АКУСТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Том II 1956 Вып. 2

К ВОПРОСУ О БИОЛОГИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ ВОЛН

И. Е. Эльпинер

Приводятся данные, показывающие, что под действием ультразвуковых волн увеличивается выход эргостерина из дрожжевых клеток, активируется в этих клетках фермент инвертаза, расщепляющий сахарозу, и, наконец, усиливается активность в нервной ткани фермента холинэстеразы, участвующего в передаче нервных импульсов. Анализ этого явления свидетельствует, что ультразвуковые волны обладают способностью «распатывать» молекулярные комплексы субмикроскопических структур клеточных элементов даже в тех случаях, когда не наблюдается гибели живых клеток.

Ультразвуковые волны обладают сильным биологическим действием. В поле ультразвуковых волн гибнут животные и растительные клетки, простейшие и микроорганизмы. Наряду с этим, строго установлено, что разные биологические объекты отличаются между собой по своей чувствительности к действию этого физического агента (избирательное действие ультразвука). Об избирательном действии судили на основании данных о выживаемости озвучиваемых объектов. Предполагалось, что под действием ультразвуковых волн биологические объекты, взвешенные в водной среде, либо подвергаются грубым механическим разрушениям, либо полностью остаются неповрежденными.

Однако действие ультразвука не сводится только к механическим разрывам клеток и клеточных структур; в результате этого воздействия довольно часто наблюдаются тонкие биохимические и функциональные изменения, не приводящие к гибели организма [1]. Как будет показано, такие изменения наступают даже в тех случаях, когда биологический объект считался резистентным к действию ультразвука.

Сложен путь выявления тонких биохимических и функциональных изменений, возникающих в живых клетках под действием того или иного физического фактора. Такие изменения могут возникнуть в результате нарушения существующих в клетке многочисленных взаимосвязей между биокатализаторами, субстратами и ингибиторами, а также между молекулярными комплексами, лежащими в основе субмикроскопических структур и определяющими физикоколлоидное состояние клетки, ее отдельных элементов и направленность ее функции.

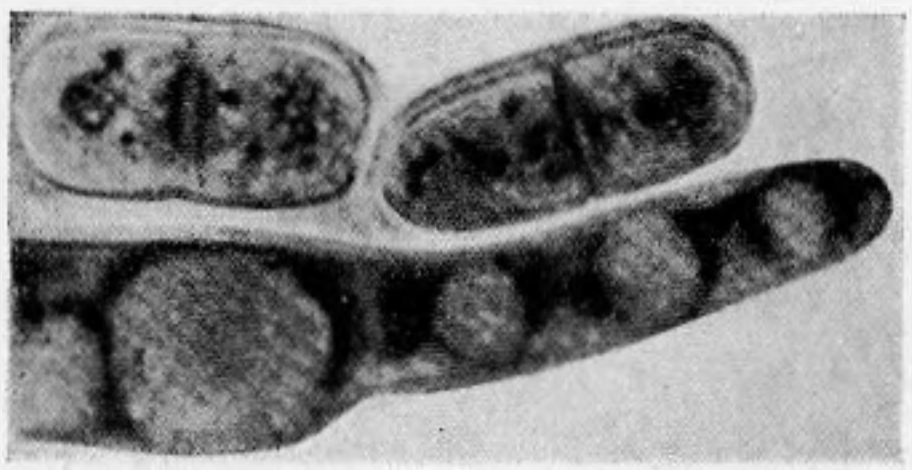
Физические явления, генетически связанные с процессами распространения в жидкой среде упругих механических колебаний (переменное давление, ускорение и смещение частиц, кавитация и т. д.), могут обусловить обратимые или полностью не восстанавливаемые нарушения физико-химического состояния гетерогенной системы, каковой является живая клетка. Одним из критериев физико-химического нарушения микроструктур являются сдвиги в состоянии клеточных биокатализаторов — их количества и степени активности. Такие сдвиги нами обнаружены в ряде случаев, что является предметом настоящего сообщения.

Прежде всего остановимся на некоторых экспериментальных данных, полученных нами при помощи цитологических исследований [2]. Эти данные убедительно показали, что действие ультразвуковых волн на дрож-

