

МЕЖОТРАСЛЕВОЙ НАУЧНО-ИНЖЕНЕРНЫЙ ЦЕНТР ФИЗИКИ ЖИВОГО И
МИКРОВОЛНОВОЙ РЕЗОНАНСНОЙ ТЕРАПИИ "ВИДГУК"
ПРИ КАБИНЕТЕ МИНИСТРОВ УКРАИНЫ

На правах рукописи

ЛУКАШЕВСКИЙ Константин Валерьевич

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ МИЛЛИМЕТРОВЫХ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ВОЛН НА РЕГУЛЯЦИЮ
ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ НА МОДЕЛИ ИНДУКЦИИ ПРОФАГА λ В КЛЕТКАХ
ESCHERICHIA COLI

(03.00.02 - БИОФИЗИКА)

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

Киев - 1993

№ 27.02

Работа выполнена в Межотраслевом научно-инженерном центре физики живого и микроволновой резонансной терапии "Видгук".

Научные руководители: кандидат биологических наук
И. Я. Беляев,
доктор физико-математических наук,
профессор В. В. Самедов.


Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Д. А. Кутлахмедов,
доктор биологических наук,
профессор В. Л. Зима.

Ведущая организация: Объединенный институт ядерных исследований (г. Дубна).

Защита состоится " 19 " марта _____ 1993 г.
в _____ час. _____ мин. на заседании специализированного совета Д 173.01.01 МНИЦ "Видгук" в Межотраслевом научно-инженерном центре физики живого и микроволновой резонансной терапии "Видгук" по адресу: г. Киев, ул. Владимирская, 61-Б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МНИЦ "Видгук".

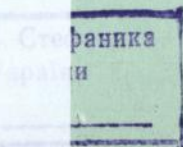
Автореферат разослан " 18 " февраля 1993 г.

Ученый секретарь специализированного совета,
кандидат физико-математических наук, доцент  Г. С. Литвинов.

ЛНБ України ім.В.Стефаника



00803313 (1)



ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В последние годы во всем мире растет интерес к изучению биологических эффектов низкоинтенсивных микроволн, что связано как с расширением их использования в технике и медицине, так и с возникновением теоретических представлений, связывающих устойчивость живых систем с передачей информации в миллиметровом диапазоне электромагнитных излучений (ЭМИД) (Sitko et al., 1988). Данная работа, посвященная исследованию регуляции генной экспрессии клеток под влиянием миллиметровых волн (ММВ) является частью исследований, ведущихся в рамках концепции физики живого (Ситко, 1989).

В настоящее время наиболее актуальным является вопрос о механизме действия ММВ на биообъекты различных уровней организации, приводящего к заметным эпигенетическим эффектам, то есть эффектам происходящим на уровне взаимодействия генов и их продуктов, но не связанных с изменением нуклеотидной последовательности ДНК (Томан, 1985). Имеется ряд данных, свидетельствующих о возможности экстраполяции явлений, происходящих при переключении генов в клетках бактерий на более высокие уровни организации живого (Ptashne M., 1986). Высокая чувствительность и хорошая изученность бактериальных индуцибельных систем, широкие возможности манипулирования экспериментальным материалом делают их наиболее подходящими объектами для изучения механизмов регуляции генной экспрессии. На двух наиболее исследованных системах бактерии *Escherichia coli*, индукции синтеза колицина (Смолянская и Виленская, 1973) и индукции профага λ (Webb, 1979) были получены острорезонансные эффекты действия низкоинтенсивных миллиметровых волн.

Отсутствие в настоящее время полной ясности в понимании механизма биоэффектов низкоинтенсивных ММВ придает большое значение исследованию микроволновой регуляции генной экспрессии, изменяющейся при различных заболеваниях и действии внешних физических и химических агентов (Ghering, 1989). Практически важно связать параметры сигнала, приводящего к включению и выключению различных групп генов, с параметрами биологической системы способной переводить клетку из

одного состояния в другое. Это возможно только при ясном понимании того, каким образом происходит выбор того или иного пути развития. На первых же этапах, направление исследований может подсказать изучение закономерностей влияния ЭМИ на поведение хорошо изученных систем, таких как две вышеназванные.

Поскольку для разрыва ковалентной связи в молекуле ДНК требуется энергия 2...5 эВ, прямое действие миллиметрового излучения с энергией кванта $10^{-4} \dots 10^{-3}$ эВ не может быть ДНК-повреждающим, что подтверждают и имеющиеся литературные данные. В таком случае, механизмы переключения генной активности под действием ДНК-повреждающих факторов и миллиметровых волн должны принципиально отличаться.

Наличие экспериментальных данных о резонансном поглощении микроволн молекулами ДНК *in vivo* (Webb and Booth, 1979) и *in vitro* (Swicord M. et al., 1983) и теоретических моделей, описывающих существование собственных колебаний белковых глобул в диапазоне частот $10^{10} \dots 10^{11}$ Гц (Frohlich, 1980) позволяют предположить взаимодействие ММВ с белок-нуклеиновыми комплексами, участвующими в регуляции генной экспрессии.

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы является экспериментальное исследование закономерностей индукции бактериофага λ в клетках *E. coli* под влиянием миллиметровых волн и анализ происходящих при этом процессов регуляции экспрессии генов профага.

В соответствии с данной целью были поставлены следующие конкретные задачи исследования: исследовать влияние миллиметровых волн на индукцию профага λ в лизогенных клетках *E. coli* K12 дикого типа на разных стадиях роста бактериальной культуры; исследовать индукцию профага λ под действием миллиметровых волн в клетках *E. coli* с мутациями в системе SOS-репарации (*recA* мутанты); провести сравнительный анализ действия микроволн и ультрафиолета на лизогенную индукцию в исследуемых штаммах; изучить частотные и мощностные зависимости действия ММВ на индукцию λ профага; оценить возможность теплового характера обнаруженных эффектов, для чего изучить зависимость лизогенной индукции от температуры; исследовать индукцию профага λ под влиянием низких концентраций бромистого этидия, как модельную систему для

оценки индуцибельного действия конформационных изменений ДНК.

