990.— № 11.— С. 34—37.
8. Воздействие миллиметрового излучения на спектр инфракрасного отражения монокристалла β -аланина / Л. И. Бережинский, Г. И. Довбешко, Г. С. Литвинов, М. П. Лисица // Биополимеры и клетка.— 1991.— 7, № 3.— С. 77—82.

Межотрасл. науч.-инж. центр по физике живого
и микроволн. резонанс. терапии «Відгук» при КМ Украины,
Киев

Получено 04.04.91

УДК 577.3:535.337

Г. С. Литвинов, В. П. Полищук, А. Л. Бойко

ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГА T4 ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ПОСТОЯННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ

Исследовано влияние постоянного магнитного поля (ПМП) с индукциями от 0,2 до 2,0 Тл на инфекционность и структуру бактериофага T4 Escherichia coli В. Обнаружено уменьшение инфекционного титра вируса под действием ПМП, которое может объясняться нарушениями его структуры: набуханием и разрушением головок бактериофагов, сокращением чехла отростка, отделением и разрушением хвостового отростка.

Снижение титра с увеличением индукции до 0,4—0,5 Тл обусловлено, по-видимому, определяющим вкладом аномального эффекта Зеемана. При более высоких значениях индукции (0,8—2,0 Тл) дестабилизирующее действие ПМП должно усиливаться за счет того, что наряду с эффектом Зеемана становится существенным ориентирующее воздействие поля на молекулы белков ДНК и вириона в целом.

Введение. Взаимодействие полей и излучений с веществом в различных формах его химической и физической организации является одной из главных гносеологических проблем современного естествознания. Важнейшее значение для успешного изучения этой проблемы имеют исследования процессов и механизмов действия магнитного поля — постоянно присутствующего экологического фактора биологической эволюции в земных условиях — на структуру и функции живого как единства физической и химической форм существования материи на различных уровнях сложности. Несмотря на очевидную теоретическую и прикладную актуальность проблематики, в настоящее время в магнитобиологии сложилась довольно противоречивая ситуация: с одной стороны, весьма большое количество воспроизводящихся экспериментов и бесспорных результатов, а с другой — почти полное отсутствие удов-

© Г. С. ЛИТВИНОВ, В. П. ПОЛИЩУК, А. Л. БОЙКО, 1992

летворительных, достаточно строгих интерпретаций. Причины этого противоречия заключаются в неразработанности теоретического базиса, равно как и в отсутствии строго количественного подхода при постановке экспериментов. Так, чаще всего используемые в экспериментах значения индукций магнитных полей находятся в интервале от десятых долей миллитесла до $\sim 2,0$ Тл. С теоретической точки зрения взаимодействие органических объектов с такими полями является слабым и не должно приводить к заметным эффектам [1]. Ситуация осложняется также и тем, что большинство экспериментов по магнитобиологии ставится на организменном (включая бактериальные клетки) или на молекулярном уровне. Надмолекулярный, субклеточный уровень биологической структуры, как правило, не изучается и лишь в немногих работах [2—4] предприняты попытки изучения количественного влияния постоянного магнитного поля (ПМП) на структуру или биологические функции некоторых вирусов.

Материалы и методы. В данной работе представлены результаты исследования влияния ПМП с индукциями от 0 до 2 Тл на биологические свойства бактериофага *T4 E. coli B*, являющегося надмолекулярной автономной биологической структурой нуклеопротеидной природы. Бактериофаг *T4-D* получен из музейной коллекции Ин-та биохимии им. акад. Н. И. Баха АН СССР. Вирусы накапливались в бактериях, культивировавшихся в жидкой питательной среде М9А [5]. Исходный биологический титр бактериофагов составлял 10^{11} — 10^{12} БОЕ/мл. Препараты очищенных дифференциальным центрифугированием вирусов в буферном растворе в пробирках вносили между полюсами постоянного электромагнита. Однородность и постоянство значений индукции ПМП контролировали с точностью до 10^{-4} Тл. Исследовали действие ПМП с индукциями 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 2,0 Тл при постоянной экспозиции 1 ч. Во время опыта контрольные препараты бактериофагов находились при тех же внешних условиях (температура, раствор, фоновые поля и т. д.), что и опытные. Бляшкообразующие титры определяли по методу Грация на двухслойных агаровых средах в контролируемых условиях при комнатной температуре. Пространственно-морфологические свойства бактериофагов исследовали с помощью негативной электронной микроскопии с использованием микроскопов JEM 100 В и ЭМ-125. В качестве контрастирующих веществ применяли 2 %-ную фосфорно-вольфрамовую кислоту или 4 %-ный уранилацетат. При избранных экспериментальных условиях размеры вирусов и их компонентов оценивали с погрешностью не более 2 нм.

