



УДК 547.024+577.1

## РАЗВИТИЕ КОНЦЕПЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ПАРАМАГНЕТИКОВ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

М. Д. Гольдфейн

Саратовский государственный университет  
E-mail: goldfeinmd@mail.ru



Исследование конденсированных фаз, содержащих стабильные радикалы, с помощью радиоспектроскопии представляет собой метод парамагнитного зондирования. Этот метод (с применением иминоксильных радикалов) позволил установить механизм взаимодействия антигенов с антителами при изучении иммунных гамма-глобулинов, особенности структурных переходов в биологических мембранах, изучить структуры некоторых модельных систем. Показано, что производные некоторых иминоксильных радикалов обладают низкой токсичностью и проявляют относительно высокую антилейкемическую активность; наибольшие величины коэффициентов торможения наблюдались для гемоцитобластов в периферической крови, в костном мозге и при химиотерапии некоторых раковых опухолей.

**Ключевые слова:** биология, органический парамагнетик, метод, изучение, радиоспектроскопия, зондирование, механизм.

### Development of Concept of Organic Paramagnetics in Molecular Biology

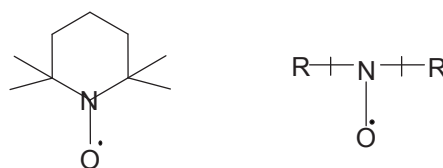
M. D. Goldfein

Research of the condensed phases containing stable radicals, by means of radiospectroscopy represents a method of paramagnetic sounding. This method (using iminoxyl radicals) allowed to set the mechanism of interaction of anti-genes with antibodies in case of study of immune gamma globulins, particularly structural transitions in biological membranes, to study the structure of some model systems. It is shown that certain derivatives of iminoxyl radicals have low toxicity and exhibit a relatively high antileukemic activity, greatest quantities were observed for the inhibition ratios hemocytoblasts in peripheral blood, bone marrow, and during chemotherapy of certain cancers.

**Key words:** biology, organic paramagnetic method, study, radio spectroscopy, sensing, mechanism.

Присутствие парамагнитных частиц в жидких или твердых объектах открыло новые возможности их изучения методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Источниками парамагнитных частиц могут быть готовые свободные радикалы и вещества, образующие парамагнитные растворы за счет спонтанной гомолиза молекул в жидких и твердых средах. Одной из важнейших проблем химии и молекулярной биологии являются синтез и использование спиновых меток и зондов на основе пиперидиновых и пирролидиновых нитроксильных стабильных радикалов. Их высокая устойчивость к воздей-

ствию тепла, кислорода и других химических реагентов позволяет использовать эти соединения в науке и технике в качестве стабилизаторов мономеров и полимеров, антиоксидантов, датчиков напряжений, рабочих веществ квантовых оптических генераторов (лазеров). Стабильные иминоксильные и азотокисные радикалы, ковалентно связанные с макромолекулой (спиновые метки) или введенные в молекулы биологических систем в относительно небольших количествах (спиновые зонды), позволяют получать уникальную информацию о структуре и динамике исследуемых систем.



Вещества этих классов вступают в обычные, давно известные свободнорадикальные реакции: рекомбинации, диспропорционирования, присоединения к кратным связям, изомеризации и  $\beta$ -расщепления [1]. Все эти реакции реализуются с неизменным участием радикального центра и неизменно приводят к полной потере парамагнетизма. Указанные нефункциональные стабильные радикалы сыграли очень важную роль и их использование показало, что для стабильности парамагнетика вовсе не обязательна выраженная делокализация неспаренного электрона по системе кратных связей. Открытие долгоживущих радикалов неароматического характера [2] не изменило ранее существовавших представлений о реакционной способности известных органических парамагнетиков. В 1960-х гг. было положено начало нового направления в химии свободных радикалов – синтезу и реакционной способности функциональных стабильных радикалов с выраженно локализованным парамагнитным центром [3]. Функциональные свободные радикалы быстро нашли широкое применение в качестве парамагнитных зондов для изучения молекулярного движения в конденсированных фазах различной природы. С их использованием

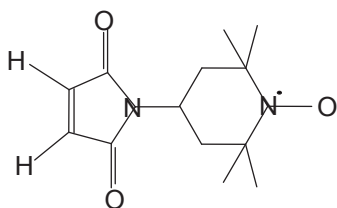


связано возникновение метода спиновой метки (ковалентно связанного парамагнитного зонда), идея которого основана на зависимости формы спектра ЭПР свободного радикала от свойств ближайшего атомного окружения и способа взаимодействия парамагнитного фрагмента со средой. Химической основой получения спин-меченых соединений стали реакции свободных радикалов без затрагивания парамагнитного центра (реакции Неймана–Розанцева) [4]. Концепция использования нерадикальных реакций радикалов в исследованиях макромолекул была сформулирована Лихтенштейном [5], а теоретические основы метода, способы расчета времен корреляции вращательной подвижности парамагнитной частицы по форме спектра ЭПР разработаны в работах [6–8]. Затем было исследовано поведение иминоксильных радикалов в различных системах [9].

