

Численное и экспериментальное исследование механизмов влияния широкополосного импульсного терагерцевого излучения на нервные клетки

М.В.Дука, Л.Н.Дворецкая, Н.С.Балбекин, М.К.Ходзицкий,
С.А.Чивилихин, О.А.Смолянская

Исследованы механизмы влияния терагерцевого широкополосного импульсного излучения на рост нейритов сенсорных ганглий с помощью сравнительного анализа спектров отражения (в диапазоне частот 0.1–2.0 ТГц) нейритов ганглий, полученных в эксперименте и при численном моделировании в программном пакете CST Microwave Studio. Обнаружено, что основное воздействие связано с поглощением энергии импульсного излучения нейритами ганглий. Особый интерес имеют одиночные резонансные частоты, связанные с размерными резонансными эффектами, которые можно будет использовать при облучении ганглий для активизации их роста.

Ключевые слова: терагерцевое излучение, механизмы влияния, ганглии, нейриты.

1. Введение

В последнее время наблюдается повышенный интерес к изучению влияния терагерцевого (ТГц) излучения на биологические объекты. Это связано с тем, что в этом диапазоне лежат частоты низкоэнергетических колебательно-вращательных уровней огромного числа биологически активных молекул со сложной пространственной организацией (белки, РНК, ДНК) и их функциональных групп, а также частоты коллективных колебательных переходов на межмолекулярном уровне, индуцирующие межмолекулярные взаимодействия [1]. Сейчас активно разрабатываются методы идентификации ТГц спектров биомолекул: анализ состояния гибридизации ДНК [2], а также изучение колебаний и вращений определенных групп атомов [3], чувствительности к конформации протеинов и их мутациям [4] и собственных частот ДНК [5]. На данном этапе развития спектроскопии перечисленные методы, к сожалению, не позволяют идентифицировать каждую спектральную линию сложных биомолекул вследствие их чрезвычайно сложной структуры и большого количества межмолекулярных связей. Спектроскопия клеток и тканей тем более не дает однозначной информации, т.к. они состоят из большого количества органелл (ядра, митохондрии, цитоплазма и др.), включающих в себя множество биологических молекул.

Идентификация спектральных линий биообъектов позволит приблизиться к раскрытию механизмов влияния ТГц излучения, о природе которых в настоящее время высказываются только предположения. Сильное по-

глощение мощного ТГц излучения гидратированными биологическими тканями может вызывать тепловые эффекты [6]. Помимо объемных тепловых эффектов, возможно наличие микротепловых эффектов, возникающих при прямом последовательном возбуждении биомолекул [7] или вследствие линейных/нелинейных механизмов резонанса [8, 9], а также формирование ультразвуковой волны [10]. Указанные эффекты могут приводить к следующим реакциям со стороны клетки: изменению конформации мембранных белков и проницаемости клеточных мембран для различных веществ, перераспределению электрического заряда на мембране клетки, а также возбуждению резонансных колебаний макромолекул, входящих в состав клеточной мембраны и цитоскелета.

На сегодняшний день экспериментальные работы по изучению влияния ТГц излучения на биологические объекты существенно различаются по используемым характеристикам излучения и объектам исследования. Применяются как непрерывные, так и импульсные источники излучения с разными его характеристиками: длиной волны, мощностью, длительностью импульса, частотой следования импульсов, а также временем экспозиции. Многозначность результатов воздействия, полученных в этих работах, не позволяет их структурировать и с уверенностью говорить о положительном или отрицательном характере влияния ТГц излучения, тем более о том, каковы механизмы воздействия. В случае непрерывных источников вероятность определения механизма наиболее высока, т.к. можно быстрее выявить биомаркер: на что именно влияет излучение на определенной частоте. При использовании импульсных широкополосных источников излучения эффект может быть достигнут суммарным влиянием излучения с несколькими частотами на различные компоненты клетки. Следствием этого может быть проявление мультипликативности воздействия на разных частотах, что приводит к неоднозначности интерпретации результатов даже в пределах одного эксперимента. Так, например, у одних генов экспрессия может повышаться, а у других – снижаться при воздействии излуче-

М.В.Дука, Л.Н.Дворецкая, Н.С.Балбекин, М.К.Ходзицкий, С.А.Чивилихин, О.А.Смолянская. Университет «ИТМО», Россия, 197101 С.-Петербург, Кронверкский просп., 49;
e-mail: duka.mv@yandex.ru, khodzitskiy@yandex.ru, o_smolyanskaya@mail.ru

Поступила в редакцию 3 марта 2014 г., после доработки – 16 июня 2014 г.

