

УДК 576.612.014.426

ОСОБЕННОСТИ СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ МИКРОВОЛН ЧАСТОТНОГО ДИАПАЗОНА 51–52 ГГц НА КЛЕТКИ *E. coli*© 2006 г. В. Л. Ушаков^{1*}, Е. Д. Алипов¹, В. С. Щеглов¹, И. Я. Беляев^{2,3}¹Московский инженерно-физический институт (государственный университет), Москва, Россия²Институт общей физики РАН, Москва, Россия³Стокгольмский университет, Стокгольм, Швеция

С помощью метода аномальной временной зависимости вязкости (АВЗВ) было исследовано действие низкоинтенсивных миллиметровых волн (ММВ) на изменение конформации нуклеоидов в клетках, *E. coli* в диапазоне частот 51–52 ГГц при плотности потока энергии (ППЭ) 100 мкВт/см². Линейно-поляризованные ММВ вызывали частотно-зависимые изменения в конформации нуклеоидов. Эффекты наблюдались в частотных окнах резонансного типа. Расстояния между близлежащими частотными окнами в спектре действия ММВ составили 55–180 МГц. ММВ только одной из двух возможных циркулярных поляризаций, правой или левой, были эффективны в каждом частотном окне спектра их действия. Знак эффективной циркулярной поляризации различался между частотными окнами. Показано, что регистрируемые методом АВЗВ эффекты ММВ не связаны с адгезией клеток к поверхности чашек Петри и не связаны с тепловым действием ММВ. Для частоты 51.575 ГГц определена полуширина резонанса. Она равна 120 ± 20 МГц, что близко к значению полуширины соседнего, ранее обнаруженного, резонанса на частоте 51.755 ГГц при этой же ППЭ. Полученные результаты свидетельствуют об однотипности мишени действия ММВ для этих двух частот.

Миллиметровые волны, спектр действия, циркулярная поляризация.

Проведенные ранее исследования выявили двоякий характер биологического действия электромагнитных полей (ЭМП) и излучений (ЭМИ): с одной стороны, обнаружено их лечебное действие, применяемое сейчас в клинике на основе микроволновой резонансной терапии [1–4], с другой стороны, есть многочисленные данные о патогенном действии [5–13], в основном, в радиочастотном диапазоне [14–17] низкочастотных ЭМП [18–19], включая промышленные частоты [20–21], что требует совершенствования их гигиенического нормирования [22].

Особый интерес с этой точки зрения представляет диапазон микроволнового излучения с длиной волн в вакууме 1–10 мм и с энергией квантов около 10^{-4} – 10^{-3} эВ, что меньше не только энергии таких слабых взаимодействий как водородная связь (10^{-2} – 10^{-1} эВ), но и энергии теплового движения ($kT \sim 10^{-2}$ эВ). Взаимодействие миллиметровых волн (ММВ) нетепловой интенсивности с биообъектами различных уровней организации носит частотнозависимый характер резонансного типа, а сами наблюдаемые эффекты разнообразны по своему проявлению [3, 23, 24, 25]: изменение скорости клеточного роста и транскрипции, синтеза ДНК и белков, проницаемости клеточ-

ных мембран. Величина эффекта резонансно зависела от частоты излучения с уровнем добротности 10^3 – 10^4 , плотности потока энергии (ППЭ) (зависимость эффекта от ППЭ часто имеет пороговый характер с выходом на плато при увеличении мощности), поляризации электромагнитной волны, геометрии облучения и ряда других параметров [23–56]. Биологические эффекты ММВ наблюдаются при интенсивностях излучения меньшей тепловой интенсивности на 6–8 порядков [40]. Из этого факта делается вывод о квантово-механическом характере эффектов ММВ [37, 57]. Мембрана, мембранные белково-липидные комплексы, свободная вода, системы белок-ион и ДНК рассматривались в качестве мишеней действия ММВ [2, 27, 40, 58–69]. В пользу той или иной гипотезы имеются экспериментальные данные, но до сегодняшнего дня остались невыясненными многие фундаментальные вопросы, связанные с причинами и механизмами формирования биологических откликов на действие ММВ.

Анализ экспериментальных работ [3, 24, 46–50, 55, 70, 71] показал, что на момент начала данного исследования не было достаточно полного определения спектра биологически эффективных частот ММВ, являющегося важным для создания физической модели. Кроме того, была выяснена зависимость эффектов ММВ от поляриза-

* Адресат для корреспонденции: 115409 Москва, Каширское ш., 31, МИФИ, каф. 1; тел.: (095) 323-92-24; факс: (095) 324-21-11; e-mail: VLushakov@mephi.ru.

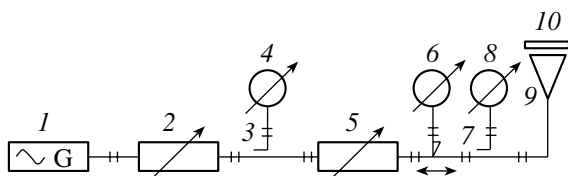


Рис. 1. Блок-диаграмма установки для облучения клеточной суспензии миллиметровым излучением: 1 – генератор излучения миллиметрового диапазона Г4-141; 2, 5 – полосковые аттенюаторы; 3, 7 – направленные ответвители; 4 – частотомер; 6 – измеритель $K_{СВН}$; 8 – измеритель мощности; 9 – пирамидальный рупор; 10 – клеточная суспензия в чашках Петри.

ции [23, 30–33], однако оставался вопрос о распределении эффективных частот по знаку эффективной циркулярной поляризации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Клетки. В работе использовался штамм *E. coli* K12: *AB1157 F⁻ thr-1 ara-14 leu-B6 proA2 lacG1 tsx-33 supE44 galK2 hisG4 rfbD1 mgl-51 rpsL31 xyl-5 mtl-1 argE3 thi-1 λ-rac⁻*. Штамм *E. coli* K12 AB1157 получен от О.А. Айзенберг (Институт биофизики РАН, Москва). Культура клеток *E. coli* хранилась на питательном агаре Hottinger при 4°C в течение 1–14 сут. Клетки культивировались при 33°C, без аэрации в питательной LB-среде: 15.5 г/л Luria Broth Base, Miller (“Sigma”, USA, Lot-1900) + 9.5 г/л NaCl. Через 18–20 ч после начала роста бактериальная культура достигала оптической плотности $OD = 0.95–1.05$ (550 нм), что соответствует ранней стационарной фазе роста бактериальной культуры. Оптическая плотность клеточной суспензии определялась на спектрофотометре СФ-26 (ЛОМО, Россия) на длине волны 550 нм. Клетки были осаждены центрифугированием (7600 g, 10 мин) и ресуспендированы в буфере М9 (KH_2PO_4 – 3 г/л, NH_4Cl – 0.2 г/л, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ – 15 г/л, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 2 г/л, NaCl – 0.5 г/л, pH = 7.1) до требуемых концентраций. Клетки выдерживали 30–60 мин в буфере М9 до начала эксперимента при комнатной температуре 20°C.