Выделим несколько важных аспектов применения органических парамагнетиков в исследованиях биологических систем.

#### Применение иминоксильных свободных радикалов для изучения иммунных $\gamma$ -глобулинов

С физико-химической точки зрения механизм различных иммунологических реакций определяется изменением фазового состояния системы. Для исследования механизма взаимодействия антигенов с антителами были использованы меченные иминоксильными радикалами  $\gamma$ -глобулины [10]. Известно, что молекула  $\gamma$ -глобулина состоит из четырех полипептидных цепей, соединенных друг с другом дисульфидными мостиками. При расщеплении межцепочечных дисульфидных связей полипептидные цепи продолжают удерживаться вместе. Спин-метка – иминоксильное производное малеимида



была присоединена к сульфгидрильным группам, полученным восстановлением дисульфидных связей  $\beta$ -меркаптоэтанолом. Опыты проводились на  $\gamma$ -глобулинах кролика и человека. Спектры ЭПР в обоих случаях соответствовали относительно большой подвижности свободных радикалов (время корреляции  $\tau=1,1 \cdot 10^{-9}$  с для человеческого и  $7,43 \cdot 10^{-9}$  с для кроличьего  $\gamma$ -глобулина). Сравнивая времена корреляции

в этих белках со значениями, полученными в опытах с меченым по сульфгидрильным группам сывороточным альбумином, обработанным мочевиной ( $\tau=1,09 \cdot 10^{-9}$  с) и диоксаном ( $2,04 \cdot 10^{-9}$  с), можно сделать вывод, что фрагменты полипептидных цепей, несущие свободные радикалы, не обладают упорядоченной вторичной структурой. Такой характер спектра ЭПР иммунного  $\gamma$ -глобулина при сохранении им специфической активности позволил исследовать конформационные и фазовые переходы при специфических реакциях антиген – антитело. Были выявлены резкие различия в подвижности спин-метки при осаждении кроличьих антител высаливанием сульфатом аммония и преципитацией специфическим антигеном (яичным альбумином), что приводило лишь к небольшому уменьшению подвижности парамагнитной метки, тогда как осаждение сульфатом аммония вызывало сильное торможение вращательной подвижности свободных радикалов (рис. 1).

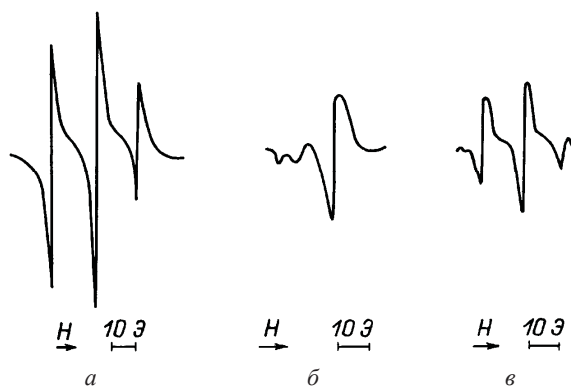


Рис. 1. Спектры ЭПР  $\gamma$ -глобулина, меченного иминоксильным радикалом без затрагивания свободной валентности: а – в растворе; б – в осадке, полученном путем высаливания сульфатом аммония; в – в специфическом преципитате

Эти результаты можно рассматривать как прямое подтверждение альтернативной теории [11], согласно которой образование преципитата связано с иммунологической поливалентностью антигена и антитела по отношению друг к другу. Действительно, заведомо исключая расположение спин-меток в активном центре антитела, можно прийти к выводу, что относительно подвижное состояние спин-меток в преципитате антиген–антитело может сохраняться лишь при условии, когда нет сильной дегидратации антител за счет межмолекулярного взаимодействия. В отличие от  $\gamma$ -глобулина, осажденного сульфатом аммония, специфический преципитат в соответствии с теорией решетки имеет микрочаеистую структуру. При длительном хранении преципитата

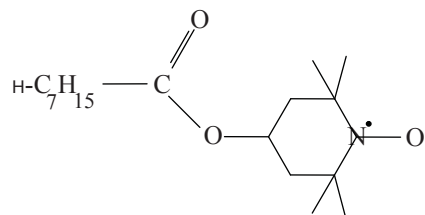


та антиген-антитело без добавки стабилизаторов степень подвижности иминоксильных радикалов резко уменьшалась.

Это, по-видимому, является результатом вторичной дегидратации антител вследствие взаимодействия молекул белка в преципитате.

