Изучение нетермического воздействия терагерцового излучения на живые системы

Пельтек С.Е.

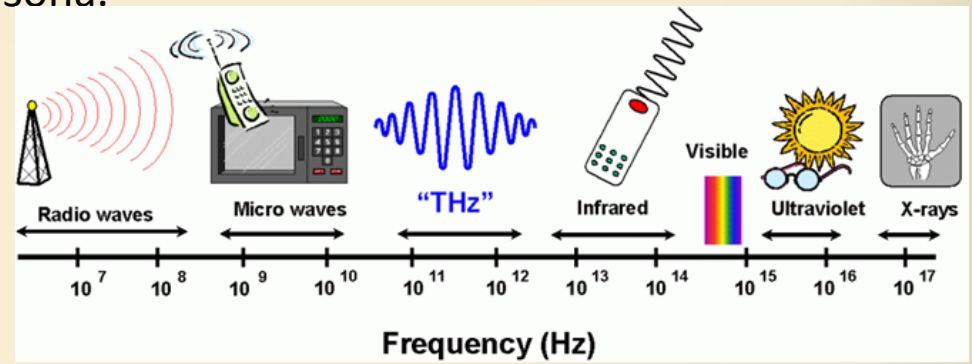
Мещерякова И.А., , Демидова Е.В. , Демидов Е.А., Горячковская Т.Н , Попик В.М., Семенов А.И., Кулипанов Г.Н., Колчанов Н.А.

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Институт ядерной физики им. Г. И. Будкера СО РАН

Под терагерцовой областью электромагнитного спектра обычно принимается область от 100 микрон до 1 миллиметра длины волны излучения. В последние десять лет научным сообществом эта область спектра начала бурно осваиваться из-за развития новых источников излучения.

Появление мощных источников терагерцового излучения и разработка приборов на его основе ставит задачу изучения ответа живых организмов на излучение терагерцового диапазона.

энергия кванта ~ 0,01 эВ



Терагерцовое излучение:

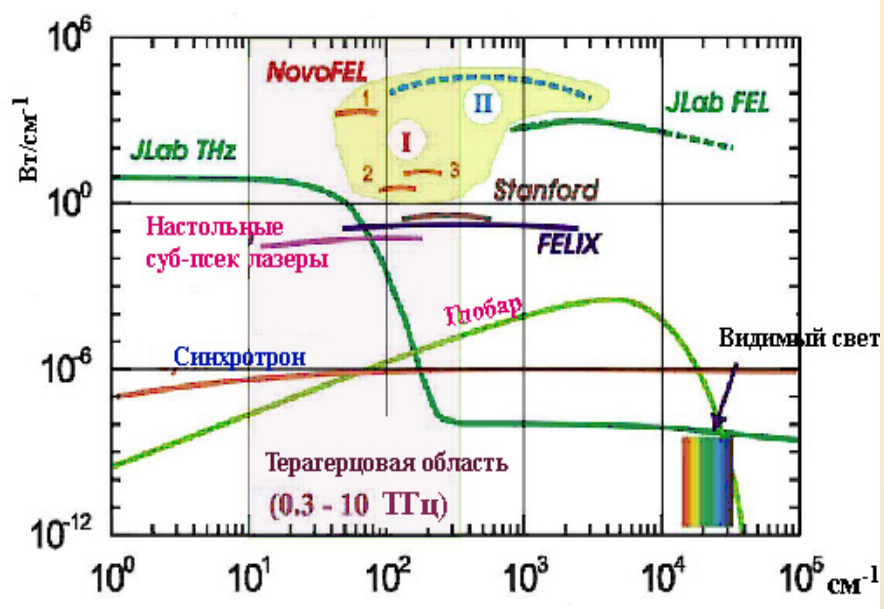
- Не ионизирующее, не разрушает первичную структуру биообъектов.
- Соответствует энергиям колебаний водородных связей, формирующих надмолекулярные вторичную, третичную и четвертичную структуры макромолекул.

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОЦЕССОВ, ПРОТЕКАЮЩИХ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ ?

Новосибирский лазер на свободных электронах (ЛСЭ) генерирует терагерцовое излучение в широких пределах длин волн (от 50 до 240 микрон) со средней мощностью до 400 Вт.

Это позволяет проводить уникальные, не имеющие аналогов в мире, эксперименты с применением терагерцового излучения при различных длинах волн и в широком диапазоне средней и пиковой мощности, недоступных при использовании других терагерцовых источников.

Параметры излучения Новосибирского ЛСЭ



Длина волны, мм	**0.05 – 0.24**
Длительность импульса, пс	**50**
Частота следования импульсов, МГц	**2.8 - 11.2**
Средняя мощность, Вт	**до 400**
Пиковая мощность, МВт	**до 1**
Минимальная относительная ширина линии	**$3 \cdot 10^{-3}$**

Сравнительная характеристика существующих в мире источников терагерцового излучения.
JLab FEL – ЛСЭ Джеферсоновской лаборатории, Вирджиния, США.
NovoFEL – Новосибирский ЛСЭ, ИЯФ СО РАН.

Изучение влияния воздействия терагерцового излучения на биологические объекты исследовали на геномном, протеомном и организменном уровнях организации.

Было оценено потенциальное ДНК-повреждающее, генотоксическое, мутагенное воздействие терагерцового излучения на геномы прокариотических и эукариотических организмов. На искуственных генетических конструкциях было проведено исследование воздействия терагерцового излучения на экспрессию под контролем стресс-чувствительных и стресс-нечувствительных промоторов.

На протеомном уровне было исследовано изменение белковой экспрессии в лизатах прокариотических и эукариотических клеток, подвергавшихся облучению или культивируемых в облученной среде.

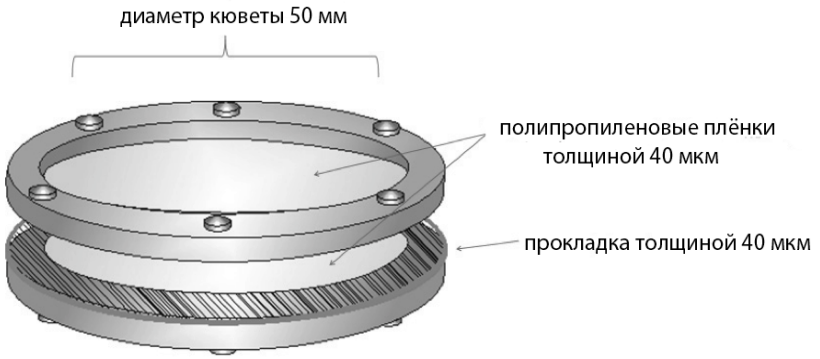
На уровне организма оценивали общее метаболическое неблагополучие прокариотических и эукариотических организмов различных трофических уровней под воздействием терагерцового излучения.

Биологическая станция в Сибирском центре синхротронного и терагерцового излучения ИЯФ СО РАН. Облучение малой кюветы

Станция предназначена для регулирования и контроля точной дозы облучения биологических объектов.

Голубой стрелкой отмечено направление подачи излучения. На экране монитора видно ИК – изображение кюветы.

Вращающаяся прозрачная в терагерцовой области кювета предназначена для равномерного экспонирования небольших порций образцов. Объем кюветы 50 мкл.



Анализ потенциальной мутагенности терагерцового излучения в тесте Эймса

Для выявления мутагенной активности терагерцового излучения в тесте Эймса использовали штаммы *Salmonella Typhimurium TA 98 (hisD3052) и TA102 (hysG428),* которые являются стандартными тестерными гиститдин-зависимыми штаммами.

Тест Эймса на индукцию мутаций проводится путем учета обратных мутаций от ауксотрофности к прототрофности по гистидину, возникающих при действии различных мутагенных факторов в результате замены основания (TA102), или сдвига рамки считывания TA 98.

Воздействие	Доза (Дж/см^2) / время облучения (минуты)	Число ревертантов на чашку[а]	
Контроль	0 / 0	53 ± 9	234 ± 26
облучение	102 / 5	52 ± 8	223 ± 32
облучение	203 / 10	59 ± 9	262 ± 37
облучение	406 / 20	63 ± 8	279 ± 35
облучение	610 / 30	72 ± 10 *	330 ± 42*
NHO[б]	0.049 мкг/мл (0.25 мкМ)	583 ± 65***	1254 ± 84***

[а] среднее значение из 3 независимых экспериментов по облучению

[б] положительные контроли 4-нитрохинолин-1-оксид (NHO)

*, *** Значения статистически отличаются от контроля (P< 0.005)

Незначительный мутагенный эффект только при дозе больше 610 Дж/см2, причем превышение количества ревертантов над фоновым значением в контроле менее 1.5 раз. При этом стандартный мутаген NHO показывает увеличение количества His+-ревертантов практически на порядок по сравнению с их спонтанным образованием в контроле.

Анализ ДНК-повреждающего действия терагерцового излучения в SOS –хромотесте

Анализ состоит в воздействии на клетки *E. coli PQ37* предполагаемого генотоксического фактора индукции с последующим определением относительной активности β-галактозидазы.

	Относительные значения фактора индукции
Контроль	**1**
Терагерц. излучение	**1.1**
Положительный контроль NHO 0.049 мкг/мл	**3.5**

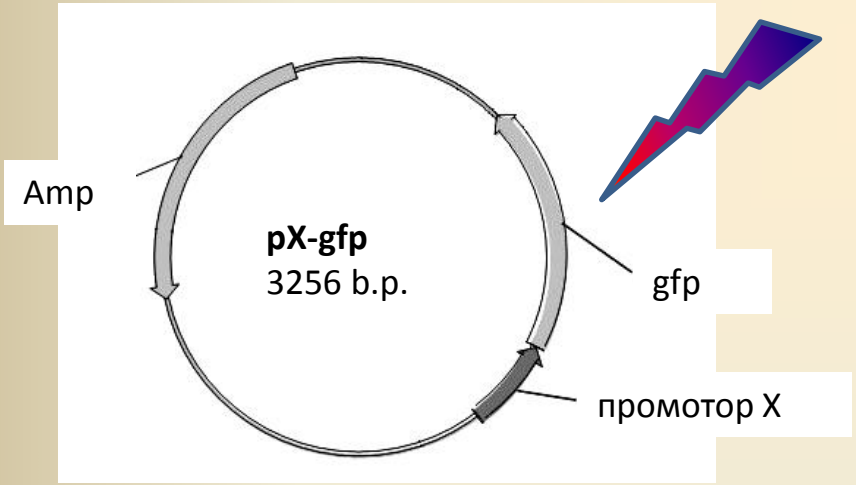
Достоверных отличий не обнаружено.

