

Г. С. Литвинов, Л. И. Бережинский, Г. И. Довбешко, М. П. Лисица

## ВОЗДЕЙСТВИЕ МИЛЛИМЕТРОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА СПЕКТР ИНФРАКРАСНОГО ОТРАЖЕНИЯ МОНОКРИСТАЛЛА $\beta$ -АЛАНИНА

*Исследовано воздействие перестраиваемого по частоте электромагнитного излучения в диапазоне 37—54 ГГц на параметры колебательного спектра монокристалла  $\beta$ -аланина. Обнаружены индуцируемые излучением значительные перераспределения интенсивностей и тонкой структуры полос инфракрасного отражения, отвечающих деформационным колебаниям N—H и C—O связей молекулы  $\beta$ -аланина в кристалле. Установлен резонансный по частоте внешнего излучения характер воздействия с полушириной резонанса 50—80 МГц. Обсуждены возможные механизмы обнаруженных эффектов.*

Воздействие электромагнитного излучения миллиметрового (мм) или крайне высокочастотного (КВЧ) диапазона на биологические объекты, обнаруженное еще в 70-е годы (см. например, [1, 2]), интенсивно изучается во многих лабораториях мира. Особенно большой интерес проявляется к эффектам мм-излучения в последнее десятилетие в связи с терапевтическими достижениями в лечении наиболее распространенных болезней [3—5]. Несмотря на впечатляющее число экспериментальных работ в этой бурно развивающейся области биофизики, насчитывающее несколько сотен, до настоящего времени ведется дискуссия по поводу возможной теоретической интерпретации [6, 7] наблюдаемых эффектов. Одна из важнейших причин многих неясностей — отсутствие широких и достаточно подробных анализов механизмов рецепции мм-излучения биологическими системами и их структурными элементами. Исследования такого рода в соответствии с признанной концепцией интегратизма [8] должны начинаться с нижайших уровней организации живого, однако до сих пор они проводятся крайне недостаточно. В частности, известно совсем мало попыток [9, 10] осуществить их для простейших биомолекул. В связи с этим нами были выполнены эксперименты по обнаружению влияния микроволн на аминокислоту  $\beta$ -аланин. В качестве метода исследований авторы избрали инфракрасную спектроскопию, обладающую большими возможностями в выяснении влияния физических и химических факторов на биологические объекты [11, 12]. Действие мм-излучения устанавливали на основе сравнения спектров, отвечающих внутримолекулярным колебаниям необлучаемых и облучаемых объектов.

Образцы  $\beta$ -аланина приготавливали в виде монокристаллов высокого оптического качества размерами до  $5 \times 5 \times 3$  мм. Их выращивали из водных растворов рацематов, полученных на основе очищенного тройной перекристаллизацией в дистиллированной воде  $\beta$ -аланина марки «х.ч.», исходно содержавшего не менее 99,7% основного вещества.

Инфракрасные спектры отражения записывали на решеточном спектрофотометре JASCO DS-402G (Япония) с разрешением  $0,5 \text{ см}^{-1}$  и воспроизводимостью по интенсивности 0,5%. Хотя прибор позволяет регистрировать также спектры пропускания, однако при их записи возникли технические трудности в подведении к образцу КВЧ-излучения, поскольку используемый с этой целью волновод перекрывает световой поток, уменьшая тем самым сигнал и вводя дополнительные погрешности измерений. КВЧ-излучение от генератора Г4-141, перестраивавшийся в диапазоне 37,5—53,5 ГГц, подводили перпендикулярно к тыльной поверхности исследуемого образца. Между поверхностью кристалла и гибким волноводом имелся зазор менее 1 мм, так что при толщине образца порядка 1 мм его отражающая грань находилась в КВЧ-поле достаточной интенсивности. Мощность выходящего из волновода излучения составляла 10 мВт. Излучение глобара оптической

системой проецируется на поверхность кристалла, отраженный сигнал от которого фокусируется на входную щель спектрофотометра (рис. 1). Измерения выполнены в области частот 600—4000 см<sup>-1</sup>, где в спектре пропускания и отражения наблюдаются интенсивные полосы. Абсолютная величина отражения в этой области составляет 15—18 %, поэтому спектры регистрировали при растяжке шкалы интенсивности

