

УДК 535.14, 57.043

ВОЗДЕЙСТВИЕ ТЕРАГЕРЦОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА РОСТ НЕЙРИТОВ

М.В. Цуркан, О.А. Смолянская, Н.Г. Брянцева

Исследовано воздействие широкополосного импульсного терагерцового излучения в диапазоне частот 0,05–2 ТГц на рост нейритов сенсорных ганглиев 10–12 дневных куриных эмбрионов. Описан дозозависимый эффект стимуляции роста нервных волокон.

Ключевые слова: терагерцовое излучение, терапия, медицина, клеточный рост, стимуляция, органотипическая культура ткани, нейрит.

Введение

Разработка новых источников терагерцового (ТГц) излучения с высокой спектральной чувствительностью и высоким разрешением позволила создать новые технологии в военной отрасли и системах безопасности, а также в биологии, химии и медицине. Уникальные свойства данного излучения заключаются в том, что в этом диапазоне находится значительная часть колебательно-вращательного спектра воды и многих органических молекул, в том числе биологически активных макромолекул (белков и нуклеиновых кислот), а так же частоты межмолекулярных взаимодействий. Однако энергии данного излучения недостаточно для тепловой вибрации, диссоциации межатомных связей и химических преобразований сложных молекул [1]. В связи с такими особенностями ТГц излучения публикации, посвященные его применению, в основном связаны с разработкой методов спектральных исследований молекул в дальнем ИК диапазоне спектра, где наблюдается большое число линий поглощения. Было показано, что сложные биологические молекулы, в том числе ДНК и РНК, также имеют поглощение в ТГц диапазоне частот [2, 3].

Применение источников ТГц излучения в различных областях, в том числе биологии и медицине, с каждым годом увеличивается. Вместе с этим увеличивается и потребность в более глубоком понимании механизмов этих взаимодействий и их возможных последствий, как положительных, так и отрицательных. Это отражено в увеличивающемся в последние годы количестве работ, связанных с исследованием возможных эффектов, которые вызваны поглощением этого излучения разнообразными биологическими объектами на различных уровнях биологической организации. Многие исследования проведены в

рамках масштабного европейского проекта THz-BRIDGE, который направлен на фундаментальное изучение воздействия ТГц излучения на биологические объекты [4].

Число работ, посвященных изучению влияния взаимодействия электромагнитного излучения ТГц частоты с собственно биологическими объектами относительно не велико. Однако в последние пять лет наблюдается рост количества работ в этом направлении, что связано с распространением источников ТГц излучения и возможностью их применения для спектроскопии в целях медицинской диагностики. Исследуются вопросы безопасности применения ТГц излучения.

Ряд работ, в которых применяется ТГц излучение различной длины волны и плотности мощности, посвящен изменению морфологии и жизнеспособности клеток [5–10], а также способности сохранять мембранный потенциал [11–16]. Авторами этих исследований отмечается как стимулирующий, так и угнетающий эффекты ТГц излучения на клеточные системы. Представлены разнонаправленные данные, которые не могут быть однозначно интерпретированы по отношению к влиянию ТГц излучения на биологические объекты.

Несмотря на возросшее количество научных направлений, посвященных практическому применению ТГц излучения, вопрос о фундаментальном обосновании возможности использования ТГц излучения для воздействия на биологические системы, в особенности на нервную систему, все еще открыт. Механизм данного воздействия до сих пор не изучен, в том числе не определены дозы и время облучения. В рамках данного вопроса на первом этапе необходимо выявить эффекты, возникающие в сложно организованных молекулярных системах – нервных клетках – при действии такого излучения.

Экспериментальная установка

В работе авторами применена специально разработанная в Санкт-Петербургском национальном исследовательском университете информационных технологий, механики и оптики (НИУ ИТМО) методика [17]. Оптическая схема эксперимента (рис. 1) основана на облучении кристалла InAs фемтосекундным волоконным лазером EFOA-SH.