Лизис клеток. По 1 мл клеточной суспензии помещали в полиалломерные пробирки (“Beckman”, USA), которые использовали в качестве сменных статоров ротационного вискозиметра. Клетки лизировали добавлением в каждую пробирку 0.3 мл раствора лизоцима (“Sigma”, USA, L-6876, 1.5 мг/мл), 1 мл раствора саркозила (“Serva”, Germany, 2%), 0.7 мл раствора папаин-глицерина (“Merck”, Germany, 7144, 3 мг/мл – 10%) с 15 мин интервалами между добавлением каждого реагента. Все растворы были приготовлены в буфере: 0.25 моль/л Na_2EDTA , 0.01 моль/л Трис, pH = 7.1. Лизаты до начала измерений кривых АВЗВ выдерживали в темноте 40–44 ч при 33°C.

Облучение линейно-поляризованными миллиметровыми волнами в диапазоне 51–52 ГГц. Приготовленную в буфере М9 клеточную суспензию ($OD_{550} = 0.12$, что соответствовало в среднем 4×10^7 кл/мл) разливали по 3.5 (4.5) мл в отдельные чашки Петри с диаметром 50 мм. Блок-диаграмма установки для облучения ММВ клеточной суспензии показана на рис. 1. В качестве источника излучения ММВ был использован генератор Г4-141, имеющий девиацию частоты выходного сигнала не более 1 МГц. Три полосковых аттенюатора, каждый из которых мог уменьшить интенсивность в волноводе на 40–50 дБ, были встроены в волноводную систему, имеющую длину 80 см, для получения требуемой мощности излучения. Аттенюаторы были откалиброваны на используемых частотах в мощностном диапазоне от 10^{-7} до 10^{-2} Вт при помощи ваттметра МЗ-22А. Частота излучения контролировалась с точностью ± 1 МГц с помощью частотомера ЧЗ-54 и преобразователя ЯЗЧ-72. Коэффициент стоячей волны по напряжению ($K_{СВН}$) определялся с помощью измерительной линии Р1-39 и измерителя отношений напряжений В8-7 и не превышал 1.4. Облучение суспензии клеток (толщина поглощающего слоя 1.7 мм) производилось 10 мин, в чашках Петри диаметром 50 мм² при помощи пирамидального рупора, имеющего размеры 40 × 50 мм². Образцы защищали от отраженных миллиметровых волн углеродсодержащим и алюминиевым экранами. В ложном облучении суспензия клеток облучалась 10 мин при нормальном режиме работы генератора на частоте 51.755 ГГц со всеми закрытыми аттенюаторами: трех полосковых аттенюаторов волнового тракта и одного аттенюатора генератора Г4-141. Согласно калибровке аттенюаторов, режим ложного облучения должен соответствовать ППЭ = 10^{-21} Вт/см².

В каждом эксперименте в качестве позитивно-го контроля проводилось облучение клеток на ранее обнаруженной частоте 51.755 ГГц, ППЭ = 10^{-4} Вт/см², время облучения 10 мин [30, 31].

Оценка средней падающей на облучаемые в чашках Петри суспензии клеток плотности потока мощности проводилось с учетом падающей мощности (P), $K_{СВН}$ в волновом тракте и площади выходной апертуры пирамидального рупора (S):

$$ППЭ_{cp} = \frac{P}{S} \left[1 - \left(\frac{K_{СВН} - 1}{K_{СВН} + 1} \right)^2 \right].$$

Распределение ППЭ в зоне облучения чашек Петри было определено с помощью диода Шоттки. Локальные изменения ± 200 МГц не приводили к значимым изменениям в характере распределения ППЭ, конкретный вид которого зависел от частоты и расстояния от апертуры рупора. Изменения частоты в широком диапазоне (порядка единиц ГГц) могло привести к значительным из-

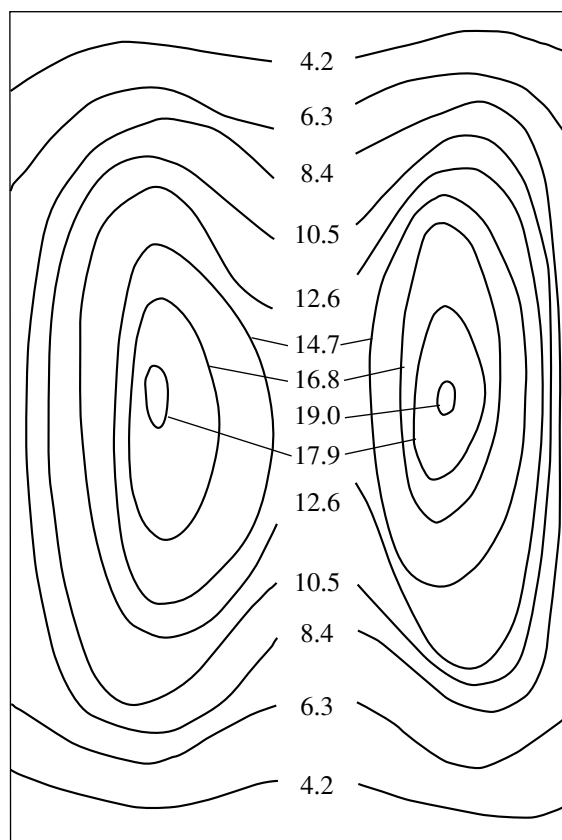


Рис. 2. Распределение по поверхности рупора плотности потока мощности (в мВт/см²) на частоте 51.76 ГГц при выходной мощности 60 мВт и расстоянии 10 мм до поверхности чашки Петри с 1.5 миллиметровым слоем воды (вид сверху).

менениям в распределении ППЭ, но средняя величина ППЭ по всей поверхности облучения не изменялась. Локальная вариабельность мощности излучения в ближней зоне нахождения чашек Петри (10 мм от пирамидального рупора) могла изменяться не более чем в 5 раз (рис. 2).

Коэффициент поглощения в наших условиях облучения измерялся двумя методами: акустическим и калориметрическим. ППЭ = 1 мкВт/см² соответствовала удельная поглощенная энергия УПЭ = 6 мкВт/г для частотного диапазона 51.62–51.84 ГГц (для 3.5 мл суспензии). При использовании ППЭ = 100 мкВт/см² нагрев клеточной суспензии не превышал 0.1°C. Данная величина интегральная, и в нее не входит оценка дифференциальной величины – микронагрева [51, 72, 73].

Как показали предыдущие исследования [29–40], величина эффектов ММВ зависит от времени после ее облучения до начала лизиса. Кроме того, величина эффектов зависела от времени между помещением клеточной суспензии в буфер М9 до начала облучения. Поэтому после центрифугирования клеточной суспензии, взятой с соответству-

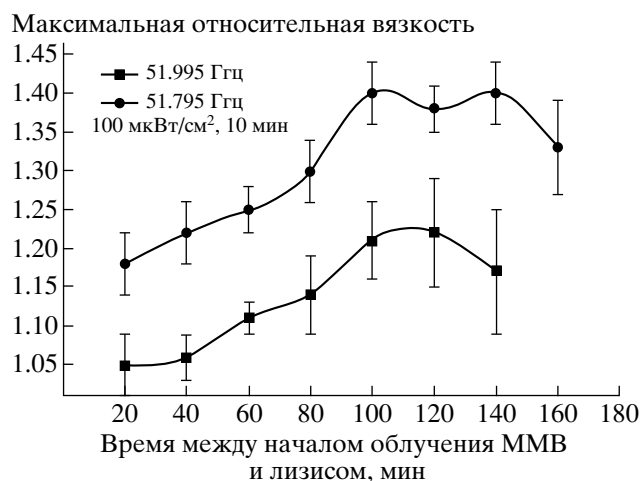


Рис. 3. Кинетика развития эффекта ММВ на частотах 51.995 ГГц и 51.795 ГГц. Результаты четырех независимых экспериментов.