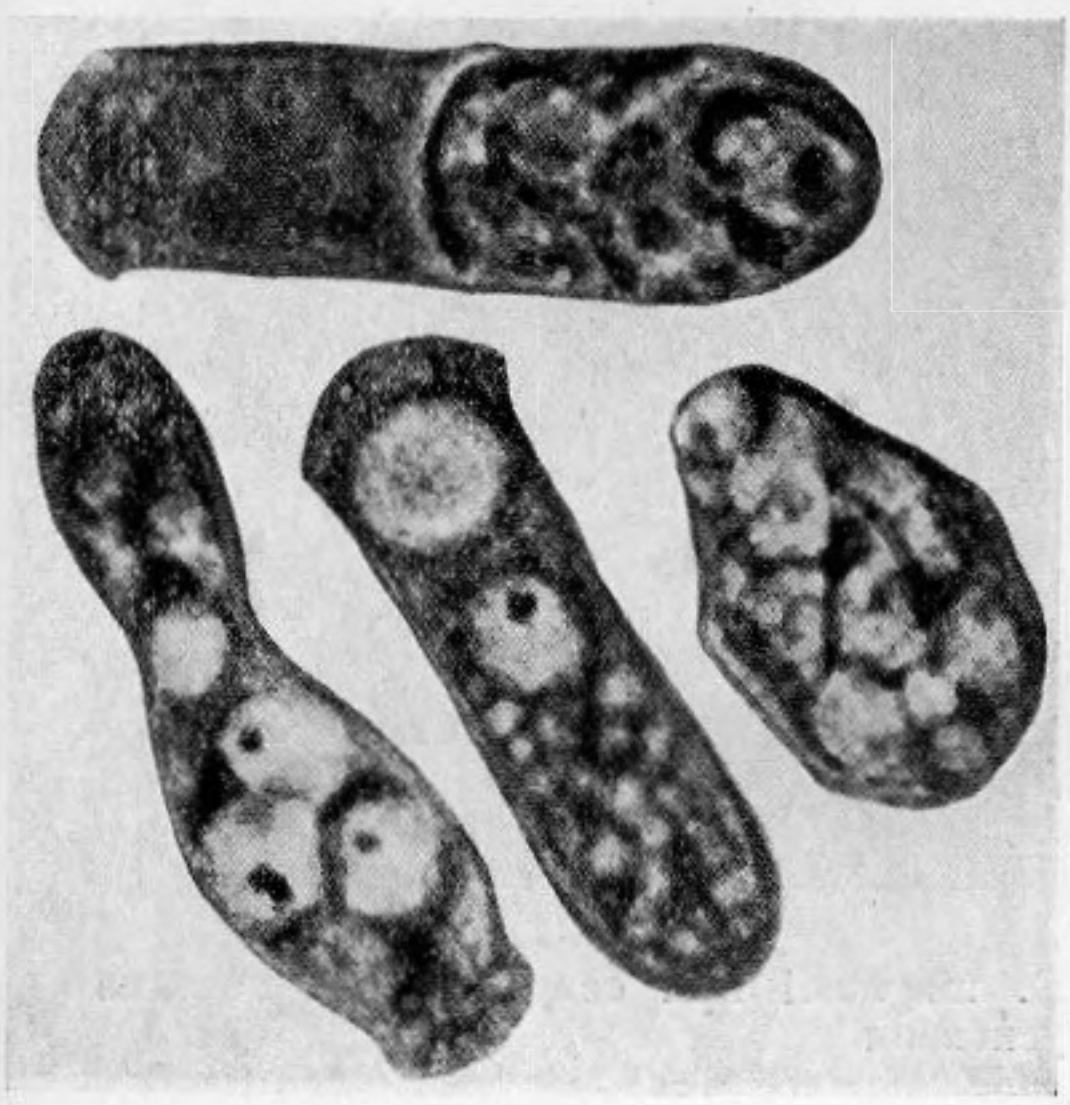
жевую культуру не сводится только к грубым разрывам и нарушениям клеток. В результате этого воздействия обнаруживаются физико-коллоидные изменения внутриклеточных структур, не всегда приводящие к гибели озвучиваемых организмов. Такие изменения наблюдались при сравнительно незначительных экспозициях ультразвука в случае озвучивания Endomyces magnusii. Излучателем ультразвука служила вогнутая пьезокварцевая пластинка, диаметр которой равнялся 55 *мм*. Фокусное расстояние пластинки — 8 *см*. Подводимая мощность к кварцевой пластинке составляла 250 *вт*, частота колебаний ультразвуковых волн — 1 200 000 циклов. Оказалось, что уже при 30 *сек* или 1 *мин* экспозиции в одних клетках отмечается «вспенивание» протоплазмы, а в других — желатинизация последней (фиг. 1 и 3). Прижизненная окраска зеленым янусом и нейтральным красным выявляет в ряде случаев наличие броунирующих частиц — обломки хондриосом и весьма мелкие гранулы валютина. Некоторые из быстро перемещающихся частиц — липоидные и жировые образования, выявляемые суданом и шарлахом. По данным люминесцентно-микроскопического исследования пораженные клетки теряют способность адсорбировать флуохромы. Валютин и ядра, так хорошо обнаруживаемые при флуохромировании акридиновым оранжевым нормальных клеток, здесь совсем не выявляются. Более ценные сведения дала нам микроскопия в темном поле. В неповрежденных клетках при этом способе микроскопии обнаруживаются оболочки и тонопласт, а также жировые и липоидные включения; протоплазма, ядра и вакуоли представляются оптически пустыми (фиг. 2,*а*). Понижением дисперсности коллоидов, изменением физико-химического состояния белков протоплазмы можно объяснить появление и усиление опалесценции, обнаруженной при микроскопировании в темном поле озвученных дрожжевых клеток (фиг. 2,*б*).