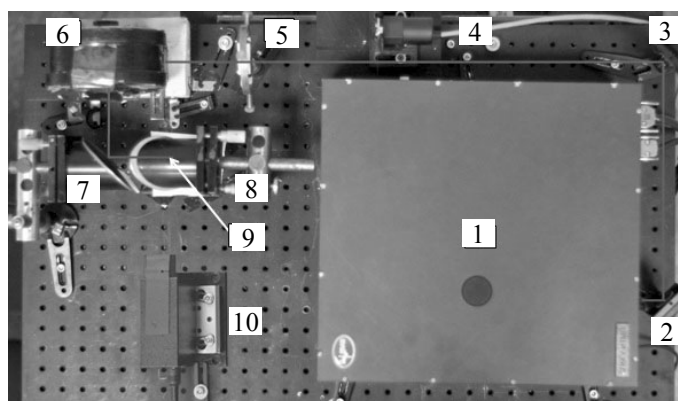


Рис. 1. Фотография оптической схемы установки: 1 – лазер; 2, 3 – система зеркал; 4 – механический модулятор; 5 – линза; 6 – магнит; 7, 8 – параболические зеркала; 9 – объект; 10 – оптико-акустический приемник

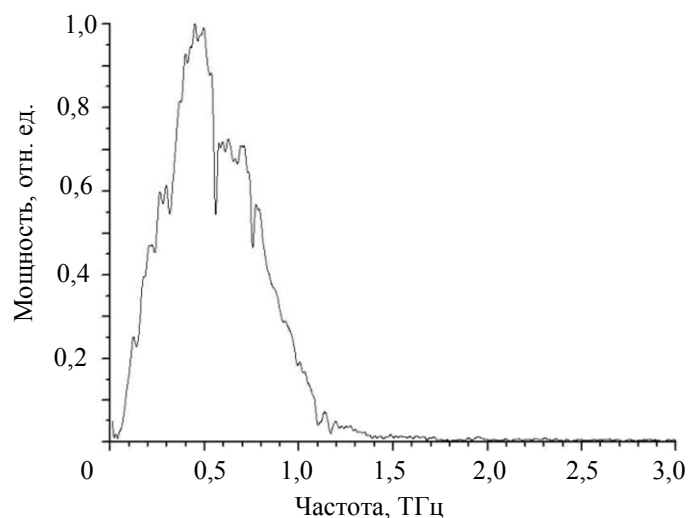


Рис. 2. Распределение мощности в импульсе

Лазер работает в импульсно-периодическом режиме с частотой повторения 50 МГц на длине волны $\lambda = 1,56$ мкм. Типичная длительность одного импульса составляет 125 фс, мощность излучения – 120 мВт. Излучение лазера 1 проходит систему зеркал 2, 3. Перед тем как попасть на кристалл, оно строится механическим модулятором 4 с частотой 13 Гц, а затем фокусируется линзой 5 на кристалл InAs, помещенный в магнит 6 для увеличения эффективности генерации. Мощность фемтосекундного излучения на входе в кристалл InAs составляла в эксперименте 120 мВт. Лазерное излучение фемтосекундной длительности создает свободные носители заряда, движение которых в магнитном поле генерирует ТГц излучение. Расходящееся ТГц излучение селектируется от излучения накачки с помощью фильтра из фторопласта, собирается внеосевыми параболическими зеркалами 7, 8 и направляется на чашку Петри с объектом 9. Генерируемое ТГц излучение имело полосу частот 0,05–2 ТГц. Мощность ТГц излучения измерялась с помощью оптико-акустического приемника 10 и варьировалась в эксперименте с помощью фильтров, составляя 10,84; 1,97 и 0,91 мкВт. Длительность импульса – 2,5 пс. Время облучения составило 3 мин. Площадь облучения – 0,18 см². Эксперименты проводились при комнатной температуре (24°C). Контроль изменения температуры образца осуществлялся с помощью инфракрасного термодатчика. Распределение мощности в импульсе приведено на рис. 2.

Описание подготовки образцов и методики измерений

В качестве объекта исследования авторами использовались культивированные спинальные ганглии 10–12-дневных куриных эмбрионов, препарированные на уровне пояснично-крестцового отдела спинного мозга. После изъятия ганглии помещали в стерильную чашку Петри на покровные стекла с коллагеновой подложкой. Капли питательной среды наносятся на стенки чашки Петри, что создает подходящие условия для поддержания жизнедеятельности ганглии за время облучения. Питательная среда содержала 35% раствора Хенкса, 35% среды Игла с добавлением инсулина (0,5 ед./мл), глюкозы (0,6%), глутамина (2 мМ), антибиотиков, 5% куриного эмбрионального экстракта и 15% фетальной сыворотки коровы. Эксперимент проводился в закрытой полистирольной чашке Петри. Данный материал довольно хорошо пропускает ТГц излучение – измеренные нами потери составили 16%. Проведение облучения в таком режиме позволяет минимизировать влияние состава окружающей среды, что является важным фактором для экспериментов на культуре ткани.