### Исследование структурных переходов в биологических мембранах

Биологические мембраны, в особенности мембраны митохондрий, играют важную роль в окислительно-восстановительных процессах в клетке, являясь местом локализации ферментов дыхательной цепи. Ранее были обнаружены существенные различия в свойствах одного из фрагментов митохондриальной мембраны – комплекса III по Грину – при переходе из окисленной формы в восстановленную: сульфгидрильные группы, легко титрующиеся в окисленной форме этого фрагмента, становятся недоступными в восстановленной. Затем электронно-микроскопическим методом были выявлены изменения в повторяющихся структурных единицах митохондрий в условиях, ведущих к образованию макроэргических промежуточных продуктов или их обеспечения, например, активного переноса ионов [14]. Все это позволило предположить, что окислительно-восстановительная реакция, катализируемая ферментативной цепью переноса электрона, сопровождается своего рода «конформационной волной», охватывающей, возможно, не только белковый компонент мембраны, но и более высокий уровень организации: фрагменты мембраны большей или меньшей степени сложности, в том числе ее липидную часть. Для проверки этого предположения была использована модификация метода спиновых меток – метод нековалентно связанного парамагнитного зонда. Радикал при этом удерживается матрицей (мембраной) только слабыми гидрофобными связями. Такой подход позволил исследовать слабые взаимодействия в системе без существенного нарушения биохимических функций биомембраны и ее структуры. Парамагнитный зонд представлял собой каприловый эфир 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксила:



Это соединение было получено из хлорангидрида каприловой кислоты и 2,2,6,6-тетраметил-

4-оксипиперидин-1-оксила в среде триэтиламина по реакции радикала без затрагивания свободной валентности. Парамагнитный зонд вводился в суспензию электронотранспортных частиц (ЭТЧ), выделенных из митохондрий сердца быка. Эти фрагменты митохондриальной мембраны характеризуются довольно полным набором ферментов дыхательной цепи с тем же молярным соотношением, которое имеет место в интактных митохондриях [14].

Парамагнитный зонд нерастворим в воде, но солюбилизируется взвешенными в буферном растворе ЭТЧ. Благодаря этому наблюдаемый спектр ЭПР свободен от фона, создаваемого радикалом, не связанным с исследуемым объектом. Наличие объемистой углеводородной цепи обеспечивает «встраивание» молекулы зонда в липидную часть ЭТЧ. Таким образом, спектр ЭПР отражает состояние именно этой фракции мембраны. Для обнаружения конформационных переходов регистрировали спектр ЭПР до и после введения субстратов окисления (сукцината и НАД-Н), а также после окисления ранее восстановленной дыхательной цепи феррицианидом калия. Типичные результаты показаны на рис. 2 [12]. Отчетливо видно усиление анизотропии спектра ЭПР иминоксила после введения субстрата. Спектр в ЭТЧ, окисленных феррицианидом, заметным образом не отличается от такового в интактных ЭТЧ.

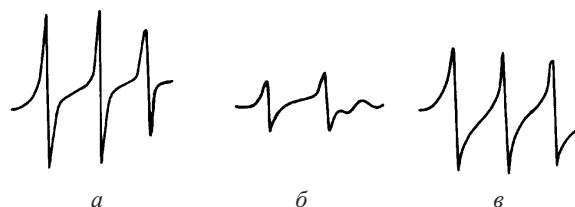


Рис. 2. Изменение анизотропии спектра ЭПР гидрофобного иминоксильного радикала в суспензии электронотранспортных частиц из митохондрий сердца быка при добавлении субстратов окисления: а – до введения субстратов окисления, б – после введения сукцината, в – после окисления ранее восстановленной дыхательной цепи феррицианидом калия

Инактивирование ЭТЧ длительным выдерживанием при комнатной температуре или ингибирование цианидом снимало этот эффект. Сопоставление формы сигналов и времен корреляции показывает, что спектр ЭПР иминоксила в интактных ЭТЧ состоит из двух сигналов, различающихся по анизотропии. Слабо анизотропный сигнал дает радикал, локализованный в той части мембраны, где эффективный свободный объем, представляемый для движения радикала,

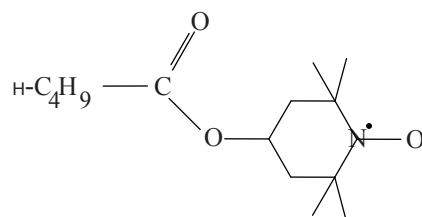


достаточно велик. Сильно анизотропный (заторможенный) спектр принадлежит радикалам, локализованным в других участках системы с меньшим эффективным свободным объемом. Восстановление дыхательной цепи субстратами приводит вследствие конформационного перехода кооперативного типа к уменьшению доли участков с большим свободным объемом (т.е. к увеличению микровязкости ближайшего окружения радикала). Время корреляции суммарного спектра меняется при этом от  $20 \cdot 10^{-10}$  в окисленных до  $4 \cdot 10^{-10}$  с в восстановленных ЭТЧ.

