

Физика биологии и медицины

Правильная ссылка на статью:

Пашовкин Т.Н. Частотно-зависимые изменения активности ферментов крови под действием модулированного ультразвука // Физика биологии и медицины. 2024. № 1. С. 1-23. DOI: 10.7256/2730-0560.2024.1.44003 EDN: RCZRDR URL: https://nbpublish.com/library_read_article.php?id=44003

Частотно-зависимые изменения активности ферментов крови под действием модулированного ультразвука

Пашовкин Тимофей Николаевич

ORCID: 0000-0001-9697-9230

доктор биологических наук

ведущий научный сотрудник; Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН

142290, Россия, Московская область, г. Пущино, пр-т Науки, 29, кв. 48



[✉ pashovkin@mail.ru](mailto:pashovkin@mail.ru)

[Статья из рубрики "Биофизика"](#)

DOI:

10.7256/2730-0560.2024.1.44003

EDN:

RCZRDR

Дата направления статьи в редакцию:

12-09-2023

Аннотация: Предметом исследования являются частотно зависимые изменения активности ферментов крови лабораторных животных (крыс) при воздействии модулированного ультразвука терапевтического диапазона интенсивностей. При равноэнергетическом воздействии на исследуемые ферментные системы показаны спектры действия для ферментов: креатинкиназы, щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы, аспартатаминотрансферазы, холинэстеразы, говорящие о возможности частотного управления функциональным состоянием ферментов, активации и ингибировании активности ферментов на определенных для каждого фермента частотах. Управление активностью всех ферментов осуществляется двумя путями: а) за счет изменения частоты действующего сигнала и б) за счет изменения энергии (или амплитуды) действующего сигнала на биологически активной частоте. Получение подробных спектров действия является необходимым условием разработки теоретических основ определения биологически активных частот и механизмов

частотно-зависимых ответов конкретных биологических систем на внешние воздействия модулированных волн. Основными выводами проведенного исследования являются: Основной подход к исследованию модулированных волн состоит в получении и использовании спектров действия для различных биологических систем. Используя воздействие на активной частоте можно, изменяя энергию действующего ультразвука, получить разнонаправленные эффекты. Таким образом, как частота модуляции, так и энергия воздействия могут быть факторами управления функциональным состоянием ферментных систем с помощью модулированных ультразвуковых волн. Задача статьи показать наличие частотно-зависимых ответов различных ферментных систем при воздействии модулированных ультразвуковых волн терапевтического диапазона интенсивностей – выполнена на примере пяти ферментных систем. Приведены спектры действия для этих систем и возможность трансформации этих спектров при изменении интенсивности ультразвука. Показана возможность управления величиной и знаком ответов исследованных ферментных систем, как частотой модуляции, так и энергией ультразвукового воздействия.

Ключевые слова:

ультразвук, модуляция, ферменты крови, активность ферментов, частота модуляции, креатинкиназа, щелочная фосфатаза, лактатдегидрогеназа, аспартатаминотрансфераза, холинэстераза

Введение

Различие в биологических эффектах модулированных и непрерывных (немодулированных) волн различной физической природы, в том числе ультразвука, было замечено рядом исследователей. Можно полагать, что зависимость биологических эффектов модулированных волн от частоты модуляции – это достаточно универсальное явление. Различия в эффектах модулированных и непрерывных волн различной физической природы показаны на целом ряде биологических объектов, например, ферментных системах, фермент-мембранных комплексах, на звеньях центральной нервной системы, поведенческих реакциях. Наибольший объем приведенных в литературе данных был получен для модулированных электромагнитных волн [1-10, 36-41].

При анализе биологических эффектов акустических воздействий так же, как и для модулированных электромагнитных воздействий, видно наличие частотно-зависимых ответов биологических систем разного уровня организации на воздействие фактора с разными частотными характеристиками [\[42-46\]](#).

Выбор частот и форм модуляции электромагнитных и акустических волн с целью усиления тех или иных эффектов зависит от объекта и требует специальных исследований. Имеющиеся литературные данные позволяют предположить, что для большинства биологических систем наиболее эффективные частоты модуляции лежат в области 1-1000 Гц.

Из литературы известно, что под действием акустических колебаний, в том числе и ультразвукового диапазона частот, в организме возникают структурные изменения, затрагивающие в первую очередь функции внутриклеточных мембран и дающих начало цепи последующих патологических процессов. Нарушается проницаемость мембран и изменяется активность ферментов, в том числе - окислительного фосфорилирования.

Изменяется активность мембраносвязанных ферментов эритроцитов [\[11-14\]](#).

Аналогичные явления прослеживаются также и в других тканях [\[43-50\]](#). Например, в тканях поперечнополосатых мышц под действием низкочастотных акустических колебаний частотой 10 Гц и уровнем 135 дБ найдены изменения активности некоторых ферментов, связанных с процессами биоэнергетики: уменьшалась активность сукцинатдегидрогеназы, аденоинтрифосфатазы, лактатдегидрогеназы [\[15\]](#).

Следует отметить, что в литературе многие данные по действию акустических волн приводятся с указанием уровней звукового воздействия L_E , дБ (sound exposure level). Это величина, равная десяти десятичным логарифмам отношения дозы шума на заданном временном интервале или продолжительности звукового события к опорному значению дозы шума.

$$L_E = 10 \lg E/E_0 ,$$

где E - доза шума на временном интервале T , $(\text{Па})^2 \times \text{с}$; E_0 - опорное значение дозы шума, равное квадрату опорного звукового давления 20 мкПа, умноженному на опорное время 1 с [$E_0 = 400 (\text{мкПа})^2 \times \text{с}$]. Однако, задача сравнения интенсивностей воздействия для различных как по частоте, так и по природе физических факторов встанет при разработке механизмов частотно-зависимых ответов биологических систем на воздействие модулированных волн.

Продолжение анализа литературных данных. В сердечной мышце белых крыс при акустическом воздействии с частотой 32 и 63 Гц и уровнем 115 дБ в течение 1 часа резко снижалась активность цитохромной системы и цитохромоксидазы, при этом активность сукцинатдегидрогеназы не изменялась. Для частот 2, 4, 8, 16 Гц и уровнем 115 дБ активность перечисленных выше ферментов менялась незначительно. Однако, в обоих вариантах было обнаружено достоверное снижение потребления кислорода тканью миокарда. При дальнейшем увеличении уровня акустических колебаний от 115 дБ до 135 дБ наблюдается дальнейшее снижение активности тканевого дыхания в мышце сердца, которое свидетельствует о снижении интенсивности окислительных процессов и о развитии гипоксии. Кроме того, акустическое воздействие с частотой 8 Гц и уровнями 90, 115, 135 дБ вызывало снижение активности а-кетоглутаратдегидрогеназы и, в меньшей степени, сукцинатдегидрогеназы, а также снижение содержания АТФ и АДФ с одновременным увеличением АМФ и неорганического фосфата [\[16\]](#).

В исследованиях активности щелочной фосфатазы в гомогенате почек крыс под действием модулированного ультразвука были показаны 2 пика изменения активности фосфатазы на частотах 350 и 2500 Гц [\[17\]](#).

В работе [\[18\]](#) показано изменение активности сукцинатдегидрогеназы в миокарде и головном мозге крыс, зависящее от частоты, уровня (100 и 135 дБ) и длительности акустического воздействия. Авторы отмечают две фазы эффектов акустического воздействия: 1 - активация мембраносвязанных ферментов, 2 - подавление активности. На основании литературных данных авторы предполагают наличие возможности прямого действия акустических волн на плазматические мембранные клеток и тканей. В ряде работ [\[19-21\]](#) показано, что изменение проницаемости клеточных мембран при акустическом воздействии приводило к снижению резерва антиоксидантной системы организма и

усилению перекисного окисления липидов.

Имеются данные, что накопление гистамина приводит к угнетению ацетилхолинэстеразы, увеличивая тем самым концентрацию ацетилхолина в головном мозге, что способствует перевозбуждению его структур. В связи с этим необходимо сказать, что изменение содержания ацетилхолина вносит изменения в механизмах образования следа памяти. Так при изучении холинergicкой системы базального переднего мозга на долю этой системы нейронов приходится основная часть поступающего в кору и лимбическую систему нейромедиатора ацетилхолина. По-видимому, ацетилхолин играет в памяти весьма существенную роль.

Как свидетельствуют результаты биохимических исследований для зрительного анализатора - на высших уровнях зрительной системы (той области мозга, который является наиболее вероятным местом хранения следов памяти) синаптические изменения, происходящие после повторной стимуляции определенных нейронов, обусловлены включением фосфатной группы в белок (F_1) под действием протеинкиназы С. Таким образом, подавление под действием акустических колебаний активности этого фермента может приводить к подавлению процессов формирования зрительной памяти.