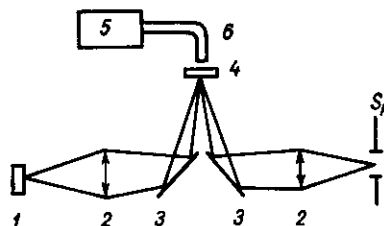


Рис. 1. Схема эксперимента для регистрации спектра отражения при воздействии КВЧ поля: 1 — глобар; 2 — проецирующая оптика; 3 — зеркала; 4 — исследуемый кристалл; 5 — КВЧ генератор; 6 — гибкий волновод;  $S_p$  — входная щель спектрофотометра

в 4—5 раз. Воспроизведение спектров при этом несколько ухудшилось, из-за чего для повышения точности реализована многократная запись спектров.

На рис. 2 показано влияние КВЧ-поля на спектр отражения  $\beta$ -аланина в области 1200—1800 см<sup>-1</sup>. Здесь же указаны поляризация КВЧ-поля и ИК-излучения относительно входной щели прибора, ориентация кристалла, на поверхностном слое которого показаны выходы оптических осей.

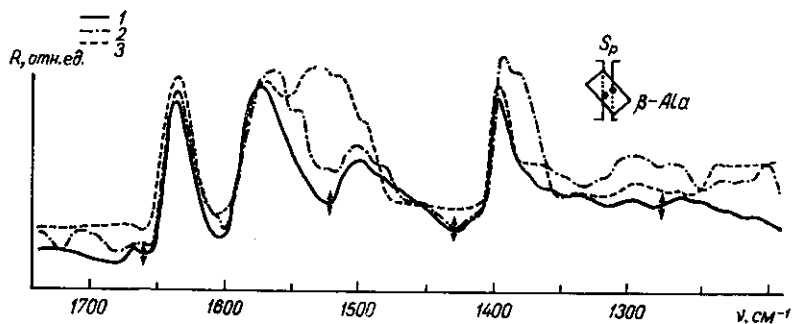


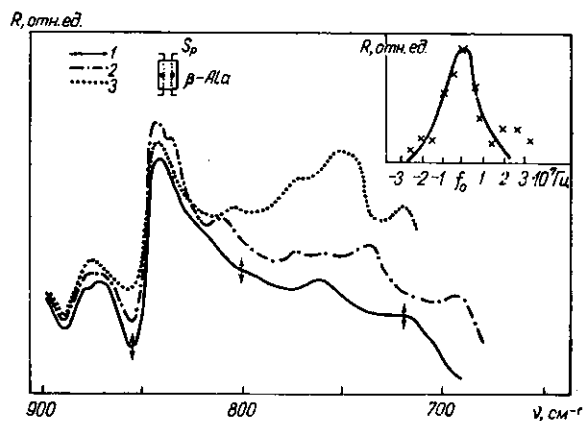
Рис. 2. Спектр отражения  $\beta$ -аланина в отсутствие КВЧ поля (1) и при его воздействии на частоте 46,57 (2) и 46,59 ГГц (3).  $E_{\text{КВЧ}} \parallel E_{\text{ИК}} \perp S_p$

глощения лежат вблизи точек перегиба полос отражения. Однако для качественного описания наблюдаемого эффекта можно ориентироваться на максимумы наблюдаемых полос (разброс результатов при многократной записи спектров указан на рис. 2 стрелками). В опубликованных к настоящему времени работах по ИК-спектрам  $\beta$ -аланина [13, 14] не проведено отнесения частот, однако на основе анализа ИК- и КР-спектров кристалла глицина [15, 16], *L*-аланина [17, 18] и  $\beta$ -аланина в водном растворе [14] полосу 1560 см<sup>-1</sup> можно отнести к симметричному деформационному колебанию группы —COO<sup>-</sup>, полосу 1505 см<sup>-1</sup> — к такому же колебанию группы —NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, полосу 1345 см<sup>-1</sup> — группы CH<sub>2</sub>.