ния в диапазоне 2–20 ТГц [11]. Для понимания причины вызванного эффекта, а также для реализации более эффективного влияния излучения на одной длине волны необходимо выполнить подтверждающее исследование с использованием различных частотных фильтров, пропускающих определенный диапазон частот импульсного ТГц излучения. Для обнаружения эффекта можно далее исследовать его с помощью источников непрерывного излучения на конкретной частоте. Для этого нужно провести огромное количество поисковых исследований на разных частотах воздействия.

Высокое содержание воды в биообъектах является, возможно, основным фактором, определяющим влияние излучения на клетки вследствие наличия многочисленных спектральных линий поглощения воды в ТГц диапазоне частот. Следовательно, эти спектральные линии будут наблюдаться и в спектре биообъекта. Кроме того, спектральные особенности объекта могут быть обусловлены также размерными резонансными эффектами на оптической длине макроструктуры (резонансы Фабри–Перо). Исключение из спектра объекта частот, связанных с линиями поглощения воды, и резонансных частот, связанных с возникновением стоячих волн в структуре, позволяет выделить спектральные линии, не обусловленные межмолекулярными взаимодействиями гидратированных компонентов клетки.

Для исключения двух последних факторов необходимо выполнить моделирование распространения широкополосного импульсного излучения через гидратированный биологический объект с геометрическими размерами, соответствующими объекту, использованному в эксперименте, и провести сравнительный анализ экспериментальных спектров биообъектов и воды со спектрами, полученными в результате численного моделирования.

В настоящей работе был проведен сравнительный анализ экспериментально и численно полученных спектров отражения образца спинальных ганглиев в диапазоне частот 0.1–2.0 ТГц с целью выяснения механизма влияния ТГц широкополосного импульсного излучения на рост нейритов сенсорных ганглий.

2. Пробоподготовка объекта исследования

Спинальный ганглий куриного эмбриона (органо-печеская культура нервной ткани) является одной из наиболее удобных экспериментальных моделей для изучения, т.к. он реагирует на любые физические и химические воздействия усилением или подавлением роста чувствительных отростков (нейритов). Ганглий, или нервный узел, представляет собой скопление нервных, глиальных и шванновских клеток, размеры которых составляют примерно 20, 7 и 6–8 мкм соответственно. У взрослых особей нервные клетки разделяются на два типа с диаметрами клеток 20–30 мкм и 20–50 мкм [12].

Для изъятия материала спинальных ганглий и его препарирования использовался набор инструментов для глазной хирургии. Ганглии извлекались из 10-дневных куриных эмбрионов на уровне пояснично-крестцового отдела спинного мозга под микроскопом и помещались в полистироловую чашку Петри с коллагеновой подложкой. Для изучения влияния ТГц излучения на рост нейритов контрольные и облученные образцы культивировались в инкубаторе (при концентрации углекислого газа 5%) в течение трех суток при температуре 36.8 °С. Перед

записью спектров отражения чашки Петри с объектами помещались в инкубатор на 30 мин для лучшей фиксации эксплантатов к подложке.

3. Исследование влияния ТГц излучения на рост нейритов

На образцы спинальных ганглий площадью 0.1 см², находящиеся в закрытой чашке Петри, в течение 3 и 5 мин воздействовали ТГц широкополосным импульсным излучением (частотный диапазон 0.1–2.0 ТГц, длительность ТГц импульса 2.5 пс) при температуре +25 °С [13]. Проводился сравнительный анализ 10 облученных образцов с 10 контрольными образцами при разных значениях мощности ТГц излучения (0.076–11.600 мкВт). Мощность регулировалась фильтрами с учетом поглощения излучения чашкой Петри.

В течение трех дней после облучения и культивирования рост нейритов в культуре ткани исследовался *in vivo* с помощью оптического микроскопа (LSM-710 Carl Zeiss) с телескопической насадкой (Carl Zeiss Axiostar Plus). Эффект воздействия ТГц излучения оценивался морфометрическим методом по индексу площади, рассчитанному как отношение площади всего культивированного образца, включая периферическую зону роста, к исходной площади ганглия (рис.1). Индекс площади у контрольных образцов принимается равным 100%.

При снижении мощности излучения наблюдается сначала угнетающий, а затем стимулирующий эффект воздействия ТГц излучения на рост нейритов. Получен эффект стимуляции роста, достигающий $147 \pm 22\%$ (уровень значимости $p < 0.05$) по отношению к контрольным образцам, при плотности мощности ТГц излучения примерно 1.1 мкВт/см².