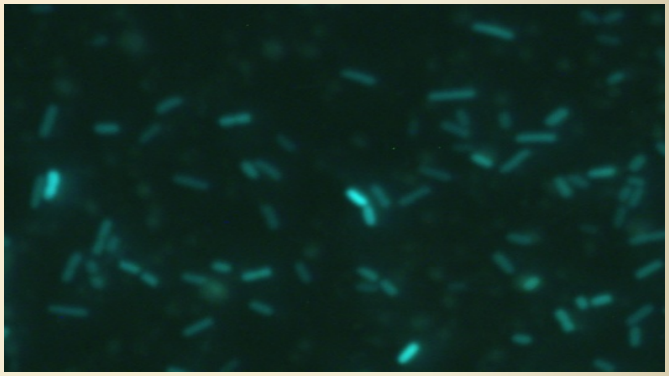
По результатам цитогенетического анализа частоты нестабильных хромосомных аберраций и ДНК-повреждающего действия в SOS–хромотесте терагерцовое излучение не обладает выраженным мутагенным эффектом.

Исследование воздействия терагерцового излучения на стрессочувствительные системы клетки

Геносенсор — это искусственная генетическая система, чувствительным элементом которой является промотор гена-сенсора, активируемый в ответ на стрессовое воздействие.

Анализируемый стрессочувствительный промотор (X) присоединён к гену-репортеру gfp, кодирующему флуоресцентный белок GFP (Green Fluorescent Protein). Полученная рекомбинантная плазмида вводится в бактериальную клетку. При попадании клетки в среду, содержащую соответствующий индуктор, промотор запускает синтез репортерного белка. Ген-репортер позволяет визуализировать работу этого промотора – клетка продуцирует флуоресцирующий белок и окрашивается в зеленый цвет.





X

dps промотор гена *Dps*, принимающего участие во многих клеточных процессах, в том числе ответе на окислительный стресс

katG *и* ***dps*** промоторы генов *KatG* и *Dps*, чувствительные к окислительному стрессу

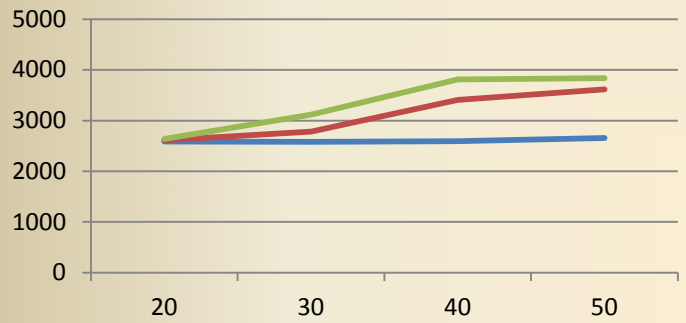
copA – промотор гена *CopA*, чувствительный к присутствия ионов меди и серебра

emr - стресс-нечувствительный промотор гена *emrR* , придающего устойчивость клеток к присутствию антибиотиков

Зависимость флуоресценции (отн.ед.) клеток со стрессо-чувствительными промоторами от времени, прошедшего после облучения (мин)

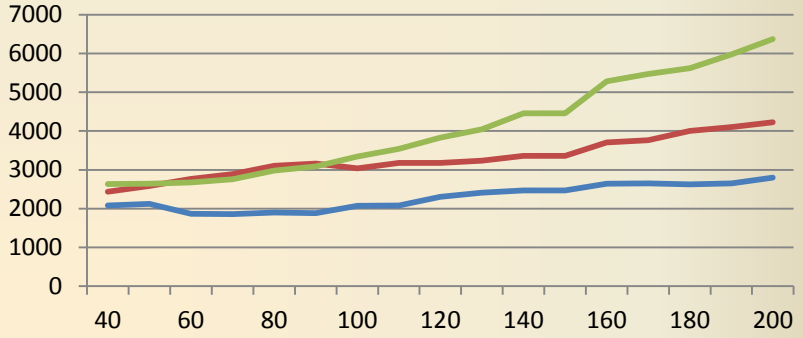
Клетки облучали с плотностью мощности излучения 1.4 Вт/см^2 в течение 15 мин.

-облученные клетки -положительный контроль -отрицательный контроль



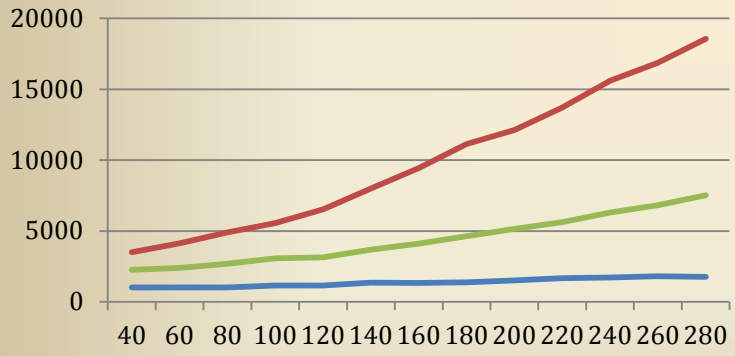
E.coli/pDps-gfp,

положительный контроль- индукция 5мМ H_2O_2



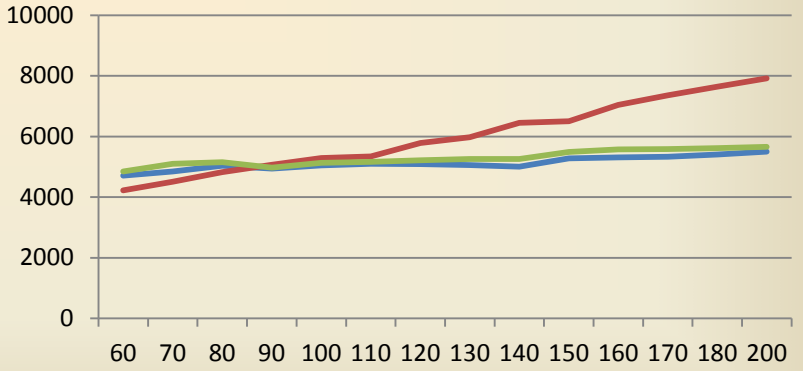
E.coli/pKatG-gfp,

положительный контроль- индукция 5мМ H_2O_2



E.coli/pCopA-gfp,

положительный контроль- индукция 12,5 мМ $CuSO_4$



E.coli/pEmrR-gfp,

положительный контроль- индукция 0,1 мМ салтциловая к-та

Таким образом, при активации промоторов генов dps, katG и copA в результате воздействия терагерцовым излучением задействованы механизмы генерализованного ответа клетки, включающего в себя, как минимум, две стрессовые системы: окислительного стресса и стресса от избытка ионов металлов.

Показано, что для некоторых геносенсоров характер ответной индукции Gfp-белка после облучения отличен от характера ответной реакции на специфический индуктор химической природы.

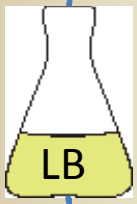
Геносенсор	Развитие ответной реакции на облучение	Уровень индукции
E.coli/pDps-gfp	Параллельно ответной реакции на специфический индуктор	Примерно одинаков у клеток положительно контроля и опыта
E.coli/pKatG-gfp	В течение длительного времени	В опыте более выражен, чем в положительном контроле
E.coli/pCopA-gfp	Параллельно ответной реакции на специфический индуктор	В опыте гораздо менее выражен, чем в положительном контроле
E.coli/pEmrR-gfp	Не наблюдалась	

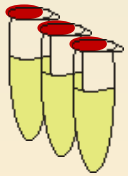
Различия в динамике ответа на терагерцовое излучение и специфические индукторы свидетельствуют о разных путях активации генных сетей стрессового ответа в случае индукции перекисными соединениями или катионами меди по сравнению с терагерцовым излучением. Отсутствие быстрого ответа облученных клеток, характерного для геносенсора *E.coli/pKatG-gfp* может свидетельствовать о том, что возможна опосредованная активация транскрипционных факторов окислительного стресса.

Схема эксперимента по краткосрочному облучению клеток *E.coli* штамма M17 терагерцовым излучением

контроль

1б. Контроль фиксировали порциями, соответствующими по времени культивирования порциям опыта



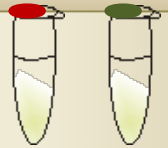


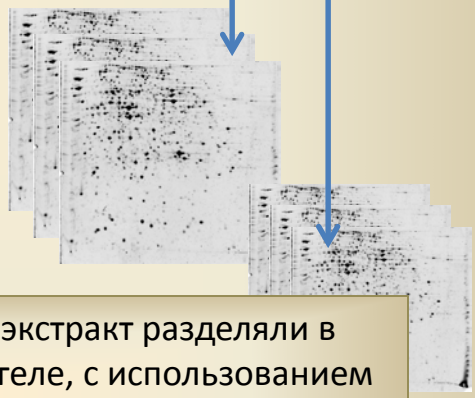
2. Порции фиксировали 50% этанолом и объединяли. Клетки осаждали, промывали и лизировали

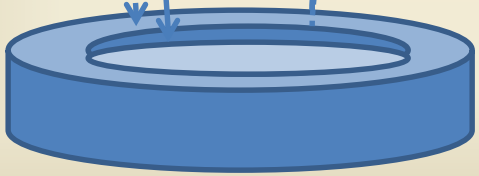
опыт

1.4 Вт/см^2
130 мкм
T= 36±2°C
t=10 мин
THz

1а$_2$. Инкубация для развития ответа T=37°C t=5 мин



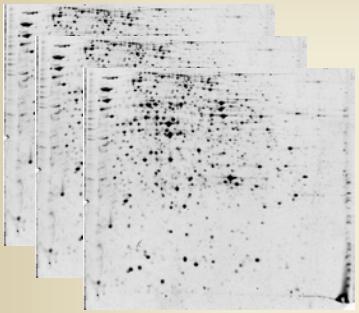




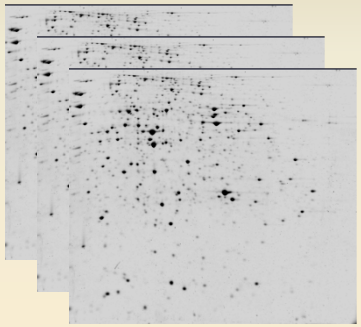
3. Суммарный белковый экстракт разделяли в двумерном 12% ПААГ-ДСН геле, с использованием для 1-го направления стрипов pH=5-8 (17 см). Гели окрашивали и визуализировали VersaDoc MP4000

1а$_1$. Облучали несколько порций (по 50 мкл) клеток в логарифмической фазе роста

Схема поиска и определения белков, продукция которых изменяется при облучении культуры клеток ТГц-излучением

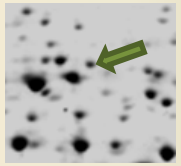


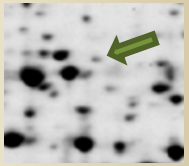
Программа PDQest



1. Сравнение снимков гелей. Параметры: Δ≥1,5 раз, p<0,01 (критерий Стьюдента).