Научная новизна работы. В настоящей работе впервые обнаружено резонансное действие ЭМИ в области 70.40 ГГц на индукцию профага λ в клетках *E. coli* N99гесА(λ), с заблокированной SOS-системой. Таким образом, показано отсутствие роли индуцибельной системы SOS-репарации в индукции профага λ под действием ММВ, что подтверждает гипотезу о влиянии данного фактора на динамический комплекс ДНК - λ репрессор, а также данные о немутагенном, ДНК-неповреждающем действии низкоинтенсивных миллиметровых волн. Впервые зарегистрировано динамическое увеличение и уменьшение спонтанного уровня индукции профага λ в стационарных клетках N99(λ) после облучения их на частоте 51.74 ГГц в условиях эффективного воздействия ММВ на конформационное состояние генома *E. coli*. Обнаружено изменение лизогенной индукции в клетках N99гесА(λ) под влиянием низких концентраций бромистого этидия, что свидетельствует о принципиальной возможности контроля переключения генов профага с помощью изменения конформации макромолекулярных комплексов.

Практическое значение работы. Выводы о закономерностях биологического действия ММВ, сделанные на основе экспериментальных данных, полученных на простейших, можно использовать как в медицинской практике, так и в экологии для нормирования воздействия ММВ на производстве и в быту.

Апробация работы. Результаты исследований докладывались на I Всесоюзном симпозиуме с международным участием "Фундаментальные и прикладные аспекты использования миллиметровых излучений в медицине" (Киев, 1989), I Всесоюзном симпозиуме с международным участием "Механизмы действия магнитных и электромагнитных полей на биосистемы различных уровней организации" (Ростов-на-Дону, 1989), X Международном биофизическом конгрессе (Ванкувер, Канада, 1990), VIII Балканских биохимических и биофизических днях (Клуш-Напока, Румыния, 1990), XIX Ассамблее URSI (Прага, ЧСФР, 1990), I Биофизическом и биотехнологическом конгрессе GAP (Диарбакир, Турция, 1991), I Конгрессе ЕВЕА (Брюссель, Бельгия, 1992).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 4 статьи и 17

тезисов научных докладов.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы включающего 102 наименования. Диссертация иллюстрирована 13 рисунками и содержит 19 таблиц. Полный объем диссертации - 80 страниц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Среды. Для выращивания бактерий в работе использовали богатые и минимальные среды. В качестве богатой среды использовали бульон или агаризованную среду Хоттингера (Тимаков, Гольдфарб, 1958). В качестве минимальной среды использовали жидкую или агаризованную среду Адамса с соответствующими добавками (Миллер, 1976). Для инкубации клеток перед облучением использовали обогащенную среду ВНВ (Brain Heart Infusion Broth, Difco).

Для выращивания фагов использовали бульон или агаризованную среду Лурья (L-бульон или L-среда) (на 1 л дистиллированной воды /г/: пептон - 15, дрожжевой экстракт - 5, NaCl - 5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 4; для L-среды агар -15).

Разведения препаратов бактерий и бактериофагов проводили в физрастворе (8.5г NaCl на 1л дистиллированной воды).

Бактериальные штаммы. Используемые в работе штаммы *Escherichia coli* K-12: C600, N99($F^-galKgalTstr^r$) (индикаторные) и SS447 = N99metBpurDsr1::Tn10recA получены из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ). Штаммы N99(λ) и N99recA(λ) были получены в ходе работы.

Штаммы бактериофагов. Умеренный бактериофаг λ , необходимый для лизогенизации штаммов, и бактериофаги λ ^{imm434} bio10 и λ vir для проверки бактерий на наличие recA мутации и лизогенность предоставлены ВКПМ.

Культивирование бактерий. Для большинства опытов клетки из ночной культуры разводили в необходимое количество раз и растили до середины логарифмической фазы в L-бульоне на качалке при температуре 37°C.

Концентрацию клеток в суспензии бактерий перед высевом опреде-

ляли умножением числа выросших на чашке Петри с агаризованной средой колоний (18 ч, 37°C) на значение разведения суспензии перед высевом.

Титр фага определяли на чашках с L-средой стандартным двуслойным методом Грация (Тимаков, Гольдфарб, 1958). В качестве верхнего слоя использовали жидкий агар (7 г агара на 1 л. дистиллированной воды) который перед заливкой на чашки поддерживали при температуре 45°C. На чашку Петри заливали 3 мл верхнего агара вместе с 0.1 мл индикаторного штамма и 0.1 мл суспензии фага после соответствующего разведения. Концентрацию фаговых частиц получали умножением подсчитанного числа негативных колоний (НК) (стерильных бляшек) на чашке на разведение фагов перед высевом.

Коэффициент индукции (K_1) профага определяли как отношение наблюдаемых НК при титровании свободного фага из облученной и необлученной культур бактерий через 16-18 часов инкубации при 37°C.

Техника облучения. Источником ММВ являлся генератор Г4-142. Образцы облучались рупорной пирамидальной антенной с сечением выходной апертуры 25x40 мм на расстоянии 60 мм от ее края. Средняя величина плотности потока мощно сти (ППМ) оценивалась исходя из измеренных значений интенсивности ЭМИ на выходе волноводного тракта и общей площади экспонированной поверхности в пределах телесного угла, образуемого стенками рупорной антенны. Локальная неоднородность ППМ в пределах облучаемой поверхности (10x10 мм), измеренная с помощью зонда на диоде Шоттке, составила $\pm 20\%$. Значение удельной поглощенной энергии (УПЭ), измерявшееся при помощи акустического метода (Полников и Путвинский, 1988) не превышало 4 мВт/г. Облучение проводили как в режиме свипирования в полосах по 200 МГц, так и на отдельных частотах с нестабильностью ± 5 МГц.

