Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет
информационных технологий механики и оптики

На правах рукописи

Дука Мария Валериевна

Исследование спектральных характеристик, оптических свойств и биологического отклика нервных клеток, фибробластов и ДНК в диапазоне частот 0,1 – 2 ТГц

01.04.05 Оптика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург
2014

Оглавление

Перечень условных сокращений 6

Введение **7**

Глава 1. Влияние излучения терагерцового диапазона частот на биологические объекты (обзор) 14

1.1. Методы терапии заболеваний глаз 14

1.1.1. Медикаментозные методики нейрогенеза роговицы 19

1.1.2. Физиотерапевтические методики нейрогенеза роговицы 23

1.2. Анализ воздействия терагерцового излучения на биологические объекты 24

1.3. Специфичность терагерцового диапазона частот для биологических обьектов 33

1.4. Методы терапии заболеваний человека с помощью воздействия излучением терагерцового диапазона частот 36

1.5 Определение безопасных пороговых уровней излучения при использовании терагерцовых частот в медицине 39

Заключение к главе 1 45

Глава 2. Спектральные характеристики и оптические свойства фибробластов в терагерцовом диапазоне частот 50

2.1. Описание методики получения и пробоподготовки клеток фибробластов 51

2.2. Описание методики импульсной терагерцовой спектроскопии 54

2.3. Экспериментальный анализ спектральных характеристик фибробластов в ТГц диапазоне частот 61

2.4. Описание методики извлечения оптических свойств из временных форм терагерцовых импульсов 63

2.5. Экспериментальное изучение дисперсии оптических свойств фибробластов 65

2.6. Методика проточной цитометрии для оценки функциональной активности фибробластов после ТГц воздействия 71
2.6.1 Оценка мембранного потенциала митохондрий и проницаемости клеточной мембраны при помощи проточной цитометрии. 72
2.6.2. Оценка жизнеспособности клеток при помощи ДНК-связывающих красителей. 75
2.6.3. Изучение распределения клеток по фазам клеточного цикла. 76
2.7. Экспериментальное исследование функциональной активности фибробластов под влиянием широкополосного импульсного излучения диапазона 0,1-2 ТГц 77
2.7.1 Описание методики импульсной терагерцовой фотометрии 77
2.7.2. Результаты оценки мембранного потенциала митохондрий фибробластов 80
2.7.3. Результаты оценки жизнеспособности клеток при помощи ДНК-связывающих красителей. 82
2.7.4. Оценка распределения клеток по фазам клеточного цикла 83
Заключение к 3 главе 84

Глава 3. Исследование изменений роста нейритов сенсорных ганглиев под влиянием широкополосного импульсного излучения диапазона 0,1-2 ТГц 87
3.1. Описание методики получения и пробоподготовки нейритов сенсорных ганглиев 89
3.1.1. Преимущество метода культуры ткани 89
3.1.2. Получение органотипической культуры нервной ткани (спинальных ганглиев) куриных эмбрионов 90

3.1.3. Описание морфометрического метода оценки роста нервных клеток 91

3.2. Описание методики импульсной терагерцовой фотометрии 93

3.3 Изучение дозозависимого изменения роста нервных волокон 95

3.4.1. Экспериментальный анализ спектральных характеристик нервных клеток в ТГц диапазоне частот 99

3.4.2. Метод расчёта оптических свойств нервных клеток 100

3.4.2.1. Модель эксперимента и формулы 100

3.4.2.2. Расчёт дисперсии показателя преломления опорного диэлектрика 102

3.4.2.3. Результаты расчётов оптических свойств нервных клеток 103

3.5. Численное моделирование спектральных характеристик нервных клеток методом конечных разностей во временной области 105

3.5.1 Метод конечных разностей во временной области 105

3.5.2. Моделирование нервных клеток 108

3.5.3. Результаты моделирования 112

3.5.4. Сравнительный анализ результатов спектров отражения, полученных численно и экспериментально 114

Заключение к 3 главе 115

Глава 4. Исследование спектров ДНК методами терагерцовой спектроскопии 117

4.1. Описание методики получения и пробоподготовки образцов ДНК 118

4.2. Описание методики импульсной терагерцовой спектроскопии 119

4.3. Экспериментальное исследование спектральных характеристик ДНК с помощью методики импульсной терагерцовой спектроскопии 121

4.4. Описание методики непрерывной терагерцовой спектроскопии 124

4.5. Экспериментальное исследование спектральных характеристик ДНК с помощью методики непрерывной терагерцовой спектроскопии 127

4.6. Анализ спектральных характеристик ДНК 129

Заключение к 4 главе 136

Заключение 139

Библиографический список использованной литературы 141

Перечень условных сокращений

ТГц – терагерцовый

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

Lasik – лазерный кератомилез

ФРК – фоторефракционная кератэктомия

ТГИ – терагерцовый импульс

ФП – фотопроводящая антенна

СД – светоделитель

ЭОК – электрооптический кристалл

БД – балансный детектор

СУ – синхронный усилитель

АЦП – аналого-цифровой преобразователь

ПК – персональный компьютер

ОАП – опто-акустический приёмник

РНК – рибонуклеиновая кислота

YO-PRO-1 – флуоресцентный краситель йодид

PI – флуоресцентный краситель йодистый пропидий

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

ЗФР – забуференный фосфатами раствор

in vitro – методика выполнения экспериментов вне живого организма

in vivo – методика выполнения экспериментов в живом организме

ИП – индекс площади

FDTD – метод конечных разностей во временной области

ЛОВ – лампы обратной волны

ФАПЧ – система фазовой автоподстройки частоты

ВР – высокодобротный резонатор

Введение

В настоящее время исследования дегенеративных и дистрофических процессов в роговице, связанных с расстройствами обмена веществ, представляют значительный интерес терапии и диагностики глазных заболеваний. Активная роль в регуляции всех обменных процессов в роговице принадлежит обильной сети нервных окончаний, нарушение которых приводит не только к ухудшению метаболизма, но и снижению чувствительности, вплоть до полной ее потери [1]. Такие нарушения происходят вследствие микрохирургических вмешательств или нейродегенеративных процессов. Так как восстановление роговицы тесно связано с повреждениями нервной сети роговицы, становится очевидным направление поиска терапевтических подходов, направленные на восстановление нервных окончаний в роговице. В последнее время ведется разработка медикаментозных препаратов для стимуляции роста нейритов глаза [2], обладающих, однако, рядом недостатков, присущим инвазивным методам. Поэтому неинвазивная методика, в основе которой лежит терапевтический эффект влияния терагерцового (ТГц) излучения на нервные клетки, могла бы стать значительно более перспективной.

В данный момент проводятся исследования влияния терагерцового излучения на различные биологические клетки, в том числе нервные. Известны как стимулирующие, так и угнетающие последствия его воздействия на рост клеток, которые зависят от мощности и длительности облучения [3]. Использование ТГц излучения с плотностью мощности свыше 1 мВт/см^2 приводит к негативным последствиям на нервные клетки [4, 5], излучение с плотностью мощности порядка 0,1 мВт/см^2 не проявляет таких особенностей [6]. При этом излучение гелий-неонового лазера с плотностью мощности порядка 0,05 мкВт/см^2 показало положительные результаты при лечении дистрофий роговицы [7]. Поэтому актуальность данной работы заключается в исследовании влияния низкоинтенсивного ТГц излучения на

нервные клетки в терапевтических целях и определении возможных механизмов воздействия через численное и экспериментальное исследование спектральных характеристик объектов. Так как нервные волокна располагаются в строме на глубине 100-250 мкм, необходимо изучить распространение излучения через покровные слои роговицы, а именно оптические свойства фибробластов в терагерцовом диапазоне частот. С целью определения биологически безопасных уровней терагерцового воздействия на фибробласты исследовалась их функциональная активность после облучения.

В связи с тем, что в терагерцовом диапазоне частот находится большая часть колебательно-вращательного спектра межатомных и межмолекулярных взаимодействий биологических макромолекул, включая белки и нуклеиновые кислоты [8], структура которых самым радикальным образом влияет на их функциональность, исследование спектров дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) представляется весьма ценной информацией для определения особенностей клеточных процессов.

Цель работы – экспериментальное и теоретическое исследование распространения импульсного широкополосного терагерцового излучения через роговицу глаза, а именно изучение взаимодействия излучения с покровными слоями роговицы и нервными клетками, а также их компонентами.

Для выполнения цели диссертационной работы решались **следующие задачи**:

1. Экспериментальное исследование влияния терагерцового излучения частотного диапазона 0,1 – 2 ТГц на рост нейритов и функциональную активность фибробластов.
2. Численное и экспериментальное исследование спектральных характеристики и оптических свойств нервных клеток для выяснения механизмов воздействия излучения в терагерцовом диапазоне частот.

3. Экспериментальное исследование спектральных характеристик и оптических свойств фибробластов, как модели покровных слоев роговицы, в терагерцовом диапазоне частот
4. Изучение спектральных особенностей компонент клеток (ДНК) методами терагерцовой спектроскопии.

Защищаемые положения:

1. В диапазоне частот 0,1 – 1,1 ТГц оптическая глубина проникновения широкополосного ТГц излучения в слое фибробластов достигает 210 мкм. Впервые показано отсутствие изменений в соотношении живых и находящихся на разных стадиях апоптоза фибробластов, а также в распределении фибробластов по фазам клеточного цикла при воздействии импульсного ТГц излучения диапазона 0,1 – 2 ТГц со средней плотностью мощности до ~ 10 мкВт/см^2.

2. Впервые обнаружен дозозависимый эффект стимулирующего воздействия импульсного широкополосного терагерцового излучения в диапазоне 0,1-2 ТГц с плотностью мощности в диапазоне от 0,76 до 1,17 мкВт/см^2, имеющий максимум стимуляции при плотности мощности равной 0,87 мкВт/см^2. Данный эффект обусловлен преобладанием поглощения излучения в диапазоне частот от 0,1 – 1 ТГц до 1,2 – 1,6 ТГц и резонансным механизмом, связанным с размерными эффектами на нервных клетках на частотах 1,10; 1,16; 1,65; 1,69 и 1,90 ТГц.

3. Определены положения центров спектральных линий поглощения молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в диапазоне частот 0,1-1 ТГц методами терагерцовой спектрометрии. Идентифицированы колебания связей молекулы ДНК с водой (0,525) и колебания водородных связей между двумя цепочками ДНК (0,401; 0,467; 0,630; 0,687 и 0,710 ТГц), а также впервые была обнаружена спектральная линия поглощения ДНК на частоте 0,360 ТГц.

Научная новизна работы:

Определяется тем, что в ней впервые:

Показано, что действие импульсного широкополосного терагерцового излучения в диапазоне 0,1 – 2 ТГц на нервные клетки приводит к изменению их биологического отклика, определяемого по пролиферативной активности. С использованием техники импульсной терагерцовой спектроскопии и численного моделирования определены механизмы такого воздействия.

Впервые предложена схема облучения клеток, находящихся в жидкой среде, широкополосным ТГц излучением.

Впервые определено, что оптическая глубина проникновения импульсного излучения диапазона частот от 0,1 до 1,1 ТГц в слой фибробластов изменяется от 170 мкм до 210 мкм.

Доказано, что воздействие импульсного терагерцового излучения мощностью 30; 2 и 0,1 мкВт не оказывает влияния на изменение функциональной активности фибробластов.

Впервые определены положения центров линий поглощения молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в диапазоне 0,1 – 1 ТГц, не зависящие от связей ДНК с подложками и растворителями. Произведена идентификация частот спектральных линий, связанных с частотами собственных колебаний в молекуле ДНК и колебаниям водородных связей между двумя цепочками ДНК.

Обнаружено, что спектр ДНК имеет ранее не наблюдаемую спектральную линию поглощения на частоте 0,360 ТГц.

Идентифицирована частота спектральной линии поглощения 0,525 ТГц, которая ответственна за колебания, ответственные за изменение конформации молекулы ДНК при растворении в воде за счет образования межмолекулярных Н-связей.

Достоверность полученных результатов:

Достоверность и обоснованность результатов данной диссертации обеспечиваются применением всесторонне апробированных и широко

используемых экспериментальных методов, и современной измерительной техники в оптическом диапазоне длин волн (методики импульсной терагерцовой спектроскопии и фотометрии). Основные результаты, полученные диссертантом в экспериментальных исследованиях, хорошо согласуются с данными выполненного им численного моделирования рассматриваемого процесса в программной среде CST Microwave Studio. Проверка спектров ДНК проводилась на спектрометре на основе синтезатора частоты на лампе обратной волны и высокодобротного резонатора.

Методы исследования:

Экспериментальные спектральные характеристики и оптические свойства нервных клеток, фибробластов и их компонент получены с использованием методики импульсной спектроскопии терагерцового диапазона частот в режиме на отражение и пропускание. Исследование механизмов влияния терагерцового излучения диапазона 0,1 - 2 ТГц на рост нейритов проводилось с помощью метода конечных разностей во временной области (finite difference time domain method) в среде трехмерного численного моделирования CST Microwave Studio. С помощью методики импульсной терагерцовой фотометрии стимулировался рост нервных клеток, который оценивался с помощью морфометрического метода световым микроскопом. Функциональная активность фибробластов после облучения оценивалась при помощи проточной цитометрии с использованием анализа интенсивности флуоресценции ДНК связывающих красителей.

Практическая ценность результатов работы:

Представленные в настоящей диссертационной работе результаты и модели исследований могут быть использованы при проведении биологических экспериментов, в создании новых биотехнологий, для выбора параметров терагерцового излучения в новых медицинских приборах, при описании процессов взаимодействия терагерцового излучения с биологическими клетками, в преподавании курсов оптики и биофотоники. Предложены оригинальный метод и устройство для облучения широкополосным ТГц излучением клеток, находящихся в жидкой среде.

Практическая реализация результатов работы:

Результаты работы были использованы при подготовке лекций нового магистерского курса «Биофотоника» 12.04.03.68., введенного с сентября 2014 года в Университете ИТМО, а также для выполнения проектов в рамках федеральных целевых программ и государственных контрактов Министерства образования и науки 2009 – 2014 гг.

Апробация работы и публикации:

Результаты диссертационной работы докладывались и получили положительную оценку на 13 международных и российских конференциях: II International Symposium Topical Problems of Biophotonics (16-22 Июля 2011, г. Нижный Новгород, Россия); VII Международная конференция молодых ученых и специалистов «ОПТИКА – 2011» (17-21 Октября 2011, г. Санкт-Петербург, Россия); SPIE Photonics West (21-26 января, г. Сан-Франциско, США); 2-nd International Conference "Terahertz and Microwave radiation: Generation, Detection and Applications" (20-22 June, 2012, Moscow, Russia); 15th International Conference "Laser Optics 2012" (25-29 June, Saint-Petersburg, Russia); VI Международный конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине» (02 - 06 июля 2012г., г.Санкт-Петербург, Россия); Global symposium on Pain "Translational approaches to cause-oriented treatment of pain symptoms (22-24 August, St. Petersburg, Russia); X Международная конференция «Прикладная оптика-2012» (15-19 октября 2012 года, г. Санкт-Петербург, Россия), 2-я Всероссийская научная конференция молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (12-14 ноября 2012, Санкт-Петербург, Россия); IV Международная научная научно-практическая конференция «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (15-16 ноября 2012, Санкт-Петербург, Россия); European Conferences on Biomedical Optics (ECBO) (12 - 16 May 2013, Munich, Germany); Fundamentals of Laser-Assisted Micro- and Nanotechnologies (FLAMN-13) (24-28 June 2013, St Petersburg, Russia); Asia Pacific Microwave Conference (APMC) (5-8 November 2013, Seoul, South Korea); Progress In

Electromagnetics Research Symposium PIERS 2014 (25-28 August 2014, Guangzhou, China).

По материалам диссертации опубликовано 21 публикаций, из которых 10 статей в рецензируемых журналах из списка ВАК РФ и 11 тезисов конференций.

Личный вклад автора:

Диссертант самостоятельно выполнил и проанализировал все представленные экспериментальные исследования по получению спектральных характеристик, оптических свойств и биологического отклика нервных клеток, фибробластов и ДНК в диапазоне 0,1 – 2 ТГц.

Автор принимал непосредственное участие в моделировании, расчетах, создании экспериментальных установок, в обсуждении и интерпретации результатов. Все составляющие суть диссертации положения решены и сформулированы самостоятельно.

Основная часть экспериментов в лаборатории терагерцовой биомедицины Университета ИТМО. Часть экспериментов по влиянию терагерцового излучения на нервные клетки проведена на оборудовании лаборатории физиологии возбудимых мембран Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (г. Санкт-Петербург). Эксперименты по исследованию функциональной активности фибробластов после воздействия терагерцового излучения проводились на установках ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН (г. Санкт-Петербург). Экспериментальное исследование ДНК с помощью методики непрерывной терагерцовой спектроскопии проводилось на установках отдела терагерцовой спектрометрии Институт физики микроструктур РАН (г. Нижний Новгород).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения, списка цитируемой литературы. Материал изложен на 160 страницах, содержит 49 рисунков и 8 таблиц, список цитированной литературы представлен 189 публикациями.

ГЛАВА 1. Влияние излучения терагерцового диапазона частот на биологические объекты (обзор)

Целью данного раздела диссертации является рассмотрение нарушений нервного аппарата глаза, соответствующие им причины и методы их лечения, как медикаментозные, так и физиотерапевтические, и обоснование целесообразности настоящей диссертационной работы. Помимо этого необходимо проанализировать существующие литературные источники, посвященные особенностям излучения терагерцового диапазона и исследованиям по влиянию данного излучения на биологические объекты, а также вопросам безопасности его применения.

1.1. Методы терапии заболеваний глаз

Перед тем, как подойти к актуальности задачи воздействия ТГц излучения на рост нейритов с целью восстановления чувствительности и полноценного метаболизма роговицы, стоит подробнее рассмотреть строение роговицы, ее патологии и их возможные методы терапии.

Роговица глаза формирует переднюю стенку глазного яблока. Это прозрачная структура со сложным анатомическим строением. Она защищает глазное яблоко и проводит свет, корректно преломляя его, к чувствительным рецепторам сетчатки.

Анатомически роговица разделена на три слоя – эпителий, строму и эндотелий, разделенных мембранами. Верхний, внешний слой — эпителий. Глубже расположена боуменова мембрана, представляющая собой плотное скопление коллагеновых волокон нерегулярной структуры и специфических нитевидных кератоцитов.

Основную часть роговицы формирует строма, а под ней расположены десцеметова мембрана и эндотелий. Строма представляет собой относительно рыхлое переплетение фибробластов уплощенной формы

(кератоцитов), чьей основной задачей является синтез коллагена, и коллагеновых волокон.

Основным требованием к строме является ее оптическая однородность и прозрачность, что исключает наличие собственных кровеносных сосудов и прочих полостей. Поэтому питание клеток стромы осуществляется путем диффузии из периферических слоев роговицы. Существенную роль в трофическом обеспечении роговицы играют подходящие к строме аксоны нервных клеток, через которые осуществляется транспорт белков, пептидов, фосфолипидов и других биологических молекул, а также выведение побочных продуктов метаболизма [9].

Несмотря на сложность внутреннего устройства роговой оболочки, все ее слои представляют собой единый слаженный механизм, направленный на качественное выполнение основной функции: наилучшее проведение и корректное преломление световых лучей.

Нервная система играет ключевую роль в регуляции метаболизма роговицы. Информация со светочувствительных рецепторов поступает к волокнам зрительного нерва, пронизывающим толщу сетчатки и образующим так называемый слой нервных волокон на внешней ее поверхности (Рисунок 1.1). Затем нервные пучки группируются в оптическом диске и образуют зрительный нерв, проводящий зрительную информацию в головной мозг, где она поступает в соответствующие его участки. Однако не только сетчатка, но и роговица густо пронизана нервными волокнами. Сеть чувствительных нервных окончаний располагается в толще стромы и ближе к ее внешнему краю и проходит к эпителию. Эти нейриты не только осуществляют снабжение роговой оболочки строительными и питательными веществами, но и обеспечивают роговичный рефлекс — смыкание век при механическом воздействии на роговицу или ее пересыхании, что позволяет защитить нежную оболочку глазного яблока [10].

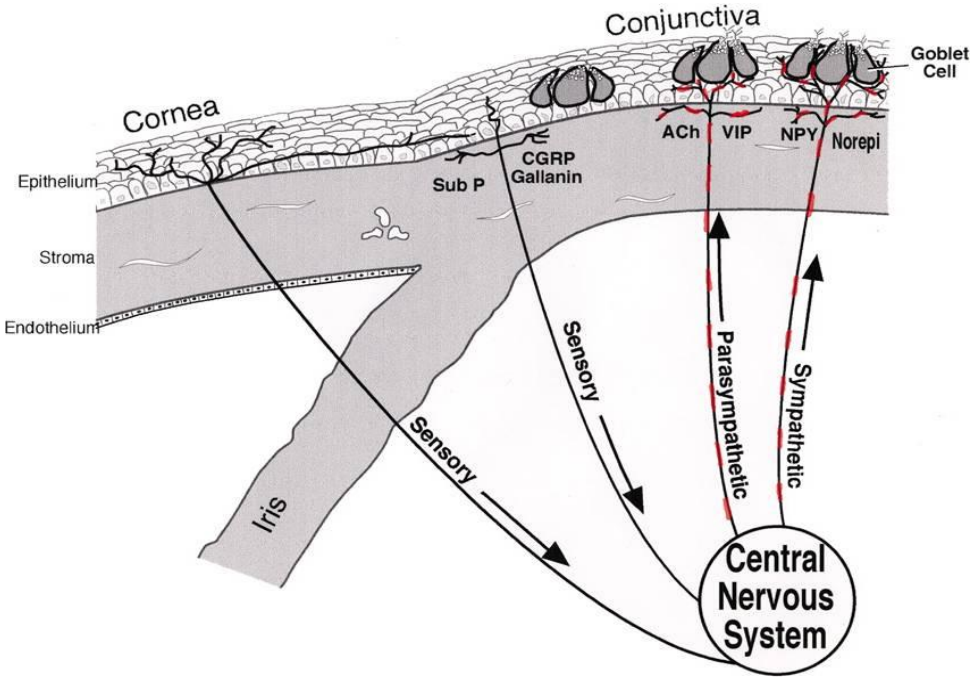


Рисунок 1.1 - Расположение нервных окончаний в роговице [11]

Нарушение механизма иннервации роговицы приводит к расстройствам ее метаболизма и к понижению чувствительности соответствующих нервных рецепторов, вплоть до полной их дисфункции, а со временем — к дистрофическим дегенеративным процессам и воспалительным реакциям. Это может быть следствием травм, неврологических нарушений разной природы либо возрастных изменений, а иногда возникает послеоперационное осложнение после микрохирургических вмешательств.

Подавляющее большинство микрохирургических операций, проводящихся на передней стороне глазного яблока, предполагает повреждение роговой оболочки и значительное ухудшение ее иннервации. Одной из наиболее популярных операций по восстановлению зрения является эксимерлазерная рефракционная хирургия. Лазерное воздействие, независимо от способа — будь то фоторефракционная кератэктомия (ФРК) или лазерный кератомилез (Lasik) — позволяет в значительной степени минимизировать риск послеоперационных осложнений. Однако само

формирование роговичного лоскута предполагает некоторое нарушение анатомической целостности роговицы и сети ее нервных окончаний.

Подобное нарушение иннервации затрудняет процессы заживления хирургического дефекта роговой оболочки, прежде всего вследствие нарушения трофической функции нейронов и ослабления роговичного рефлекса. Особенно страдает наружный эпителий роговицы, чья защитная функция в значительной мере ослабляется. Длительность и выраженность этих нарушений зависит от степени повреждения нервной сети и индивидуальной скорости нейрорегенеративных процессов. Однако многие офтальмологические операции — криокератомилез, кератомилез in situ, ФРК, факоэмульсификация, Lasik — в числе возможных послеоперационных осложнений могут приводить к снижению чувствительности роговицы и к дегенеративным процессам в соответствующих нервных окончаниях [12].

Так, после операции ФРК при миопии в пределах зоны абляции чувствительность рецепторов роговицы теряется полностью вследствие полного разрушения нервных волокон эпителия и существенного нарушения стромальной нервной сети роговицы. Образующийся заново в процессе послеоперационного восстановления эпителиальный слой практически лишен нервных окончаний сам и снижает чувствительность нижележащих нервных рецепторов стромы. Реиннервация эпителиального слоя роговицы происходит медленно, и в течение года после операции все еще не обеспечивает нормальной чувствительности. Этот процесс может рассматриваться как иллюстрация разрушения и последующей регенерации нервных окончаний [13].