Таким образом, во время облучения экспериментального эксплантата в чашке Петри отсутствовала питательная среда, температура окружающей среды изменялась не более чем на 1°C. Образцы, не подвергшиеся влиянию ТГц излучения, считались контрольными.

Для прикрепления эксплантатов после облучения исследуемый объект помещался в СО₂-инкубатор при температуре 36,8°C с содержанием 5% СО₂. Через трое суток культивирования в контрольных эксплантатах спинномозговых ганглиев формируются две отчетливо выраженные зоны: центральная, состоящая из немигрирующих дифференцирующихся нейробластов, и периферическая. Периферическая зона, представляющая собой характерный ореол вокруг ганглия, образуется растущими нейритами, фибробластоподобными клетками и глией. Рост нервных волокон в культуре ткани исследовался прижизненно с помощью светового микроскопа. Для количественной оценки влияния ТГц излучения на рост нервных волокон спинальных ганглиев применялся морфометрический метод. С целью унификации конечных показателей степени роста нервных волокон для ее оценки использовался относительный критерий – индекс площади (ИП). Интенсивность роста эксплантатов оценивалась по величине ИП, которая рассчитывалась как отношение площади всего эксплантата, включая периферическую зону роста, к исходной площади ганглия. Полученные данные соотносились с данными контрольных эксплантатов, которые не подвергались облучению и культивировались при тех же условиях. Для каждого значения плотности мощности ТГц излучения анализировали 10 экспериментальных эксплантатов. Полученные данные соотносились с данными контрольных эксплантатов, которые не подвергались облучению и культивировались при тех же условиях. Достоверность различий в ИП контрольных и экспериментальных эксплантатов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Статистическая обработка результатов проведена в предположении нормальности распределения с доверительной вероятностью 0,95. Значения ИП выражали в процентах, причем за 100% принимали контрольные значения ИП.

Результаты

В данной работе исследовалось изменение роста нейритов сенсорных ганглиев в органотипической культуре ткани под действием ТГц излучения различной плотности мощности.

При плотностях мощности облучения 60 мкВт/см² и 11 мкВт/см² изменение ИП относительно контрольного образца составило 103% и 107% соответственно. Эти результаты не являются статистически достоверными и могут рассматриваться как погрешности на уровне контроля. Увеличение индекса площади до 124% ($p < 0,05$) было получено при плотности мощности облучения 5 мкВт/см² (рис. 3), что позволяет говорить нам об эффекте стимуляции клеточного роста.

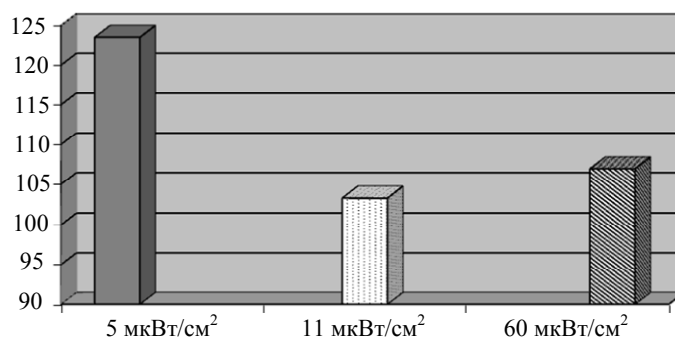


Рис. 3. Влияние ТГц излучения на рост нейритов спинномозговых ганглиев 10–12-дневных куриных эмбрионов. По вертикали – индекс площади эксплантата в % к контрольным значениям. Для плотности мощности 5 мкВт/см² $p < 0,05$

Обсуждение результатов и сравнение с литературными данными

В эксперименте мы не наблюдали изменения температуры образца во время воздействия ТГц излучения. Сравнивая полученные нами результаты с литературными данными, можем предположить возникновение стимуляции роста нервных волокон через нетепловые механизмы воздействия, которые обеспечиваются при самой низкой мощности, на которой был достигнут наибольший эффект (5 мкВт/см²), и непродолжительной экспозиции (3 мин). Однако с учетом того, что пики поглощения воды находятся в ТГц диапазоне, а клетка на 80% состоит из воды, возможно наличие микротермальных эффектов, выражаемых в локальном нагреве элементов клетки, что влияет на ее метаболизм и изменяет функциональное регулирование.