Анализ кривых, представленных на рис. 2, свидетельствует о том, что изменения интенсивностей наблюдаемых полос под действием КВЧ-поля превосходят ошибки измерений. Кроме того, при 1390, 1500 и 1570 см<sup>-1</sup> проявляется дополнительная структура, зависящая от поляризации ИК-излучения. Видны изменения также в области 1200—1350 см<sup>-1</sup>. В интервале 700—800 см<sup>-1</sup> они весьма существенны. При облучении КВЧ-полем с частотой 37,5 ГГц сильно возрастает интенсивность полосы с максимумом вблизи 765 см<sup>-1</sup> (рис. 3). Эту зависимость можно рассматривать только качественно, так как произвести точные абсолютные измерения в реализованной постановке экспери-

мента не представляется возможным. Действительно, поскольку образец находится на металлической или диэлектрической диафрагме, выходящее из волновода излучение отражается от образца и диафрагмы и частично возвращается в волновод, а затем и в генератор, что может влиять на режим его работы, изменяя, например, частоту или интенсивность генерации либо то и другое одновременно. Отсутствие согласования с нагрузкой, т. е. с облучаемым кристаллом, является главной причиной нестабильности параметров генерации. Измерения показывают, что при одних и тех же положениях индикатора частоты генератора Г4-141 истинная частота выходного излучения может отличаться на величину  $\pm 50$  МГц. Поэтому на

Рис. 3. Спектр отражения  $\beta$ -аланина в отсутствие КВЧ поля (1) и при его воздействии на частоте 37,9 (2) и 37,5 ГГц (3). На вставке показано изменение интенсивности полосы  $\nu = 765$   $\text{см}^{-1}$  от расстройки частоты КВЧ поля относительно частоты  $f_0 = 37,5$  ГГц.

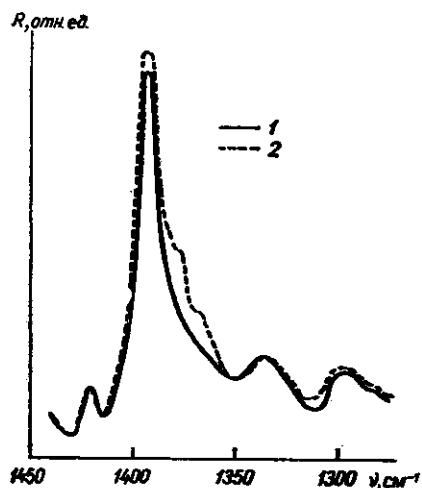


вставке рис. 3 показано изменение интенсивности полосы  $\nu = 765$   $\text{см}^{-1}$  в зависимости от расстройки КВЧ-поля относительно частоты ориентировочного значения  $f_0 = 37,5$  ГГц.

Рассмотрим возможные причины, приводящие к наблюдаемым эффектам влияния КВЧ-излучения на спектры отражения  $\beta$ -аланина в области частот внутримолекулярных колебаний. В случае сложных молекул, учитывая многочисленные комбинации основных тонов и обертоны различного порядка плюс набор вращательных состояний, сопровождающих каждый колебательный уровень, мы получаем практически квазинепрерывный спектр энергетических уровней уже при небольших значениях колебательных квантовых чисел. Известно, что вращательные состояния не проявляются в спектрах твердой фазы. Однако при наличии внешнего возмущения, частота которого совпадает с таковой вращательного перехода молекулы, возможна вынужденная стимуляция заторможенного вращения слабой амплитуды. При этом уместно оценить расстояние между вращательными уровнями молекул аммиака и  $\text{H}_2\text{S}$ , поскольку структурными элементами исследуемой молекулы  $\beta$ -аланина являются группы атомов  $-\text{NH}_3^+$  и  $-\text{COO}^-$ . Что касается  $\text{NH}_3^+$ , то имеет место полная аналогия, а  $\text{COO}^-$  группа характеризуется одинаковой симметрией и близким набором вращательных частот с молекулой  $\text{H}_2\text{S}$ . В первом случае упомянутое расстояние составляет 40  $\text{см}^{-1}$  для S-ветви и 20  $\text{см}^{-1}$  — для P-ветви, во втором — о величине  $\Delta\nu$  можно судить по вращательной постоянной, равной 10  $\text{см}^{-1}$  [19]. Эти значения существенно превышают частоту (1  $\text{см}^{-1}$ ), удовлетворяющую условию наблюдавшегося резонансного взаимодействия КВЧ-поля с молекулой  $\beta$ -аланина. Наряду с этим в предположении многофотонного возбуждения вполне реально резонансное взаимодействие приложенного поля с колебаниями кристалла. Такое допущение не лишено оснований, так как при наличии постоянного или низкочастотного электрического поля время жизни в колебательно-вращательных (колебательно-либрационных) состояниях может возрасти на несколько порядков [19, 20]. Следовательно, КВЧ-подсветка способна привести к существенному перераспределению молекул не только по либрационным состояниям, но также изменить распределение молекул по колебательным состояниям.