4. Методика получения ТГц спектров отражения ганглий

Для получения спектров отражения был использован импульсный ТГц рефлектометр (рис.2). Широкополосное импульсное ТГц излучение (спектральный диапазон

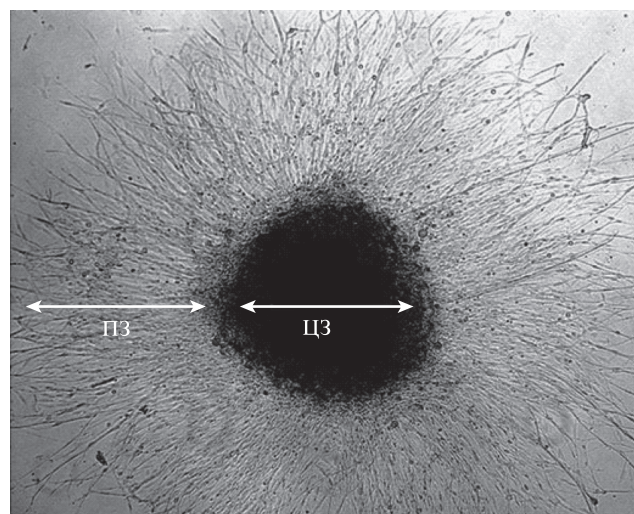


Рис.1. Микрофотография контрольного образца спинального ганглия 10-дневного куриного эмбриона (увеличение 50 \times): ЦЗ и ПЗ – центральная и периферическая зоны ганглия соответственно.

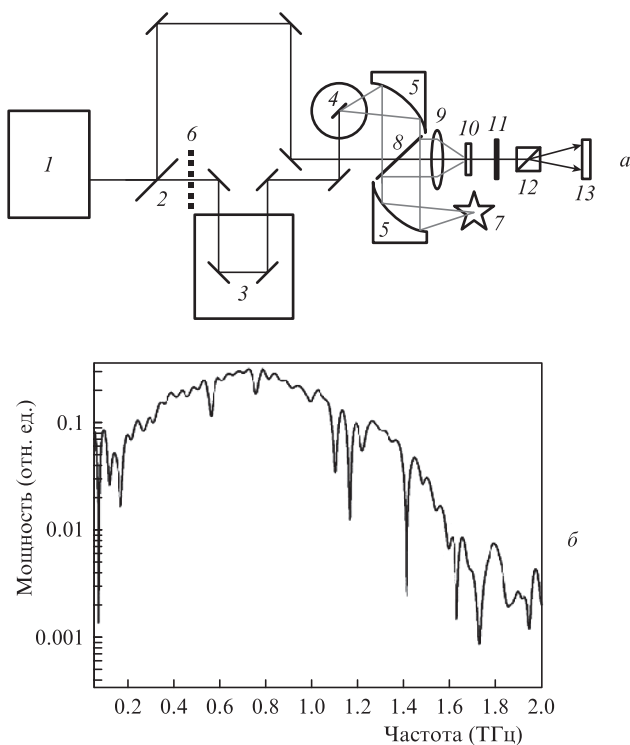


Рис.2. Экспериментальная схема ТГц рефлектометра (а) и частотный спектр ТГц импульса (б):

1 – лазер фемтосекундных импульсов; 2 – светоделитель; 3 – оптическая линия задержки; 4 – генератор ТГц излучения (кристалл InAs в магнитной системе); 5 – 45-градусные параболические зеркала; 6 – оптико-механический модулятор; 7 – исследуемый биологический объект; 8 – светоделитель ТГц излучения на основе пластины из высокоомного кремния; 9 – линза из полимера ТРХ с фокусным расстоянием 5 см; 10 – электрооптический кристалл CdTe; 11 – ахроматическая четвертьволновая пластинка; 12 – призма Волластона; 13 – балансный фотодетектор.

0.1–2.0 ТГц, средняя мощность 30 мкВт, пиковая мощность импульса 755 мкВт, длительность импульса 2.7 пс) генерировалось с помощью фотопроводящей антенны (нелегированного кристалла арсенида индия) при облучении ее импульсами фемтосекундного Yb: KYW-лазера (длина волны излучения 1040 нм, длительность импульса 120 фс, частота следования импульсов 75 МГц, мощность 1 Вт). Основная мощность ТГц излучения была распределена в диапазоне частот 0.12–1.10 ТГц [13].

Терагерцевое излучение, генерируемое кристаллом InAs в магнитной системе, после прохождения через тефлоновый фильтр (отсекающий излучение с длиной волны менее 50 мкм) проходило сквозь образец (закрытая чашка Петри с ганглиями), который фиксировался в вертикальном положении в фокальной плоскости, перпендикулярной пучку, на трехкоординатном предметном столике. Излучение сначала проходило через подложку, а затем попадало на ганглии. При совмещении пробного пучка фемтосекундного излучения и пучка ТГц излучения, отраженного от объекта исследования, на электрооптическом кристалле CdTe терагерцевый импульс наводил в нем двулучепреломление пробного пучка из-за электрооптического эффекта. Величина двулучепреломления прямо пропорциональна напряженности $E(t)$ электрического поля ТГц волны в данной временной точке. Схема измерения двулучепреломления состояла из четвертьволновой пластинки, призмы Волластона, балансного фотодетектора (Nirvana) и синхронного усилителя (LIA-MV-150, Femto),

управляемого от оптико-механического модулятора (МС-1000А, Thorlabs), помещенного на пути пучка накачки.