Облучение бактерий в логарифмической фазе роста. Эксперименты выполняли по методике, близкой к описанной Веббом, при этом особое внимание уделялось соблюдению требований, которые необходимы для микроволновой индукции профага λ в клетках *E. coli*. (Использование богатой среды, облучение экспоненциально растущих клеток, поддержание ростовых условий во время всего опыта и использование ППМ от 0.1 до 0.5 мВт/см²). В каждой серии экспериментов бактерии облучались на

одной и той же стадии развития культуры клеток. Облучение проводили на нитроцеллюлозных фильтрах фирмы Millipore с диаметром пор 0.4 мкм. Во время облучения фильтры с осажденными клетками находились в пластиковых чашках Петри на подкладках, смоченных L-средой. Следили, чтобы клетки во время облучения не подсыхали. При облучении контрольный образец, экранированный от воздействия ММВ, находился в идентичных условиях с опытным. После облучения фильтры с бактериями вместе с подкладками помещали в свежую питательную среду и инкубировали при 37 °С на качалке необходимое для созревания фаговых частиц время.

Модифицированная методика облучения синхронной культуры была использована с целью стабилизации параметров эксперимента и увеличения K_1 по сравнению со спонтанным уровнем. Синхронизация клеток со стационарной фазы роста проводилась по способу, описанному ранее (Webb, 1980). Отмытые в физиологическом растворе клетки последовательно выдерживали по 15 мин при 40 °С и 4 °С и после 30 минутной инкубации в свежей среде облучали 10 мин в стандартных условиях. При таком временном режиме по имеющимся данным (Webb, 1979) синхронная культура лизогенных бактерий наиболее подвержена действию изучаемого излучения. После облучения и 30 минутной инкубации клетки отделяли от свободного фага центрифугированием или фильтрованием через нитроцеллюлозные фильтры и инкубировали 15 мин в свежей среде для созревания индуцированных ММВ фаговых частиц.

Облучение стационарной культуры бактерий проводили в стеклянных чашках Петри в тонком слое ($h \sim 1$ мм) минимальной среды М9. Образцы облучались 10 мин при ППМ=0.1 мВт/см² (УПЭ=0.6 мВт/г). В каждом эксперименте клетки облучались на одной и той же стадии развития культуры клеток (начало стационарной фазы, при $OD_{550} = 1.1$). После обработки, бактерии помещали в физраствор на 60-70 мин, после чего переносили в L-среду или среду М9 с ростовыми добавками. Клетки инкубировали при 37 °С на качалке для созревания фаговых частиц. Через определенные промежутки времени из растущей культуры отбирали пробы для определения титра фага и концентрации клеток.

Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли

на ПЭВМ с помощью программных пакетов SUPERCALC, STATGRAPHICS и SURFER.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МИЛЛИМЕТРОВЫХ ВОЛН НА ЛИЗОГЕННЫЕ КЛЕТКИ *E. COLI* ДИКОГО ТИПА.

1.1. Исследование частотной зависимости микроволновой индукции профага в бактериях дикого типа

Для выяснения вопроса, о влиянии миллиметровых волн на индукцию профага λ в клетках *E. coli* K12 дикого типа, была исследована зависимость K_i от частоты низкоинтенсивного ЭМИ после облучения штамма N99(λ) ММВ в интервале частот от 70.0 до 70.8 ГГц. Эта область частот выбрана на основании данных Вебба, обнаружившего в этом диапазоне резонансную лизогенную индукцию с максимумом на частоте 70.4 ГГц (Webb, 1979). Изменение индукции было обнаружено в области частот от 70.3 до 70.6 ГГц при облучении клеток N99(λ) с ППМ 0.4 мВт/см². Частотная зависимость K_i в каждом отдельном эксперименте имела выраженный максимум, когда выход свободного фага увеличивался под действием миллиметровых волн в довольно узкой полосе, и заметно не отличался от спонтанного уровня на других частотах. Так как экспериментальные условия и диапазон частот совпадали с использованными Веббом, полученные в настоящей работе данные были аппроксимированы такими же, как у него колоколообразными кривыми с одним максимумом и полушириной около 50 МГц. График на рис.1 представляет результаты одной из трех серий опытов. В каждой серии индукция профага λ под влиянием микроволн регистрировалась в 4 последовательных экспериментах, выполненных в течение 4-5 недель. В каждом отдельном опыте исследовалась реакция бактерий, облученных на 4-6 частотах из интервала от 70.1 до 70.8 ГГц, причем пробы клеток до облучения на каждой частоте находились в одинаковых условиях.

Одновременно с индукцией профага определялась концентрация клеток в суспензии перед началом титрования фага. Это делалось для того, чтобы контролировать возможное влияние миллиметровых волн на скорость роста использованных клеток, так как темп деления лизогенных бактерий, по-видимому, может влиять на индукцию профага. В

результате обнаружили, что титр клеток после инкубации облученных бактерий в свежей среде не коррелировал с величиной K_i .

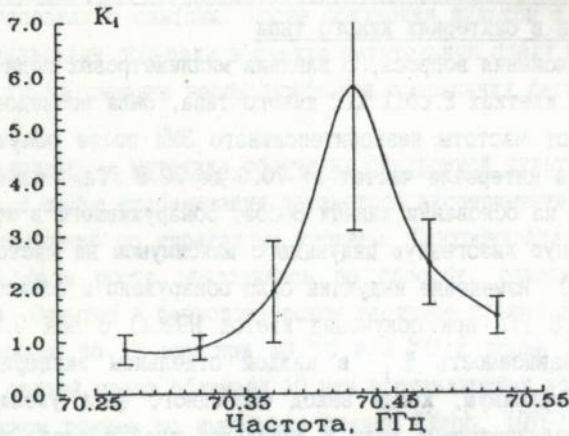


Рис. 1. Зависимость индукции профага λ в клетках *E.coli* от частоты ЭМИ (штамм - N99(λ); log-фаза роста; облучение: 30 мин, 0.4 мВт/см², среда-ВНВ, 37 °С)

Подавляющее большинство авторов, регистрировавших биологические эффекты низкоинтенсивных миллиметровых волн, отмечали резонансный характер взаимодействия данных ЭМИ с живыми системами (Залповская, 1970; Девятков, 1973; Grundler et al., 1977; Webb, 1979; Севастьянова и др., 1983). Эти данные побудили исследовать частотные распределения полученных экспериментальных значений K_i . Учитывая значительные погрешности определения K_i , а также известную нестабильность параметров индукции профага λ от опыта к опыту, целесообразно было решить вопрос о том являются ли обнаруженные в данной работе максимальные значения K_i статистически значимо отличающимися от значений K_i на других частотах.