ющей фазы роста в питательной среде, клетки ресуспендировали в буфере М9 в концентрации 10⁷ кл/мл и до начала облучения выдерживали в буфере порядка 30–40 мин для адаптации их к солевой среде. Если облучение производили ранее этого времени, то эффект ММВ имел невоспроизводимый характер. Величина эффекта ММВ по тесту АВЗВ зависела от времени между окончанием облучения и началом лизиса (рис. 3). Зависимость имела фазу роста величины эффекта на временах до 100 мин с последующим выходом на плато продолжительностью 80 мин и уменьшением величины эффекта на временах до 300 мин [26, 33, 37]. В настоящем исследовании спектра действия ММВ было использовано время 120 мин между окончанием облучением и лизисом. Контрольные клетки, а также облученные клетки, до воздействий и между ними (ложным облучением) и лизисом, были защищены от воздействия ММВ алюминевым экраном. После облучения и соответствующей инкубации, суспензия клеток из каждой чашки Петри контрольной и экспериментальной группы была разделена на 3 или 4 части (по 1 мл) и помещена в пробирки для лизиса клеток.

От начала культивирования и до лизиса все клетки (контрольные, подвергнутые ложному облучению и облученные) находились в геомагнитном поле с индукцией $B_0 = 49 \pm 5$ мкТл: вертикальная составляющая геомагнитного поля $B_z = 44$ мкТл, горизонтальная составляющая, параллельная короткой стороне рупора, $B_x = 21$ мкТл, горизонтальная составляющая, параллельная длинной стороне рупора $B_y = 8$ мкТл. Переменное низкочастотное поле не превышало 50 нТ.

Основными типами волн в прямоугольном волноводе излучательного тракта являются волны E_{11} , E_{01} , H_{11} , H_{01} [74, 75]. В СВЧ-технике для на-

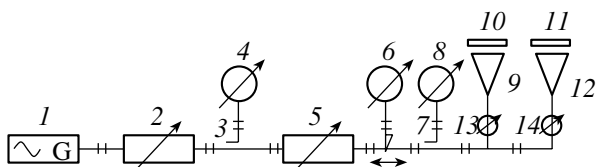


Рис. 4. Блок-диаграмма установки для облучения клеточной суспензии циркулярно-поляризованным миллиметровым излучением: 1 – генератор излучения миллиметрового диапазона Г4-141; 2, 5 – полосковые аттенюаторы; 3, 7 – направленные ответвители; 4 – частотомер; 6 – измеритель $K_{СВН}$; 8 – измеритель мощности; 9, 12 – пирамидальные рупоры; 10, 11 – клеточные суспензии в чашках Петри; 13, 14 – четвертьволновые пластинки для создания лево- (13) и право- (14) циркулярно-поляризованного излучения.

правленной передачи большой мощности применяют прямоугольные волноводы, в которых распространяется волна типа H_{01} , так как появление в линии волн высших типов вызывает большие потери энергии. Вычисление коэффициентов затухания для разных типов волн приводит к результату, что величина коэффициента затухания в расчете на один метр волнового тракта для волны H_{01} примерно на шесть порядков меньше, чем для H_{11} , E_{11} . К положительным свойствам волны H_{01} относят также устойчивость плоскости поляризации колебаний вектора напряженности электрического поля E , параллельной высоте прямоугольного волновода (направление вдоль короткой стороны рупора). Магнитное поле B для волны излучения H_{01} имеет составляющую в направлении своего распространения и составляющую вдоль ширины прямоугольного волновода (направление вдоль длинной стороны рупора).

Облучение циркулярно-поляризованными миллиметровыми волнами. Установка, представленная на рис. 4, позволяла проводить одновременно облучение двух чашек Петри с клетками ММВ одной и той же частоты, но с разной поляризацией. Коэффициент стоячей волны по напряжению в волноводном тракте, измеряемый с помощью измерительной линии Р1-39 при падающей мощности 1 мВт, не превышал 1.4, коэффициент эллиптичности вдоль оси распространения циркулярно-поляризованных ЭМИ был равен 1.02. В каждом эксперименте для каждой компоненты циркулярно-поляризованного ЭМИ проводили ложное облучение при полностью закрытых трех полосковых аттенюаторах. Этот режим должен соответствовать ППЭ = 10^{-16} Вт/см². В момент облучения клетки находились в геомагнитном поле с индукцией $B_0 = 49 \pm 5$ мкТл.

Измерение кривых АВЗВ и анализ результатов. Измерения кривых АВЗВ проводили как описано ранее [23, 28–45], используя автоматический вискозиметр типа Зимма–Крозера, при скорости сдвига 5.8 с^{-1} и напряжении сдвига 0.0065 Н/м^2 . Для

каждого варианта опыта проводили измерения кривых АВЗВ в 3–4 независимых пробирках с лизатами (объем 3 мл) и определяли среднюю величину результата. Кривые АВЗВ записывались подсоединенным on-line персональным компьютером и анализировались с помощью созданного в лаборатории программного обеспечения. Как правило, чувствительным параметром служил максимальный период оборота ротора (T_{\max}), пропорциональный эффективной максимальной вязкости раствора. Величина эффекта на клетки *E. coli* или их лизаты оценивалась по величине максимальной относительной вязкости, равной отношению усредненного по нескольким пробиркам (не менее трех) максимального периода оборота ротора в экспериментальной точке к среднему периоду оборота ротора в контрольных лизатах (клетки или их лизаты либо не подвергались какому-либо воздействию или подвергались ложному облучению как указано выше). В каждом эксперименте, помимо ложного облучения, использовалось три контроля (каждый контроль представлял 3–4 независимых тест-пробирки с лизатами контрольных клеток), различающихся по времени лизиса: вместе с первой облученной пробой, в середине серии облученных проб, вместе с последней облученной пробой. Это позволило контролировать возможные артефакты, связанные со временем инкубации клеток в М9 или действием каких-либо неконтролируемых в процессе проведения эксперимента факторов. Как правило, на всем протяжении эксперимента величина T_{\max} пиков АВЗВ в клеточных лизатах контроля и ложного облучения сохраняла неизменную величину, поэтому величины T_{\max} всех пиков АВЗВ в лизатах контрольных и ложно облученных клеток усреднялись, а эффект действия ММВ оценивался как отношение средней по трем или четырем независимым тест-пробиркам величины максимального пика оборота ротора T_{\max} в лизатах облученных клеток к усредненному T_{\max} в контроле и ложном облучении. Для статистической обработки полученных данных использовали *t*-test Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показано в работах [23, 29–45], нетепловые эффекты действия ММВ на конформационное состояние нуклеоида клеток *E. coli* зависят от физических, физиологических и генетических факторов. До начала данного исследования на используемом в работе штамме клеток *E. coli* K12 AV1157, было показано существование двух резонансов в спектре действия ММВ: 51.76 ГГц в частотном диапазоне 51.62–51.84 ГГц и 41.32 ГГц в частотном диапазоне 41.25–41.50 ГГц, при используемом ППЭ = 100 мкВт/см^2 и времени облучения 10 мин [31]. Эффект действия ММВ на