UP regulation

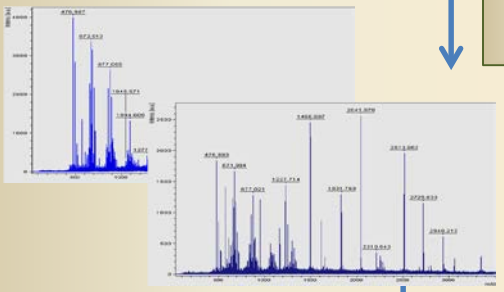




Glutamine synthetase

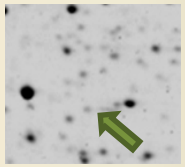
метод MALDI

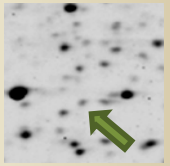
2. Триптический гидролиз в геле соответствующих фракций



3. Пептидный состав белков с измененной экспрессией под воздействием THz
(прибор Ultraflex Tof Tof (Bruker Daltonics)
матрица α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid)

DOWN regulation

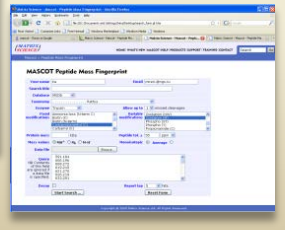




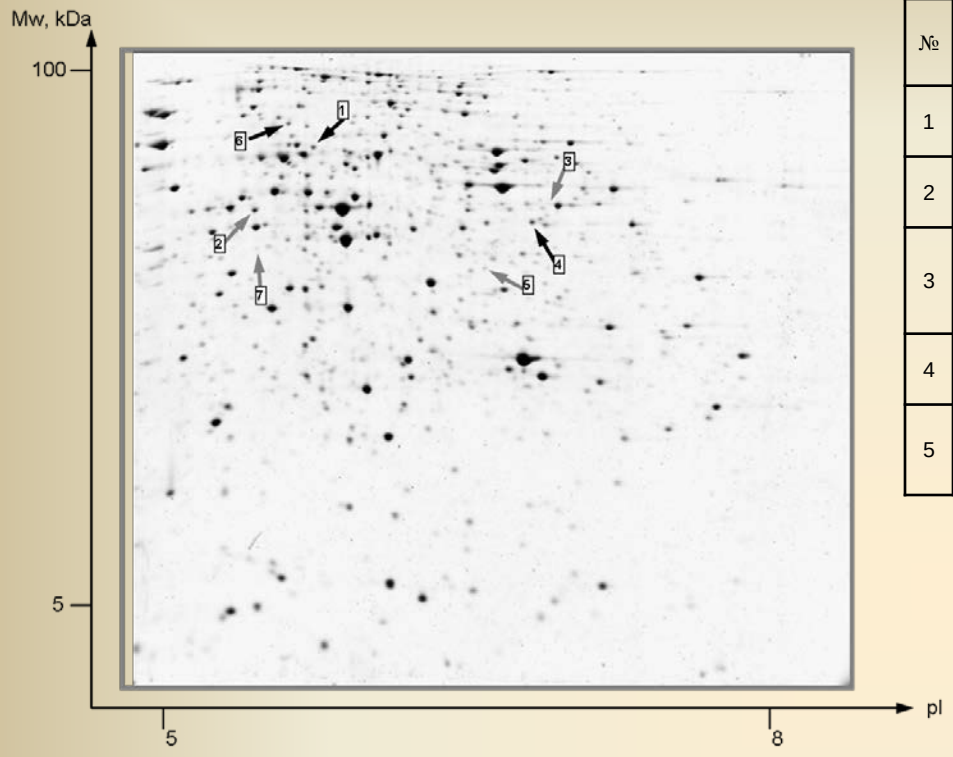
Threonine dehydratase

программа MASCOT

база данных NCBI



4. Восстановление первичных структур белков и их точная идентификация



№		Идентифицированный белок	regulation	Mw, kDa	pI	Seq Cov	Score
1	GLNA_ECO57	Glutamine synthetase	up	5.26	111	57%	51871
2	DEOB_ECO58	Phosphopento-mutase	down	5.11	96	38%	44342
3	GLYA_ECO57	Serine hydroxymethyl-transferase	down	6.03	111	52%	45316
4	ISCS_ECO57	Cysteine desulfurase	up	5.94	89	43%	45061
5	THD2_ECO57	Threonine dehydratase	down	5.75	116	69%	35210

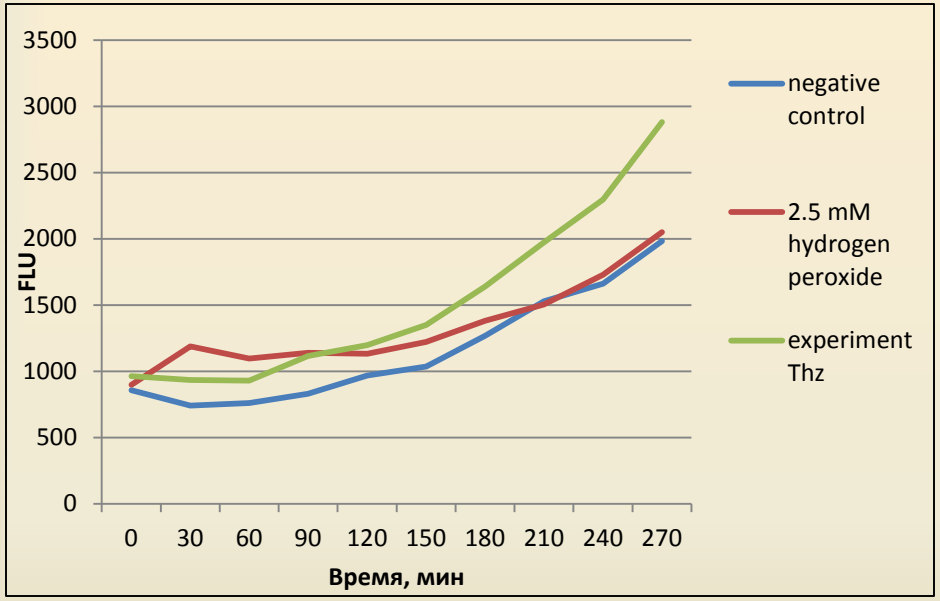
Электрофореграмма в двумерном 12% ПААГ-ДСН суммарного белка *E. coli* M17, окраска Sypro Ruby. Отмечены фракции с достоверно изменяющейся экспрессией ($p<0,01$, более чем в 1,5 раза) после воздействия терагерцового излучения. Сравнение проводили по 4-ем биологическим повторам.

В результате краткосрочного воздействия терагерцового излучения на культуру *E.coli* M17 происходит изменение экспрессии ферментов метаболизма аминокислот и нуклеотидов бактерии.

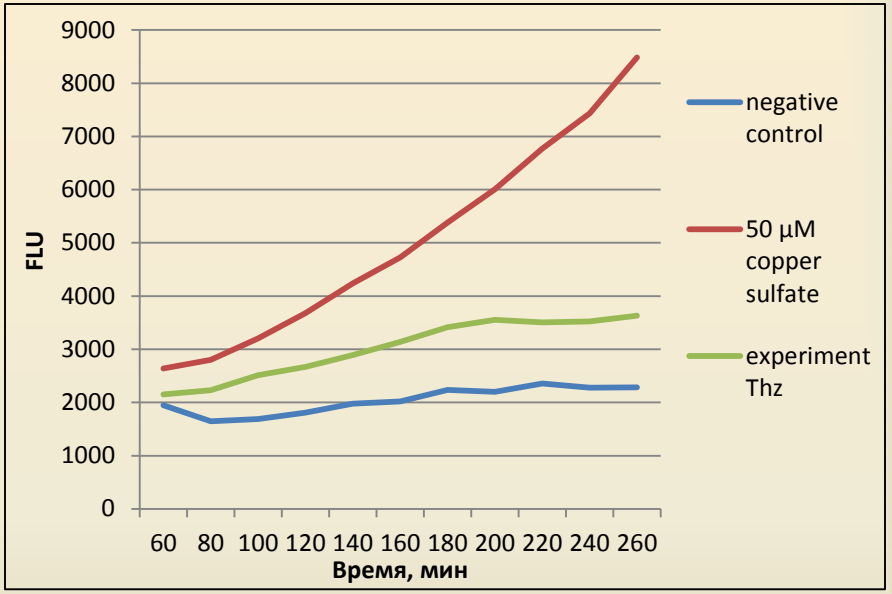
Индукция флюоресценции клеток геносенсора после добавления облученной минимальной среды

Минимальную среду М9 облучали в течение 15 мин, затем добавляли равный объем клеток и измеряли флюоресценцию.

- *E. coli/katG-gfp*



- *E. coli/copA-gfp*



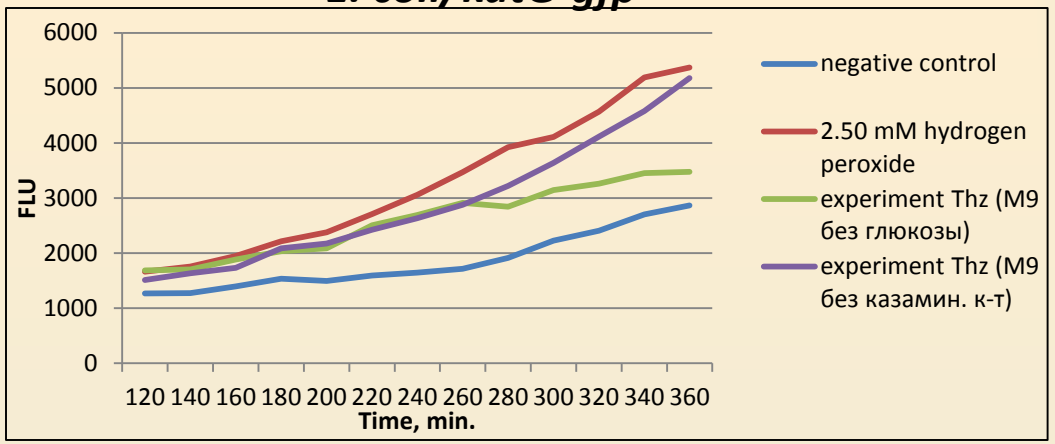
Развитие ответной реакции геносенсоров при помещении клеток в облученную среду М9 воспроизводит ответную реакцию геносенсоров облученных клеток.

