EESTI NSV TEADUSTE AKADEEMIA TOIMETISED. 22. KÖIDE
BIOLOOGIA. 1973, NR. 4

ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК ЭСТОНСКОЙ ССР. ТОМ 22
БИОЛОГИЯ. 1973, № 4

https://doi.org/10.3176/biol.1973.4.02

УДК 577.154.3.03

ЭНЕ КИЙРЕНД, ЭНДЕЛЬ ЛИППМАА

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ВЫСОКОЧАСТОТНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ α-АМИЛАЗЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СВИНЬИ

Нет сомнения в том, что химические реакции, катализируемые ферментами, ускоряются под воздействием активных группировок (имидазольных, карбоксильных и других) в активном центре макромолекулы фермента. Кроме того, уже малые изменения молекулярной конформации приводят к изменениям активности и даже специфичности фермента.

После неудачных попыток создания эффективных моделей ферментов — активных фрагментов протеолитических ферментов, простых комплексов меди и других металлов — Х. Киферу с сотрудниками (Kiefer и др., 1972) удалось, наконец, получить полимер на основе декстрана с имидазольными группами, имеющий сульфатазную активность, в 10^{12} раз превышающую каталитическую активность растворенного имидазола.

В то же время достаточно загадочными остаются вопросы механического (вибрационного) перераспределения энергии между реакционными центрами в митохондриях, хлоропластах и т. д., а также точный механизм передачи аллостерического влияния. Многие авторы (Lumry, Biltonen, 1969; Phillipson, 1968; Чернавский и др., 1967) считают вибрацию и возможность запасания энергии в этих степенях свободы весьма важными для каталитической активности ферментов. Процессы такого рода требуют сегментальных вибраций отдельных частей молекул белка, достаточно изолированных от среды, так что запасенная энергия не распределяется моментально по всем степеням свободы молекулы. Если это действительно так, то существует коренное различие между ферментами и их небелковыми моделями. Эти вибрации должны указывать на возможность резонансного поглощения радиочастотной (РЧ) энергии на соответствующих резонансных частотах. По мнению Д. С. Чернавского с сотрудниками (1967), представляет интерес исследование ферментативных систем в гиперзвуковом поле, а также изучение возможных резонансных явлений в электромагнитном (ЭМ) поле соответствующих частот.

Действительно, методами комбинационного рассеяния уже найдены низкочастотные (НЧ) коллективные вибрации в некоторых ферментах на частоте 29 $см^{-1}$ (Brown, Erfurth, 1972). Этот резонанс исчезает при денатурации фермента.

Из результатов изучения спектров протонного резонанса рибонуклеа-

зы следует, что в окрестности одного из гистидиновых остатков фермента происходят спонтанные колебания между двумя конформациями с частотой 50 *гц* (Meadows, Jardetzky, 1968).

Обнаружены также низкочастотные колебания в синтетических полипептидах, сопровождающие переход спираль—клубок (Markley и др., 1967).

В то же время медицинская литература содержит очень много данных о нетепловых эффектах, вызываемых ЭМ полем в живых организмах самых разных видов. Опубликовано несколько работ о действии ЭМ поля на молекулярном уровне. По данным М. М. Чиркова (1964, 1965), сверхвысокочастотные (СВЧ) и НЧ ЭМ поля вызывают в разбавленной (1 : 1000) крови кролика изменение активности ферментов каталазы и пероксидазы. Л. А. Афанасьева с сотрудниками (1971) подтверждают резонансное воздействие микроволн на гемоглобин. В работах С. А. Баха с сотрудниками (Bach и др., 1961; Bach и др., 1962; Bach, 1965) найдено специфическое резонансное влияние РЧ поля на ферментативную активность (ФА) α-амилазы поджелудочной железы свиньи и изменение электрофоретической диаграммы γ-глобулинов.

Влияние РЧ поля на алкогольдегидрогеназу и ДНК исследовано С. Такашима (Takashima, 1966). Последний не обнаружил специфического эффекта. Имеются и другие данные об аналогичных экспериментах *in vitro*. Как видно, публикации свидетельствуют о противоречивых результатах исследования влияния ВЧ и СВЧ ЭМ полей на биополимеры.

Материал и методика

α-Амилаза поджелудочной железы свиньи была получена методом Колдуэлла (Caldwell и др., 1952) из панкреатина свиньи, произведенного Ленинградским мясокомбинатом им. С. М. Кирова, и очищена гелевой фильтрацией на сефадексе G-75. Амилазная активность определялась методом Бернфелда (Bernfeld, 1955) с амилопектином фирмы «Аустроварен» или растворимым крахмалом и 3,5-динитросалициловой кислотой Рижского завода «Реагент». Оптическая плотность измерялась на спектрофотометре СФ-4 при 540 *нм*.