Такие факторы, как многообразие совокупности колебательных уровней многоатомных молекул, наличие многочисленных возможностей проявления резонанса Ферми, а в твердой фазе — комбинированного резонанса Ферми — Давыдова, значительно увеличивают вероятность резонансного взаимодействия КВЧ-поля с квазинепрерывным спектром колебательно-либрационных состояний кристаллического  $\beta$ -аланина, способствуют существенному перераспределению интенсивностей ИК-спектров поглощения (отражения) и спектров комбинационного рассеяния.

К явлениям, способствующим активному влиянию КВЧ-подсветки, относятся и чисто решеточные колебания, обнаруживаемые по спек-



тру Мандельштам-Бриллюэновского рассеяния. Как установлено нами, такой спектр кристаллического  $\beta$ -аланина содержит две полосы, одна из которых отвечает частоте, в два раза меньшей использованной в работе частоты мм-излучения. Последняя, таким образом, является первым обертоном одного из решеточных колебаний, способного резонансно взаимодействовать с КВЧ-полем через обертоновый уровень.

Рис. 4. Влияние магнитного поля на отражение  $\beta$ -аланина в полосе  $1400 \text{ см}^{-1}$  при воздействии КВЧ-поля на частоте  $46,59 \text{ ГГц}$ : 1 —  $B=0$ ; 2 —  $B=0,2 \text{ Т}$

Этим не исчерпываются факторы, способствующие наблюдаемым изменениям в описанных выше спектрах отражения. К ним может относиться также инверсионный спектр группы  $\text{NH}_3^+$ , насчитывающий более 60 линий, которые перекрывают частотный интервал использованного в настоящей работе КВЧ-излучения [21]. Таким образом, имеется дополнительная возможность проявления резонанса, сопровождающегося приведенными выше изменениями в исследованных спектрах отражения, и в первую очередь вблизи полосы  $1500 \text{ см}^{-1}$ .

Следует также отметить или предположить, что наличие групп  $\text{NH}_3^+$  и  $-\text{COO}^-$  в решетке  $\beta$ -аланина должно обуславливать появление магнитных моментов токов, связанных с вращательным движением положительного или отрицательного зарядов этих групп. Так, нами установлено, что, если одновременно с КВЧ-полем частоты  $46,59 \text{ ГГц}$  наложить на исследуемый образец постоянное магнитное поле с индукцией  $0,2 \text{ Т}$ , то в спектре отражения появляется дополнительная структура (рис. 4). Этот результат еще не дает оснований сделать однозначный вывод о резонансном поглощении КВЧ-излучения кристаллом  $\beta$ -аланина в присутствии магнитного поля благодаря взаимодействию с конкретным магнитным моментом. Видимо, более определенный ответ может быть получен после измерений электронного парамагнитного резонанса.

Подводя итог обсуждению экспериментальных результатов, можно сформулировать вывод о механизме непосредственного влияния КВЧ-поля на колебательно-вращательные спектры  $\beta$ -аланина за счет резонансного взаимодействия с широко развитой сетью соответствующих энергетических состояний кристалла. Такое взаимодействие обеспечивается близостью или даже совпадением некоторых частот внутримолекулярных переходов и решеточных колебаний с КВЧ-частотами, многократным увеличением времени жизни ряда возбужденных состояний кристалла в КВЧ-поле, участием комбинированного резонанса Фер-

ми — Давыдова, вовлекающего во взаимодействие многочисленные колебательные состояния различного порядка и приводящего в итоге к смещению уровней и значительному изменению плотностей колебательных состояний. Поскольку при КВЧ-подсветке в той или иной мере срабатывают перечисленные факторы, ИК-спектры отражения и поглощения претерпевают значительные изменения, прежде всего, в распределении интенсивностей. Таким же изменениям, предположительно, подвергаются и спектры комбинационного рассеяния.