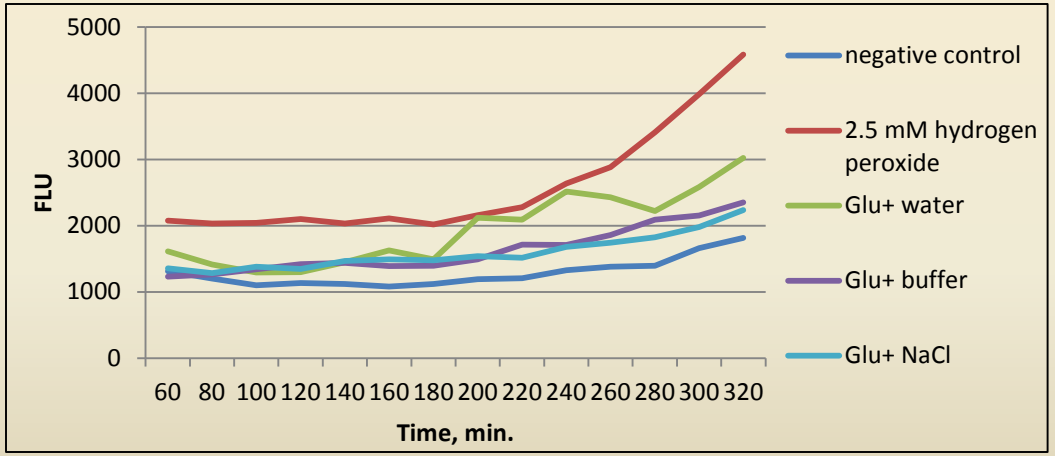
Зависимость ответной реакции геносенсора, помещенного в облученную минимальную среду, от состава среды

Компонентный состав М 9

- Na_2HPO_4x 12 H_2O
- KH_2PO_4
- NaCl
- NH_4Cl
- $MgSO_4$
- $CaCl_2$
- Глюкоза
- Казаминовые кислоты
- H_2O

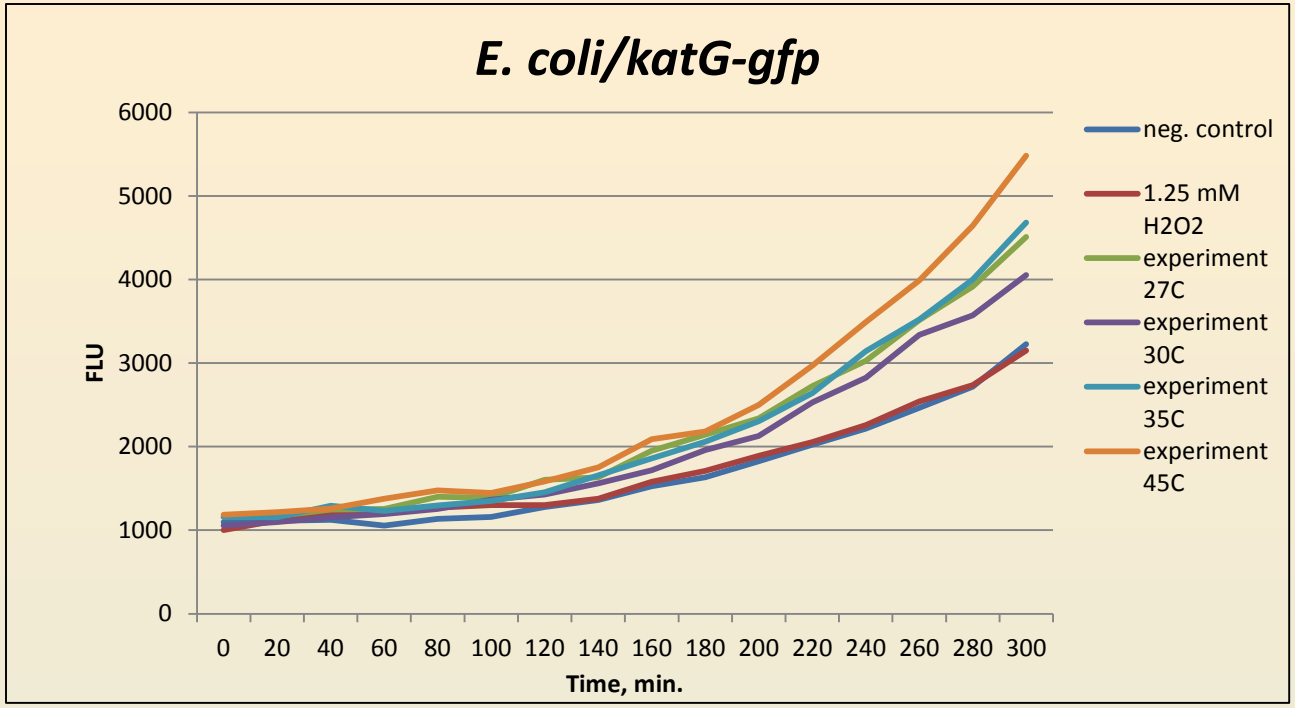
E. coli/katG-gfp





Степень развития ответной реакции геносенсора зависит от наличия органической компоненты в среде М9.

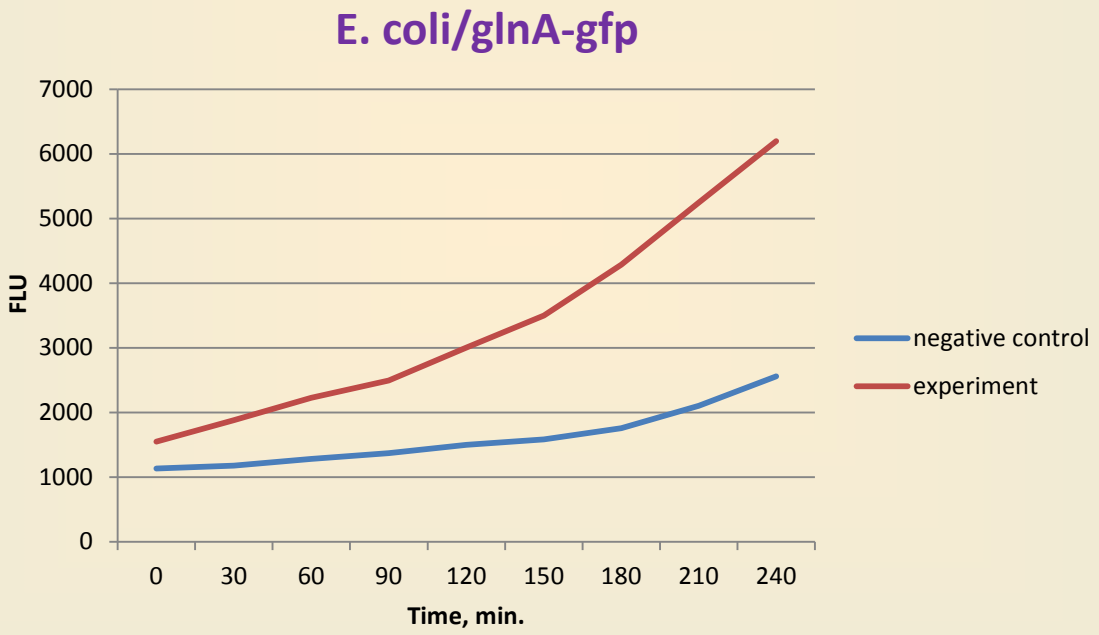
Зависимость уровня индукции флюоресцентного белка GFP от температуры облучения минимальной среды



С повышением температуры облучения среды М9 уровень индукции геносенсора растет.

Индукция GFP после добавления облученной минимальной среды к геносенсору *E. coli/glnA-gfp*

Используя промотор гена glnA чей продукт реагирует на THz облучение мы сконструировали геносенсор *E.coli/glnA-gfp*. Минимальную среду M9 облучали в течение 15 мин. Затем добавляли равные объемы бактериальной культуры и измеряли уровень флуоресценции.



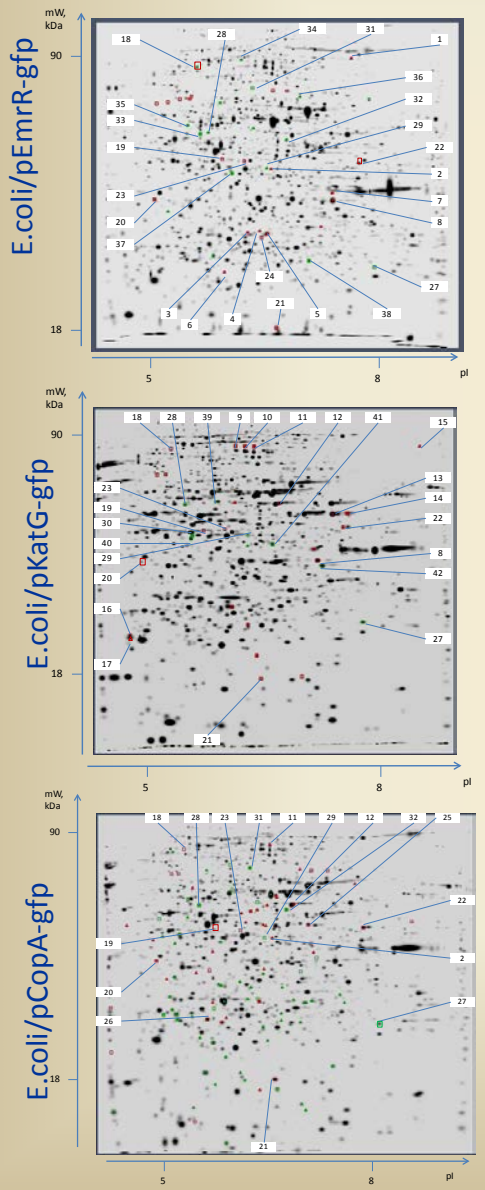
Активация промотора гена glnA после воздействия облученной среды M9 подтверждает увеличение экспрессии glutamine synthetase, выявленное протеомным анализом.

