

ДІЯ ЕЛЕКТРОМАГНІТНОГО ПОЛЯ НАДНИЗЬКОЇ ЧАСТОТИ НА АТР-азну АКТИВНІСТЬ АКТОМІОЗИНУ

Ю. В. ЦЕЙСЛЕР, О. В. ШЕЛЮК, В. С. МАРТИНЮК, Н. Є. НУРИЩЕНКО

ННЦ «Інститут біології», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: yuliya.tseysler@gmail.com; shelyuk_olga@ukr.net

Оцінювали Mg^{2+}/Ca^{2+} - і K^{+} -АТР-азну активність актоміозину скелетних м'язів кроля методом Fiske-Subbarow при одно-, дво-, трьох-, чотирьох- та п'ятигодинній експозиції протейнових розчинів в електромагнітному полі (ЕМП) частотою 8 Гц та індукцією 25 мкТл. Одержані результати вивчення АТР-азної активності актоміозину в умовах електромагнітного впливу показали, що зміни цього показника характеризуються певною часовою динамікою: через 1, 2 і 4 години експозиції експериментальних розчинів дія ЕМП пригнічує АТР-азну активність порівняно з контрольними зразками, які не піддавали дії поля, а у разі трьох- і п'ятигодинної експозиції в ЕМП спостерігається збільшення АТР-азної активності актоміозину. Зміни активності ензиму є універсальними і спостерігаються як у середовищі з Mg^{2+} і Ca^{2+} , так і без цих іонів у буфері. Це може свідчити про Ca^{2+} -незалежні шляхи впливу ЕМП на біологічні об'єкти. На наш погляд, зазначені ефекти пояснюються впливом ЕМП на динамічні властивості розчинів актоміозину, в основі яких можуть лежати процеси спонтанного динамічного структуроутворення.

Ключові слова: електромагнітне поле наднизької частоти, актоміозин, АТР-азна активність.

Питання біологічної дії електромагнітних полів природного та антропогенного походження в різних частотно-амплітудних діапазонах як одного із факторів навколишнього середовища присвячено багато досліджень. Зростаючий інтерес до цієї проблеми пояснюється комплексом складних різноманітних ефектів, які реалізуються на різних рівнях організації живої матерії [1] і поки що не мають достатнього теоретичного пояснення. Дія електромагнітних полів на біологічні об'єкти припускає різні механізми реалізації залежно від характеристик самого фізичного фактора, часу його впливу, особливостей організації експериментального об'єкта та його вихідного функціонального стану [2], а також супутніх фізичних і хімічних факторів [3], які одночасно з електромагнітним полем можуть впливати на біологічний об'єкт. Окремий інтерес виявляє вивчення біологічної дії електромагнітних полів наднизьких частот (ЕМП ННЧ), близьких за своїми окремими параметрами до природних електромагнітних варіацій. Організм людини і тварин є складною нерівноважною відкритою системою, в якій різні функціональні підсистеми виявляють різну чутливість до ЕМП ННЧ [4–6]. Найчутливішими до впливу ЕМП вважаються нервова, нейроендокринна, серцево-судинна й імунна системи. Водночас з цим вплив

ЕМП ННЧ на м'язову тканину вивчено недостатньо. З цього питання найвідомішими є дослідження Леднева В. В. і співавт. [7], де показано інгібуючий вплив ЕМП ННЧ на АТР-азну активність міозину, який автори пояснювали зміною зв'язування іонів кальцію з молекулами міозину. Але в цих дослідженнях з іншими частотами ЕМП спостерігались подібні ефекти, які неможливо було пов'язати з регуляторною дією іонів кальцію, що свідчить про інші первинні механізми впливу ЕМП ННЧ. На жаль, ці дослідження було проведено короткотривалими експозиціями і більше не повторювались. Інші дослідники показали, що дія ЕМП ННЧ збільшує частоту скорочень і впорядковує ритмічну активність, а також пригнічує силу і збільшує тривалість K^{+} -індукованого скорочення з одночасним уповільненням розслаблення гладеньком'язових смужок [8]. Припускають, що вплив ЕМП ННЧ реалізується на рівні регуляторних механізмів, що контролюють іонну проникність плазматичної і мітохондріальної мембран гладеньком'язових клітин. Водночас з цим дослідники не виключають безпосередній вплив на роботу скорочувальних протейнів. Найважливішим скорочувальним елементом м'язових волокон є актоміозиновий комплекс, основними функціональними протейнами якого є актин і міозин. Він виявляє АТР-азну активність, тобто здатність розщеплювати мо-

