

Эне КИЙРЕНД, Рээт АГУРАЙЮЯ, Эндель ЛИППМАА

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ РАДИОЧАСТОТНОГО И МИКРОВОЛНОВОГО ДИАПАЗОНОВ НА ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНУЮ РЕАКЦИЮ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ И ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЯХ

В данной работе приведены результаты исследования влияния высокочастотного электромагнитного поля (ВЧ ЭМ поля) на фермент-субстратную реакцию. Аналогичные эксперименты провел П. Фогельгут (Vogelhut, 1960), который зарегистрировал специфическое резонансное влияние ЭМ поля в интервале 8200—12 400 Мгц на скорость фермент-субстратной реакции лизоцима.

М. М. Чирков (1965) также обнаружил влияние ЭМ поля с частотой 27 Мгц на протекание реакции между перекисью водорода и каталазой.

### Материал и методика

В настоящей работе в ЭМ поле исследованы реакции: щелочной фосфатазы (ЩФ) с *пара*-нитрофенилфосфатом (НФФ), альдолазы с фруктозо-1,6-дифосфатом (ФДФ) в присутствии  $\alpha$ -глицерофосфат-дегидрогеназы (ГФД) и триозофосфатизомеразы (ТФИ), глутаматоксалацетат-трансаминазы (ГОТ) с  $\alpha$ -кетоглутаратом ( $\alpha$ -КГ) и НАД·Н в присутствии малатдегидрогеназы (МДГ), глутаматдегидрогеназы (ГДГ) с  $\alpha$ -КГ в присутствии НАД·Н и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) с пируватом и НАД·Н. Изучалась также реакция связанной в полиакриламидном геле ЛДГ с пируватом. 7,5%-ный полиакриламидный гель приготовлялся из препарата Цианогум 41 фирмы «Шухарт» в растворе 0,05 М фосфатного буфера (рН 7,5),  $1,2 \cdot 10^{-4}$  М рибофлавина (ч., фирмы «Хемапол») и  $1,5 \cdot 10^{-3}$  М сульфата натрия (х. ч.).

Чтобы увеличить долю мощности ЭМ поля, поглощенной белком, ряд реакций исследовался в очищенных органических растворителях.

Так как в данной работе использовались коммерческие препараты ферментов разных фирм и реакции проводились с разными субстратами, то в таблицах указывается точное происхождение каждого препарата.

Ферментативные реакции проводились в течение 20—40 мин, причем все это время реакционная смесь циркулировала в замкнутой системе как в присутствии (опыт), так и в отсутствии (контроль) ЭМ поля при одинаковых температурах (точность измерения температуры  $\pm 0,05^\circ\text{C}$ ). Исползованная методика циркуляции и установка облучения в РЧ диапазоне описана в работе Э. Кийренд, Э. Липпмаа (1973). В микроволновом диапазоне облучение растворов проводилось на установке, схема которой представлена на рисунке. Облучаемая реакционная смесь проходила через термостатированную проточную измерительную кювету,

Таблица 1

Генератор ЗГ-10А, стеклянная трубка в волноводе, емкость кюветы  $V_k=3,2$  мл, емкость всей системы  $V_c=18$  мл, скорость циркуляции 2,7 мл/сек, поглощаемая мощность до 5 вт

Фермент	Субстрат	Частота, Мгц	Активность, %
ЩФ («Кох-Лайт»)	синт. Ва-соль НФФ	2220	100±2 (7)*
		2300	100, 102, 101
		2400	99, 102, 102, 101
ЩФ («Калбиохим») в 70%-ном диоксане	(«Калбиохим») Na-соль НФФ	2200	100±2 (6)
		2300	100±3 (10)
		2400	100±2 (6)

\* В скобках во всех таблицах указано число параллельных измерений.

