

Е.А.Пронина¹, Г.М.Шуб¹, А.П.Креницкий², А.В.Майбородин², О.В.Бецкий³, Ю.В.Гуляев³

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ И СУПЕРОКСИДИСМУТАЗЫ БАКТЕРИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ЧАСТОТЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ И ИЗЛУЧЕНИЯ АТМОСФЕРНОГО КИСЛОРОДА

¹ГОУВПО «Саратовский государственный медицинский университет», ²ОАО Центральный НИИ измерительной аппаратуры, Саратов; ³Институт радиотехники и электроники РАН, Москва

Описана динамика изменения уровня активности каталазы и супероксиддисмутазы золотистого стафилококка, кишечной и синегнойной палочек при действии электромагнитного излучения на частоте молекулярного спектра поглощения и излучения атмосферного кислорода. Выявлено повышение активности названных ферментов изучаемых штаммов, наиболее выраженное при 45-минутной экспозиции.

Ключевые слова: каталаза, супероксиддисмутаза, электромагнитное излучение, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

В последние годы опубликовано значительное количество работ, посвященных поиску эффектов и механизмов действия электромагнитного излучения крайневисоких частот (ЭМИ КВЧ) на биологические объекты различного уровня организации – от одиночных клеток до целостного организма, в частности, изучению первичных звеньев реакции живых систем [2, 5, 10].

При облучении молекул энергия КВЧ-излучения расходуется на переходы молекул из одного состояния в другое. При совпадении частоты проводимого облучения с частотой вращения полярных молекул возможна перекачка энергии излучения молекуле, сопровождающаяся увеличением ее вращательной кинетической энергии, что влияет на их реакционную способность. Поскольку фундаментальной основой функционирования сложных биологических систем являются молекулы-метаболиты, детерминированное управление их реакционной способности излучением, совпадающим со спектрами их излучения и поглощения, может направленно регулировать процесс метаболизма в среде. Известно, что вращательные молекулярные спектры резонансного поглощения и излучения молекул важнейших клеточных метаболитов (NO, CO, O₂, CO₂) находятся именно в КВЧ диапазоне [1].

Изучение действия ЭМИ КВЧ на микроорганизмы может конкретизировать представления о возможных путях восприятия организмами этого вида излучения. Так, под воздействием ЭМИ КВЧ обнаружено ингибирование ряда ферментов у *Clostridium sporogenes*, увеличение фибринолитической активности у *Aspergillus orizal*, изменение скорости деления клеток и скорости роста у дрожжей и кишечной палочки. Эффекты были обнаружены на частотах излучения 42, 66, 69, 71, 73 и 136 ГГц [4, 10, 12, 13].

Важнейшим регулятором биологических процессов в клетках является кислород в его реактивных формах (РФК), выполняющих роль внутриклеточных и межклеточных мессенджеров. Установлено, что электромагнитное облучение на указанных выше

частотах также способствует образованию РФК. Можно полагать, что при использовании частот молекулярного спектра поглощения и излучения (МСПИ) кислорода эти процессы будут активизироваться.

От состояния антиоксидантных систем микробов в большой мере зависит их способность противостоять окислительному взрыву в клетках макроорганизма. Утилизация супероксид-аниона и перекиси водорода, образующихся при фагоцитозе, реализуется, главным образом посредством супероксиддисмутазы и каталазы.

В этой связи целью работы явилось экспериментальное изучение влияния ЭМИ на частоте молекулярного спектра поглощения и излучения атмосферного кислорода (129 ГГц) на каталазную и супероксиддисмутазную активность бактерий.

Сведения по влиянию электромагнитного излучения на частоте МСПИ атмосферного кислорода на перечисленные выше ферменты бактерий в доступной литературе отсутствуют.

Материалы и методы

В работе использовали генератор O₂, разработанный в ОАО ЦНИИИА.

Для решения поставленной задачи использовался панорамно-спектрометрический комплекс с квазиоптическим трактом, в котором возбуждались электромагнитные КВЧ колебания, имитирующие структуру молекулярного спектра поглощения и излучения атмосферного кислорода (МСПИ) [7, 9].