Активация метаболизма дофамина приводит к увеличению продуктов перекисного окисления липидов за счет повышения активности в-гидролазы и моноаминооксидазы (поставщиков радикалов кислорода и перекиси). При этом, в любой биологической мемbrane в результате высокой реакционной способности свободных радикалов происходят характерные изменения: резко возрастает проницаемость мембран для молекул и ионов, увеличивается вязкость липидного слоя, на поверхности мембран появляются отрицательно заряженные химические группы, а также выходят из строя многие мембранные ферменты, в первую очередь те, активность которых зависит от присутствия в молекуле тиоловых групп (-SH). Эти группы очень быстро разрушаются свободными радикалами и гидроперекисями липидов. Однако самым существенным для жизнеспособности клеток можно считать нарушение барьерной функции мембран, которое наблюдается на ранних стадиях перекисного окисления липидов. Нарушение барьерной функции связано с рядом событий в липидном слое мембран. Во-первых, продукты перекисного окисления могут переносить через липидный слой мембраны ионы водорода. Во-вторых, в результате перекисного окисления липидов в липидном слое могут образовываться отверстия (поры), по которым в клетку устремляются ионы, в частности Ca^{2+} . В третьих, наблюдается снижение электрической прочности липидного слоя и мембрану "пробивает" электрическим током. Показано также, что напряжение, при котором происходит электрический пробой мембран, уменьшается при действии четырех факторов: перекисного окисления липидов, фермента фосфолипазы, механического растяжения мембраны и при адсорбции на поверхности мембраны некоторых чужеродных белков. Таким образом, прямое влияние акустических колебаний на активность ферментов в сочетании с механическим натяжением, формируемом при первичном взаимодействии акустических волн с биологическими тканями, может менять функциональную активность биологических систем. Кроме того из вышесказанного видно, что основной причиной нарушения барьерной функции мембран в патологии клеток является пробой мембран собственным мембранным потенциалом, а значит это является и причиной гибели клеток.

Ряд экспериментальных работ о действии низкочастотных колебаний на структуру мембран эритроцитов свидетельствует, по-видимому, о прямом действии колебаний на нерецепторные клетки. Такое изменение структуры мембран эритроцитов под действием

низкочастотных акустических колебаний характеризуется снижением резистентности эритроцитов к различным гемолизинам, повышением проницаемости мембран и изменением активности мембраносвязанных ферментов. Вследствие изменения структуры и проницаемости мембран изменяется активность ряда ферментов: каталазы, ацетилхолинэстеразы, АТФ-азы, супероксиддисмутазы и других [1-4].

Наименее представлены в литературе биологические эффекты модулированных ультразвуковых волн, особенно в низкочастотном диапазоне модулирующих волн. Принято считать, что применение модуляционных режимов ультразвукового воздействия в терапии обеспечивает более "мягкое" воздействие на ткани, вследствие уменьшения суммарной энергии, вводимой в организм, ослабления тепловых эффектов. Для этого в аппаратах, предназначенных для ультразвуковой физиотерапии, используются режимы модуляции с длительностями импульсов 2, 4, 10 мс и периодом следования 20 мс. Однако, основное достоинство модулированного ультразвука может оказаться в другом: в возможности целенаправленного воздействия на конкретную патологию.

Применение модулированных ультразвуковых волн в диагностике, например в акустооптической томографии, которые изменяют оптические свойства ткани во времени и пространстве, кроме получения информации об исследуемой ткани может и влиять на физиологические процессы в исследуемой ткани. Однако, исследование зависимостей таких изменений от частоты модуляции еще систематически не сделано. Это может быть связано с тем, что интенсивности воздействия диагностического ультразвука находятся в диапазоне 0.1-70 мВт/см², а интенсивности ультразвука терапевтического диапазона составляют 0.05 – 2 Вт/см². Тем не менее, нижние значения интенсивностей терапевтического ультразвука и верхние значения интенсивностей диагностического ультразвука пересекаются. Кроме того, нет данных о порогах развития эффектов модулированных волн. Поэтому, исследования частотно зависимых эффектов модулированных волн актуальны и для диагностического ультразвука.

Различие в биологических эффектах импульсного и непрерывного ультразвука было замечено многими авторами. Однако, систематические исследования зависимости характера биологических эффектов и их порогов от частоты следования импульсов ультразвука нам не известны.

Прямые экспериментальные данные, подтверждающие возможность снижения порогов повреждающего действия ультразвука при использовании импульсных режимов с определенными частотами следования импульсов были получены в работе [22]. Исследовалось действие импульсного и непрерывного ультразвука на развитие зародышей амфибий, а также на эктомезодермальные эксплантаты (ЭМЭ) - фрагменты ткани, вырезанные из боковой стороны зародышей по окончании нейруляции. ЭМЭ за короткое время (от единиц до десятков минут в зависимости от вида амфибий) скручиваются мезодермой внутрь, как бы имитируя гаструляцию целых зародышей, и являются удобной моделью для исследования действия ультразвука на эмбриональные процессы. Было показано, что повреждающий эффект импульсного ультразвука как на целые зародыши, так и на ЭМЭ, значительно выше, чем в случае непрерывного ультразвука, и зависит от частоты следования импульсов. Пятиминутное озвучивание эксплантатов *R. temporaria* импульсным ультразвуком с частотами следования импульсов в интервале 10-20 Гц со скважностью 2 и средней по времени и пространству интенсивностью 0.025 Вт/см² приводило к значительным эффектам, в отдельных опытах до полного разрушения ЭМЭ. Для эксплантатов амфибий другого вида (*Xenopus laevis*), у

которых свертывание происходит быстрее, эффективные частоты лежали в области 110-125 Гц. Непрерывный ультразвук при средней интенсивности 0.05 Вт/см^2 , в два раза большей, чем в случае импульсного не оказывал никакого действия на ЭМЭ.

Наименее исследованными в настоящее время являются биологические эффекты, связанные с действием модулированного ультразвука, когда эти эффекты зависят в значительной степени не от интенсивности воздействующего сигнала, а от того, с какими частотой модуляции и видом модуляции осуществляется воздействие, в какую из фаз функционального состояния биосистемы [\[23-31\]](#).

Наиболее эффективным для получения частотно-зависимых эффектов модулированных ультразвуковых волн является равноэнергетическое воздействие гармоническими частотами модуляции по сравнению с импульсными воздействиями. Это связано с тем, что воздействие проводится волновым фактором с хорошо контролируемыми параметрами. Импульсный же сигнал содержит в себе значительное количество различных частот, и выделить эти частоты, проанализировать весовые вклады каждой частоты в наблюдаемый эффект на фоне возможных эффектов остальных частот становится крайне затруднительно. В этом случае каждая частота будет являться управляющим фактором, эффективным в разной степени для разных функциональных частей биологических систем.

Особое внимание в этих экспериментах должно уделяться одинаковым условиям содержания исследуемых систем и условиям воздействия, так как внесение дополнительных факторов воздействия, например, изменение состава питательных сред при исследовании систем *in vitro*, дополнительные стрессорные воздействия, меняющие функциональные состояния систем *in vivo*, могут внести значительные искажения в регистрацию частотно-зависимых эффектов модулированного ультразвука. Для анализа частотно- зависимых эффектов модулированных волн наиболее эффективным методом является получение для биологических систем различного уровня организации спектров действия. Спектры действия – зависимость величины и знака биологических эффектов от частоты модуляции при равноэнергетическом (равноамплитудном) воздействии модулированных волн на биологические системы за равные промежутки времени. В этом случае возможно получение значимых биологических эффектов и выявление биологически активных частот. Кроме того, появляется возможность анализа биологических эффектов и получение зависимостей этих эффектов от энергии воздействующего фактора. Это связано с тем, что спектры действия зависят от интенсивности воздействия и могут трансформироваться. В этом случае, например, биологически активная частота может быть как активирующей, так и подавляющей функциональную активность исследуемого объекта в зависимости от того, с каким уровнем энергетического воздействия мы имеем дело. Спектр действия модулированного ультразвука для конкретных систем будет отражать характеристики именно этой системы. Например, для ферментных систем возможно получение активирующих и ингибирующих эффектов, что может дать возможность проводить неинвазивную коррекцию ряда тяжелейших заболеваний, связанных с недостаточной функциональной активностью специфических ферментных систем, или их гиперактивностью. Оптимизация ультразвуковой терапии с помощью гибкого управления модуляционными режимами является актуальной задачей медицинской акустики и требует дальнейшей разработки.

При исследовании биологических эффектов ультразвука следует уделять большое внимание метрологическому обеспечению экспериментов. Это связано с тем, что при воздействии на исследуемые объекты используются пьезокерамические или

магнитострикционные излучатели ультразвука. Ультразвуковые поля, генерируемые такими излучателями, отличаются пространственным распределением локальных интенсивностей ультразвука, как в ближней, так и в дальней зоне излучателей [32-35]. От знания этих распределений зависят методы воздействия, так как величины локальных интенсивностей ультразвука могут в несколько раз превосходить по амплитуде величины средних по пространству и времени интенсивностей ультразвука. Для пространственного усреднения ультразвуковой энергии в медицине (физиотерапии) ультразвуковые воздействия часто проводят по лабильной методике, при которой излучатель постоянно перемещают по поверхности кожи в области необходимого лечебного воздействия.