Аналогичные эффекты должны наблюдаться и в спектрах подавляющего большинства молекулярных кристаллов, в первую очередь, состоящих из достаточно сложных молекул, и тем более для биомолекул и образований высокой степени организации, в том числе живого вещества.

#### Резюме

В роботі вивчено дію електромагнітного випромінювання у діапазоні 37—54 ГГц на параметри коливального спектру монокристалу β-аланіну. Виявлені індуковані міліметровим випромінюванням значні перерозподіли інтенсивностей та структури смуг інфрачервоного відображення. Встановлений резонансний по частоті зовнішнього випромінювання характер дії з півшириною резонансу 50—80 МГц. Обговорені можливі механізми знайдених ефектів.

#### Summary

Experiments on millimeter wave radiation influence upon the vibrational spectra parameters of β-alanine single crystal are presented in the work. Millimeter wave irradiation frequency was tuned in the range 37,5—53,5 GHz. The band structure together with the strong intensity redistribution were found. Resonance character of millimeter wave effect on the β-alanine vibrational spectra is detected. The probable mechanisms of this effect is discussed.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Webb S. I., Booth A. D. Absorption of microwaves by microorganisms // Nature.— 1969.— 222, N 5199.— P. 1199—1200.
2. Залюбовская Н. П. К оценке действия микроволн миллиметрового и субмиллиметрового диапазона на различные биологические объекты: Автореф. дис. ... канд. биол. физ. наук.— Днепропетровск, 1970.— 18 с.
3. Андреев Е. А., Белый М. У., Ситько С. П. Проявление собственных характеристических частот организма человека // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1984.— № 10.— С. 60—64.
4. Sit'ko S. P., Andreev E. A., Dobronravova I. S. The hole as a result of self-organization // J. Biol. Phys.— 1988.— 16, N 1.— P. 71—73.
5. Фундаментальные и прикладные аспекты применения электромагнитного излучения в медицине: Тез. докл. I Всесоюз. симпоз. с междунар. участием.— Киев, 1989.— 404 с.
6. Frohlich H. Biological effects of millimeter waves and related questions // Adv. Electron. Phys.— 1980.— 53.— P. 85—152.
7. Чернавский Д. С., Хургин Ю. И. Физические механизмы взаимодействия белковых макромолекул с КВЧ излучением // Миллиметровые волны в медицине и биологии.— М.: Ин-т радиоэлектроники АН СССР, 1989.— С. 227—235.
8. Энгельгард В. А. Познание жизни.— М.: Наука, 1985.— 325 с.
9. Изучение цикла развития дрожжей при облучении ЭМИ мм-диапазона и о некоторых соображениях по их биологическому действию / С. Е. Манойлов, Ю. Е. Коисв, В. Ф. Кондратьева и др. // Мед.-биол. аспекты миллиметрового излучения: Сб. науч. тр.— М.: Ин-т радиоэлектроники АН СССР, 1987.— С. 116—120.
10. Литвинов Г. С., Довбешко Г. И., Струк В. И. Перераспределение интенсивностей полос инфракрасного поглощения простых биомолекул под воздействием электромагнитного излучения мм-диапазона // Фундам. и прикл. аспекты применения миллиметрового излучения: Тез. докл. I Всесоюз. симпоз. с междунар. участием.— Киев., 1989.— С. 35—37.
11. Сузи Г. Инфракрасные спектры биологических молекул и модельных соединений // Структура и стабильность биол. макромолекул в растворе.— М.: Мир, 1973.— С. 481—578.