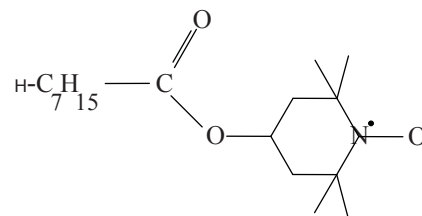
Параллельно с усилением анизотропии сигнала уменьшается и его интенсивность: иминоксил восстанавливается, по-видимому, до производных гидроксилamina. Феррицианид калия обращает этот процесс. Следует учесть, что субстраты окисления сами по себе заметным образом не взаимодействуют с иминоксилами. Очевидно, конформационный переход приводит не только к изменению микровязкости, но и снимает стерические препятствия, затрудняющие восстановление радикала. В принципе это обстоятельство указывает на возможный новый, собственно химический, аспект применения метода парамагнитного зонда.

#### Исследование структуры некоторых модельных систем

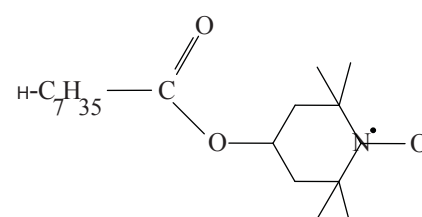
Применение метода парамагнитного зонда в системах типа биологических мембран ставит перед исследователем ряд вопросов, относящихся к поведению гидрофобных меток в средах с упорядоченным расположением гидрофобных цепей. В качестве первого этапа были изучены смеси неионного детергента твина-80 и воды. Твин-80 представляет собой олеинсорбитанполиэтиленгликоль и относится к числу неионных детергентов на основе оксида полиэтилена [12]. Выбор объекта определялся некоторыми методическими удобствами, а также тем, что в литературе имеются данные о структуре водных растворов твина, полученные классическими методами (вискозиметрия, рефрактометрия и др.). Свойства этого детергента интересны и сами по себе, поскольку он находит довольно широкое применение при фрагментации биологических мембран. В качестве парамагнитного зонда использовали сложные эфиры 2,2,6,6-тетраметил-4-оксиперидин-1-оксила и насыщенных кислот нормального строения с длиной углеводородной цепи 4, 7 и 17 атомов углерода или соответствующие амиды. Для сравнения было также изучено поведение в этих системах гидрофобных меток IV и V



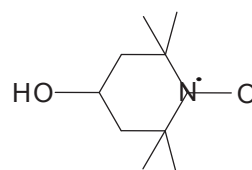
I



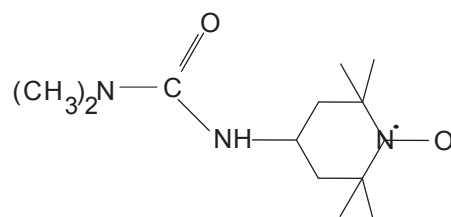
II



III



IV



V

Ход изменения времени корреляции вращения радикалов в зависимости от концентрации твина изображен на рис. 3. Можно выделить несколько областей, отвечающих, по-видимому, различным типам структур. Начальный участок, различимый лишь для наиболее легких радикалов, соответствует ненасыщенному раствору твина в воде. Эта область лучше выявляется у детергентов с большей критической концентрацией мицеллообразования (ККМ), например, у додецилсульфата натрия (рис. 4) [13]. Затем наступает мицеллообразование. При этом вре-





мья корреляции водонерастворимых меток возрастает и выходит на плато; при дальнейшем увеличении концентрации детергента оно проходит через максимум, после чего монотонно возрастает вплоть до значения его в чистом твине. Целесообразно сопоставить эти данные с результатами вискозиметрических измерений обычными макрометодами. Рис. 5 показывает, что вязкость имеет один экстремум в области около 60% твина. Таким образом, при высокой концентрации твина эффективный объем, представленный для вращения молекулы зонда, и макровязкость не коррелируют.

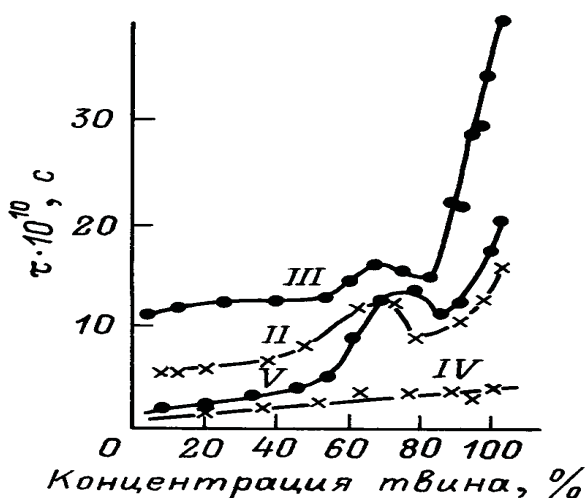


Рис. 3. Изменение времени корреляции в системе детергент-вода для нитроксильных радикалов с сильно локализованным парамагнитным центром