Среднее значение максимального K_i в каждой экспериментальной серии определялось в процессе статистической обработки. При этом вычислялось среднее значение частоты ЭМИ, соответствующее максимуму и являющееся средним частотного распределения K_i . Было показано, что максимальный K_i на одной из частот в каждой серии опытов статистически значимо ($p < 0.05$) отличался от K_i на соседних с ней опытных частотах, как в сторону уменьшения, так и в сторону увеличения частоты. Таким образом установлено, что в каждой серии экспериментов миллиметровые волны частотозависимо индуцируют профаг λ в бактериях *E. coli* N99(λ) в области частот от 70.3 до 70.6 ГГц.

Частотозависимый характер влияния миллиметровых волн на лизогенную индукцию в *E. coli* позволяет предположить, что взаимодействие данной биосистемы с ЭМИ детерминируется какими-то резонаторами на субклеточном уровне, хотя возможно, что резонирующими структурами являются как сами клетки, так и клеточные популяции, в виде которых клетки участвуют в жизненно важных процессах (Шапиро, 1988). Именно на уровне клеточных ассоциаций с характерными размерами порядка миллиметров концепция физики живого рассматривает биоэффекты ММВ, как проявление фундаментальной роли микроволн в существовании живых систем (Ситько, 1989).

Можно предположить, что параметры ММВ, эффективно взаимодействующих с лизогенными бактериями, могут быть связаны с параметрами, определяющими конформационные изменения при внедрении ДНК профага в ДНК бактерии. Это предположение подтверждается данными об изменении частоты, резонансно влияющей на бактерии *E. coli* K12, при внедрении в хромосому клетки-хозяина одного или двух участков ДНК профага λ (Belyaev et al, 1993).

1.2. Изменение средней частоты частотной зависимости K_i во времени.

Средняя частота частотной зависимости $\langle f \rangle$ в каждом опыте определялась по формуле:

$$\langle f \rangle = \frac{\sum f_i \cdot K_i}{\sum K_i}$$

При анализе результатов экспериментов было обнаружено что $\langle f \rangle$ изменяется от серии опытов к серии, и даже внутри каждой серии экспериментов. Так значение $\langle f \rangle$, определенное в первой серии экспериментов статистически значимо ($p < 0.05$) отличалась от средней $\langle f \rangle$ второй серии опытов, а $\langle f \rangle$ второй серии от $\langle f \rangle$ третьей ($p < 0.005$). Поэтому была сделана попытка исследовать зависимость $\langle f \rangle$ от календарного времени проведения эксперимента. При проведении корреляционного анализа совокупности данных всех экспериментов выяснилось, что исследуемая зависимость (рис. 2) хорошо описывается ($p < 0.001$) функцией:

$$\langle f \rangle = (70.309 \pm 0.015) + (0.00147 \pm 0.00017)t,$$

где t - время в днях, начиная со дня первого эксперимента. Таким образом, из полученных данных следует, что значение $\langle f \rangle$ слабо изменяется во времени. Можно предположить, что частотное распределение K_i зависит от неконтролируемых внешних факторов геофизической природы. Подобные особенности биологического действия ЭМИ, по-видимому, могут быть одной из причин широко дискутируемой в литературе (Gandhy, 1986; Leal et al., 1988-1989; Ситько, 1989) невоспроизводимости биоэффектов слабых электромагнитных полей.

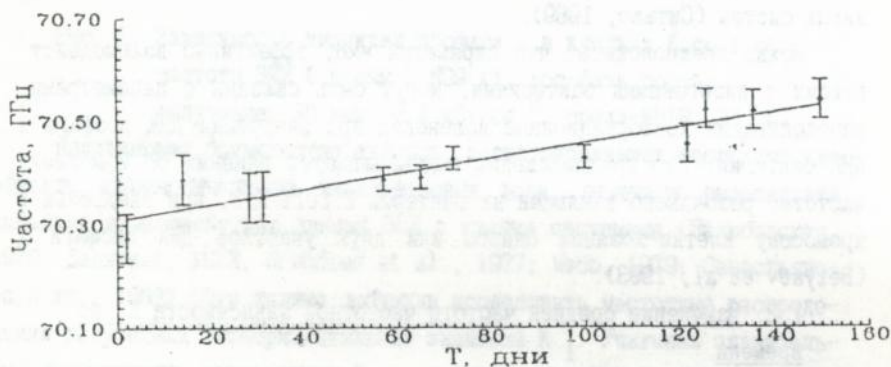


Рис. 2. Зависимость $\langle f \rangle$ микроволновой индукции профага λ в клетках *E. coli* N99(λ) от времени проведения эксперимента (2 июня - 27 октября 1988 г.).

1.3. Исследование индукции профага в условиях воздействия, эффективно влияющего на конформационное состояние генома

Имеются литературные данные о влиянии ММВ на конформационное состояние генома *E.coli* K12 в двух интервалах миллиметровых волн (Belyaev et al., 1992). Так, в области 51.76 ГГц было обнаружено отличие частот резонансного влияния ММВ на бактерии, содержащие и не содержащие профаг λ (Belyaev et al., 1993). Лизогенные клетки при этом реагировали резонансно на воздействие ЭМИ с частотой 51.74 ГГц в соответствии с предложенной физической моделью. Эти данные побудили провести исследование индукции профага в условиях воздействия, изменяющего конформационное состояние генома в клетках N99(λ).