лекули АТР, вивільняючи при цьому енергію, необхідну для забезпечення скорочувальної діяльності м'язів. Для з'ясування ефектів ЕМП ННЧ на м'язовий комплекс метою нашого дослідження була оцінка впливу ЕМП ННЧ на АТР-азну активність актоміозину скелетних м'язів кроля *in vitro*. Для виявлення ролі Ca^{2+} в магніторецепції проводили визначення $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -АТР-азної активності (відома з літератури як Ca^{2+} -залежна або актинактивована [9]) і K^{+} -АТР-азна активність (з хелатованими ЕГТА іонами Са).

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження був актоміозинний комплекс скелетних м'язів кроля (*Soviet Chinchilla*), виділений за методикою Перрі, описаною в роботі А. Д. Тартаковського [10] з авторською модифікацією співробітників відділу «Біофізики» НДІ фізіології імені академіка Петра Богача ННЦ «Інститут біології» КНУ імені Тараса Шевченка, яка полягала в додатковому очищенні актоміозину за рахунок центрифугування на VAC-602 при 20 000 об/хв протягом однієї години. Чистоту виділеного протеїнового комплексу оцінювали електрофоретично у ПААГ за Леммлі [11], а концентрацію протеїну – за допомогою біуретової реакції [12].

Визначення $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ - і K^{+} -АТР-азної активності актоміозину проводили, встановлюючи кількість неорганічного фосфату (нмоль) P_i , що утворюється під час гідролізу АТР активними центрами міозинних молекул за модифікованим методом Fiske-Subbarow [13]. Інкубаційне середовище у разі визначення $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -АТР-азної активності містило 20 мМ імідазольного буфера (рН 7,5), 0,08 М КСІ, 2,5 мМ MgCl_2 , 100 мкМ CaCl_2 , 1 мМ АТР (Sigma-Aldrich, США); за визначення K^{+} -АТР-азної активності додавали хелатор двовалентних іонів – 1 мМ етиленглікольбіс(β-аміноетил-ефір)-N,N,N',N'-тетраоцтової кислоти (ЕГТА, Sigma-Aldrich, США). Концентрація актоміозину в кінцевому об'ємі реакційної суміші 1,8 мл – 0,2 мг/мл. Тривалість АТР-азної реакції складала 5 хв при температурі 36 °С. Реакцію зупиняли додаванням до реакційної суміші 0,45 мл 20%-ї ТХО. Подальшим центрифугуванням впродовж 20 хв при 3 тис. об/хв осаджували протеїн. До 1,5 мл надосадової рідини додавали 0,25 мл 2,5%-го розчину молібдату амонію в 5 н сірчаній кислоті та 0,5 мл аскорбінової кислоти концентрацією 0,2 мг/мл (Sigma-Aldrich, США). Інкубацію проводили впродовж 20 хв при кімнатній

температурі, після чого фіксували значення абсорбції розчинів при $\lambda = 720$ нм (максимум поглинання молібденового синього).

АТР-азну активність розраховували за формулою:

$$A = [(P-K) \cdot V_{\text{зар}} \cdot N] / [t_{\text{інкуб.}} \cdot V_{\text{к}} \cdot V_{\text{пр}} \cdot C_{\text{пр}}],$$

нмоль/ хв на мг протеїну,

де P – величина абсорбції проби, K – величина абсорбції контролю, $V_{\text{зар}}$ – загальний об'єм, в якому здійснюють кольорову реакцію, $t_{\text{інкуб.}}$ – час інкубування протеїну з АТР, $V_{\text{к}}$ – об'єм протеїну, який додають у пробу, $C_{\text{пр}}$ – концентрація протеїну, що додається, N – калібрувальний коефіцієнт.

ЕМП частотою 8 Гц і індукцією 25 мкТл генерували за допомогою експериментальної системи кілець Гельмгольца, на яку подавався струм від генератора сигналів спеціальної форми Г6-28. Вектор індукції створюваного електромагнітного поля був паралельним вектору геомагнітного поля Землі. Характеристики ЕМП було обрано на основі раніше встановленої їх біологічної активності [3, 14]. Експериментальні зразки розчинів 2 мг/мл актоміозину поділялись на 5 груп відповідно до часу знаходження в експериментальній установці генерування ЕМП – 1, 2, 3, 4, 5 годин експозиції при температурі 36 °С. Контрольні зразки (5 груп) знаходились в аналогічних умовах без штучного впливу з фоновим рівнем ЕМП ННЧ, характерним для цієї лабораторії, що складав 20–65 нТл. Перед експозицією визначали значення початкової АТР-азної активності (горизонтальна лінія на рисунку), відносно якої в подальшому проводили порівняння значень активності контрольної і експериментальної груп. Для оцінки можливого впливу фонових значень ЕМП проводили дослідження з уявним впливом цього фактора, коли зразки розташовували в експериментальній установці, а струм на неї не подавали.