Протеомное профилирование стрессовых ответов клеток геносенсоров *E.coli/pKatG-gfp, E.coli/pCopA-gfp, E.coli/pEmrR-gfp*

M9 облученная THz излучением	Химические индукторы (положительный контроль)	Отрицательный контроль
1а. Несколько порций среды M9 (50 µl) облучали по 15 мин при плотностьи мощности излучения 0.8 W/см^2, длине волны 130 мкм, T = 36 ± 2°C. Облученные порции среды объединяли и хранили 14 часов при + 4 ° C.	1б. Среду M9 хранили 14 часов при +4°C. Затем добавляли специфические индукторы: 1) 0,006 мМ H_2O_2 2) 0,125 мМ $CuSO_4$ 3) 0,1 мМ салициловую кислоту	1в. Среду M9 хранили 14 часов при +4°C.
2. К культурам клеток *E.coli/pKatG-gfp, E.coli/pCopA-gfp, E.coli/pEmrR-gfp* геносенсоров, находящихся в ранней логарифмической фазе роста добавляли равные объемы облученной среды M9 и контрольных сред. Клетки культивировали в течении 5–и часов, при этом культуры оставались в логарифмической фазе роста. Затем клетки осаждали и лизировали.		
3. Белковые экстракты разделяли в двумерных 12% ПААГ-ДСН гелях, используя для 1-ого направления стрипы pH 5-8 (17 см). Гели окрашивали флуоресцентным красителем Sypro Ruby и визуализировали системой VersaDoc MP4000. Для каждого эксперимента было сделано по три технических повтора.		
4. Сравнение снимков гелей выполняли при помощи программы PDQues. Фракции с различиями в экспрессии более чем в два раза ($p<0.01$, t-test) вырезали из геля и идентифицировали масс-спектрометрически.		

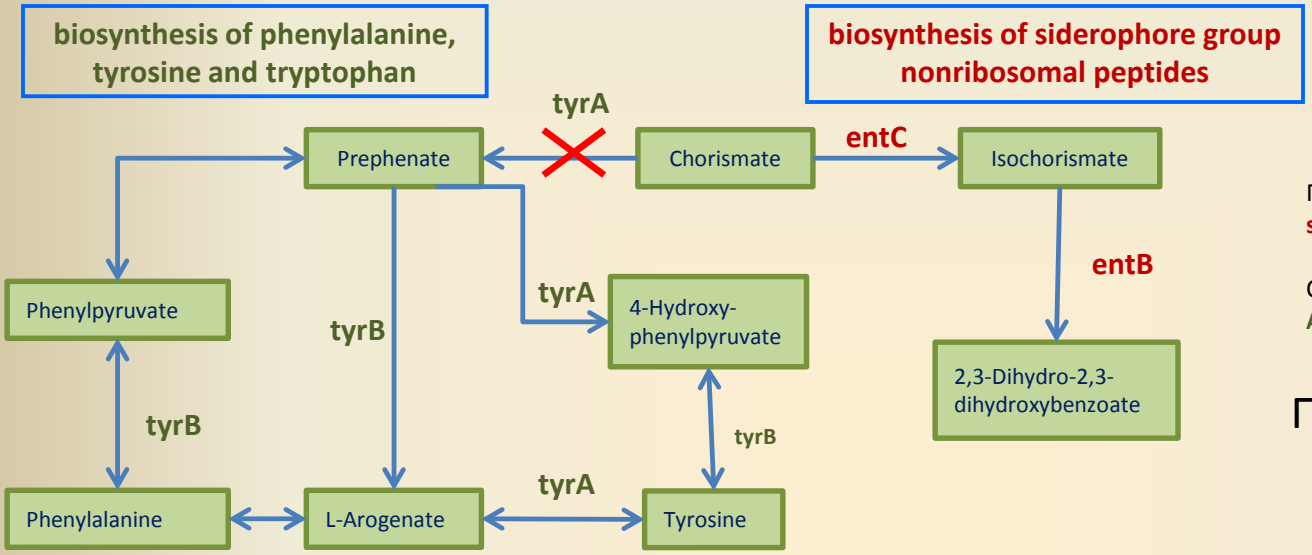
Двумерные протеомные карты ответа клеток E.coli/pKatG-gfp, E.coli/pCopA-gfp, E.coli/pEmrR-gfp на воздействие специфических индукторов (0,006 мМ H_2O_2 , 0,125 мМ $CuSO_4$, 0.1 мМ салициловая к-та, соответственно) и облученной среды М9.

Красным - повышение экспрессии, **зеленым** - снижение. Номера фракций соответствуют номерам белков в Таблице



							induction					
							THz medium			chemical inducers		
	name	ID	score	Mr	pI	sc	EmrR	katG	copA	EmrR	katG	copA
1	Probable dimethyl sulfoxide reductase chain YnfF	YNFF_ECOLI	75	89930	6.56	20%						
2	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	CFA_ECOLI	99	43881	5.69	41%						
3	Beta-lactamase TEM	BLAT_ECOLX	84	31495	5.69	37%						
4	Pyridoxine 5'-phosphate synthase	PDXJ_ECOL6	64	26344	5.49	49%						
5	Green fluorescent protein	GFP_AEQVI	140	26869	5.67	58%						
6	Orotate phosphoribosyltransferase	PYRE_ECO27	94	23552	5.33	42%						
7	Aspartate carbamoyltransferase	PYRB_ECO55	112	34388	6.12	40%						
8	Aspartate carbamoyltransferase	PYRB_ECO24	167	34406	6.12	61%						
9	Formate acetyltransferase	PFLB_ECOLI	118	85303	5.69	33%						
10	Formate acetyltransferase	PFLB_ECOLI	235	85303	5.69	44%						
11	Formate acetyltransferase	PFLB_ECOLI	250	85303	5.69	40%						
12	Tryptophanase	TNAA_ECOSM	205	52708	5.88	54%						
13	Green fluorescent protein	GFP_AEQVI	105	26869	5.67	55%						
14	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase D	RLUD_ECO57	67	37098	6.31	30%						
15	Maltodextrin phosphorylase OS=Escherichia coli	PHSM_ECOLI	158	90466	6.94	35%						
16	Alkyl hydroperoxide reductase subunit	AHPC_ECO57	78	20748	5.03	52%						
17	Alkyl hydroperoxide reductase subunit	AHPC_ECO57	66	20748	5.03	43%						
18	Ferrienterobactin receptor	FEPA_ECOLI	86	82056	5.39	33%						
19	Cation efflux system protein	CUSB_ECO57	113	44295	6.26	43%						
20	Isochorismatase	ENTB_ECO57	89	32533	5.05	41%						
21	Molybdenum cofactor biosynthesis protein	MOAB_ECO57	99	18654	5.73	55%						
22	L-lactate dehydrogenase [cytochrome]	LLDD_ECO7I	134	42687	6.33	52%						
23	Isochorismate synthase	ENTC_ECO57	96	42905	5.49	47%						
24	NADPH-dependent ferric-chelate reductase	YQJH_ECOLI	41	28854	5.53	29%						
25	Cysteine desulfurase	ISCS_ECO24	108	45061	5.94	34%						
26	Thiazole synthase	THIG_ECOBW	77	26879	5.36	53%						
27	Molybdate-binding periplasmic protein	MODA_ECOLI	217	27347	7.82	72%						
28	Threonine synthase	THRC_ECOLI	181	47084	5.24	53%						
29	T-protein	TYRA_ECOLI	80	42016	5.68	38%						
30	Aromatic-amino-acid aminotransferase	TYRB_ECOLI	69	43510	5.32	28%						
31	Hydrogenase-1 large chain	MBHL_ECOLI	95	66211	5.61	29%						
32	Serine hydroxymethyltransferase	GLYA_ECO24	75	45288	6.03	34%						
33	Argininosuccinate synthase	ASSY_ECO24	122	49915	5.23	43%						
34	Bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase 1	AK1H_ECOLI	139	89064	5.47	35%						
35	Glutamate decarboxylase alpha	DCEA_ECOL6	103	52651	5.22	39%						
36	L-aspartate oxidase	NADB_ECOLI	62	60299	5.89	29%						
37	Ornithine carbamoyltransferase	OTC_ECOL6	123	36728	5.89	32%						
38	ABC transporter arginine-binding protein	ARTJ_ECOLI	78	26813	6.84	48%						
39	D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit GatZ	GATZ_ECO24	68	47079	5.5	26%						
40	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	DHAS_ECO57	67	39992	5.37	26%						
41	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	SYFA_ECO24	186	36809	5.79	56%						
42	Dipeptide transport ATP-binding protein DppD	DPPD_ECO57	89	35821	6.15	33%						

Метаболические пути и биологические процессы, в которые вовлечены дифференциально экспрессируемые после воздействия облученной среды белки