При удлинении времени озвучивания дрожжевой суспензии эндомицетов до пяти минут удается установить наличие грубых механических разрывов клеток. Характер и место разрывов различны: то отрываются концы клетки, что придает ей форму цилиндра, то клетка разрывается на две части, преимущественно в местах, где обычно имеются перегородки, то в разных местах клеточной стенки образуются воронкообразные дефекты. В таких клетках протоплазма почти отсутствует. Под микроскопом видны лишь «тени», «футляры» клеток (фиг. 3).

Иные изменения, более тонкие и скоропреходящие, наступают при воздействии ультразвуковыми волнами на дрожжевые клетки, относящиеся к штаммам сахаромицетов. В данном случае грубые механические разрывы не наступали даже при озвучивании дрожжевой суспензии в течение 30—60 *мин*. При таком длительном воздействии отмечалось лишь сильное разжижение протоплазмы, которое сопровождалось освобождением большого количества капель жира. В некоторых случаях протоплазма и оболочки утончаются. Последние часто приобретают неправильную угловатую форму. Наблюдаемая картина несколько напоминает автолиз дрожжевых клеток (фиг. 4). Озвучиваемая культура сахаромицетов, как правило, при последующем посеве дает обильный рост. Более того, даже после 1—1,5-часового озвучивания количество кислорода, поглощаемого культурой (Saccharomyces globosus), снижается только на 10—20%, т. е. выживаемость клеток составляет 80—90% [3]. Тем не менее получены данные, показывающие, что и в этих случаях в клетках наступают физико-химические сдвиги, приводящие, повидимому, к «расшатыванию» или «разрыхлению» внутриклеточных молекулярных комплексов. Последнее выражается в том, что под действием ультразвуковых волн в дрожжевых клетках высвобождается ряд биологически активных веществ (витамины, ферменты и др.), значительная часть которых находится в интактных клетках, повидимому, в связанном состоянии. В качестве примера приводим результаты исследования, проведенного нами совместно с М. Н. Мейселем и Р. Д. Гальцовой. Речь идет о влиянии ультразвука