Согласно другим исследованиям, операция по методике Lasik предполагает нарушение целостности роговичного нерва, что приводит к потере его функциональности по данным неврограммы [2]. Реиннервация роговичного эпителия и стромы после операции ФРК занимает не менее 6-8 месяцев, и новообразованная нервная сеть анатомически отличается от интактной, отличаясь неравномерностью распределения рецепторов и

наличием добавочных тонких нейритов. Восстановление иннервации роговицы, насколько можно судить по выраженности роговичного рефлекса, начинается через один – полтора месяца после операции и продолжается не менее 6-12 месяцев, хотя и после этого срока можно наблюдать некоторые анатомические различия в структуре нервных волокон [14].

Нарушение иннервации роговой оболочки также негативно отражается на состоянии и функциональной компетентности эпителия роговицы. Повреждение чувствительных рецепторов приводит к нарушениям адгезивных свойств эпителиальных клеток, дегенеративным процессам в нервных волокнах, что не может не сказаться на функциональности самой роговицы вплоть до развития нейропаралитической кератопатии [15].

Все исследователи сходятся на том, что послеоперационное восстановление функциональности нервных клеток роговицы требует длительного времени. По существующему мнению, именно скорость регенерации и реиннервации эпителиального слоя роговицы является ключевым фактором в оценке риска послеоперационных осложнений, связанных с частичной либо полной потерей чувствительности и функциональности роговицы [1]. Эпителиальный слой роговицы восстанавливается относительно быстро, обеспечивая полную эпителизацию в течение 3-4 дней после операции ФРК, в то время как полная реиннервация требует около года [16].

Метод Lasik является одним из наиболее популярных микрохирургических вмешательств, и количество операций в мировом масштабе составляет около трех миллионов ежегодно [17]. Помимо прочих преимуществ, эта методика предполагает более быстрое восстановление нормальной чувствительности роговицы (от 2,5 до 3,5 месяцев) по сравнению с ФРК, предполагающей 3-5-месячный срок восстановления. При этом полное восстановление функциональности нервных волокон роговицы до предоперационных значений может длиться год и более, а примерно у каждого десятого пациента реиннервация не происходит, скорость

эпителизации снижается, что в свою очередь может приводить к нарушениям метаболизма и функциональности роговицы [18].

Поэтому огромное значение для хирургической офтальмологии имеет разработка методов стимуляции синтеза и роста нервных окончаний. Повышение скорости реиннервации при регенерационных процессах в роговице позволит существенно снизить риск послеоперационных осложнений. Стимуляция нейрорегенеративных процессов может оказаться чрезвычайно полезной при различных нейропатиях, для которых на данный момент эффективных методов лечения не разработано: атрофических и денегеративных процессов зрительного нерва (часто встречающихся осложнениях при глаукоме и заболеваниях сетчатки), различных нейродегенеративных процессов в роговице (нейропаралитическая кератопатия, диабетическая кератопатия, язва роговицы). Поэтому новые эффективные методы стимуляции нейрогенеза и роста нервных волокон в сетчатке или роговице глаза теоретически могут применяться для лечения многих офтальмологических заболеваний.

1.1.1. Медикаментозные методики нейрогенеза роговицы

Негативным последствием хирургического вмешательства в область роговой оболочки глаза может являться снижение её чувствительности. В настоящее время, к сожалению, не осуществляется активная послеоперационная обработка роговицы для стимуляции процессов заживления. Предполагается, что её чувствительность через определённое время восстановится сама. В ряде случаев применяется лишь определённый спектр симптоматических препаратов в виде глазных капель и мазей для лечения синдрома сухого глаза. Уменьшают чувствительность роговицы и некоторые заболевания: нейропаралитическая и диабетическая кератопатия, язва роговицы.

Решению перечисленных проблем на уровне нервного аппарата глаза посвящена единственная на данный момент разработка медикаментозного

препарата для стимуляции роста нейритов глаза, опубликованная в патенте в 2012 году несколькими японскими фирмами [2]. Это изобретение направлено на проблему восстановления зрения за счёт улучшения чувствительности роговой оболочки. Необходимый эффект достигается стимулированием роста отростков нейронов – дендритов или аксонов с помощью вещества из группы амидов. Активный ингредиент – запатентованное соединение N-(1-ацетилпиперидин-4-ил)-4-фторбензамид, которое можно ввести в состав глазных растворов или мазей.

Следуя принятой терминологии, нейритом называется отросток нервной клетки (нейрона). Это и аксон (осевой цилиндр, передающий импульсы от тела клетки), и дендрит (разветвленный отросток, передающий информацию телу клетки). «Генез» подразумевает рост нейрита, то есть его удлинение, а «стимулирование генеза», соответственно, - удлинения нейрита из клетки под действием активного вещества.

Проведены эксперименты, выявившие следующее положительное действие данного соединения:

1) Стимуляция нейритогенеза в ретинальных клетках кролика. Об этом свидетельствуют фотографии нейритов сетчатки, окрашенных антителами к нейрофиламентам: при добавлении N-(1-ацетилпиперидин-4-ил)-4-фторбензамида отмечался интенсивный нейритогенез (Рисунок 1.2);

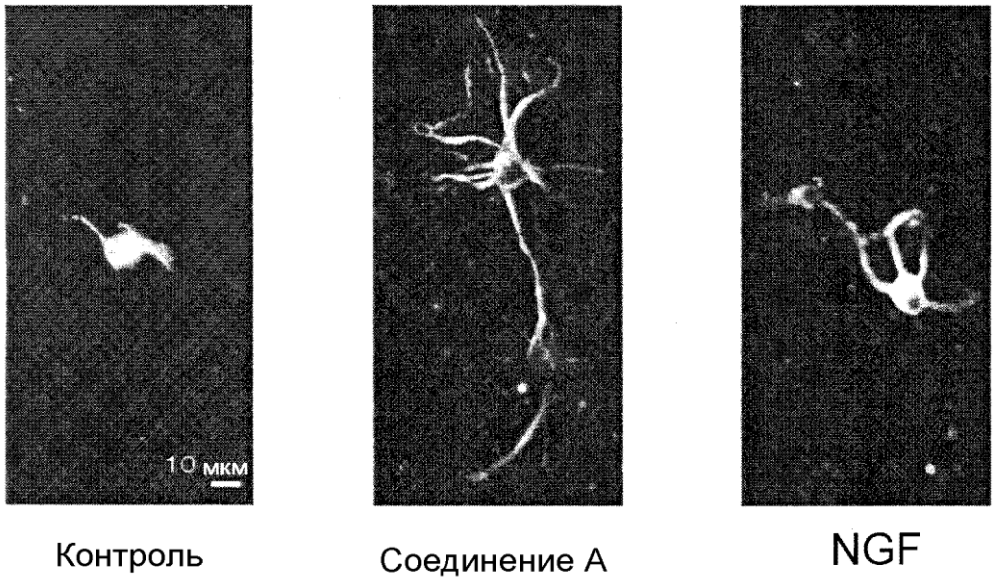


Рисунок 1.2 - Отношение (%) клеток с нейритогенезом ко всем клеткам [2]

2) Ускоренное восстановление пониженной после создания лоскута чувствительности роговой оболочки кроликов. Срок восстановления чувствительности роговицы в опыте на 1,5 недели обгонял контрольные варианты (Рисунок 1.3).

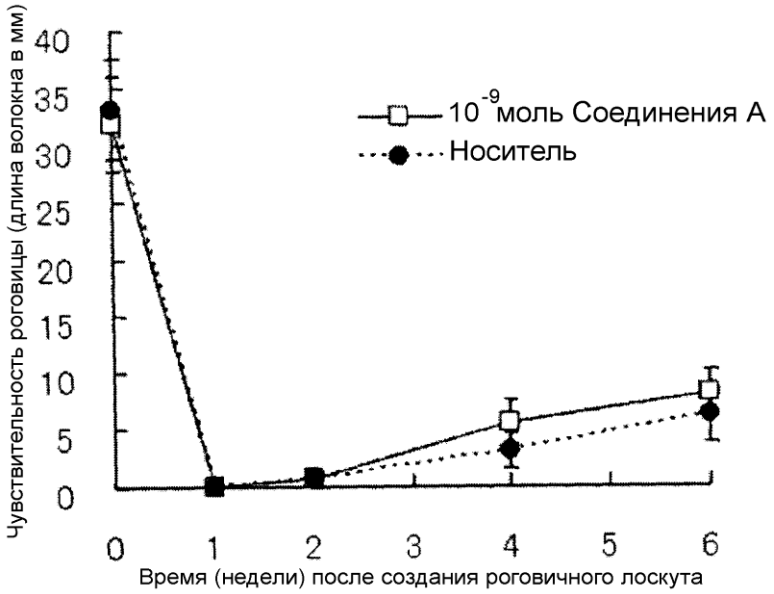


Рисунок 1.3 – Длина нервных волокон у контрольных образцов и с применением запатентованного соединения, изменяющаяся в течение 6 недель после создания роговичного лоскута [2]

3) Стимуляция нейритогенеза в клеточной культуре тройничного нерва кролика была представлена в данной работе двояко: для одних тех же условий для 5 образцов в одном случае показано, что в контроле у 30,4 % клеток отмечено удлинение отростков, а при добавлении вышеназванных амидов – у 45,9 %; во втором случае результаты свидетельствуют о 29,5 % для контроля и 70 % для исследуемого соединения (Рисунок 1.4).

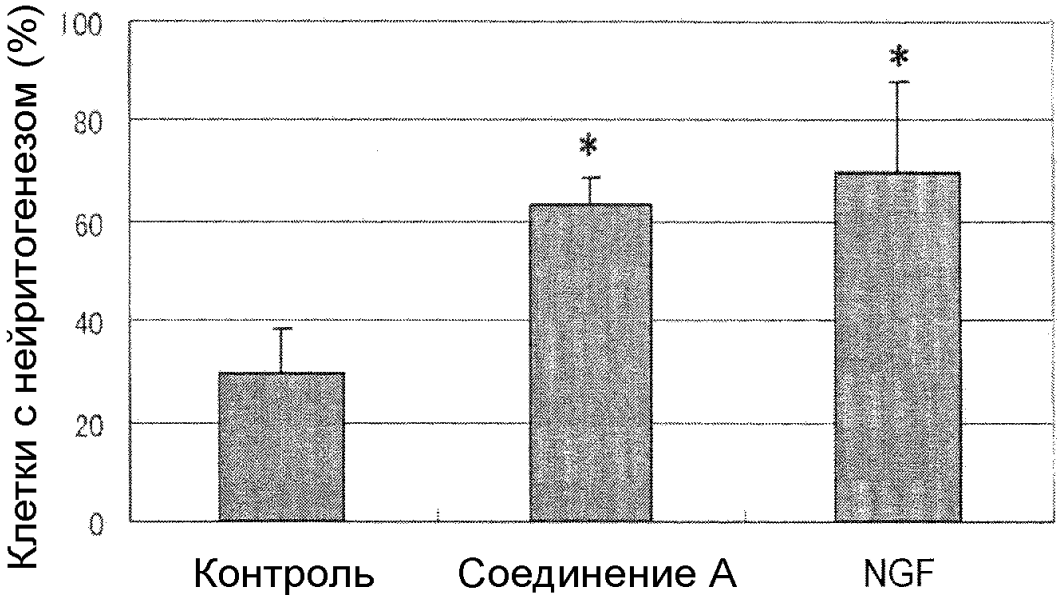


Рисунок 1.4 - Отношение (%) клеток с нейритогенезом ко всем клеткам [2]

Помимо неоднозначных результатов по стимуляции нейритогенеза и малого количества исследуемых образцов недостатками методики, вследствие ее инвазивного характера, являются:

1) непродолжительность терапевтического эффекта, в связи с чем требуется частое применение лекарства;

2) низкая биодоступность препарата;

3) его химическая нестабильность;

4) несовместимость уровня кислотности препарата и тканей;

5) нарушение стерильности;

6) дискомфорт во время применения.

1.1.2. Физиотерапевтические методики нейрогенеза роговицы

Фармакологические средства, применяемые в современной офтальмологии, оказывают кратковременный эффект. Более перспективным является комплексное лечение, предполагающее сочетание медикаментозной терапии с хирургией и физиотерапией. Рассмотрим, например, методики восстановления функций частично атрофированного зрительного нерва.

Наряду с использованием медикаментозных препаратов нерв подвергают действию электрического тока (так называемой электростимуляции). В нейрозрительной системе человека при раздражении импульсным током происходит ответная рефлекторная реакция. Морфофизиологические сдвиги, возникшие в нервной системе в ответ на воздействие электрического тока, способствуют восстановлению работы зрительного нерва. При этом повышается острота зрения и улучшается предметное зрение. У 68 % пациентов достигается стойкий функциональный эффект, у 21 % – положительный результат терапии несколько снижен, и лишь у 11 % отмечена стабилизация патологии [19]. Из отрицательных моментов использования данной методики замечены некоторые неудобства, которые испытывают пациенты при кожном либо прямом электростимулировании глазных нервов.

Магнитотерапия также относится к неинвазивным методам. В лечебных целях применяют переменные или прерывистые постоянные низкочастотные магнитные поля. Индуцируемое переменным магнитным полем движение ионов приводит к выделению тепловой энергии внутри тканей. Процесс сопровождается варьированием окислительно-восстановительного потенциала и изменением в протекании ферментативных реакций в тканях [20, 21]

Возможно использование и таких методов, как: лечение ультразвуком [23, 24], фонофорез, электрофонофорез, а также лазеротерапия [25]. Разными исследователями зафиксирован 46,6-98,2%-ный эффект воздействия [26]. Общим недостатком методов является непродолжительность улучшения

зрительных функций и меньшая выраженность повторных курсов терапии. В лечении атрофии зрительного нерва используются гальванизация, основанная на применении постоянного электротока низкого напряжения и лекарственный электрофорез (ионогальванизация, ионофорез, ионоэлектротерапия, диэлектролиз) [23].

Для лечения заболеваний глаз, связанных с нарушениями обменных процессов, применяется облучение низкоинтенсивным инфракрасным лазерным излучением. Перспективным является применение данного метода при терапии как заднего, так и переднего отдела глаза, включая и роговицу. Лазерное излучение низкой интенсивности позитивно влияет на восстановительные процессы в роговой оболочке, оказывая противовоспалительный, рассасывающий, десенсибилизирующий эффект и стимулируя процессы клеточного питания [27].

Как уже отмечалось выше, недостатком физических методов лечения патологий глаз является кратковременность положительного эффекта, а также невозможность одновременного воздействия на все звенья патологии [23,24,25]. Эти методы пригодны для выведения из угнетённого состояния жизнеспособных, неповреждённых нервных клеток, но не могут стимулировать образование в глазу новых нервных окончаний.

1.2. Анализ воздействия терагерцового излучения на биологические объекты

Электромагнитное излучение ТГц частот находится в диапазоне 0,1 - 10 ТГц и занимает область спектра, расположенную между инфракрасным и микроволновым излучением. Ему соответствуют длины волн от 30 мкм до 3 мм. Вследствие низкой энергии кванта (0.41 — 41 мэВ) оно относится к неионизирующему излучению, но вместе с тем обладает заметным воздействием на живые объекты, вследствие чего представляет интерес для медицины. В этом диапазоне находится большая часть колебательно-вращательного спектра межатомных и межмолекулярных взаимодействий не

только воды, но и биологических макромолекул, включая белки и нуклеиновые кислоты [8].

Эти свойства делают излучение терагерцового и дальнего инфракрасного диапазонов весьма перспективным для разработки методов спектрального анализа органических макромолекул. Большое количество линий поглощения в терагерцовой части спектра свойственно для многих макромолекул сложной структуры, в том числе дезокси- и рибонуклеиновых кислот [8, 28, 29].

Весьма многообещающим представляется использование этого излучения в медицине для детальной визуализации in vivo, что позволяет облегчить диагностику дерматологических, онкологических, сердечнососудистых и стоматологических заболеваний [30-33].

Чувствительность излучения ТГц частот к молекулам воды ограничивает возможности его диагностического использования, но вместе с тем позволяет с достаточной точностью определять степень гидратации тканей, которая может служить индикатором ее состояния[34].

ТГц-излучение в биологических и медицинских исследованиях находит все большее применение. Вместе с тем комплексное и детальное понимание воздействий этого излучения — позитивное либо негативное - на биологические объекты требует дальнейших исследований. В последнее время все большее количество работ связаны с изучением эффектов, возникающих вследствие облучения волнами терагерцового диапазона различных биологических объектов [4-6, 35-80].

В работах, посвященных влиянию ТГц излучения на биологические системы, наблюдается как стимулирующий, так и угнетающий характер влияния ТГц излучения. На рисунке 1.5 представлены работы, посвященные различным эффектам влияния непрерывного (обозначено квадратами) [4, 5, 35-66] и импульсного (обозначено кругами) [36, 67-77] терагерцового излучения, в том числе на пролиферативную активность клеток, их жизнеспособность, проницаемость мембран, генную экспрессию и многое

другое. Экспериментальные данные представлены в виде зависимости от плотности мощности ТГц излучения и от времени облучения. Серым цветом на графике отмечено отсутствие эффекта при воздействии ТГц излучения, 28 % работ [6, 35-40, 69, 73-77], красным цветом – отрицательный эффект влияния, 38 % работ [4, 5, 40-55, 68-72], зеленым – положительный эффект влияния (применимо к терапевтическим приложениям), 24 % работ [56-65, 67], а синим – эффект без однозначной интерпретации, относящийся в большей степени к раскрытию механизмов влияния, как, например, обратимое изменение проницаемости мембраны во время ТГц воздействия, 10% работ [4, 40, 66]. Среди большинства работ, посвященных негативному эффекту влияния ТГц излучения, можно выделить область исследований с положительным эффектом воздействия при использовании ТГц излучения с плотностью мощности от 0,001 до 10 мВт/см^2 при времени облучения от 10 до 100 минут. Большинство работ в этой области выполнялось с использованием непрерывных источников ТГц излучения, в то время как исследования по влиянию импульсного излучения с такими же параметрами не выявляет никаких эффектов воздействия.

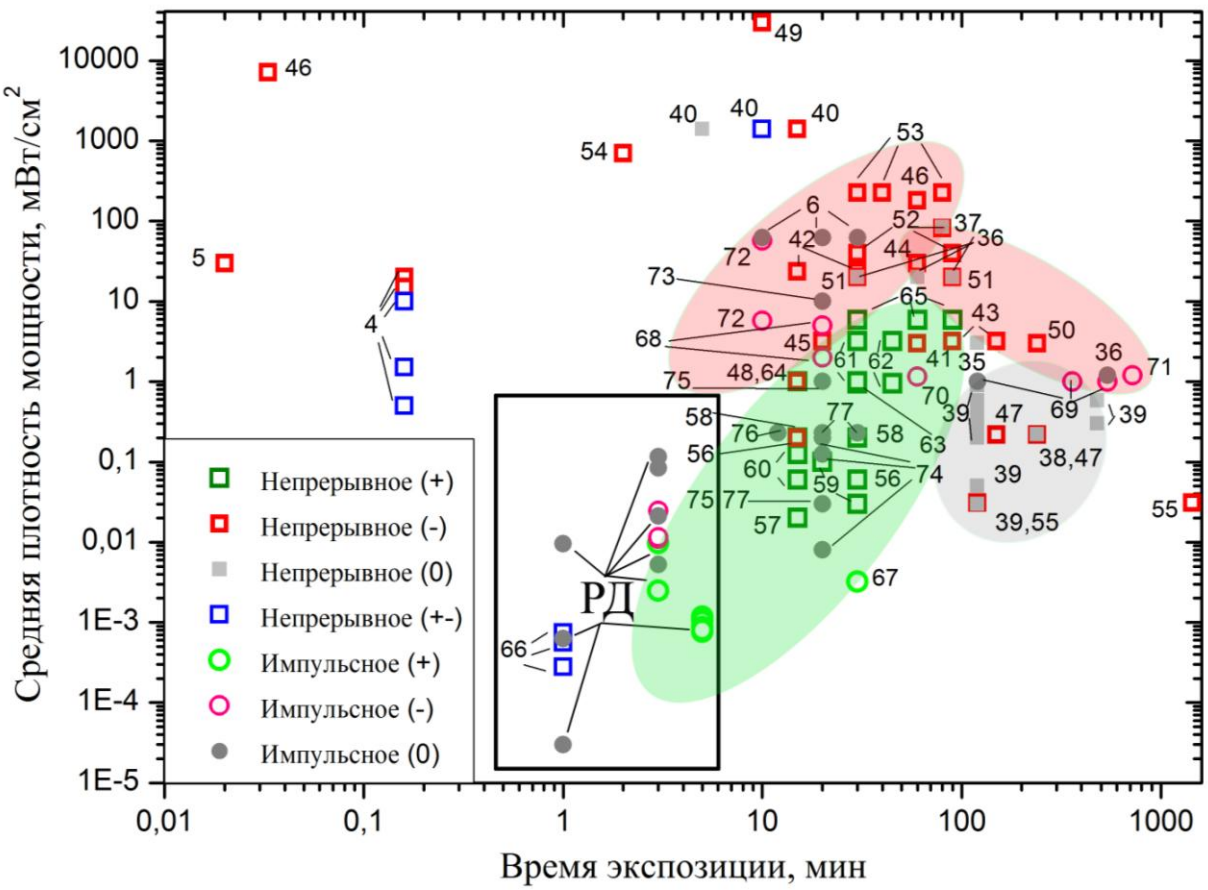


Рисунок 1.5 - Характер влияния ТГц излучения на биологические системы в зависимости от средней плотности мощности и от времени облучения (результаты работ 4-6, 35-77 и настоящей работы). Квадратами обозначены результаты воздействия непрерывного излучения на биологические объекты, кругами – импульсного излучения. Серый цвет – отсутствие эффекта, красный – негативный эффект, зеленый – терапевтический эффект, синий – эффект, относящийся к раскрытию механизмов влияния. Результаты данной работы представлены знаком «РД»

Из диаграммы видно, что работы, выполненные при практически одинаковых характеристиках излучения, зачастую отличаются полученным после воздействия эффектом на биологических объектах. Например, работы 6 и 72; 36, 42 и 51; 36 и 69; 37 и 52; 39 и 55; 48 и 64; 56 и 58; 58 и 77; 72 и 74. В связи с тем, что все рассмотренные работы выполнены на разных объектах (от генов до организмов), очень сложно их структурировать и делать утверждения о характере и механизмах влияния ТГц излучения. Стоит

отметить, что, исходя из результатов проведенного обзора, существует возможность использования ТГц излучения в терапевтических целях [56-65, 67]. Однако в настоящее время ТГц излучение рассматривается большинством ученых как новый метод медицинской диагностики, в том числе диагностики рака кожи и груди. Именно в этом направлении сейчас сосредоточены основные усилия исследователей [78, 79]. При этом если говорить о диагностическом применении ТГц излучения, то нежелательно получение какого-либо эффекта влияния ТГц излучения.

Так как импульсные ТГц источники стали активно исследоваться и применяться только в последние пять лет, в 80 % опубликованных работ исследовалось влияние источников непрерывного ТГц излучения. Однако импульсное ТГц излучение имеет наибольший потенциал для медицинских задач, поскольку оно позволяет анализировать широкий спектральный диапазон исследуемого объекта за одно время сканирования. Видно также, что большинство исследований проводились при большой длительности облучения. Поэтому образуется область с характеристиками излучения менее 1 мВт/см^2 и длительностью облучения менее 10 минут, где проводилось только одно исследование по влиянию непрерывного излучения [66] и не проводилось исследований по влиянию импульсного терагерцового излучения. По результатам работы [66] наблюдалось как блокирование, так и усиление нейронной активности при воздействии излучения на частоте 0,06 ТГц в течение 1 минуты при низкой плотности мощности (0,07; 0,28; 0,56 и 0,74 мкВт/см^2).

Суммируя результаты вышеперечисленных статей, можно сказать, что терагерцовое излучение вызывает разнонаправленные биологические эффекты, которые проявляются на разных уровнях организации биологических систем, в том числе на клеточном уровне [35, 83]. На этом уровне доказанное воздействие терагерцового излучения проявляется в основном в изменении мембранной проницаемости и влиянии на экспрессию генов [35, 80]. В исследованиях различных авторов показано усиление

проницаемости плазматической мембраны под воздействием ТГц излучения, что доказывается проникновением в клеточное пространство веществ, для которых в обычном состоянии мембрана непроницаема.

Поскольку наши исследования посвящены влиянию волн ТГц диапазона частот на нервные и покровные клетки, то особый интерес для данного обзора представляют работы, где исследуется воздействие излучения на подобные биологические объекты либо на клеточные мембраны.