Повышение экспрессии: **Isochorismate synthase (entC), Isochorismatase (entB)**

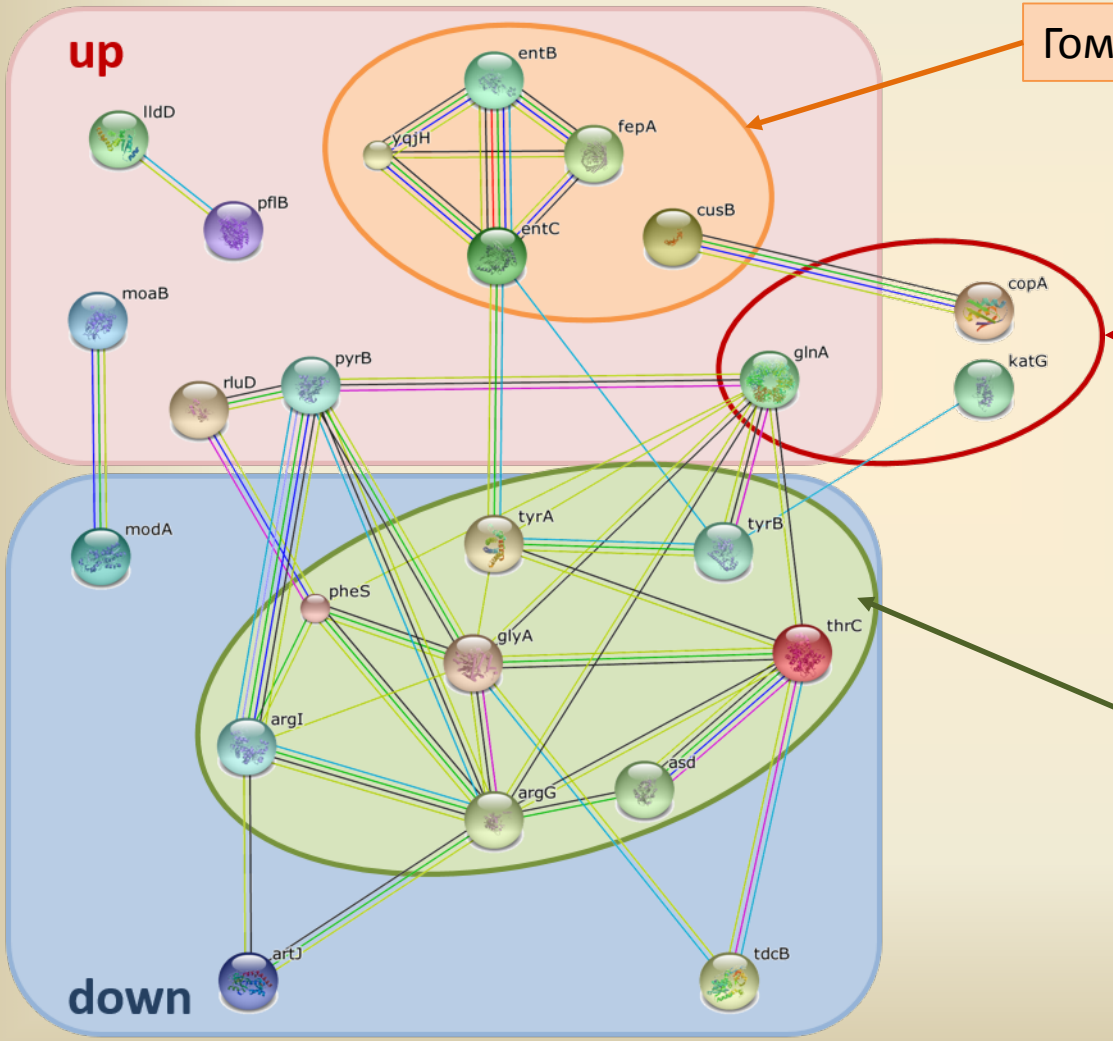
Снижение экспрессии: **T-protein (tyrA), Aromatic-amino-acid aminotransferase (tyrB)**

Построено при помощи базы данных KEGG

GO biological process complete	gene	Fold Enrich ment	P value	Δ
cellular transition metal ion homeostasis	3	> 5	0.0184	+
alpha-amino acid biosynthetic process	7	> 5	0.0000344	-
organic acid biosynthetic process	7	> 5	0.000523	-
organonitrogen compound biosynthetic process	9	> 5	0.0017	-
oxoacid metabolic process	8	> 5	0.0338	-
tyrosine biosynthetic process	2	> 5	0.0368	-

Построено при помощи Gene Ontology и системы PANTHER

Физические и функциональные взаимодействия дифференциально экспрессируемых в ответ на облученную среду белков (построено при помощи базы данных STRING)

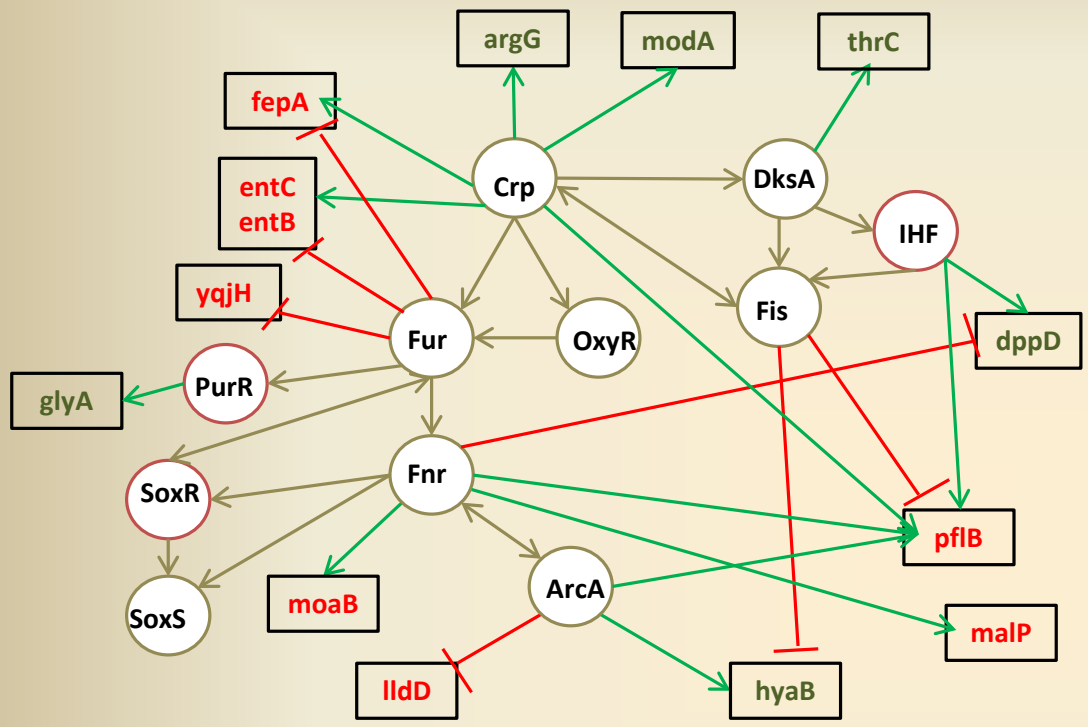


Гомеостаз переходных металлов

Гены, промоторы которых чувствительны к излучению (геносенсоры)

Метаболизм аминокислот

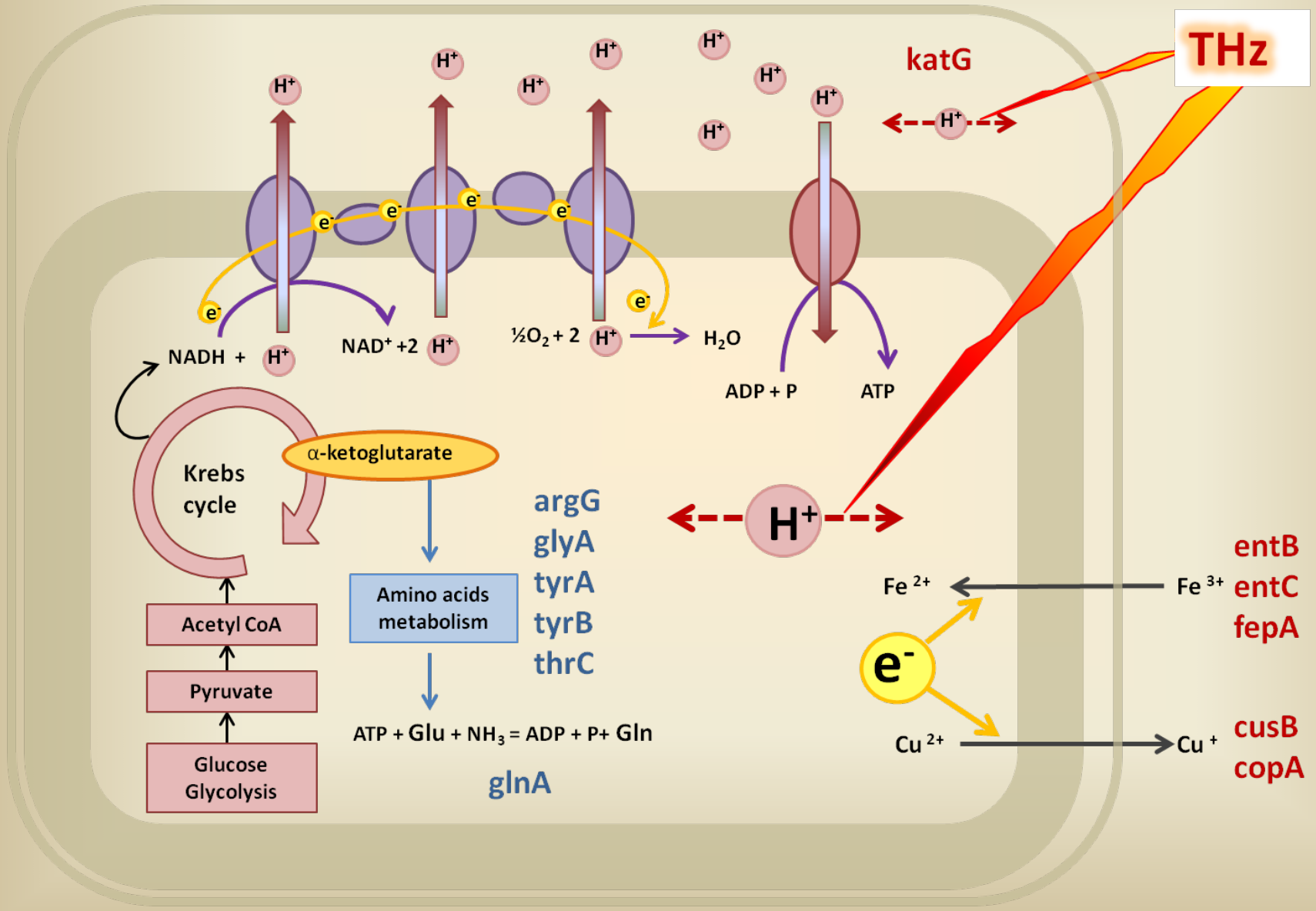
Регуляторная схема генов, вовлеченных в ответ клеток E.coli cells на облученную среду (построено при помощи базы данных EcoCyc и дифференциального протеомного анализа)