Наличие ориентационных эффектов ПМП устанавливали оптическими методами: с применением методов двойного лучепреломления в видимом и инфракрасном (ИК) диапазонах электромагнитного излучения. Двойное лучепреломление в растворах бактериофагов (с концентрацией 5 мг/мл), вносившихся в кварцевой кювете толщиной 1 см между полюсами электромагнита, изучали с помощью линейно поляризованного излучения He-Ne лазера ГЛ-78 на длине волны 632,8 нм с выходной мощностью 1 мВт/см². Оптическая схема включает в себя анализатор на основе призмы Никколя (рис 1). Световой поток регистрировали фотоэлементом, подключенным через усилитель к автоматическому потенциометру ЛКС-001.

ИК-дихроизм препаратов бактериофагов анализировали в интервале волновых чисел 900—1700 см⁻¹ с использованием поляризатора на основе AgCl оптической стопы. Образцы ориентированных вирусовготавливали при испарении между полюсами магнита капли раствора бактериофага (10 мг/мл) в дистиллированной H₂O, находившейся на поверхности прозрачной в ИК-области пластинки TlBrCl. Испарение происходило при комнатной температуре за 1,5—2 ч. Спектры ИК-поглощения для двух ортогональных поляризаций анализатора записывали на спектрометре UR-20 («Carl Zeiss», Германия) при воспроизводимости волновых чисел ± 2 см⁻¹, относительной пиковой интенсивности

$\pm 3\%$. Образец располагали так, чтобы проекция вектора ПМП, действовавшего на образец во время высушивания, была параллельной оси поляризатора и входной щели спектрометра.

Результаты и обсуждение. Результаты экспериментов, усредненные по 5—7 измерениям, представлены на рис. 2, 3 и в таблице. Как видно из представленных данных, инфекционный титр бактериофага

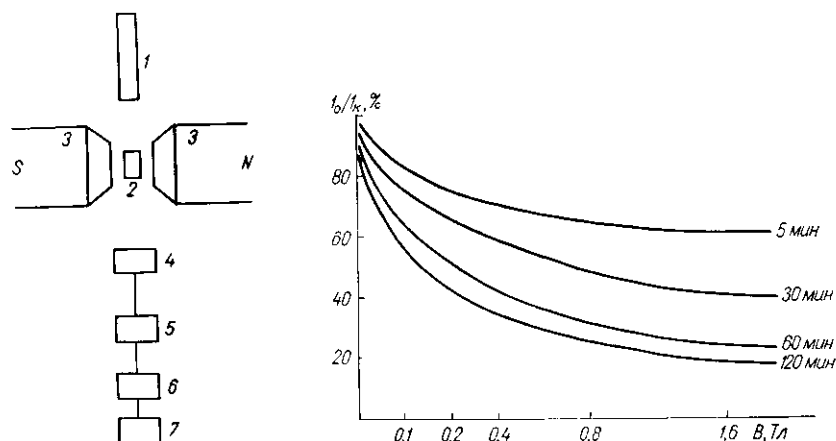


Рис. 1. Схема измерения ориентирующего действия постоянного магнитного поля на бактериофаги в растворе с помощью эффекта двойного лучепреломления: 1 — He-Ne-лазер; 2 — образец; 3 — полюса электромагнита; 4 — поляризатор (анализатор); 5 — фотоэлемент; 6 — усилитель сигнала; 7 — детектор

Рис. 2. График зависимости величины инфекционного титра бактериофага Т4 от индукции постоянного магнитного поля при разной экспозиции: I_0/I_k — соотношение инфекционных титров опытных и контрольных образцов; B — индукция постоянного магнитного поля

под действием ПМП уменьшается (см. рис. 2). Это уменьшение имеет нелинейный характер — ход кривой описывается затухающей экспонентой. С помощью электронной микроскопии в опытных препаратах обнаружено значительное число вирионов с различными деструкциями (см. таблицу). Наиболее характерные из этих нарушений: а) набухание, увеличение размеров и разрушение головок; б) отрыв хвостовых отростков; в) сокращение чехла отростка. Скорость снижения титра с увеличением индукции ПМП была наибольшей в интервале 0,1—0,4 Тл, при дальнейшем повышении индукции скорость снижения биологического титра падала.