Для экспериментов применялись подходящие фракции гельфильтрации панкреатической α-амилазы с наименьшим содержанием протеолитических ферментов, которые определялись методом казеина (Bergmeyer, 1952). Раствор амилазы был разбавлен 0,02 М фосфатным буфером (pH — 6,9) до подходящей концентрации фермента (оптическая плотность при определении ФА находилась в пределах 0,2—0,7). В некоторых опытах использовалась кристаллическая α-амилаза поджелудочной железы свиньи, произведенная фирмой «Сигма», с концентрацией около 1 *мкг/мл*. Растворы этого препарата в 0,02 М фосфатном буфере пропускались через колонку биогеля P-2 для освобождения от ионов Ca^{2+} (добавленных к коммерческому препарату для стабилизации фермента), поскольку известно (Elödi, Krusteva, 1970), что они сильно тормозят денатурацию панкреатической амилазы.

Первые опыты с амилазой имели целью повторить опыты С. А. Баха (Bach, 1962). Облучаемый раствор фермента выдерживался в стеклянной кювете, охлаждаемой фракцией уайт-спирта с малыми диэлектрическими потерями. Стеклянная кювета находилась в катушке выходного контура коротковолнового судового передатчика (тип 1410. SA2, мощность 150 *вт*). Температура облучаемого раствора измерялась бензольным термометром. Контрольный опыт проводился при той же температуре. После экспозиции определялась ФА облучаемого раствора. Во

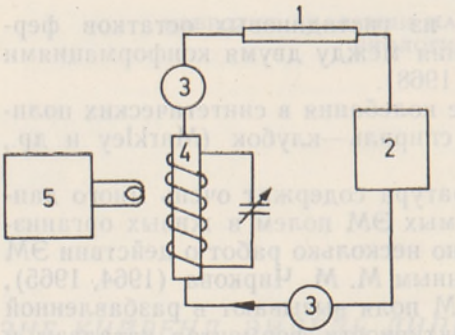


Рис. 1. Схема установки для облучения растворов в ЭМ поле. *1* — холодильник; *2* — насос; *3* — термометр; *4* — кювета облучения; *5* — генератор.

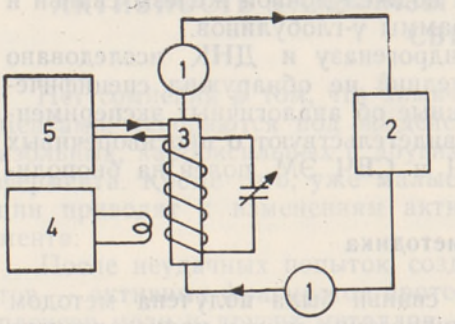


Рис. 3. Схема установки для облучения растворов в ЭМ поле с термостатированной кюветой. *1* — термометр; *2* — насос; *3* — кювета облучения; *4* — генератор; *5* — термостат.

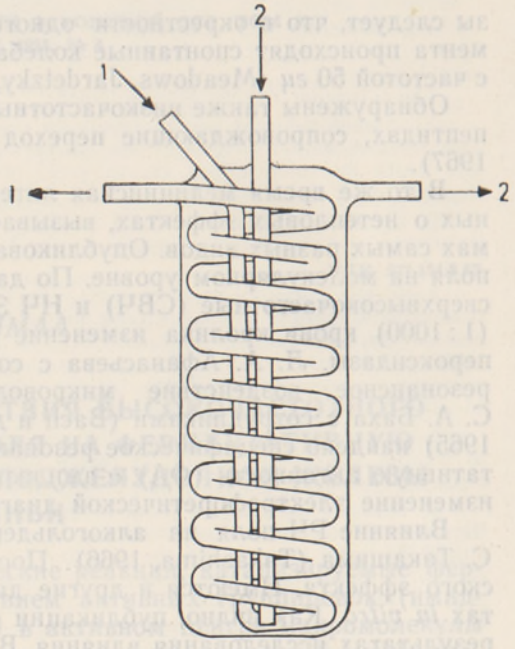


Рис. 2. Термостатированная кювета. *1* — реакционная смесь; *2* — термостатирующая жидкость.