Так, на культивируемых in vitro нейронах моллюска Lymnaea stagnalis при облучении частотой 2,3 ТГц (экспозиция 10 сек., плотность мощности излучения от 0,5 до 20 мВт/см^2) показано нарушение неспецифической проницаемости мембраны, которое проявлялось в окрашивании клеточного содержимого красителем трипановый синий [4]. Чем больше повреждена мембрана, тем больше красителя проникает в клетку и локализуется в отдельных ее частях; выраженность этого эффекта оказалась в прямой зависимости от мощности облучения. Если при облучении низкой мощности при длине волны 130 мкм и частоте 2 ТГц наблюдались только единичные окрашенные клетки с пониженным или нулевым значением мембранного потенциала, то с увеличением мощности удельная доля таких клеток росла.

Авторы предположили, что повреждение выражается в индуцируемом терагерцовым излучением образовании сквозных гидрофильных пор, так как только через такие поры краситель проникает в клетку. Эффект обратим, поскольку через 24 часа после облучения мембранный потенциал таких клеток не отличался от нормального значения. О восстановлении мембраны после повреждения свидетельствует наблюдаемая в этих и контрольных клетках флуоресценция красителя, проникающего через неповреждённую мембрану. При облучении на частоте 2 ТГц и тех же параметрах экспозиции отмечены только единичные равномерно окрашенные клетки, мембранный потенциал которых был пониженным или нулевым. Была обнаружена зависимость количества

окрашенных нейронов от мощности излучения на длине волны 130 мкм (Рисунок 1.6).

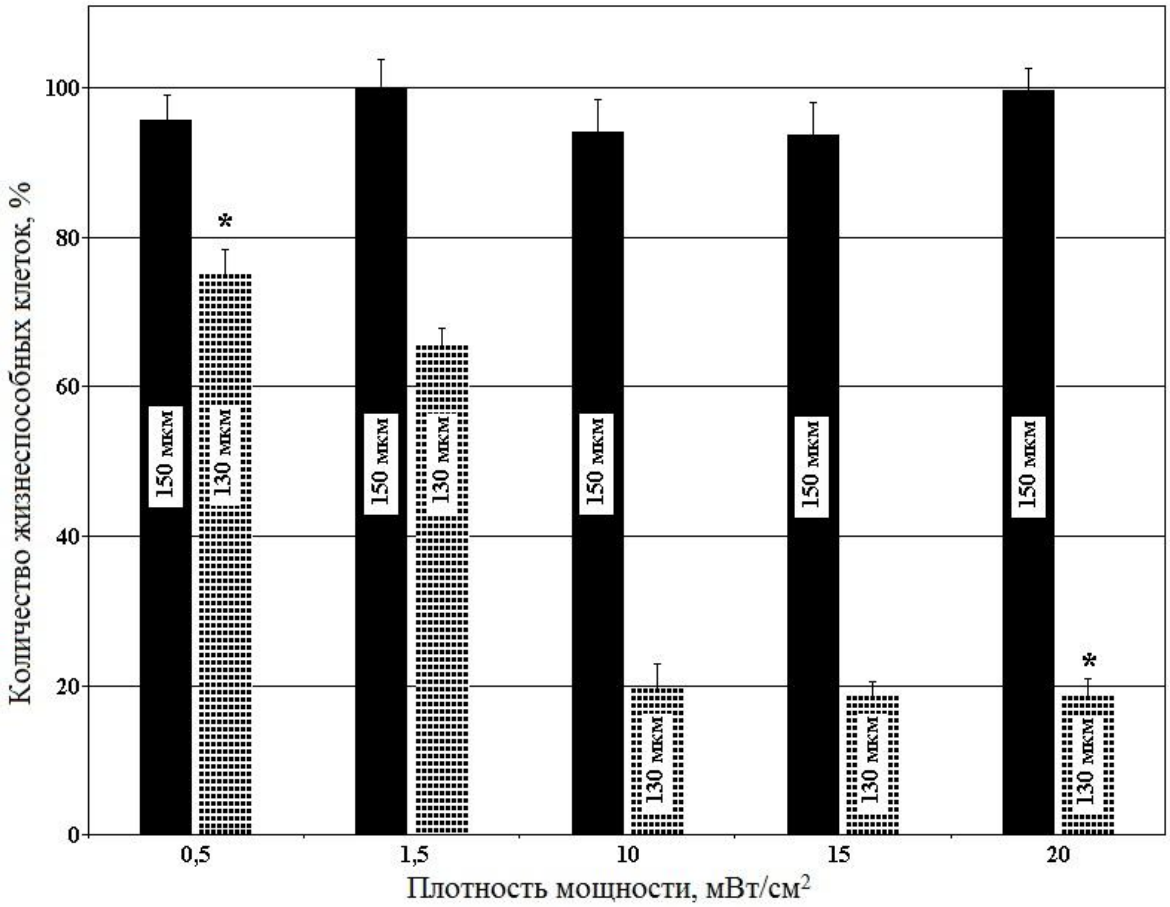


Рисунок 1.6 - Зависимость количества жизнеспособных клеток (не окрашенных трипановым синим) от длины волны и мощности излучения [4]

Авторы данного исследования полагают, что механизм воздействия излучения состоит в образовании пронизывающих мембрану гидрофильных пор, так как иным образом краситель не может проникнуть внутрь нейрона. В течение суток после облучения проницаемость мембраны полностью восстанавливалась. Это доказывается не только нормальной реакцией мембраны на флуоресцентный краситель, показатели проникновения которого в клетку спустя сутки не отличаются от контрольных, но и восстановлением значений мембранного потенциала. Следовательно, ТГц

излучение вызывает обратимые и регулируемые нарушения проницаемости клеточной мембраны [4].

При облучении с частотой 2,3 ТГц при экспозиции 60 сек. и плотности мощности излучения 30 мВт/см^2 наблюдалось постепенное падение значений мембранного потенциала, за которым следовали необратимые морфологические нарушения мембранных органелл и немембранных структур и, в конце концов, гибель клеточной культуры в течение 2 ч [81]. Уменьшение мощности облучения до 3 мВт/см^2 приводило к гибели клеток в течение 3 ч. При средней плотности мощности 0,3 мВт/см^2 количество жизнеспособных клеток стабилизировалось через 2 ч и в дальнейшем не изменялось. Однако изменение частоты излучения до 2,16 ТГц при тех же параметрах воздействия (длительность экспозиции 60 сек., плотность мощности 0,3 мВт/см^2) приводило к полной гибели клеточной культуры через 1 час после облучения.

Эффект повышения проницаемости клеточной мембраны под действием терагерцового излучения показан также в опытах на фибробластах кожи человека при облучении на частоте 2,52 ТГц с плотностью мощности излучения 227 мВт/см^2 при облучении свыше 12 секунд [37]. Эффект оценивали по появлению в цитоплазме клеток красителей, один из которых проникает только в клетки с мембранами, имеющими поры, другой – локализуется на внутренней стороне мембраны интактных клеток, но распространяется по цитоплазме клеток, находящихся в стрессовом состоянии. При уменьшении времени облучения проницаемость наоборот снижалась.

Повышение проницаемости, вызванное терагерцовым излучением, продемонстрировано также на модельном объекте клеточной мембраны – липосоме при облучении на частоте 0,13 ТГц. Импульсное облучение с плотностью мощности излучения 8,17 мВт/см^2 (частота следования импульсов 7 или 10 Гц, продолжительность импульса 50 пс) в течение 2 минут привело к двукратному увеличению проницаемости, тогда как

облучение с меньшей плотностью или частотой следования импульсов в 5 Гц такого влияния не оказывало [76]. Непрерывное излучение на частоте 0,15 ТГц с плотностью мощности излучения 6,2 мВт/см^2 в течение 2-3 мин не повлияло на проницаемость. Авторы предположили, что терагерцовое излучение вызывает перестройку липидного бислоя, ведущую к повышению его проницаемости.

ТГц излучение вызывает не только изменение проницаемости мембраны, но и нарушение ее целостности. Это было доказано in vitro на эритроцитах периферической крови человека [51]. У клеток, подвергнутых облучению частотой 3,68 ТГц (длительность экспозиции 60 мин, мощность излучения 20 мВт) выход гемоглобина был заметно интенсивнее, чем в контрольном образце, и время разрушения оболочки эритроцитов у таких клеток резко сокращалось. Выраженность эффекта зависела от концентрации NaCl в растворе. При этом показатели спонтанного гемолиза оставались неизменными.

Наряду с этим некоторые работы показывают, что облучение не влияет на функциональную активность кератоцитов человеческой кожи [73] и культуры фибробластов хомячка [82]. Другие исследователи [6] наблюдали снижение показателей функциональности и жизненного потенциала человеческих кератоцитов не только непосредственно в точке облучения излучением с частотой 0,14 ТГц с плотностью мощности $1 \div 4$ мВт/см^2, но и на некотором удалении от нее. При непрерывной экспозиции длительностью 2-3 часа снижение показателей клеточной активности наблюдалось в течение 120 часов после облучения.

Подобные эффекты являются лишь отражением глубокого воздействия, которое ТГц излучение оказывает на межатомные и межмолекулярные процессы в мембранах и других клеточных системах. Изменение конформации белков мембраны может запускать целый каскад сигнальных, регуляторных, метаболических реакций, конечной точкой

воздействия которых может стать изменение функциональной активности генов.

1.3. Специфичность терагерцового диапазона частот для биологических обьектов

Рассмотрим возможные механизмы воздействия терагерцового излучения. Терагерцовый диапазон частот соответствует колебательно-вращательным спектрам квантовых переходов в молекулах воды, колебательным модам водородных связей, спектральным частотам низкоэнергетических квантовых состояний сложных биологических макромолекул, прежде всего белков и нуклеиновых кислот, чья конформационная устойчивость, пространственная организация и функциональная активность отдельных доменов зависит от степени гидратации и устойчивости слабых водородных связей [8]. К терагерцовому диапазону частот относятся спектры поглощения и других биологически активных соединений, причем не только отдельных молекул, но и колебательных переходов в местах межмолекулярного взаимодействия.

Однако большинство исследователей сходятся на том, что основная часть поглощенного живыми тканями ТГц излучения приходится на молекулы воды [3, 83-87]. Это происходит благодаря тому, что молекулы воды образуют максимальное количество водородных связей как между собой, так и с многочисленными растворенными и гидратированными соединениями. Это позволяет образовывать сложные динамические цепочки и сети из диполей, которые сообща отвечают на изменения среды. Межмолекулярные колебания макроскопической сети дипольных молекул воды обладают собственным вращательно-колебательным спектром с частотой 5,6 ТГц. [88-90]. Кроме того, медленная релаксация больших агрегаций, которые молекулы воды образуют с помощью водородных связей, обуславливает сильные межмолекулярные колебания частотой 1,5 ТГц [88-

90]. Все это делает водную среду наиболее эффективным хромофором для терагерцового излучения.

Сложные биологические макромолекулы также способны к образованию подобных агрегаций и, следовательно, к коллективным колебательным взаимодействиям в терагерцовом диапазоне частот, как уже указывалось выше [3, 28, 91-93].

Достаточно активно поглощают указанное излучение гидратные оболочки макромолекул, в особенности находящихся с внешней стороны клеточной мембраны. Эффективным акцептором энергии терагерцовых волн является и растворенный в воде кислород. Если под воздействием облучения ТГц диапазона частот гидратные оболочки мембранных белков и фосфолипидов (а также доступность молекулярного кислорода) претерпевают существенные изменения, это не может не сказаться на структуре транспортных и сигнальных белков. Терагерцовое излучение влияет и на селективную проницаемость, и на размер мембранных пор. Соответственно, меняется вся система клеточного транспорта, включая ее селективность и специфичность к отдельным молекулам (как правило, и селективность, и специфичность клеточного транспорта под воздействием облучения снижаются). Изменения транспортных и сигнальных мембранных белков запускают молекулярные каскады реакций во внутриклеточной среде и существенно изменяют механизмы клеточной регуляции [94]. В зависимости от типа воздействия подобные изменения затрагивают практически все аспекты клеточной активности, от регуляторной и ферментативной до иммунной и генетической.

При описании воздействия различных излучений на биологические объекты существенным параметром становится их разделение не только на ионизирующие и неионизирующие, но и, в зависимости от мощности излучения, на тепловое и нетепловое. Условной границей этого разделения считается мощность потока излучения в 10 мВт/см^2. Излучение более мощного потока повышает температуру биологических объектов на 0,1°С и

выше [95]. Это происходит за счет теплового рассеяния электромагнитной энергии, что вызывает локальный нагрев живой ткани. Если мощность излучения меньше указанной, такой нагрев не превышает 0,1°С, что в большинстве случаев является физиологически несущественным [95, 96]. В таком случае все наблюдаемые при воздействии такого излучения эффекты следует относить на счет его специфического биологического воздействия, не связанного с термическими процессами [97].

Поскольку в норме большинство живых тканей обладают высокой степенью гидратации, они весьма интенсивно поглощают электромагнитное излучение ТГц диапазона частот, что при достаточной мощности потока сопровождается нагревом. Однако в некоторых случаях ТГц излучение способно вызывать специфические нетепловые и микротепловые эффекты, а также тепловые эффекты низкого уровня. Подобная теория выдвигалась Фролихом и др. в работах 1971 года [98, 99]. Микротепловые эффекты терагерцового излучения были объяснены прямой передачей возбуждения по цепочке молекул [98] и линейными / нелинейными резонансными механизмами [100, 101]. Экспериментальное подтверждение этих теорий на данном этапе затруднено из-за недостаточной чувствительности лабораторного оборудования, поэтому само существование микротепловых эффектов, не говоря о конкретных механизмах их проявления, является спорным [69, 102]. Однако многие явления, наблюдаемые в ходе экспериментов с облучением терагерцовыми волнами, достаточно трудно объяснить только термическим воздействием излучения [3].

Нетепловые специфические эффекты терагерцового излучения еще только систематизируются в рамках современных исследований [100, 103, 104]. Исследователи полагают, что нетепловые механизмы могут быть обусловлены тем фактом, что период колебаний ТГц волны (пикосекунды), совпадает с естественными частотами фонона биологических молекул [100, 101]. В частности, ТГц излучение может способствовать локальному раскручиванию двухцепочечной ДНК и даже местами нарушать водородные

связи между противоположными цепочками ДНК, изменяя процесс транскрипции генов [100, 101].

1.4. Методы терапии заболеваний человека с помощью воздействия излучением терагерцового диапазона частот

Благодаря своей несомненной биологической активности на молекулярном уровне, излучение терагерцового диапазона частот может использоваться не только в диагностике, но и в терапии различных заболеваний. Большинство современных работ на тему терапии касаются перспектив использования ТГц излучения для восстановления функциональности, прежде всего иммунологической, клеток крови и для коррекции уровня стрессовых гормонов.

Так в работах, объектом исследования которых являлась кровь больных нестабильной стенокардией, непрерывное терагерцовое излучение на частоте 0,24 ТГц в течение 15 минут оказывало положительный эффект на вязкостные свойства цельной крови, эритроциты [105] и функциональную активность тромбоцитов [106]. Такое же воздействие на тромбоциты оказало и излучение на частоте 0,4 ТГц [107].Большая серия работ посвящена нормализации гормонального статуса крыс, подвергшихся иммобилизационному стрессу. Так, излучение на частотах 0,13; 0,15 и 0,17 ТГц приводило к снижению уровня кортикостерона [108-110] , восстановлению функций щитовидной железы [111 ,112] и надпочечников [113], а также благотворно влияло на метаболизм таких крыс [114] и восстановление их белкового обмена [115].

В работе [57] при облучении терагерцовым излучением частотой порядка 0,15 ТГц с плотностью мощности 20-30 мкВт/см^2 на 35 пациентах с разными степенями ожогов были получены положительные результаты: видимый антибактериальный эффект, выражающийся в отсутствии нагноения раны, и сокращение периода эпителизации и заживления ожогов.

Так, показано, что непрерывное облучение с плотностью мощности 0,06-0,125 мВт/см^2 и длительностью экспозиции 15 мин приводило к нормализации аллергических проявлений, что указывает на коррекцию функций клеточного иммунитета. При увеличении плотности мощности облучения (с той же экспозицией) до 0,2-0,4 мВт/см^2 наблюдалось снижение иммунореактивности к специфическим антигенам и увеличивались показатели миграции лейкоцитов, что в целом также следует полагать признаками нормализации аллергических проявлений [56, 60, 116].

В опытах на крысах было показано, что двукратное облучение волнами ТГц частоты (плотность мощности 0,4 и 0,8 мВт/см^2, длительность непрерывной экспозиции 15 мин) на начальной стадии формирования костной ткани достоверно стимулирует процесс регенерации при травматических дефектах костей. В особенности облучение с плотностью мощности 0,4 мВт/см^2 показало свою эффективность для ускорения минерализации костного матрикса. При этом ТГц облучение на стадии минерализации костного матрикса (14 суток после травмы), напротив, приводит к замедлению регенерационных процессов, а на стадии зрелого костного регенерата (21 сутки после травмы) не вызывает достоверных регистрируемых эффектов [117].

В работе [118] зарегистрировано изменение роста злокачественной опухоли кожи после воздействия терагерцового излучения на мышах. Показано, что двукратное облучение зоны опухоли излучением мощностью 1,6 мВт/см^2 приводило к достоверному снижению объема опухоли, достигающему 26,5%. Стоит отметить, что при смене режима облучения на ежедневный в течение 7 дней при плотности мощности 0,4 мВт/см^2 объем опухоли наоборот увеличился на 30% по сравнению с контролем, однако продолжительность жизни подопытных мышей несмотря на это увеличилась на 22 %.

Все представленные работы выполнены с непрерывными источниками терагерцового излучения. Положительное влияние импульсного

широкополосного терагерцового излучения диапазона частот 0,1–2,2 ТГц (длительность импульса 1 пс, мощность в импульсе 8,5 мВт, частота повторения импульсов 76 МГц) описано в работе [67]. Показано, что показатели выживаемости облученных линий зависят не только от стадии развития (воздействие облучения на личиночных стадиях развития было скорее негативным или нейтральным, на стадии взрослой особи — скорее позитивным), но и от половой принадлежности особей.

В целом показано, что действие излучений ТГц частот может распространяться на регуляторные системы (как нервные, так и эндокринные), изменять функциональную активность и морфологическое состояние тканей и органов и таким образом оказывать существенное влияние на организм в целом. Экспериментальные данные подтверждают широкие возможности влияния электромагнитного терагерцового излучения на процессы гомеостатической регуляции.

Так как перечисленные в работах [41, 58, 59, 107-115] терапевтические эффекты достигнуты с использованием терагерцового излучения на частотах поглощения оксида азота, авторы исследований в качестве механизма предполагают изменение биохимической активности данной молекулы за счет резонансного поглощения ею энергии облучения. Авторы работ [57, 67, 116-118] не выдвигают предположений о возможных механизмах воздействия.

Однако возвращаясь к полному анализу работ, посвященных воздействию терагерцового излучения, стоит отметить, что количество работ, где описано благотворное влияние, составляет всего 24 % по отношению к 38% работ с негативным эффектом после облучения. Поэтому для применения ТГц излучения в терапии важно продолжить исследования с теми параметрами излучения, которые соответствуют области «терапевтического эффекта», представленного на рисунке 1.5 зеленым цветом.

1.5. Определение безопасных пороговых уровней излучения при использовании терагерцовых частот в медицине

Несмотря на недостаточную изученность воздействия терагерцового излучения на биологические объекты, его использование в медицине и других областях с каждым годом увеличивается. Это связано с постоянной необходимостью диагностики, как и других областей медицины, в новых методах детальной бесконтактной визуализации. Противоречивые данные о различных аспектах воздействия этих излучений на живые организмы заставляют поднять вопрос о безопасности их использования. Наилучшим выходом из этого положения был бы поиск тех уровней и параметров облучения, которые, при сохранении чувствительности методик, практически исключали бы любые артефактные воздействия на биологические объекты как на тканевом, так и на клеточном уровне.

Подавляющее большинство исследований, посвященных вопросам безопасности волн ТГц диапазона, использовали непрерывное облучение. Прикладные исследования, направленные на разработку диагностических и спектроскопических методов, напротив, делают упор на использование импульсных источников излучения, обладающих целым рядом преимуществ. Они хорошо распространяются в пространстве, но при этом их проникающая способность для биологических объектов более ограничена [119]. При использовании в ТГц спектроскопии импульсные источники излучения позволяют использовать широкий диапазон частот для получения больших массивов информации о спектральных свойствах объектов, включая данные об их внутренней структуре [120]. В связи с этим появляется существенный разрыв между прикладными и фундаментальными исследованиями, поскольку безопасные параметры импульсного облучения невозможно определить на основании данных о непрерывном облучении.

В связи с этим очевидна необходимость накопления экспериментальных данных по воздействию не только непрерывных, но и импульсных излучений разной частоты, длительности и мощности на

биологические объекты, причем необходимо выяснить не только биологические эффекты от такого облучения, но и те параметры облучения, при которых не будет регистрироваться никаких эффектов. Только это позволит сделать выводы о биологической безопасности ТГц диапазона частот, как это было сделано с электромагнитными излучениями других частот.

Критическое значение, определяющее характер воздействия электромагнитного излучения на живые существа имеет средняя энергия фотона. Если эта энергия больше значения 12 эВ - «потенциала ионизации» - что соответствует длинам волн порядка 100 нм (верхняя граница ультрафиолетового или нижняя граница рентгеновского излучения), то фотон способен передать электронам внешней оболочки атомов энергию, достаточную для квантового перехода с образованием ионов. Иногда энергия фотонов достигает тысяч или миллионов эВ. Такое излучение не только проникает глубоко в ткани, но и вызывает мощные как прямые, так и опосредованные реакции образования ионов, свободных радикалов и разнообразных продуктов перекисного окисления. В зависимости от мощности облучения и степени его воздействия на макромолекулы и клеточные структуры, с тем или иным успехом запускаются механизмы устранения повреждений; при непоправимых повреждениях облученная клетка гибнет. Если механизмы клеточного восстановления дают сбой, результатом облучения может стать повреждение генетического материала либо появление онкологических изменений .

К ионизирующим традиционно относят излучения гамма- и рентгеновского диапазона, хотя в отдельных случаях вызывать ионизацию способно ультрафиолетовое и даже видимое излучение. Если энергия фотона ниже потенциала ионизации, излучение считается неионизирующим — таково излучение, соответствующее длинам волн ультрафиолетового, видимого, инфракрасного, терагерцового, микроволнового и радиочастотного областей спектра. Классификация эта носит не

умозрительный, а фундаментальный характер, поскольку воздействие ионизирующего и неионизирующего излучений на биологические объекты радикально различаются.

Неионизирующее излучение характеризуется много меньшей квантовой энергией, которая неспособна запускать реакции ионизации. Вследствие успешного поглощения тканями, прежде всего кожным покровом, такие излучения проникают неглубоко. При облучении биологических объектов такое излучение вызывает как тепловую (если энергия фотона более или равна значению показателя kT, соответствующему энергии теплового движения молекул), так и нетепловую передачу энергии. Это может проявляться, в том числе и в термических эффектах, подобных таковым от объемного нагревания другими методами [3].

ТГц излучение относится к неионизирующим, и вследствие этого считается более безопасным для исследований in vivo. В особенности это относится к низким терагерцовым частотам, поскольку энергия фотона при таком излучении ниже не только потенциала ионизации, но и показателя kT. Этого количества энергии кванта достаточно для воздействия на водородные связи в сложно организованных макромолекулах или спонтанных агрегациях молекул воды, однако эта энергия не может вызвать существенное повышение интенсивности теплового движения и не вызывает химических реакций [120]. Как и другие виды неионизирующего излучения, ТГц волны неспособны воздействовать на внешние электронные оболочки атомов в сложных молекулах, вызывая их ионизацию и образование свободных радикалов.

Общий эффект облучения биологических объектов зависит как от параметров самого облучения (общая доза, длительность, мощность, частотный диапазон, импульсный – непрерывный режим, частота повторения импульсов), так и от свойств объекта (степень гидратации, активность репарационных механизмов, воздействие протекторных или сенсибилизирующих веществ). При высокой интенсивности и больших дозах

ионизирующего облучения возникают необратимые повреждения, как на клеточном, так и на молекулярном уровне. Длительные воздействия низкой интенсивности могут приводить к истощению механизмов восстановления, в этом случае возникают мутагенные и онкогенные эффекты, либо, напротив, к их стимуляции.