В отсутствие ТГц излучения пробный пучок не испытывал двулучепреломления. После прохождения через четвертьволновую пластинку, которая превращала горизонтальную поляризацию пучка в круговую, и призму Волластона пробный пучок разделялся на два пучка одинаковой интенсивности с ортогональными поляризациями. Вследствие этого на балансном фотодетекторе отсутствовал сигнал. При наведении ТГц импульсом двулучепреломления в электрооптическом кристалле пучки, после прохождения через призму Волластона, имели разную интенсивность, и на балансном фотодетекторе регистрировался сигнал рассогласования (рис.2). С помощью линии задержки изменялся момент совпадения ТГц импульса и импульса пробного пучка в нелинейном кристалле. Таким образом, в случае измерения ТГц сигнала при различных временах его задержки была получена зависимость амплитуды ТГц поля от времени $E(t)$. Для увеличения отношения сигнал/шум в схеме использовался синхронный усилитель. Отфильтрованный и усиленный сигнал передавался в компьютер посредством АЦП. Схема установки обеспечивала спектральное разрешение 15 ГГц. Автоматизация спектрометра проводилась через созданный в среде разработки LabView виртуальный прибор, позволяющий осуществлять запись временного профиля ТГц импульса $E(t)$ и расчет частотного спектра коэффициента отражения образца. Спектры получали с помощью фурье-преобразования временного профиля измеренных импульсов (опорного и объектного) и расчета отношения амплитуд спектров опорного сигнала и исследуемого биологического объекта.

5. Моделирование в программе CST Microwave Studio

Для моделирования ТГц отклика биологических объектов использовалась программа CST Microwave Studio для трехмерного численного электромагнитного моделирования структур произвольной формы. Биологические объекты были смоделированы в виде гидратированных структур, вследствие повышенного процентного содержания воды (78%) в нервных клетках. Действительная и мнимая части диэлектрической проницаемости воды, которая использовалась при моделировании, показаны на рис.3 [14, 15].

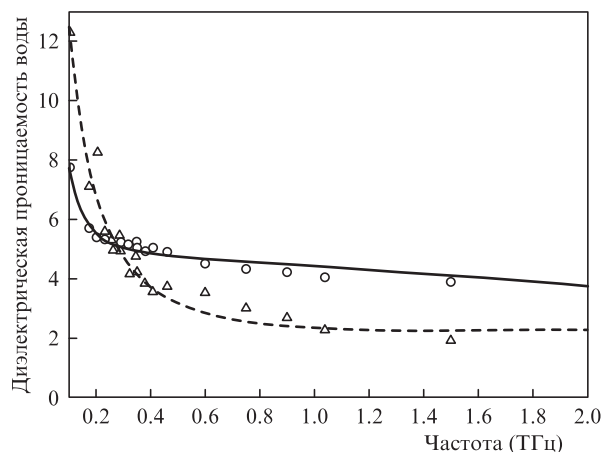


Рис.3. Действительная (о) и мнимая (Δ) части диэлектрической проницаемости воды. Кривые – аппроксимация.

Были рассмотрены две двухслойные структуры: подложка–слой гидратированного биологического объекта (рис.4,*а*) и подложка–биологический объект из гидратированных сферических частиц (рис.4,*б*). Ганглий был смоделирован в виде скопления фантомов нервных клеток, которые благодаря большим размерам, вносят основной вклад в спектральные характеристики биологического объекта. Шванновские и глиальные клетки при моделировании не учитывались. Нервные клетки были представлены в виде хаотически расположенных сферических резонаторов диаметром 17–22 мкм. Конгломерат клеток имел толщину 800 мкм и был расположен на подложке из

полистирола (диэлектрическая проницаемость $\epsilon = 4.326$) [16] толщиной 950 мкм. Исследуемая структура в свободном пространстве возбуждалась плоской электромагнитной волной в частотном диапазоне 0.1 – 2.0 ТГц. В связи с тем что размеры мембраны (толщина 0.01 мкм) и ядра (диаметр 1 мкм) не сопоставимы с длиной волны ТГц диапазона, различные органеллы нервных клеток не учитывались при моделировании. Биологический объект находился между двумя портами: излучатель (порт 1) и приемник (порт 2). Моделирование первой структуры было необходимо для выделения резонансных спектральных линий, связанных с возникновением стоячих волн на оптической толщине структуры, а исследование второй структуры – для обнаружения размерных резонансных эффектов на нервных клетках.