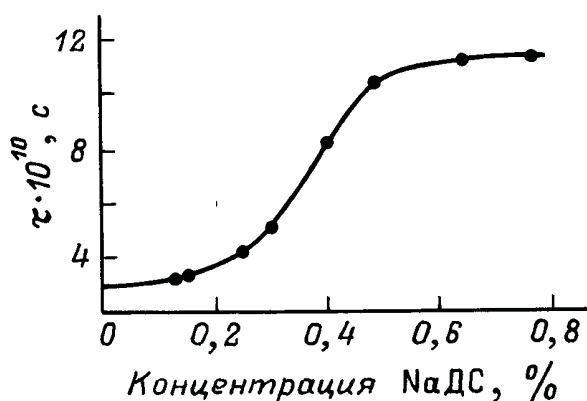


Рис. 4. Определение критической концентрации мицеллообразования додецилсульфата натрия с помощью варерата 2,2,6,6-тетраметил-4-гидро-ксипиперидил-1-оксила

Эти результаты можно объяснить следующим образом. В чистом твине ламеллярная структура обеспечивает легкое послойное скольжение, поэтому макровязкость системы мала. Однако в отсутствие воды взаимодействие полярных групп велико, углеводородные цепи упорядоче-

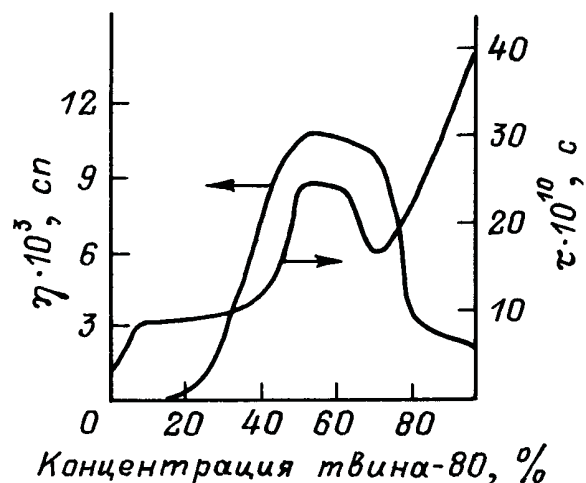


Рис. 5. Изменения микро- и макровязкости системы вода-твин-80

ны и эффективный свободный объем в области локализации радикала мал. Небольшие количества воды приводят к образованию дефектов в слоистой структуре. Скольжение затрудняется, поэтому вязкость возрастает. Однако увлажнение нарушает тесное взаимодействие полярных групп твина. Последние деформируются и углеводородные цепи разупорядочиваются. При этом макровязкость углеводородного слоя уменьшается. По окончании гидратации полярных групп образуются полости, заполненные водой. Они являются структурным элементом (мицеллой), из которого строится система. Структурообразование проявляется как рост микро- и макровязкости. В области максимума возможно обращение фазы. Образуются структурные единицы нового типа – мицеллы твина в воде, переходящие при дальнейшем разбавлении в коллоидный раствор. Ход изменения макровязкости при высоких концентрациях твина поразительно напоминает изменение времени корреляции при увлажнении некоторых лиофилизированных клеточных оргanelл. Это сходство подтверждает, что в области максимума  $\tau$ , где начинается реставрация биохимической активности хлоропластов, происходит фазовый переход того же типа, что и в жидкокристаллических системах детергент – вода.

Некоторую информацию о поведении радикальных частиц в коллоидных системах дают результаты температурных измерений. Рис. 6 иллюстрирует зависимость времени корреляции от температуры в аррениусовских координатах для нескольких иминоксильных радикалов различной степени гидрофобности.

Сильная зависимость предэкспоненты от длины цепи, по-видимому, подтверждает, что наблюдаемое время корреляции действительно



отражает вращение молекулы радикала как целого. Однако этот результат допускает и другую интерпретацию: в зависимости от длины углеводородной цепи радикал внедряется в мицеллу детергента на большую или меньшую глубину. Это может привести к изменению частоты вращения иминоксильной группы вокруг простых связей в молекуле в зависимости от окружения полярного конца радикала. Если полярная группа радикала находится на поверхности раздела мицелла – растворитель, то измеряемая частота должна зависеть от поверхностного заряда (потенциала) мицеллы. По нашему мнению, этот круг коллоидно-химических проблем, тесно связанных также с вопросами трансмембранного переноса в биологических системах, составит еще одно поле применений метода парамагнитного зонда.