Таблица 2

Коротковолновый судовой передатчик (типа 1410.SA2), ( $V_k=17,4$  мл,  $V_c=28$  мл, скорость циркуляции 3,8 мл/сек, мощность до 20 вт)

Фермент	Субстрат	Частота, Мгц	Активность, %
ЩФ («Калбиохим»)	Na-соль НФФ, («Калбиохим»)	10	103, 98, 99
		11	93, 103, 100, 100, 99
		12	100±3 (13)
ЩФ («Калбиохим») в 50%-ном диоксане		10	100±3 (11)
		11	103, 102, 101, 100
		12	100, 105, 102, 102
ЩФ («Калбиохим») в 50%-ном ДМСО		11	100, 99, 98, 102
		12	101, 102, 98, 99
ЩФ («Калбиохим») в 50%-ном ацетоне		11	100, 103, 98
		12	100, 101, 100

Таблица 3

ЛДГ, пируват, НАД-Н, скорость циркуляции 4,6 мл/сек,  $V_k=3,7$  мл,  $V_c=16$  мл,

Частота, облучения, Мгц	Мощность облучения, вт	Источник ЭМ поля	Активность, %
700	2	Г4-5	100±2 (8)
2000	5	Г3-10А	101±2 (10)
2220	4	"	99±5 (10)
2300	5	"	99±3 (5)
2363	4	"	102±3 (10)
2413	"	"	98±4 (9)
2500	"	"	100±2 (5)
2580	"	"	97±5 (8)
2617	"	"	100±4 (8)
2660	"	"	99±2 (6)

Таблица 4

ЛДГ, пируват, НАД·Н, скорость циркуляции 4,6 мл/сек,  $V_h = 16$  мл,  $V_c = 35$  мл, судовой передатчик, мощность облучения до 20 вт

Частота облучения, Мгц	Среда реакции	Активность, %
10	Буферный раствор	101±2 (7)
11	То же	100±2 (14)
12	"	99±5 (7)
20	"	100±3 (6)
10	30%-ный ацетон	98±5 (6)
12	30%-ный диоксан	100±2 (8)
12	40%-ный ДМСО	99±3 (6)

Таблица 5

ЛДГ в полиакриламидном геле, площадь поверхности геля 11 см<sup>2</sup>,  $V_h = 3$  мл,  $V_c = 16$  мл, генератор ГЗ-10А, кювета в волноводе, скорость циркуляции 4,6 мл/сек

Частота облучения, Мгц	Концентрация фермента в геле, мг/мл	Активность, %
2213	0,40	100±2 (4)
2220	0,40	101±2 (6)
2220	1,25	100±2 (6)

где оптическая плотность регистрировалась на спектрофотометре Sperecord UV-VIS Zeiss. Для облучения в РЧ диапазоне применялся коротковолновый судовой передатчик типа 1410.SA2 (при котором поглощаемая раствором мощность достигала 20 вт). В микроволновом диапазоне применялись генераторы ГЗ-10А (максимальная поглощаемая мощность 5 вт), Г4-5 (поглощаемая мощность 2 вт) и Луч-2 (поглощаемая мощность до 15 вт). Генераторы соединялись с волноводом, в котором помещалась стеклянная трубка с циркулирующей через нее реакционной смесью. Связанный в полиакриламидном геле фермент находился также в стеклянной трубке волновода, а в замкнутой системе циркулировал буферный раствор субстрата.

### Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены результаты исследования в микроволновом диапазоне реакции ЩФ с НФФ в 0,01 М глициновом буфере (х. ч., «Реанал», рН 10,5) и в 70%-ном (по объему) диоксане при температуре 37°. Концентрация субстрата в реакционной смеси составляла  $4 \cdot 10^{-3}$  М, концентрация ЩФ («Калбиохим») — 30 мкг/мл и ЩФ («Кох-Лайт») — 50 мкг/мл. Из приведенных результатов следует, что активность ЩФ (судя по изменению оптической плотности при 450 нм в течение 20 мин) в пределах ошибки измерений не отличается от контрольной. Концентрации реагентов подбирались по литературным данным (Бресткин и др., 1967).

В табл. 2 представлены результаты исследования этой же реакции в РЧ диапазоне. Концентрация ЩФ в буферном растворе — 4 мкг/мл, в диоксане, ацетоне и диметилсульфоксиде (ДМСО) — около 10 мкг/мл.