клетки, определяемый по методу АВЗВ, проявлялся в подавлении репарации радиационно-индуцированных разрывов ДНК. Эффект не мог быть объяснен нагреванием, поскольку репарация подавлялась при уменьшении ППЭ до 1 мкВт/см^2 и не подавлялась при нагревании клеточной суспензии до 5°C . Нагрев клеточной суспензии, учитывая неоднородности распределения ППЭ по поверхности рупора (см. рис. 2), при ППЭ 100 мкВт/см^2 не превышал 0.1°C . Уменьшение ППЭ от 3×10^{-3} до 10^{-13} Вт/см^2 сопровождалось уменьшением полуширины резонансов и уменьшением величины эффекта [26, 40], при этом резонансная частота 51.755 ГГц , определенная по изменению конформационного состояния нуклеоидов с помощью метода АВЗВ, не изменялась с точностью $\pm 1 \text{ МГц}$. Полуширина линии резонанса ΔH частотной зависимости эффекта действия ММВ на клетки имеет разное значение в зависимости от величины используемой ППЭ излучения: чем больше ППЭ излучения, тем больше полуширина резонанса, причем это справедливо, как для клеток прокариот – бактерий *E. coli AB1157* [26, 40], так и для клеток эукариот – дрожжей [49] и тимоцитов крыс [36]. Так, для резонансной частоты 51.575 ГГц , полученной для штамма *E. coli K12 AB1157* [40], ΔH имеет разное значение для разных ППЭ облучения: при ППЭ $= 10^{-13}$ – 10^{-10} Вт/см^2 – $\Delta H = 11 \pm 2 \text{ МГц}$; увеличение ППЭ приводит к росту полуширины резонанса и при ППЭ порядка 10^{-6} – 10^{-4} Вт/см^2 наблюдается быстрое возрастание ее величины до $\Delta H = 90 \pm 10 \text{ МГц}$ при ППЭ $= 100 \text{ мкВт/см}^2$. Учитывая вышеперечисленные зависимости полуширины резонанса от ППЭ, для поиска новых резонансных частот в спектре действия ММВ в диапазоне 51 – 52 ГГц шаг между исследуемыми частотами был выбран 20 – 40 МГц при использовании ППЭ $= 100 \text{ мкВт/см}^2$, а при ППЭ $= 10^{-10} \text{ Вт/см}^2$ – 5 – 10 МГц .

В работе [76] было отмечено, что для получения неизменного биологического эффекта (синхронизация роста клеточной культуры), мощность используемого воздействия ММВ связана со временем воздействия по закону: чем больше ППЭ – тем меньше время воздействия и наоборот. В работах [31, 37, 40] отмечена неизменность величины эффекта действия ММВ по тесту АВЗВ при времени облучения 10 мин на частоте 51.755 ГГц для ППЭ $= 10^{-5}$ – 10^{-3} Вт/см^2 . Для достижения такого же эффекта при ППЭ $= 10^{-14}$ – 10^{-17} Вт/см^2 время облучения увеличивалось до 20 – 40 мин . Все это справедливо при концентрации облучаемых клеток 10^7 кл/мл . При повышении концентрации облучаемых клеток до 10^8 кл/мл эффект действия ММВ при 10 -минутном облучении имел постоянную величину большую, чем в случае с 10^7 кл/мл , несмотря на то, что концентрация лизируемых клеток была такой же в диапазоне ППЭ 10^{-4} – 10^{-17} Вт/см^2 , при той же резонансной частоте 51.755 ГГц . Величина

Таблица 1. Зависимость среднего максимального периода оборота ротора (T_{max}) в клеточных лизатах и величины эффекта действия ММВ от использования дополнительного измерения оптической плотности на спектрофотометре (СФ) в суспензиях облученных и необлученных ММВ клеток

Клетки	T_{max} , сек	Величина эффекта ММВ	Уровень значимости*
Контроль	12.8 ± 0.8		
Облучение	18.0 ± 0.7	1.4 ± 0.1	0.02
Контроль + СФ	13.71 ± 0.09		
Облучение + СФ	20 ± 2	1.5 ± 0.2	0.04

Примечание. Контроль – контрольные клетки, облучение – облученные клетки, контроль + СФ и облучение + СФ – контрольные и облученные клетки соответственно, подвергнутые перед их лизисом дополнительному измерению на СФ их оптической плотности. Результаты трех независимых экспериментов.

* Уровень значимости отличий в облученных вариантах по сравнению с соответствующими контролями.

полуширины резонанса не зависела от концентрации облучаемых клеток. Исходя из указанных результатов, для исследования спектра действия ММВ были выбраны следующие параметры облучения: время облучения 10 мин , концентрация облучаемых клеток 10^7 кл/мл .

Так как зависимость T_{max} от концентрации клеток носит линейный характер, то получаемые резонансные эффекты действия ММВ можно гипотетически объяснить влиянием ММВ на адгезию клеток. Другими словами, одно из возможных объяснений наблюдаемого нами эффекта ММВ могло бы быть их влияние не на конформацию нуклеоидов, а на скорость оседания или/и агрегационную способность клеток *E. coli*, а также силу их прикрепления к чашкам Петри. Для проверки этого предположения была исследована, зависимость ОД_{550} суспензии от частоты ММВ. Приготовление клеток для эксперимента производилось по стандартной методике. Клетки облучались ММВ (частота 51.755 ГГц , время облучения 10 мин , ППЭ $= 10^{-4} \text{ Вт/см}^2$) в чашках Петри при концентрации $4 \times 10^7 \text{ кл/мл}$ ($\text{ОД}_{550} = 0.12$) и инкубировались 80 мин до начала лизиса. Непосредственно перед лизисом из чашки после стандартного перемешивания отбиралось 3.3 мл суспензии для измерения оптической плотности ОД_{550} . Проведение этого дополнительного измерения не влияло на проявление и величину эффекта ММВ и средние максимальные периоды оборотов ротора (T_{max}) в лизатах облученных и необлученных ММВ клеток (см. табл. 1). Затем клетки лизировали и через 40 – 44 ч измеряли АВЗВ. На рис. 5 представлены данные типичного эксперимента. Во всех проведенных экспериментах линейной корреляции между изменением величины T_{max} в



Рис. 5. Зависимость максимальной относительной вязкости и оптической плотности клеточной суспензии после облучения ММВ (время облучения 10 мин, ППЭ = 10^{-18} Вт/см²).

* – величина эффекта ММВ имеет значимые отличия ($p < 0.05$) от контроля и от величины эффекта ММВ на крайних частотах резонанса.

лизатах облученных клеток и изменением OD_{550} лизируемых облученных клеток выявить не удалось, что не подтверждает предположение о связи резонансных эффектов с адгезией клеток на чашках Петри.