Статистичну обробку результатів експериментів проводили в програмі Origin 8.0 (OriginLab Corporation, США), а також з використанням t -критерію Стьюдента ($P < 0.05$ вважалось статистично вірогідним).

Результати та обговорення

Дослідження АТР-азної активності актоміозину п'яти експериментальних груп експозиції показало, що цей показник змінюється в часі відносно середньостатистичного значення на початку інкубації, яке становило $268 \pm 10,5$ нмоль/хв на мг протеїну в

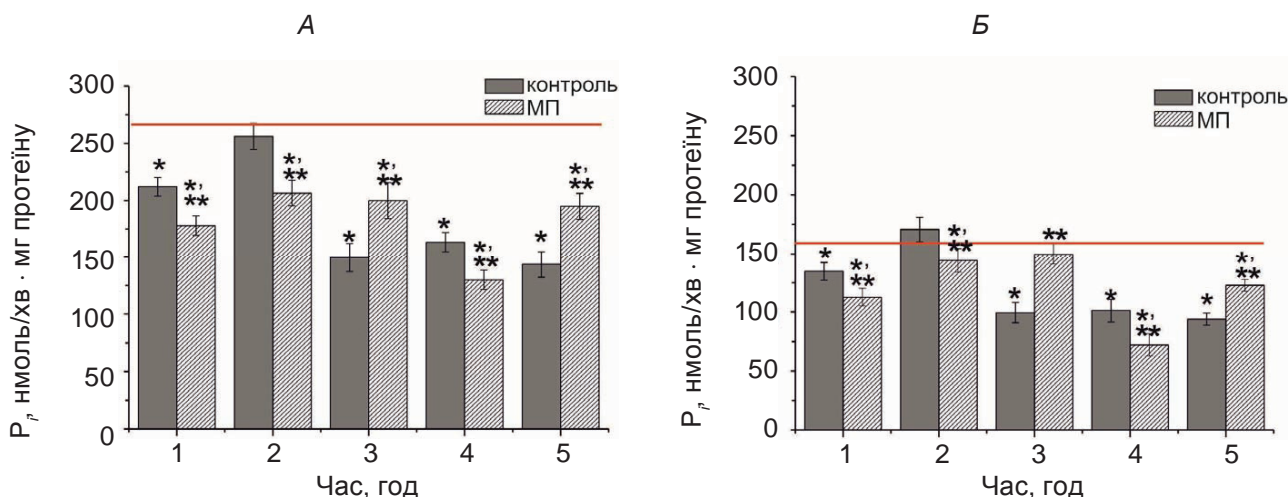


Рис. Mg²⁺/Ca²⁺- і K⁺-АТР-азна активність (А і Б відповідно) актоміозину (нмоль/хв·мг) за експозиції в ЕМП ННЧ 1, 2, 3, 4 і 5 годин (n = 60); горизонтальна лінія – середнє значення АТР-азної активності, що відповідає початку експозиції. * Відмінності вірогідні відносно активності на початку експозиції, P < 0,05; ** відмінності вірогідні відносно контрольних значень, P < 0,05

середовищі з Mg²⁺ і Ca²⁺ та 158,00 ± 8,05 нмоль/хв на мг протеїну в середовищі з хелатором цих іонів – ЕГТА. Як видно з рисунку в усіх п'яти групах після інкубації як у контрольних, так і в експериментальних розчинах актоміозину Mg²⁺/Ca²⁺- та K⁺-АТР-азна активність в обох експериментальних середовищах вірогідно знижувалась порівняно з початковими значеннями. Але таке зниження функціональної активності відбувається в коливальному режимі. Так, у контрольних зразках вірогідне зниження АТР-азної активності актоміозину відносно її початкових значень, які було прийнято за 100%, спостерігали на 1-, 3-, 4- і 5-у годину експозиції і становлять 20,9 ± 0,84, 44,17 ± 1,57, 39,0 ± 0,85 і 46,42 ± 1,13% (n = 60) для середовища з Mg²⁺ і Ca²⁺ та 14,7 ± 0,75, 37,0 ± 0,86, 35,93 ± 0,96 і 40,50 ± 0,52% в середовищі з ЕГТА відповідно. При 2-годинній експозиції вірогідних змін АТР-азної активності актоміозину не виявлено.