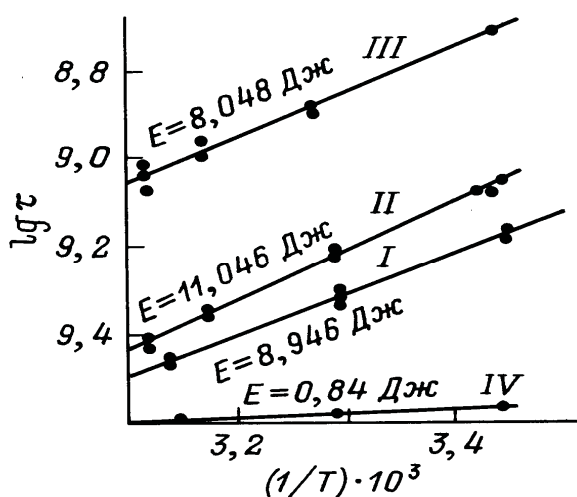


Рис. 6. Энергия активации вращательной диффузии свободных иминоксильных (нитроксильных) радикалов в системе твин-вода (30% твина-80)

#### Решение других биологических проблем с помощью стабильных радикалов

Дальнейший прогресс в области использования стабильных парамагнетиков для решения разнообразных биологических задач нашел отражение в многочисленных обзорных статьях и монографиях, например [14–27]. Для динамической биохимии несомненный интерес представляют локальные конформационные изменения белковых молекул в растворах. Расстояния между определенными локусами биомакромолекул в принципе можно количественно оценить с помощью стабильных парамагнетиков. После введения иминоксильных фрагментов в определенные участки нативного белка (НРР-метод) расстояние между соседними парамагнитными центрами можно рассчитать по эффективности

их диполь-дипольного взаимодействия в застеклованных растворах спин-меченого препарата (ЭПР-метод). В одних из первых работ по оценке расстояния между парамагнитными центрами в спин-меченых мезоциме и гемоглобине была указана перспективность такого подхода. В связи с этим возникла необходимость выявления простого эмпирического параметра в спектрах ЭПР для количественной оценки диполь-дипольного взаимодействия парамагнитных центров.

Удобный эмпирический параметр был найден при изучении застеклованных растворов иминоксильных радикалов. Им оказалось значение отношения суммарной интенсивности крайних компонентов спектра к интенсивности центральной (рис. 7). Для установления корреляции величины  $d_1/d$  со средним расстоянием между локализованными парамагнитными центрами были построены соответствующие калибровочные графики (рис. 8). Расчет показал, что параметр  $d_1/d$  зависит от значения диполь-дипольного уширения и удовлетворительно согласуется с независимо полученными экспериментальными результатами. Впоследствии методы количественной оценки расстояний между парамагнитными центрами в бирадикалах и спин-меченых биомолекулах и стали надежным инструментом в структурных исследованиях.

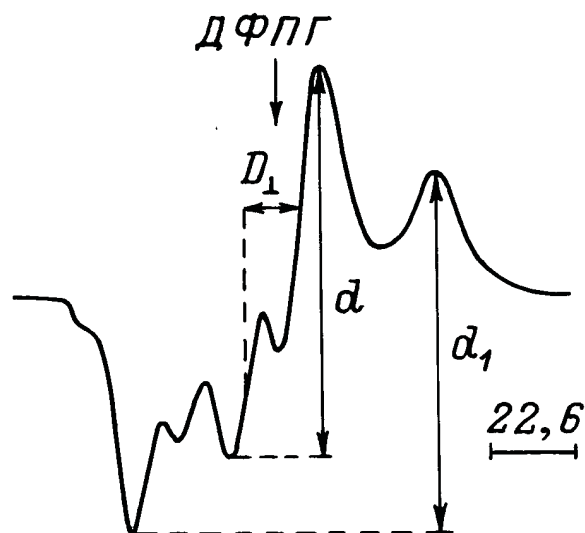


Рис. 7. Спектр ЭПР иминоксильного свободного бирадикала (фталата 2,2,6,6-тетрамethyl-4-гидрокси-пиперидин-1-оксила), застеклованного в толуоле при 77К

При определении констант скорости релаксации разных парамагнитных центров в растворе оказалось, что значения этих констант существенно зависят от химической природы функциональных групп в иминоксильных радикалах.

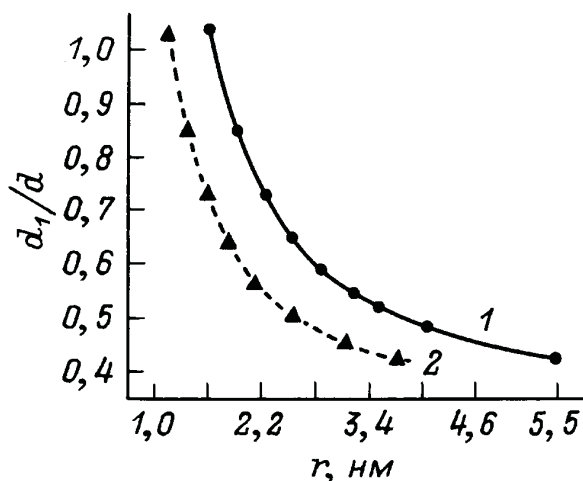


Рис. 8. Зависимость параметра  $d_1/d$  спектра ЭПР от величины среднего расстояния  $r$  между взаимодействующими парамагнитными центрами иминоксильных радикалов (1) и бирадикалов (2) при 77 К

