

ЭФФЕКТЫ НИЗКОЧАСТОТНОГО ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ НА АКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗЫ

© 2020 г. А.А. Олешкевич, В.Э. Новиков, М.А. Данилова

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина,
109472, Москва, ул. Скрябина, 23

E-mail: kompsotita@gmail.com

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.

После доработки 04.04.2020 г.

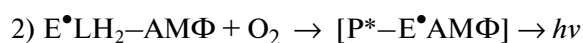
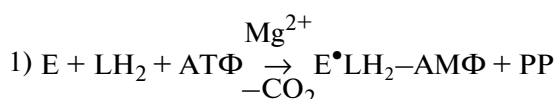
Принята к публикации 07.04.2020 г.

Проведены исследования действия электрического поля на активность рекомбинантной люциферазы в системе «люцифераза–люциферин–АТФ–Mg²⁺». Ферментативную активность определяли по уровню биохемилюминесценции на стандартном хемилюминометре. Выявлены эффективные частоты, вызывающие необратимые изменения активности фермента. Критерием уровня активности люциферазы служили интенсивность хемилюминесценции ($I_{\text{хл}}$) после ее выхода на стационарный уровень свечения и величина постоянной времени кривой затухания после окончания стационарного свечения в связи с расходом АТФ. При действии поля с частотой 6 Гц величина I_0 резко возрастала по сравнению с контролем от (250 ± 47) имп/с до (1250 ± 75) имп/с. При этом длительность стационарного свечения сократилась приблизительно в пять раз (от 30 до 5.5 мин). Затухание свечения τ также значительно ускорилось (в девять раз относительно контроля). При исследовании влияния остальных экспериментально отобранных частот был обнаружен противоположный эффект. Так, на частотах 12, 48 и 96 Гц активность люциферазы по сравнению с контролем была подавлена от двух (48 и 96 Гц) до четырех (12 Гц) раз. При действии поля с частотой 24 Гц активность люциферазы не отличалась от контроля.

Ключевые слова: фермент, активность, люцифераза, электромагнитное поле.

DOI: 10.31857/S0006302920040043

В основе биоломинесценции – свечения живых организмов – лежит катализируемая хемилюминесцентная реакция, обусловленная окислением субстрата люциферина в присутствии фермента люциферазы [1–3]. При этом люминесцентные методы лабораторного анализа с использованием современных высокочувствительных физических детекторов люминесценции обладают явными преимуществами по сравнению с визуальными люминесцентными и флуориметрическими методами. В обзоре И.В. Березина с соавт. [4] достаточно подробно описаны физико-химические особенности данной системы. Там же приводятся наиболее общепринятые представления о механизме реакции, который удобно описывать в две стадии:



где: E – люцифераза (фермент), LH₂ – люциферин, АТФ – аденозинтрифосфосная кислота,

PP – пирофосфат, АМФ – аденозинмонофосфорная кислота, P* – продукт реакции, образовавшийся в элетронно-возбужденном состоянии и служащий источником люминесценции.

Кинетической особенностью данной реакции является жесткое соответствие уровня биохемилюминесценции, сопровождающей окисление субстратов (люциферина и MgАТФ), скорости реакции (скорости образования продукта) (формула 1):

$$I_{\text{хл}} = \frac{dN}{dt} = \frac{d[EP]}{dt} = V, \quad (1)$$

где $I_{\text{хл}}$ – интенсивность биохемилюминесценции; N – количество квантов света; EP – количество образовавшегося продукта.

Квантовый выход люминесценции продукта равен единице. Реакция суммарно подчиняется уравнению Михаэлиса–Ментен. Поэтому до тех пор, пока фермент насыщен по обоим субстратам, уровень свечения имеет стационарный ха-

рактически. Дефицит какого-либо из субстратов приводит к быстрому затуханию свечения.