Вследствие низкой квантовой энергии фотонов терагерцового излучения оно прежде априорно расценивалось как безопасное. Лишь в последнее время (2009 – 2014 гг.) эта точка зрения ставится под сомнение вследствие накопления данных о различных биологических эффектах, вызываемых воздействием волн ТГц диапазона прежде всего на водородные связи. При этом эффекты, угнетающие либо стимулирующие, проявляются на всех уровнях биологической организации объектов изучения [3,35]. Параметры безопасных пороговых уровней ТГц облучения изучаются не только in vivo и in vitro, но и с помощью математического моделирования [46, 121].

Имеющиеся мировые стандарты, Американский национальный стандарт [122] и стандарт Европейского парламента и союза [123], устанавливают порог плотности мощности на уровне 0,3 Вт/см^2 при длительность не более 10 секунд. Институт инженеров по электротехнике и электронике IEEE [124] устанавливал предел плотности мощности на уровне 0,01 Вт/см^2. В редакции предписаний Международной комиссии по защите от неионизирующего излучения от 1997 года вклад от широкополосного излучения с длиной волны 100 нм – 1 мм (частотой от 100 до 0,3 ТГц) не представлял практического значения и пороги для него не были установлены. В редакции от 2006 года пороговое значение было увеличено от первоначального до 1,19 Вт/см^2 [125].

Российский стандарт безопасности обычных лазерных источников [126] определяет допустимые значения плотности мощности на уровне 107 Вт/см^2 и мощности $1{,}25 \cdot 10^8$ Вт при длительности облучения 100 секунд. Такое значение на 8 порядков выше самой большой плотности мощности,

предписанной международными стандартами. Это связано с тем, что ГОСТ Р 50723-94 «Лазерная безопасность» был принят в конце 1994 г., когда техника с ультракороткой длительностью импульсов еще не получила достаточного развития. Поэтому в стандарте нет упоминания о безопасных нормах для воздействии экспозиций ниже 10^{-9} с.

Все предельно допустимые значения плотности мощности, кроме последнего, указаны для частот от 0,3 ТГц и выше. Стандарт [124] разрабатывался для частот радиодиапазона частот ниже 0,3 ТГц. Приведенные варианты предписывают пороговые значения мощности для излучения такой частоты только для длительности импульса порядка наносекунд, как и в Российском ГОСТе, и, таким образом, не отражают стандарты для характерных пикосекундных длительностей импульса в ТГц диапазоне. Это обстоятельство необходимо учитывать, так как основной характеристикой излучения при воздействии на живые существа является его мощность, как объективный показатель интенсивности, а мощность соответствует количеству энергии, выделившейся за единицу времени (1 сек.). Поэтому даже при небольшой энергии использование сверхкоротких импульсов при облучении позволяет достигнуть огромной мощности и, соответственно, сильного биологического воздействия. Поэтому эффекты, вызываемые непрерывным облучением, невозможно экстраполировать на модели импульсного воздействия.

Поэтому на данном этапе развития терагерцовой техники в отношении безопасных уровней энергии, стоит опираться на исследования, которые выполняются в разных лабораториях мира, несмотря на их разрозненность, обусловленную различными параметрами ТГц источников. Однако большинство имеющихся работ, результаты которых свидетельствуют о генотоксическом эффекте ТГц излучения или воздействии ТГц излучения на функциональную активность клеток, были получены с использованием непрерывных источников излучения. Проводить параллель между полученными результатами от непрерывных источников для

излучения одной частоты и широкополосным излучением импульсного источника, содержащего такую же частоту, совершенно неоправданно.

На основе имеющихся стандартов для непрерывных источников и источников одиночных импульсов был проведен математический расчет максимального предельно допустимого облучения для импульсного излучения ТГц диапазона частот. По двум методам значения составили 1,6 МВт и 94,0 Вт [121].

В работе [46] было проведено компьютерное моделирование, а затем экспериментальное изучение порогов разрушения объекта при облучении широкополосным ТГц излучением диапазона $0{,}1 \div 1$ ТГц, с частотой повторения импульсов 9,36 МГц и длительностью импульса 350 пс. Численно разрушение объекта происходило на уровне 5 Вт/см^2, экспериментально — 7,16 Вт/см^2 при длительности воздействия 2 секунды. Вместо кожи человека экспериментаторы исследовали влажную замшу. Поэтому данные результаты нельзя использовать в качестве безопасных порогов терагерцового облучения живых тканей человека.

Полученные мощности значительно превышают используемые в ТГц технике, так и в имеющихся стандартах безопасности. В настоящее время мощность импульсных ТГц систем не превышает 1 мВт. Однако с развитием методов ТГц генерации этот предел может быть преодолен. Создание норм для стандартов безопасности основывается на пороге повреждения при воздействии довольно мощного излучения. Поэтому основные усилия исследователей направлены на определение верхнего порога допустимых значений при ТГц облучении.

Однако большое количество публикаций по воздействию слабых полей показывает, что излучение слабой интенсивности может приводить к биологическим эффектам, которые не наблюдаются при излучении большей мощности. В открытых давно микроволновом и инфракрасном диапазонах частот, соседних с ТГц диапазоном частот, теоретическое описание воздействия мощного излучения хорошо согласуется с экспериментальными

данными [127]. В свою очередь механизмы воздействия излучения низкой интенсивности наоборот слабо изучены теоретически. В медицине существует целое направление низкоинтенсивной лазерной терапии, исследование причин воздействия которого до сих пор продолжается [128]. Основные возможные механизмы излучения терагерцового диапазона низкой интенсивности рассмотрены в работе [129].

Из данных литературы следует, что вопрос о безопасности и целесообразности медицинского использования терагерцового излучения остается открытым. Вопреки обилию гипотез и предположений, детальные механизмы биологического воздействия ТГц частот остаются невыясненными. Особого внимания заслуживают рутинные работы по выяснению тех параметров облучения, которые не вызывают регистрируемых артефактов и поэтому могут быть использованы в диагностике и терапии, причем с особенным заострением внимания на реальные и перспективные возможности соответствующих приборов. В первую очередь следует выяснить безопасные значения мощности излучения во всем диапазоне возможностей, поскольку реакция живых организмов на облучение прямо зависит от этого параметра. Иногда биологические эффекты от относительно незначительного изменения мощности оказываются противоположными.

Заключение к главе 1

Важнейшая роль в регуляции метаболизма роговой оболочки принадлежит нервной системе. Любые изменения целостности либо функциональности нервных волокон роговицы приводят к существенным нарушениям ее метаболизма и к снижению чувствительности нервных окончаний, вплоть до полной ее потери [10]. Нарушение иннервации может происходить вследствие нейродегенеративных процессов, вызванных другими заболеваниями и возрастными изменениями, либо вследствие травм, в том числе при микрохирургических вмешательствах.

Последние в большинстве своем предполагают нарушение анатомической целостности роговицы и, в частности, повреждение ее нервной сети. Послеоперационное восстановление структуры и функциональности нервных волокон может занимать год и более, а у каждого десятого пациента реиннервация и вовсе не происходит в полном объеме, что неизбежно сказывается на функциональной компетентности роговицы [18].

В связи с этим вопросы стимуляции нейрогенеза и реиннервации чрезвычайно актуальны в хирургической офтальмологии, где разработка соответствующих методов позволила бы успешно предотвращать большую часть послеоперационных осложнений. Помимо этого, вопросы нейрорегенеративной терапии важны при лечении разного рода нейропатий.

Существуют современные разработки лекарственных препаратов для стимуляции нейрогенеза в офтальмологии [2]. Однако даже на стадии предварительных исследований в малых группах данные препараты показали в целом неоднозначную эффективность. К тому же они характеризуются низкой биодоступностью и краткосрочным терапевтическим эффектом, а само применение предполагает инвазивные процедуры и дискомфортные ощущения у пациентов.

С некоторым успехом применяются физиотерапевтические процедуры: электростимуляция [19], магнитотерапия [21] и лазеротерапия [27], однако и им свойственны определенные недостатки. Прежде всего, это небольшая продолжительность эффекта и невозможность воздействовать на все уровни патологического процесса одновременно [23-25]. Кроме того, физиотерапевтические методы могут показать некоторую эффективность для восстановления уже существующих нервных волокон, но неспособны стимулировать нейритогенез.

В связи с этим методика стимуляции нейритогенеза путем облучения электромагнитными волнами терагерцовых частот представляется весьма перспективной. Она сочетает в себе простоту и неинвазивный характер

физиотерапевтических методов и эффективность лекарственных средств. Для ее экспериментального обоснования необходимо изучение нейростимулирующих эффектов от облучения в частотном диапазоне 0,1-2 ТГц и подбор наиболее оптимальных параметров такого облучения.

Из данных литературы известно, что биологические эффекты терагерцового излучения на клеточном и субклеточном уровне проявляются прежде всего в изменении проницаемости клеточной мембраны и воздействии на активность генов [35, 80]. Хотя многие исследователи отмечают негативное влияние терагерцового излучения на биологические объекты [4, 5, 40-55, 68-72], существуют также определенные предпосылки для использования ТГц частот в терапевтических целях [56-65, 67]. Анализ данных литературы по параметрам используемого облучения (длительности и плотности мощности) позволяет выделить некоторые области, где излучение способно оказывать достоверные позитивные либо негативные биологические эффекты (Рисунок 1.1). Поскольку подавляющее большинство исследователей использовали непрерывные источники излучения с большой длительностью экспозиции, существует только одна работа по изучению влияния краткосрочных (менее 10 мин.) импульсов излучения малой мощности (менее 0,1 мВт/см^2) [66], а данные об эффектах импульсного излучения отсутствуют вовсе. Поэтому для разработки методов использования волн ТГц диапазона крайне важны дополнительные исследования с теми параметрами излучения, которые входят в зону «терапевтического эффекта», с тенденцией к уменьшению длительности и мощности облучения.

Поскольку нервные волокна роговицы пронизывают преимущественно слой стромы, сильно отличающийся по анатомическим и метаболическим признакам от окружающих тканей, для эффективной стимуляции процесса реиннервации необходимо изучить особенности прохождения ТГц излучения через эту ткань. Используя фибробласты как объект, моделирующий поверхностные слои стромы, необходимо изучить

глубину проникновения ТГц излучения, оптические свойства и спектральные характеристики клеток, а также влияние излучения на их функциональную активность.

Это исследование не только даст информацию о влиянии излучения ТГц диапазона на фибробласты, необходимую для разработки прикладных физиотерапевтических методов в офтальмологии, но и внесет большой вклад в изучение общих вопросов безопасности и эффективности терапевтического использования ТГц волн.

Потребность в этом существует, так как современные стандарты, как международные [122-125], так и отечественные [126], предписывают в качестве безопасного использование излучений ТГц частот с наносекундной длительностью, а стандарты безопасности для облучения с пикосекундной длительностью еще не разработаны. Большинство работ по изучению вопросов безопасности ТГц излучения [46, 121] сосредоточены на выявлении верхнего порога предельно допустимых значений мощности и длительности облучения. При этом биологические эффекты низкоинтенсивного излучения малой мощности, иногда противоположны эффектам полученным при интенсивном облучении, остаются в большинстве своем невыясненными.

Из литературы известно, что разные биологические объекты могут давать обратную реакцию на одни и те же параметры облучения (работы 6 и 72; 36, 42 и 51; 36 и 69; 37 и 52; 39 и 55; 48 и 64; 56 и 58; 58 и 77; 72 и 74). Вследствие этого делать однозначные утверждения о механизмах влияния излучений ТГц диапазона на живые организмы пока не представляется возможным. Поэтому для выяснения физиологических особенностей ответа нервных клеток на ТГц облучение необходимо выяснить их оптические свойства и спектральные характеристики в ТГц диапазоне.

Вместе с тем, сама идея использования волн ТГц частот базируется на определенных предпосылках. ТГц излучение может вызывать потенциально важные биологические эффекты вследствие того, что в этом диапазоне находятся спектры поглощения не только важнейших биологических

макромолекул, но и водородных связей, которые регулируют высокие (третичный и четвертичный) уровни их структуры. Большие группы атомов, образующие функциональные либо структурные домены макромолекул, в процессе коллективного взаимодействия формируют собственные спектры поглощения в ТГц диапазоне частот [8]. Любые изменения этих коллективных атомных взаимодействий способны приводить к изменениям конформационной структуры макромолекулы, что неизбежно сказывается на ее функциональности и, в свою очередь, находит отражение в изменении спектральных характеристик.

Поэтому изучение особенностей поглощения ТГц излучения различными макромолекулами, клеточными компонентами и клетками в целом методами ТГц спектроскопии позволяет делать важные выводы об их структуре, функциональности и особенностях взаимодействия.

ГЛАВА 2. Спектральные характеристики и оптические свойства фибробластов в терагерцовом диапазоне частот

Нервные волокна, стимуляция роста которых является основной задачей данной работы, располагаются преимущественно в строме роговицы, образованной роговичными фибробластами и коллагеновыми волокнами. До стромы располагается эпителий и боуменова мембрана. Так как их суммарная толщина составляет порядка 70 мкм, а толщина стромы может составлять до 460 мкм [130], для эффективной стимуляции роста нейритов ТГц необходимо изучить распространение излучения через этот слой порядка 550 мкм, определить спектральные характеристики и оптические свойства фибробластов, как модели покровных слоев роговицы, в терагерцовом диапазоне частот, в том числе определить глубину проникновения ТГц излучения, подобрать оптимальные параметры излучения, а также исследовать влияние ТГц излучения на функциональную активность фибробластов.

Для выполнения этих задач оптимально подойдет использование ТГц спектроскопии. Традиционно генерация и регистрация терагерцового импульса (ТГИ) происходит или с помощью фотопроводящих (ФП) антенн, или при использовании нелинейных кристаллов. В качестве ФП антенны обычно выступает пластинка, изготовленная из полупроводника. На ее поверхности, на расстоянии порядка десятков микрометров параллельно друг другу располагаются две металлические дорожки - электроды. Если антенна нужна для генерации ТГИ, то к ее электродам прикладывают постоянное напряжение. Генерация ТГИ происходит за счет движения носителей заряда под действием постоянного напряжения в антенне, возникших от внешнего оптического излучения, например от фемтосекундного лазера. Регистрация ТГИ осуществляется путем измерения напряжения на электродах пластинки, возникшего в результате воздействия терагерцового и оптического

излучений, падающих с временной задержкой друг относительно друга, на ФП антенну. Напряжение непосредственно связано с величиной напряженности электрического поля ТГИ. Поэтому, изменяя временную задержку между оптическим и терагерцовым импульсом, можно получить зависимость величины E для ТГИ. Таким образом, может быть осуществлена как обычная спектроскопия, так и спектроскопия с разрешением во времени. Для проведения импульсной терагерцовой спектроскопии необходимо провести измерение временного ТГц сигнала на выходе из исследуемого образца. В случае сильнопоглощающих сред спектроскопия поглощения неприменима, поэтому регистрируют отраженный сигнал (терагерцовая спектроскопия отражения) [131]. С помощью терагерцовой спектроскопии могут быть также исследованы жидкости [132, 133], газы [134] и биологические ткани [135]. При этом коэффициент поглощения терагерцового излучения можно оценить с помощью толщины исследуемых образцов. Полученные данные согласуются с результатами для других методик и имеют высокую воспроизводимость.

Ширина спектра излучения, испускаемого источником терагерцовых импульсов, находится в пределах от 0,1 до 10 ТГц и выше. В этом диапазоне может быть определена спектральная характеристика объекта. Для этого используется волновая форма ТГИ после его взаимодействия с исследуемым веществом. Поскольку для получения спектра необходимо регистрировать волновую форму импульса, данный метод стали называть терагерцовой спектроскопией во временной области.

2.1. Описание методики получения и пробоподготовки клеток фибробластов

В данный момент практически все клетки, как животных, так и человека, могут воспроизводиться в культуре. Они являются важными способом и объектом исследования для многих медицинских и биологических исследований.

Так как нервные волокна роговицы располагаются в строме, образованной роговичными фибробластами (кератобластами), в качестве модельного объекта для изучения была выбрана культура первичных фибробластов человека.

Следующая фотография [136] демонстрирует размеры нормальных фибробластов человека по трем измерениям (Рисунок 2.1). Исходя из данного снимка и из литературных данных мы определили, что длина и ширина данных клеток колеблется от 30 до 50 мкм, ширина клетки около 3-7 мкм.

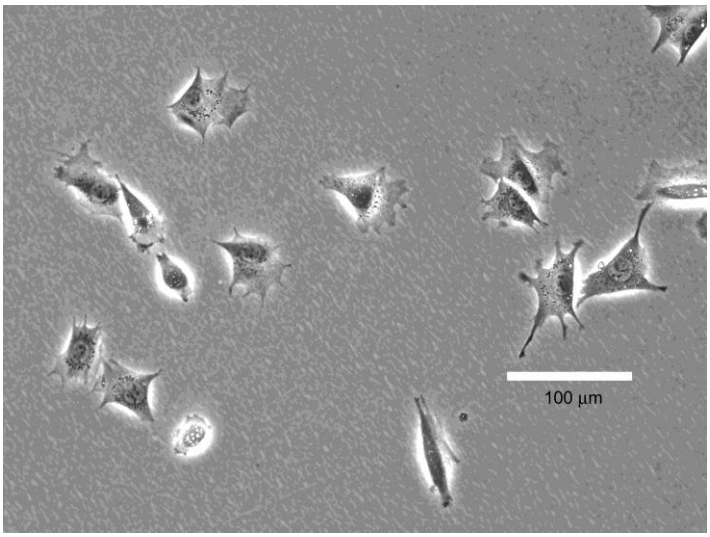


Рисунок 2.1 - Микроскопическая фотография первичных фибробластов человека [136]

Для культивирования клеток использовали среду DMEM («Биолот», Санкт-Петербург) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) («Биолот», Санкт-Петербург), 50 мкг/мл гентамицина («Биолот», Санкт-Петербург) и 2 мл L-глутамина («Биолот», Санкт-Петербург). Для ведения клеток использовали пластиковые флаконы объемом 50 мл («Sarstedt», Германия). Клетки пересевали каждые 3–4 дня. Инкубацию осуществляли при 37°C с содержанием 5% CO_2 в атмосфере.

Культивирование клеток осуществляли в соответствии с рекомендациями «Банка клеточных культур» ЦИН РАН.

Для постановки экспериментов по распространению ТГц излучения фибробласты пересевали в лунки 6-луночного плоскодонного планшета («Sarstedt», Германия) (далее также именуемого полистирольной подложкой) и инкубировали до формирования конфлюэнтного монослоя. Для исследования воздействия ТГц излучения на функциональную активность фибробластов клетки пересевали в 24-луночных планшетах. Непосредственно перед проведением измерений по получению спектральных характеристик среду полностью удаляли, чтобы избежать поглощения терагерцового излучения водой. Фибробласты были представлены в четырех повторах. Две лунки планшета без клеток использовались для получения спектральных характеристик полистирольной подложки. Каждый образец измерялся не менее 5-ти раз. Следующая фотография иллюстрирует процесс подготовки образцов к проведению эксперимента (Рисунок 2.2), т.е. процесс аспирации физиологического раствора из лунки плоскодонного планшета, на дне которой культивирован монослой исследуемых клеток.

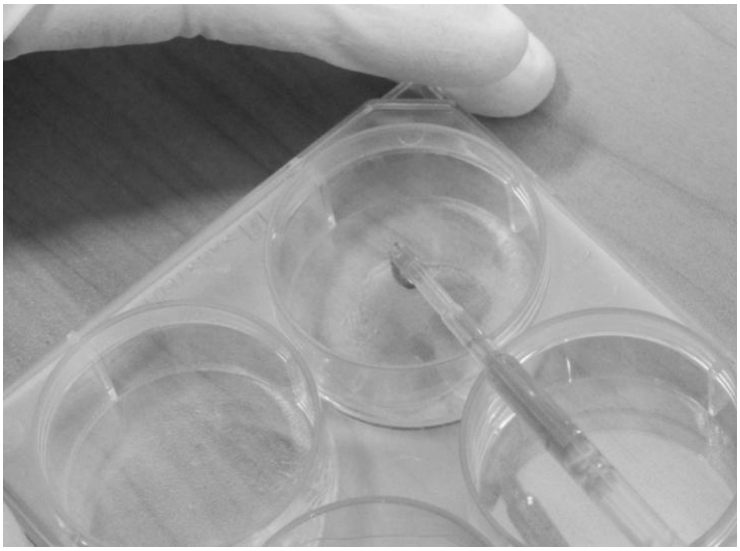


Рисунок 2.2 - Фото, иллюстрирующее процесс удаления физиологического раствора из лунки 6-луночного планшета, на дне которой культивирован монослой исследуемых клеток

2.2. Описание методики импульсной терагерцовой спектроскопии

Изучение спектральных характеристик и оптических свойств фибробластов проводилось с использованием режимов отражения и пропускания универсального импульсного терагерцового спектрометра (Рисунок 2.3). Так как клетки находятся в планшете в жидкой среде, схема, описанная в [137] была модифицирована для расположения образца в горизонтальной плоскости.

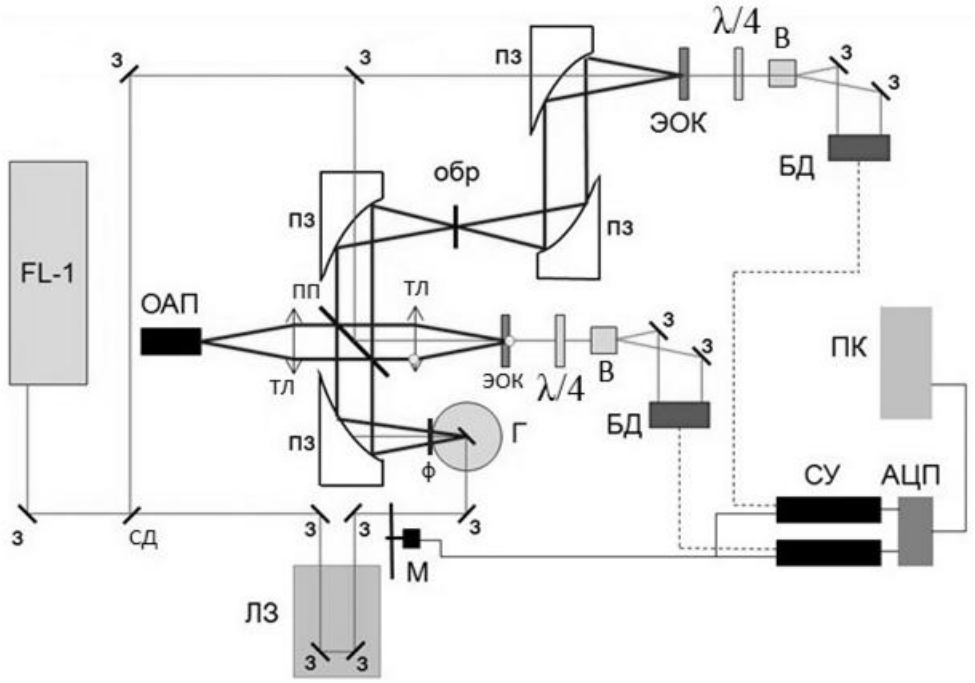


Рисунок 2.3 - Схема универсального импульсного терагерцового спектрометра. ФЛ – импульсный фемтосекундный инфракрасный лазер; З – зеркала с R ≈ 100%; СД - светоделитель; ЛЗ – оптическая линия задержки; М – модулятор; Г – кристалла InAs для генерации ТГц излучения; ф - фильтр из тефлона; ПЗ – параболические зеркала; ПП - полупрозрачная кремниевая пластинка; ТЛ - линзы для ТГц излучения; обр. – объект исследования; ЭОК – электрооптический кристалл CdTe; В – призма Волластона; БД – балансный детектор; СУ – синхронный усилитель; АЦП – аналого-цифровой преобразователь; ПК – персональный компьютер. ОАП – опто-акустический приёмник

Используемая экспериментальная установка может генерировать широкополосное ТГц излучение. Для этого используется фотопроводящая антенна из арсенида индия (InAs). Генерация происходит при облучении данной антенны фемтосекундными лазерными импульсами. Работа установки построена на записи распределения напряженности электрического поля (E) до образца и после него (возможно как отражение, так и прохождение ТГц излучения через объект). Регистрация импульса происходит с помощью балансной электрооптической системы детектирования, работающей на эффекте Поккельса. Преимуществом данного способа является высокая чувствительность и отсутствие задержки отклика. Спектр ТГИ восстанавливается при использовании преобразования Фурье от зарегистрированного отклика. Терагерцовое излучение на выходе из образца имело следующие параметры:

- частота модуляции – 670 Гц;
- длительность импульса – 2.7 пс;
- средняя мощность - 30 мкВт;
- спектральный диапазон – 0.1 – 2.0 ТГц;

Рассмотрим схему, представленную на рис. подробнее. Луч поступает на FL-1, в котором в качестве активной среды использован кристалл Yb:KYW. Рабочая длина волны составила $\lambda = 1040$ нм, длительность одиночного импульса $t_и = 46$ фс, частота повторения импульсов $f = 75$ МГц и средняя мощность не превышала 1 Вт. На выходе нелинейного кристалла стоит светоделитель пучка СД, разделяющий излучение, поступающее из FL-1 на два луча: накачки и зондирующий. Они используются для генерации и регистрации ТГИ соответственно. В свою очередь зондирующее излучение поступает на систему зеркал З и снова делится на два луча, использующиеся в двух схемах: на пропускание и на отражение.