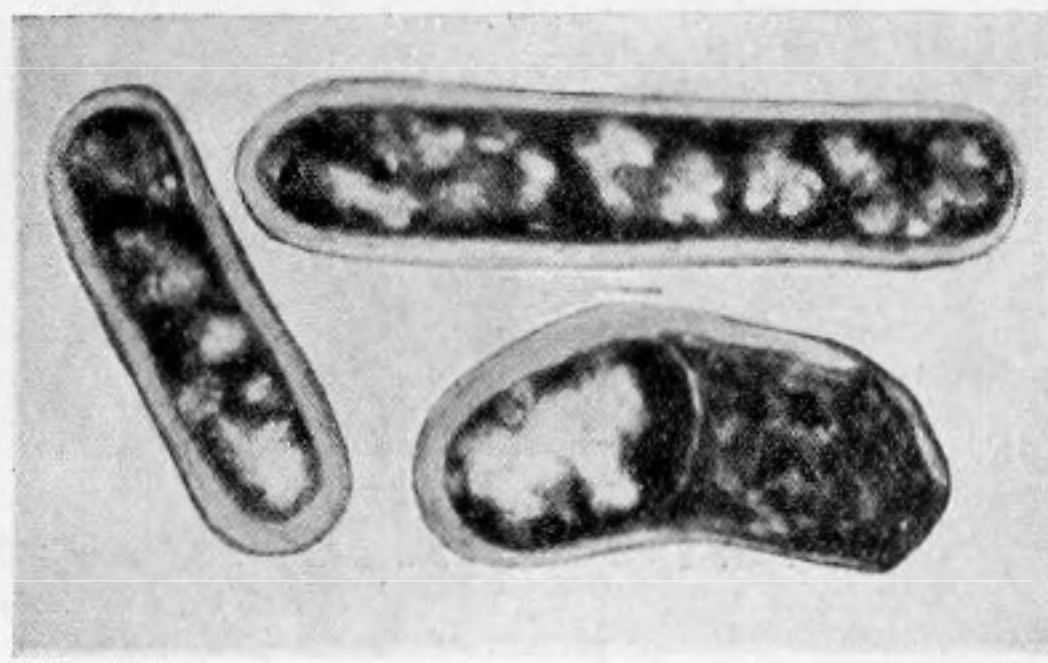
а



б

Фиг. 1

а

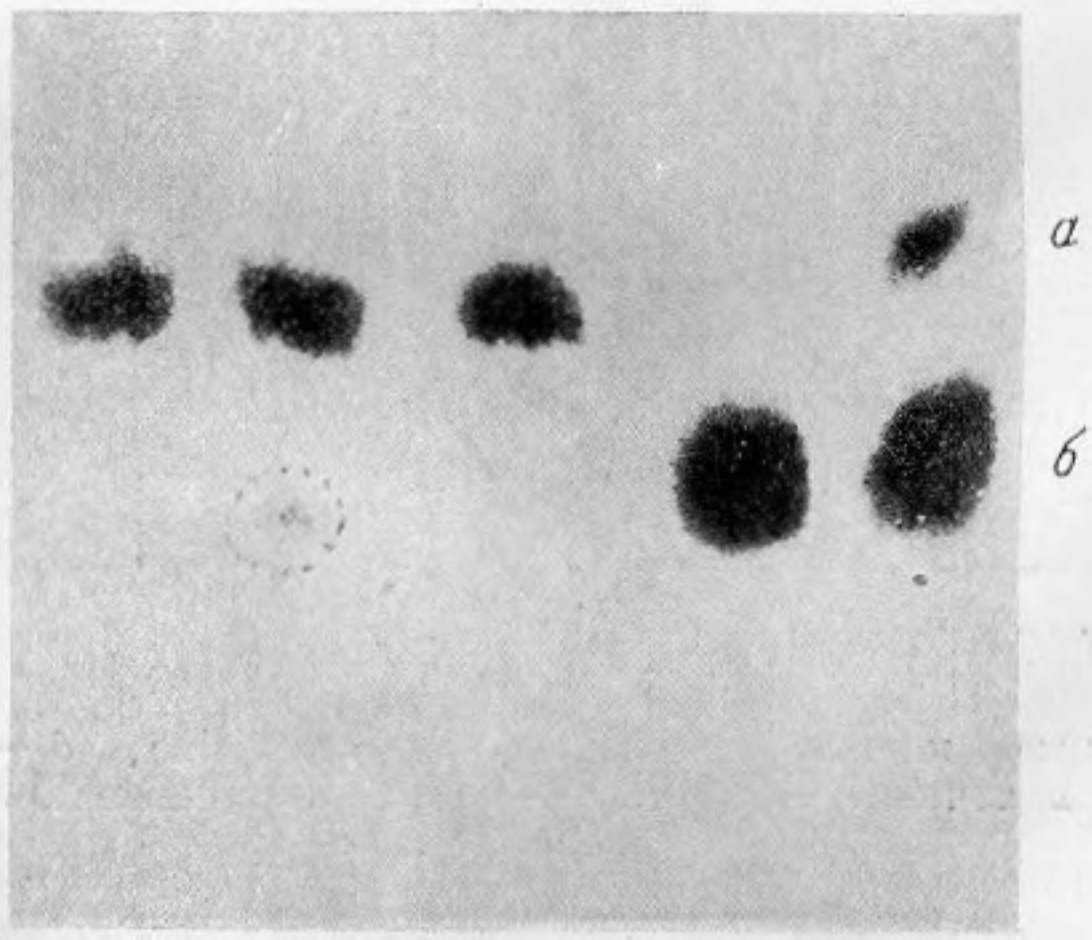


б

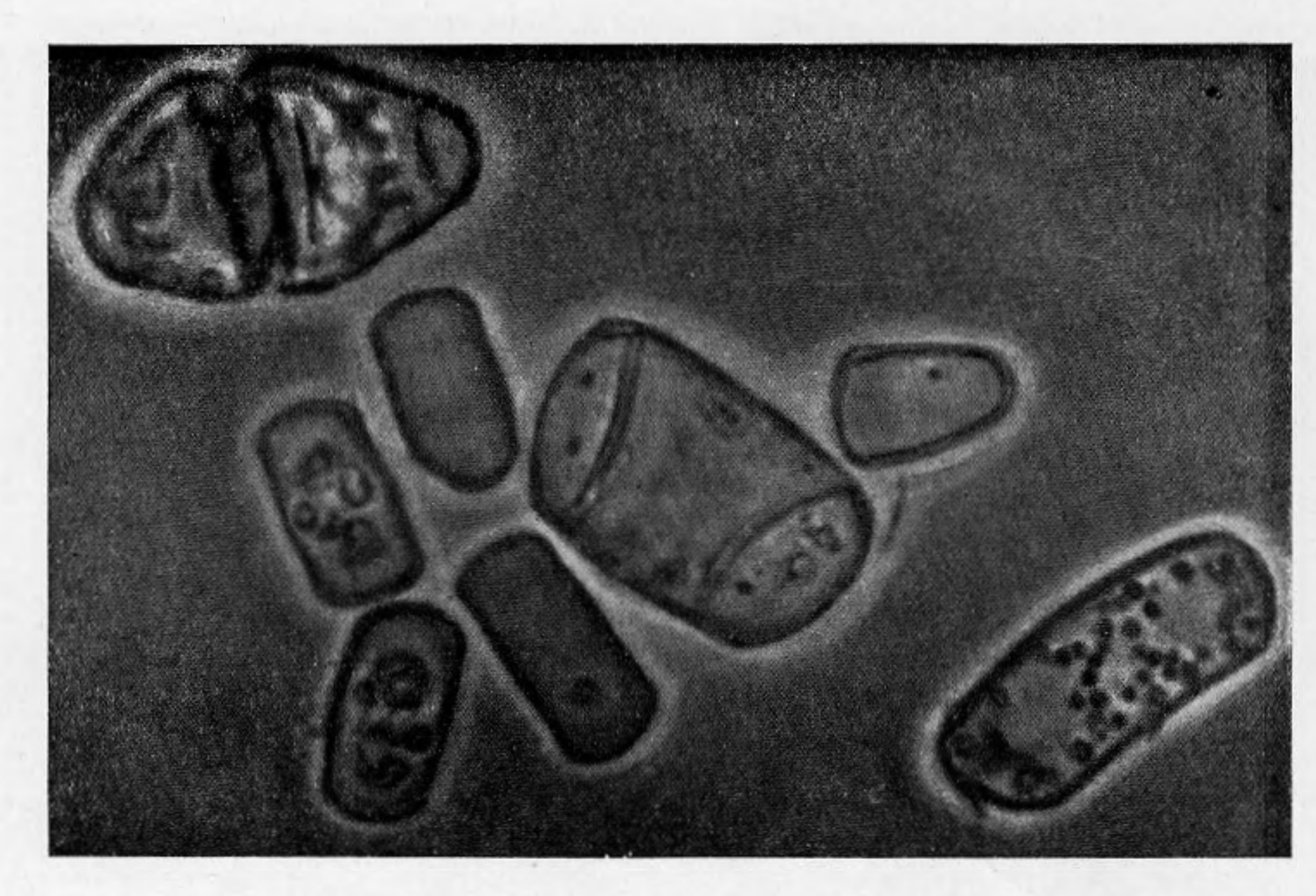
Фиг. 2

Фиг. 1. *а* — неозвученные дрожжевые клетки Endomyces magnusii, *б* — клетки