Следует отметить, что сегодня также успешно развиваются работы в направлении исследования воздействия колебаний акустической природы на различные биологические объекты. Хотя однозначной теории формирования частотно-зависимых ответов на акустическое воздействие все еще не выработано, показаны существенные отличия на уровне ткани в биологических эффектах непрерывных и модулированных волн различной физической природы [5–7]. При этом вызываемые изменения при воздействии модулированных волн выше, а степень и выраженность в большей степени зависят от частоты модуляций. Также было показано, что модулированное электромагнитное или ультразвуковое воздействие на некоторых частотах модуляции могут вызывать изменение ферментативной активности как в сторону активирования, так и ингибирования [8, 9]. В исследованиях на мозге золотых рыбок выявлены эффективные частоты модуляции, активирующие и подавляющие активность нейронов [10] после действия амплитудно-модулированных ультразвуковых волн терапевтического диапазона интенсивностей. При работе с непрерывным ультразвуком нами на модельном объекте — клетках бактериальной культуры *Aliivibrio fischeri* — были найдены оптимальный режим и закономерности химико-биологического и физического воздействия при использовании по отдельности и комбинированно для стимуляции пролиферации и эмиссионной активности светящихся бактерий [11, 12]. Увеличение интенсивности фотоэмиссии после воздействия ультразвука интенсивностью 0.4 Вт/см^2 составила 35–45% по сравнению с контролем.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на кафедрах биофизики и физики Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина. В связи с тем, что лабораторный стенд и часть биофизических методов разработаны непосредственно авторским коллективом, ниже будет полностью представлено описание методов, использованных в данной работе.

При исследовании действия электрических полей на активность люциферазы применяли систему «люцифераза–люциферин–АТФ- Mg^{2+} », для чего использовали биoluminesцентный реагент из стандартного набора «ЛЮМТЕК» № К-10 (на основе люциферазы, выделенной из рекомбинантных клеток *E. coli*, содержащих плазмиду с геном люциферазы светлячков).

Концентрации реагентов. Содержимое флакона лиофильно высушенного АТФ-реагента предва-

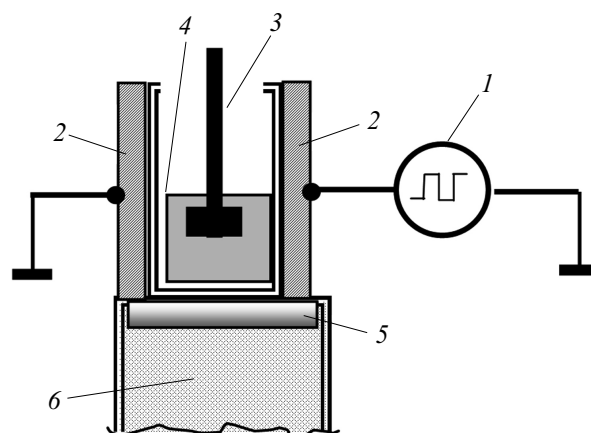


Рис. 1. Фрагмент схемы модифицированного хемилюминометра: 1 — низкочастотный генератор, 2 — конденсаторные пластины (металлические обкладки) кюветы люминометра, 3 — механическая мешалка (тефлон), 4 — кювета люминометра с реакционной средой, 5 — фотокатод ФЭУ, 6 — ФЭУ.

рительно разводили в 2 мл «раствора для реконструкции АТФ-реагента» (также из набора «ЛЮМТЕК» № К-10). Реконструированный раствор АТФ-реагента инкубировали в течение часа; для измерений использовали стандартные разведения — к 2 мл воды для инъекций добавляли 0.05 мл реконструированного АТФ-реагента, в результате чего рабочий раствор АТФ-реагента содержал рекомбинантную люциферазу и люциферин в избытке [13].

Активность рекомбинантной люциферазы определяли по уровню биохемилюминесценции на стандартном хемилюминометре ХЛ-003 ((УГАТУ, Уфа, Россия)). Регистрация сигнала происходила в режиме подключения хемилюминометра к компьютеру; в качестве программного обеспечения служила универсальная программа «PowerGraph». Критерием уровня активности люциферазы служили: интенсивность хемилюминесценции ($I_{\text{ХЛ}}$), после ее «выхода» на стационарный уровень свечения и величина постоянной времени кривой затухания после окончания стационарного свечения в связи с расходом АТФ.

Кюветное отделение хемилюминометра было дополнительно оборудовано гнездом-вкладышем квадратного сечения ($2 \times 2 \text{ см}$). В одну пару противоположных сторон вкладыша были встроены металлические пластины, к которым подводилось переменное напряжение от специального низкочастотного генератора лабораторного изготовления (рис. 1).