При исследовании влияния ЭМИ с частотой 51.74 на индукцию профага λ на стационарной стадии развития бактериальной культуры было проведено 3 эксперимента, в каждом из которых зарегистрированы статистически значимые отклонения уровня спонтанной индукции профага от контрольного уровня. Динамика лизогенной индукции при инкубации бактерий в течение 2 часов имеет общую тенденцию для всех экспериментов возрастая на первой фазе инкубации (до 40 минут) и уменьшаться в дальнейшем (60-90 минут). Обычно клетки инкубировались в богатой L-среде, кроме одного эксперимента, когда использовалась среда M9, обогащенная ростовыми добавками. В этом случае динамика созревания фаговых частиц после микроволнового облучения не отличалась существенно от наблюдаемой в других опытах.

2. ВЛИЯНИЕ ММВ НА ГЕННУЮ ЭКСПРЕССИЮ ПРОФАГА λ В КЛЕТКАХ *E. COLI* С ЗАБЛОКИРОВАННОЙ СИСТЕМОЙ SOS-РЕПАРАЦИИ

2.1. Влияние микроволн на индукцию профага в геса мутантном штамме *E. coli*

Эксперименты по изучению воздействия миллиметровых волн на бактерии N99геса(λ) проводили с использованием модифицированной методики облучения синхронной культуры клеток. В предварительных экспериментах исследовалось действие миллиметровых волн в 5 полосах по 200 МГц из интервала с 70.05 до 71.05 ГГц, при этом частота ЭМИ свипировалась с частотой 1 Гц. В результате серии опытов была выявлена тенденция увеличения индукции профага λ в полосе от 70.25 до 70.40 ГГц.

В среднем, K_i в этой области частот увеличивался в 12 раз. Полученные данные позволили нам выбрать частотный диапазон исследования лизогенной индукции в гесА мутантах. На отдельных частотах влияние ЭМИ изучалось в серии экспериментов, выполненных в достаточно узком промежутке времени (2 недели). В каждом из опытов действие микроволн исследовалось на 3-5 частотах, причем каждый облученный образец сравнивался с соответствующим контрольным, который во время экспериментальной процедуры находился в идентичных условиях, но был экранирован от действия микроволн. Выход свободных фаговых частиц определялся по стандартному методу, а каждая проба при титровании высевалась на 3 чашки Петри с L-агаром.

По данным серии, состоящей из трех экспериментов, были зарегистрированы уровни индукции профага λ , на 2-3 порядка превышающие уровень спонтанной индукции в области частот от 70.2 до 70.6 ГГц (рис. 3). Максимальное значение K_i составило $1.2 \cdot 10^3$ при $\langle f \rangle = 70.39$ ГГц и значение статистически значимо ($p < 0.002$) отличалось от K_i на других частотах, использованных в эксперименте.

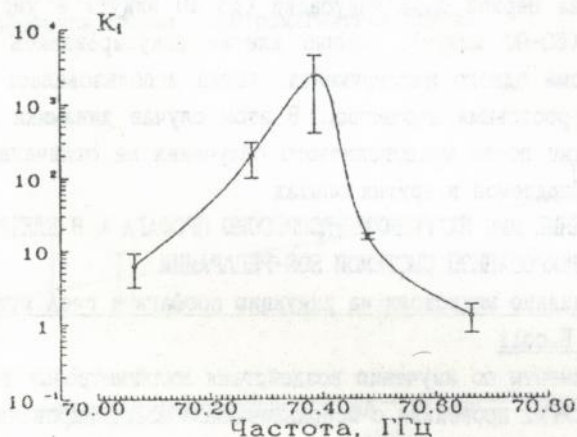


Рис. 3. Зависимость индукции профага λ в клетках *E. coli* от частоты ЭМИ (штамм - N99гесА(λ); log-фаза роста; облучение: 30 мин, 0.4 мВт/см², L-среда, 37 °C).

Известно, что в использованном в настоящей работе *гесА* мутанте уровень спонтанной индукции профага существенно (по крайней мере на 2 порядка) ниже чем в диком лизогенном штамме. Этим объясняется разница в K_i , полученных в резонансных условиях для *гесА* мутантов и штаммов *E. coli* K12 дикого типа. По проведенным в настоящей работе оценкам, доля клеток, в которых ЭМИ индуцировало переключение генной активности профага в *гесА*-мутантах с лизогенного на литический путь развития, не изменилась по сравнению с нормальными клетками и составила около 0.01% популяции облученных бактерий.

2.2. Оценка участия SOS-системы бактерий в лизогенной индукции под влиянием миллиметровых волн

Обнаруженный эффект резонансного увеличения индукции профага в клетках *E. coli* K12 с мутацией в гене *гесА* имеет существенное значение для понимания роли миллиметровых волн в регуляции генной экспрессии. Дело в том, что продукт бактериального гена *гесА* многофункциональный белок *RecA* выполняет исключительно важную роль в процессе переключения генов профага с лизогенного на литический путь развития после действия на систему ДНК-повреждающих физических или химических факторов окружающей среды (SOS-ответ бактерии) (Walker, 1984). Этот белок при появлении в клетке поврежденной ДНК (ее однонитевых участков) активируется, приобретает протеолитическую активность (Roberts et al, 1977), и разрезает белки репрессоров SOS-генов *E. coli* и похожий на них λ -репрессор, продукт гена *cI*. После инактивации большей части молекул *cI*-репрессора (около 90%) (Bailone et al, 1979) освобождается занимаемый ими в динамическом равновесии операторный участок O_R регуляторной области фаговой ДНК. Клеточный белок РНК-полимераза при этом получает доступ к промотору P_R , с которого начинается транскрипция молчавших ранее генов профага λ , что приводит к его индукции и последующему лизису клетки-хозяина (Ptashne, 1986). Таким образом, белок *RecA* играет ключевую роль в работе SOS-системы, запускающей индукцию профага λ при генотоксичных воздействиях.

В использованном нами бактериальном мутанте этот механизм заблокирован, так как белок *RecA* в нем дефектный. В данной работе установлено, что при действии ультрафиолета на штамм N99*гесА*(λ) в

дозах, которые вызывают в диком штамме индукцию профага, в 20-40 раз превышающую спонтанный уровень, не регистрировалось увеличение выхода фаговых частиц по сравнению с необлученным контролем. Следовательно, если бы микроволновая индукция профага шла по тому же механизму, что и под действием ДНК-тропных агентов, ее не удалось бы обнаружить в использованных мутантах. Таким образом, в настоящей работе показано, что принципиальной особенностью специфического действия миллиметровых волн на экспрессию генов профага является то, что ключевая функция индуцибельной системы SOS-репарации бактерий, осуществляемая взаимодействием *RecA* белка с *CI*-репрессором не реализуется в резонансной микроволновой индукции профага λ в клетках *E. coli* K12.