Поляризационные исследования спектров ИК-поглощения препаратов фагов, полученных при воздействии ПМП, представлены на рис. 3. Как видно, спектры ИК-поглощения существенно различаются для поляризаций, параллельно и перпендикулярно ориентированных по отношению к направлению ПМП, действовавшего на образец в процессе его приготовления. Наибольшие различия наблюдались для ИК-поглощения в интервалах $950\text{--}1050\text{ см}^{-1}$ (валентные Р—ОН, С—О, Р—О—С, О—Р—О колебания нуклеиновой кислоты), $1430\text{--}1490\text{ см}^{-1}$ (С=О валентные симметричные колебания белка и нуклеиновой кислоты), $1530\text{--}1750\text{ см}^{-1}$ (колебания амид 1 — амид 2 белков и С=О валентные асимметричные колебания белков и нуклеиновых кислот). Обращает на себя внимание факт различий не только ИК-спектров взаимно перпендикулярных поляризаций, но и спектра в неполяризованном свете по сравнению с каждым из поляризованных спектров.

Полученные результаты, по-видимому, следует интерпретировать исходя из различных возможных механизмов взаимодействия вирусных частиц и их молекулярных компонентов с внешним магнитным полем. В частности, влияние ПМП при индукциях в интервале 0,1—0,4 Тл может быть обусловлено изменениями энергетической структуры молекул белков и ДНК вследствие взаимодействия внешнего ПМП с имеющими

собственные магнитные моменты электронами и в меньшей степени — с ядрами атомов (аномальный эффект Зеемана) [6]. В результате возникают упорядочивающие силы, отличные по направлению от тех, которые формировали плотную упаковку белковых молекул капсида, отростка и других известных структурных компонентов бактериофага T4 [7], что должно приводить к разуплотнению структуры и нарушению



Рис. 3. Спектры ИК-поглощения препаратов бактериофага T4, экспонированного в постоянном магнитном поле: 1, 2 — параллельная и перпендикулярная поляризации анализатора соответственно; 3 — неполяризованный свет

термодинамически и механически выгодной, устойчивой (вне действия экспериментальных ПМП), эволюционно закрепившейся конформации фага (рис. 4, а). В первую очередь это должно проявиться в увеличении размеров, что подтверждается экспериментально наблюдавшимся нами набуханием головок бактериофагов. При более высоких индукциях (0,8—2,0 Тл) дестабилизирующее действие ПМП будет усиливаться за счет того, что наряду с эффектом Зеемана становится существенным ориентирующее воздействие поля на молекулы белков и ДНК, возрастающее пропорционально квадрату индукции. Вполне понятно, что магнитные мо-

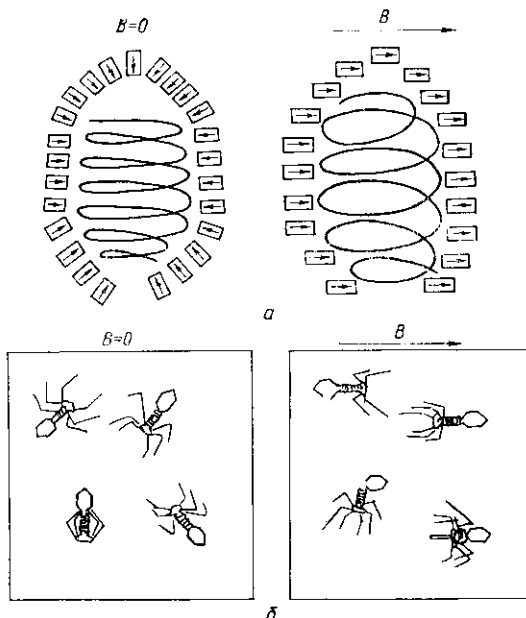


Рис. 4. Схематическое изображение гипотезы ориентации вирусных частиц и их компонентов в постоянном магнитном поле: а — на уровне структурных компонентов; б — на уровне целостной частицы

менты каждой из белковых субъединиц и ДНК вириона, расположенных в пространстве в соответствии с законами плотной упаковки, ориентированы по отношению к вектору внешнего ПМП раз-