Точное значение заданной частоты определяли в соответствии с международной базой данных молекулярных спектров высокого разрешения HITRAN (созданной с участием космического агентства) и с учетом поправок на атмосферное давление и температуру окружающей среды [3].

Объектом исследования были эталонные штаммы *Escherichia coli* ATCC 25922 (К-12), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-Р, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и по 5 клинических штаммов каждого вида.

Из суточных культур испытуемых микроорганизмов, выращенных на мясо-пептонном агаре, готовили взвесь по 10^9 м.к. в 1 мл. По 1,5 мл этой взвеси вносили в пробирки типа «Эппендорф» и подвергали воздействию ЭМИ на частоте МСПИ O_2 (129 ГГц) в течение 10, 30, 45 и 60 мин. Контролем служили необлученные культуры.

Активность каталазы определяли колориметрическим методом [6]. Принцип метода основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс. В опыте использовались холостая, контрольная и опытная пробы. В каждую пробу вносили 1 мл 0,05М трис-НСI буфера (рН 7,8), в холостую и опытную – по 2 мл перекиси водорода, а в контрольную – 2 мл дистиллированной воды; в контрольную и опытные пробы затем прибавляли по 0,1 мл бактериальной взвеси. Реакцию останавливали через 10 мин добавлением 1 мл 4 % раствора молибдата аммония во все пробирки, после этого в холостую пробу приливали 0,1 мл взвеси. Интенсивность окраски в каждой пробе измеряли на спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО, Россия) при длине волны 410 нм против контрольной пробы.

Активность каталазы рассчитывали по формуле:

$$E = (A_{хол} - A_{оп}) \cdot V \cdot t \cdot K,$$

где E – активность каталазы (мкат/мл); $A_{хол}$ и $A_{оп}$ – экстинкция холостой и опытной проб; V – (0,1 мл) объем вносимой пробы; t – время инкубации (600 с); K – коэффициент миллимолярной экстинкции H_2O_2 ($22,2 \cdot 10^3 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$).

За единицу активности каталазы принимали то количество фермента, которое участвует в превращении 1 мкат перекиси водорода за 1 с при заданных условиях.

Активность СОД определяли по методике, описанной Чевари С. и соавт. [11]. Принцип метода основан на способности конкурировать с нитросиним тетразолием (НСТ) за супероксидные анионы, образующиеся в результате взаимодействия восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида (НАД·Н) и феназинметасульфата (ФМС). В результате этой реакции НСТ восстанавливается с образованием гидразинтетразолия. В присутствии СОД процент восстановления НСТ уменьшается. Количественные параметры протекающей реакции определяли на спектрофотометре СФ-46 путем измерения оптической плотности реакционной смеси при длине волны 540 нм. После перемешивания компонентов пробы в кювете устанавливали начальную экстинкцию. Через 10 мин измеряли нарастание оптической плотности раствора.

Расчет вели по формуле:

$$\frac{E_0 - E_{пр}}{E_0} \cdot 100\% = \% \text{ блокирования},$$

где E_0 – экстинкция реакционной смеси в отсутствие СОД (нулевая проба),

$E_{пр}$ – исследуемой пробы (опытная проба).

За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для снижения оптической плотности в процессе восстановления НСТ в опытной пробе на 50 %. Активность СОД выражали в усл. ед. на 1 мл взвеси.

Статистическую обработку результатов проводили с применением стандартных методов вариационной статистики [8].