При исследовании индукции профага λ под влиянием низких концентраций бромистого этидия (*EtBr*) в *recA* мутантных лизогенах в данной работе обнаружено, что концентрации *EtBr* в области 30-50 мкг/мл статистически значимо могут увеличивать и уменьшать спонтанный уровень выхода свободного фага. Известно, что механизм биологического действия *EtBr* связан с внедрением данного интерколятора в двойную спираль молекулы ДНК, изменяющим ее конформацию. Следовательно, полученные данные свидетельствуют о принципиальной возможности механизма переключения генов профага при изменении конформации макромолекулярных комплексов. Таким образом, можно предположить, что изменение конформации участка ДНК, участвующего в образовании комплекса с λ репрессором может приводить к изменению уровня спонтанной индукции профага λ . Имеются также литературные данные (Susskind and Botstein, 1975) о возможности изменения индукции профага в *recA* мутантах под влиянием антирепрессора - белка вырабатываемого фагом P22, который обратимо воздействует на конформацию комплекса ДНК - *CI*-репрессор. Эти данные указывают на возможность переключения генов фага λ при конформационных изменениях вышеназванного комплекса.

Так как триггерное переключение генов профага с лизогенного на литическое развитие может произойти только через изменение функционирования комплекса ДНК - λ -репрессор, полученные в настоящей работе результаты означают, что миллиметровые волны действуют на комплекс

ДНК - СІ-репрессор таким образом, что в части клеток изменения в конформации комплекса или динамике взаимодействия его компонентов приводят к снятию репрессии. Эффективность индукции профага будет определяться резонансным влиянием ЭМИ либо на конформацию промоторного участка, что изменит динамику посадки репрессора, либо на конформацию всего комплекса ДНК с белком репрессора. В любом случае генная активность будет переключена в условиях эффективного взаимодействия с ЭМИ только в тех клетках, которые содержат критическое количество молекул репрессора, минимально необходимое для поддержания состояния лизогении (около 10% от среднего). В таких клетках к переходу профага на литический путь может привести изменение времени жизни динамического комплекса ДНК с репрессорными димерами. Полученные следствия предлагаемого механизма нашли подтверждение в проведенных экспериментах, поскольку по сделанным в настоящей работе оценкам во всех исследованных штаммах лизогенная индукция происходила в небольшой (около 0.01%) доле клеток, сравнимой с частью бактерий, содержащих критическое количество репрессора.

3. НЕТЕПЛОВОЙ ХАРАКТЕР ДЕЙСТВИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНЫХ МИКРОВОЛН НА ИНДУКЦИЮ ПРОФАГА λ В КЛЕТКАХ *E. COLI*

3.1. Изучение мощностной зависимости индукции профага

В связи с описанной выше нестабильностью $\langle f \rangle$, для получения экспериментальных данных при воспроизводимом эффекте, облучение клеток N99(λ) проводили в полосе наиболее активно действующих частот от 70.3 до 70.6 ГГц. В каждом из 5 опытов исследовалось действие микроволн с 4-5 различными ППМ, которые варьировали в пределах от 0.05 до 0.5 мВт/см². Все данные, полученные в пяти экспериментах обрабатывали совместно. На рис. 4 представлен график кривой, полученной при регрессионном анализе, где показано ($p < 0.05$), что экспериментальная зависимость K_i от ППМ аппроксимируется функцией:

$$K_i = 3.30549(P)^{0.1799}$$

где P - ППМ миллиметровых ЭМИ в мВт/см². Полученные результаты подтверждают литературные данные по профагу λ (Webb, 1979) и не противоречат выводам других авторов (Смолянская и Виленская, 1973; Севастьянова, 1981; Belyaev et al, 1992) о существовании довольно широкой

области мощностей низкоинтенсивных миллиметровых волн, где величины биоэффектов не изменяются существенно при возрастании ППМ.

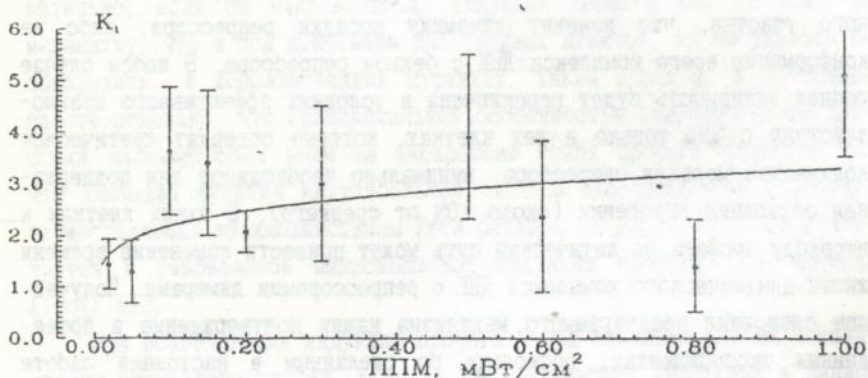


Рис. 4. Зависимость индукции профага λ в клетках *E. coli* от ППМ ЭМИ (штамм - N99(λ); log-фаза роста; облучение: 30 мин свипирование 70.3-70.5 ГГц, $f_{св}$ =1Гц, L-среда, 37 °С).