При исследовании ферментных систем воздействие проводилось в начале дальней зоны излучателей, где наблюдается наиболее равномерное распределение интенсивностей ультразвука. Усреднение ультразвукового воздействия происходило за счет активного перемешивания растворов ферментов с реакционными составляющими в поле ультразвука.

Целью исследования являлось: 1) показать, что для различных видов ферментов возможны частотно-зависимые изменения активности ферментов на внешние воздействия модулированными акустическими волнами, что говорит об универсальности механизмов формирования таких ответов; 2) показать наличие разных механизмов появления частотно-зависимого изменения активности ферментов.

Задачами исследования являлось: 1) получение спектров действия для различных ферментов крови лабораторных животных; 2) показать зависимость изменения активности ферментов от интенсивности воздействия модулированными ультразвуковыми волнами и как при этом меняется характер активных частот; 3) показать роль метрологии ультразвуковых полей в получении частотно-зависимых изменений активности ферментов, так как в неоднородных полях локальные интенсивности ультразвука могут отличаться в 2-3 раза от средних.

Материалы и методы исследований

В данной работе проведены исследования активности ряда ферментов крови лабораторных животных: креатинкиназы, щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы, аспартатаминотрансферазы, бутирилхолинэстеразы. Целью работы являлось исследование каталитической активности ферментов в зависимости от частоты модуляции ультразвука с интенсивностью ультразвука до $1 \text{ Вт}/\text{см}^2$. Выбор диапазонов частот модуляции был обусловлен частотами оборотов ферментов. Напрямую соответствия чисел оборота ферментов с диапазоном частот модуляции не проводилось. Но в той последовательности, в которой рассматриваются результаты исследований, каталитическая активность растет от креатинкиназы до холинэстеразы.

Исследования были проведены на установке, представленной на рис.1. Установка содержала две терmostатируемых ячейки объемом 5 см^3 , имеющими звукопрозрачные окна диаметром 1 см, располагающихся на расстоянии 2 см от излучателя (соответствует началу дальней зоны излучателя). Ферменты помещали в терmostатируемые ячейки и озвучивали в опытной ячейке перед добавлением субстрата реакции или по ходу ферментативной реакции. Изменения активности ферментов по ходу опыта отслеживали в озвученных пробах, через каждую контрольную пробу. Так как активность ферментов в зависимости от времени после выделения имеет разную активность, то для получения спектров действия был использован анализ относительной активности ферментов в зависимости от частоты модуляции ультразвука, что позволяет получать данные с

высокой воспроизводимостью. При использовании опытной ячейки без включения ультразвука и контрольной ячейки относительные изменения активности были близки к нулю, то есть, кинетические кривые в контрольной и опытной ячейке были одинаковы. Различия появлялись только после озвучивания модулированным ультразвуком. Измерения проводились в одинаковых временных точках кинетической кривой, как для опытных, так и для контрольных образцов. В ультразвуковом поле исследуемая проба эффективно перемешивалась, чем достигалось равномерное воздействие на весь ее исследуемый объем.

Графики строились в координатах: X - частота модуляции в Гц, Y - относительное изменение активности, где $Y = (A_0 - A_K) / A_K * 100\%$ (A_0 - активность озвученного фермента, A_K - активность фермента в контроле).

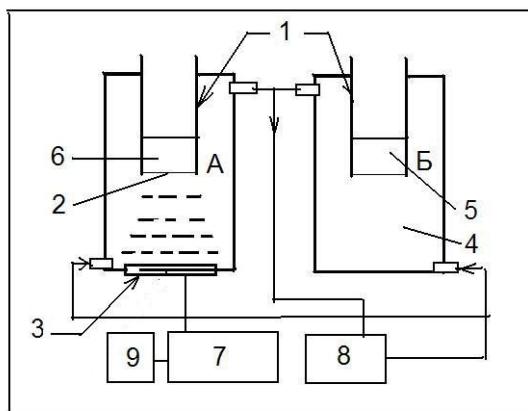
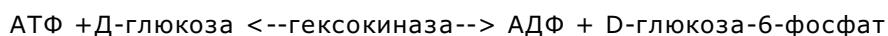
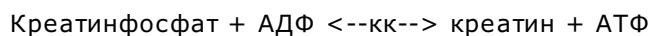


Рис. 1. Схема установки для воздействия модулированным ультразвуком: А - термостатируемая камера для ультразвукового воздействия, Б - термостатируемая камера для контрольных образцов. 1 - внутренняя камера для образцов, 2 - звукопрозрачное окно, 3 - ультразвуковой излучатель, 4 - термостатирующий объем камеры, 5 - контрольный образец, 6 - облучаемый образец, 7 - генератор ультразвука, 8 - ультратермостат, 9 - генератор модулирующих сигналов.

Креатинкиназа катализирует реакцию:



Фермент определяли в крови кролика с помощью диагностического набора для определения активности креатинкиназы фирмы CORMAY кинетическим методом по рекомендации DGKC, SFBC и SCEМетод основан на образовании НАДФН, инициируемом креатинкиназой.



Скорость образования НАДФН прямо пропорциональна активности креатинкиназы (КК) в пробе. В сыворотке крови креатинкиназа стабильна до 10 суток при температуре 2-8 градусов Цельсия или 24 часа при комнатной температуре. Измерение активности проводили спектрофотометрически на длине волны 340 нм, в кювете с длиной оптического пути 1 см. Температура проведения реакции - 30 °C, время реакции - 5

минут. Значения поглощения регистрировали через 1, 2, 3 мин.

Щелочная фосфатаза катализирует реакцию гидролиза п-нитрофенилфосфата с образованием окрашенного п-нитрофенола. Фосфатазы специфичны по отношению к фосфатной части молекулы и могут переносить фосфатные группы на другие молекулы, так что разрыв происходит непосредственно за атомом фосфора. Клиническое значение ЩФ состоит в увеличении активности при ряде патологических процессов, в частности, при воспалительных процессах. Резкое уменьшение активности ЩФ наблюдается при ряде других заболеваний (лучевая болезнь, гепатит и др.)

Активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови определяли с помощью тест набора фирмы "Диаком" спектрофотометрическим методом.

Кинетическое спектрофотометрическое определение активности щелочной фосфатазы (ЩФ) основано на регистрации увеличения оптической плотности опытного образца на длине волны 405 нм в результате протекания реакции:

ДЭА, Mg²⁺



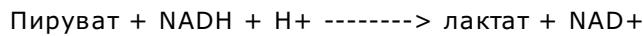
ЩФ, pH 9.8

Скорость образования в результате реакции окрашенного п-нитрофенола пропорциональна активности ЩФ.

В экспериментах использовали кровь крыс линии Вистар. В кювету спектрофотометра вносили 2 мл раствора реагента и 30 мкл анализируемой сыворотки, перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 15 мин., затем добавляли 200 мкл инициатора реакции, перемешивали и через 1 мин измеряли поглощение. Замеры повторяли 3 раза с интервалом в 1 мин. Расчет изменения оптической плотности E в минуту проводили по прямолинейному участку кинетической кривой: Для удобства сравнения результатов построение графиков проводили в координатах, где по шкале Y отложены относительные изменения активности (по сравнению с контролем), что позволило выявлять активные частоты воздействия.

Определение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) основано на уменьшении оптической плотности опытного образца при 340 нм в результате протекания реакции:

ЛДГ



Окисление NADH в присутствии ЛДГ сопровождается уменьшением оптической плотности. Для определения активности ЛДГ использован набор реактивов для определения активности ЛДГ в сыворотке и плазме крови «Диаком ЛДГ».

Определение активности аспартатаминотрансферазы

Для определения активности аспартатаминотрансферазы (АсАТ) использованы стандартные наборы для *in vitro* диагностики (AST UV FS). Определение активности АсАТ основано на регистрации уменьшения экстинкции на длине волны 340 нм (спектрофотометрически) при окислении НАДН. Это уменьшение пропорционально активности АсАТ в пробе. Стандартный набор реактивов, состоял из реактива R1 (трикс, pH 7.8, L-аспартата, малатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы), и реактива R2 (НАДН, 2-

оксоглутарата).

Работу проводили на сыворотке крови крыс, взятой из хвостовой вены. В качестве антикоагулянта при взятии образцов крови использовали гепарин. Для определения контрольной активности AcAT в кювету спектрофотометра вносили 1000 мкл реактива R1 и 200 мкл сыворотки крови. После 5 минутного инкубирования при температуре 37 °C в кювету добавляли 250 мкл реактива R2. Измерение экстинкции проводили через 1 мин. в течении 3 мин. Параллельно ставили пробу в поле модулированного ультразвука на указанное время- 5 мин., после чего определяли значение экстинкции через 1, 2 и 3 мин.