Генератор обеспечивал сигнал, по форме близкий к симметричным прямоугольным биполярным импульсам (меандр, скважность близка к единице), с частотой следования в диапазоне от 6 до 100 Гц. Максимум амплитудного значения —

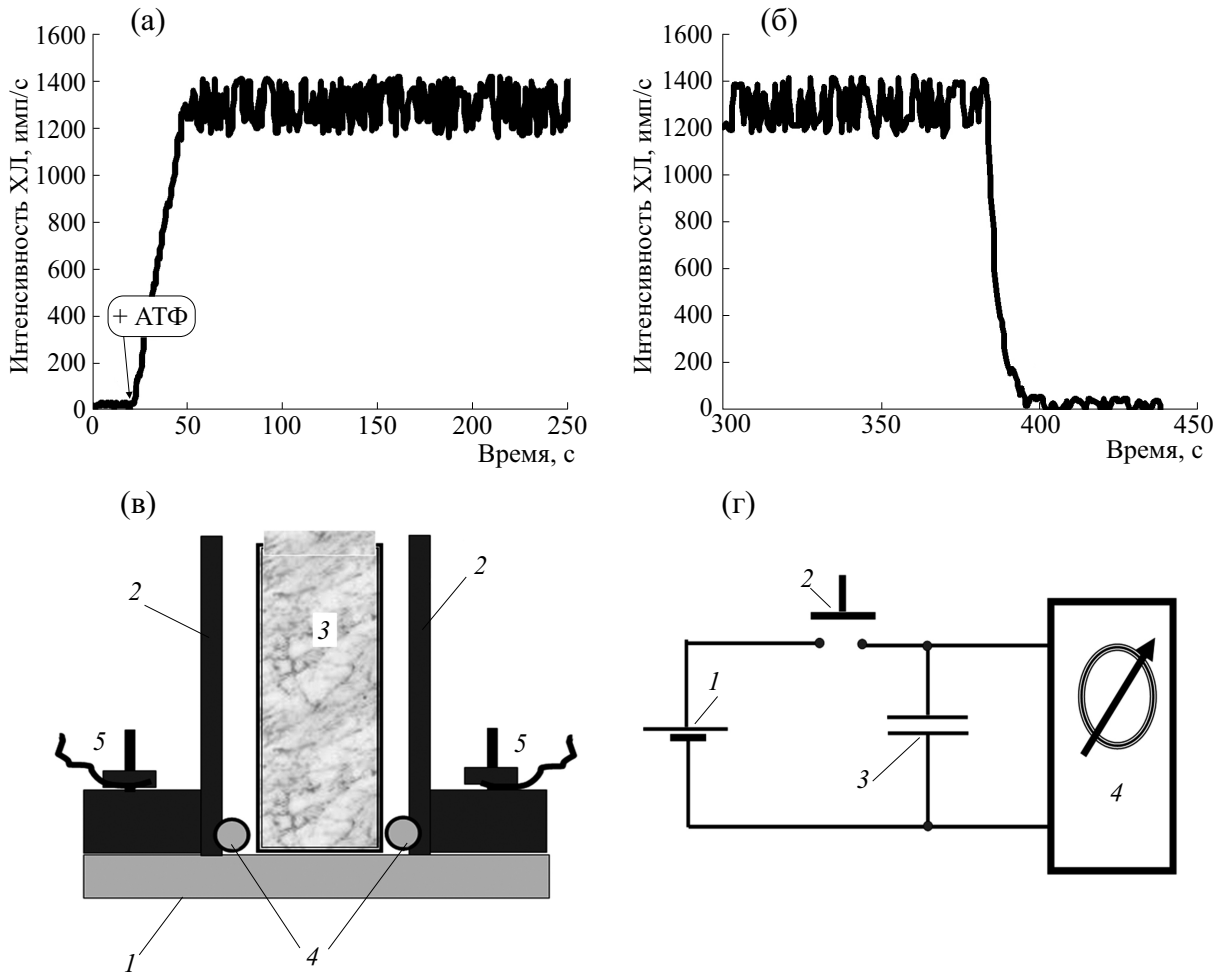


Рис. 2. (а) – Динамика хемилюминесценции «системы люциферин–люцифераза» (зависимость интенсивности люминесценции от времени от момента внесения АТФ в систему – регистрация в реальном времени). Выход на стационарный уровень хемилюминесценции. (б) – Динамика хемилюминесценции системы «люциферин–люцифераза». (в) – «Измерительный конденсатор»: 1 – стеклянная пластина-подложка; 2 – металлические пластины-обкладки конденсатора; 3 – полистироловая кювета с измеряемой средой; 4 – стеклянные ограничители; 5 – клеммы для подключения. (г) – Электрическая схема измерения заряда конденсатора: 1 – аккумулятор; 2 – кнопка-замыкатель («нормально разомкнута») цепи; 3 – «измерительный конденсатор»; 4 – потенциометр.