3.2. Исследование влияния температуры на индукцию профага

Несмотря на то, что энергия кванта излучения с используемыми в работе параметрами довольно мала по сравнению с kT , определяющей тепловые процессы, происходящие в бактериальной клетке, а разогрев образцов во время облучения был несущественным ($<1^{\circ}C$) и теоретически не мог повлиять на переключение экспрессии генов профага, было исследовано влияние повышения температуры на индукцию профага в исследуемых штаммах бактерий. Экспериментальные культуры N99(λ) и N99recA(λ) подвергались 30 минутной инкубации в водяной бане как в жидкой L-среде, так и на нитроцеллюлозных фильтрах в тех же условиях, что и в опытах по их облучению. Контрольные клетки инкубировались в идентичных условиях но при температуре 37 °С. Температурная зависимость исследовалась с шагом 0.5-1 °С в области температур от 37 до 42 °С. Полученные данные обрабатывались статистически, при этом не было обнаружено значимых отклонений K_1 от единицы при влиянии какой-либо температуры, как для клеток дикого типа (рис. 5), так

и для *gcsA* мутантов (рис.6). Также не удалось аппроксимировать экспериментальные данные монотонно изменяющейся зависимостью при значимом коэффициенте корреляции. Таким образом, полученные результаты можно интерпретировать как доказательство нетеплового характера изучаемых эффектов.

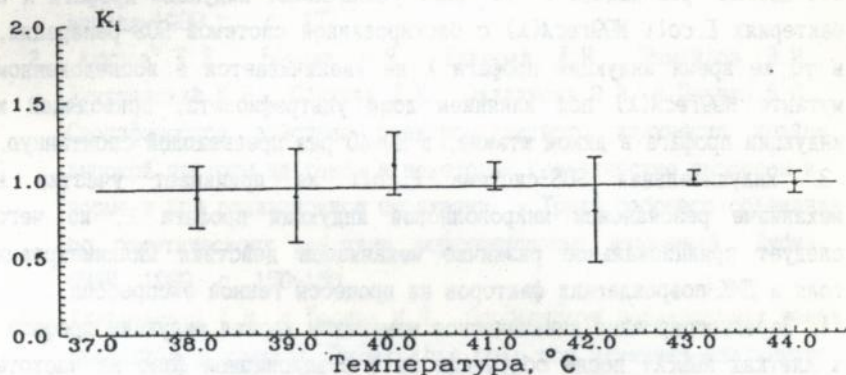


Рис. 5. Зависимость индукции профага λ в клетках *E.coli* от температуры (штамм - N99(λ); инкубация: 30 мин, L-среда).

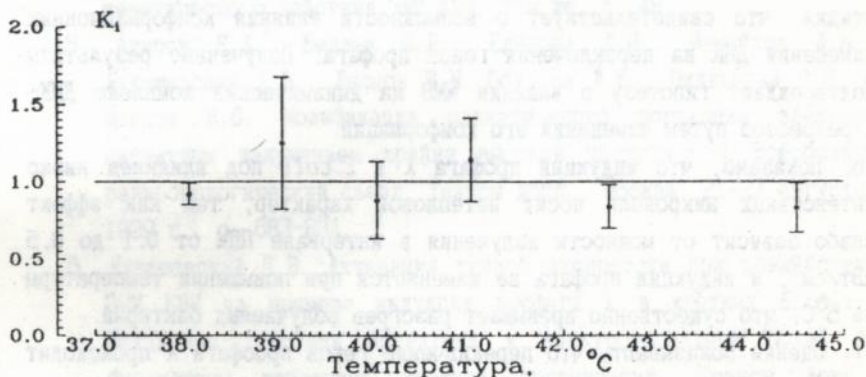


Рис. 6. Зависимость индукции профага λ в клетках *E.coli* от температуры (штамм N99gcsA(λ); инкубация: 30 мин, L-среда).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Низкоинтенсивные миллиметровые волны в интервале 70.3-70.6 ГГц индуцируют экспрессию генов профага λ в клетках *E. coli* K12 N99(λ), что приводит к заметному (~5 раз) увеличению выхода свободного фага.
2. Миллиметровые электромагнитные волны в области 70.4 ГГц с ППМ ~ 0.4 мВт/см² резонансно (~ 10³ раз) увеличивает индукцию профага λ в бактериях *E. coli* N99recA(λ) с заблокированной системой SOS-репарации, в то же время индукция профага λ не увеличивается в исследованном мутанте N99recA(λ) под влиянием дозы ультрафиолета, приводящей к индукции профага в диком штамме, в 20-40 раз превышающей спонтанную.
3. Индуцибельная SOS-система *E. coli* не принимает участия в механизме резонансной микроволновой индукции профага λ , из чего следует принципиальное различие механизмов действия миллиметровых волн и ДНК-повреждающих факторов на процессы генной экспрессии.
4. Зарегистрировано динамическое изменение уровня индукции профага λ в клетках N99(λ) после облучения их в стационарной фазе на частоте 51.74 ГГц в условиях, обеспечивающих эффективное влияние на конформационное состояние генома.
5. В бактериальном штамме N99recA(λ) индукция профага λ меняется в несколько (~ 3 раз) под действием низких концентраций бромистого этидия, что свидетельствует о возможности влияния конформационных изменений ДНК на переключения генов профага. Полученные результаты подтверждают гипотезу о влиянии ММВ на динамический комплекс ДНК- λ -репрессор путем изменения его конформации.
6. Показано, что индукция профага λ в *E. coli* под влиянием низкоинтенсивных микроволн носит нетепловой характер, так как эффект слабо зависит от мощности излучения в интервале ППМ от 0.1 до 0.5 мВт/см², и индукция профага не изменяется при повышении температуры на 5°C, что существенно превышает разогрев облучаемых бактерий.
7. Оценки показывают, что переключение генов профага λ происходит примерно в 0.01 % облученных миллиметровыми волнами бактерий, что позволяет объяснить результаты по микроволновой индукции профага λ в клетках *E. coli* воздействием ЭМИ на взаимодействие ДНК - CI-белок в клетках, содержащих критическое количество молекул репрессора.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Алипов Е. Д., Беляев И. Я., Лукашевский К. В., Лысцов В. Н. и Щеглов В. С. Влияние электромагнитного излучения крайне высокой частоты на геном *E. coli* в норме и при рентгеновском облучении. - VII Всесоюзное совещание по микродозиметрии, Канев, 14-15 апреля 1989 г., с. 177.
2. Алипов Е. Д., Беляев И. Я., Еднерал Д. И., Измайлов Д. М., Лукашевский К. В., Обухова Л. К., Окладнова О. В. и Щеглов В. С., Специфическое действие электромагнитного излучения крайне высокой частоты на геном и некоторые генетические процессы в норме и при радиационном поражении. - Труды рабочего совещания по генетическому действию корпускулярных излучений. Дубна, ОИЯИ, 1989, с. 150-160.
3. Лукашевский К. В. и Беляев И. Я., Особенности переключения генов профага λ в клетках *Escherichia coli* под влиянием миллиметровых волн. - Фундаментальные и прикладные аспекты использования миллиметровых излучений в медицине. Тезисы докл., Киев, 1989, с. 81.
4. Беляев И. Я., Лукашевский К. В. и Еднерал Д. И. Два аспекта генетического действия ЭМИ КВЧ. Там же, с. 48.
5. Алипов Е. Д., Беляев И. Я., Еднерал Д. И., Измайлов Д. Н., Лукашевский К. В., Лысцов В. Н., Обухова Л. К., Окладнова О. В. и Щеглов В. С. Модификация радиационного поражения электромагнитным излучением крайне высокой частоты. - I Всесоюзный радиобиологический съезд. Тезисы докл., Москва, 21-27 августа 1989 г., с. 683-884.
6. Лукашевский К. В. Активация генной экспрессии при воздействии ЭМИ КВЧ на примере индукции профага λ в клетках *E. coli*. - Механизмы действия магнитных и электромагнитных полей на биосистемы различных уровней организации. Тезисы докл., Ростов-на-Дону, 1989, с. 259-261.
7. Беляев И. Я. и Лукашевский К. В. Системный отклик биологических

