

## ДЕЙСТВИЕ СЛАБЫХ ПОСТОЯННЫХ И НИЗКОЧАСТОТНЫХ ПЕРЕМЕННЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ НА АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Яблокова Е.В., Новиков В.В., Кувичкин В.В., Фесенко Е.Е.

Учреждение Российской академии наук Институт биофизики клетки РАН, 142290, Россия, МО, г. Пущино, ул. Институтская 3, **E-mail:** [docmag@mail.ru](mailto:docmag@mail.ru)

**Аннотация:** В экспериментах использовали воду высокой степени очистки (имеющую высокое удельное сопротивление 18 МОм/см). Раствор фермента подвергали воздействию коллинеарных слабых магнитных полей (МП) - постоянного (42  $\mu\text{T}$ ) и переменного (0.1  $\mu\text{T}$ , частота - 4.4 Гц). Время инкубации растворов составляло от 30 мин до 4 часов. Далее к раствору фермента добавляли о-фенилендиамин и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , реакционную смесь инкубировали в течение 30 мин. Показано, что воздействие слабыми комбинированными МП влияет на скорость реакции окисления о-фенилендиамина перекисью водорода, где катализатором является фермент пероксидаза хрена. Происходит снижение активности пероксидазы хрена в реакции после обработки растворов фермента МП, по сравнению с контрольными образцами. Вероятно, что снижение активности пероксидазы хрена при действии слабых МП связано с конформационными изменениями структуры этого белка, т.к. спектры его флуоресценции (собственной и в присутствии флуоресцентных зондов) до и после такого воздействия отличаются.

**Ключевые слова:** слабое магнитное поле, пероксидаза, водные растворы

Широкомасштабные исследования действия магнитных полей (МП) на биологические объекты, проведенные, в частности в Институте биофизики клетки РАН, привели к открытию различных биологических эффектов МП на уровне организма, клеточном и молекулярном уровнях. Одним из наиболее значимых и перспективных является эффект активации процессов распада белков и пептидов в физико-химических и биологических системах при действии слабых магнитных полей [1]. Этот результат является приоритетным, не имеющим аналогов в мире, и может служить основой для создания новых подходов к профилактике и лечению онкологических и нейродегенеративных заболеваний, связанных с отложением патологических белков в тканях организма. При анализе полученных результатов обращает на себя внимание тот факт, что величины максимальной биологической активности, обнаруженные в опытах при настройке поля в различных частотных диапазонах (диапазон циклотронных частот ионов аминокислот, диапазоны частот неорганических ионов - кальция и калия), а также в пределах одного и того же частотного диапазона практически совпадают или близки [2,3]. Это обстоятельство свидетельствует в пользу универсальности эффекторной части механизма, приводящего к повреждению опухолей и нейрофибриллярных структур при действии слабых магнитных полей. Ранее нами сообщалось о том, что при действии слабого МП на целый организм активируется система противоопухолевого иммунитета, в частности происходит стимуляция продукции фактора некроза опухолей (ФНО) макрофагами брюшной полости у мышей [4]. Этот опосредованный через иммунную систему механизм, по-видимому, вряд ли является единственным, и не может объяснить целый ряд обнаруженных нами экспериментальных фактов. Во-первых, опыты на мышах различных линий (SHK, CBA, C<sub>57</sub>Bl, Balb) показали близкие величины противоопухолевой активности слабого МП. Во-вторых, при использовании слабых ЭМП сантиметрового диапазона отмечена приблизительно такая же активация продукции ФНО [4], однако выраженность противоопухолевого эффекта в этом случае ниже. По нашему мнению, возможными кандидатами на роль повреждающих агентов для опухолевых клеток в случае воздействия слабыми МП могут являться активные формы кислорода (АФК) продуцирующиеся и действующие непосредственно в опухолевой ткани и/или в клетках иммунной системы. Известно, что в опухолевой ткани происходят преимущественно анаэробные процессы, система эндогенных антиоксидантов недостаточна активна. В этих условиях даже незначительные локальные повышения концентраций АФК могут привести к

избирательному повреждению клеток опухолей, в отличие от клеток нормальной ткани. Все эти эффекты могут быть обусловлены действием АФК, в частности перекисей. В этой связи заманчиво предположить, что сложные магнитные сигналы, настроенные на резонанс ионов и компонентов среды, могут при воздействии на организм приводить к локальному повышению концентраций АФК, и осуществлять в связи с этим биологические эффекты.