Результаты и обсуждение

Из представленных данных (рис. 1) видно, что

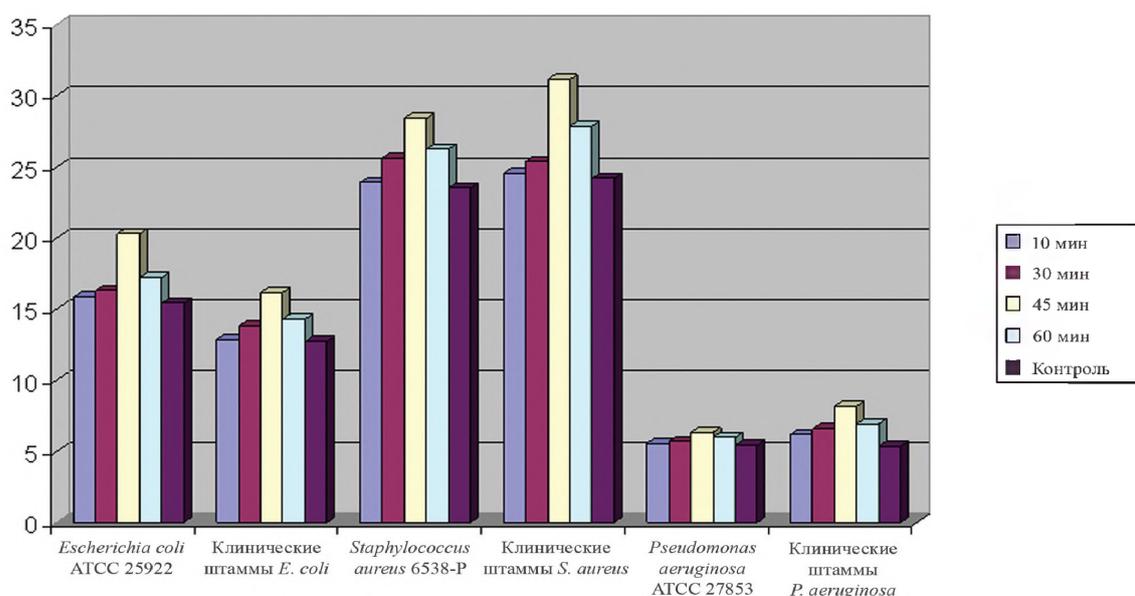


Рис. 1. Динамика изменения активности каталазы (мкат/мл) при разном времени воздействия ЭМИ МСПИ атмосферного кислорода на различные виды бактерий

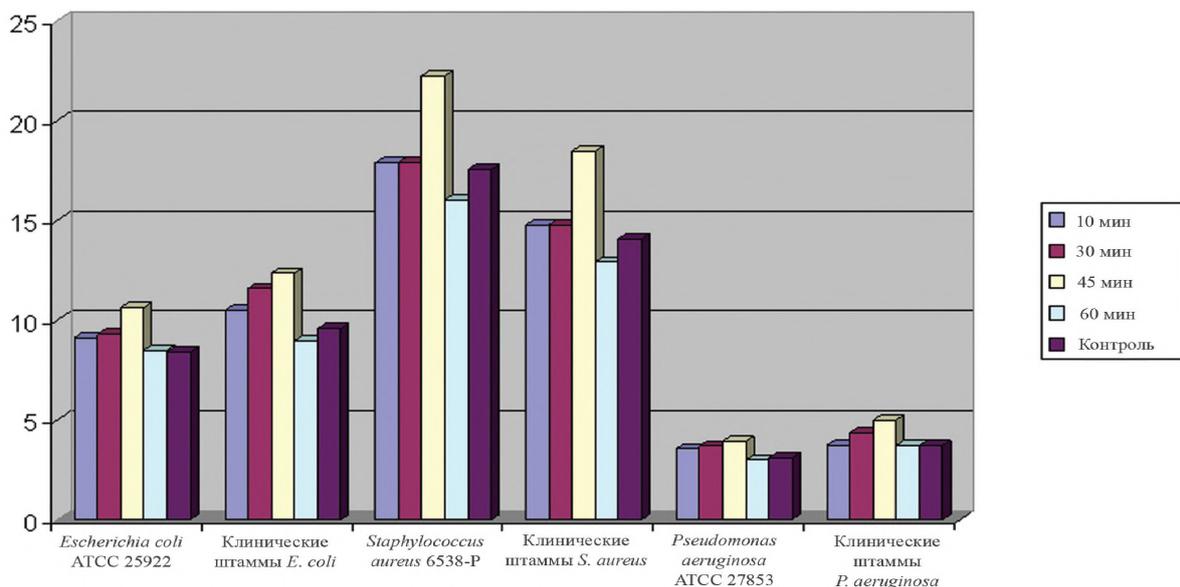


Рис. 2. Динамика изменения активности супероксиддисмутазы (усл.ед./мл) при разном времени воздействия ЭМИ МСПИ атмосферного кислорода на различные виды бактерий