объектов: два аспекта генетического действия ЭМИ КВЧ. - Первый болгаро-советский симпозиум по магнитобиологии и магнитотерапии София, 29 сентября-2 октября 1989 г., с. 14.

8. Алипов Е.Д., Беляев И.Я., Еднерал Д.И., Измайлов Д.М., Лукашевский К.В., Лысов В.Н., Обухова Л.К., Окладнова О.В. и Шеглов В.С. Генетическое действие электромагнитного излучения крайне высокой частоты в норме и при комбинации с ионизирующими излучениями. - Эколого-генетические последствия воздействия на окружающую среду антропогенных факторов. Сыктывкар, 1989 г., с. 36-37.
9. Lukashevsky K.V. and Belyaev I.Ya. Possible Role of DNA-protein Interactions in Millimeter EMR Action on the Gene Expression. - X International Biophysics Congress, Vancouver, Canada, 3-7 July 1990, p. 550.
10. Belyaev I.Ya., Alipov Ye.D., Shcheglov V.S., Lukashevsky K.V., Lystsov V.N.. The role of genome and its different states in the formation of systemic response of cells to the millimeter waves resonance effect. - Ibid, p. 549.
11. Lukashevsky K.V., Belyaev I.Ya. Induction of Lambda Prophage in the Cells of E. coli by the Millimeter waves.-(Ugarov B.N. -ed.), Otklik, Vidguk, Kiev, 1990, pp. 147-157.
12. Belyaev I.Ya., Lukashevsky K.V. Two Aspects of Genetic Effect of the EHF Electromagnetic Irradiation.-Ibid., pp. 125-135.
13. Lukashevsky K.V. and Belyaev I.Ya. Resonance Regulation of Gene Expression in Lysogenic Cells of Escherichia Coli of Wild Type and in Mutants with Blocked System of SOS-reparation under the Effect of Low-intensity Millimeter Waves. - 8th Balcan Biochemical and Biophysical Days, Cluj-Napoca, Romania, 10-14 Sept., 1990, pp. 238-239.
14. Belyaev I.Ya., Alipov Ye.D., Lukashevsky K.V., Shcheglov V.S., Yedneral D.I., and Lystsov V.N.. The role of genome and its different states in the formation of systemic response of cells to the millimeter waves resonant effect.-Ibid, pp. 223 - 224.

15. Lukashevsky K.V. and Belyaev I.Ya. Possible Role of DNA-Protein Interaction in Millimeter Waves Action of the Gene Expression. - Bioelectromagnetic Symposium (BEMS), XXIII General Assembly of the International Union of Radio Science (URSI), Prague, Czechoslovakia, 28 Aug.-5 Sept., 1990, p. 20.
16. Lukashevsky K.V. and Belyaev I.Ya. Switching of Prophage Lambda Genes in *Esherichia coli* by Millimeter Waves. - Medical Science Research, 1990, 18, pp. 955-957.
17. Lukashevsky K.V. and Belyaev I.Ya. Investigation of gene activation mechanism under the low-intensity millimeter waves action, - The First Arab Conference on Medical Biophysics Cairo Univ., 15-17 Jan., 1991, p. 25.
18. Belyaev I.Ya., Alipov Ye.D., Shcheglov V.S., Lukashevsky K.V., and Lystsov V.N.. The formation of systemic response in the *E.coli* cells through discrete transition between conformational genome states under low-intensive influence of millimeter waves. - Ibid, p. 21.
19. Lukashevsky K.V. and Belyaev I.Ya. Investigation of gene activation mechanism under the low-intensity millimeter waves action. - The 1st International Biophysics Congress and Biotechnology at GAP, Dicle University, 13-15 May 1991, Diyarbakir, Turkey, p. 32.
20. Belyaev I.Ya., Alipov Ye.D., Shcheglov V.S., Lukashevsky K.V., and Lystsov V.N.. The formation of systemic response in the *E.coli* cells through discrete transition between conformational genome states affected by low-intensity millimeter waves. - Ibid, p. 36.
21. Lukashevsky K.V. and Belyaev I.Ya. Millimeter Waves not only Induce but Reduce Spontaneous Induction of Prophage λ in *E.coli*. In: Transactions of the first congress of The European Bioelectromagnetic Association, Brussels, Belgium, 23-25 January, 1992, p. 43.



465608

Ab 27.021
AB 27.021

Премстройбанк Зак 61 Тър 100 4, 2 83