Подібні коливання спостерігали і в експериментальних зразках, але ЕМП ННЧ спричинює загальне зниження АТР-азної активності актоміозинового комплексу, внаслідок чого практично всі значення активності є вірогідно нижчі відносно початкових значень активності ензиму. У зв'язку з цим необхідно зазначити, що в експериментах з уявною дією ЕМП за порівняння значень активності ензиму контрольних груп і зразків, що підлягали уявному впливу, вірогідних відмінностей не виявлено, що дозволяє нехтувати теоретично можливим впливом фонових

електромагнітних полів та інших неконтрольованих в експерименті факторів.

Аналіз змін АТР-азної активності актоміозину в умовах електромагнітного впливу показав різноспрямовані зміни цього показника порівняно з контрольними зразками: через 1, 2 і 4 години експозиції протеїнових розчинів ЕМП ННЧ пригнічує АТР-азну активність (P < 0,05), а на третій і п'ятій годині експозиції в ЕМП спостерігається вірогідне (P < 0,05) зростання АТР-азної активності актоміозину. Важливим є той факт, що характер змін практично однаковий як у протеїнових розчинах, які містять вільні іони кальцію і магнію, так і в розчинах, в яких ці іони є хелатованими ЕГТА. Це, на наш погляд, може свідчити про Ca²⁺-незалежний механізм впливу ЕМП ННЧ на АТР-азну активність актоміозину.

Що стосується величин ефектів впливу ЕМП ННЧ, то Mg²⁺/Ca²⁺- і K⁺-АТР-азна активність через годину експозиції в ЕМП майже однакова і знижується на 16,50 ± 0,82% і 16,30 ± 0,75% відносно контрольних зразків (таблиця). Через дві години Mg²⁺/Ca²⁺-АТР-азна активність знижується на 19,50 ± 1,14%, а K⁺-АТР-азна – на 15,50 ± 1,03%. Через три години експозиції ЕМП сприяє підвищенню Mg²⁺/Ca²⁺-АТР-азної активності на 33,60 ± 1,26%, тоді як K⁺-АТР-азної активності на 50,30 ± 0,86%. Через чотири години впливу Mg²⁺/Ca²⁺ і K⁺-АТР-азна активність знижується на 20,50 ± 0,85% і 28,78 ± 0,96% відповідно. П'ятигодинна обробка призво-

Mg²⁺/Ca²⁺- і K⁺-АТФ-азна активність актоміозину (%) відносно контрольних зразків за експозиції в ЕМП ННЧ 1, 2, 3, 4 і 5 год (M ± m, n = 60)

Активність ензимів	Час експозиції, год				
	1	2	3	4	5
Mg ²⁺ /Ca ²⁺ -АТФ-аза	83,50 ± 0,82	80,50 ± 1,14	133,60 ± 1,26	79,50 ± 0,85	135,68 ± 1,14
K ⁺ -АТФ-аза	83,70 ± 0,75	84,50 ± 1,03	150,30 ± 0,86	71,22 ± 0,96	130,60 ± 0,51

дить до активації Mg²⁺/Ca²⁺ і K⁺-АТФ-азної активності на 35,68 ± 1,14% і 30,60 ± 0,51% відповідно (таблиця).

Отже, аналіз одержаних даних свідчить про те, що за звичайних умов у розчинах актоміозину спостерігаються коливання АТФ-азної активності досліджуваного протеїнового комплексу. ЕМП ННЧ в цілому пригнічує функціональну активність і водночас з цим змінює динамічні властивості протеїнових розчинів. Подібні коливальні зміни властивостей протеїнових розчинів у часі спостерігались у дослідженнях неспецифічного насичення деяких протеїнів вуглеводнями [3, 14, 15]. При цьому вплив ЕМП ННЧ дестабілізував або навпаки стабілізував динаміку властивостей водно-колоїдних систем. Вивчення тонкої структури спектрів поглинання сироваткового альбуміну показало наявність різних конформаційних форм цього протеїну, пов'язаних, імовірно, з динамічністю процесів утворення і розпаду метастабільних асоціатів протеїнів у розчині [16]. Згідно з даними деяких авторів [16] саме нерівноважність і метастабільність мішеней дії ЕМП ННЧ та імовірнісний характер перетворення сигналу слабого магнітного поля в біохімічну відповідь, які спостерігались і в нашому дослідженні, є властивістю молекулярного механізму магніторецепції. Підтвердженням цього твердження можуть розглядатись експериментальні результати, які показують зміну розподілу можливих конформаційних форм протеїну за впливу ЕМП ННЧ [17]. Найпереконливіші докази динамічної поведінки розчинів актоміозину і подібних за функцією та структурою протеїнів, які є молекулярними моторами, одержані в дослідженнях процесів спонтанної агрегації цих протеїнів і утворення