E. magnusii, озвученные в течение 30 *сек*

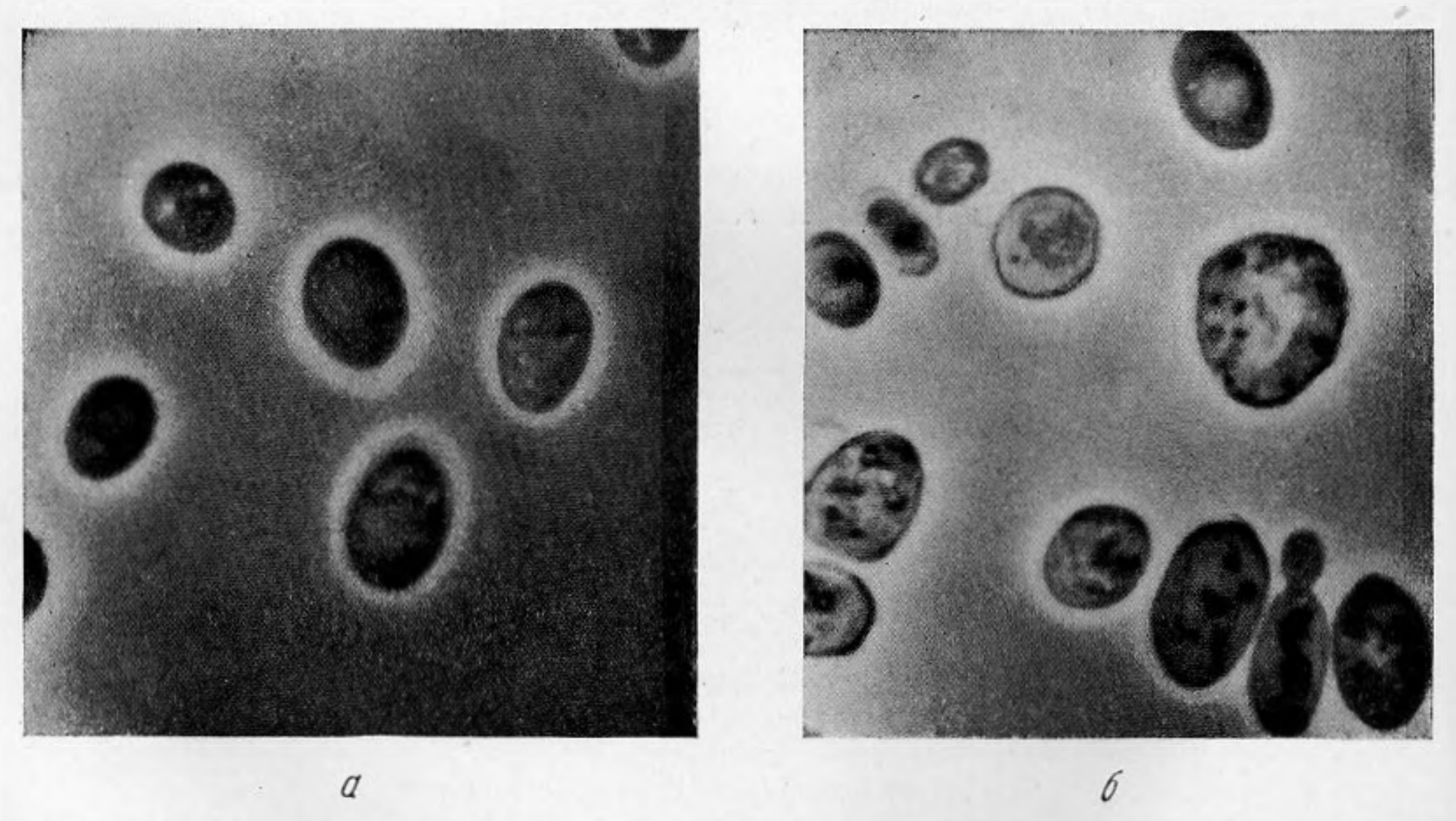
Фиг. 2 *а* — контрольные клетки E. magnusii (темное поле), *б* — клетки E. magnusii, озвученные в течение 30 *сек* (темное поле)