Наиболее сильное влияние на значения констант оказывает изменение знака электростатического заряда заместителя и степень его удаления от парамагнитной иминоксильной группы. Более существенным фактором является электростатический эффект, обусловленный величиной и знаком заряда взаимодействующих в растворе парамагнитных частиц. Увеличение ионной силы приводит к изменению значения  $k$  в качественном согласии с теорией Дебая. Другим фактором, заметно влияющим на значения константы, является масса заместителя. Если заместителем является белковая макромолекула, значение  $k$  в пределе уменьшается в 2 раза. Проанализированы возможности применения метода парамагнитного зонда для обнаружения анионных и катионных групп и оценки расстояний при исследовании микроструктуры белка. Полученные на опыте зависимости показывают, что уравнение Дебая с  $D = 80$  может успешно применяться для анализа экспериментальных данных и, в частности, для оценки расстояния от иминоксильной группы спин-метки на белке до ближайшей заряженной группы, если это расстояние не превышает 1.0–1.2 нм.

Учитывая роль свободнорадикальных процессов при лучевой терапии раковых заболеваний, было предложено исследовать воздействие иминоксильных радикалов на организм лабораторных животных. Фармакокинетические исследования показали, что простейшие функционализированные производные 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксида обладают относительно низкой токсичностью и проявляют выраженную антилейкемическую ак-

тивность. Наибольшие значения коэффициентов торможения наблюдались для гемоцитобластов в периферической крови и костном мозге. Это обстоятельство стимулировало дальнейшие структурно-синтетические исследования, направленные на получение более эффективных и менее токсичных канцеролитиков и сенситизаторов для лучевой терапии рака.

#### Список литературы

1. Розанцев Э. Г. Химический энциклопедический словарь. М. : Сов. энцикл., 1983.
2. Розанцев Э. Г., Лебедев О. Л., Казарновский С. Н. Диплом на открытие № 248 от 05.10.1983 // ИР. 1982. № 6. С.6.
3. Розанцев Э. Г. Парамагнитные производные окиси азота : дис. ... д-ра физ.-мат. наук. М., 1965.
4. Zhdanov R. I. Nitroxyl Radicals and Non-Radical Reactions of Free Radicals // Bioactive Spin labels / ed. R. I. Zhdanov. Springer. Berlin ; Heidelberg ; N.Y., 1991. P. 24.
5. Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. М. : Наука, 1974.
6. McConnell H. J. Effect anisotropic hyperfine interaction s on paramagnetic relaxation in liquids // Chem. Phys. 1956. Vol. 25. P. 709–711.
7. Freed J., Fraenkel G. J. Oximetry deep in tissues with low-frequency electron paramagnetic resonance // Chem. Phys. 1963. Vol. 39. P. 326–348.
8. Стрюков В. Б. Стабильные радикалы в химической физике. М. : Знание, 1971.
9. Гольдфельд М. Г., Григорян Г. Л., Розанцев Э. Г. Высокомолекулярные соединения : сб. препринтов. М. : ИХФ АН СССР, 1979. С. 269.
10. Григорян Г. Л., Татарнинова С. Г., Кульберг Л. Я., Калмансон А. Э., Розанцев Э. Г., Сускина В. И. Парамагнитная метка при изучении иммунных гамма-глобулинов // Докл. АН СССР. 1968. Т. 178. С. 230–283.
11. Pressman D. Mol. Structure and Biological Specificity. Washington : D. C., 1957.
12. Розанцев Э. Г. Биохимия мяса и мясных продуктов (Общая часть) : учеб. пособие для студ. вузов. М. : ДеПи принт, 2006.
13. Кольтовер В. К., Кутлахиедов В. К., Сухоруков Б. И. Особенности структуры твина в жидких средах // Докл. АН СССР. 1968. Т. 181. С. 730–737.
14. Смит Я., Шриер-Мучилло Ш., Марч Д. Метод спиновых меток // Свободные радикалы в биологии : в 2 т. М. : Мир, 1979. Т. 1. С. 179.
15. Шокова Э. А., Розанцев Э. Г., Ожогина О. А., Розов А. К. Синтез дииминоксила в условиях дегидротации и его применение при изучении биологических систем // Докл. АН СССР. 1990. Т. 314, № 4. С. 875.
16. Henry Y., Guissani A. Contribution on spin-trapping EPR techniques for the measurement of NO production in biological systems // Analysis. 2000. Vol. 28, № 6. P. 445–454.