вихороподібних дисипативних структур у часі [18, 19]. Таким чином, враховуючи дані літератури, зниження АТФ-азної активності актоміозину протягом тривалої інкубації в наших дослідженнях можна пояснити зростаючою спонтанною агрегацією протеїнового комплексу в часі, внаслідок чого в протеїнових агрегатах зменшується доступність субстрату до активного центру міозину. Процес агрегації має коливальний характер, що призводить до відповідних коливань АТФ-азної активності. ЕМП ННЧ, імовірно за все, сприяє агрегації актоміозину, що спричиняє загальне зниження ензиматичної активності протеїну. Але, водночас із цим, вплив ЕМП ННЧ змінює динаміку процесів агрегації–деагрегації в розчинах актоміозину, що виявляється у вигляді коливань на пряму ефекту впливу ЕМП ННЧ протягом тривалого експерименту. Можна припустити, що такий вплив є Ca²⁺-незалежним, що підтверджує теоретичні уявлення про вплив електромагнітних полів на гідрофобно-гідрофільний баланс у водно-колоїдних системах [1, 3].

Отже, результати наших досліджень дозволяють дійти висновку, що АТФ-азна активність у розчинах актоміозину протягом тривалої інкубації вірогідно знижується. На тлі цього зниження спостерігаються вірогідні коливання ензиматичної активності, причиною яких, імовірно, є динамічна агрегація в розчинах цього протеїнового комплексу. Вплив ЕМП ННЧ прискорює зниження АТФ-азної активності актоміозину, на наш погляд, за рахунок посилення протеїнової агрегації та зміни її часової динаміки. Важливим фактом є те, що виявлений вплив ЕМП ННЧ на динамічну поведінку протеїнових розчинів може бути Ca²⁺-незалежним.

**ДЕЙСТВИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО
ПОЛЯ КРАЙНЕ НИЗКОЙ ЧАСТОТЫ
НА АТР-азную АКТИВНОСТЬ
АКТОМИОЗИНА**

*Ю. В. Цейслер, О. В. Шелюк,
В. С. Мартинюк, Н. Е. Нурищенко*

ОНЦ «Институт биологии», Киевский
национальный университет имени
Тараса Шевченко, Украина;
e-mail: yuliya.tseysler@gmail.com;
shelyuk_olga@ukr.net

В исследовании оценивали Mg^{2+}/Ca^{2+} - и K^+ -АТР-азную активность актомиозина скелетных мышц кролика методом Fiske-Subbarow при пятичасовой экспозиции протеиновых растворов в электромагнитном поле частотой 8 Гц и индукцией 25 мкТл. Полученные результаты изучения АТР-азной активности актомиозина в условиях электромагнитного воздействия показали, что изменения данного показателя характеризуются определенной временной динамикой: через 1, 2 и 4 часа экспозиции протеиновых растворов действие электромагнитного поля угнетает АТР-азную активность по сравнению с контрольными образцами, которые не подвергались действию поля, а при трех- и пятичасовой экспозиции в электромагнитном поле наблюдается увеличение АТР-азной активности актомиозина. Изменения активности энзима являются универсальными и наблюдаются как в среде с Mg^{2+} и Ca^{2+} , так и в отсутствие данных ионов в буфере. Это может свидетельствовать о Ca^{2+} -независимых путях влияния ЭМП на биологические объекты. С нашей точки зрения, вышеуказанные эффекты можно объяснить влиянием ЭМП на динамические свойства растворов актомиозина, в основе которых могут находиться процессы спонтанного динамического структурообразования.

Ключевые слова: электромагнитное поле крайне низкой частоты, актомиозин, АТР-азная активность.