Еще одним возможным объяснением наблюдаемых эффектов действия ММВ мог быть нагрев/микронагрев клеточной суспензии под действием ЭМИ. Как уже упоминалось, в наших работах использовалась ППЭ не более 100 мкВт/см^2 и время облучения 10 мин. При ППЭ = 100 мкВт/см^2 и 10-минутном времени облучения нагрев клеточной суспензии не превышал 0.1°C . Было проведено исследование действия повышения температуры на клетки *E. coli*. В работе использовались клетки, отобранные с ранней стационарной фазой роста. Спустя 30 мин после помещения их в буфер М9 ($OD_{550} = 0.12$), по 1 мл клеточной суспензии разливалось по тест-пробиркам и ставилось в водяную баню при заданной температуре на 15 мин, после чего их помещали на 1–2 мин в водяную баню при комнатной температуре 20°C (в предварительном эксперименте было показано, что этого времени достаточно для установления в клеточной суспензии комнатной температуры) и выдерживались при комнатной температуре до лизиса 15 мин. Контрольные клетки подвергались всем вышеописанным операциям, но водяные термостаты поддерживали температуру 20°C .

Как видно из рис. 6 15-минутный (в наших экспериментах по действию ММВ время облучения 10 мин) нагрев клеточной суспензии до $40\text{--}50^\circ\text{C}$ приводит примерно к 12%-ному возрастанию пиков АВЗВ. При 60°C наблюдался резкий спад пиков вязкости, что связано с конденсацией генома

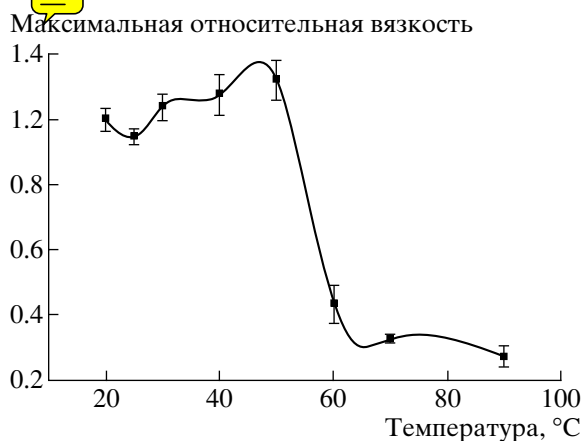


Рис. 6. Температурная зависимость максимальной относительной вязкости.

Результаты трех независимых экспериментов.

(пульс-форез показал, что ДНК при нагреве клеток до 60°C не фрагментируется). Кинетика развития эффекта температурного воздействия была определена после 15 и 30-минутного нагрева клеток. В каждой временной точке одновременно с экспериментальными клетками лизировались контрольные клетки. Контролем служили клетки, подвергшиеся воздействию 20°C . На рис. 7 по оси абсцисс отложено время между окончанием 1–2-минутного охлаждения клеток в водяной бане до 20°C , следующего после нагрева клеток и началом их лизиса.

Сравним результаты, представленные на рис. 7, с данными, полученными при исследовании кинетики развития эффекта действия ММВ (51.755 ГГц , ППЭ 100 мкВт/см^2 , время облучения 10 мин) и представленными на рис. 3. Как можно видеть из

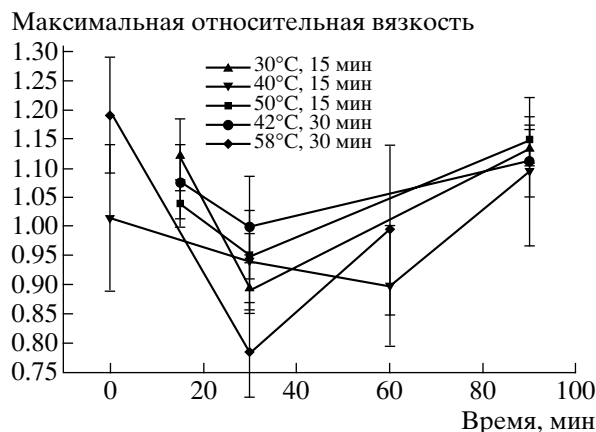


Рис. 7. Кинетика развития эффекта при нагреве клеток *E. coli*.

На графике указаны продолжительность и температура нагрева. Результаты трех независимых экспериментов.

рис. 7, эффект теплового шока имеет максимальные значения: 20%-ное уменьшение ($p < 0.05$) (30 мин нагрева при 58°C) на 30-й мин кинетики и 15%-ное ($p = 0.02$) (15 мин нагрева при 30°C) увеличение на 90-й мин кинетики. Компактизация-декомпактизация нуклеоидов, вызванная тепловым шоком, – процесс, нелинейно зависящий от температуры и времени воздействия [77]. Показано [78] увеличение компоненты белка в ДНК-белковых комплексах, приводящее к увеличению массы нуклеоидов, их жесткости или, иначе говоря, к компактизации генома. Почти 30%-ная величина эффекта ММВ на 90-й мин динамики (см. рис. 3) превышает в 1.5–2 раза величины эффектов от теплового воздействия, измеренные на том же временном промежутке. Если учесть, что нагрев клеточной суспензии при используемых в наших экспериментах ППЭ (меньших или равных 100 мкВт/см², 10-минутное облучение) не превышает 0.1°C, то можно сделать вывод о нетепловом характере эффектов ММВ в наших условиях проведения экспериментов. Это заключение подтверждается также аномальной зависимостью эффекта ММВ от ППЭ для некоторых частот воздействия [43].

Особенности спектра действия ММВ на клетки *E. coli* в частотном диапазоне 51–52 ГГц заключались в следующем.

Частотные зависимости действия ММВ диапазона 51–52 ГГц были исследованы при ППЭ = 100 мкВт/см², с шагом между исследуемыми частотами 20–40 МГц (см. рис. 8а, 8б, 8в). Резонансную частотную зависимость мы определяли как зависимость резонансного (колоколообразного) типа, в которой статистически значимые и воспроизводимые эффекты наблюдаются не менее чем на четырех частотах. Частота, на которой наблюдался максимальный эффект, определялась как резонансная частота (частота 51.755 ГГц на рис. 8б). Для большинства приведенных на рис. 8а–8в) частот, на которых наблюдается значимый и воспроизводимый экстремум эффекта ММВ, вводится понятие эффективной частоты, поскольку на исследованных близлежащих частотах значимых эффектов ММВ не было или таких частот было менее четырех. На основании такой градации, частоты 51.575, 51.755, 51.875 ГГц были отнесены к резонансным частотам, а 51.085, 51.135, 51.205, 51.295, 51.425, 51.955 ГГц – к эффективным (рис. 8а–8в). Лизис клеток выполнялся через 120 мин после действия на них ММВ.

Характерное расстояние между пиками полученных частотных зависимостей равно 55–180 МГц. Эти расстояния между близлежащими областями эффективных частот (частотными окнами) в спектре действия ММВ согласуются с литературными данными, полученными при той же мощности облучения для прокариотических клеток [70].