В табл. 3 и 4 представлены результаты исследования реакции ЛДГ с пируватом (очищенная К-соль) в 0,05 М фосфатном буфере с рН 7,5 и в органических растворителях при температуре 28°. Концентрация НАД·Н составляла  $1,3 \cdot 10^{-4}$  М, пирувата —  $2,9 \cdot 10^{-4}$  М, а количество фермента варьировалось в зависимости от условий эксперимента. В буферном растворе концентрации ЛДГ составляла  $3-4 \cdot 10^{-5}$  М, в 30%-ном ацетоне —  $8 \cdot 10^{-4}$  М, 30%-ном диоксане —  $1,32 \cdot 10^{-3}$  М и в 40%-ном ДМСО —  $1,06 \cdot 10^{-3}$  М. Реакция связанной в полиакриламидном геле ЛДГ проводилась при температуре 26°, результаты представлены в табл. 5.

В табл. 6 приведены данные исследования влияния ЭМ поля с частотой 2375 Мгц. Эксперименты проводились на установке (см. рисунок)

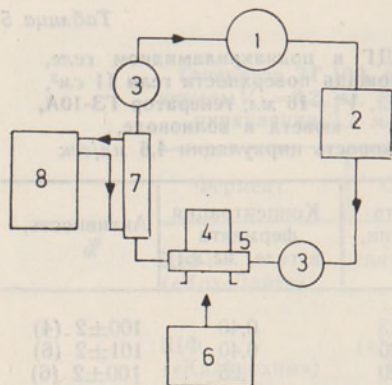


Схема установки для облучения в микроволновом диапазоне.

1 — термостатированная измерительная кювета, 2 — насос, 3 — термометр, 4 — волновод, 5 — кювета облучения, 6 — генератор, 7 — холодильник, 8 — термостат.

без холодильника. Подогрев кюветы при контроле осуществлялся электроспиралью. Реакция ЩФ в буферном растворе описывалась выше. Реакция альдозазы (фирмы «Реанал», трехкратно перекристаллизованная) исследовалась при температуре  $37^\circ$  в  $0,056$  М коллидиновом буфере с рН 7,4, в  $3 \cdot 10^{-4}$  М моноиодацетате, в  $2 \cdot 10^{-3}$  М ФДФ и  $1 \cdot 10^{-4}$  М НАД·Н. Концентрация альдозазы в реакционной смеси составляла  $40$  мкг/мл, кристаллическая суспензия ГФД и ТИМ ( $0,1$  мг протеина на  $1$  мл суспензии) употреблялась без разбавления ( $0,1$  мл на  $20$  мл реакционной смеси).

Реакция ГОТ исследовалась при температуре  $25^\circ$  в  $0,025$  М фосфатном буфере с рН 7,4, в  $1 \cdot 10^{-3}$  М L-аспартате с  $1 \cdot 10^{-2}$  М  $\alpha$ -КГ в присутствии  $2 \cdot 10^{-4}$  М НАД·Н и малатдегидрогеназы ( $20$  мкг/мл). Кон-

Таблица 6

Луч-2, мощность до  $15$  Вт,  $V_k = 3,2$  мл,  $V_c = 18$  мл, скорость циркуляции  $2,6$  мл/сек

Фермент	Субстрат	Активность, %
ЩФ («Калбиохим»)	НФФ, соль Na («Бэрингер»)	$100 \pm 3$ (5)
Альдозаза («Реанал») ГДФД («Бэрингер») ТФИ „	ФДФ, $\alpha$ -КГ, НАД·Н («Бэрингер»)	$100 \pm 3$ (17)
ГОТ, МДН («Бэрингер»)	$\alpha$ -КГ, НАД·Н («Бэрингер»)	$100 \pm 2$ (6)
ГДГ («Бэрингер»)	$\alpha$ -КГ, НАД·Н («Бэрингер»)	$100 \pm 3$ (11)
ЩФ («Калбиохим») в 50%-ном ацетоне	НФФ («Калбиохим»)	100, 102, 99
ЩФ в 70%-ном диоскане	То же	100, 101, 100

центрация ГОТ —  $5$  мкг/мл; продолжительность облучения до  $40$  мин. Кинетика реакций с НАД·Н регистрировалась по поглощению при  $340$  нм. Реакция ГДГ исследовалась при температуре  $26^\circ$  в  $0,02$  М триэтанолминовом буфере с рН 8,0 в присутствии  $4 \cdot 10^{-3}$  М ЭДТА,  $5 \cdot 10^{-3}$  М  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ,  $4 \cdot 10^{-4}$  М НАД·Н и  $1 \cdot 10^{-3}$  М  $\alpha$ -КГ. Концентрация ГДГ составляла  $1$  мкг/мл.