**EFFECT OF ELECTROMAGNETIC
FIELD OF EXTREMELY LOW
FREQUENCY ON ATPase ACTIVITY
OF ACTOMYOSIN**

*Yu. V. Tseyslyer, O. V. Shelyuk,
V. S. Martynyuk, N. E. Nuryschenko*

ESC Institute of Biology, Taras Shevchenko
Kyiv National University, Ukraine;
e-mail: yuliya.tseysler@gmail.com;
shelyuk_olga@ukr.net

S u m m a r y

The Mg^{2+}/Ca^{2+} and K^+ -ATPase actomyosin activity of rabbit skeletal muscle was evaluated by the Fiske-Subbarow method during a five-hour exposition of protein solutions in electromagnetic field of extremely low frequency of 8 Hz and 25 μT induction. The results of the study of the ATPase activity of actomyosin upon electromagnetic exposure have shown statistically significant changes that are characterized by a rather complex time dynamics. After 1, 2 and 4 hours of exposure of protein solutions the effect of ELF EMF exposure inhibits the ATPase activity compared to control samples, which are not exposed to the magnetic field. By the third and fifth hours of exposure to the electromagnetic field, there is a significant increase in the ATPase activity of actomyosin. It should be noted that a similar pattern of change in enzyme activity was universal, both for the environment by Mg^{2+} and Ca^{2+} , and in the absence of these ions in the buffer. This can evidence for Ca^{2+} -independent ways of the influence of electromagnetic field (EMP) on biologic objects. In our opinion, the above effects are explained by EMP influence on the dynamic properties of actomyosin solutions, which are based on the processes of spontaneous dynamic formation of structure.

Key words: electromagnetic fields of extremely low frequency, actomyosin, ATPase activity.

1. Мартинюк В. С. Вплив магнітного поля наднизької частоти на організм людини і тварин. Автореф. дис... докт. биол. наук: 03.00.02. – К., 2008. – 44 с.
2. Грабовская Е. Ю. Реакции крыс с различными индивидуальными особенностями двигательной активности на действие слабого переменного магнитного поля сверхнизкой частоты. Автореф. дис... канд. биол. наук: 03.00.13. – Симферополь, 1992. – 23 с.
3. Martyniuk V. S., Tseysler Yu. V. / In: Biophotonics and Coherent Systems in Biology. – Berlin-Heidelberg – New York: Springer, 2006. – P. 105–122.
4. Кузнецов А. И., Кшуташвили Т. Ш., Колоколов А. С., Лазарев А. В. // Изв. АН СССР. Серия Биология. – 1990. – № 2. – С. 178–183.
5. Темуриянц Н. А., Шехоткин А. В., Насилевич В. А. // Биофизика. – 1998. – 43, № 4. – С. 761–765.
6. Темуриянц Н. А., Макеев В. В., Малыгина В. Н. // Там же. – 1992. – 37, № 4. – С. 653–655.
7. Lednev V. V., Malyshev S. L. // Bioelectromagnetics Society Annual Meeting, June 10–14, 2001. – St Paul, Minnesota, USA, – P. 2–3.
8. Цимбалюк О. В., Мартинюк В. С. // Фізика живого. – 2011. – 19, № 1. – С. 20–24.
9. Enrique M. De La Cruz, E. Michael Ostap // Methods Enzymol. – 2009. – 455. – P. 157–192.
10. Моргулис Б. А. / Сб.: Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков / Под ред. Г. Р. Иваницкого. – Л.: Наука, 1978. – С. 180–198.
11. Тартаковский А. Д. / Там же. – С. 55–76.
12. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В. В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 364 с.
13. Fiske C. H., Subbarow G. // J. Biol. Chem. – 1925. – 66, N 1. – P. 375–400.
14. Martyniuk V. S., Kalinovskiy P. S., Tseysler Yu. V. // Biophysics. – 2004. – 49, N 1. – P. 17–22.
15. Мартинюк В. С., Шадрин О. Г. // Биомед. радиоэлектроника. – 1999. – № 2. – С. 61–63.
16. Мартинюк В. С., Цейслер Ю. В., Калиновский П. С. // Таврический медико-биологический вестник. – 2004. – 7, № 1. – С. 86–90.
17. Бинги В. Н., Миляев В. А., Чернавский Д. С., Рубин А. Б. // Биофизика. – 2006. – 51, № 3. – С. 553–559.
18. Tariq Butt, Tabish Mufti, Ahmad Humayun et al. // J. Biol. Chem. – 2010. – 285, N 7. – P. 4964–4974.
19. Yutaka Sumino, Ken H. Nagai, Yuji Shitaka et al. // Nature. – 2012. – 483. – P. 448–452.

Отримано 11.05.2012