избежание локального перегрева ферментативного раствора при облучении последний перемешивался циркуляцией его в замкнутой системе, состоящей из кюветы облучения, холодильника, термометров и перистальтического насоса (рис. 1). В системе и насосе в качестве соединений применялись трубки из силиконового каучука. Часть опытов проводилась с термостатированной кюветой (рис. 2) на установке без холодильника (рис. 3). Мощность, поглощаемая в облучаемых растворах, достигала 20 *вт*.

Результаты и обсуждение

Предварительно была исследована термическая денатурация амилазы. Раствор фермента выдерживался в ультратермостате и затем определялась ФА. Как видно из табл. 1, инактивация зависит от температуры и резко возрастает при температурах выше 38 °С. Поэтому все опыты с ЭМ полем проводились при температуре ниже 37°.

Данные по денатурации циркулирующего раствора амилазы представлены в табл. 2. Денатурация повышается с ростом температуры и зависит также от концентрации ферментативного раствора.

В табл. 3 приведены данные по исследованию влияния ЭМ поля с частотами 10; 11; 12; 22 и 25 *Мгц* на ФА амилазы. Облучение проводилось на установке, схема которой представлена на рис. 1.

Таблица 1

Термическая денатурация α-амилазы поджелудочной железы свиньи

Время температурного воздействия, *ч*	Температура раствора, °С	Оптическая плотность раствора	Процент активности
3	20	0,352	98,6
	35	0,347	
3	20	0,450	89,8
	36	0,404	
3	20	0,538	83,6
	37	0,450	82,4
	38	0,444	
2	20	0,202	60,0
	40	0,121	
3	20	0,440	47,8
	40	0,210	

Таблица 2

Денатурация циркулирующего раствора панкреатинской α-амилазы

Температура циркулирующего раствора, °С	Время циркуляции, *мин*	Оптическая плотность раствора		Процент активности
		контрольного	циркулирующего	
19,5	65	0,582	0,588	101,2
20,0	70	0,636	0,646	101,2
20,0	70	0,461	0,480	104,2
20,0	70	0,377	0,380	100,8
20,0	70	0,412	0,402	97,5
25,0	70	0,585	0,590	100,8
35,5	30	0,620	0,330	53,2
35,5	30	0,334	0,150	44,9

Таблица 3

α-Амилаза поджелудочной железы свиньи. Скорость циркуляции — 4,6 *мл/сек*, емкость кюветы v_k=8,2 *мл*, емкость системы v_c=22 *мл*

Частота облучения, *Мгц*	Время облучения, *мин*	Температура раствора, °С		Оптическая плотность раствора		Процент активности
		перед облучением	после облучения	контрольного	облученного	
10,00±0,10	60	14,5	18,2	0,669	0,676	101,2
	60	16,2	21,0	0,725	0,702	96,8
	60	15,4	18,2	0,628	0,618	98,6
	60	14,4	17,4	0,618	0,616	99,8
	60	15,5	19,8	0,440	0,448	101,8
11,00±0,1	60	17,2	21,0	—	—	100±2 (5)*
12,00±0,10	60	18,0	24,0	—	—	100±3(5)*
22,0±0,10	60	14,2	16,8	0,616	0,618	100,1
	60	14,0	16,5	0,530	0,531	100,0
25,00±0,10	60	14,0	17,1	0,438	0,441	100,5
	60	14,0	17,2	0,462	0,457	99,3

* Среднее пяти измерений

В табл. 4 приведены результаты исследования влияния частоты ЭМ поля на ФА. При каждой частоте опыты повторялись несколько раз, так что в таблице представлены средние арифметические значения из 6—7 параллельных определений ФА. Частота облучения измерялась волномером типа 121 фирмы «ВЭБ Функверк Эрфурт».

Во всех приведенных опытах температура облучаемого раствора была ниже температуры опытов С. А. Баха и соответствовала условиям наименьшей денатурации амилазы. Повторение экспериментов А. С. Баха осуществлялось на установке с термостатированной кюветой (рис. 2, 3). При этом использовалась кристаллическая α-амилаза фирмы «Сиг-