В это время луч накачки проходит через оптическую линию задержки (ЛЗ), оптико-механический модулятор (М) и попадает на генератор ТГИ, представляющий собой антенну из InAs (Г). Рассмотрим, как в данной случае

происходит генерация терагерцовых импульсов. Известно, что арсенид индия (InAs) является полупроводником с узкой запрещенной зоной. Поэтому когда антенна облучается фемтосекундным лазерным излучением (ультракороткими лазерными импульсами) возникает фотогальванический эффект Дембера.

Суть этого эффекта заключается в том, что под действием внешнего оптического излучения в полупроводнике, где благодаря различию коэффициентов диффузии дырок и электронов, возникает электрическое поле. Если наблюдается сильное поглощение лазерного импульса, то вблизи поверхности полупроводника распределение, наведенных оптическим излучением, электронно-дырочных пар будет неоднородным. При этом скорость диффузии носителей заряда вглубь материала будет иметь вид:

$$\frac{\partial \mathrm{N}}{\partial \mathrm{t}} = \mathrm{D}\frac{\partial^2 \mathrm{N}}{\partial \mathrm{z}^2}, \qquad (2.1.)$$

где N – количество носителей заряда, z – направление от границы внутрь объекта, D – коэффициент диффузии.

Поскольку электроны двигаются быстрее чем дырки, то и диффузия для них происходит быстрее. В результате этого на поверхности полупроводника образуется диполь, существующий в течение довольно короткого временного промежутка. Это приводит к возникновению электромагнитного поля, которое затем преобразуют в излучение [138]. Поскольку при эффекте Дембера колебания концентрации носителей заряда происходят перпендикулярно поверхности полупроводника, то для вывода излучения необходимо использовать согласующие элементы и сильное магнитное поле. Это позволяет развернуть диполь в удобном для использования направлении, касательном к поверхности.

Получаемое в результате излучение направляется на тефлоновый элемент (ф), фильтрующий излучение с длинами волн меньше 50 мкм. После этого сигнал проходит через систему двух параболических зеркал (ПЗ) и полупрозрачную кремниевую пластинку (ПП), которая делит терагерцовое

излучение. Часть ТГИ после пластинки направляется на образец (ОБР) с небольшим амплитудно-фазовым пропусканием, другая часть отражается от него. Исследуемый объект располагается в фокусной плоскости, перпендикулярно ТГц лучу, но в горизонтальном положении с помощью трехкоординатного столика.

Далее схема прохождения луча немного отличается в зависимости от метода исследования – на отражение или пропускание. Отраженное образцом излучение через параболическое зеркало (ПЗ) и делитель (ПП) падает на электрооптический кристалл CdTe (ЭОК), фокусируясь линзой для ТГц излучения (ТЛ). Прошедшее же через образец ТГц излучение фокусируется на электрооптический кристалл CdTe (ЭОК) системой параболических зеркал в параллельной схеме.

Зондирующий пучок фемтосекундного лазера и ТГц излучения (как отраженный от объекта исследования, так и прошедший через него) направляются на электрооптический кристалл CdTe. Если и лазерное, и терагерцовое излучение попадают на CdTe одновременно, то для каждой из двух систем детектирования, ТГИ приведет к возникновению электрооптического эффекта Поккельса. В результате чего, пробный пучок будет испытывать двулучепреломление, а фаза повернется прямо пропорционально напряженности электрического поля ТГИ (Рисунок 2.4).

С помощью ЛЗ изменяют величину временной задержки между ТГИ и пробным пучком, попадающих в кристалл. Для каждого значения сдвига терагерцового излучения относительно фемтосекундного излучения измеряется величина двулучепреломления. Это осуществляется с помощью схемы, состоящей из четвертьволновой пластинки (λ/4-пластинки), призмы Волластона (В), балансного фотодетектора (БД) и синхронного усилителя с оптико-механическим модулятором (М). Если напряженность ТГИ отсутствует, то пробный пучок с линейной поляризацией не будет испытывать двулучепреломление, и на выходе из λ/4-пластинки получим излучение с круговой поляризацией. После прохождения призмы Волластона

пучок разделится на два, каждый из которых имеет ортогональную поляризацию. Излучение этих пучков направляется на диоды балансного фотодетектора. На выходе из БД получится сигнал, представляющий собой разность между интенсивностями излучений, которые зарегистрировали диоды. Если напряженность поля ТГИ отлична от нуля, то пробный пучок на выходе из четвертьволновой пластинки будет иметь эллиптическую поляризацию. Это приведет к нарушению баланса интенсивности между ортогональными пучками. В результате на выходе из БД появится разностный сигнал, пропорциональный величине поля ТГИ в точке, где пересекаются фемтосекундный (ИК излучение) и терагерцовый (ТГц излучение) импульсы.

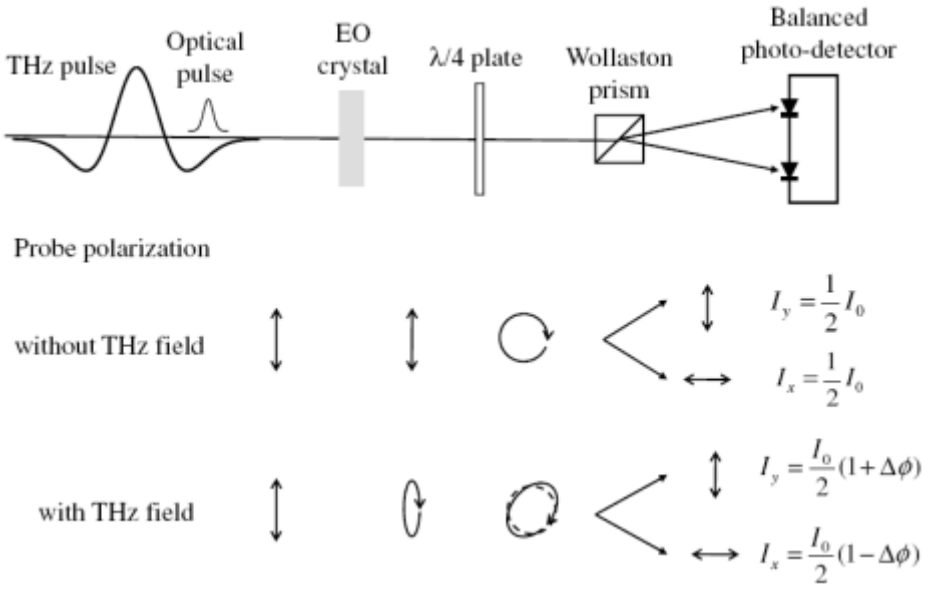


Рисунок 2.4 - Принцип и схема измерения двулучепреломления [139]

Измерение сигнала для различных времен задержки ТГц сигнала, дает информацию о зависимости амплитуды поля ТГИ от времени E(t) (Рисунок 2.5).

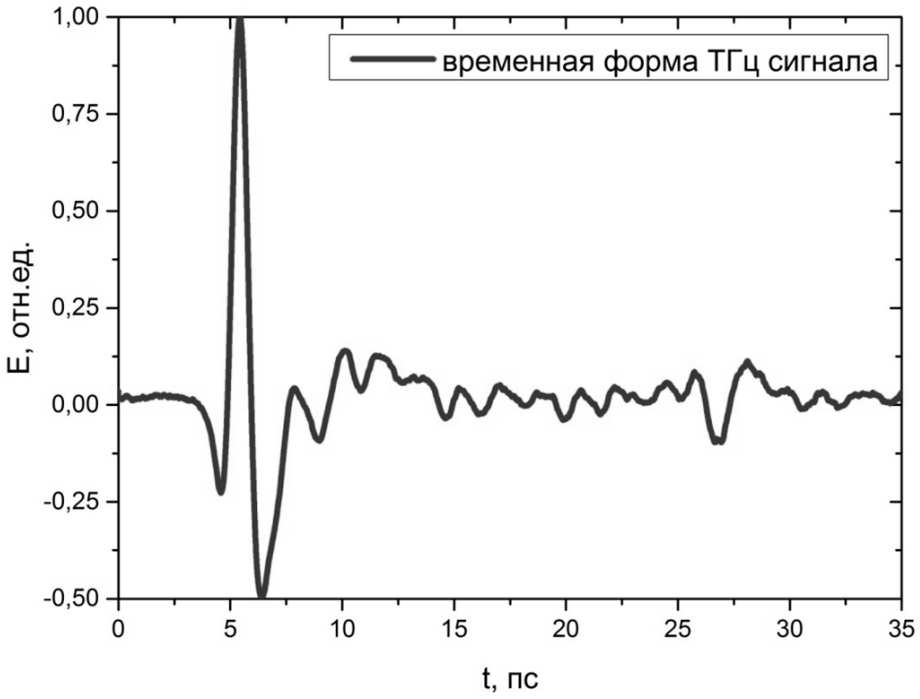


Рисунок 2.5 - Изображение отраженного от зеркала ТГц импульса (его временная форма)

В результате поле терагерцового излучения представляется в виде функции от временной задержки зондирующего импульса. Частотный спектр ТГИ (Рисунок 2.6) можно получить с помощью преобразования Фурье:

$$\widetilde{E}(\omega) = A(\omega) * e^{-i\varphi(\omega)} = \frac{1}{2\pi}\int_{-\infty}^{+\infty} E(t)e^{-i\omega t}\,dt\,, \qquad (2.2)$$

где $\widetilde{E}(\omega)$ – комплексная амплитуда волны, $A(\omega)$ – частотный спектр амплитуды комплексной амплитуды волны, φ – фаза комплексной амплитуды волны, ω – круговая частота, $E(t)$ – временная форма амплитуды волны.

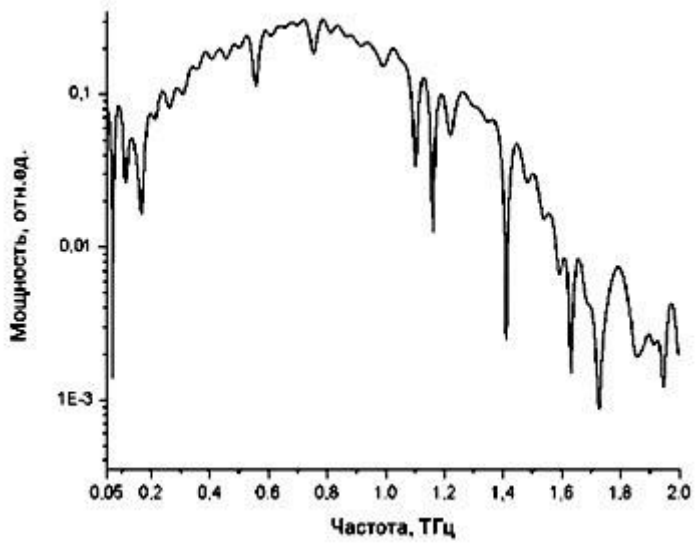


Рисунок 2.6 - Частотный спектр ТГИ

Увеличение отношения сигнал/шум осуществлялось с помощью синхронного детектора, фильтровавшего и усиливающего сигнал. Обработанный сигнал передавался в компьютер при использовании аналого-цифрового преобразователя. Спектральное разрешение системы регистрации используемой установки составляло 15 ГГц. Спектрометр был автоматизирован за счет использования виртуального прибора, разработанного в среде LabVIEW (LabVIEW National Instruments). С его помощью осуществлялось управление временной задержкой пробного импульса и процессом его измерения. Кроме того, осуществлялась запись временного профиля ТГИ. На компьютер выводилась зависимость вещественной части электромагнитного поля терагерцового поля от времени. С помощью другой программы производился расчет относительного спектра излучения отраженного от образца (на основе Фурье-преобразования временной формы измеренных импульсов) и отношения между амплитудами спектра. Данные измерения осуществлялись для опорного сигнала и сигнала от исследуемого объекта.

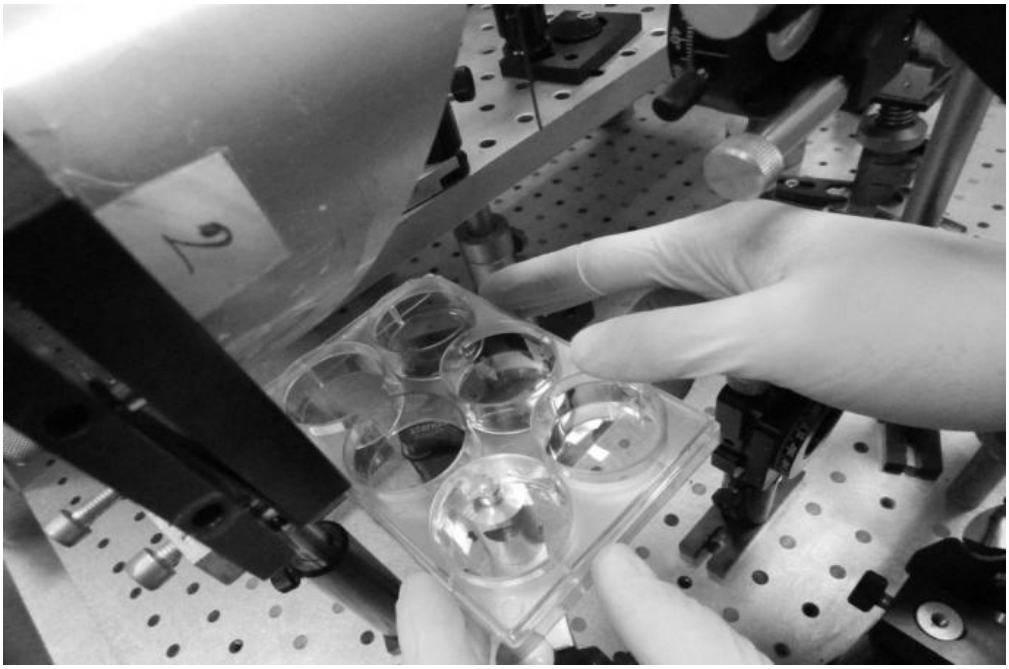


Рисунок 2.7 - Фотография объектного столика с установленным планшетом в схеме спектрометра

Для нормировки исследуемых спектров был получен спектр пропускания полистирольной подложки. Спектр полистирола был нормирован на опорный спектр ТГц сигнала, т.е. на спектр пропускания воздуха.

2.3. Экспериментальный анализ спектральных характеристик фибробластов в ТГц диапазоне частот

ТГц спектры отражения и пропускания нормальных человеческих фибробластов были получены с помощью стандартной техники терагерцовой импульсной спектроскопии в частотном диапазоне от 0,1 до 1,4 ТГц.

Нормированные и усредненные спектры отражения и пропускания представлены на Рисунке 2.8.

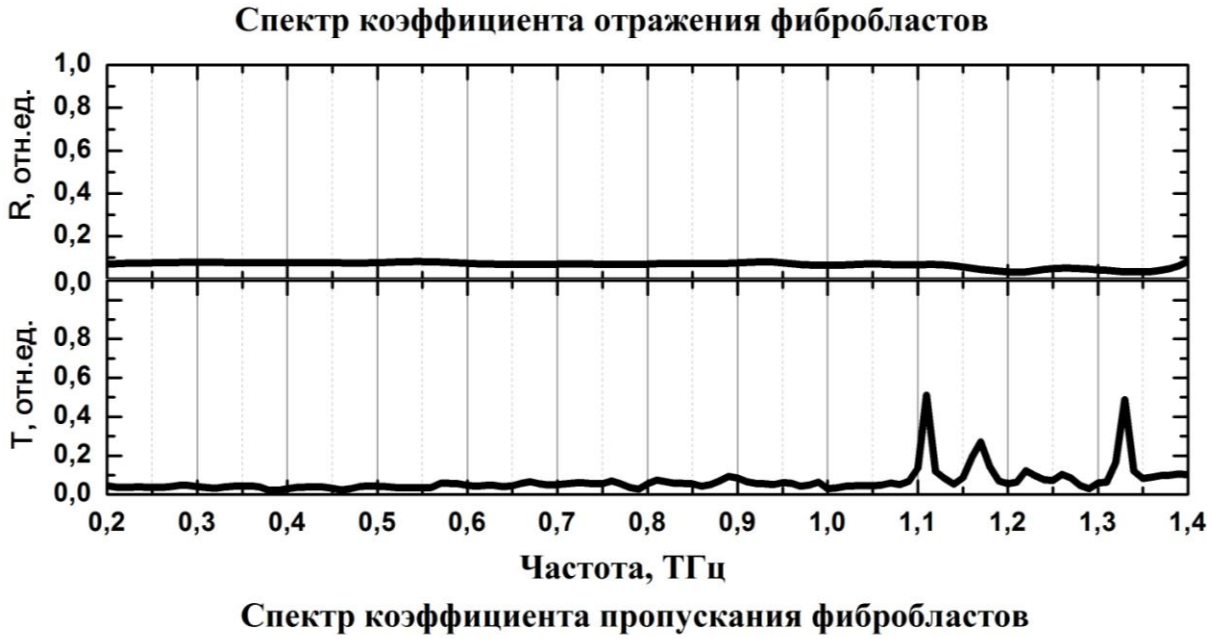


Рисунок 2.8 - ТГц спектры коэффициентов отражения и пропускания фибробластов

Основными процессами при взаимодействии терагерцового излучения с биологическими объектами являются поглощение, рассеяние и преломление (как частный случай – отражение) света. В полученных спектрах отражения и пропускания фибробластов до 1 ТГц нет никаких спектральных особенностей, что вызвано эффективным поглощением клеток в данных диапазонах. В диапазоне частот 1,0 – 1,4 ТГц наблюдаются как пики пропускания. Так как основной задачей исследования спектральных характеристик является подбор оптимального режима воздействия ТГц излучения, при котором оно достигает нервных клеток и эффективно распространяется в слое фибробластов, не поглощаясь, имеет смысл воздействовать на частотах, в которых наблюдаются пики пропускания.

Такие пики наблюдаются на частотах 1,11; 1,17; 1,32 ТГц. Наиболее сильные пики пропускания соответствует частотам 1,11 и 1,32 ТГц. Соответственно, воздействие излучением диапазоном, включающим данные частоты, будет наиболее оптимальным. Этого можно достичь с использованием специальным терагерцовых фильтров, выделяющих

определенный диапазон частот, либо непрерывных источников ТГц излучения.

2.4. Описание методики извлечения оптических свойств из временных форм терагерцовых импульсов

Второй задачей в данной работе стояло нахождение оптических свойств исследуемых клеточных культур фибробластов, в том числе глубины проникновения ТГц излучения. Рассмотрим способ извлечения оптических свойств из эксперимента, описанного в двух предыдущих частях 2.2 и 2.3, методом «на пропускание».

Для нахождения дисперсии комплексного показателя преломления были использованы следующие формулы, взятые из статьи [140].

Комплексный показатель преломления:

$$\hat{n} = n' - jn'' = n - jk\,, \qquad (2.3.)$$

где n – его действительная часть, k – его мнимая часть.

Дисперсия действительной части показателя преломления:

$$n_{обр}(\nu) = 1 + \frac{c}{2\pi\nu d}\left(\varphi_{обр}(\nu) - \varphi_{возд}(\nu)\right), \qquad (2.4.)$$

где c – скорость света, ν – частота, d – толщина образца, $\varphi_{обр}(\nu)$ – дисперсия фазы комплексной амплитуды пропускания образца, $\varphi_{возд}(\nu)$ – дисперсия фазы комплексной амплитуды пропускания воздуха.

Дисперсия мнимой части показателя преломления:

$$\kappa_{обр}(\nu) = -\frac{c}{2\pi\nu d}\ln\frac{E_{обр}(\nu)}{E_{возд}(\nu)}, \qquad (2.5.)$$

где c – скорость света, ν – частота, d – толщина образца, $E_{обр}(\nu)$ – дисперсия амплитуды пропускания образца, $E_{возд}(\nu)$ – дисперсия амплитуды пропускания воздуха.

Воспользовавшись полученной дисперсией показателя преломления, можно найти дисперсию комплексной диэлектрической проницаемости среды. Известно, что комплексный показатель преломления связан с

комплексной диэлектрической проницаемостью среды при μ=1 следующим соотношением:

$$\hat{n} = \sqrt{\hat{\varepsilon}} \qquad (2.6)$$

Комплексная диэлектрическая проницаемость среды:

$$\hat{\varepsilon} = \varepsilon' - j\varepsilon'', \qquad (2.7)$$

где ε’ – её действительная часть, ε’’ – её мнимая часть.

Дисперсия действительной части диэлектрической проницаемости среды:

$$\varepsilon'_{обр}(\nu) = n(\nu)^2_{обр} - k(\nu)^2_{обр}. \qquad (2.8)$$

Дисперсия мнимой части диэлектрической проницаемости среды:

$$\varepsilon''_{обр}(\nu) = 2n(\nu)_{обр}k(\nu)_{обр}. \qquad (2.9)$$

Данные выражения использовались для нахождения дисперсии комплексного показателя преломления полистирольной подложки, а также эффективной структуры полистирол – слой фибробластов.

Под эффективной структурой в моей работе понимается двухслойный объект, оптические свойства которого нельзя определить для каждого слоя в отдельности. Необходимость рассмотрения такой структуры связана с тем фактом, что длина волны падающего на объект излучения превосходит толщину первого слоя – слоя клеток (можно сказать, что первый слой оказывается нечувствительным к падающему излучению).

Следующей задачей было нахождение оптических свойств отдельно взятого слоя клеток толщиной 5 мкм, для выполнения данной задачи было использовано следующее выражение [141].

Комплексный показатель преломления эффективной структуры полистирол – слой клеток:

$$\hat{n}_{эфф} = \frac{\hat{n}_{пол}d_{пол} + \hat{n}_{кл}d_{кл}}{d_{пол}+d_{кл}}, \qquad (2.10)$$

где $\hat{n}_{пол}$ – комплексный показатель преломления полистирола, $\hat{n}_{кл}$ – комплексный показатель преломления монослоя клеток, $d_{пол}$ – толщина полистирола, $d_{кл}$ – толщина монослоя клеток.

Зная толщины образцов, можно рассчитать дисперсию комплексного показателя преломления клеток. Далее из его мнимой части можем получить коэффициент поглощения:

$$\mu_{акл} = \frac{4\pi k_{кл}}{\lambda}, \quad (2.11)$$

где $k_{кл}$ – мнимая часть показателя преломления клеток. И далее рассчитать глубину проникновения в клетках:

$$\delta = \frac{1}{\mu_{акл}}. \quad (2.12)$$

2.5. Экспериментальное изучение дисперсии оптических свойств фибробластов

Сигнал обрабатывался при помощи функции аподизации Хаппа-Гензеля. Описанным в разделе 2.4. методом были в первую очередь получены дисперсия комплексного показателя преломления (Рисунок 2.9) и дисперсия комплексной диэлектрической проницаемости (Рисунок 2.10) полистирольной подложки толщиной 790 мкм.