В связи с появлением в последнее время ряда убедительных экспериментальных и теоретических исследований, показывающий вероятность участие АФК в реализации биологических эффектов слабых МП [1,5], изучение влияния слабых МП на ферментативные системы генерации и деградации активных форм кислорода особенно актуально.

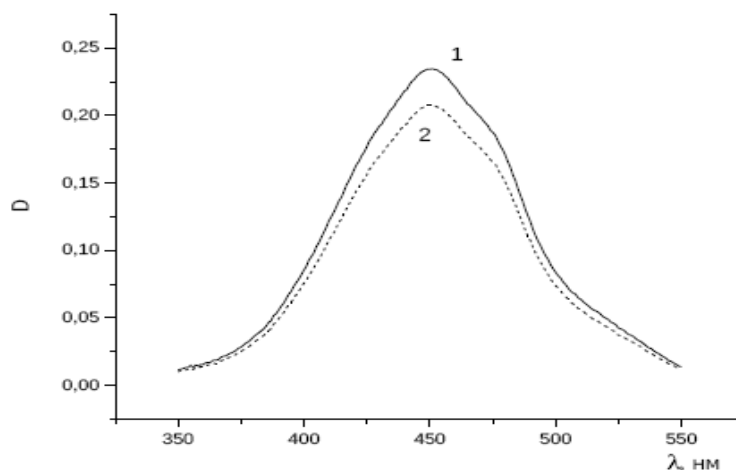
Мы исследовали активность пероксидазы хрена (Sigma) при действии слабых комбинированных МП, используя в качестве субстрата орто-фенилендиамин (ОФД). Пероксидаза хрена (HRP) достаточно изучена, поэтому этот фермент - полезная тест система для научных исследований. HRP имеет молекулярную массу около 44,2 кДа, представляет собой гликопротеид и имеет четыре остатка аминокислоты лизина для соединения с молекулой, которую требуется пометить. HRP представляет собой идеальный фермент для многих методик, так как имеет относительно небольшой размер, относительно стабильна и более дешева, чем альтернативы — например, щелочная фосфатаза. HRP имеет большее количество оборотов в единицу времени и потому обеспечивает развитие достаточно сильного сигнала за относительно небольшой период времени. Пероксидаза хрена в свободной форме или в виде конъюгатов с другими молекулами требует наличие субстрата для визуализации. HRP окисляет субстрат в присутствии пероксида водорода, при этом образуются продукты, которые можно детектировать спектрофотометрически.

В экспериментах использовали воду высокой степени очистки (E-pure Module (Barnsted/Termolyne Corporation)), имеющую высокое удельное сопротивление (18 МОм/см). Применялись следующие растворы: 0.005 М NaCl (о.с.ч.), буферные растворы 0.1 М лимонной кислоты - цитрат натрия (pH 5.2),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6.0), Раствор фермента и других соединений подвергали воздействию коллинеарных слабых МП - постоянного (42  $\mu\text{T}$ ) и переменного (0.1  $\mu\text{T}$ , частота - 4.4 Гц). Время инкубации растворов составляло от 30 мин до 4 часов. Далее к раствору фермента добавляли о-фенилендиамин и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , реакционную смесь инкубировали в течение 30 мин.

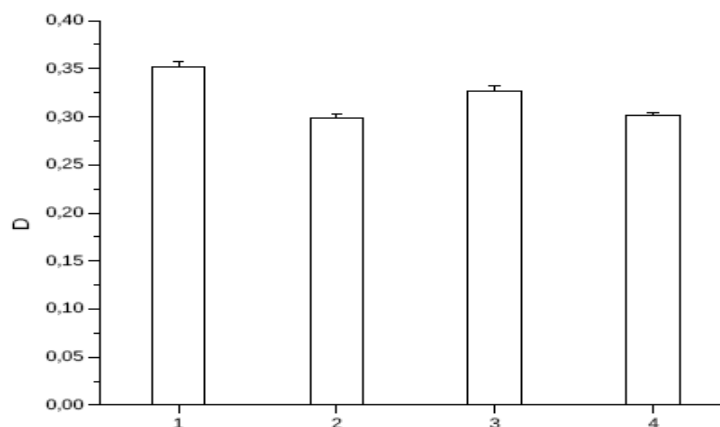
Показано, что воздействие слабыми комбинированными МП влияет на скорость реакции окисления о-фенилендиамина перекисью водорода, где катализатором является фермент пероксидаза хрена. Происходит значимое снижение активности пероксидазы хрена в реакции после обработки растворов фермента МП, по сравнению с контрольными образцами (Рис.1, 2).