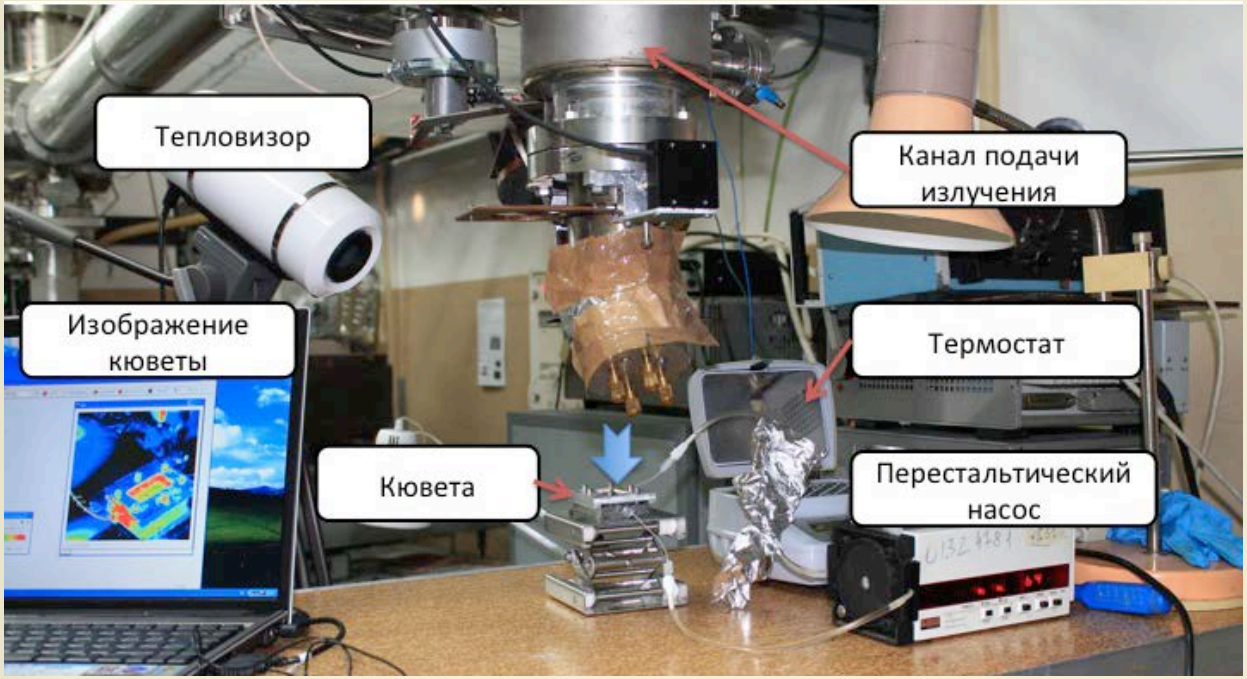
fepA	Ferrienterobactin receptor
entB	Isochorismatase
moaB	Molybdenum cofactor biosynthesis protein
lldD	L-lactate dehydrogenase [cytochrome]
entC	Isochorismate synthase
yqjH	NADPH-dependent ferric-chelate reductase
pflB	Formate acetyltransferase
malP	Maltodextrin phosphorylase
modA	Molybdate-binding periplasmic protein
thrC	Threonine synthase
hyaB	Hydrogenase-1 large chain
argG	Argininosuccinate synthase
glyA	Serine hydroxymethyltransferase
dppD	Dipeptide transport ATP-binding protein DppD

Fur-Fe^{2+} controls the transcription of genes involved in iron homeostasis.
FNR mediates the transition from aerobic to anaerobic growth through the regulation of hundreds of genes.
CRP involved in many processes, regulates the expression of genes involved in the catabolism of secondary carbon sources
DksA "dnaK suppressor“, RNA polymerase-binding transcription factor DksA.
Fis regulates the expression of many genes involved in translation, metabolic processes, stress response, amino acid biosynthesis, transport, cell structure, motility, and chemotaxis.
PurR dimer controls several genes involved in purine nucleotide biosynthesis
IHF affects processes such as DNA replication, recombination, and the expression of many genes.
OxyR regulator for the expression of antioxidant genes in response to oxidative stress.
SoxR the transcription of the regulon involved in defense against redox-cycling drugs and in responses to nitric oxide.
SoxS participates in the removal of superoxide and nitric oxide and protection from organic solvents and antibiotics.

Нетермическое воздействие терагерцового излучения на метаболические системы E.coli



Биологическая станция в Сибирском центре синхротронного и терагерцового излучения. Облучение проточной кюветы

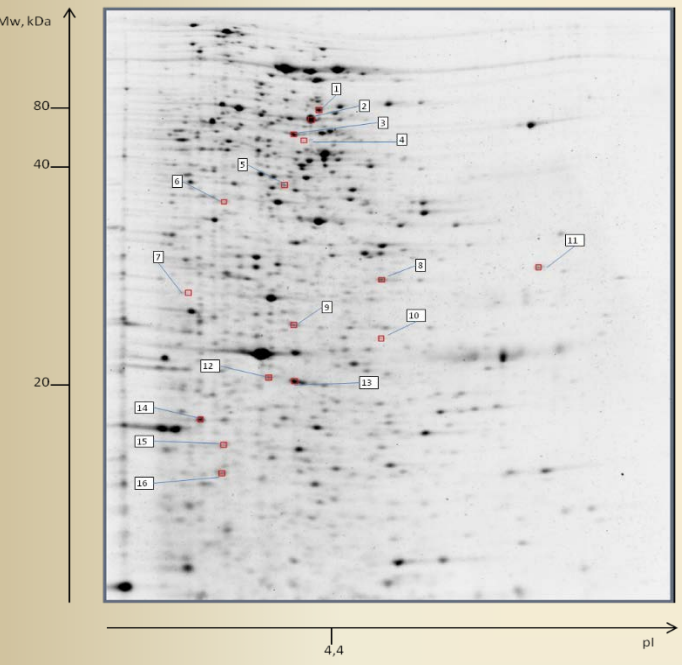


Голубой стрелкой отмечено направление подачи излучения. На экране монитора видно ИК – изображение кюветы. В кювете организовано непрерывное движение жидкости при помощи перестальтического насоса.

Проточная кювета предназначена для длительного облучения больших объёмов образцов. Изготовлена из инвара с напылением кварцевого стекла слоем ≈ 1 мкм. Облучение производится через крышку - пластину высокоомного кремния ≈ 2 мм. Кювета посредством силиконовых шлангов соединена с пробиркой, в которой осуществляется аэрация культуры. Общий объем системы ≈ 5 мл.

Эксперимент по длительному облучению клеток архей *Halorubrum* sp. штамм Н3 терагерцовым излучением в проточной кювете

Культуру клеток облучали в течение 5 часов при длине волны 130 мкм и средней плотности мощности излучения 0,8 Вт/см^{2,} температуру поддерживали на уровне 42±2°С. Контроль культивировали при 42°С в проточной кювете в течение 5 часов.



№	название	Mw	pI	score	s.c.	regulation
1	Translation elongation factor 2	41473	4.67	137	41%	down
2	Translation elongation factor 1 alpha subunit	47629	4.36	181	53%	down
3	Translation elongation factor 1 alpha subunit	47629	4.36	140	46%	down
5	Glycosyltransferase	37455	4.33	113	41%	up
6	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha subunit	26724	4.15	54	26%	down
13	Adenine phosphoribosyltransferase	20841	4.33	78	49%	down
12	Thiosulfate sulfurtransferase 2C rhodanese	34809	4.34	75	38%	down

В результате воздействия электромагнитного излучения терагерцового диапазона на культуру архей происходит:

- Снижение экспрессии белков, контролирующих процесс трансляции.
- Снижение уровня некоторых ферментов метаболизма.

Эксперименты по облучению плюрипотентных стволовых клеток человека ESMK05 терагерцовым излучением в камере OptiCell

Камера OptiCell (NUNC, США) состоит из двух полистирольных газопроницаемых мембран (75 мкм) натянутых на рамку. Расстояние между мембранами 2 мм, объём камеры 10 мл

Клетки облучали через слой полистерольной мембраны OptiCell в течение часа THz излучением с длиной волны 130 мкм и средней плотностью мощности 1.4 Вт/см^2, температуру поддерживали на уровне 36.5–37.5°C. Контрольную камеру с клетками инкубировали в течении 1 часа при 37°C.

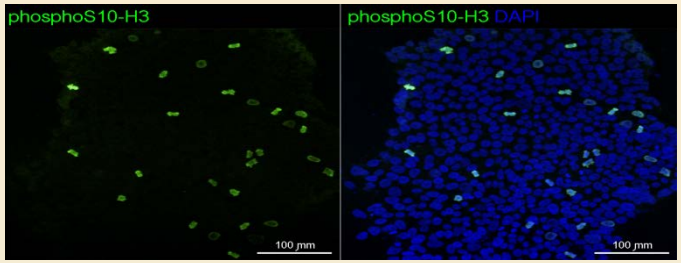
Результаты цитогенетического анализа частоты нестабильных хромосомных аберраций в ЭСК (hESMK05) после воздействия терагерцового излучения

	Кол-во клеток	Клеток с аберрациями, на 100 клеток, ±SE (кол-во)	Частота аберраций хромосомного типа, на 100 клеток, ±SE (кол-во)	Частота аберраций хроматидного типа, на 100 клеток, ±SE (кол-во)
Контроль	430	2.1 ± 0.7 (9)	0.2 (1)	2.3 ± 0.7 (10)
Терагерц. излучение	475	2.3 ± 0.7 (11)	0.6 ± 0.4 (3)	2.1 ± 0.7 (10)

Достоверных отличий не обнаружено.

Влияние терагерцового излучения на митотический индекс и частоты индукции двунитевых разрывов ДНК

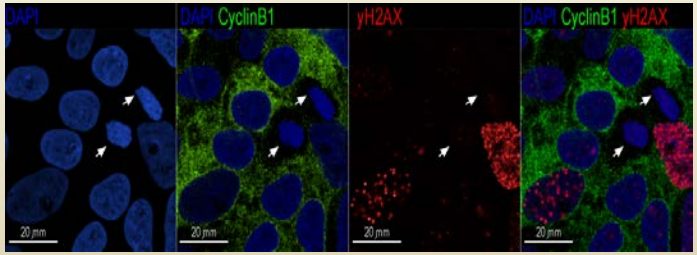
Клетки облучали 1 час при вт/см. Облучённые и контрольные клетки фиксировали 4% PFA/PBS, затем пермеабилизировали при помощи 0.5% TritonX100/PBS. Препараты инкубировали с первичными антителами (Antiphospho-Histone H2A.X (Ser139) Antibody, clone JBW301 (Millipore), Anti-Histone H3 (phospho S10) antibody (Abcam), растворёнными в блокирующем растворе (2.5% BSA/PBS/0.1%Tween20), в течение 12-16 часов при 4°C.



	Кол-во клеток	Кол-во митотич. кл	Митотич. индекс	Средн.митотич. индекс
Опыт-1	5985	188	3.1±0.2	
Опыт-2	5343	175	3.3±0.2	**3,2 ± 0,1**
Контроль-1	5811	196	3.4±0.2	
Контроль-2	5215	143	2.7±0.2	**3,1 ± 0,4**

Достоверных отличий не обнаружено.