100 В. Исследование активности фотоэмиссии проводили на частотах 6, 12, 24, 48 и 96 Гц, которые были экспериментально установлены авторами в серии предварительно проведенных испытаний на биологических объектах разной природы. Расстройка по частоте составляла около ± 2 Гц. Электрическое поле подавали на кювету в течение всего времени измерения. Контролем служили аналогичные измерения без подачи напряжения от генератора на конденсаторные пластины кюветы.

Исходно в кювете люциферазы реакционная среда содержала люциферазу и в избытке люциферин. Далее шла регистрация фонового значения хемилюминесценции. Затем реакцию инициировали введением в кювету через штуцер раствора АТФ (рис. 2а). Во всех случаях использовали

одну и ту же начальную концентрацию АТФ – $5 \cdot 10^{-7}$ М.

В качестве критериев активности люциферазы использовали интенсивность хемилюминесценции ($I_{ХЛ}$) после выхода на стационарный уровень свечения и величину постоянной времени кривой затухания после окончания стационарного свечения в связи с расходом АТФ (рис. 2б, формула 2):

$$I_{ст} = I_0 \exp(-t/\tau) \quad (2)$$

где I_0 – стационарный уровень свечения; t – время от начала затухания; τ – постоянная времени экспоненты затухания свечения (увеличению τ соответствует рост скорости расхода АТФ и более высокая активность фермента).

Таблица 1. Диэлектрическая проницаемость реакционной смеси и полистироловой кюветы

Параметр	Частота, Гц						
	0	6*	10	12	24	48	96
ϵ_1	84.2	99.2	81.4	83.2	87.0	86.0	84.7
Стандартное отклонение	8.1	21.9	8.6	11.3	7.9	9.6	9.0
ϵ_2	3.1	3.0	3.0	3.0	3.1	3.0	2.8
Стандартное отклонение	0.2	0.9	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1

Примечание. * – На частоте 6 Гц ошибка воспроизводимости превышала 25%, что вызвано неустойчивой работой генератора на граничной частоте.

Оценка коэффициента поглощения энергии. Полагая, что

$$SAR = \sigma E^2 / \rho, \quad (3)$$

где SAR – коэффициент поглощения энергии, E – напряженность электрического поля внутри образца. В приближении об однородности поля внутри образца:

$$E = E_0 / \epsilon, \quad (4)$$

где E_0 – внешнее приложенное поле; ϵ – относительная диэлектрическая проницаемость внутреннего содержимого кюветы-конденсатора.

Определение диэлектрической проницаемости инкубационных смесей, использованных в работе. Проводили измерение емкости конденсатора при наличии между обкладками исследуемых сред (смесей), с последующим сравнением с емкостью того же конденсатора без наличия между обкладками исследуемых смесей (сред). В этом случае относительная диэлектрическая проницаемость среды равнялась

$$\epsilon = C_j / C_0, \quad (5)$$

где C_j – емкость конденсатора со средой, C_0 – емкость аналогичного воздушного конденсатора.

Определение статической величины относительной диэлектрической проницаемости. Для проведения измерений был собран лабораторный стенд (рис. 2в,г).

Металлические пластины-обкладки размером 10×10 см устанавливали на стеклянную подложку (во избежание утечки). Между обкладками помещали полистироловую кювету (объем 50 мл, толщина 9 мм). Для предотвращения утечки по поверхности кюветы был предусмотрен зазор (около 0.5 мм) между стенкой кюветы и обкладкой, что обеспечивалось стеклянным капилляром.