Сравнивали среднее значение активности AcAT в опытной пробе со средним значением активности в контрольной пробе. Для наглядного определения активных частот расчет относительного изменения активности фермента проводили по формуле $A = (dE_0/dE_k - 1) * 100\%$, где dE_0 и dE_k – изменение оптической плотности в опыте и контроле, соответственно. Поэтому, отрицательные значения активности соответствуют величине подавления активности фермента, а положительные – величине активации.

Для определения активности холинэстеразы крови (ХЭ) использованы стандартные наборы для *in vitro* диагностики (фирмы Lachema). Определение активности ХЭ основано на регистрации увеличения экстинкции на длине волны 405 нм (спектрофотометрически). Это увеличение пропорционально активности ХЭ в пробе. Стандартный набор реактивов, состоял из реактива R1 (буфер – хромоген, состоящий из фосфатного буфера с pH 7.9, дитио-бис-нитробензойной к-ты – 40 мкМ/флакон), реактива R2 (субстрат – бутирилтиохолинийодид – 1.08 мкМ/флакон) и стандарта –холинэстеразы.

Сравнивали среднее значение активности ХЭ в опытной пробе со средним значением активности в контрольной пробе. Расчет изменения активности проводили так же, как и для AcAT.

Аппаратура для воздействия амплитудно-модулированными ультразвуковыми волнами

Для проведения ультразвукового воздействия был использован терапевтический генератор ультразвука УЗТ-102 с внешним входом модуляций, работающий на частоте 0.88 МГц в диапазоне средних по пространству и времени интенсивностей 0.02 - 1.5 Вт/см² (I_{SATA} – spatial average temporal average intensity – международный стандарт), генераторы модулирующих сигналов (Г6-28 и Г3-110), термостатируемая камера для облучаемых образцов, цифровой спектрофотометр для регистрации кинетики ферментативной реакции (722 Grating Spectrophotometer). При применении модулированных волн (импульсная модуляция со скважностью 2) $I_{SATA} - \text{mod} = \frac{1}{2} I_{SATA} - \text{nep}$

Воздействие ультразвуком проводилось в начале дальней зоны ультразвукового излучателя, в центре пучка, диаметром центрального пятна в зоне ультразвукового воздействия – 10 мм. В работе использована импульсная модуляция со скважностью равной 2. Такой режим позволяет работать с равноэнергетическими воздействиями, не зависимо от частоты модуляции.

Метрология ультразвуковых полей

Контроль распределения интенсивности ультразвука в сечении ультразвукового пучка в

области воздействия ультразвука на исследуемый объект проводили: с использованием дифференциальной термопары, калиброванной по интенсивности ультразвука и методом краска/бумага, разработанной автором статьи с использованием специально разработанной нами программы, позволяющей представлять распределение интенсивностей в сечении ультразвукового пучка в виде трехмерного изображения, где оси X и Y – размеры сечения, Z – величина локальной интенсивности или локального переменного давления. Таким образом, можно выбирать зону воздействия ультразвукового поля на объект исследования с наиболее равномерным по амплитуде распределением интенсивностей ультразвука. Программа позволяет определять величину локальной интенсивности в любой точке сечения ультразвукового пучка и отображать определяемые точки в таблице. Характер распределения интенсивностей в одинаковых сечениях ультразвукового пучка одного и того же излучателя не изменяется в зависимости от интенсивности ультразвука. Меняется только степень прокрашивания, которая пропорциональна интенсивности в терапевтическом диапазоне. Метод обладает высокой степенью пространственного разрешения и быстротой получения изображений по сравнению со стандартными методами контроля параметров ультразвуковых излучателей и сравним с оптическими шлирен-системами. Гидрофоны и дифференциальные термопары усредняют пространственное разрешение распределений интенсивностей по объему используемого датчика. В наших исследованиях важно было определить зону ультразвукового пучка, наиболее усредненную по интенсивности, для более равномерного воздействия на образец. Модуляция не вносит изменений в пространственное распределение интенсивностей в аналогичном сечении поля используемого излучателя. Меняется только степень прокрашивания, в соответствии с уменьшением средней по пространству и времени интенсивностью модулированного ультразвука. На рис. 2 приведен пример представления пространственного распределения интенсивностей ультразвука и определения величин локальных интенсивностей ультразвука.

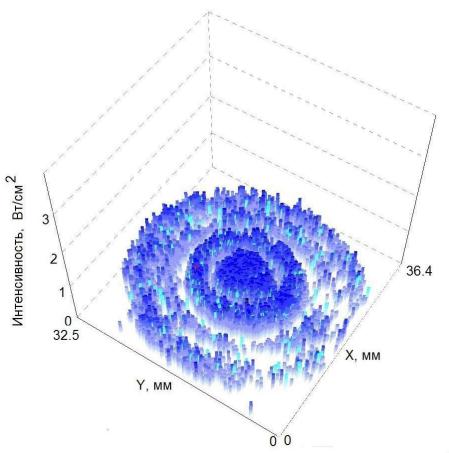


Рис. 2. Пример трехмерного представления распределения локальных интенсивностей ультразвука в заданном сечении ультразвукового пучка.

Результаты

Результаты представлены на графиках в виде столбцов, имеющих различные знаки (+/-), так как расчет изменения активности проводили по формуле $E = (A_0 / A_k - 1) * 100\%$. Таким образом, уменьшение активности приводит к значениям со знаком минус на рисунке, увеличение активности – со знаком плюс. Подобный подход к анализу результатов позволяет получать частотные зависимости изменения активности ферментов с малым разбросом получаемых данных, мало зависящих от меняющейся со

временем абсолютной каталитической активности ферментов от момента выделения объекта исследования до окончания экспериментов. Поэтому, при получении данных использовалось чередование исследований по схеме контроль-опыт, до 7 повторений на одну точку получаемых данных для каждой исследованной частоты модуляции.

На рис. 3 приведены результаты исследований действия амплитудно-модулированного ультразвука, интенсивностью $I_{SATA} = 0.7 \text{ Вт}/\text{см}^2$ на креатинкиназу крови кроликов. Видно, что каталитическая активность креатинкиназы не зависимо от серии увеличивалась при воздействии частот 1-3 Гц и 7-9 Гц и достигала величины 15-80 % для этих частот воздействия. Уменьшение каталитической активности наблюдалось в диапазоне частот 3 – 6 и 10 Гц и достигало величин от 20 - 30 % .

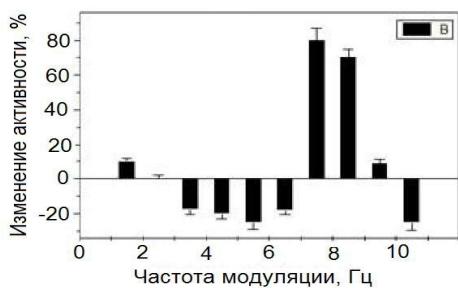


Рис. 3. Зависимость относительного изменения активности креатинкиназы ($(A_0 - A_K) / A_K * 100\%$) от частоты модуляции ультразвука. Озвучивание по ходу реакции в течение 5 мин. Различия в области частот 1-6, 7-9, 9-10 Гц достоверны ($P < 0,05$). Несущая частота – 0.88 МГц, интенсивность $I_{SATA} = 0.7 \text{ Вт}/\text{см}^2$.

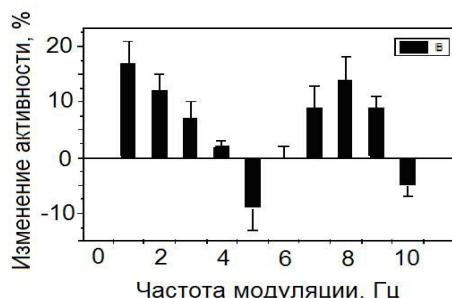


Рис. 4. Зависимость относительного изменения активности креатинкиназы ($(A_0 - A_K) / A_K * 100\%$) от частоты модуляции ультразвука через 12 часов после выделения. Различия в области частот 1-4, 5, 6-10 Гц достоверны ($P < 0,05$). Несущая частота – 0.88 МГц, интенсивность $I_{SATA} = 0.7 \text{ Вт}/\text{см}^2$.

Частотная зависимость изменения ферментативной активности наблюдается на свежевыделенных препаратах. При воздействии на препараты длительного хранения частотная зависимость становится маловыраженной (изменения достигают только 15 - 17%) , несмотря на сохранение уровня каталитической активности равному уровню свежевыделенного препарата (рис. 4).