Фиг. 5. *1* — исходная суспензия дрожжей Saccharomyces globosus (отсутствие фермента), *2* — появление фермента после озвучивания в течение 15 *мин*, *3* — инактивация фермента кипячением, *4* — после озвучивания дрожжевых клеток в течение 30 *мин*; *а* — сахароза, *б* — фруктоза



Фиг. 3. Разные типы повреждения клеток E. magnusii при озвучивании в течение 5 *мин* дрожжевой суспензии



а *б*

Фиг. 4. *а* — неозвученные клетки Saccharomyces cerevisiae, *б* — клетки Saccharomyces cerevisiae, озвученные в течение 10 *мин*, *в* — то же в течение 20 *мин*, *г* — то же в течение 30 *мин*

на стериновые соединения сахаромицетов, представленные в этих клетках преимущественно в виде эргостерина — провитамина $Д_2$. Для исследования были использованы следующие культуры дрожжей : Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces carlsbergensis и Saccharomyces carlsbergensis Frohberg. Озвучивание сахаромицетов осуществлялось в стеклянных кол-

Таблица 1

Влияние ультразвука на содержание эргостерина в различных штаммах дрожжевых клеток — сахаромицетов (2-суточная культура)

Название дрожжевой культуры	Содержание эргостерина в дрожжевых клетках в %		Увеличение выхода эргостерина в %
	до озвучивания	после озвучивания	
Saccharomices cerevisiae . .	1,07	1,80	68
» »	1,09	1,72	58
Saccharomices carlsbergensis	3,06	4,00	30
» »	3,06	4,00	30
Saccharomices carlsbergensis Frohberg	2,54	3,89	53
То же	2,75	3,89	41

Таблица 2

Непосредственное влияние различных физических агентов на содержание эргостерина в дрожжевых клетках (Saccharomyces cerevisiae)

Название физического агента	Количество эргостерина в %		Увеличение количества эргостерина в %
	до воздействия	после воздействия	
Рентгеновские лучи	1,09	1,10	0
Ультрафиолетовые лучи . .	1,09	1,09	0
Прогревание культуры на кипящей водяной бане в течение 30 *мин*	1,09	1,12	0
Ультразвуковые волны . .	1,09	1,72	48

бах в течение 45 минут, частота колебаний — 740 *кгц*, интенсивность ультразвука — 10 *вт/см*^{2}. Количество эргостерина определялось по методу Гайдушки и Линднера, модифицированному Проскуряковым. Результаты исследования приведены на табл. 1.

Как видно из табл. 1, содержание эргостерина в озвученных клетках Saccharomyces cerevisiae увеличивается приблизительно на 60%, в Saccharomyces carlsbergensis — на 30% и в Saccharomyces carlsbergensis Frohberg — на 45%. Для выхода эргостерина не имеет значения, производилось ли озвучивание суспензии дрожжей в щелочной или нейтральной среде. Важно отметить, что увеличение содержания эргостерина в дрожжевых клетках происходит только под действием ультразвуковых волн. Другие физические агенты (рентгеновские лучи, ультрафиолетовые лучи и обычное тепло) непосредственно не вызывают увеличения содержания эргостерина в изученных дрожжевых культурах (табл. 2).