Воздействие постоянного магнитного поля на форму и структуру бактериофага T4

Индукция поля, Тл	Число частиц	Доля частиц с нормально сокращенным отростком, %	Доля частиц с аберрантно сокращенным отростком, %	Доля частиц с разбухшей головкой, %	Доля разрушенных частиц, %
0 (контроль)	1050	9,3±2,1	2,1±1,0	2,5±1,1	1,8±0,7
0,4	1050	19,1±4,2	4,8±1,8	4,3±1,0	2,8±0,7
1,6	1050	24,8±6,4	5,7±1,5	5,5±1,9	7,5±1,9

личным образом, а внешнее поле заставляет их повернуться и расположиться упорядоченно — против его вектора, так как белки и ДНК являются диамагнетиками [8]. Естественно, что при ориентирующем взаимодействии ПМП нарушаются не только белок-белковые, но и взаимодействия белок — ДНК тем более, что, согласно [9], белковые структуры стремятся расположиться коллинеарно с полем, а ДНК — перпендикулярно ему. Причина деструкций вирионов, проявляющихся в отделении хвостовых отростков от головок, на наш взгляд, может заключаться в том, что вирионы взаимодействуют с ПМП как целое. Целостной вирусной частице можно поставить в соответствие некоторый суммарный магнитный момент, связанный с анизотропией формы вириона (рис. 4, б). В естественных условиях вирионы и их магнитные моменты в жидкой среде расположены равновероятно по всем направлениям. При наложении внешних ПМП вследствие взаимодействия для частиц, неколлинеарных с полем, возникает вращающий момент, ориентирующий их в поле. Если учесть, что повороты вирионов происходят не в вакууме, а в жидкой среде с ненулевой вязкостью, то становится понятной возможность отламывания хвостовых отростков в месте их присоединения к головке.

Необходимо отметить, что о значительном ориентирующем эффекте ПМП на бактериофаги в целом так же, как и на отдельные их молекулярные компоненты, свидетельствуют данные по измерению двойного лучепреломления при $\lambda=6328$ нм. Для значения поля 2 Тл рассчитанное нами значение $n_e - n_o$ составляет 10^{-4} , что указывает на близость по порядку величины ориентирующего эффекта для T4 и нитевидных фагов Pfl и fd [9]. Ориентационное взаимодействие фагов с ПМП нашло также свое отражение и в дихроизме спектров ИК-поглощения. Здесь интересным, на наш взгляд, является то, что различные атомные группы биополимеров, составляющих бактериофаг, по-разному взаимодействовали с ПМП. Так, полосы ИК-поглощения с волновыми числами 1430 и 1490 см^{-1} оказались ортогонально поляризованными, так же как и полосы в интервалах 950—1050 см^{-1} (ДНК, фосфат 1) по отношению к полосам 1530—1650 см^{-1} (белок амид 1 — амид 2).

В заключение следует подчеркнуть, что для осуществления заметного ориентирующего воздействия ПМП на отдельные молекулярные субъединицы вириона, а также на бактериофаг как целое необходимо, чтобы энергия этого взаимодействия была достаточно велика по сравнению с энергией теплового, разупорядочивающего движения. Согласно [8], это условие соблюдается с вероятностью, близкой к 1, для белковых структур с числом аминокислотных остатков порядка 10^4 — 10^5 и, следовательно, выполняется для бактериофага T4, суммарный белок которого насчитывает свыше 10^6 аминокислотных остатков [10], а ДНК — $3 \cdot 10^5$ пар оснований [11].

Резюме. Досліджено вплив постійного магнітного поля (ПМП) з індукціями від 0,2 до 2,0 Тл на інфекційність та структуру бактеріофага T4 *Escherichia coli* B. Виявлено зменшення інфекційного титру вірусу під дією ПМП, яке можна пояснити порушенням його структури: набуханням та руйнуванням головок бактеріофагів, скороченням чохла відростка, відділенням та зруйнуванням хвостового відростка.

Зниження титру із зростанням індукції до 0,4—0,5 Тл обумовлено, очевидно, визначальним вкладом аномального ефекта Зеємана. При більш високих значеннях індукції (0,8—2,0 Тл) дестабілізуюча дія ПМП повинна збільшуватись за рахунок того, що поряд з ефектом Зеємана стає суттєвою орієнтуюча дія поля на молекули білків ДНК і віріона в цілому.