В отличие от креатинкиназы щелочная фосфатаза имеет частотную зависимость изменения активности при воздействии более высоких частот. Так максимальное

увеличение активности наблюдалось на частотах, близких к 350-370 Гц и достигало 25%. (рис. 5), то есть, выраженность частотно-зависимых изменений ферментативной активности была меньше чем для креатинкиназы.

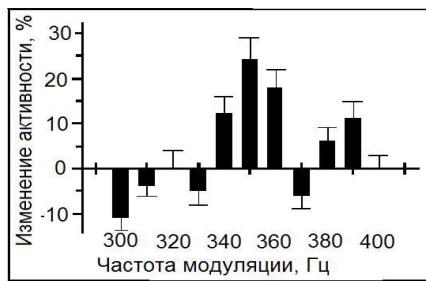


Рис. 5. Зависимость относительного изменения активности щелочной фосфатазы ($(A_0 - A_K) / A_K * 100\%$) от частоты модуляции ультразвука. Озвучивание по ходу реакции в течение 5 мин. (по 5 измерений на каждую точку). Различия в области частот 300-330, 340-370 Гц достоверны ($P < 0,05$).

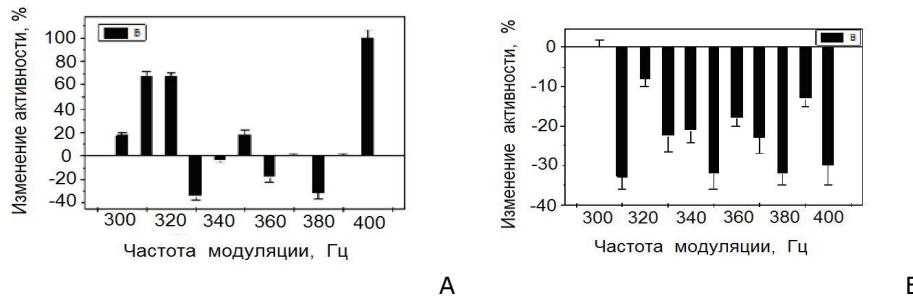


Рис. 6. Зависимость относительного изменения активности лактатдегидрогеназы ($(A_0 - A_K) / A_K * 100\%$) от частоты модуляции ультразвука. Озвучивание плазмы крови крысы импульсно-модулированным ультразвуком в течении 3 мин. до инициирования реакции - А ($0.7 \text{ Вт}/\text{см}^2, 0.88 \text{ МГц}$) и Б ($0.2 \text{ Вт}/\text{см}^2, 0.88 \text{ МГц}$)

В частотном диапазоне (300 – 400 Гц) частотно-зависимые эффекты для лактатдегидрогеназы существенно отличаются от таких, полученных для щелочной фосфатазы, как по величине эффектов, так и по локализации частот активации ферmenta или подавления его активности (рис.6А, 6Б). Можно говорить о разнонаправленном действии аналогичных частот в одинаковом диапазоне частот модуляции для двух ферментов: щелочной фосфатазы и лактатдегидрогеназы.

Видно также, что при изменении интенсивности ультразвукового воздействия на биологически активной частоте модуляции происходит трансформация активной части спектра действия и наблюдается смена знака эффекта (рис.7).

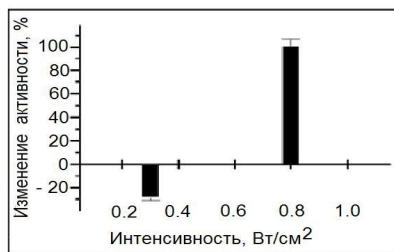


Рис. 7. Зависимость относительного изменения активности лактатдегидрогеназы от интенсивности модулированного ультразвука на частоте модуляции 400 Гц.

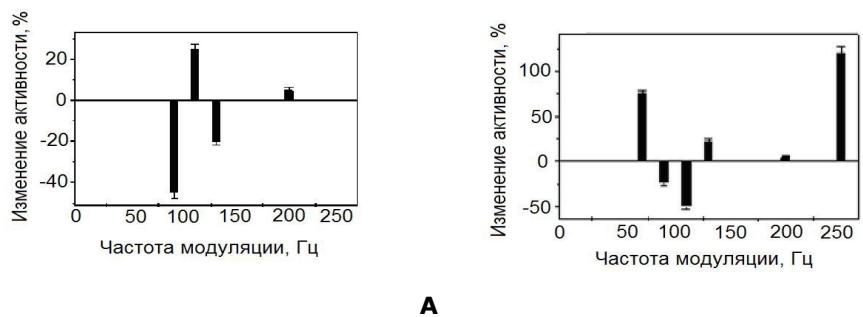


Рис. 8. Спектры действия для AcAT, полученные с использованием АМ ультразвука. $I_{SATA} = 0.05 \text{ Вт/см}^2$ (А), $I_{SATA} = 0.7 \text{ Вт/см}^2$ (Б), частота несущей – 0.88 МГц, $t_{\text{обл}} = 5 \text{ мин}$.

Для аспартатаминотрансферазы с использованием АМ ультразвука для двух интенсивностей (0.05 и 0.7 Вт/см²) были получены спектры действия в диапазоне частот модуляции 0-250 Гц (рис 8). При интенсивности 0.7 Вт/см² были показаны частоты активации AcAT (70 Гц, 130 Гц, 250 Гц – максимальная величина активации), и частоты подавления активности (110 Гц). Однако, при уменьшении амплитуды воздействия произошла трансформация спектра действия и выявлены частоты, подавляющие активность AcAT Особенностью этого спектра действия является наличие в нем частот подавления активности фермента (частота модуляции – в области 88 Гц и 130 Гц), достигающих 20-50 % подавления активности. И частота активации 130 Гц при интенсивности ультразвука $I_{SATA}=0.05 \text{ Вт/см}^2$ трансформируется в частоту подавления активности при $I_{SATA}=0.7 \text{ Вт/см}^2$. То есть, как и в случае с ЛДГ наблюдается трансформация знака эффекта.

Для холинэстеразы с использованием модулированного ультразвука для интенсивности 0.7 Вт/см² был получен спектр действия в диапазоне частот модуляции 0-100 Гц (рис 9).

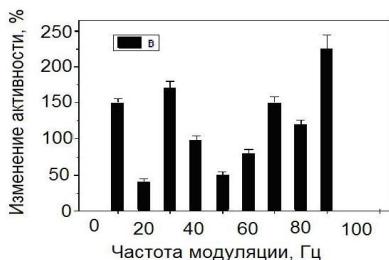


Рис. 9. Изменение активности ХЭ под действием модулированного ультразвука. $I=0.7$

Вт/см², t = 3 мин. Различия в области частот 0-100 Гц достоверны (P < 0,05).

Для ХЭ частотно зависимые изменения активности были выражены наиболее сильно по сравнению с другими исследованными ферментами крови. Это наиболее подробный спектр действия, снятый с шагом в 10 Гц. Максимальные изменения активности достигали 150-220 % на частотах модуляции 10, 30, 70 и 90 Гц.

Обсуждение результатов исследования

Практически для всех исследованных ферментов крови наблюдаются частотно зависимые эффекты активации и подавления активности в различных диапазонах частот модуляции при воздействии модулированных ультразвуковых волн. Это позволяет говорить об универсальной природе таких эффектов.

Как видно из рис. 6 - 8 при воздействии модулированного ультразвука терапевтического диапазона интенсивностей на ферменты крови наблюдаются 3 вида эффектов: 1) при воздействии на частоте модуляции, вызывающей при малых интенсивностях ультразвука (0.05 Вт/см²) эффект подавления активности с увеличением интенсивности ультразвука наблюдается уменьшение эффекта подавления, вплоть до нулевого, а затем активация ферментативной активности и ее рост с увеличением интенсивности ультразвука; 2) при воздействии на частоте модуляции, вызывающей при малых интенсивностях ультразвука (0.05 Вт/см²) эффект активации фермента с увеличением интенсивности наблюдается уменьшение эффекта активации, вплоть до нулевого, а затем подавление ферментативной активности и увеличение эффекта подавления с увеличением интенсивности ультразвука; 3) появление эффекта активации/подавления активности на некоторых исходно нейтральных частотах как при малых, так и при больших интенсивностях модулированного ультразвука. В первых двух случаях точка перехода знака эффекта находится в области интенсивности ультразвука равной 0.4 Вт/см².

Встает вопрос, требующий дальнейших исследований, каким образом происходит такая трансформация спектра при изменении энергии воздействия модулированного ультразвука, вследствие чего частоты активации становятся частотами подавления активности и наоборот.

Неравновесный динамический характер живых систем, частью которых являются ферментные системы, может быть причиной зависимости получаемых биологических эффектов модулированного ультразвукового воздействия от временных, частотных и энергетических параметров ультразвука. При исследовании биологических эффектов наиболее значимыми параметрами обычно считаются интенсивность ультразвука и общее время воздействия. Большинство исследователей видят единственное различие между импульсным и непрерывным ультразвуком только в изменении соотношения между тепловыми и кавитационными эффектами. Явления, которые могут быть обусловлены динамикой биологической системы и связанные с ними специфические эффекты модулированных воздействий обычно не учитываются.