О возможном влиянии ультразвуковых волн на клеточные молекулярные комплексы свидетельствуют и другие наблюдения. Считалось установленным, что дрожжевые клетки Saccharomyces globosus 349 не содержат фермента инвертазы, расщепляющего сахарозу. Клетки эти приобретают способность сбраживать сахарозу лишь при длительном и многократном выращивании в среде, содержащей названное вещество (сахарозу) [4]. Оказалось, что под действием ультразвуковых волн в клетках Saccharomyces globosus 349 появляется активная инвертаза (интенсивность ультразвука — 10 *вт/см*^{2} [5], частота — 740 000 *гц*, продолжительность озвучивания — 30 *мин*). Фермент этот был обнаружен в сгущенных растворах озвученных суспензий сахаромицетов, как видно из приведенной хроматограммы (фиг. 5).

Увеличение активности фермента инвертазы нами было обнаружено при воздействии ультразвуковыми волнами на другие дрожжевые штаммы, в интактных клетках которых он обычно присутствует. Это явление было установлено при изучении локализации ферментов в озвученных дрожжевых клетках. От локализации ферментов в клетке в значительной степени зависят активность и направленность действия последних. Как было показано, под действием ультразвуковых волн легко разрываются дрожжеподобные клетки — эндомицеты (Endomyces magnusii), что позволяет отделить содержимое протоплазмы от оболочек. Это создает благоприятные условия для определения в отдельности наличия ферментов в протоплазменной фракции и в оболочках. Таким путем удалось показать, что дегидразы являются цитоплазматическими ферментами, инвертаза тесно связана со структурами оболочки. Наряду с этим выявилось, что в озвученных препаратах Endomyces magnusii активность инвертазы увеличивается в 3—4 раза по сравнению с активностью данного фермента в неозвученных клетках названной дрожжевой культуры. Можно предположить, что с клеточной оболочкой также связаны молекулярные комплексы инвертазы, лишенные ферментативной активности. Лишь под влиянием ультразвуковых волн осуществляется «расшатывание» этих комплексов с переходом фермента в окружающую среду в активном состоянии. Повышения ферментативной активности под действием ультразвуковых волн не было выявлено при изучении ферментов, находящихся в протоплазменной фракции озвученных дрожжевых клеток Endomyces magnusii. Это относится и к ферменту мальтазе, обнаруженному в протоплазме исследованных клеток.

Следует отметить, что в литературе нет указаний на возможность повышения ферментативной активности при воздействии ультразвуковыми волнами на очищенные или кристаллические ферменты в водной среде. В этих случаях обычно выявляется инактивирующее действие данного физического агента. Инактивация фермента происходит, вероятнее всего, в результате взаимодействия этого фермента с валентно-ненасыщенными свободными радикалами — продуктами расщепления ионизированных молекул воды: HO, HO_2, H и др. Ионизация молекул воды осуществляется в кавитационных полостях, где возникают огромные электрические напряжения [6]. Есть основание думать, что появление весьма активных в химическом отношении продуктов расщепления ионизированных молекул воды обусловливает распад аминокислот и белка, деполимеризацию нуклеиновых кислот, расщепление пуриновых соединений и других биологически активных веществ [7]. Более того, подбором определенных веществ или газов удается задержать или усилить те или иные химические реакции [8, 9, 10]. В присутствии воздуха быстро инактивируются в поле ультразвуковых волн водные растворы полифенолоксидазы (тирозиназа). Водород, наоборот, снижает в данном случае инактивирующее действие этого вида энергии [11]. В присутствии четыреххлористого углерода усиливается инактивация фермента инвертазы, весьма устойчивой в обычных условиях озвучивания [12]. По этим данным, усиление инактивации фермента на-

блюдается и в присутствии иодистого калия, окисляющегося под действием ультразвука с образованием атомарного иода. Однако усиления инактивирующего действия KJ и CCl_4 не наблюдается, если в озвучиваемом растворе присутствует альбумин, легко блокирующий атомарный иод и атомарный хлор. Выявление такого механизма подавления и усиления химических процессов значительно расширяет наши представления о характере процессов, вызываемых ультразвуком в водной среде, окружающей биологические объекты. Наряду с механическими силами, порождаемыми кавитацией, для биологического эффекта, повидимому, велико значение и химических процессов, развивающихся в результате кавитационного электрохимического действия ультразвука. Возможность кавитации внутри животных или растительных клеток подвергается сомнению. Отсутствие кавитации связывают с большой вязкостью цитоплазмы. Иными словами, механические и химические процессы, генетически связанные с кавитацией, протекают во внешней среде и поражают в первую очередь клеточные мембраны или оболочки, граничащие с этой средой. Неслучайным, повидимому, является усиление активности инвертазы, локализованной в оболочках дрожжевых клеток. Не случайны, вероятно, и другие факты, установленные нами в последнее время.