Остальные реакции описывались выше.

Из приведенных результатов следует, что ферментативная активность в ЭМ поле РЧ и микроволнового диапазонов при ранее отмеченных частотах не отличается от контрольной. Можно полагать, что для ферментативных реакций существует определенный уровень интенсивности облучения, ниже которого эффект не проявляется. Возможно, что воздействие ЭМ поля носит резонансный характер и, кроме того, для получения за-

метного результата необходимо длительное облучение. Однако для понимания биологического эффекта РЧ воздействия необходимы исследования на молекулярном уровне, без которых невозможно объяснить механизм влияния ЭМ поля на целостный организм.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Vogelhut P., 1960. Study of enzymatic activity under the influence of 3 cm electromagnetic radiation. — 3<sup>d</sup> Internat. Conf. Med. Electronics: 52.
- Чирков М. М., 1965. Влияние энергии электромагнитных колебаний звукового и радиочастотного диапазона на активность катализы и пероксидазы крови кроликов и тканей крыс. Автореф. канд. дисс., Воронеж.
- Кийренд Э. О., Липпмаа Э. Т., 1973. Исследование воздействия высокочастотного электромагнитного поля на ферментативную активность альфа-амилазы поджелудочной железы свиньи. Изв. АН ЭССР. Биология, 22 (4) : 302—308.
- Бресткин А. П., Никольская Е. Б., Карпенко Н. Б., 1967. Кинетика гидролиза *p*-нитрофенилфосфата натрия под действием щелочной фосфатазы. Биохимия 32 : 261.

Институт кибернетики  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
22/I 1973

Ene KIIREND, Reet AGURAIUIA, Endel LIPPMAA

#### RAADIOSAGEDUSLIKU JA MIKROLAINE PIIRKONNA ELEKTROMAGNETILISE VÄLJA MÕJU FERMENDI JA SUBSTRAADI VAHELISELE REAKTSIOONILE VESILAHUSTES JA ORGAANILISTES SOLVENTIDES

##### Resümee

Et arvestada võimalikku pöörduvat mikrolainete ja raadiolainete mõju fermentatiivsele aktiivsusele, viidi läbi rida ferment-substraatreaktsioone kõrgsagedusväljas. Kontrollreaktsioon teostati samades tingimustes ilma kõrgsagedusväljata. Uuriti spektrofotomeetriliselt jälgitavaid reaktsioone aluselise fosfataasi ja *p*-nitrofenüülfosfaadi ning aldolaasi ja fruktoos-1,6-difosfaadi vahel,  $\alpha$ -glütserofosfaatdehüdrogenaasi ja triosofosfaat-isomeraasi juuresolekul, samuti laktaatdehüdrogenaasi (LDH) ja polüakrüülamiidgeeli seotud LDH-i ning pürovaadi vahel NADH juuresolekul ning glutamaatoksalaatsetaadi transaminaasi ja  $\alpha$ -ketoglutarraadi vahel NADH ja malaatdehüdrogenaasi juuresolekul.

Osa reaktsioone viidi läbi orgaanilistes solventides dimetüülsulfoksiidis, atsetoonis ja dioksaanis.

Sagedustel 10, 11, 12 MHz (reaktsioonisegus neeldunud võimsus (N) kuni 20 W), 700 MHz (N kuni 2 W), 2000, 2220, 2300, 2400, 2500, 2660 (N kuni 5 W) ja 2375 MHz (N kuni 15 W) ja 2375 MHz (N kuni 15 W) ei täheldatud spetsiifilist kõrgsagedusvälja efekti fermentatiivsele aktiivsusele.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia  
Küberneetika Instituut

Toimetusse saabunud  
22. I 1973

Ene KIIREND, Reet AGURAIUIA, Endel LIPPMAA

#### STUDY OF THE EFFECT OF RADIO-FREQUENCY AND MICROWAVE ELECTROMAGNETIC FIELDS ON THE ENZYME-SUBSTRATE REACTION IN AQUEOUS SOLUTIONS AND ORGANIC SOLVENTS