Иммуноцитохимическое окрашивание необлучённых
ЭСК hESMK05 с антителами к фосфорилированному гистону H3 (зелёный цвет), ядра окрашены DAPI (синий цвет).



	Кол-во клеток	Всего фокусов γH2AX	Частота γH2AX на клетку	Средняя частота γH2AX на клетку
Опыт-1	40	109	2.7 ± 0.5	
Опыт-2	32	176	5.5 ± 1.1	**4.1 ± 1.4**
Контроль-1	30	123	4.1 ± 0.6	
Контроль-2	30	100	3.3 ± 0.4	**3.7 ± 0.4**

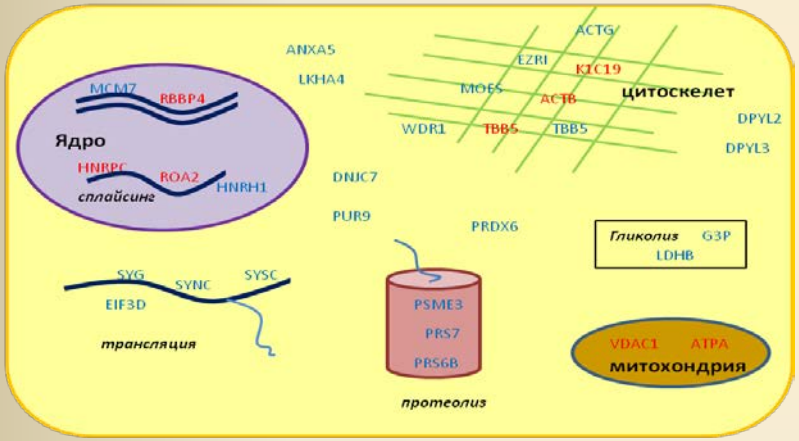
Достоверных отличий не обнаружено.

Двойное иммуноцитохимическое окрашивание необлучённых
ЭСК hESMK05 с антителами к фосфорилированному гистону γH2AX (красный цвет) и циклину B1 (зелёный цвет), ядра окрашены DAPI (синий цвет). Белыми стрелками указаны только что поделившиеся клетки, в которых проводился подсчёт фокусов γH2AX.

Список белков эмбриональных стволовых клеток человека ESMK05, экспрессия которых изменилась в ответ на облучение

Up regulation

ATPA ATP synthase subunit alpha, mitochondrial (16)
K1C19 Keratin, type I cytoskeletal 19 (25)
HNRPC Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 (26)
RBBP4 Histone-binding protein RBBP4 (21)
TBB5 Tubulin beta chain (22)
ACTB Actin, cytoplasmic 1 (24)
ROA2 Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (18)
VDAC1 Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (19)



Белки, экспрессия которых повышается в ответ на облучение ТГИ, обозначены красным цветом. Белки, экспрессия которых снижается – синим.

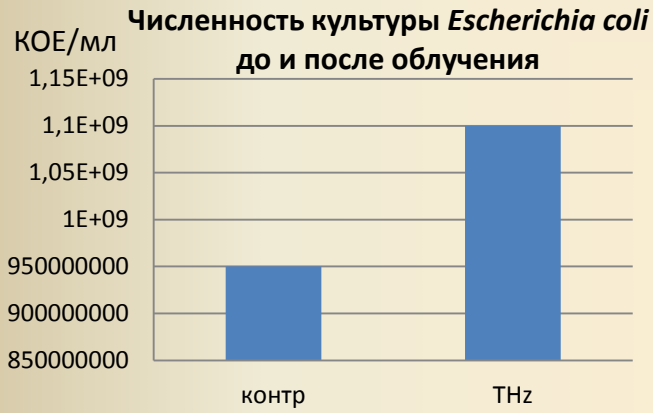
Down regulation

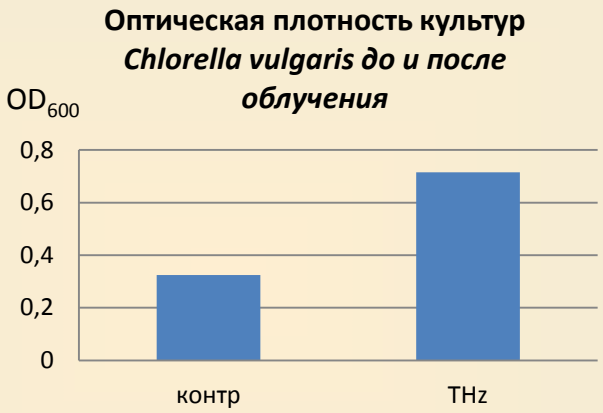
MCM7 DNA replication licensing factor MCM7 (1)
EZRI Ezrin (2)
SYG Glycine--tRNA ligase (3)
MOES Moesin (4)
EIF3D Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D (5)
LKHA4 Leukotriene A-4 hydrolase (6)
DPYL2 Dihydropyrimidinase-related protein (7)
SYNC Asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic (8)
WDR1 WD repeat-containing protein 1 (9)
PUR9 Bifunctional purine biosynthesis protein PURH (10)
DPYL3 Dihydropyrimidinase-related protein 3 (11)
SYSC Serine--tRNA ligase, cytoplasmic (12)
DNJC7 DnaJ homolog subfamily C member 7 (13)
HNRH1 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (14)
PRS7 26S protease regulatory subunit 7 (15)
G3P Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (17)
TBB5 Tubulin beta chain (20)
PRS6B 26S protease regulatory subunit 6B (23)
ACTG Actin, cytoplasmic 2 (27)
LDHB L-lactate dehydrogenase B chain (28)
ANXA5 Annexin A5 (29)
PSME3 Proteasome activator complex subunit 3 (30)
PRDX6 Peroxiredoxin-6 (31)

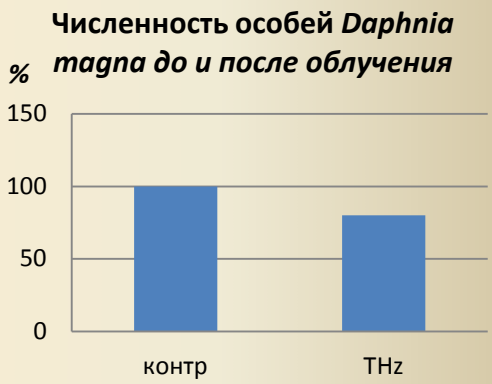
В результате воздействия ТГ излучения на стволовые клетки человека происходит изменение экспрессии функционально связанных между собой белков, вовлеченных в регулировку клеточного цикла и клеточной смерти, реализацию генетической информации, поддержание формы и энергетику клетки.

Оценка общего метаболического неблагополучия организмов *Escherichia coli, Chlorella vulgaris, Daphnia magna* под воздействием терагерцового излучения

Организмы облучали в течение часа при средней плотности мощности 1.4 Вт/см^2, температуру поддерживали на уровне 36±2°С (*Escherichia coli),* 28±2°С *(Chlorella vulgaris)* и 21±2°С *(Daphnia magna).*







ИТФ1 по Escherichia coli	ИТФ2 по Chlorella vulgaris	ИТФ3 по Daphnia magna	ИТФср	Класс токсичности
1,2	2,2	0,8	1,4	VI - стимуляция

Индекс токсичности (ИТФ) оцениваемого фактора: ИТФ = ТФо/ТФк, ТФо – значение регистрируемой тест-функции в опыте, ТФк – в контроле

На стандартной тест-системе было проверено влияние терагерцового излучения на метаболическое неблагополучие организмов разных трофических уровней.

Показано:

- Излучение в данном диапазоне не угнетает процесс размножения тест-организмов.
- В случае с *E. coli и C. Vulgaris* наблюдался стимулирующий эффект излучения на организмы.

По результатам иммуноцитохимических и цитогенетических исследований терагерцовое излучение на оказывает генотоксического действия на генетический материал и не обладает выраженным мутагенным эффектом. Незначительный мутагенный эффект наблюдали только при высокой дозе облучения (больше 610 Дж/см2).

Исследование воздействия излучения на стрессочувствительные системы клеток *E. coli* выявило активацию как минимум двух стрессовых систем: окислительного стресса и стресса от избытка ионов металлов.

Различия в динамике ответа на терагерцовое излучение и специфические индукторы свидетельствуют о разных путях активации генных сетей стрессового ответа в случае индукторов и терагерцового излучения. Характер ответа геносенсора *E.coli/pKatG-gfp может* свидетельствовать об опосредованной активации транскрипционных факторов окислительного стресса.

При этом показано, что развитие ответной реакции геносенсоров при помещении клеток в облученную среду М9 воспроизводит ответную реакцию геносенсоров облученных клеток. Степень развития ответной реакции геносенсора зависит от наличия органической компоненты в среде М9 и с повышением температуры облучения уровень индукции геносенсора растет.

Краткосрочное воздействия электромагнитного излучения терагерцового диапазона на культуру *E.coli* приводит к изменению экспрессии ферментов метаболизма аминокислот и нуклеотидов бактерии.

Длительное культивирование клеток *E.coli* в облученной среде оказывает влияние на процессы метаболизма аминокислот и гомеостаза переходных металлов. Происходит повышение экспрессии белков, вовлеченных в поддержание уровня железа в клетке и снижение экспрессии ферментов метаболизма аминокислот.

Длительное воздействие терагерцового излучения на культуру архей также приводит к снижению экспрессии белков, контролирующих процесс трансляции, и некоторых ферментов метаболизма.

В целом, излучение оказывает меньшее влияние на протеом экстремофильной культуры архей, чем на бактериальный протеом.

Воздействие излучения на эукариотические клетки приводит к более выраженным последствиям. Помимо снижения экспрессии белков, связанных с процессами транскрипции и трансляции, некоторых ферментов метаболизма и протеасомных белков, излучение влияет на экспрессию белков, регулирующих процессинг и сплайсинг пре-мРНК, генную экспрессию на транскрипционном и трансляционном уровнях, а также белков, связанных с цитоскелетом. Эти белки вовлечены в регулировку клеточного цикла и клеточной смерти, реализацию генетической информации, энергетику клетки, а также поддержание ее формы.

В основном, под воздействием терагерцового излучения происходило снижение экспрессии белков. При этом, в ответ на терагерцовое излучениене ни в одном эксперименте не наблюдалось изменение экспрессии белков теплового шока, таким образом обнаруженные изменения в протемном профиле вызваны нетермическим воздействием терагецового излучения.

Было показано также, что излучение в данном диапазоне длин волн не угнетает процесс размножения тест-организмов. Более того, в случае с *E. coli и C. Vulgaris* наблюдался стимулирующий эффект излучения на организмы.