Известно, что фермент холинэстераза, имеющий интимное отношение к процессам возникновения и передачи нервного импульса, расположен в мембранах нервной ткани и ее элементов. Проведенные опыты показали, что при воздействии на измельченную мозговую ткань ультразвуковыми волнами, активность холинэстеразы, связанной со структурами этой ткани, увеличивается почти в два раза. Активность фермента возрастала почти в 3 раза, когда мозговая ткань озвучивалась в присутствии незначительного количества перекиси водорода (H_2O_2 усиливает окислительные химические процессы под действием ультразвука). При прибавлении к тканевой суспензии H_2O_2 процесс высвобождения фермента протекает таким образом, что облегчается переход этого фермента в суспензионную среду. Однако повышение в данном случае активности фермента не свидетельствует еще о том, что оно полностью обусловлено химическими процессами, протекающими в поле ультразвуковых волн. Этиловый эфир, всегда тормозящий кавитационные электрохимические явления, только несколько угнетает процесс усиления активности холинэстеразы, связанной со структурами нервной ткани.

Иное поведение в поле ультразвуковых волн экстрагированной из мозговой ткани холинэстеразы. Изолированная из мозговой ткани холинэстераза инактивируется под действием данного физического агента. При этом H_2O_2 усиливает процесс инактивации фермента, а этиловый эфир полностью защищает его от разрушения.

Усиление активности исследованных ферментов, входящих в состав субмикроскопических структур клеточных мембран, может быть обусловлено рядом процессов. К последним должны быть отнесены инактивация ингибиторов, разрушение молекулярного комплекса, в который входит фермент, обнажение ферментативных центров белковой молекулы, нарушение физического состояния биокатализатора — изменение пространственной конфигурации и ориентации молекул и т. д. Все эти процессы в основном могут быть воспроизведены при воздействии ультразвуковыми волнами большой интенсивности на водные растворы индивидуальных биологически активных веществ. Они возникают в результате непрямого действия ультразвуковых волн, вызываемого кавитационно-электрохимическими явлениями в водной среде. Однако, как сказано, возникновение кавитации внутри клетки взято под сомнение, так как вязкость протоплазмы значительна. Закономерна мысль, что сдвиги в физико-химическом состоянии биоколлоидов могут быть также вызваны механическими силами, интимно связанными с распространением ультраакустических колебаний (ускорение и смещение частиц). Эту возможность необходимо осо-

бенно учитывать при анализе описываемых выше явлений, которые преимущественно сосредоточены на границе разных фаз. Повидимому, особую роль здесь играют ионные и мицеллярные вибрационные потенциалы, возникающие в биоколлоидах под действием ультразвуковых волн. Несомненно, дальнейшее развитие исследований в указанном направлении послужит более быстрой расшифровке механизма биологического действия ультразвуковых волн.

ЛИТЕРАТУРА

1. И. Е. Эльпинер. О механизме действия ультразвуковых волн на микроорганизмы. Микробиология, 1955, **24**, 3, 371—381.
2. Г. А. Медведева и И. Е. Эльпинер. Действие ультразвуковых волн на дрожжевые клетки. Журн. общ. биолог., 1955, **16**, 4, 315—320.
3. А. И. Опарин, Н. С. Гельман и И. Е. Эльпинер. Изучение локализации ферментов в клетках Endomyces magnusii при помощи ультразвуковых волн. ДАН СССР, 1954, **96**, 3, 573—576.
4. К. В. Косиков. Генетика дрожжей и методы селекции дрожжевых культур. Изд.-во АН СССР. М., 1954.
5. А. И. Опарин, Н. С. Гельман и И. Е. Эльпинер. Обнаружение инвертазы у Saccharomyces globosus 349 при помощи ультразвуковых волн. ДАН СССР, 1954, **97**, 2, 293—295.
6. Я. И. Френкель. Об электрических явлениях, связанных с кавитацией, обусловленной ультразвуковыми колебаниями в жидкости. ЖФХ, 1940, **14**, 305.
7. И. Е. Эльпинер. О биологических и химических процессах в поле ультразвуковых волн. ЖТФ, 1951, **21**, 10, 1204—1212.
8. И. Е. Эльпинер и Ц. Б. Кац. Действие ультразвуковых волн на пуриновые и пирамидиновые основания. ДАН СССР, 1952, **82**, 611—614.
9. И. Е. Эльпинер и М. Ф. Колесникова. О процессах окисления и восстановления иода в поле ультразвуковых волн. ДАН СССР, 1950, **75**, 837—839.
10. И. Е. Эльпинер, Л. А. Блюменфельд и С. Э. Красовицкая. Распад порфиринового ядра под действием ультразвуковых волн. ДАН СССР, 1951, **79**, 495—498.
11. P. Grabar, I. Voinovitch et R. Prudhomme. Action des ultrasons sür une oxydase. Biochim. Biophys. Acta, 1949, **3**, 412.
12. А. И. Опарин, М. С. Бардинская и И. Е. Эльпинер. Действие ультразвуковых волн на дрожжевую инвертазу. ДАН СССР, 1954, **99**, 423—426.

Институт биофизики АН СССР
Москва

Поступила в редакцию
21 февраля 1956 г.