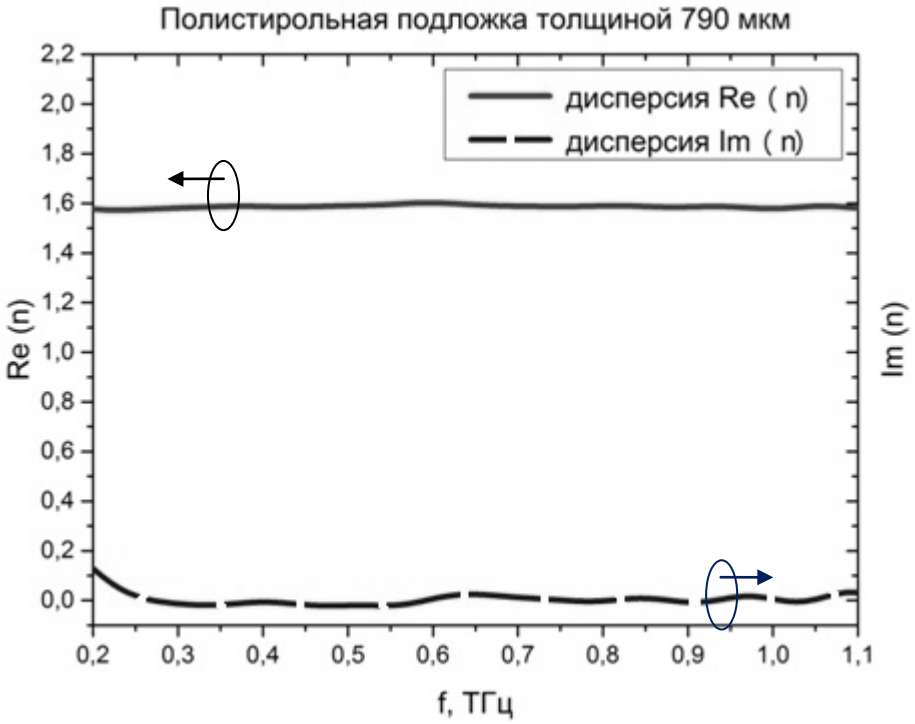


Рисунок 2.9 - Дисперсия комплексного показателя преломления полистирольной подложки толщиной 790 мкм

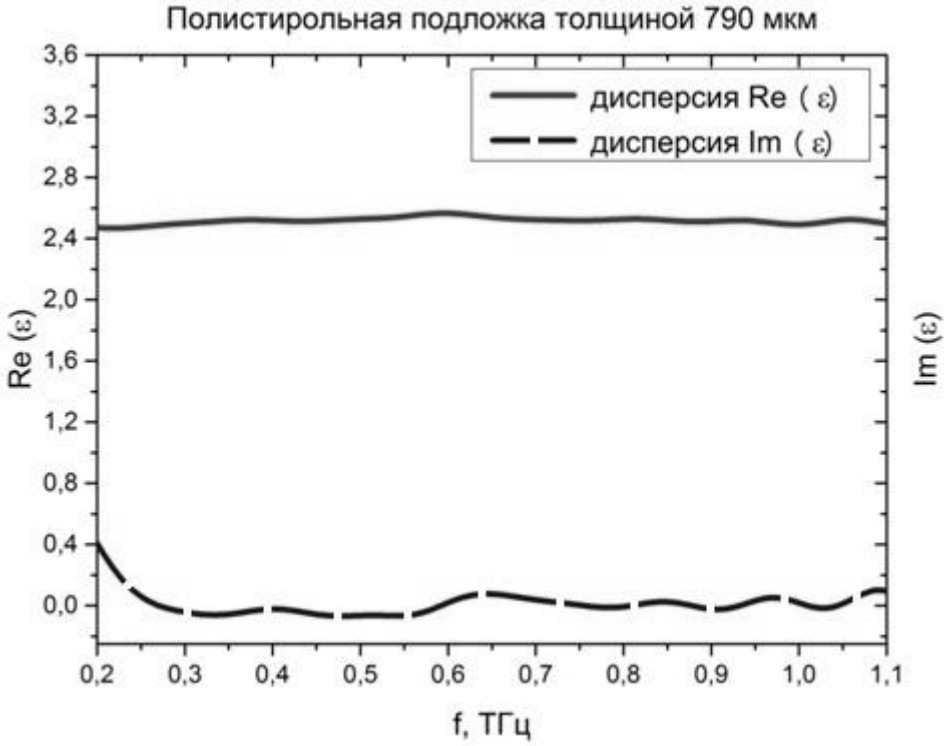


Рисунок 2.10 - Дисперсия комплексной диэлектрической проницаемости полистирольной подложки толщиной 790 мкм

Следующим шагом было получение дисперсии комплексного показателя преломления (Рисунок 2.11) и дисперсии комплексной диэлектрической проницаемости (Рисунок 2.12) эффективной структуры полистирол – монослой клеток толщиной 795 мкм. Понятие эффективной структуры было описано ранее в разделе 2.4.

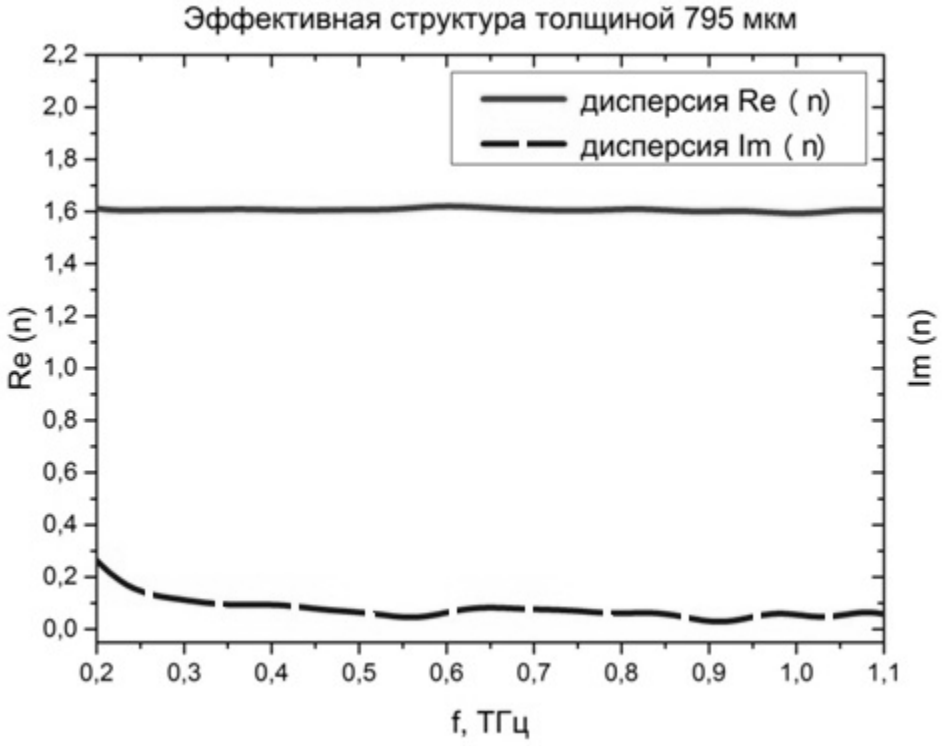


Рисунок 2.11 - Дисперсия комплексного показателя преломления эффективной структуры полистирол - монослой клеток толщиной 795 мкм

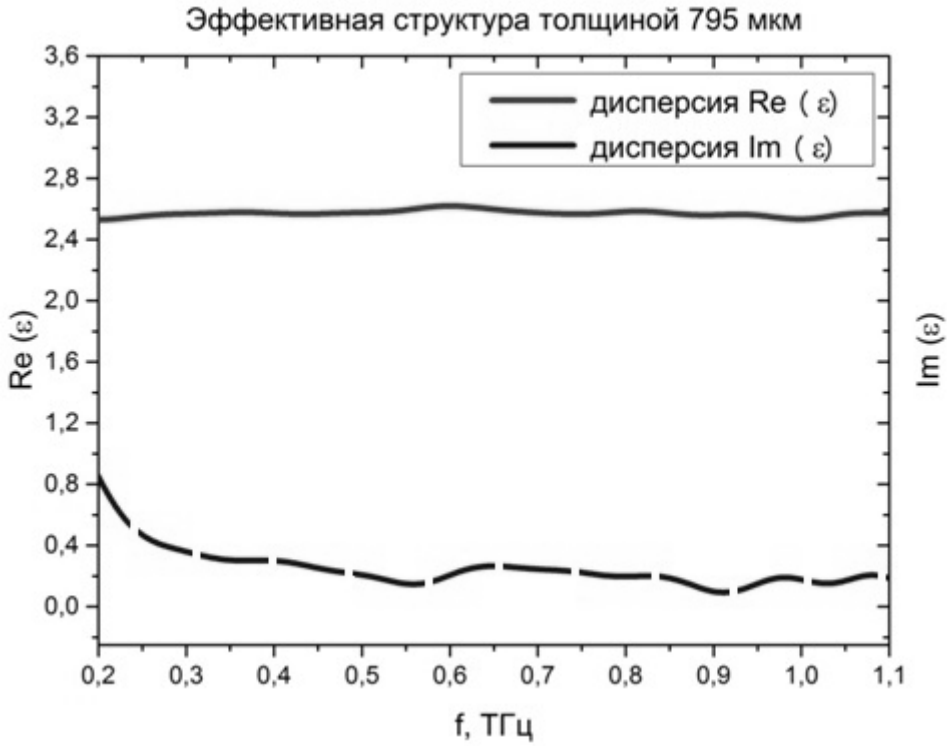


Рисунок 2.12 - Дисперсия комплексной диэлектрической проницаемости эффективной структуры полистирол - монослой клеток толщиной 795 мкм

Затем можно рассчитать дисперсии комплексного показателя преломления и комплексной диэлектрической проницаемости отдельно взятого монослоя клеток (Рисунок 2.13, Рисунок 2.14).

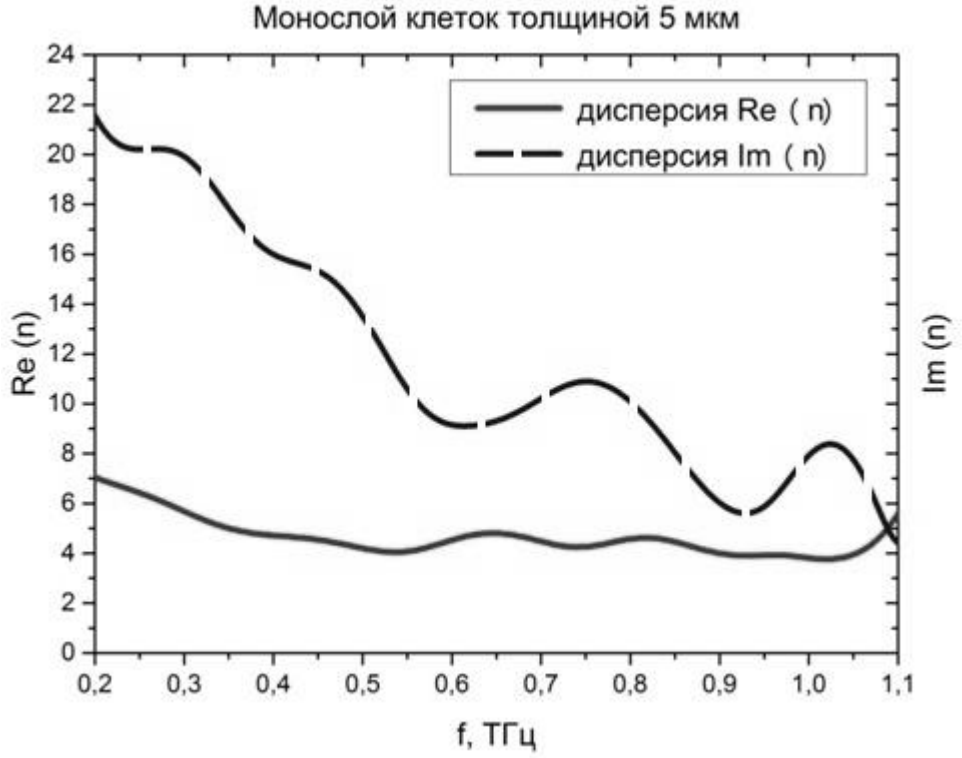


Рисунок 2.13 - Дисперсия комплексного показателя преломления монослоя клеток толщиной 5 мкм

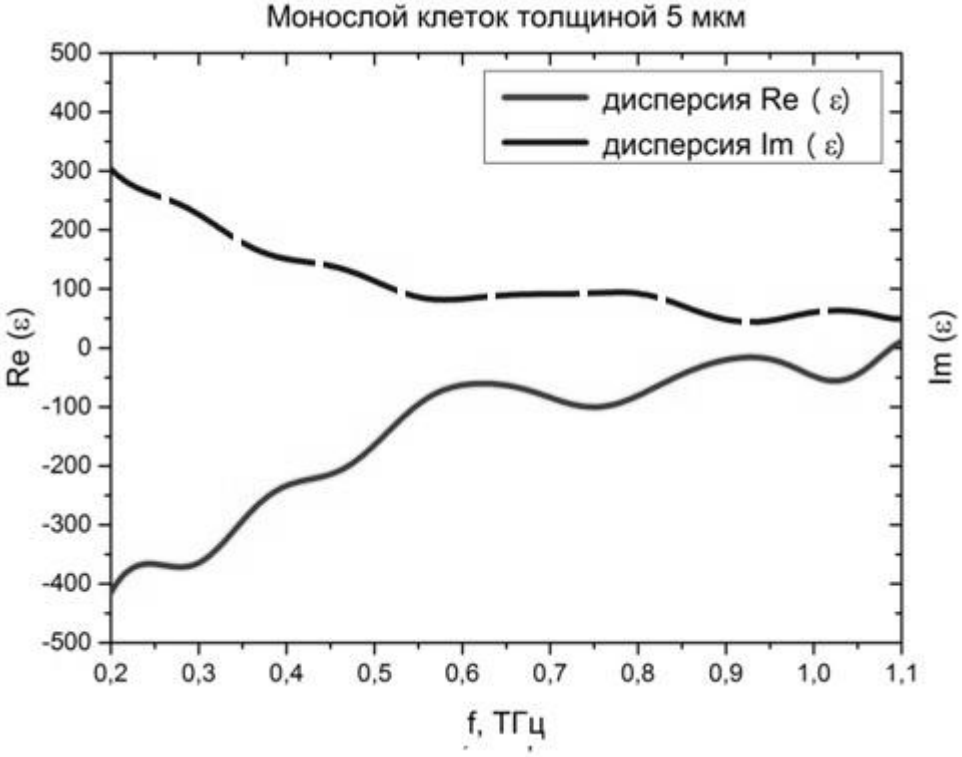


Рисунок 2.14 - Дисперсия комплексной диэлектрической проницаемости монослоя клеток толщиной 5 мкм

Искомая дисперсия глубины проникновения ТГц излучения в слой фибробластов представлена на Рисунке 2.15.

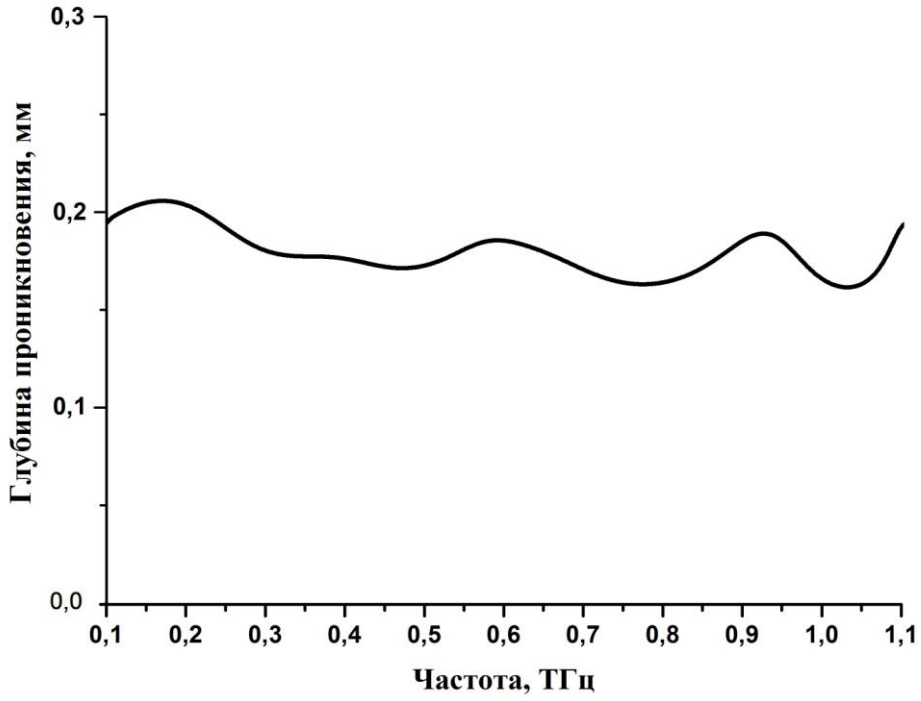


Рисунок 2.15 - Дисперсия глубины проникновения в слое фибробластов до 1,1 ТГц

Показано, что в диапазоне частот 0,1 – 1,1 ТГц глубина проникновения ТГц излучения в слое фибробластов составляет порядка 200 мкм: от 170 до 210 мкм. Так как толщина эпителия и боуменовой мембраны составляет порядка 70 мкм, а диапазон толщины стромы от 283 до 460 мкм [130], использование ТГц излучения на данных частотах достаточно для стимуляции основной части нервной сети роговицы, располагающейся преимущественно в верхней части стромы.

2.6. Методика проточной цитометрии для оценки функциональной активности фибробластов после ТГц воздействия

При оценке влияния импульсного ТГц излучения на клетки, прежде всего, важно изучить, не провоцирует ли оно преждевременную смерть клеток, а затем — не влияет ли оно на процесс деления клеток. Оба эти эффекта можно оценить методом проточной цитометрии [141].

В основе работы проточного цитофлуориметра лежит принцип «гидродинамического» фокусирования. «Обжимающий» поток изотонического раствора движется через проточную ячейку под давлением. Внутри ячейки находится специальный зонд, предназначенный для подачи анализируемого образца – в нашем случае таковым является суспензия одиночных клеток. Прибор действует по принципу гидродинамического фокусирования. Благодаря разнице давления «обжимающего» потока и давления в зонде образуются два ламинарных потока жидкости, которые не перемешиваются между собой. Размер внутренней струи сопоставим с размерами анализируемых клеток, которые в результате «гидродинамического фокусирования» выстраиваются, а затем следуют друг за другом. Затем клетки пересекают излучение источника света, именно здесь происходит регистрация их различных параметров – относительного размера, структуры организации цитоплазмы и ядра, а также – в случае предварительной окраски клеток флуоресцентными красителями – интенсивности их флуоресценции в различных частях спектра (для большинства красителей – в диапазоне 450-750 нм) [141]. В нашем случае после воздействия широкополосного терагерцового излучения, оценивалась жизнеспособность клеток, мембранный потенциал их митохондрий и распределение по фазам клеточного цикла, анализируя интенсивность флуоресценции специально подобранных красителей. Ниже рассмотрим принцип каждого из методов.

Цитометрический учет проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ («Beckman Coulter», США), оснащенном двумя

полупроводниковыми лазерами с длинами волн генерации 488 и 638 нм, мощностью 22 и 25 мВт, размерами эллиптического сечения пятна 10×84 мкм и 9,6×72 мкм, соответственно. Для регистрации сигналов по «малоугловому» (регистрация светорассеяния под углом 1-8°) и «боковому» (рассеивание под углом 90°) светорассеянию, характеризующих размер и структуру (сложность организации цитоплазмы и ядра) клеток, использовали специальные фотодетекторы с ослабителями. При помощи этих двух параметров происходит выявление популяции клеток, удаление из зоны анализа слипшихся клеток и различного рода частиц (микропузырьки воздуха, агрегаты белков культуральной среды, крупные кристаллы солей растворов и т.п.), не соответствующих по своих характеристикам исследуемым клеткам. Для регистрации флуоресценции использовали систему фильтров и фотоэлектронный умножитель (регистрация сигналов в пределах 200-800 нм), предназначенные для детектирования флуоресценции строго определенных длин волн, характерных для красителей, применяемых для оценки характеристик клеток [142].

2.6.1 Оценка мембранного потенциала митохондрий и проницаемости клеточной мембраны при помощи проточной цитометрии.

Принцип метода. Данный метод основан на использовании двух флуоресцентных красителей - йодида 3,3’-дигексилоксакарбоцианина ($DiOC_6(3)$) и йодистого пропидия (PI). $DiOC_6(3)$ относится к группе катионных липофильных красителей, которые в литературе получили название «митохондриальных зондов», так как применяются для изучения мембранного потенциала митохондрий клеток [143]. Благодаря своим липофильным свойствам $DiOC_6(3)$ способен свободно проникать через билипидные мембраны клетки (поверхностную мембрану клетки, а также внешнюю и внутреннюю мембраны митохондрий) и, благодаря уже катионным свойствам, этот краситель накапливается в областях с высокой концентрацией протонов, то есть под внутренней мембраной митохондрий.

Этот эффект сопровождается изменением интенсивности флуоресценции клеток в зеленой части спектра, что и регистрируют при анализе на проточном цитофлуориметре [144]. В том случае, если концентрация протонов снижена, как это имеет место на начальных этапах физиологической смерти клетки - апоптоза, то краситель будет накапливаться в них менее эффективно, и, как следствие, интенсивность его флуоресценции, будут снижены. Тем самым, можно отличить живые клетки с эффективно функционирующими митохондриями (и, как следствие, высокой интенсивностью флуоресценции), от гибнущих или мертвых клеток, в которых функционирование митохондрий нарушено. Как следствие, такие клетки обладают пониженной интенсивностью флюоресценции. В том случае, если деполяризация митохондрий рассматривается как «раннее» событие при запуске апоптоза, то нарушение целостности поверхностной мембраны (то есть ее фрагментация) обычно характерно для клеток, находящихся на терминальных стадиях гибели. Поэтому для выявления разных стадий апоптоза, помимо $DiOC_6(3)$, клетки дополнительно окрашиваются PI – красителем, способным взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами клеток. PI не способен диффундировать через билипидные мембраны и поэтому не способен связаться с ДНК клеток. Однако по мере фрагментации цитоплазматической и ядерной мембран краситель проникает в клетку и взаимодействует с РНК и ДНК. Следствием подобного взаимодействия является накопления красителя в цитоплазме и ядре, и клетка обретает флуоресценцию в красной части спектра.

Таким образом, живые клетки будут обладать яркой флуоресценций по каналу, предназначенному для детектирования $DiOC_6(3)$, но не будут накапливать йодистый пропидий (фенотип $DiOC_6(3)^{bright}PI^-$). Клетки находящиеся на ранних стадиях апоптоза (митохондриальный потенциал снижен, но плазматическая мембрана еще сохраняет свою целостность и непроницаемость для йодистого пропидия) будут иметь фенотип $DiOC_6(3)^{dim\text{-}to\text{-}neg}PI^-$). Вместе с тем, клетки, находящиеся на поздней стадии апоптоза или

уже погибшие (некроз), не будут эффективно накапливать $DiOC_6(3)$, но будут окрашиваться PI – фенотип $DiOC_6(3)^{dim\text{-}to\text{-}neg}PI^+$.

Процедура окрашивания клеток. Для оценки мембранного потенциала митохондрий к 100 мкл клеточной суспензии ($2\text{-}3\times10^6$ клеток/мл) добавляли 20-кратный рабочий раствор $DiOC_6(3)$ («Invitrogen», США), получая конечную концентрацию красителя равную 20 нМ. Рабочий раствор готовили, добавляя к 10 мкл стокового раствора (стоковый – 1 мг/мл ДМСО, дозировали по 10 мкл и хранили при –20°С до использования) 4900 мкл забуференного фосфатами раствора (ЗФР). После внесения красителя образцы тщательно перемешивали и инкубировали в течение 20 минут при 37 °С в атмосфере 5 % CO_2 в защищенном от света месте. По завершении инкубации образцы отмывали избытком ЗФР, содержащим 2% ЭТС (8 минут при 300g). После чего надосадок удаляли, а клеточный осадок переводили в 100 мкл свежего ЗФР. В полученную клеточную суспензию вносили 10 мкл раствора йодистого пропидия («Sigma-Aldrich», США), получая финальную концентрацию PI равную 1 мкг/мл. После чего образцы инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. По завершении инкубации в образцы вносили по 200 мкл ЗФР и проводили цитометричекий учет. Для каждого из образцов анализировали не менее 50000 одиночных клеток. Чтобы отличить одиночные клетки от слипшихся (агрегатов) и в последующем дискриминировать агрегаты из анализа, использовали следующие сочетания сигналов по прямому (величина, пропорциональная размеру клеток) и боковому (величина, характеризующая структуру клеток) светорассеянию – интенсивность пикового против интенсивности интегрального сигналов по FS или SS, а также время полета против интенсивности интегрального сигналов FS или SS. Анализ полученных результатов проводили при помощи программного обеспечения Kaluza™ («Beckman Coulter», США) [145].

2.6.2. Оценка жизнеспособности клеток при помощи ДНК-связывающих красителей.