Таблица 4

α-Амилаза поджелудочной железы свиньи

Диапазон частот, *Мгц*	Время облучения, *мин*	Температура раствора, °С		Оптическая плотность раствора		Процент активности
		перед облучением	после облучения	контрольного	облученного	
11,52—12,42	60	18,4	21,0	0,599	0,609	101,8
		18,4	21,0	0,599	0,587	98,3
11,12—11,50	60	17,8	21,0	0,599	0,611	102,1
		17,9	21,0	0,599	0,590	98,8
10,50—10,95	60	17,3	21,0	0,599	0,596	99,6
		17,4	21,0	0,599	0,591	98,8
10,21—10,50	60	17,5	21,0	0,632	0,629	99,6
9,3 — 9,8	60	17,6	21,0	0,632	0,613	97,0
7,6 — 9,5	60	17,5	21,0	0,632	0,610	96,8
18,75—21,00	60	18,0	21,0	0,632	0,616	97,6

ма». При температурах 27,7—28,2° частота облучения составляла 10,9775 *Мгц*, а при температуре 35,5° — 11,970 *Мгц*. По данным С. А. Баха, при этих условиях происходила наибольшая инактивация α-амилазы. Наши результаты, представленные в табл. 5, показывают, что активность амилазы в пределах ошибок измерений не отличается от контрольной. Частота облучения измерялась частотомером ЧЗ-24 с точностью ±1 *гц*.

Таблица 5

α-Амилаза поджелудочной железы свиньи («Сигма»)
Скорость циркуляции — 3,8 *мл/сек*, v_k=17,4 *мл*, v_c=28,6 *мл*

Частота облучения, *Мгц*	Время облучения *мин*	Температура раствора, °С		Оптическая плотность раствора		Процент активности
		после облучения	перед облучением	контрольного	облученного	
10,9775	75	28,3	28,0	0,678	0,680	100,5
	30	28,5	28,0	0,411	0,403	98,0
	40	28,5	28,0	0,296	0,286	96,7
	30	28,3	27,8	0,316	0,320	101,2
	30	28,2	27,7	0,458	0,453	99,0
	30	28,4	27,8	0,344	0,357	103,5
	30	28,5	27,7	0,169	0,167	98,8
	30	28,3	27,7	0,330	0,336	101,8
	30	28,3	27,6	0,350	0,344	98,3
	30	28,3	27,7	0,421	0,428	101,7
	40	28,2	27,8	0,514	0,525	102,0
	60	28,2	27,9	0,412	0,410	102,0
	60	28,2	28,0	0,322	0,324	100,5
11,970	40	36,0	35,5	0,154	0,145	96,1
	30	36,0	35,4	0,168	0,170	101,1
	30	36,0	35,5	0,336	0,330	98,3
	30	36,0	35,4	0,389	0,381	98,3
	30	36,0	35,5	0,442	0,440	99,4
	30	35,8	35,3	0,418	0,420	100,5
	40	35,5	35,0	0,400	0,405	101,2

В описанных экспериментах изучалось необратимое влияние коротковолнового ЭМ поля на α-амилазу. При ранее отмеченных частотах не было обнаружено никакого селективного нетеплового влияния энергии ЭМ поля. Эксперименты по изучению возможных резонансных явлений ферментативных систем в ЭМ полях несмотря на трудности их проведения все же представляют значительный интерес для проверки механической модели (Чернавский и др., 1967) белка-фермента.

ЛИТЕРАТУРА

Афанасьева Л. А., Гайдук В. И., Коренева Л. Г., Кудряшова В. А., 1971. Нетепловое воздействие электромагнитных излучений на гемоглобин и связанные с этим вопросы спектроскопии биополимеров. Всес. конфер. по спектроскопии растворов биополимеров. Тезисы докл. Харьков : 6.

Чернавский Д. С., Хургин Ю. И., Шноль С. Э., 1967. Об упругих деформациях белка-фермента. Мол. биол. **1** (3) : 419.

Чирков М. М., 1964. Влияние энергии электромагнитных колебаний звукового спектра на каталазную активность крови. В кн.: Некоторые вопросы физиологии и биофизики, Воронеж : 25—31.

Чирков М. М., 1965. Влияние энергии электромагнитных колебаний звукового и радиочастотного диапазона на активность каталазы и пероксидазы крови кроликов и тканей крыс. Автореф. канд. дисс., Воронеж.

Bach S. A., Korteling G. J., Goucher C. R., 1962. Activity changes in alpha-amylase solutions following their exposure to radio-frequency energy. Presented at the Section on Military Med., Am. Med. Assoc., Chicago, Illinois.

Bach S. A., 1965. Biological sensitivity to radio-frequency and microwave energy. Federat. Proc. **24** (1) : 522.

Bach S. A., Luzzio A. J., Korteling G. J., 1961. Changes in macromolecules produced by alternating electrical fields. Presented at the 4th Internat. Conf. Med. Electronics, N. Y.