Замыканием кнопки к обкладкам конденсатора подключали аккумулятор. Величину разности

потенциалов ($U_0 = 1.5$ В) регистрировали высокоомным ($R_{\text{вх}} = 10^{12}$ Ом) потенциометром. При помещении в кювету измеряемой среды разность потенциалов падает до величины U_1 . Относительная статическая диэлектрическая проницаемость среды (ϵ_1) в этом случае составляет

$$\epsilon_1 = U_1 / U_0. \quad (6)$$

Аналогичным образом определяли статическую диэлектрическую проницаемость полистироловой кюветы без среды (ϵ_2). Измеряли величину U_1 для конденсатора без кюветы, а величину U_2 – вставляя кювету; избегали соприкосновения обкладок со стенками кюветы:

$$\epsilon_{\text{кр}} = \epsilon_1 + \epsilon_2. \quad (7)$$

Определение величины относительной диэлектрической проницаемости при действии переменного электрического поля. Определение проводили мостовым методом с использованием стандартной аппаратуры. Особенность измерения состояла в том, что в соответствующую диагональ измерительного моста вместо синусоидальных колебаний подавалось напряжение от внешнего генератора импульсов (меандр) в диапазоне частот следования 10–100 Гц. (параметры импульсов те же, что и в основном тексте статьи)

$$\epsilon = \epsilon_1 + \epsilon_2. \quad (8)$$

Измеряемая среда (реакционная смесь). К 50 мл воды для инъекций добавляли 0.125 мл АТФ-реакта ЛЮМТЕК (лиофильно высушенный реагент из набора, разведенный в 2 мл раствора для реконструкции АТФ-реакта).

Значения диэлектрической проницаемости реакционной смеси и полистироловой кюветы, напряженности электрического поля внутри образца, при которых проводили экспериментальные исследования, приведены в табл. 1 и 2.

Таблица 2. Напряженность электрического поля внутри образца

Напряженность	Частота, Гц						
	0	6*	10	12	24	48	96
E , В/м	57	49	59	58	55	56	57

Примечание. ϵ_1 – Значения диэлектрической проницаемости реакционной смеси, ϵ_2 – полистироловой кюветы. * – На частоте 6 Гц ошибка воспроизводимости превышала 25%, что вызвано неустойчивой работой генератора на граничной частоте.

Таблица 3. Значения удельной проводимости реакционной смеси (σ , См/м), определенные при ряде частот следования импульсов

σ , См/м	Частота, Гц				
	6	12	24	48	96
Среднее значение	1586	1576	1577	1574	1575
Стандартное отклонение	18	9	9	7	5

Примечание. σ – Удельная проводимость. При измерении величин σ и ϵ на частотах 6 и 12 Гц мостовым методом в качестве нуль-индикатора баланса моста использовали специально сконструированный измерительный усилитель. На остальных частотах нуль-индикатором служил стандартный осциллограф.

Массовую плотность реакционной смеси (ρ , кг/м³) определяли гравиметрически стандартным способом, используя пикнометр на 2 мл. В результате шестикратного измерения была получена средняя величина, равная 1004.4 ± 0.2 кг/м³.

Удельную электропроводность инкубационной смеси (σ , См/м) определяли на кондуктометре стандартным способом (мостовая схема измерения) на переменном (импульсном) токе при тех же частотах. Результаты определения (табл. 3) свидетельствуют о примерно равных значениях удельной проводимости реакционной смеси. Большая точность совпадения заданных значений в данном эксперименте авторам не требовалась.

Расчетные экспериментальные значения SAR (табл. 4) позволяли контролировать допустимое колебание физических параметров.

Воспроизводимость результатов. На каждой из частот было проведено по семь повторных измерений + одно контрольное измерение при выключенном поле, т. е. после каждых семи измерений под действием поля проводили одно контрольное для поправки на изменение реагентов

во времени (ферментативная активность не менялась; реагент хранится без изменения активности до семи-десяти суток при комнатной температуре).

Статистическая обработка данных проведена в пакете прикладных программ Statistica 6.0. Достоверными считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении исследований по поиску неконтактных способов управления активностью ферментов *in vitro* изучали действие переменного (пульсирующего) электрического поля на интенсивность биохимилюминесценции – активность люциферазы, системы «люцифераза–люциферин–АТФ–Mg²⁺». Авторами выявлены эффективные частоты, вызывающие необратимые изменения активности фермента. Влияние переменных магнитных полей в последнее время изучается в многочисленных химических и биохимических экспериментах [14, 15]. Известно, что взаимодействие физических полей с биологическими объектами вследствие разной глубины

Таблица 4. Значения коэффициента поглощения энергии реакционной смеси, рассчитанные для исследуемых частот

Частота, Гц	6	12	24	48	96
SAR , Вт/кг	1602	1574	1572	1568	1570

Примечание. SAR – коэффициент поглощения энергии. При измерении величин σ и ϵ на частотах 6 и 12 Гц мостовым методом в качестве нуль-индикатора баланса моста использовали специально сконструированный измерительный усилитель. На остальных частотах нуль-индикатором служил стандартный осциллограф.