Принцип метода. Метод основан на применении одновременно двух флуоресцентных красителей – йодида YO-PRO-1 и йодистого пропидия PI [146]. Отличительной особенностью этих веществ, помимо небольшой молекулярной массы (629,3 и 668,4 Да, соответственно), является способность стехиометрическим образом связываться с нуклеиновыми кислотами клетки. Подобного рода взаимодействия сопровождается накоплением красителей в цитоплазме (после взаимодействия с РНК) и в ядре (после взаимодействия с ДНК) клетки и, как следствие, изменением флуоресценции после возбуждения источником света с длиной волны 488 нм. Максимум эмиссии YO-PRO-1 приходится на зеленую (около 509 нм, поэтому перед фотоэлектронным умножителем устанавливали пропускающий фильтр для регистрации флуоресценции в пределах 525±40 нм), а йодистого пропидия – на красную (около 617 нм, для регистрации использовали пропускающий фильтр для диапазона 620±20 нм) части спектра. Однако существенное различие между данными красителями заключается в способности проникать в клетки, билипидный слой мембраны которых для них не проницаем. Так, за накопление YO-PRO-1 внутри цитоплазмы отвечают ионные каналы P2RX7 [147, 148]. В живых клетках накопления YO-PRO-1 не происходит, так как эти каналы не активны или не обладают высокой способностью транспортировать краситель через мембрану. Однако их активация происходит при запуске апоптоза и по времени совпадает с нарушением асимметрии липидного состава поверхностной мембраны, что позволяет рассматривать накопление YO-PRO-1 в клетке в качестве события, характерного для «ранних» стадий апоптоза. Поэтому для выявления различных стадий апоптоза, а не только констатации факта его запуска, помимо YO-PRO-1, клетки дополнительно окрашиваются вторым ДНК-связывающим красителем – йодистым пропидием – обладающим несколько иными свойствами. Йодистый

пропидий не имеет каких-либо интегрированных в мембрану специфических переносчиков и может проникать в цитоплазму и ядро только через поврежденные / фрагментированные мембраны, что обычно имеет место на финальных стадиях апоптоза при формировании апоптотических телец или при некрозе клеток. Таким образом, живые клетки в образце не будут окрашиваться ни одним из упомянутых выше красителей. Клетки, вступившие в апоптоз, будут позитивны только YO-PRO-1, тогда как клетки, находящие на более поздних стадиях апоптоза, будут эффективно окрашиваться обоими красителями. Окраску клеток различных клеточных линий проводили в соответствие с рекомендациями, приведенными в [146]. Анализ полученных результатов проводили при помощи программного обеспечения Kaluza™ («Beckman Coulter», США) [142].

2.6.3. Изучение распределения клеток по фазам клеточного цикла.

Принцип метода. Для определения содержания ДНК в клетках использовали ДНК-связывающий краситель йодистый пропидий. Йодистый пропидий относится к группе «интеркалирующих» красителей – веществ, которые взаимодействуют с молекулами нуклеиновых кислот, встраиваясь в пространство между остатками нуклеотидов, находящимися в соседних нитях. Поскольку связывание йодистого пропидия с ДНК стехиометрическое, т.е. строго пропорционально количеству ДНК, находящемуся в ядре клетки, то на гистограммах, полученных с проточного цитометра, можно выделить следующие основные области, соответствующие различным стадиям клеточного цикла [149]. Покоящиеся клетки (G_0) и клетки, находящиеся в фазе G_1 клеточного цикла, содержат равное количество ДНК (2N), которое соответствует диплоидному набору хромосом. Поэтому на гистограмме они будут находиться в составе одного пика, так называемого диплоидного (G_0/G_1) пика. В фазе синтеза клеточного цикла содержание ДНК постепенно возрастает с 2N до 4N, что сопровождается увеличением связывания PI и, как следствие, усилением интенсивности флюоресценции окрашенных клеток. В

фазе G_2 и во время митоза содержание ДНК и количество хромосом удваиваются (4N). Следствием этого является то, что интенсивность флюоресценции клеток в фазах G_2/M клеточного цикла будет ровно в два раза превосходить таковую клеток, имеющих диплоидный набор ДНК (G_0/G_1). В том случае, если пик G_0/G_1 находится в районе 200-го канала линейной шкалы, то пик G_2/M будет располагаться в районе 400-го канала. Что касается клеток, вступивших в апоптоз, то, как уже отмечалось выше, они будут располагаться левее пика G_0/G_1, так как они несут неполный или гиподиплоидный набор ДНК (менее 2N). Клетки, находящиеся в фазе, где происходит удвоение ДНК (S-фаза) — будут находиться между пиками G_0/G_1 и G_2/M. Окраску клеток проводили по общепринятой методике [150]. Для каждого из образцов анализировали не менее 10 000 одиночных клеток. Чтобы отличить одиночные клетки от слипшихся и в последующем удалить их из зоны анализа, использовали следующие сочетания сигналов – соотношение пиковый / интегральный сигналов PI против интенсивности флуоресценции интегрального сигнала PI, интенсивность флуоресценции пикового против интенсивности флуоресценции интегрального сигналов PI, а также время полета PI против интенсивности флуоресценции интегрального сигналов PI.

Полученные в ходе цитометрического учета результаты анализировали при помощи программного обеспечения ModFit TL («Verity Software House», США). Результаты получали в виде распределения клеток по фазам G_0/G_1, S и G_2/M, выраженном в процентах от общего числа проанализированных клеток [142].

2.7. Экспериментальное исследование функциональной активности фибробластов под влиянием широкополосного импульсного излучения диапазона 0,1-2 ТГц

2.7.1 Описание методики импульсной терагерцовой фотометрии

За основу была взята схема терагерцового излучателя, разработанная для облучения нервных клеток [151]. Она была модернизирована для облучения клеток, находящихся в жидкой среде. Так как такие клетки осаждаются на дно планшета, необходимо подавать излучение снизу, а для оперативного слежения за выходной мощностью ТГц излучения без прерывания облучения объектов, часть излучения подавалась на оптико-акустический приемник (Рисунок 2.16) [142].

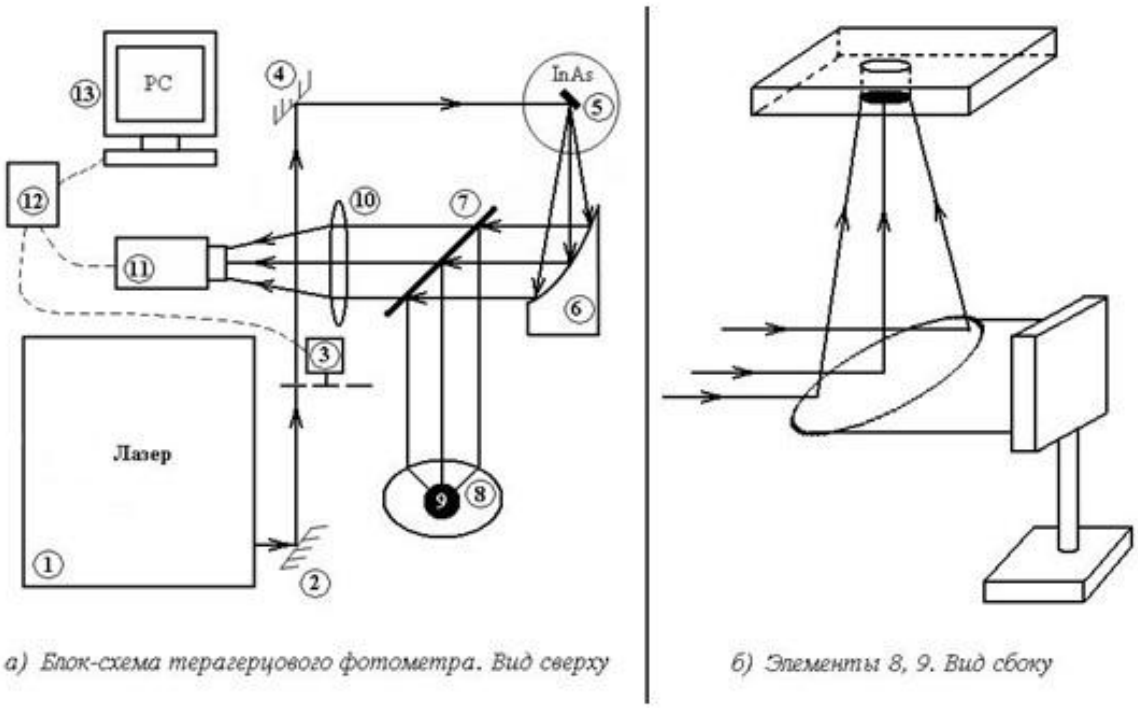


Рис. 2.16. Блок-схема терагерцового фотометра. На схеме: 1- лазер FL-1, 2 ,4 – зеркала, 3 - механический модулятор Thorlabs mc1000a, 5 – магнитная система с кристаллом InAs (угол падения излучения составлял 45°), 6, 8 - параболические зеркала, 7 – светоделительная кремниевая пластина, 9 – объект, помещенный в ячейку планшета, 10 – линза, 11 – оптико-акустический приемник GC-1P, 12 – синхронный усилитель LIA-MV-150, 13 – персональный компьютер [142]

В схеме установки излучение фемтосекундного лазера FL-1 с активной средой Yb:KYW (длина волны 1040 нм, длительность импульса

излучения 120 фс, частота следования импульсов 75 МГц, средняя мощность излучения 1 Вт) (1) падало под углом 45° на 100% отражающие зеркала (2, 4). Перед тем как попасть на полупроводниковый кристалл, ТГц излучение модулировалось механическим модулятором (3) с частотой 13 Гц, затем подавалось под углом 45° на кристалл InAs, помещенный в специальную магнитную систему с магнитной индукцией B = 2,2 Тл (5). При возбуждении фотоносителей фемтосекундным лазерным импульсом в кристалле InAs, вследствие наличия приповерхностного электрического поля, эффекта Дембера и скрещенного магнитного поля системы, происходила генерация ТГц излучения [10]. Расходящееся ТГц излучение коллимировалось внеосевым параболическим зеркалом (6) с фокусным расстоянием 12 см и световым диаметром 7 см и направлялось на светоделительную пластину (7) из высокоомного кремния, толщиной 500 мкм. Фемтосекундное излучение, отраженное от кристалла, поглощалось в фильтре из фторопласта, перед зеркалом 6. Далее часть излучения, прошедшая через светоделительную пластину, фокусировалась линзой с фокусным расстоянием 5 см (10) на оптико-акустический приемник (ОАП) GC-1P фирмы Tydex с оптической чувствительностью $1x10^5$ В/Вт и скоростью отклика 30 мс (11). Другая часть излучения, отраженная от кремниевой пластины, попадала на второе параболическое зеркало (8), которое направляло излучение (сходящийся пучок) вверх на объект (9). Потери ТГц излучения на планшете, в котором находились клетки, составили 20 %. Сигнал с ОАП поступал на синхронный усилитель LIA-MV-150 фирмы FEMTO и далее на аналогово-цифровой преобразователь с USB выходом на ПК, где получаемые данные обрабатывались с помощью программы, написанной в среде LabView. Генерируемое ТГц излучение имело полосу частот от 0,1 до 2 ТГц, длительность ТГц импульса составляла 2,5 пс. Облучение образцов происходило в течение 1 минуты. Мощность ТГц излучения варьировалась на уровне разных порядков с помощью фильтров и с учетом поглощения планшетом составляла 30; 2 и 0.1 мкВт. Площадь

облучения составляла 3,14 $см^2$. Соответственно, плотность мощности составляла 9,55; 0,63 и 0,03 $мкВт/см^2$. Эксперименты проводились при температуре 20 °С. Было проведено три серии экспериментов, в каждой серии облучение на каждой мощности проводилось три раза. В качестве контроля для каждой из мощностей использовали лунки планшета, которые не подвергались облучению [142].

2.7.2. Результаты оценки мембранного потенциала митохондрий фибробластов

Для анализа результатов проточной цитофлуориметрии с использованием программного обеспечения были построены гистограммы интенсивности флуоресценции DIOC6(3), увеличение интенсивности флуоресценции которого зависит от мембранного потенциала митохондрий. На Рисунке 2.17 для фибробластов, применявшихся в эксперименте, приведено по одному типичному примеру такой гистограммы [145].

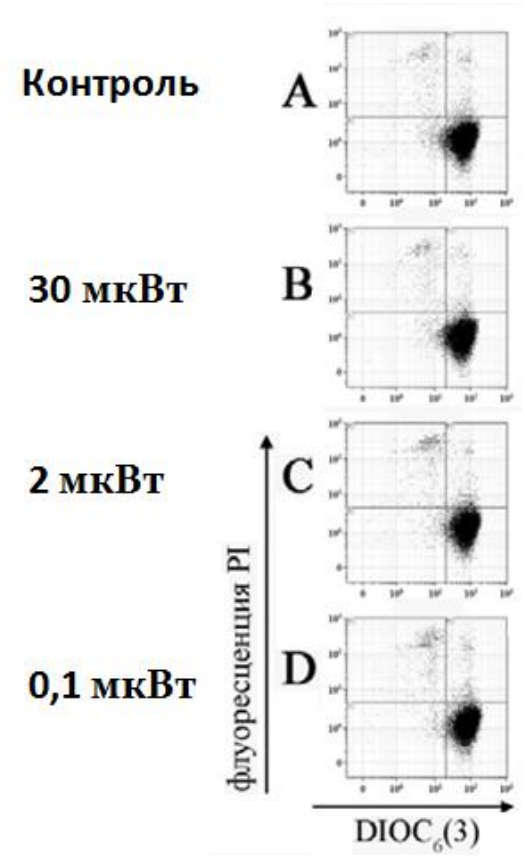


Рисунок 2.17 - Исследование мембранного потенциала митохондрий при помощи флуоресцентного красителя DIOC6(3). По оси абсцисс: интенсивность флуоресценции DIOC6(3); по оси ординат: интенсивность флуоресценции йодистого пропидия. Сверху вниз – примеры гистограмм распределения клеток в контрольных лунках, а также в лунках, облученных излучением с мощностью 0,1; 2 и 30 Вт (ряды гистограмм A, B, C и D, соответственно) [145]

Полученные из гистограмм данные были обработаны и сведены в таблицу 2.1, где в процентном соотношении приведены живые и находящихся на ранних и поздних стадиях апоптоза клетки.

Таблица 2.1. Количественное соотношение живых и находящихся на разных стадиях апоптоза клеток.

Культура клеток	Мощность облучения, мкВт	Живые клетки, %	Ранний апоптоз, %	Поздний апоптоз / некроз, %
Фибробласты	Контроль	95,9±0,5	1,2±0,7	2,8±0,3
	0,1	96,2±0,3	1,2±0,4	2,6±0,3
	2	96,3±0,4	0,7±0,2	3,0±0,3
	30	96,4±0,4	0,7±0,2	2,9±0,2

Из результатов видно, что вне зависимости от используемой нами мощности облучения культура нормальных человеческих фибробластов не показала статистически достоверного изменения мембранного потенциала и не вызвала изменений в проницаемости мембраны по сравнению с контролем.

2.7.3. Результаты оценки жизнеспособности клеток при помощи ДНК-связывающих красителей.

При оценке жизнеспособности клеток при помощи ДНК-связывающих красителей йодида YO-PRO-1 и йодистого пропидия PI полученные данные были обработаны и сведены в таблицу 2.2.

Таблица 2.2. Количественное соотношение живых и находящихся на разных стадиях апоптоза клеток

Культура клеток	Мощность облучения, мкВт	Живые клетки, %	Ранний апоптоз, %	Поздний апоптоз/некроз, %
Фибробласты	Контроль	94,6±0,3	1,2±0,4	4,2±0,2
	0,1	95,2±0,6	1,4±0,5	3,5±0,1
	2	94,7±0,6	1,0±0,3	4,2±0,6
	30	95,1±0,8	1,1±0,4	3,8±0,8

Эти данные однозначно коррелируют с данными, полученными нами с использованием метода оценки мембранного потенциала митохондрий и проницаемости клеточной мембраны при помощи проточной цитометрии, результаты которого приведены выше. Оба результата свидетельствуют об отсутствии статистически достоверных отличий между контрольными и облученными образцами по количественному соотношению живых и находящихся на разных стадиях апоптоза клеток вне зависимости от используемой нами мощности облучения [142].

2.7.4. Оценка распределения клеток по фазам клеточного цикла

Таблица 2.3 позволяет проанализировать распределение фибробластов по фазам клеточного цикла при помощи йодистого пропидия. Также не обнаружены достоверные изменения их пролиферативной активности. Как для контрольных образцов, так и для образцов, содержащих клетки подвергнутые воздействию терагерцового излучения при мощностях 30, 2 и 0,1 мкВт, в фазах клеточного цикла, отличных от G_0/G_1 обнаруживалось не более 3 ÷ 4 % клеток. Это соответствует спонтанному уровню пролиферации мононуклеарных клеток в условиях in vitro.

Таблица 2.3. Распределение фибробластов по фазам клеточного цикла (G_0/G_1, S и G_2/M)

Культура клеток	Мощность облучения, мкВт	Фаза G0/G1, %	S-фаза, %	Фаза G2/M, %
Фибробласты	Контроль	93,6±1,0	4,5±0,9	1,9±0,1
	0,1	94,8±0,9	3,3±0,7	1,8±0,2
	2	94,3±0,5	3,6±0,5	2,1±0,1

Заключение к 3 главе

По итогам второй главы предложен режим терагерцового излучения, позволяющий обеспечить эффективную стимуляцию основной части нервной сети роговицы, располагающейся под эпителием и боуменовой мембраной (слой величина которого, составляет порядка 70 мкм) в строме с толщиной от 283 до 460 мкм [130]. Эффективность воздействия ТГИ определялась по спектральным характеристикам модельного объекта - фибробластов. Для получения этой информации по результатам работы предлагается использовать области, в которых наблюдаются пики пропускания ТГц излучения. По результатам проведенных экспериментов установлено, что ТГц излучение в диапазоне частот от 1,0 до 1,4 ТГц эффективно распространяется в слое фибробластов и может достигать нервных клеток. Поскольку важно обеспечить отсутствие поглощения излучения, то воздействие необходимо осуществлять на частотах, соответствующих пикам (максимальной величине) пропускания. Согласно результатам исследования пропускание наблюдается на частотах 1,11; 1,17; 1,32 ТГц. Максимальной величины пропускание достигает на частотах 1,11 и 1,32 ТГц. Для получения излучения с такими частотами можно использовать специальные терагерцовые фильтры или непрерывные источники ТГц излучения.

В ходе экспериментов по определению глубины проникновения ТГИ было продемонстрировано, что излучение с частотой, принадлежащей

диапазону 0,1 – 1,4 ТГц проходит в слой фибробластов на глубину от 170 до 210 мкм. Этой глубины достаточно для достижения в роговице нервных волокон.

Помимо задачи подбора режима эффективного прохождения ТГц излучения через фибробласты, необходимо при этом не повредить их. Поэтому важно было определить биологически безопасный уровень воздействия терагерцового излучения на фибробласты. Для этого предложено исследовать их функциональную активность после ТГц облучения.

В рамках данного исследования были разработаны макет и методика облучения биологических клеток, находящихся в жидкой среде, широкополосным импульсным ТГц излучением диапазона 0,1 – 2 ТГц с максимумом сигнала на 0,8 ТГц, длительностью импульса 2,5 пс. Наблюдение за постоянством выходной мощности осуществлялось через отведение части излучения на оптико-акустический приемник. Разработана методика исследования влияния ТГц излучения на культуры клеток, основанная на анализе интенсивности флуоресценции ДНК-связывающих и митохондриальных красителей. С ее помощью оценивалась жизнеспособность клеток и их распределение по фазам клеточного цикла облученных и контрольных образцов.

С использованием макета и разработанной методики облучения, а также цитофлуориметрии ДНК-связывающих красителей показано, что воздействие импульсного терагерцового излучения мощностью 30; 2 и 0,1 мкВт не оказывает существенного влияния на изменение функциональной активности фибробластов. Так, между контрольными и облученными образцами не обнаружено статистически достоверных изменений в соотношении живых и находящихся на разных стадиях апоптоза клеток, а также в распределении клеток по фазам клеточного цикла.

Таким образом, можно сделать вывод о возможности безопасного применения излучения с данными параметрами мощности и длительности

для терагерцовых систем. В дальнейшем разработанные методики могут быть использованы для определения границы биологически безопасных энергетических порогов воздействия импульсного ТГц излучения на более сложные биологические объекты [142].

ГЛАВА 3. Исследование изменений роста нейритов сенсорных ганглиев под влиянием широкополосного импульсного излучения диапазона 0,1-2 ТГц

После хирургических вмешательств на роговице (фоторефракционная кератэктомия, лазерный кератомилез др.) регенерация в ней нервных волокон является определяющим параметром процесса ее восстановления. Как следствие, это определяет появление осложнений и, соответственно, результативности лечения. В связи с этим создание методики стимуляции послеоперационного нейритогенеза представляется весьма актуальной задачей. Для определения возможности управления процессом стимуляции роста нейритов в настоящей работе исследовалось влияние широкополосного импульсного ТГц излучения диапазона 0,1 – 2 ТГц на культуру ткани спинальных ганглиев.

Анализ ТГц спектральных линий спинальных ганглиев позволит на данном этапе разделить процессы, связанные с эффектами поглощения, рассеяния или резонансными эффектами. Тем самым приблизиться к раскрытию механизмов влияния терагерцового излучения на биообъекты, о которых на данный момент высказываются только предположения. Сильное поглощение мощного терагерцового излучения (>10 мВт/см2) гидратированными биологическими тканями может вызывать тепловые эффекты [3, 95]. Помимо объемных тепловых эффектов, возможно наличие микротепловых эффектов, которые возникают вследствие прямого последовательного возбуждения биомолекул [98] или линейных / нелинейных механизмов резонанса [100, 101], а также формирование ультразвуковой волны [152]. Вследствие вышеназванных механизмов возможны следующие реакции со стороны клетки: изменение конформации мембранных белков и проницаемости клеточных мембран для различных веществ, перераспределение электрического заряда на мембране

клетки, а также возбуждение резонансных колебаний макромолекул, входящих в состав клеточной мембраны и цитоскелета.

Высокое содержание воды в биообъектах является, возможно, основным фактором, вызывающим влияние ТГц излучения на клетки, вследствие наличия многочисленных спектральных линий поглощения воды в этом диапазоне частот. Следовательно, эти спектральные линии будут наблюдаться и в спектре облучаемого биологического объекта. 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 связанные с межмолекулярными взаимодействиями гидратированных компонент клетки.

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

В настоящей главе было проведено исследование влияния широкополосного импульсного ТГц излучения на рост нейритов и выполнен сравнительный анализ экспериментально и численно полученных спектров отражения образца спинальных ганглиев в диапазоне частот 0,1-2 ТГц с целью выяснения механизма влияния излучения с этими параметрами на рост нейритов сенсорных ганглий [153].

3.1. Описание методики получения и пробоподготовки нейритов сенсорных ганглиев

3.1.1. Преимущество метода культуры ткани

Альтернативой экспериментам на животных являются искусственно созданные тест-системы: культура клеток, культура тканей и культура органов.

Метод, при котором жизнеспособность биологических тканей сохраняется вне организма (in vitro) за счёт создания условий, обеспечивающих полный метаболизм (газообмен, питание, удаление вредных метаболитов) и асептику, – получил название «культура ткани» (tissue culture). Аналогично формулируются определения для культур клеток и органов.

Удобство использования, достоверность информации, получаемой с применением этих методов, привело к тому, что они широко используются в лабораториях мира. К тому же, использование в экспериментах вместо целого живого существа культур тканей и органов удовлетворяет требованиям этики.

Основой метода органотипического культивирования лежит получение эксплантата и выращивание из него in vitro части органа. Благодаря тому, что специфические клеточные взаимодействия в культуре тканей не нарушаются, гистологическая целостность ткани сохраняется в течение длительного времени. Функции отдельных тканей органа при этом осуществляются in vitro аналогично процессам в живом организме (in vivo) [154-156]. В то же время культура тканей является системой, намного более просто устроенной по сравнению с организмом. Исследователи могут варьировать различные параметры культивирования, моделируя ситуации, воспроизведение которых невозможно в условиях, когда исследования ведутся на целом живом организме. Открываются более широкие возможности для анализа взаимодействий отдельных структур органа. Исследуемый объект возможно поставить в строго контролируемые условия

культивирования [155, 157]. Влияние на клетки тестируемых воздействий определяется в «чистом виде», без учёта нейрогуморальных воздействий, происходящих в целом организме.

Доскональное изучение механизмов роста клеток и их дифференцирования, межклеточных взаимодействий, гистогенеза, различных этапов метаболизма стало возможным благодаря использованию культуры тканей.

Установлено, что адекватной моделью для изучения биологической активности фармакологических препаратов и разнообразных воздействий является органотипическая культура спинальных ганглиев 10-12-дневных куриных эмбрионов.