Bernfeld P., 1955. Amylases, α and β. Methods of Enzymology I, ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Acad. Press, N. Y. : 149.

Bergmeyer H. U., 1962. Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie : 814.

Brown K. G., Erfurth S. C., Small E. W., Peticolas W. L., 1972. Conformationally dependent low-frequency motions of proteins by laser Raman spectroscopy. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **69** (6) : 1467—1469.

Caldwell M. L., Adams M., Kung J. T., Toralballa G. C., 1952. Crystalline pancreatic amylase. II. Improved method for its preparation from hog pancreas glands and additional studies of its properties. J. Am. Chem. Soc. **74** : 4033.

Elödi P., Krusteva M., 1970. Structural investigations on pancreatic α-amylase. Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung. **5** (4) : 449—462.

Kiefer H. C., Congdon W. J., Scarpa I. S., Klotz J. M., 1972. Catalytic accelerations of 10^{12} fold by enzyme-like synthetic polymer. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **69** (8) : 2155—2159.

Lumry R., Biltonen R., 1969. Aspects of protein conformations. In: Structure and stability of biological macromolecules. M. Dekker, Inc., N. Y. : 65.

Markley J. L., Meadows D. H., Jardetzky O., 1967. Nuclear magnetic resonance studies of helix-coil transitions in polyamino acids. J. Mol. Biol. **27** (1) : 25—40.

Meadows D. H., Jardetzky O., 1968. Nuclear magnetic resonance studies of the structure and binding sites of enzymes. IV. Cytidine 3′-monophosphate binding to ribonuclease. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **61** (2) : 406—413.

Phillipson P., 1968. On the possible importance of relaxation processes in enzyme catalysis. J. Mol. Biol. 31 : 319—321.

Takashima S., 1966. Studies on the effect of radio-frequency waves on biological macromolecules. IEEE Trans. Bio-Med. Engineering **13** : 28—31.

Институт кибернетики
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
22/I 1973

ENE KIIREND, ENDEL LIPPMAA

KÕRGSAGEDUSLIKU ELEKTROMAGNETILISE VÄLJA MÕJU SEA PANKREASE α-AMÜLAASI AKTIIVSUSELE

Resümee

α-amülaasi lahust fosfaatpuhvris (0,02 M, pH 6,9) mõjutati sagedustel 10, 11, 12, 22 ja 25 MHz (temperatuuril 18—24 °C), 10,9775 MHz (temperatuuril 27,7—28,2°) ning 11,970 MHz (temperatuuril 35,5°). Kahe viimase sageduse ja vastavate temperatuuride puhul tegi S. A. Bach (Bach, 1965) kindlaks spetsiifilise kõrgsagedusvälja mõju α-amülaasi aktiivsusele. Käesolevas uurimuses ei täheldatud eespool märgitud sagedustel mingit kõrgsagedusvälja selektiivset mõju fermentatiivsele aktiivsusele.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Küberneetika Instituut

Toimetusse saabunud
22. I 1973

ENE KIIREND, ENDEL LIPPMAA

STUDY OF THE INFLUENCE OF HIGH-FREQUENCY ELECTROMAGNETIC FIELDS ON THE ENZYMATIC ACTIVITY OF THE HOG PANCREATIC α-AMYLASE

Summary

There is enough evidence that electromagnetic fields of microwaves or radiowaves can influence biologic systems from the simplest to the most complex ones. Our series of experiments began with the investigations of the possible mechanism of biologic sensitivity to radiofrequency energy. We were interested in the effect of electromagnetic radiofrequency fields on the enzymatic activity of α-amylase (Bach, 1965). The enzyme solutions were irradiated at 10, 11, 12, 22 and 25 Mc/sec in the range of 18—24 °C, at 10.9775 Mc/sec in the range of 27.7—28.2° and at 11.970 Mc/sec at 35.5° (in the two latter conditions the α-amylase activity decreased in experiments of Bach). Buffered enzyme solutions were irradiated in a thermostating exposure arrangement in a closed circulating system. As the source of radio-frequency energy a ship microwave transmitter (model 1410.SA2, of 150 Watt power) was used. The percentage activities of α-amylase solutions were found immediately after the exposure (usually lasting from 30 to 75 min.). The exposed α-amylase solutions were analysed under the same conditions as with the controls.

Our measurements indicated that with an absorbed electrical power of 20 Watt the activities of the exposed α-amylase samples did not show any changes in comparison with the activities of the unexposed enzyme solutions.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Cybernetics

Received
Jan. 22, 1973