Для изучения влияния размеров нервных клеток на спектр отражения были смоделированы структуры с тремя распределениями клеток по диаметрам D , лежащим в диапазонах 20–30 мкм, 20–40 мкм и 20–50 мкм. Распределение в каждом диапазоне предполагалось нормальным с плотностью вероятности

$$f(D) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{(D - \bar{D})^2}{2\sigma^2}\right],$$

где \bar{D} – среднее значение диаметра клеток; σ – стандартное отклонение от среднего. В каждом диапазоне значения диаметров задавались с помощью генератора случайных чисел. Стандартное отклонение в диапазонах 20–30 мкм, 20–40 мкм и 20–50 мкм составляло 1.67, 3.34 и 3 мкм соответственно. Распределение клеток по диаметрам для каждого диапазона (рис.5) было получено по 50 реализациям.

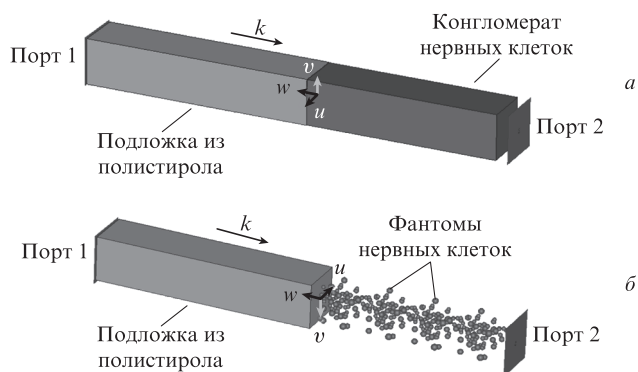


Рис.4. Модели исследуемого объекта в программной среде CST Microwave Studio: подложка–слой гидратированного биологического объекта (*а*) и подложка–биологический объект из гидратированных сферических частиц (*б*). Порт 1 – ТГц излучатель, порт 2 – приемник.

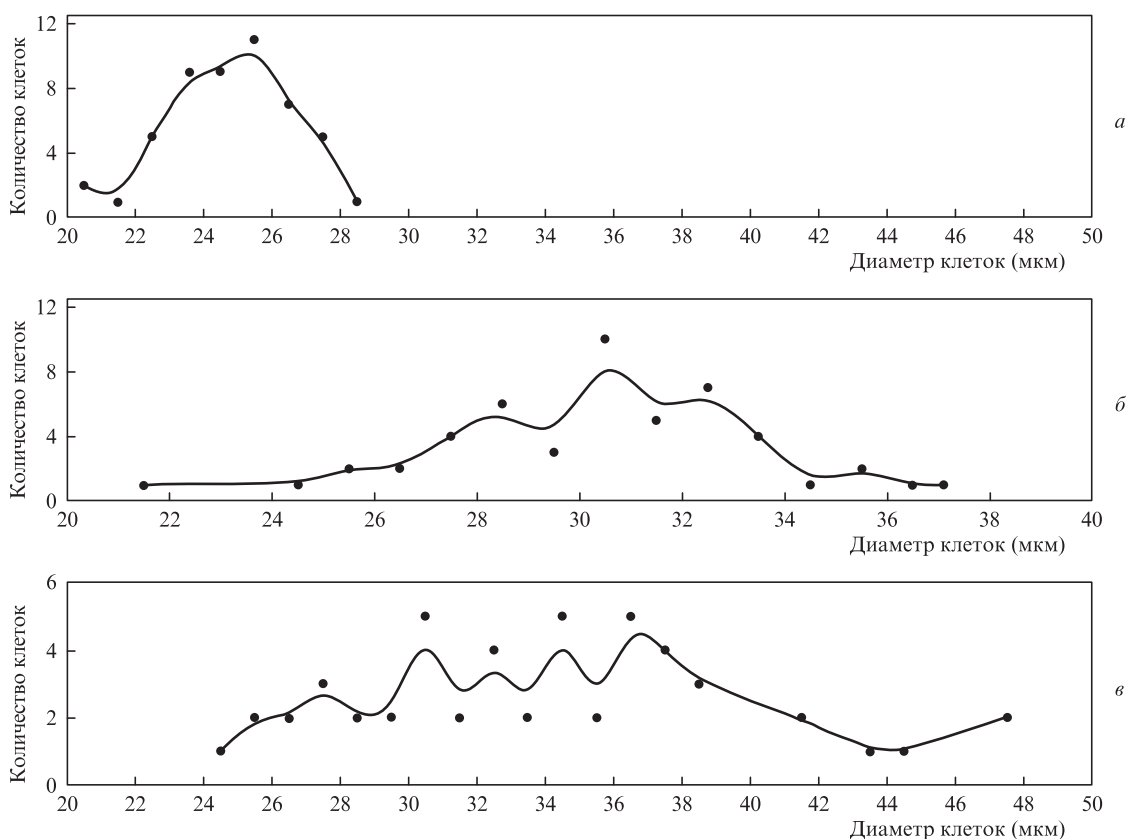


Рис.5. Функции распределения клеток по диаметрам для диапазонов $D = 20-30$ мкм (*а*), $20-40$ мкм (*б*) и $20-50$ мкм (*в*).