12. Parker F. S. Application of infrared spectroscopy in biochemistry, biology and medicine.— New York: Plenum press, 1971.— 483 p.
13. Беллами Л. Инфракрасные спектры сложных молекул.— М.: Изд-во иностр. лит., 1965.— 590 с.
14. Pearson I. E., Slifkin M. A. The infrared spectra of amino acids and dipeptides // Spectrochim. acta.— 1972.— 28, N 12.— P. 2403—2413.
15. Suzuki S., Shimanouchi T., Tsuboi M. Normal vibrations of glycine and deuterated glycine molecules // Ibid.— 1963.— 19.— P. 1195—1208.
16. The infrared absorption spectrum of obhgen-1 labelled glycine / I. Lauticht, S. Pinchas, D. Samuel, I. Wasserman // J. Phys. Chem.— 1966.— 70, N 2.— P. 2719—2725.
17. Wang C. H., Storms R. D. Raman study of hydrogen bonding and long-wavelength lattice modes in an L-alanine single crystal // J. Chem. Phys.— 1971.— 55, N 10.— P. 5110—6119.
18. The temperature-dependence of the far infrared spectra of L-alanine / I. Bandekar, L. Genzel, F. Kremer, L. Santo // Spectrochim. acta.— 1983.— 39A, N 4.— P. 357—366.
19. Герцберг Г. Колебательные и вращательные спектры многоатомных молекул.— М.: Изд-во иностр. лит., 1949.— 647 с.
20. Амелькин С. В., Оравский А. Н. Многофотонное возбуждение колебаний молекул в электрическом поле // Труды физ. ин-та АН СССР.— 1988.— 187.— С. 178—201.
21. Таунс Ч., Шавлов А. Радноспектроскопия.— М.: Изд-во иностр. лит., 1959.— 756 с.

Врем. науч. коллектив «Отклик», Киев  
Ин-т полупроводников АН УССР, Киев

Получено 05.07.90

УДК 544.344

А. А. Серейская, И. В. Смирнова

#### ДЕЙСТВИЕ НАТИВНОГО ( $\alpha$ ) И МОДИФИЦИРОВАННОГО ( $\gamma$ ) ТРОМБИНОВ НА N-КОНЦЕВЫЕ ФРАГМЕНТЫ ФИБРИНОГЕНА БЫКА

*Сравнивается гидролиз N-концевых фрагментов фибриногена быка нативным  $\alpha$ -тромбином и его некоагулянтной  $\gamma$ -формой с нарушенным дополнительным центром узнавания высокомолекулярных субстратов. Обнаружено, что чувствительная к тромбину связь 19—20 фрагмента 1—54 A $\alpha$ -цепи фибриногена, изолированного или в составе N-концевого дисульфидного узла, гидролизует  $\alpha$ -тромбином намного эффективнее, чем  $\gamma$ -формой фермента. Разница между ними исчезает при отщеплении последовательности 37—54 с C-конца фрагмента, причем скорость гидролиза  $\alpha$ -тромбином снижается до уровня  $\gamma$ -формы. Эти результаты свидетельствуют о том, что: 1) в пределах последовательности 37—54 A $\alpha$ -цепи фибриногена быка находится участок «узнающий» дополнительный центр тромбина; 2) взаимодействие между ним и дополнительным центром приводит к усилению каталитического действия активного центра фермента.*

**Введение.** Тромбин (ТР) инициирует свертывание фибриногена (ФГ), отщепляя с N-концов его A $\alpha$ -цепей фибринопептиды А (ФПА). Затем в процессе свертывания ТР гидролизует еще несколько связей в N-концевых участках A $\alpha$ - и B $\beta$ -цепей фибриногена, но гораздо медленнее [1].

Характерной особенностью ТР является его способность сохранять каталитическую активность в отношении низкомолекулярных субстратов при резком снижении или полной потере ряда важных физиологических функций, в том числе и свертывающей. Такими свойствами обладают  $\beta$ ,  $\gamma$  и другие формы ТР, полученные из коагулянтного (свертывающего)  $\alpha$ -ТР путем определенных модификаций его структуры. Полагают, что у этих форм нарушен дополнительный центр (экзосайт) связывания — узнавания высокомолекулярных субстратов, отделенный от активного центра [2—4].

Разными авторами предпринимались попытки локализовать участок на ФГ, ответственный за связывание с дополнительным центром ТР. Для этого действие ТР на ФГ изучали по отщеплению ФПА при гидролизе пептидной связи во фрагментах ФГ различной длины. Результаты исследований привели к предположению о том, что участок специфического узнавания тромбина удален от расщепляемой связи и

© А. А. СЕРЕЙСКАЯ, И. В. СМИРНОВА, 1991