уровень каталазы при облучении ЭМИ на частоте излучения и поглощения молекулярного кислорода в течение 30 мин возрастал на 9 % у эталонного штамма *S. aureus* и на 5 % у клинических штаммов этого вида; на 6 % у эталонного штамма *E. coli* и на 8 % – у клинических штаммов; на 5 % у эталонного штамма *P. aeruginosa* и на 13 % – у клинических штаммов.

При облучении ЭМИ на частоте молекулярного кислорода в течение 45 мин активность каталазы также увеличивалась по сравнению с контролем и достигала максимального значения у всех штаммов, возрастала на 21 % у эталонного штамма *S. aureus* и на 29 % у клинических штаммов; на 32 % у эталонного штамма *E. coli* и на 27 % у клинических штаммов; на 17 % у эталонного штамма *P. aeruginosa*, и на 33 % у клинических штаммов. Полученные данные статистически достоверны ($p < 0,05$).

Далее при облучении в течение 60 мин уровень каталазы начинал падать, он был несколько меньше показателей при 45-минутной экспозиции, но превышал контрольные значения на 12 и 15 % у *S. aureus*, на 12 у *E. coli* и на 11 и 13 % у *P. aeruginosa*.

При облучении в течение 10 мин изменение активности каталазы было незначительным и является достоверным только для клинических штаммов синегной палочки.

При изучении динамики изменения активности СОД (рис. 2) видно, что уровень активности данного фермента после облучения ЭМИ в течение 30 мин возрастал на 2 % у эталонного штамма *S. aureus* и на 5 % у клинических штаммов этого вида; на 10 % у эталонного штамма *E. coli* и на 21 % у клинических штаммов; на 19 % у эталонного и на 17 % у клиниче-

ских штаммов *P. aeruginosa*.

При облучении ЭМИ на частоте молекулярного кислорода в течение 45 мин активность СОД также увеличивалась по сравнению с контролем у всех штаммов. Активность супероксиддисмутазы возрастала на 27 % у эталонного штамма *S. aureus* и на 31 % у клинических штаммов; на 26 % у эталонного штамма *E. coli* и на 29 % у клинических штаммов; на 26 % у эталонного штамма *P. aeruginosa*, и на 34 % у клинических штаммов.

Далее при облучении в течение 60 мин уровень активности СОД так же, как и уровень активности каталазы начинал падать. Данный показатель был меньше контрольных значения на 9 и 8 % у *S. aureus*, на 1 и 6 % у *E. coli* и на 4 % у *P. aeruginosa*.

При облучении в течение 10 мин уровень активности СОД имел тенденцию к повышению в отличие от уровня активности каталазы. Он превышал контрольные значения на 2 и 5 % у *S. aureus*, на 8 и 10 % у *E. coli* и на 14 % у *P. aeruginosa*.