6. Результаты и их обсуждение

Экспериментально полученный спектр коэффициента отражения ганглия имеет пики слабой интенсивности на частотах 0.34, 0.41, 0.49, 0.56, 0.64 и 0.98 ТГц и явно выраженные высокоинтенсивные пики на частотах 1.10, 1.16, 1.65, 1.69 и 1.90 ТГц (рис.6). Спектральные линии на частотах 0.41, 0.49, 0.56 и 0.64 ТГц с хорошей точностью согласуются с пиками коэффициента отражения на частотах 0.423, 0.474, 0.544, 0.600 и 0.710 ТГц, полученными при численном моделировании двухслойной структуры подложка – слой гидратированного биологического объекта (рис.7,*a*), и связаны с размерными резонансными эффектами на оптической длине структуры. Спектральные особенности на частотах выше 0.80 ТГц, полученные при численном моделировании, также связаны с резонансами

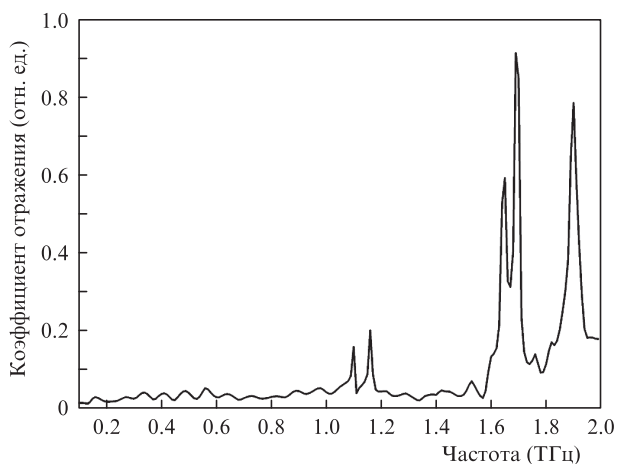


Рис.6. ТГц спектр коэффициента отражения ганглия (эксперимент).

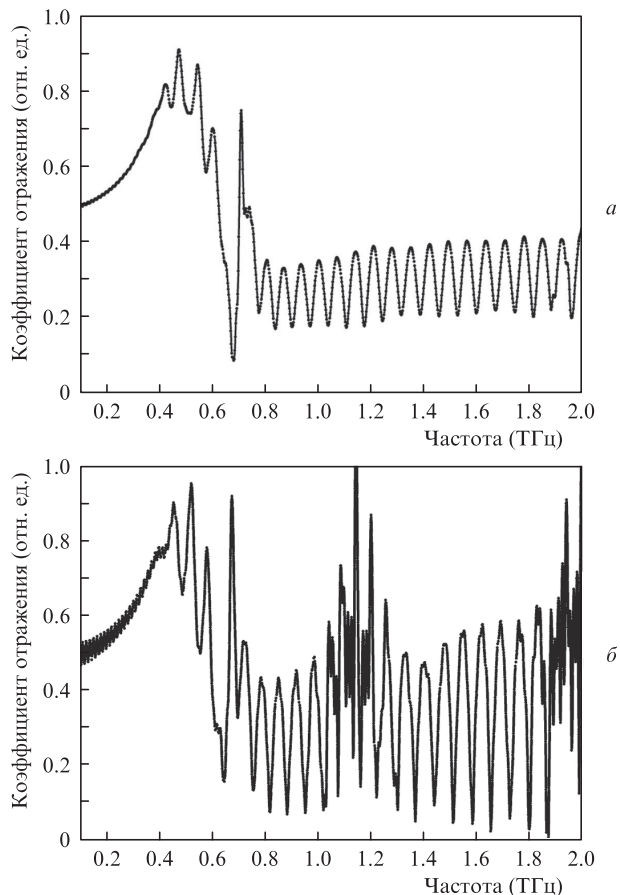


Рис.7. Численно смоделированные спектры коэффициента отражения двухслойных структур подложка–объект (*a*) и подложка–объект с геометрическими свойствами ганглия (*б*).