В большинстве исследований, авторы которых также предполагают наличие микротермальных эффектов, использовалось излучение, по мощности и длительности облучения значительно превышающее примененное нами, а также выполнялись требования текущего американского правительственного стандарта по максимально допустимой мощности облучения (MPE) – 1 мВт/см² – и длительности – 6 мин. В этих пределах мощности облучения также были получены как стимулирующие, так и угнетающие эффекты на биологических объектах [18–22]. Кроме того, во всех известных нам работах, кроме [7, 12, 15], длительность облучения была равной или свыше 15 мин. Работа [15] может быть сравнима с нашей по используемой плотности мощности и длительности воздействия: в приведенной работе при воздействии ТГц излучения на частоте 0,06 ТГц наблюдалось ингибирование и стимуляция потенциала действия при плотностях мощности (0,28, 0,74 и 0,56 мкВт/см²). Это входит в диапазон частот и мощностей, использованный в эксперименте нами.

Следует, однако, подчеркнуть, что почти во всех перечисленных нами работах в экспериментах использовался источник непрерывного излучения. Нам известна лишь одна печатная работа [11], авторы которой достигли увеличения проницаемости мембраны при использовании импульсного излучения и показали преимущества этого вида облучения по сравнению с непрерывным режимом. Фактически в своей работе мы впервые получили дозозависимый эффект импульсного широкополосного ТГц облучения стимуляции клеточного роста нервных клеток.

Заключение

Получены качественные характеристики и количественные данные, свидетельствующие о стимулирующем воздействии ТГц излучения малой интенсивности на нервные клетки. Обнаружено, что стимулирующий эффект максимально проявляется при сравнительно малой плотности мощности излучения (5 мкВт/см²), а сам эффект является дозозависимым. Это исследование является первой ступенью масштабной работы. Результаты исследования имеют большое значение для обеспечения безопасности сотрудников при работе с электромагнитным излучением ТГц диапазона. С другой стороны, изменение проницаемости мембраны влечет за собой изменение ионных токов, что можно использовать для усиления клеточного метаболизма. Посредством неразрушающего процесса при подборе правильного режима облучения появляется возможность потенциального контроля нейронного ответа, что в дальнейшем может привести к созданию новых методов терапии.

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (ГК №14.В37.21.0248), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (ГК № 16.513.11.3070).