Максимальная относительная вязкость

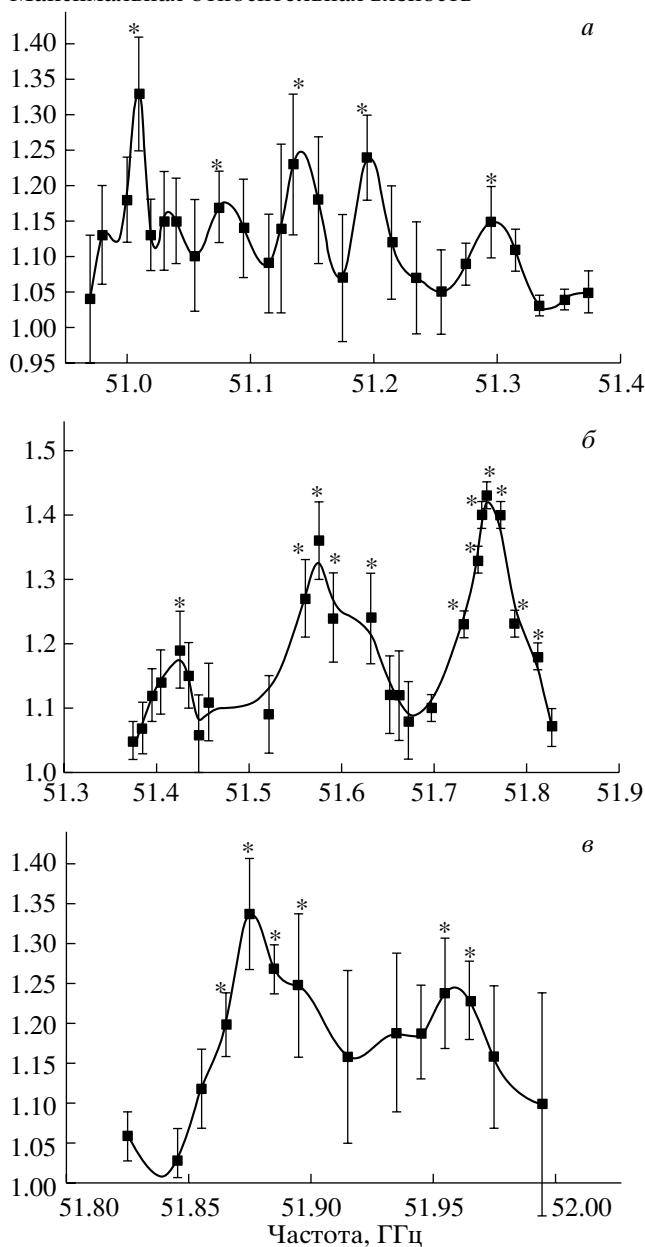


Рис. 8. Частотная зависимость эффекта ММВ (а, б, в) при ППЭ = 100 мкВт/см², время облучения 10 мин. Результаты четырех независимых экспериментов. * – отличия от контроля (ложного облучения) ($p < 0.05$).

В предыдущих исследованиях [23, 26, 33, 36] было показано, что кинетики развития эффекта ММВ (частота 51.755 ГГц, 10 мин) на клетки *E. coli* *AB1157*, находящиеся в стационарной фазе роста, имеет начальный участок монотонного роста и последующее плато на временах 100–140 мин (рис. 3) для исследуемых мощностей 10⁻¹⁰, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴, 3 × 10⁻³ Вт/см². Хотя с увеличением мощности облучения время выхода эффекта на плато уменьшалось, но в диапазоне 100–160 мин

Таблица 2. Зависимость величины эффекта действия ММВ от знака циркулярной поляризации ММВ (ППЭ = 100 мкВт/см², время облучения 10 мин, время от начала облучения до лизиса 120 мин, облучение клеточной суспензии с ОД₅₅₀ = 0.12) эффективной частоты из спектра действия ММВ диапазона 51–52 ГГц

Поляризация	Частота				
	51.425 ГГц	51.575 ГГц	51.755 ГГц	51.857 ГГц	51.955 ГГц
Левая	1.27 ± 0.07 <i>p</i> < 0.05	1.02 ± 0.09	1.26 ± 0.05 <i>p</i> < 0.05	1.21 ± 0.05 <i>p</i> < 0.05	1.05 ± 0.08
Правая	1.11 ± 0.04	1.28 ± 0.07 <i>p</i> < 0.05	1.06 ± 0.06	1.08 ± 0.04	1.20 ± 0.06 <i>p</i> < 0.05

Примечание. Усредненные данные четырех независимых экспериментов. Для статистически значимых отличий приведен уровень значимости.

зависимость эффекта от времени после облучения имела плато во всех используемых мощностях.

Величина эффекта ММВ в обнаруженных частотных окнах изменяется от 15 до 40% (см. рис. 8а–8в). Это можно было бы объяснить разной кинетикой развития эффекта для разных эффективных частот поскольку используемые в экспериментах время между облучением и лизисом, 120 мин, могло быть неоптимальными для определенных частот. Проведенные исследования (см. рис. 3) кинетики развития эффекта на частоте 51.955 ГГц (10 мин, 100 мкВт/см²) выявили похожую, как для частоты 51.755 ГГц, зависимость: первоначальный рост и плато на временах 100–140 мин. Кинетики развития эффекта циркулярно-поляризованных ММВ (51.755 ГГц, 10 мин, 100 мкВт/см²) после облучения логарифмических и стационарных клеток *E. coli* AB1157 также имели максимальный эффект на временах 80–120 мин [33].

Исследовано действие циркулярно-поляризованных миллиметровых волн на изменение конформационного состояния нуклеоидов клеток *E. coli*. Эксперименты выявили различие в действии лево- и правополяризованных ММВ на клетки *E. coli* [30, 32, 34]. В частности, при воздействии на клетки *E. coli* на частоте 41.32 ГГц, эффективной была правая поляризация, а на частоте 51.76 ГГц – левая [34]. Из найденного спектра эффективных частот ММВ диапазона 51–52 ГГц было выбрано несколько близрасположенных эффективных частот для исследования действия ММВ разной циркулярной поляризации (ППЭ = 100 мкВт/см², время облучения 10 мин, время начала лизиса после облучения 120 мин). Результаты проведенных экспериментов (табл. 2) показали разную эффективность циркулярных поляризаций на исследованных частотах. Наличие для каждой резонансной частоты лишь одной эффективной циркулярной поляризации указывает на асимметричность мишени действия ММВ и нетепловой характер наблюдаемых эффектов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании вышеперечисленных экспериментальных данных можно заключить, что частотный спектр действия низкоинтенсивных ММВ на клетки *E. coli* имеет достаточно регулярную структуру с расстояниями между эффективными частотами 55–180 МГц при ППЭ = 100 мкВт/см² в диапазоне частот 51–52 ГГц. Показано, что эффективные частоты спектра действия ММВ отличаются по знаку эффективной циркулярной поляризации. Регистрируемые методом АВЗВ эффекты ММВ не связаны с адгезией клеток к поверхности чашек Петри и не связаны с тепловым действием ММВ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреев Е.А., Белый М.У., Ситко С.П. // Вестн. АН СССР. 1985. № 1. С. 24–32.
2. Девятков Н.Д., Чернов З.С., Бецкий О.В., Путвинский А.В. // Биологическое действие электромагнитных полей. Пущино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1982. С. 44.
3. Девятков Н.Д., Голант М.Б., Бецкий О.В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности. М.: Радио и связь, 1991.
4. Девятков Н.Д., Голант М.Б., Бецкий О.В. Особенности медико-биологического применения миллиметровых волн. М.: ИРЭ РАН, 1994. 164 с.
5. Электромагнитное загрязнение окружающей среды и здоровье населения России / Под ред. А.К. Демина. М.: Фонд “Здоровье и окружающая среда”, Росс. ассоц. обществ. здоровья, 1997. 91 с.
6. Электромагнитные поля и здоровье человека / Под ред. Ю.Г. Григорьева. М.: Росс. ун-т Дружбы народов, 2002. 177 с.
7. Ежегодник Российского Национального Комитета по защите от неионизирующих излучений: Сб. трудов. М.: РУДН, 2003. 222 с.
8. Ежегодник Российского Национального Комитета по защите от неионизирующих излучений 2003: Сб. трудов. М.: Аллана, 2004. 260 с.
9. Сотовая связь и здоровье: Медико-биологические и социальные аспекты. М.: Аллана, 2004. 222 с.