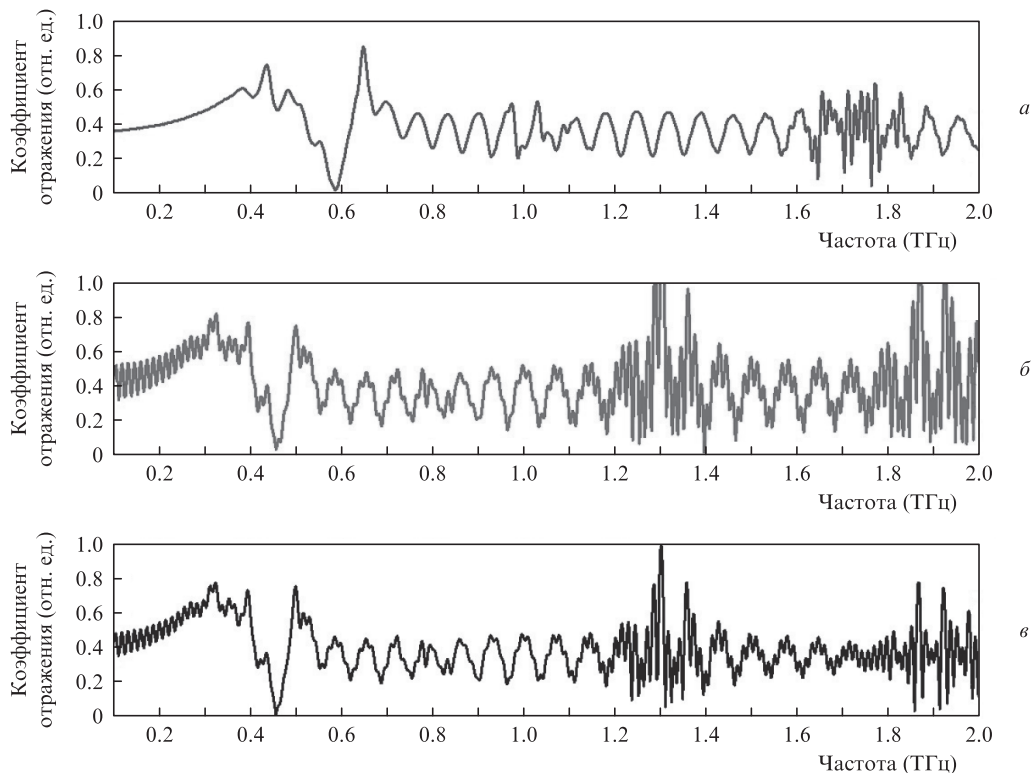


Рис.8. Численно смоделированные ТГц спектры коэффициента отражения нервных клеток с размерами 20–30 мкм (*a*), 20–40 мкм (*б*) и 20–50 мкм (*в*).

Фабри–Перо на толщине исследуемой структуры в случае слабой дисперсии комплексной диэлектрической проницаемости воды (рис.3).

При моделировании образца с учетом размера нервных клеток и межклеточного расстояния в спектре отражения на частотах 1.080, 1.143, 1.200, 1.930 и 1.990 ТГц появляются пики, которые отсутствуют в спектре структуры подложка – слой гидратированного биологического объекта, но проявляются в спектрах, полученных экспериментально (рис.7,б). Эти спектральные особенности могут быть вызваны размерными резонансными эффектами на нервных клетках и не связаны с межмолекулярными взаимодействиями гидратированных компонентов клетки. Для выяснения причины возникновения этих пиков были смоделированы спектры отражения ганглий для разных распределений нервных клеток по диаметрам (рис.8). При изменении функции распределения клеток по диаметрам заметно смещение резонансных пиков в спектре коэффициента отражения, что подтверждает размерные эффекты на нервных клетках. В спектре отражения на рис.8,а появляются резонансы в диапазоне частот 1.65–1.75 ТГц, которые хорошо согласуются с резонансами в экспериментальном спектре. Пики на частотах 1.65 и 1.69 ТГц, полученные в эксперименте, обусловлены резонансными размерными эффектами на клетках с диаметрами от 25 до 30 мкм.

7. Анализ результатов

Анализируя спектры коэффициента отражения исследуемых биообъектов можно определить механизмы воздействия ТГц излучения при различных его частотах. Так, из сравнения экспериментальных спектральных линий на частотах 1.11, 1.67 и 1.80 ТГц, где коэффициент отражения минимален, с пиками поглощения воды [17–19]* следует, что на этих частотах биологический эффект будет обусловлен поглощением излучения водой.

При воздействии излучения на частотах 1.10, 1.16, 1.65 и 1.69 ТГц, где коэффициент отражения максимален, механизм воздействия будет связан с размерными резонансными эффектами, а в области частот, соответствующих низким коэффициентам отражения (1.2–1.6 ТГц и до 1.0 ТГц), он обусловлен сильным поглощением излучения [20].