Литература

1. Zhang X.-C., Xu J. Introduction to THz wave photonics. – NY: Springer Science+Business Media, 2010. – 248 p.

2. Globus T.R., Woolard D.L., Khromova T., Crowe T.W., Vykhovskaia M., Gelmont B.L., Hesler J. and Samuels A.C. THz-spectroscopy of biological molecules // *J. Bio. Phys.* – 2003. – V. 29. – № 2. – P. 89–100.
3. Цуркан М.В., Собакинская Е.А., Смолянская О.А., Беспалов В.Г., Вакс В.Л., Балбекин Н.С. Исследование спектра молекулы ДНК в терагерцовой области частот // *Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики.* – 2012. – № 1 (77). – С. 15–19.
4. Gian Piero Gallerano. Tera-Hertz radiation in Biological Research, Investigation on Diagnostics and study of potential Genotoxic Effects. Проектная документация [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.frascati.enea.it/thz-bridge/index.html, свободный. Яз. англ. (дата обращения 13.12.2012).
5. Webb S.J., Dodds D.D. Inhibition of bacterial cell growth by 136 gc microwaves // *Nature.* – 1968. – V. 218. – № 5139. – P. 374–375.
6. Blackman C.F., Benane S.G., Weil C.M., Ali J.C. Effects of nonionizing electromagnetic radiation on single cell biologic systems // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 1975. – V. 247. – № 1. – P. 352–366.
7. Berns M.W., Bewley W. Inhibition of nucleic acid synthesis in cells exposed to 200 micrometer radiation from the Free electron laser // *Photochemistry and Photobiology.* – 1987. – V. 46. – № 2. – P. 165–167.
8. Berns M.W., Bewley W., Sun C.H., Templin P. Free electron laser irradiation at 200 microns affects DNA synthesis in living cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1990. – V. 87. – № 7. – P. 2810–2812.
9. Hadjiloucas S., Chahal M., Bowen J. Preliminary results on the non-thermal effects of 200–350 GHz radiation on the growth rate of *S. cerevisiae* cells in microcolonies // *Phys. in Med. and Biol.* – 2002. – V. 47. – № 21. – P. 3831–3839.
10. Bock J., Fukuyo Y., Kang S., Phipps M.L., Alexandrov L.B., Rasmussen K. Ø., Bishop A.R., Rosen E.D., Martinez J.S., Chen H.-T., Rodriguez G., Alexandrov B.S., Usheva A. Mammalian stem cells reprogramming in response to terahertz radiation // *PLoS ONE.* – 2010. – V. 5. – № 12. – e15806.
11. Ramundo-Orlando A., Gallerano G.P., Stano P., Doria A., Giovenale E., Messina G., Cappelli M., Arienzo M.D., Spassovsky I. Permeability changes induced by 130 GHz pulsed radiation on cationic liposomes loaded with carbonic anhydrase // *Bioelectromagnetics.* – 2007. – V. 28. – № 8. – P. 587–598.
12. Olshevskaya J.S., Ratushnyak A.S., Petrov A.K., Kozlov A.S., Zapara T.A. Effect of terahertz electromagnetic waves on neurons systems // *Computational Technologies in Electrical and Electronics Engineering. 2008. SIBIRCON 2008. IEEE Region 8 International Conference.* – 2008. – P. 210–211.
13. Olshevskaya J.S., Kozlov A.S., Petrov A.K., Zapara T.A., Ratushnyak A.S. Cell membrane permeability under the influence of terahertz (submillimeter) laser radiation // *Vestnik Novosibirsk State University.* – 2010. – № 5 (4). – P. 177–181.
14. Alekseev S.I., Ziskin M.C. Effects of millimeter waves on ionic currents of *Lymnaea* neurons // *Bioelectromagnetics.* – 1999. – V. 20. – № 1. – P. 24–33.
15. Siegel P.H., Pikov V. Can neurons sense millimeter waves? // *SPIE Photonics West, BiOS.* – 2010. – P. 7562-17.
16. Siegel P.H., Pikov V., Impact of low intensity millimeter-waves on cell membrane permeability // *Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves, IRMMW-THz (2009), 34th International Conference on 1(1).* – 2009. – P. 21–25.
17. Tsurkan M.V., Penniyainen V.A. et al. Changing growth of neurites of sensory ganglions by terahertz radiation // *Proc. of SPIE.* – 2012. – V. 8261. – P. 82610S-1.
18. Kiselev V.K. Use of submillimeter laser technology in immunological studies // *Radiotekhnicheskie Systemy Millimetrovogo i Submillimetrovogo Diapazonov.* – 1991. – P. 176–181.
19. Makolins V.I. Influence of submillimeter wave radiation on some manifestation of immunoresponsives *Meditsinskaya Reabilitologiya // Kurortologiya i Fizioterapiya.* – 1996. – V. 1. – P. 33–35.
20. Kirichuk V.F., Ivanov A.N., Antipova O.N., Krenickiy A.P., Mayborodin A.V., Tupikin V.D. Sex-specific differences in changes of disturbed functional activity of platelets in albino rats under the effect of terahertz electromagnetic radiation at nitric oxide frequencies // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* – 2008. – V. 145. – № 1. – P. 75–77.
21. Kirichuk V., Tsymbal A. Effects of Terahertz Irradiation at Nitric Oxide Frequencies on Intensity of Lipoperoxidation and Antioxidant Properties of the Blood under Stress Conditions // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* – 2009. – V. 148. – № 2. – P. 200–203.
22. Kirichuk V., Tsymbal A. Use of Terahertz Electromagnetic Waves for Correcting Hemostasis Functions // *Biomedical Engineering.* – 2010. – V. 44. – № 1. – P. 11–14.

Цуркан Мария Валериевна – Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, аспирант, tsurkan.maria@yandex.ru

Смолянская Ольга Алексеевна – Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, кандидат физ.-мат. наук, доцент, denisiuk@mail.ifmo.ru

Брянцева Наталья Геннадьевна – Национальный исследовательский Томский государственный университет, кандидат физ.-мат. наук, мл. научный сотрудник, brjantseva@ Rambler.ru