10. Григорьев Ю.Г., Шафиркин А.В., Никитина В.Н., Васин А.Л. // Радиационная биология. Радиэкология. 2003. Т. 43. № 5. Стр. 565–578.
11. Grigoriev Y.G., Stepanov V.S., Nikitina V.N. et al. // Biological effects of radiofrequency electromagnetic fields and the radiation guidelines. Results of experiments performed in Russia/Soviet Union. Moscow: Institute of Biophysics, 2003. P. 00–00.
12. Grigoriev Y.G. // Electromagnetic fields of mobile radio communication and danger estimation for the population. Russia. Saint-Petersburg: Inst. Electrical and Electronics Eng. 2005. P. 9–14.
13. Grigoriev Y.G., Grigoriev O.A., Merkulov A.V., Grigoriev K.A. // Possible postponed effects of electromagnetic fields from mobile communication base stations on population and bio-ecosystems (in Russian) Russia. / Saint-Petersburg: Inst. Electrical and Electronics Eng. 2005. P. 283–287.
14. Adey W.R. // Review of Radio Science, 1996–1999 / Ed. S. Ueno Oxford: Oxf. Univ. press, P. 845–872.
15. Kundi M, Mild K, Hardell L, Mattsson M.O. // J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev. 2004. V. 7. № 5. P. 351–384.
16. Lai H., Singh N.P. // Int. J. Radiat. Biol. 1996. V. 69. P. 513–521.
17. Lai H. // Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering / Ed. G.L. Bowlin. N.Y.: Marcel Decker, 2005. P. 00–00.
18. MCCann J., Dietrich F., Rafferty C. // Mutat. Res. 1998. V. 411. P. 45–86.
19. Tofani S., Ferrara A., Anglesio L., Gilli G. // Bioelectrochem. Bioenergetics. 1995. V. 36. P. 9–13.
20. Loshner W., Mevissen M. // Life Sci. 1994. V. 54. № 21. P. 1531–1543.
21. Valjus J., Hongisto M., Verkasalo P. et al. // Bioelectromagnetics. 1995. V. 16. P. 365–376.
22. Рубцова Н.Б. // Авиакосм. и экол. медицина. 1997. Т. 31. № 1. С. 4–8.
23. Belyaev I.Ya., Shcheglov V.S., Alipov Ye.D., Ushakov V.L. // IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques. 2000. V. 48. № 11. P. 2172–2179.
24. Pakhomov A.G., Akyel Y., Pakhomova O.N. et al. // Bioelectromagnetics. 1998. V. 19. № 7. P. 393–413.
25. Искин В.Д. Биологические эффекты миллиметровых волн и корреляционный метод их обнаружения: Харьков: Изд-во “Основа” при Харьк. гос. ун-те, 1990. 248 с.
26. Alipov Ye.D., Belyaev I.Ya., Kravchenko V.G. et al. // Physics of the Alive. 1993. V. 1. № 1. P. 72–80.
27. Arinichev A.D., Belyaev I.Ya., Samedov V.V., Sitko S.P. // 2nd Int. Sci. Meeting “Microwaves in medicine 1993”. Rome: Univ. of Rome, 1993. P. 305–307.
28. Belyaev I.Ya. // Bioelectrochem. Bioenergetics. 1992. V. 27. P. 11–18.
29. Belyaev I.Ya., Shcheglov V.S., Alipov Ye.D. // Charge and Field Effects in Biosystems-3 / Ed. M.J. Allen, S.F. Cleary, A.E. Sowers, D.D. Shillady. Boston; Basel; Berlin: Birkhauser, 1992. P. 115–126.
30. Belyaev I.Ya., Alipov Ye.D., Scheglov V.S. // Electro-Magnetobiology. 1992. V. 11. № 2. P. 97–108.
31. Belyaev I.Ya., Alipov Ye.D., Shcheglov V.S., Lystsov V.N. // Z. Naturforsch. 1992. Bd. 47c. S. 621–627.
32. Belyaev I.Ya., Shcheglov V.S., Alipov Ye.D. // Bioelectrochem. Bioenergetics. 1992. V. 27. P. 405–411.
33. Belyaev I.Ya., Shcheglov V.S., Alipov Ye.D., Radko S.P. // Bioelectrochem. Bioenergetics. 1993. V. 31. P. 49–63.
34. Belyaev I.Ya., Alipov Ye.D., Polunin V.A., Shcheglov V.S. // Electro- Magnetobiology. 1993. V. 12. P. 39–49.
35. Belyaev I.Ya., Alipov Ye.D., Shcheglov V.S., Yedneral D.I. // 2nd Int. Sci. Meeting “Microwaves in medicine 1993”. Rome: Univ. of Rome, 1993. P. 189–191.
36. Belyaev I.Ya., Kravchenko V.G. // Z. Naturforsch. 1994. Bd. 49c. S. 352–358.
37. Belyaev I.Ya., Alipov Ye.D., Shcheglov V.S. et al. // Electro-Magnetobiology. 1994. V. 13. P. 53–66.
38. Belyaev I.Ya., Matronchik A.Yu., Alipov Ye.D. // Charge and Field Effects in Biosystems-4 / Ed. M.J. Allen. Singapore: World Scientific, 1994. P. 174–184.
39. Belyaev I.Ya., Alipov Ye.D., Matronchik A.Yu., Radko S.P. // Bioelectrochem. Bioenergetics. 1995. V. 37. P. 85–90.
40. Belyaev I.Ya., Shcheglov V.S., Alipov Ye.D., Polunin V.A. // Bioelectromagnetics. 1996. V. 17. P. 312–321.
41. Belyaev I.Ya., Spivak I.M., Kolman A., Harms-Ringdahl M. // Mutat. Res. 1996. V. 358. P. 223–230.
42. Belyaev I.Ya., Alipov Ye.D., Harms-Ringdahl M. // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1336. P. 465–473.
43. Shcheglov V.S., Belyaev I.Ya., Alipov Ye.D., Ushakov V.L. // Electro-Magnetobiology. 1997. V. 16. № 1. P. 69–82.
44. Belyaev I.Ya., Alipov Ye.D., Matronchik A.Yu. // Bioelectromagnetics. 1998. V. 19. P. 300–309.
45. Belyaev I.Ya., Alipov Ye.D., Harms-Ringdahl M. // Electricity and Magnetism in Biology and Medicine/Ed. Bersani. Kluwer Acad./Plenum Publ., 1999. P. 481–484.
46. Grundler W. // Biological Effects and Dosimetry of Nonionizing Radiation / Ed. M. Grandolfo, S. Michaelson, A. Rind. L.: Plenum Press, 1983. № 4. P. 299–318.
47. Grundler W., Jentzsch V., Keilmann F., Putterlik V. // Biological Coherence and Response to External Stimuli / Ed. H. Frohlich New York; Berlin; Heidelberg; London; Paris; Tokyo: Springer-Verlag, 1988. P. 65–85.
48. Grundler W., Keilmann F. // Z. Naturforschung. 1989. Bd. 44c. S. 863–866.
49. Grundler W. // Bioelectrochem. Bioenergetics. 1992. V. 27. P. 361–365.
50. Webb S.J. // Phys. Letters. 1979. V. 73A. № 2. P. 145–148.
51. Бецкий О.В., Путвинский А.В. // Изв. вузов. Радиэлектроника. Электронные приборы СВЧ. 1986. Т. 29. № 10. С. 4.
52. Бецкий О.В., Голант М.Б., Девятков Н.Д. Миллиметровые волны в биологии. М.: Знание, 1988. 64 с.
53. Бецкий О.В. // Int. Symp. “Millimeter Waves of non-Thermal Intensity in Medicine”, Digest of Papers, Moscow, Oct. 3–6, 1991. М., 1991. С. 521–528.