Действие ультразвука зависит от целого ряда факторов, которые можно разделить на две категории: а) факторы, связанные с воздействующим агентом - ультразвуком и б) факторы, связанные со свойствами объектов воздействия. К первой категории относятся такие факторы ультразвукового воздействия как частота, интенсивность, время воздействия, распределение энергии в ультразвуковом пучке, вид модуляции, частоты модуляции. Ко второй категории для ферментных систем относятся такие, как: акустические свойства объекта, концентрации ферментов, субстратов, в каком

конформационном состоянии находятся молекулы ферментов, доступность активных центров фермента для молекул субстрата, в каком виде находятся молекулы фермента (тетрамеры, димеры, мономеры), наличия в растворе ионов металлов, pH раствора. Формирование биоэффектов ультразвука будет определяться совокупностью факторов первой и второй категории.

Одной из важнейших характеристик воздействующего ультразвука является интенсивность, которая определяет природу первичных физических процессов (механических, тепловых, кавитационных) в биологических объектах, находящихся в ультразвуковом пучке. Механические процессы связаны с такими факторами ультразвука как колебательное смещение, скорость, ускорение, переменное давление, их градиенты. Тепловые процессы связаны с поглощением ультразвуковой энергии в объекте вследствие релаксационных процессов в биополимерах. Кавитационные процессы в ультразвуковом поле обусловлены появлением пульсирующих газовых полостей в среде, гидродинамическими процессами вокруг пульсирующих полостей и вторичными физико-химическими явлениями: механическими, тепловыми, электрохимическими. Преобладание какого-либо из перечисленных процессов будет определять первичный физический механизм биологического действия ультразвука.

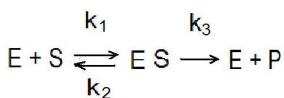
В терапии, в зависимости от объекта, используются ультразвуковые волны в диапазоне средних по пространству и времени интенсивностей (I_{SATA}) 0.05 - 1.0 Вт/см² (в США - 0.05 - 3.0 Вт/см²). Вследствие пространственной неоднородности ультразвуковых полей локальные интенсивности для плоских излучателей могут превышать средние в несколько раз. Для терапии это является существенным фактом и при выборе параметров ультразвукового воздействия на конкретный объект и при анализе наблюдаемых эффектов необходимо учитывать отношение пиковой интенсивности к средней. Для ультразвука низких интенсивностей (< 0.2 - 0.4 Вт/см²), когда тепловыми и кавитационными эффектами можно обычно пренебречь, воздействие на биологические объекты будет обусловлено механическими факторами.

Увеличение интенсивности приводит к увеличению доли тепловых эффектов и качественному изменению механизмов биологического действия и связанных с ними эффектов, например, температурных изменений ферментативной активности, тепловой денатурации белков. При еще больших интенсивностях, когда возникают кавитационные явления, наблюдаются эффекты других типов, например, образование химически активных соединений, которые могут взаимодействовать с биомакромолекулами.

Анализ известных биоэффектов непрерывного ультразвука показывает, что процессы активации в биологических системах проявляются обычно в зоне механических и тепловых эффектов, а процессы ингибирования начинаются в начале кавитационной зоны интенсивностей.

При исследовании ферментативных реакций и воздействия на них как непрерывного, так и модулированного ультразвука просматривается ряд механизмов увеличения или уменьшения активности ферментов. Известно, что ферментативные реакции происходят через образование промежуточного продукта – «фермент-субстратного комплекса» .

В простейшем случае:



E – фермент; k_1 – константа скорости реакции образования фермент-субстратного комплекса ES . Фермент-субстратный комплекс далее может диссоциировать с константой скорости – k_2 . Кроме того, фермент-субстратный комплекс может превращаться в продукт реакции P с высвобождением фермента E . Константа скорости образования продукта реакции P – k_3 . Константа скорости химической реакции:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_3 \times [ES]$$

Таким образом, скорость реакции пропорциональна концентрации комплекса ES .

Увеличение количества продукта зависит как от того, в какой форме в ряду /тетрамер-димер-мономер/ находится фермент, так и от конформационного состояния фермента, чем большее количество активных центров открыто для взаимодействия фермента с субстратом, тем выше выход продукта и наоборот. Кроме того, чем выше скорость поступления субстрата к активному центру, тем выше скорость образования продукта реакции, по количеству которого оценивается эффективность работы фермента. Исходя из этого видно, что воздействие модулированных ультразвуковых волн происходит на уровне процессов, связанных с константами скоростей.

Следует отметить, что существующие терапевтические ультразвуковые аппараты не позволяют гибко осуществлять выбор частоты следования импульсов ультразвука с целью поиска оптимальных режимов воздействия на конкретный орган с конкретной патологией. Имеющиеся в терапевтических аппаратах режимы ограничены импульсной модуляцией с частотой 50 Гц и длительностями импульсов 2, 4, 10 мсек. Принято считать, что применение импульсного режима в терапии обеспечивает более "мягкое" воздействие на ткани, вследствие уменьшения суммарной энергии, вводимой в организм, ослабление тепловых эффектов. Однако, основное достоинство импульсного ультразвука может оказаться в другом: в возможности более целенаправленного воздействия на данную патологию. Импульсно-модулированный ультразвук с частотой следования импульсов специально подобранный для лечения конкретного заболевания пока еще не используется в терапии. Также следует отметить, что применение модулированных ультразвуковых волн в физиотерапии может существенно снизить энергетическую нагрузку на организм и существенно понизить интенсивность действующего ультразвука при сохранении эффективности физиотерапии. Оптимизация ультразвуковой терапии с помощью гибкого управления модуляционными режимами является актуальной задачей медицинской акустики и требует дальнейшей разработки.

Заключение

Наибольший интерес в исследовании механизмов биологического действия физических факторов разной природы вызывают вопросы энергетического и информационного действия факторов. Энергетическое воздействие вызывает биологические эффекты качественно и количественно зависящие от амплитуды или падающей энергии физического фактора. Под информационной составляющей нужно понимать возможность

получения разных биологических эффектов, зависящих от частоты модуляции при равноэнергетическом и равноамплитудном воздействии модулированного ультразвука на исследуемые биологические системы, в данном случае – ферментные системы.

Поэтому, на начальных стадиях исследований возможно выяснить в принципе наличие или отсутствие частотно-зависимых эффектов для данной биологической системы с достаточно грубым шагом. В случае наличия биологических эффектов должна выясниться более тонкая зависимость эффектов и их корреляции с амплитудно-частотными характеристиками фактора воздействия в зоне активной частоты с последующим анализом функциональных изменений на разных уровнях организации биосистем. Особое внимание в этих экспериментах должно уделяться одинаковым условиям содержания биосистем и условиям воздействия, так как внесение дополнительных факторов воздействия, например, изменение состава питательных сред при исследовании систем *in vitro*, дополнительные стрессорные воздействия, меняющие функциональные состояния систем *in vivo* могут внести значительные искажения в эффекты действующего физического фактора.

п Основной подход к исследованию модулированных волн состоит в получении и использовании спектров действия для различных биологических систем.

п Спектры действия – зависимости величины и знака биологического эффекта от частоты модуляции при равноэнергетическом и равноамплитудном воздействии на исследуемую систему. Это позволяет управлять функциональным состоянием биосистем и направленно менять величину и знак биологического эффекта, так как в спектре всегда присутствуют частоты разнонаправленного действия. То есть, можно с помощью одной частоты получить эффект, а с помощью другой частоты либо усилить его, либо полностью отменить.

п Используя воздействие на активной частоте можно, изменения энергию действующего ультразвука, получить разнонаправленные эффекты.

п Таким образом, как частота модуляции, так и энергия воздействия могут быть факторами управления функциональным состоянием ферментных систем с помощью модулированных ультразвуковых волн.

Основные отличия биологических эффектов непрерывного и модулированного ультразвука.

I Эффекты непрерывного ультразвука зависят преимущественно от механизмов биологического действия (механических, тепловых, кавитационных). При увеличении интенсивности воздействия преимущественно работает один из этих механизмов. Как правило, с увеличением интенсивности наблюдается подавление функционального состояния биосистем различного уровня организации.

I Эффекты модулированного ультразвука могут существенно отличаться от эффектов непрерывного ультразвука. Наличие активных частот приводит к трансформации биологических эффектов. На частотах активации или подавления функциональной активности можно получить эффекты, превышающие эффекты непрерывного ультразвука, с возможностью изменения знака эффекта при изменении интенсивности. Таким образом, можно существенно снизить интенсивность ультразвукового воздействия в физиотерапии при сохранении величин биологических эффектов при использовании модулированных ультразвуковых полей.