Таким образом, облучение бактериальных взвесей стафилококка, кишечной и синегной палочек ЭМИ МСПИ атмосферного кислорода приводит к однонаправленному повышению каталазной и супероксиддисмутазной активности. Данный процесс, при различном времени экспозиции от 10 до 60 мин, развивается постепенно и достигает максимума к 45 мин для супероксиддисмутазы и каталазы. Более длительная экспозиция приводит к торможению активности и каталазы, и супероксиддисмутазы. Выявленная динамика характерна для всех трех изученных видов бактерий, хотя они и различаются между собой по уровню исходной активности – наибольшей у стафилококка и наименьшей у псевдомонад.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Башаринов А.Е., Тучков Л.Г., Поляков В.М. и др. Измерение радиотепловых и плазменных излучений в СВЧ-диапазоне. М.: Советское радио; 1968.
2. Беуцкий О.В., Девятков Н.Д., Кислов В.В. Миллиметровые волны низкой интенсивности в медицине и биологии. Биомедицинская радиоэлектроника. 1998; 4:13–29.
3. Беуцкий О.В., Креницкий А.П., Майбородин А.В. и др. Молекулярные HITRAN-спектры газов-метаболитов в терагерцевом и ИК-диапазонах частот и их применение в биомедицинских технологиях. Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. 2007; 8–9:27–43.
4. Брюхова А.К., Буяк Л.И., Зиновьева Н.А. и др. Некоторые особенности действия электромагнитных излучений миллиметрового диапазона на микроорганизмы. В кн.: Девятков Н.Д., редактор. Медико-биологические аспекты миллиметрового излучения низкой интенсивности. М.: ИРЭ АН СССР; 1987. С. 98–103.
5. Девятков Н.Д., Голант М.Б., Беуцкий О.В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности. М.: Радио и связь; 1991.
6. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. Лаб. дело. 1988; 1:16–9.
7. Креницкий А.П., Майбородин А.В., Беуцкий О.В. и др. Квазиоптический КВЧ генераторный комплекс моделирования детерминированных шумов для биофизических исследований. Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. 2003; 2:5–11.
8. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа; 1990.
9. Майбородин А.В., Креницкий А.П., Тушкин В.Д. и др. Панорамно-спектрометрический комплекс для исследования тонких структур молекулярных спектров физических и биологических сред. Биомедицинская радиоэлектроника. 2001; 8:35–47.
10. Тамбиев А.Х. Миллиметровые волны и фотосинтезирующие организмы. М.: Радиотехника; 2003.
11. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах. Лаб. дело. 1985; 11:678–81.
12. Grundler W., Kaiser F., Keilmann F., Walleczek J. Mechanisms of electromagnetic interaction with cellular systems. Naturwissenschaften. 1992; 79:551–9.
13. Webb S.J., Dodds D.D. Inhibition of bacterial cell growth by 136 gc microwaves. Nature. 1968; 218:374–5.

Об авторах:

Пронина Е.А., Шуб Г.М. Саратовский государственный медицинский университет. 410012, Саратов, ул. Б.Казачья, д. 112. Тел. (845-2) 66-98-20.

Креницкий А.П., Майбородин А.В. ОАО Центральный НИИ измерительной аппаратуры. 410002, Саратов, ул. Московская, д. 66. Тел. (845-2) 74-02-75.

Беуцкий О.В., Гуляев Ю.В. Институт радиотехники и электроники РАН. 125009, Москва, ул. Моховая, д. 11. Тел. (495) 203-47-89.

E.A.Pronina, G.M.Shub, A.P.Krenitskiy, A.V.Maiborodin, O.V.Betskiy, Yu.V.Gulyaev

Alteration of Activity of Bacterial Catalase and Superoxide Dismutase under the Action of Electromagnetic Radiation at a Frequency of Molecular Absorption Spectrum and Atmosphere Oxygen Emission

Saratov State Medical University; Central Research Institute of Measuring Instrumentation, Saratov; RAS Institute of Radiotechnology and Radioelectronics, Moscow

Described is dynamics of alteration of the level of activity of catalase and superoxide dismutase of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* under the action of electromagnetic radiation at a frequency of molecular absorption spectrum and atmosphere oxygen emission. Increase of the named enzymes activity in strains under research was determined, most pronounced at 45 min exposition.

Key words: catalase, superoxide dismutase, electromagnetic radiation, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Authors:

Пронина Е.А., Шуб Г.М. Саратов State Medical University. 410012, Saratov, B.Kazach'a St., 112.

Креницкий А.П., Майбородин А.В. Central Research Institute of Measuring Instrumentation.

Бетский О.В., Гуляев Ю.В. RAS Institute of Radiotechnology and Radioelectronics. Moscow.

Поступила 23.12.08.