##### Summary

We have studied the influence of radio-frequency and microwave energy on the enzyme-substrate reaction. The samples were irradiated (exposures usually from 20 to 40 min.) at 10, 11 and 12 Mc/sec. (the absorbed average power 20 Watts), at 700 Mc/sec (2 Watts average power), at 2000, 2220, 2300, 2400, 2500 and 2660 Mc/sec (5 Watts average power) and at 2375 Mc/sec (15 Watts average power). The samples

with enzyme were flowing in a closed circulating system through an exposure arrangement into a thermostated spectrophotometer cell where the optical density was continuously recorded. We studied the following reactions: alkaline phosphatase with *p*-nitrophenylphosphate, aldolase with fructose-1,6-diphosphate in the presence of  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase and triosephosphate isomerase, lactate dehydrogenase (LDH) and LDH adsorbed in polyacrylic gel with pyruvate and NAD H, glutamate dehydrogenase with  $\alpha$ -ketoglutarate and NAD H, and glutamic-oxalacetic transaminase with  $\alpha$ -ketoglutarate, NADH and malate dehydrogenase. Most of the samples were commercially available mixtures chiefly from Boehringer, BRD.

To increase radio-frequency power absorbed in proteins some of the runs were carried out in purified organic solvents: alkaline phosphatase was measured in 70-per-cent (v/v) dioxane, 50-per-cent (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) and 50-per-cent (v/v) acetone, whereas LDH was recorded in 30-per-cent (v/v) acetone, 30-per-cent (v/v) dioxane and 40-per-cent (v/v) DMSO.

The reported reactions did not indicate any selective effects of the radio-frequency and microwave energy on enzymatic activity.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,  
Institute of Cybernetics

Received  
Jan. 22, 1973

RAADIOSAGEDUSTE JA MIKROLAINE PIRIKOJA ELEKTROMAGNETILISE  
VALJA MÕJU FERMENTI JA SUBSTRADI VAHELISELE REAKTSIOONILE  
VESILAHUSTES JA ORGAANILISTES SOLVENTIDES

Et arvestada võimalikku mõjuvõimet mikroainete ja radioaktiivsete isotoopidega ensüümidele, uuriti nende mõju ensüümidele ja nende suhtes. Enamasti kasutati boehringeri tootetud ensüümide segu, mille koostis on järgmine: alkaline phosphatase, aldolase,  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase, triosephosphate isomerase, lactate dehydrogenase (LDH) ja LDH adsorbed in polyacrylic gel with pyruvate and NAD H, glutamate dehydrogenase with  $\alpha$ -ketoglutarate and NAD H, and glutamic-oxalacetic transaminase with  $\alpha$ -ketoglutarate, NADH and malate dehydrogenase. Most of the samples were commercially available mixtures chiefly from Boehringer, BRD.

To increase radio-frequency power absorbed in proteins some of the runs were carried out in purified organic solvents: alkaline phosphatase was measured in 70-per-cent (v/v) dioxane, 50-per-cent (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) and 50-per-cent (v/v) acetone, whereas LDH was recorded in 30-per-cent (v/v) acetone, 30-per-cent (v/v) dioxane and 40-per-cent (v/v) DMSO.

The reported reactions did not indicate any selective effects of the radio-frequency and microwave energy on enzymatic activity.

REACTION IN AQUEOUS SOLUTIONS AND ORGANIC SOLVENTS  
EFFECT OF RADIO-FREQUENCY AND MICROWAVE  
ELECTROMAGNETIC FIELDS ON THE ENZYME-SUBSTRATE

Enzyme reactions were studied in a closed circulating system through an exposure arrangement into a thermostated spectrophotometer cell where the optical density was continuously recorded. We studied the following reactions: alkaline phosphatase with *p*-nitrophenylphosphate, aldolase with fructose-1,6-diphosphate in the presence of  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase and triosephosphate isomerase, lactate dehydrogenase (LDH) and LDH adsorbed in polyacrylic gel with pyruvate and NAD H, glutamate dehydrogenase with  $\alpha$ -ketoglutarate and NAD H, and glutamic-oxalacetic transaminase with  $\alpha$ -ketoglutarate, NADH and malate dehydrogenase. Most of the samples were commercially available mixtures chiefly from Boehringer, BRD.