Из последнего пункта вытекает, что пороги развития биологического эффекта для модулированных и непрерывных ультразвуковых волн могут быть существенно различными, то есть, величины пороговых интенсивностей для получения биологического эффекта непрерывным ультразвуком могут быть намного больше пороговых интенсивностей для получения аналогичных биологических эффектов модулированным ультразвуком ($I_{\text{SATA-НЕПР}} >> I_{\text{SATA-МОД}}$).

Таким образом, задача статьи показать наличие частотно-зависимых ответов различных ферментных систем при воздействии модулированных ультразвуковых волн терапевтического диапазона интенсивностей – выполнена на примере пяти ферментных систем. Приведены спектры действия для этих систем и возможность трансформации этих спектров при изменении интенсивности ультразвука. Показана возможность управления величиной и знаком ответов исследованных ферментных систем, как частотой модуляции, так и энергией ультразвукового воздействия.

Библиография

1. Григорьев Ю.Г. (1996) Роль модуляции в биологическом действии электромагнитного излучения // *Радиационная биология. Радиоэкология*, Т. 36, № 5, С. 659-670.
2. Гапеев А.Б., Соколов П.А., Чемерис Н.К. (2001) Модельный анализ особенностей действия модулированных электромагнитных полей на клеточном уровне при различных параметрах модулирующих сигналов // *Биофизика*, Т. 46, № 4, С. 661-675.
3. Гапеев А.Б., Чемерис Н.К. (2000) Модельный подход к анализу действия модулированного электромагнитного излучения на клетки животных // *Биофизика*, Т. 45, № 2, С. 299-312.
4. Гапеев А.Б., Якушина В.С., Чемерис Н.К., Фесенко Е.Е. (1997) Модулированное ЭМИ крайне высоких частот низкой интенсивности активирует или ингибирует респираторный взрыв нейтрофилов в зависимости от частоты модуляции // *Биофизика*, Т. 42, № 5, С. 1125-1134.
5. Пашовкина М.С., Акоев И.Г. (1996) Действие импульсно-модулированного микроволнового излучения 2375 МГц на АТФазную активность актомиозина мышц крыс // *Радиационная биология. Радиоэкология*. Т. 36, № 5, С. 700-705.
6. Пашовкина М.С., Акоев И.Г. (2000) Изменение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови морских свинок *in vitro* при действии амплитудно-модулированного сверхвысокочастотного электромагнитного поля 2375 МГц // *Биофизика*. Т. 45, № 1, С. 130-136.
7. Пашовкина М.С., Акоев И.Г. (2001) Влияние интенсивности СВЧ ЭМИ на направленность и выраженность реакции щелочной фосфатазы сыворотки крови при слабых амплитудно-модулированных воздействиях // *Радиационная биология. Радиоэкология*. Т. 41, № 1, С. 62-66.
8. Пашовкина М.С., Акоев И.Г. (2000) Исследование изменения активности аспартатаминотрансферазы сыворотки крови человека при низких амплитудно-модулированных СВЧ ЭМИ воздействиях // *Радиационная биология. Радиоэкология*. Т. 40, № 6, С. 700-702.
9. Пашовкина М.С., Акоев И.Г., Пашовкин Т.Н. (2002) Изменение активности некоторых ферментов животных и человека при воздействии модулированных микроволн и феномены выявленных нелинейных эффектов // В кн. *Биологические эффекты слабых электромагнитных излучений*. Пущино, С. 26-37.
10. Гапеев А.Б., Чемерис Н.К. (1999) Действие непрерывного и модулированного ЭМИ КВЧ на клетки животных. Обзор. Часть I. Особенности и основные гипотезы о механизмах биологического действия ЭМИ КВЧ // *Вестник новых медицинских*

- технологий. – Т. VI, N 1. – С. 15-22.
11. Свидовый В.И., Колмаков В.Н., Кузнецов Г.В. (1985) Изменение активности аминотрансфераз и проницаемости эритроцитарных мембран при воздействии инфразвука и низкочастотного шума // *Гигиена и санитария*. N 10, С. 73-74.
 12. Свидовый В.И., Колмаков В.Н., Кулеба В.А., Тимофеева В.М. (1987) Изменение проницаемости, общей АТФ-азной активности эритроцитов и супероксиддисмутазной активности плазмы крови при воздействии инфразвука // *Гигиена и санитария*. – N5, С. 78-79.
 13. Алексеев С.В., Колмаков В.Н., Свидовый В.И. (1984) Влияние низкочастотных акустических колебаний на некоторые свойства мембран эритроцитов // *Гигиена и санитария*, N2, С. 82-84.
 14. Колмаков В.Н., Свидовый В.И., Шлейкин А.Г. (1984) Влияние низкочастотных акустических колебаний на некоторые компоненты мембран эритроцитов // *Гигиена труда и профзабол.*, N10, С. 48-49.
 15. Новиков А.М. (1976) Гистохимические исследования ферментативно-метаболических изменений в поперечно-полосатых мышечных волокон под действием инфразвука // *Труды ЛСГМИ*, Т. 114, С. 30-32.
 16. Габович Р.Д., Шутенко О.И., Кречковский Е.А. (1984) Влияние инфразвука на процессы биоэнергетики, ультраструктурную организацию органов и некоторые процессы регуляции // *Гигиена и санитария*, N3, С. 9-15.
 17. Барсегян В.О. (1981) Исследование действия химических агентов и ультразвука на активность щелочной фосфатазы // *Диссертация к.б.н.*, Ереван.
 18. Свидовый В.И., Шлейкин А.Г. (1987) О влиянии инфразвука на активность сукцинатдегидрогеназы тканей // *Гигиена труда и профзабол.*, N 5, С. 50-52.
 19. Гончарова Л.П., Кадыскина Е.Н., Макарова И.Н., Родионова Л.П. (1984) Сравнительное изучение действия шума разной интенсивности на некоторые компоненты антиоксидантной системы клетки // *Антиоксиданты и адаптация*. Л., С. 22-26.
 20. Мелкоян М.М., Мелик-Агаева Е.А. (1984) Влияние шума на процессы липидной переоксидации // *Биол. ж. Армении*, Т. 37, N8, С. 668-677.
 21. Алексеев С.В., Свидовый В.И., Величко Л.Н. (1983) Влияние низкочастотных акустических колебаний на фосфолипидный состав цельной крови и некоторых тканей животных. // *Гигиена труда и профзаболеваний*. N3, С. 39-41.
 22. Sarvazyan A.P., Belousov L.V., Petropavlovskaya M.N., Ostroumova T.V. (2002) The action of low-intensity pulsed ultrasound on amphibian embrionic tissues // *Ultrasound in Med. & Biol.* 2002, № 8, С. 639-654.
 23. Е.В.Мельникова, В.К.Утешев, Т.Н.Пашовкин, А.А.Соколова, В.А.Яшин, В.Н.Карнаухов, Э.Н.Гахова. (2006) Изменение проницаемости зародышевых оболочек амфибий для флуоресцентных красителей под действием ультразвука.// *Биофизика*, 2005, Т. 50. Вып. 3, С. 500-504.
 24. Пашовкин Т.Н. (2005) Биологические эффекты амплитудно-модулированных ультразвуковых полей терапевтического диапазона интенсивностей. // В сб. материалов II Евразийского конгресса по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика – 2005», Москва, 21-24 июня 2005 г., С. 223.
 25. Pashovkin, T.N., Pashovkina, M.S. (2005) Effects of amplitude-modulated therapeutic ultrasound on blood enzymes // 5TH International Symposium on Therapeutic Ultrasound. Abstracts. October 27-29 October, 2005, Harvard Medical School, Boston, T063, Р. 39.
 26. Гахова Э.Н., Пашовкин Т.Н., Мельникова Е.В., Утешев В.К., Садикова Д.Г. (2007) Ультразвук может изменять проницаемость зародышевых оболочек амфибий. // *Ветеринарная патология*, № 1, С. 7-9.
 27. Утешев В.К., Пашовкин Т.Н., Гахова Э.Н. (2010) Выживаемость зародышей амфибий