Summary. Constant magnetic field influence with induction from 0,2 to 2,0 Tl on infection titre and structure of bacteriophage T4 *Escherichia coli* B was investigated. Viral titre reduction under constant magnetic field action was found which could be explained by its structural destruction: swelling and destruction of bacteriophage heads, tail contraction, disjointment and destruction.

Infection titre reduction with induction increase till 0,4—0,5 Tl is caused apparently by certain contribution of anomalous Zeeman effect. Under higher induction (0,8—2,0 Tl) destabilized action of constant magnetic field should be intensified on account that side by side with Zeeman effect field orientation action on DNA protein molecules and virion in the whole becomes more substantial.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волькенштейн М. В. Физика и биология.— М.: Наука, 1981.— 165 с.
2. Бойко А. Л., Швед А. Д., Григорян Ю. А. Вплив постійного магнітного поля на вірус тютюнової мозаїки // Вісн. АН УРСР.— 1975.— № 8.— С. 26—31.
3. Nemes N., Horagova D., Szazil P. Changes in the growth of staphylophage 812 induced by a homogeneous magnetic field // Folia Fac. Sci. Nat. Univ. Park Brno.— 1983.— № 24.— P. 73—85.
4. Torbet J. Internal structural anisotropy of spherical viruses studied with magnetic birefringence // EMBO J.— 1983.— 2, N 1.— P. 63—66.
5. Девис П., Богстайн Д., Рот Дж. Генетика бактерий.— М.: Мир, 1984.— 186 с.
6. Борн М. Оптика.— М.: Изд-во ин. лит., 1960.— 550 с.
7. Поглазов Б. Ф., Серышева И. И., Абуладзе Н. К. Структура и функционирование двигательного аппарата бактериофага T4 // Успехи биол. химии.— М.: Наука, 1988.— Т. 29.— С. 122—144.
8. Дорфман Я. Г. О специфике воздействия магнитных полей на диамагнитные молекулы в растворах // Биофизика.— 1962.— № 6.— С. 733—736.
9. Марс Г., Дрансфельд К. Биомолекулы и полимеры в сильных постоянных магнитных полях // Сильные и сверхсильные магнитные поля и их применение.— М.: Мир, 1988.— С. 180—254.
10. Тихоненко Т. И. Биохимия вирусов.— М.: Медицина, 1966.— 295 с.
11. Общая вирусология / С. Лурья, Дж. Дарнеллс, Д. Балтимор, Э. Кэмпбэлл.— М.: Мир, 1981.— 670 с.

Меожотрасл. науч.-инж. центр по физике живого
и микроволн. резонанс. терапии «Відгук» при КМ України,
Київ

Получено 14.05.91

УДК 547.853.7:541.651

В. Б. Пивоваров, Г. Г. Шеина

ТАУТОМЕРИЯ ИЗОЦИТОЗИНА В РАСТВОРЕ

Методом температурно-зависимой ИК-спектроскопии показано, что изоцитозин в водном и метанольном растворах пребывает в равновесии двух таутомерных форм, причем характер таутомерии для него иной, нежели для 4-оксопиримидина, молекулы которого находятся в таутомерном равновесии $N_1H \leftrightarrow N_3H$ кетоформы. Приведены аргументы в пользу таутомерии изоцитозина по типу кето-амин — кето-имин.

Введение. Природу спонтанных мутаций в ДНК хорошо объясняет нарушение уотсон-криковского спаривания нуклеотидных оснований вследствие образования ими редких таутомерных енольных и иминных форм [1]. Экспериментальному обнаружению редких таутомеров оснований и выяснению физико-химических условий их существования посвящен ряд работ. У изолированных молекул оснований ранее были обнаружены енольные таутомеры: для цитозина, изоцитозина — в матрицах отвердевших инертных газов методом ИК-спектроскопии [2—4], для урацила и тимина — в сверхзвуковых молекулярных струях методом флуориметрии [5]. В растворах выяснение таутомерных состояний оснований сопряжено со значительными трудностями в интерпретации экспериментальных данных. Так, в работе [6] методом температурного скачка в сочетании с УФ- и ИК-спектроскопией показано, что цитозин в воде присутствует в аминоксоформе, для которой характерно равновесие N_3H - и N_1H -таутомеров, сильно смещенное в сторону последнего (доля таутомера N_3H при 25 °С составляет 0,2 %). С другой стороны,

© В. Б. ПИВОВАРОВ, Г. Г. ШЕЙНА, 1992