54. *Бецкий О.В., Кислов В.В., Девятков Н.Д.* // Успехи совр. радиоэлектроники. 1996. № 12. С. 3–15.
55. *Севастьянова Л.А.* // Нетепловые эффекты миллиметрового излучения / Под ред. Н.Д. Девяткова. М.: ИРЭ АН СССР, 1981. С. 86–113.
56. *Севастьянова Л.А., Бородкина А.Г., Зубенкова Э.С. и др.* // Эффекты нетеплового воздействия миллиметрового излучения на биологические объекты / Под ред. Н.Д. Девяткова. М.: ИРЭ АН СССР, 1983. С. 34–47.
57. *Бинги В.Н.* Магнитобиология. Эксперименты и модели. М.: Милта, 2002. 592 с.
58. *Frohlich H.* // Phys. Letters. 1968. V. 26A. № 9. P. 402–403.
59. *Frohlich H.* // Advances in Electronics and Electron Physics. 1980. V. 53. P. 85–152.
60. *Frohlich H.* // Collective Phenomena. 1981. V. 3. P. 139–146.
61. *Frohlich H.* // Bioelectromagnetics. 1982. V. 3. № 1. P. 45–47.
62. *Mei W.N., Kohli M., Prohofsky E.W., Van Zandt L.L.* // Biopolymers. 1981. V. 20. P. 833–852.
63. *Postow E., Swicord M.L.* // CRC Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields / Ed. C. Polk and E. Postow. Boca Raton: CRC Press, FL, 1986. P. 425–460.
64. *Банников В.С., Веденский О.Ю., Ермак Г.П. и др.* // Докл. АН УССР. 1990. Сер. А. № 9. С. 46–50.
65. *Волобуев А.Н., Дровяникова Л.П., Овчинников Е.Л. и др.* Миллиметровые волны в биологии и медицине // Медико-техническая ассоциация “КВЧ”, Научное медико-биологическое общество “КВЧ”, июнь 1995. № 5. С. 14–41.
66. *Волобуев А.Н.* Биофизика. Самара: Самар. Дом печати, 1999. С. 132–148.
67. *Голант М.Б., Шаилов В.А.* // Применение миллиметрового излучения низкой интенсивности в биологии и медицине / Под ред. Н.Д. Девяткова. М.: ИРЭ АН СССР, 1985. С. 127–131.
68. *Давыдов А.С.* Солитоны в биоэнергетике. Киев: Наук. думка, 1986. 159 с.
69. *Красильников П.М.* // Биофизика. 1999. Т. 44. Вып. 6. С. 1078–1082.
70. *Смолянская А.З., Виленская Р.Л.* // Успехи физ. наук. 1973. Т. 110. Вып. 3. С. 458–460.
71. *Банников В.С., Рожков С.Б.* // Докл. АН СССР. 1980. Т. 225. № 3. С. 746–748.
72. *Khizhnyak E.P., Ziskin M.C.* // Bioelectromagnetics. 1996. V. 17. № 3. P. 223–229.
73. *Ряковская М.Л., Штемлер В.М.* // Эффекты нетеплового воздействия миллиметрового излучения на биологические объекты / Под ред. Н.Д. Девяткова. М.: ИРЭ АН СССР, 1983. С. 172–181.
74. *Харвей А.Ф.* Техника сверхвысоких частот. В 2-х т. М.: Сов. радио, 1965. 00 с.
75. *Исмаилов Э.Ш.* Биофизическое действие СВЧ-излучений. М.: Энергоатомиздат, 1987. 144 с.
76. *Божанова Т. П., Брюхова А. К., Голант М. Б. и др.* // Медико-биологические аспекты миллиметрового излучения низкой интенсивности / Под ред. Н.Д. Девяткова. М.: ИРЭ АН СССР, 1987. С. 90–97.
77. *Sarimov R., Malmgren L.O.G., Markova E. et al.* // IEEE Transactions on Plasma Science. 2004. V. 32. № 4. P. 1600–1608.
78. *Roti-Roti J.L., Painter R.B.* // Radiat. Res. 1982. V. 89. P. 166–175.

Поступила в редакцию
17.10.2005

The Peculiarities of Non-Thermal Effects of Microwaves in the Frequency Range of 51–52 GHz on E. coli Cells

V. L. Ushakov¹, Ye. D. Alipov¹, V. S. Sheglov^{1†}, I. Ya. Belyaev^{2,3}

¹Moscow Engineering Physics Institute (State University), Moscow, 115409, Russia; e-mail: VLUshakov@mephi.ru

²General Physics Institute, Russian Academy of Science, Moscow, Russia

³Stockholm University, Stockholm, Sweden

The effects of microwaves on conformation of nucleoids in E. coli were studied by the method of anomalous viscosity time dependence (AVTD) at various frequencies in its range of 51–52 GHz and the power flux density of 100 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$. Linearly polarized microwaves resulted in significant effects within specific frequency windows of resonance type. The distances between frequency windows were in the range of 55–180 MHz. Only one of two possible circular polarizations, left-handed or right-handed, was shown to be effective at each frequency window. The sign of effective circular polarization alternated between frequency windows. We show that the effects of microwaves on E. coli cells measured by the AVTD technique are not caused by adhesion of cells. The half-width of the 51.575 GHz resonances was measured to 20 ± 20 MHz. This value is very close to the half-width of the 51.755 GHz resonance as it has previously was determined at the same power flux density. The obtained data suggest similar targets for effects of microwaves at these two resonance frequencies and provide evidence for non-thermal nature of the observed microwave effects.