- после воздействия модулированного ультразвука терапевтического диапазона интенсивностей. //Вестник новых медицинских технологий, № 4, С. 7-10.
28. Олешкевич А.А., Пашовкин Т.Н. (2014) Количественный анализ действия модулированного ультразвука на некоторые клетки тканей животных. // Ветеринария, зоотехния и биотехнология/ Научно-практический журнал. ФГБОУ ВПО МГАВМиБ, – № 5. – С. 27-33.
29. Oleshkevich, A.A., Pashovkin, T.N. (2015) Effect of modulated ultrasound in Natrinema Pallidum (*Halobacterium halobium*) and *Alivibrio fisheri* // Матер. Международного Симпозиума «МИКРООРГАНИЗМЫ И БИОСФЕРА» MICROBIOS-2015, 25-30 ноября 2015. Ташкент, Узбекистан.
30. Олешкевич А.А., Василевич Ф.И., Пашовкин Т.Н. (2015) Биохимические и биофизические эффекты непрерывных и модулированных ультразвуковых волн на *Alivibrio fisheri* и *Natrinema pallidum*. //Ветеринария, зоотехния и биотехнология, № 12, С. 50-56.
31. Gapeyev, A.B., Lysenko, Yu.N., Pashovkin, T.N. (2016) Combined drug and ultrasound on cancer treatment // Приглашенный устный доклад на International Conference on "New Approaches fighting Cancer and Aging", December 2-3, 2016 in Nanjing, China.
32. Пашовкин Т.Н., Шильников Г.В., Сарвазян А.П. (1986) Способ визуализации ультразвукового поля // А.с. № 1206693 . Б.и. № 3, 23.01.86 г.
33. Пашовкин Т.Н., Шильников Г.В. (2000) Регистрация и анализ распределений интенсивностей в ультразвуковых пучках с использованием красителей // Научное приборостроение, Т. 10, № 3. С. 17-26.
34. Садикова Д.Г., Пашовкин Т.Н. (2005) Распределение интенсивностей в сечениях ультразвуковых пучков терапевтических и диагностических излучателей в жидких средах // В сб. материалов II Евразийского конгресса по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика – 2005», Москва, 21-24 июня 2005 г., С. 225.
35. Пашовкин Т.Н., Пашовкина М.С., Садикова Д.Г., Шильников Г.В. (2006) Распределение интенсивностей в ультразвуковых пучках терапевтических излучателей с использованием красителей: 3-мерное представление распределений интенсивностей в сечениях ультразвуковых пучков и 3D-реконструкция ультразвуковых полей в водных средах. Вестник новых медицинских технологий, Т. XIII, № 3, С. 155-159.
36. Bawin SM, Gavalas-Medici R, Adey WR (1973): Effects of modulated very high frequency fields on specific brain rhythms in cats. Brain Res N 58. Pp. 365–384.
37. Bawin S.M., Kaczmarek L.K., Adey W.R. (1975). Effects of modulated VHF fields on the central nervous system. Ann NY Acad Sci N 247, Pp. 74–80.
38. Blackman CF, Elder JA, Weil CM, et al. (1979). Induction of calcium ion efflux from brain tissue by radio frequency radiation: effects of modulation frequency and field strength. Radio Sci N 14, Pp. 93–98.
39. Blackman C.F., Benane S.G., House D.E., et al. (1985). Effects of ELF (1–120 Hz) and modulated (50 Hz) RF fields on the efflux of calcium ions from brain tissue in vitro. Bioelectromagnetics N 6, Pp. 327–338.
40. Byus C.V., Lundak R.L., Fletcher R.M. et al. (1984). Alterations in protein kinase activity following exposure of cultured lymphocytes to modulated microwave fields. Bioelectromagnetics N 15. Pp. 217–238.
41. Litovitz T, Krause D, Penafiel M, et al. (1993). The role of coherence time in the effects of microwaves on ornithine decarboxylase activity. Bioelectromagnetics N 14. Pp. 395–404.
42. Dalecki, D., Raeman, C.H., Child, S.Z. and Carstensen, E.L., (1995). Intestinal hemorrhage from exposure to pulsed ultrasound, Ultrasound in medicine & biology. V 21, N 8. Pp. 1067-1072.
43. [Bialek and Wit, 1984] Bialek W, Wit HP (1984). Quantum limits to oscillator stability:

- theory and experiments on acoustic emissions from the human ear. *Phys Lett N* 104A. Pp. 173–178.
44. Lennart D. Johns (2002). Nonthermal Effects of Therapeutic Ultrasound: The Frequency Resonance Hypothesis *Journal of Athletic Training*, V 37, N 3. Pp. 293–299.
45. Pinamonti S., Gallenga P.E., Masseo V. (1982). Effects of pulsed ultrasound on human erythrocytes in vitro. *Ultrasound Med Biol.* N 8. Pp. 631–638.
46. Nykanen M. (1995). Pulsed ultrasound treatment of the painful shoulder: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Scand J Rehabil Med.* N 27. Pp. 105–108.
47. Dyson M. (1987). Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*. N 73. Pp. 116–120.
48. Kitchen S.S., Partridge C.J. (1990). A review of therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*. N 76. Pp. 593–600.
49. Nilsson A.M., Odselius R., Roijer A., Olsson S.B. (1995). Pro- and antifibrinolytic effects of ultrasound on streptokinase-induced thrombolysis. *Ultrasound Med Biol.* V 21. Pp. 833–840.
50. Ter Haar G. (1999). Therapeutic ultrasound. *Eur J Ultrasound*. N 9. Pp. 3–9.

Результаты процедуры рецензирования статьи

В связи с политикой двойного слепого рецензирования личность рецензента не раскрывается.

Со списком рецензентов издательства можно ознакомиться [здесь](#).

Рецензуемая статья посвящена частотно-зависимым изменениям активности ряда ключевых ферментов крови лабораторных животных под действием модулированных ультразвуковых волн. Для непрерывного ультразвука, применяемого в медицине для физиотерапии и фенофореза лекарственных веществ, в мировой литературе приведено достаточно большое количество работ, с описанием биологических эффектов и механизмов биологического действия, включая механические, тепловые и кавитационные механизмы. Это связано с безопасным применением ультразвуковых волн. Поэтому, основные эффекты описаны для диапазона средних по пространству и времени интенсивностей ультразвука 0.05 – 3.0 Вт/см² и временам воздействия до 15 минут. В то же время отмечается в ряде работ, что для модулированного ультразвука с различными типами модуляции можно наблюдать биологические эффекты, превышающие по величине эффекты непрерывных волн при меньшей (как минимум в два раза) интенсивности. То есть, пороги возникновения биологических эффектов модулированного ультразвука могут быть существенно меньше аналогичных, вызываемых непрерывным ультразвуком. Также просматривается еще одно отличие биологических эффектов непрерывных и модулированных волн – неспецифичность биологических эффектов непрерывных волн и специфичность – для модулированных волн, выражаясь в наличии частотно-зависимых эффектов. В последнем случае эффекты могут различаться при различных частотах модуляции, но при равном энергетическом воздействии на исследуемые биологические системы. То есть, кроме основных механизмов, работающих при воздействии непрерывных волн, появляются механизмы воздействия, связанные с применением модуляции волн. Именно с этим связана актуальность исследований механизмов биологического действия модулированных ультразвуковых волн. Кроме того, применение модуляционных режимов при воздействии ультразвука может повысить эффективность и избирательность применения ультразвука в медицине при уменьшении энергии воздействующего ультразвука. То есть увеличить безопасность применения ультразвука в медицине.

Данная статья построена в традиционном стиле, содержит введение с обзором

литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, заключение и список используемой литературы.

Во введении дан обзор литературы, в котором приведены данные о частотно-зависимых эффектах при воздействии модулированных волн на биологические системы разного уровня организации. Рассмотрено понятие спектров действия и важность их получения при равноэнергетическом воздействии модулированных волн для выявления биологически активных частот для исследуемых объектов. Особое внимание уделено метрологическому обеспечению экспериментов с ультразвуком, так как в ближней и начале дальней зон используемых излучателей распределение локальных интенсивностей в сечениях ультразвуковых пучков неоднородно. Это проиллюстрировано на рис.1. От корректной метрологии зависит воспроизводимость результатов.

В работе приведены частотно-зависимые изменения активности ферментов для пяти разных ферментов крови при воздействии модулированных ультразвуковых волн терапевтического диапазона интенсивностей. Показано, что спектры действия могут меняться в зависимости от интенсивности ультразвука. Таким образом, было показано, что управляющими факторами, формирующими биологические эффекты, могут быть как частоты модуляции, так и энергетический фактор (интенсивность ультразвука). То есть, применение модулированных ультразвуковых волн в медицине может быть адресным.

До настоящего времени нет теории воздействия модулированных ультразвуковых волн на биологические системы разного уровня организации. Поэтому, получение корректных данных о частотно- зависимых биологических эффектах является необходимым условием разработки такой теории (или теорий).

Представление данных о частотно-зависимом изменении активности ферментов в виде относительного изменения активности позволяет использовать полученные автором данные различных экспериментов с разным исходным уровнем активности ферментов и повысить воспроизводимость результатов, с определением биологически активных частот. Данные, представленные в статье, не вызывают сомнений, поскольку базируются на достаточном количестве и высоком качестве научного материала. Список цитированной литературы содержит 35 публикаций.

Подытоживая вышесказанное, можно говорить о том, что статья «Частотно- зависимые изменения активности ферментов крови под действием модулированного ультразвука» должна быть опубликована в научном журнале «Физика биологии и медицины».