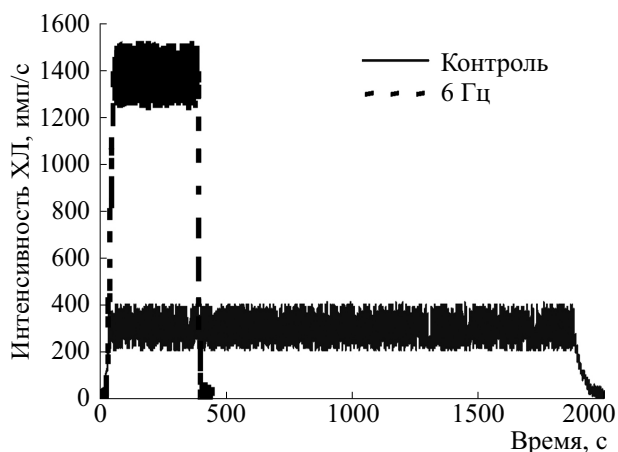


Рис. 3. Динамика хемилюминесценции при действии поля 6 Гц.

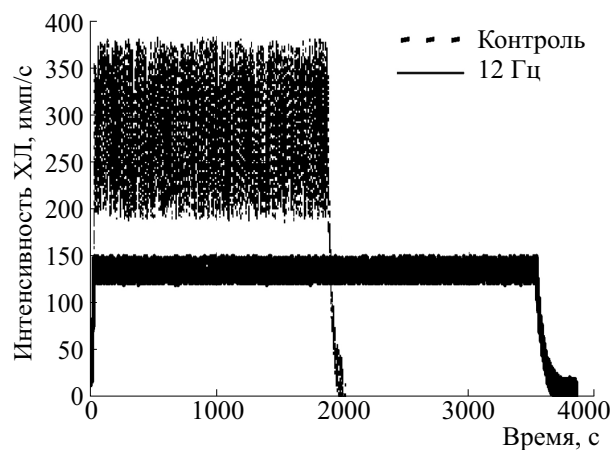


Рис. 4. Динамика хемилюминесценции при действии поля 12 Гц.

проникновения может происходить как интегрально — на низких частотах, так и локально — на частотах электромагнитного излучения миллиметрового диапазона, когда во взаимодействие с полями включаются только клетки или ферменты. Так как биологические макро- и микросистемы являются колебательными и динамическими, они могут находиться на разных стадиях функционирования, следовательно, каждая из них может как иметь разную чувствительность к фактору воздействия, так и проявлять «индивидуальный» ответ. А в системе будут возникать вынужденные колебания с частотой внешнего электрического поля.

Анализ полученных нами результатов показал, что при действии поля с частотой 6 Гц величина I_0 резко возрастала по сравнению с контролем — от 250 ± 47 имп/с до 1250 ± 75 имп/с. При этом ($p < 0.05$) длительность стационарного свечения сократилась приблизительно в пять раз — от 30 мин до 5.5 мин. Затухание свечения также значительно ускорилось: значение t возросло в девять раз относительно контроля (рис. 3).

Таким образом, воздействие электрического поля с частотой 6 Гц значительно повысило активность фермента.

При исследовании на остальных частотах был обнаружен противоположный эффект. Так, на частотах 12, 48 и 96 Гц активность люциферазы по сравнению с контролем была подавлена от двух (48 и 96 Гц) до четырех (12 Гц) раз (рис. 4).

При действии поля с частотой 24 Гц активность люциферазы не отличалась от контроля. Сводные данные приведены в табл. 1.