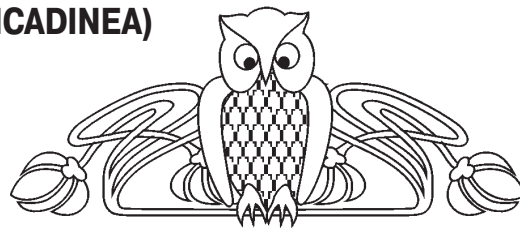
17. Розанцев Э. Г., Гольдфейн М. Д., Пулин В. Ф. Органические парамагнетики. Саратов : Изд-во Саратов. ун-та, 2000.
18. Hanafy K. A. ALS and other Neuron Disorders // Med. Sci. Monit. 2001. Vol. 7, № 4. P. 801–819.
19. Davies M. J. Electron Paramagnetic Resonance // Cambridge J. Royal Soc. of Chem. 2002. Vol. 18. P. 47–73.
20. Петухов М. С., Рычков Г. А., Серрано Л. Методы регистрации и химические особенности NO // Бреслеровские чтения : молекулярная генетика, биофизика и медицина сегодня. СПб. : Изд-во ПИЯФ РАН, 2002. Вып. 1. С. 148–168.
21. Бободжанов П. Х. Изучение структуры и молекулярной динамики хлопковой целлюлозы и глобулярных белков методом спиновых меток и зондов : дис. ... д-ра хим. наук. М., 2003.
22. Hausmann O. N. NO, nitrotyrosine and cyclic GMP in signal transduction // Spinal Cord. 2003. Vol. 41, № 7. P. 369–378.
23. Koltover V. K. Theory of reability and biological aging // Carbon. 2004. Vol. 42, № 5. P. 1179–1183.
24. Furukawa Y., O'Halloran T. V. Biological effects of CCS in the abtstnce of SOD 1 enzyme // Antioxid. Redox Signal. 2006. Vol. 8, № 5. P. 847–867.
25. Vanin A. F., Bevers L. M., Mikoyan V. D., Poltorakov A. P., Kubrina L. N., Faassen van E. Application complexes Fe-DTK by spin-trapping for NO // Nitric Oxide. 2007. Vol. 16, № 1. P. 71–81.
26. Гольдфейн М. Д., Иванов А. В., Маликов А. Н. Концепции современного естествознания. Курс лекций / под ред. проф. М. Д. Гольдфейна. М. : Изд-во РГТЭУ, 2009.
27. Гольдфейн М. Д., Урсул А. Д., Иванов А. В., Маликов А. Н. Основы естественнонаучной картины мира / под ред. проф. М. Д. Гольдфейна. Саратов : Изд-во СИ (филиал) РГТЭУ, 2011.

УДК 579.26

## АССОЦИАТИВНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ НАСЕКОМЫХ ПОДТРЯДА ЦИКАДОВЫЕ (НОМОПТЕРА, CICADINEA)

Е. В. Глинская, А. Ю. Тяпкин, А. М. Петерсон,  
Н. О. Макаров, Р. А. Верховский

Саратовский государственный университет  
E-mail: elenavg-2007@yandex.ru



Изучены видовой состав, количественные показатели и встречаемость ассоциативных микроорганизмов трех видов цикадовых (*Cicadella viridis*, *Athysanus argentarius*, *Lepyronia coleoprata*) в окрестностях озера Став (Саратовская область). Из организмов цикадовых выделено 15 видов бактерий, количественные показатели которых варьировали от  $10^2$  до  $10^5$  КОЕ в пробе, индексы встречаемости – от 20 до 60%. Бактерии рода *Gluconobacter* присутствовали как в растительном соке, так и в пищеварительном тракте *Lepyronia coleoprata*.

**Ключевые слова:** ассоциативные микроорганизмы, насекомые, цикадовые.

### Associative Microorganisms of Cicadinea (Homoptera)

E. V. Glinskay, A. Yu. Tyapkin, A. M. Peterson,  
N. O. Makarov, R. A. Verchovskii

Species composition, quantitative indicators and occurrence of associative microorganisms of *Cicadella viridis*, *Athysanus argentarius*, *Lepyronia coleoprata* around Lake Staw (Saratov region) were studied. 15 bacteria species were revealed. Quantitative indicators varied from  $10^2$  to  $10^5$  CFU per sample, index of occurrence – from 20 to 60%. *Gluconobacter* was present in the vegetable juice and digestive tract of *Lepyronia coleoprata*.

**Key words:** associative microorganisms, insects, Cicadinea.

Насекомые подотряда цикадовые (Homoptera, Cicadinea) широко распространены и многочисленны во многих растительных ассоциациях, особенно в травяном ярусе. Положительная роль цикадовых в природных биоценозах заключается в том, что они являются пищевыми объектами для других животных, главным образом, для насекомоядных птиц [1–2]. Однако будучи облигатными фитофагами, цикадовые являются серьезными вредителями сельскохозяйственных культур: древесно-кустарниковых пород, пастбищных и декоративных растений. Кроме того, большой вред цикадовые наносят как переносчики фитопатогенных микроорганизмов [3–4].

Актуальной проблемой в настоящее время является изучение ассоциативных микроорганизмов различных групп насекомых, однако сведения, посвященные микробиоценозам насекомых, в том числе цикадовых, в современной литературе практически отсутствуют [5].

Целью настоящей работы являлось изучение ассоциативных микроорганизмов насекомых подотряда цикадовые (Homoptera, Cicadinea).