Зарегистрированный эффект зависит от ряда физико-химических параметров данной реакции. На изменение активности фермента в условиях действия слабыми МП влияют солевой состав водной среды, температура и pH. Следует отметить, что максимальные изменения активности фермента, обработанного МП, наблюдаются, когда в качестве реакционной среды используется вода высокой степени очистки (Рис.3).

В буферных средах и в присутствии солей изменение активности пероксидазы хрена, после магнитной обработки, становится значительно более слабым, а во многих случаях, не обнаруживается вовсе. Показано, что действие МП не оказывает заметного влияния на процесс при обработке отдельных компонентов реакционной смеси (за исключением раствора фермента), таких как, например, перекись водорода и растворов ряда солей. Вероятно, что снижение активности пероксидазы хрена при действии слабых МП связано с конформационными изменениями структуры этого белка, т.к. спектры его флуоресценции (собственной и в присутствии флуоресцентных зондов) до и после такого воздействия отличаются.

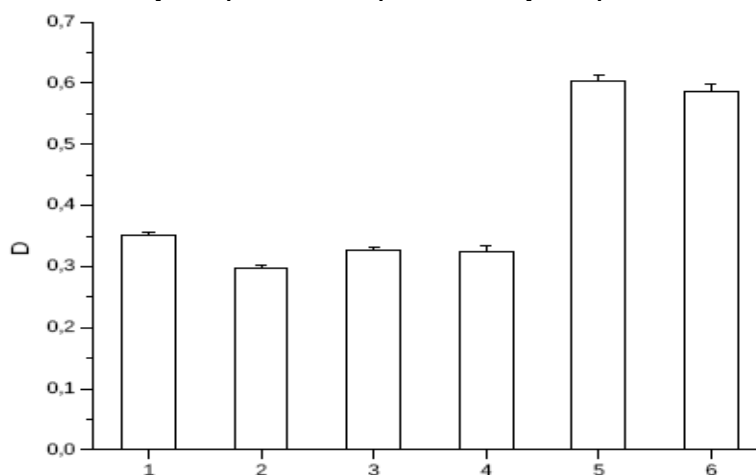


**Рис.1.Спектры поглощения реакционной смеси, содержащей  $1.23 \times 10^{-4}$  М о-фенилендиамина,  $1.00 \times 10^{-4}$  М  $H_2O_2$ ,  $2.08 \times 10^{-9}$ М пероксидазы до (1) и после (2) обработки слабыми магнитными полями.**



**Рис.2.Влияние слабых магнитных полей на активность пероксидазы при  $t=20^\circ C$  (1,2),  $15^\circ C$  (3,4) .**

**1 – контроль, 2 – опыт; 3 – контроль, 4 – опыт.**



**Рис.3.Влияние слабых магнитных полей на активность пероксидазы в водно-солевых растворах.**

1, 2 – контроль, опыт, вода;

3,4 - контроль, опыт, 0.005 М раствор NaCl,;

5,6 - контроль, опыт, 0.1М буфер лимонная кислота-цитрат, pH=5.2.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов усиливают гипотезу об участии активных форм кислорода в реализации эффектов слабых МП. Нам удалось найти путем дифференциального экспериментального анализа при обработке полем отдельных компонентов реакционной смеси в системе фермент-субстрат-окислитель основную молекулярную мишень действия слабых комбинированных магнитных полей – фермент пероксидазу.

## **THE EFFECT OF WEAK STATIC AND LOW-FREQUENCY MAGNETIC FIELDS ON THE ACTIVITY OF PEROXIDASE IN AQUEOUS SOLUTIONS**

***E. V. Yablokova, V. V. Novikov, V. V. Kuvichkin, E. E. Fesenko***

Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, **E-mail:** [docmag@mail.ru](mailto:docmag@mail.ru)

### **Литература**

1. Новиков В.В., Фесенко Е.Е. // Биофизика, 2001, Т. 46, №.2, с. 235.
2. Novikov V.V., Novikov G.V., Fesenko E.E. // Bioelectromagnetics, 2009, V. 30, N 5, p. 343.
3. Bobkova N.V., Novikov V.V., Medvinskaya N.I., Aleksandrova I.Y., Nesterova I.V., Fesenko E.E. // Eur. J. Oncol. Library, 2010, V. 5, p. 235.
4. Новоселова Е.Г., Огай В.Б., Сорокина О.В., Новиков В.В., Фесенко Е.Е. // Биофизика, 2001. Т.46, №1, с. 131.
5. Пономарев В.О., Новиков В.В. // Биофизика, 2009, Т. 54, №2, с. 235.