Теория, объясняющая механизмы биологического действия магнитных полей на биологические системы, основана на факте существования биологических эффектов комбинированных (постоянного и переменного) магнитных полей при определенных, теоретически предсказуемых значениях частот переменной компоненты поля, формально соответствующих циклотронным частотам ряда ионов (кальция, калия, магния). В основе расчета частот воздействия лежит Ларморова прецессия как результат влияния магнитного поля на электронную орбиту с появлением дополнительного орбитального электронного тока

Таблица 5. Параметры хемилюминесценции системы люциферин-люцифераза при действии электрического поля различных частот

Параметр	Частота электрического поля, Гц					
	Контроль	6	12	24	48	96
$I_{ст}$, имп/с	250 ± 47	1250 ± 75	48 ± 17	212 ± 33	115 ± 41	123 ± 44
$t_{ст}$, мин	30 ± 7	$5 \pm 1,5$	> 120	34 ± 6	67 ± 19	55 ± 12
T , с	29 ± 3	$3 \pm 1,7$	Не установлено	32 ± 6	50 ± 7	44 ± 6

и индуцированного магнитного момента электрона [16].

Особое внимание следует обратить на действие физических полей на активность ферментов из-за особенностей функционирования как отдельных клеток (систем активного транспорта, участие в проведении нервного импульса, в наработке энергетических эквивалентов и так далее), так и биологических систем в целом. В связи с этим изменение активности ферментов и показателей углеводного обмена при воздействии физических полей и вибрации может приводить к фатальным для клеток и тканей последствиям [17].

Результаты изучения особенностей импеданса биологических объектов животного происхождения под действием переменного электрического тока в диапазоне частот от 20 до 10^6 Гц выявили сложный характер частотной зависимости [18]. В ряде работ была теоретически рассмотрена возможность резонансного поглощения электромагнитного поля белковыми молекулами в связи с так называемыми дисперсионными силами взаимодействия [19, 20]. В белках, содержащих ряд нейтральных и отрицательно заряженных основных боковых групп, среднеквадратичная величина дипольного момента отлична от нуля, даже если их средний постоянный момент равен нулю. Это обусловлено тем, что число поляризованных боковых групп в белковой молекуле обычно превышает число связанных с ними протонов, поэтому существует множество возможных конфигураций распределения протонов в молекуле, мало отличающихся по свободной энергии (за исключением случая сильно кислых растворов). Если предположить непрерывное распределение основных групп молекул ферментов, то происходящие за счет флуктуации распределения протонов диполь-дипольные взаимодействия между группами могут вызывать поглощение кванта энергии, соответствующего частоте 10 ГГц. Однако в наших экспериментах и ингибирующая, и активирующая частота были в 10^9 раз ниже.

Ранее [20] уже было изучено изменение относительной активности холинэстеразы при действии модулированного сверхвысокочастотного электромагнитного излучения в опытах *in vitro*. Анализ результатов экспериментов позволил установить, что значимое влияние на активность холинэстеразы — от выраженного стимулирующего действия до уровня исходной активности и наоборот — оказывали частота и интенсивность воздействия. Это позволяет выделить модулированное электромагнитное поле в особую группу излучений, биологический эффект которых зависит и от величины поглощенной энергии, и от типа модуляции, «адресованной» к первичной мишени в функционирующей системе. Все выявленные нами и другими авторами особенности

могут быть связаны с параметрическими резонансными воздействиями модулирующих частот на процессы жизнедеятельности. Следовательно, для выработки практических рекомендаций по применению электромагнитных и других видов полей необходимо будет учитывать амплитудно-частотную структуру воздействия наравне с величиной поглощенной энергии.

ВЫВОДЫ

1. Выбранный объект (система «люциферин—люцифераза») и критерии хемилюминесценции в качестве модели для изучения влияния переменных электрических (и других) полей на активность ферментов хорошо соответствует поставленной задаче.

2. Существуют частоты колебаний электрического поля, при которых возможна значительная активация фермента, равно как и существуют частоты, на которых возможно подавление активности фермента.

3. Выраженный характер частотной зависимости (активация при 6 Гц) не связан с амплитудой воздействия: при всех частотах была использована одна и та же амплитуда.

4. Показанные в работе эффекты по значительному неконтактному влиянию слабых электрических полей на активность ферментов позволяют считать данное направление перспективным в плане совершенствования методов биотехнологии.