8. Заключение

В данной работе исследованы механизмы влияния импульсного ТГц излучения на рост нейритов сенсорных ганглий с помощью сравнительного анализа спектров отражения (в диапазоне частот 0.1–2.0 ТГц) нервных клеток, полученных в эксперименте и при численном моделировании в программном пакете CST Microwave Studio. Было установлено, что:

1) в диапазоне частот от 0.1–1.0 ТГц до 1.2–1.6 ТГц происходит существенное поглощение излучения;

2) на частотах 1.10, 1.16, 1.65 и 1.69 ТГц имеет место размерный резонансный эффект, связанный с возникновением стоячих волн в биологическом объекте.

Поскольку большая часть мощности ТГц импульса распределена в диапазоне частот 0.20–1.10 ТГц, то основное воздействие импульсного излучения на нейриты связано с поглощением энергии. При этом особый интерес приобретают также обнаруженные одиночные резонансные частоты (1.10, 1.16, 1.65 и 1.69 ТГц), которые можно будет использовать при облучении ганглий непрерывным ТГц излучением большой мощности для активизации их роста.

Авторы выражают благодарность В.А.Пенниайнен, А.В.Кипенко, Е.В.Лопатиной и Б.В.Крылову – сотрудникам лаборатории физиологии возбудимых мембран Института физиологии им. И.П.Павлова – за помощь в подготовке исследуемых объектов и ценные рекомендации.

Работа выполнена при государственной финансовой поддержке ведущих университетов РФ (субсидия №074-U01) и поддержана грантом для молодых ученых «ОПТЭК» 2013 года.

1. Markelz A.G., Roitberg A., Heilweil E.J. *Chem. Phys. Lett.*, **320**, 42 (2000).
2. Rahman A., Stanley B., Rahman A.K. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **7568**, 756810 (2010).
3. Walther M., Fischer B., Schall M., Helm H., Jepsen P. *Uhd. Chem. Phys. Lett.*, **332**, 389 (2000).
4. Markelz A.G., Whitmirre S., Hillebrecht J., Birge R. *Phys. Med. Biol.*, **47**, 3797 (2002).
5. Tsurkan M.V., Balbekin N.S., Sobakinskaya E.A., Panin A.N., Vaks V.L. *Opt. Spectrosc.*, **114** (6), 894 (2013).
6. Wilmink G.J., Grundt J.E. *J. Infrared Millimeter Terahertz Waves*, **32**, 1074 (2011).
7. Frohlich H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72** (11), 4211 (1975).
8. Alexandrov B.S., Gelev V., Bishop A.R., Usheva A., Rasmussen K.Ø. *Phys. Lett. A*, **374** (10), 1214 (2010).
9. Chitanvis S.M. *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, **44** (18), 2740 (2006).
10. Мунзарова А.Ф., Зеленцов Е.Л., Козлов А.С. *Вестник НГУ. Сер. Физика*, **8** (2), 117 (2013).
11. Alexandrov B.S., Phipps M.L., Alexandrov L.B., Booshehri L.G., Erat A., Zabolotny J., Mielke C.H., Chen H.T., Rodriguez G., Rasmussen K.Ø., Martinez J.S., Bishop A.R., Usheva A. *Sci. Rep.*, **3**, 1184 (2013).
12. Vay S.L., Meier C., Glees P. *Acta Neuropathol.*, **17**, 103 (1971).
13. Tsurkan M.V., Penniyainen V.A., et al. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **8261**, 82610S (2012).
14. Ronne C., Thrane L., Åstrand P.-O., Wallqvist A., Mikkelsen K.V., Keiding S.R. *J. Chem. Phys.*, **107**, 5319 (1997).
15. Ronne C., Åstrand P.-O., Keiding S.R. *Phys. Rev. Lett.*, **82** (14), 2888 (1999).
16. Naftaly M., Miles R.E. *Proc. IEEE*, **95**, 8 (2007).
17. Globus T., Bykhovski A., Khromova T., Gelmont B., Tamm L.K., Salay L.K. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **6772**, 67720S (2007).
18. Roggenbuck A., Schmitz H., Deninger A., Cámara Mayorga I., Hemberger J., Güsten R., Grüninger M. *New J. Phys.*, **12**, 043017 (2010).
19. Exter M., Fattinger Ch., Grischkowsky D. *Opt. Lett.*, **14**, 1128 (1989).
20. Bassan P., Byrne H.J., Bonnier F., Lee J., Dumas P., Gardner P. *Analyst*, **134**, 1586 (2009).

* ТГц частоты спектральных линий поглощения воды составляют 0.321, 0.342, 0.420, 0.489, 0.550, 0.588, 0.648, 0.675, 0.720, 0.752, 0.988, 1.097, 1.113, 1.163, 1.208, 1.229, 1.410, 1.602, 1.661, 1.669, 1.717, 1.762 и 1.795 ТГц.