Результаты, послужившие основой для данной статьи, были предварительно представлены на VI съезде биофизиков России (Сочи, 16–21 сентября 2019 г.) [21].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. V. Dunlap and K. Kita-Tsukamoto, in *The Prokaryotes. Vol. 2: Ecophysiology and Biochemistry*, ed. by M. Dworkin (Springer, New York, 2006), pp. 863–892.
2. Н. С. Родионова, Автореферат дис. ... канд. биол. наук (Ин-т биофизики СО РАН, Красноярск, 2004).
3. А. В. Соснов и др., Разработка и регистрация лекарственных средств, № 4, 108 (2017).

4. И. В. Березин, Л. Ю. Бровко и Н. И. Угарова, Биоорг. химия **3** (12), 1589 (1977).
5. В. К. Утешев, Т. Н. Пашовкин и Э. Н. Гахова, Вестн. новых мед. технологий, № 4, 7 (2010).
6. А. А. Oleshkevich, Biophysics **62** (4), 603 (2017).
7. D. J. Panagopoulos, A. Karabarbounis, and L. H. Margaritisa, Biochem. Biophys. Res. Commun. **298**, 95 (2002).
8. М. С. Пашовкина, И. Г. Акоев и Т. Н. Пашовкин, в сб. *Биологические эффекты слабых электромагнитных излучений* (Пушино, 2002), сс. 26–37.
9. М. С. Пашовкина и И. Г. Акоев, Биофизика **45** (1), 130 (2000).
10. Т. Н. Pashovkin, in *Abstr. Book of 5th Int. Symp. on Therap. Ultrasound* (Harvard Medical School, Boston, 2005), p. 77.
11. А. А. Олешкевич, А. М. Носовский и Е. В. Каминская, Биомед. радиоэлектроника, № 2, 53 (2014).
12. А. А. Олешкевич, Ветеринарная медицина, № 3–4, 35 (2012).
13. Н. Н. Угарова, М. И. Кокшаров и Г. Ю. Ломакина, Патент RU 2420594 (2009).
14. А. Д. Усанов и др., Биомед радиоэлектроника, № 8, 32 (2015).
15. А. Д. Усанов и др., Химико-фармацевтич. журн. **39** (8), 65 (2005).
16. В. В. Леднев, Биофизика **41** (1), 224 (1996).
17. М. А. Дерхо и Т. И. Середа, Изв. Оренбургского гос. аграрного ун-та, № 1 (57), 72 (2016).
18. И. М. Голев и др., Биомед. радиоэлектроника, № 8, 25 (2015).
19. М. С. Пашовкина и Т. Н. Пашовкин, Радиц. биология. Радиоэкология **51** (3), 1 (2011).
20. L. D. Johns, J. Athletic Training **37** (3), 293 (2002).
21. В. Э. Новиков, А. А. Олешкевич и М. А. Данилова, в сб. *Научные труды VI Съезда биофизиков России* (Полиграфическое объединение «Плехановец», Краснодар, 2019), т. 2, с. 48.

Effects of Low-Frequency Electric Field on Recombinant Luciferase Activity

A.A. Oleshkevich, V.E. Novikov, and M.A. Danilova

Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, ul. Scryabina 23, Moscow, 109472 Russia

Studies on the effects of electromagnetic field on recombinant luciferase activity in the "luciferase–luciferin–ATP–Mg²⁺" system were conducted. The enzymatic activity was measured with a standard chemiluminometer by the intensity of biochemiluminescence. Frequencies which cause effectively irreversible changes in enzyme activity were identified. The criteria for the luciferase activity level were the intensity of chemiluminescence (I_{cl}), after it "reached" the stationary level of luminescence and the value of a time constant of the decay curve after cessation of the stationary luminescence coupled to ATP consumption. In the 6 Hz electromagnetic field exposure system, the I_0 value sharply increased from (250 ± 47) imp/s to (1250 ± 75) imp/s as compared to control while the duration of the stationary luminescence decreased by approximately five times (from 30 to 5.5 min). Also, the decay of luminescence t accelerated significantly (by nine times relative to control). In contrast, the opposite results were obtained while studying the effects of electromagnetic field in other experimentally chosen frequencies. Thus, exposure to electromagnetic field in the frequency bands of 12, 48, and 96 Hz caused a decrease of luciferase activity by 2 (48 and 96 Hz) and 4 (12 Hz) times as compared to control. Following the 24 Hz electromagnetic field exposure, no difference was found between luciferase activity and control.

Keywords: enzyme, activity, luciferase, electromagnetic field