3.1.2. Получение органотипической культуры нервной ткани (спинальных ганглиев) куриных эмбрионов

Источником материала служили куриные эмбрионы возрастом 10-12 дней. Под микроскопическом контролем с помощью набора инструментов для глазной хирургии выделялись спинальные ганглии пояснично-крестцового отдела спинного мозга. Эксплантаты нервной ткани помещались на покровные стекла, покрытые коллагеновой подложкой, в стерильные полистерольные чашки Петри.

Для изучения влияния ТГц излучения на рост нейритов контрольные и облученные образцы культивировались в инкубаторе (5% CO_2) в течение трех суток при температуре 36,8^{o} С. Перед записью спектров отражения чашки Петри с объектами помещали в инкубатор на 30 минут для лучшей фиксации эксплантатов к подложке.

Чтобы избежать поглощения ТГц излучения питательной средой, стандартная методика (рисунок 3.1а) была изменена: капли питательной среды наносились на стенки закрытой чашки Петри с объектом, а не покрывали его целиком (рисунок 3.1б), что создавало подходящие условия для поддержания жизнедеятельности ганглия на время облучения.

Стандартный состав питательной среды содержал среду Игла с инсулином, раствор Хенкса, фетальную сыворотку коровы, глюкозу, глютамина, антибиотики и куриный эмбриональный экстракт. 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 не изменялась более чем на 1ºС. Образцы, не подвергшиеся влиянию ТГц излучения, считались контрольными.

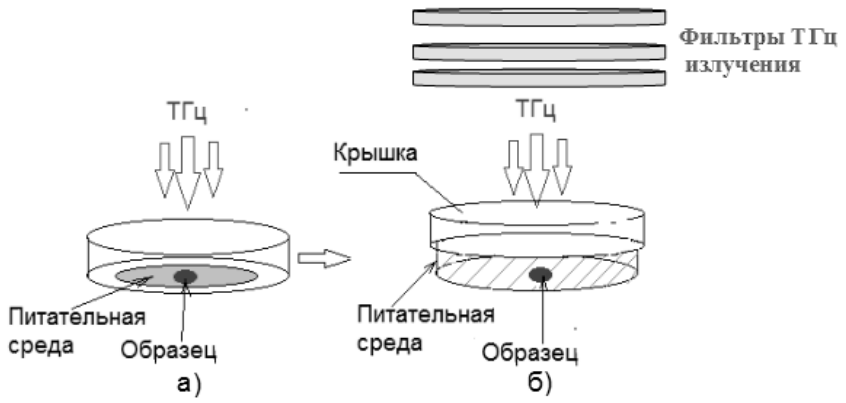


Рисунок 3.1 - Механизм облучения образца: а) ТГц излучение полностью поглощается питательной средой, в которую помещен образец; б) питательная среда нанесена на стенки чашки Петри, закрытой полистирольной крышкой. Мощность излучения варьировалась фильтрами ТГц излучения

3.1.3. Описание морфометрического метода оценки роста нервных клеток

Рост нервных клеток в культуре спинальных ганглиев исследовали прижизненно с помощью светового микроскопа. В процессе культивирования спинальных ганглиев вначале отмечено появление

отростков нервных клеток, а позже перемещение фибробластов и шванновских клеток.

Чтобы получить количественные показатели роста нервных клеток в культуре и влияния исследуемых веществ на этот процесс, применяли морфометрический метод. Для унификации показателей в различных эксплантатах рост клеток оценивали по относительному показателю, сравнивая соотношение площади всего эксплантата вместе с периферической зоной роста и площади центральной зоны, соответствующей первичному ганглию. Полученное соотношение (индекс площади или ИП) использовали как объективный показатель интенсивности процессов роста (Рисунок 3.2). В качестве единицы площади при этом принимали квадрат-окуляр сетки микроскопа LSM-710 Carl Zeiss с телескопической насадкой Carl Zeiss Axiostar Plus (при увеличении 3,5x10 значение равно 150 мкм^2). Статистическая обработка результатов проведена с использованием t-критерия Стьюдента с доверительной вероятностью 0,95. Индекс площади (ИП) выражался в процентах, где контрольные значения ИП принимались за 100%.

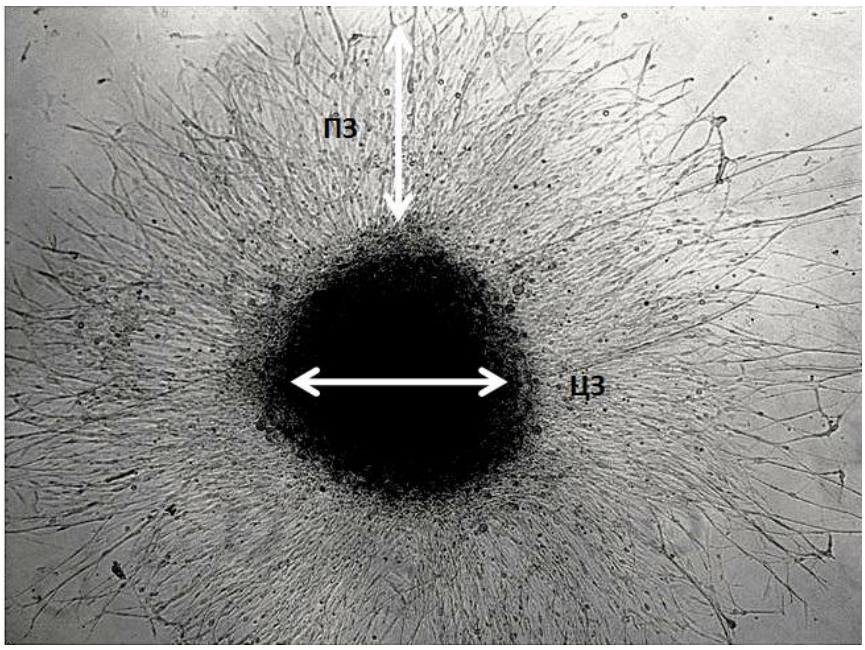


Рисунок 3.2 - Микрофотография спинального ганглия 10-12-дневного куриного эмбриона. Увеличение х50. Контроль. ЦЗ и ПЗ - центральная и периферическая зоны, соответственно

После культивирования для оценки относительного распределения количества клеток по фазе клеточного цикла использовалась окраска акридиновым оранжевым. Флуоресцентный краситель акридиновый оранжевый проникает в клетки и окрашивает ДНК в зеленый, а РНК — в красный цвет.

3.2. Описание методики импульсной терагерцовой фотометрии

Оптическая схема эксперимента (Рисунок 3.3) включала в себя лазер, работающий в импульсно-периодическом режиме, при частоте повторения 50 МГц и с длиной волны λ = 1,56 мкм. Мощность излучения накачки составляла 120 мВт, длительность одного импульса - 125 фс. Излучение лазера 1 проходило систему зеркал 2, 3. До попадания на кристалл оно проходило через механический модулятор 4, где стробировалось с частотой 13 Гц, а затем фокусировалось линзой 5 на кристалл InAs, помещенный в магнитную систему 6, для увеличения эффективности генерации.

Расходящееся ТГц излучение селектировалось от излучения накачки с помощью фильтра из фторопласта, собиралось внеосевыми параболическими зеркалами 7, 8 и направлялось на чашку Петри с объектом 9 [158]. Детектирование ТГц излучения осуществлялось через оптико-акустический приемник 10, GC-1P фирмы Tydex с оптической чувствительностью $1x10^5$ В/Вт и скоростью отклика 30 мс. Сигнал с ОАП поступал на синхронный усилитель LIA-MV-150 фирмы FEMTO и далее на аналогово-цифровой преобразователь с USB выходом на ПК, где получаемые данные обрабатывались с помощью программы, написанной в среде LabView.

На образцы спинальных ганглий площадью 0,1 $см^2$, находящиеся в закрытой чашке Петри, в течение 3 и 5 минут воздействовали ТГц широкополосным импульсным излучением (частотный диапазон: 0,1-2 ТГц; длительность ТГц импульса: 2,5 пс, скважность 8000) при температуре + 25°С. Проводился сравнительный анализ 10 облученных образцов с 10 контрольными образцами при разных значениях мощности ТГц излучения (диапазон: 0,076 - 11,600 мкВт), которая регулировалась с помощью фильтров с учетом поглощения чашкой Петри.

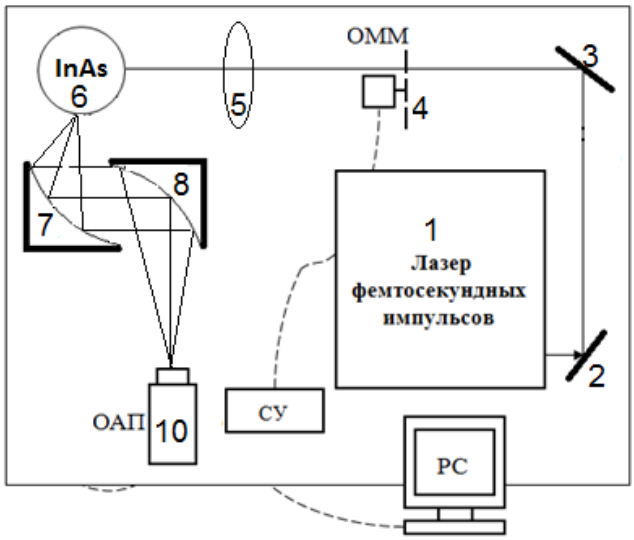


Рисунок 3.3 - Схема терагерцового фотометра: 1 – лазер; 2, 3 – система зеркал; 4 – механический модулятор; 5 – линза; 6 – магнитная система; 7, 8 –

параболические зеркала; 9 – объект; 10 – оптико-акустический приемник [159]

3.3 Изучение дозозависимого изменения роста нервных волокон

В данной работе исследовалось изменение пролиферативной активности нейритов сенсорных ганглиев в органотипической культуре ткани под действием широкополосного импульсного ТГц излучения с различной плотностью мощности (Рисунок 3.4).

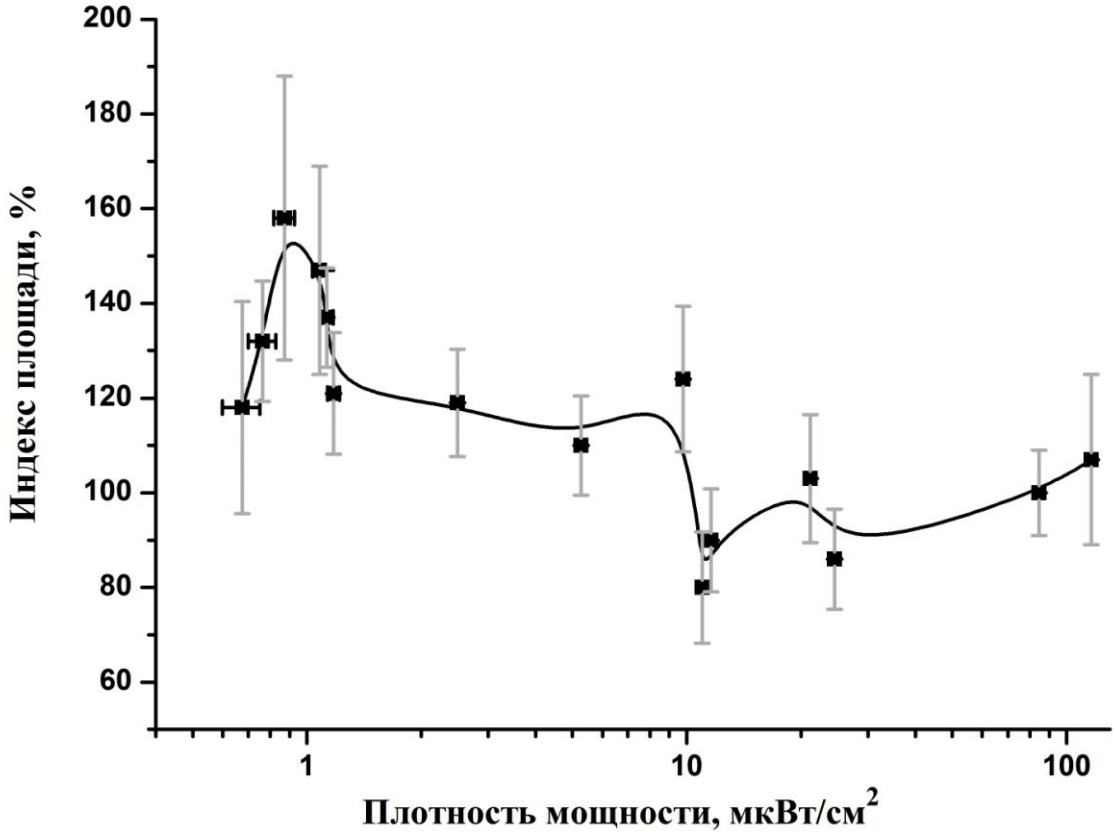


Рисунок 3.4 - Зависимость индекса площади облученных образцов от плотности мощности ТГц излучения

Для наглядности, зависимость индекса площади от различных характеристик излучения представлена в таблице 3.1.

Таблица 3.1. Распределение индекса площади в зависимости от параметров излучения

Мощность, мкВт	Плотность мощности, мкВт/см^2	Плотность мощности в импульсе, Вт/см^2	Суммарная энергия, мДж	Время облучения, мин	Индекс площади, %
11,604	116,039	0,928	20,887	3	107±18
8,468	84,680	0,677	1,524	3	100±9
2,450	24,497	0,196	4,409	3	86±10,58
2,114	21,136	0,169	3,804	3	103±13,5
1,158	11,582	0,093	2,084	3	90±10,87
1,098	10,982	0,088	1,976	3	80±11,76
0,978	9,776	0,078	1,759	3	124±15,36
0,527	5,267	0,042	0,95	3	109,5±10,5
0,249	2,492	0,0199	0,448	3	118,76±11,3
0,117	1,176	0,0094	0,353	5	121±12,85
0,113	1,129	0,009	0,338	5	137,47±10,47
0,108	1,081	0,0086	0,324	5	147±22
0,087	0,872	0,0069	0,261	5	158±30
0,076	0,764	0,0061	0,229	5	131,76±12,7
0,067	0,675	0,0054	0,202	5	118±22,4

При снижении мощности излучения наблюдается сначала угнетающий, а затем стимулирующий эффект действия ТГц излучения на рост нейритов. Получен эффект стимуляции роста, достигающий 158±30 % по отношению к контрольным образцам при плотности мощности ТГц излучения 0,872 мкВт/см^2.

На рисунках 3.5 и 3.6 приведены результаты окраски контрольных и облученных образцов (мощность порядка 1,081 мкВт/см^2).

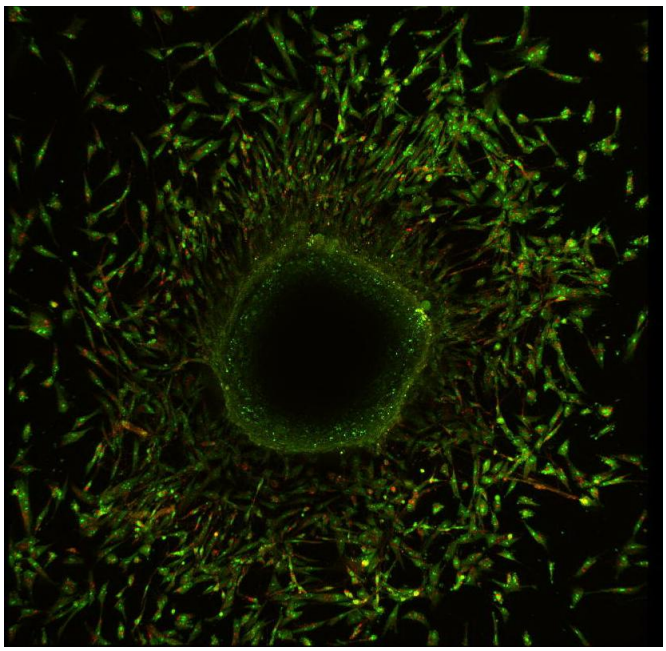


Рисунок 3.5 - Фотография контрольного образца после культивирования при окраске акридиновым оранжевым, ИП=100%. Увеличение х10. Зеленым цветом окрашены ДНК, оранжевым – РНК

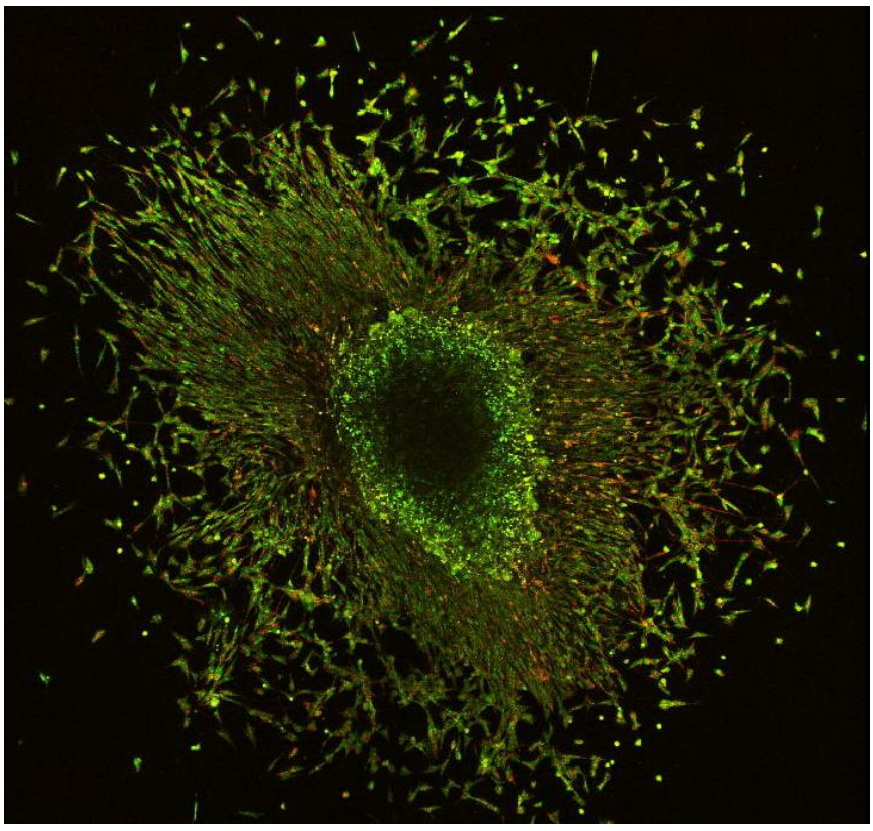


Рисунок 3.6 - Фотография облученного образца после культивирования при окраске акридиновым оранжевым телескопической насадкой Carl Zeiss Axiostar Plus, ИП=147%. Зеленым цветом окрашены ДНК, оранжевым – РНК

Сравнивая рисунки 3.5 и 3.6 можно отчетливо видеть усиление пролиферации нейритов в облученном образце, увеличение их плотности, а также сохранение жизнеспособности клеток в центральной зоне, соответствующей первичному ганглию. В необлученном образце клетки центральной зоны гибнут из-за недостатка питательных веществ и кислорода, что наблюдается на рисунке 3.5.

В эксперименте не наблюдалось изменение температуры образца во время воздействия ТГц излучения. Сравнивая полученные нами результаты с литературными данными, можно сделать вывод о возникновении стимуляции клеточного роста (пролиферации) через нетепловые механизмы воздействия, которые обеспечиваются низкой плотностью мощности в эксперименте. Однако с учетом того, что пики поглощения воды находятся в ТГц диапазоне частот, а клетка, как известно, 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 литературных источниках при воздействии малой, менее 1 мВт/см^2, плотности мощности ТГц излучения на разных частотах также были получены как угнетающие [4, 5, 40-55, 68-72], так и стимулирующие [56-65, 67] эффекты на биологические объекты. Во всех этих работах, кроме [67], использовался источник непрерывного излучения и длительность облучения, превышающая 10 минут. При параметрах облучения, наиболее близким к используемым, в работе [66], наблюдалось изменение потенциала действия нейрона (плотности мощности 0,28; 0,74 и 0,56 мкВт/см^2, длительность облучения 1 минута). При параметрах облучения работы [66] наиболее близких к нашим параметрам, наблюдалось изменение потенциала действия нейрона (плотности мощности 0,28; 0,74 и 0,56 мкВт/см^2, длительность облучения 1 минута). Несмотря на то, что эффект в работе [66] получен при воздействии ТГц излучения на одной частоте - 0.06 ТГц, он не может однозначно трактоваться, так как было получено, как блокирование, так и усиление потенциала действия. Следовательно, эффект от воздействия

ТГц излучения скорее определяется дозой облучения, нежели применяемой частотой излучения [159].

3.4. Экспериментальное исследование спектральных характеристик и оптических свойств нервных клеток

3.4.1. Экспериментальный анализ спектральных характеристик нервных клеток в ТГц диапазоне частот

Для получения спектров отражения был использован импульсный ТГц спектрометр в режиме отражения, описанный в разделе 2.2. Сигнал обрабатывался при помощи функции аподизации Хаппа-Гензеля. Усредненный по трем образцам спектр отражения нервных клеток представлен на рисунке 3.7.

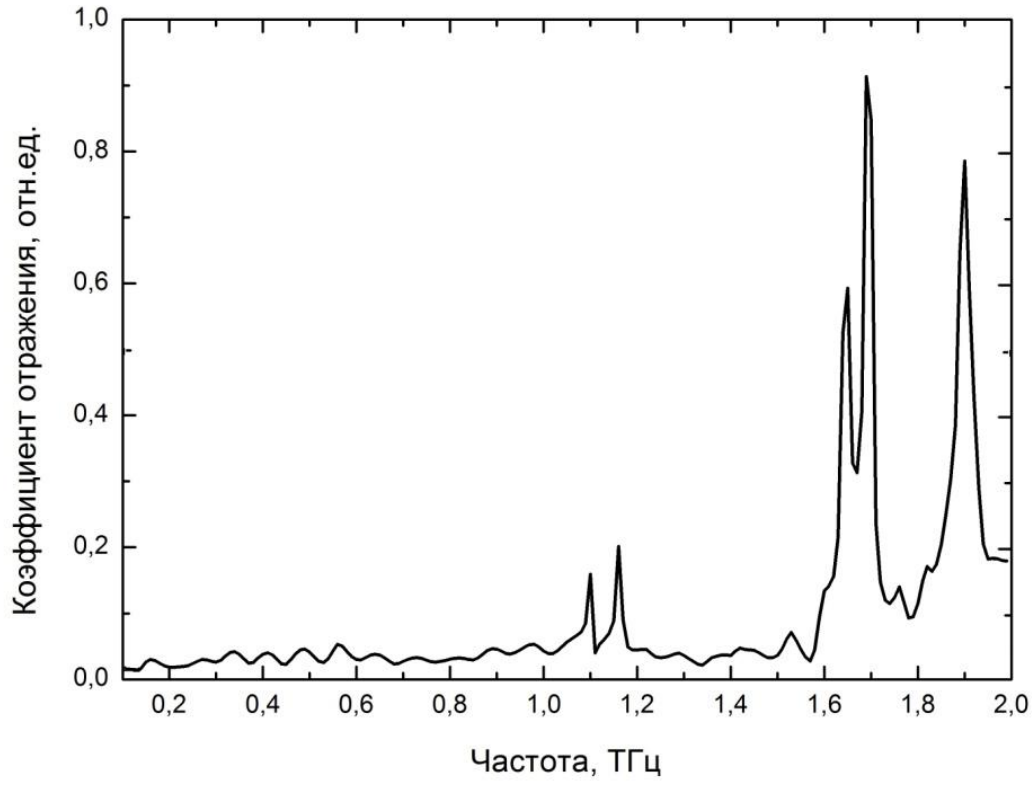


Рисунок 3.7 - ТГц спектр коэффициента отражения ганглия (эксперимент)

3.4.2. Метод расчёта оптических свойств нервных клеток

3.4.2.1. Модель эксперимента и формулы

Для расчёта дисперсий показателя преломления и коэффициента поглощения, и глубины проникновения излучения в объект был выбран метод детектирования отражения излучения от объекта с опорным диэлектриком [160, 161].

Суть метода заключается в том, что происходит измерение отражённого сигнала от биологического образца, расположенного после опорного диэлектрика с известной дисперсией показателя преломления. В результате временная форма ТГц сигнала содержит два пика – отражение от границы воздух/опорный диэлектрик и отражение от границы опорный диэлектрик/клетки (Рисунок 3.8). Затем для каждого из пиков отдельно проводится быстрое преобразование Фурье.

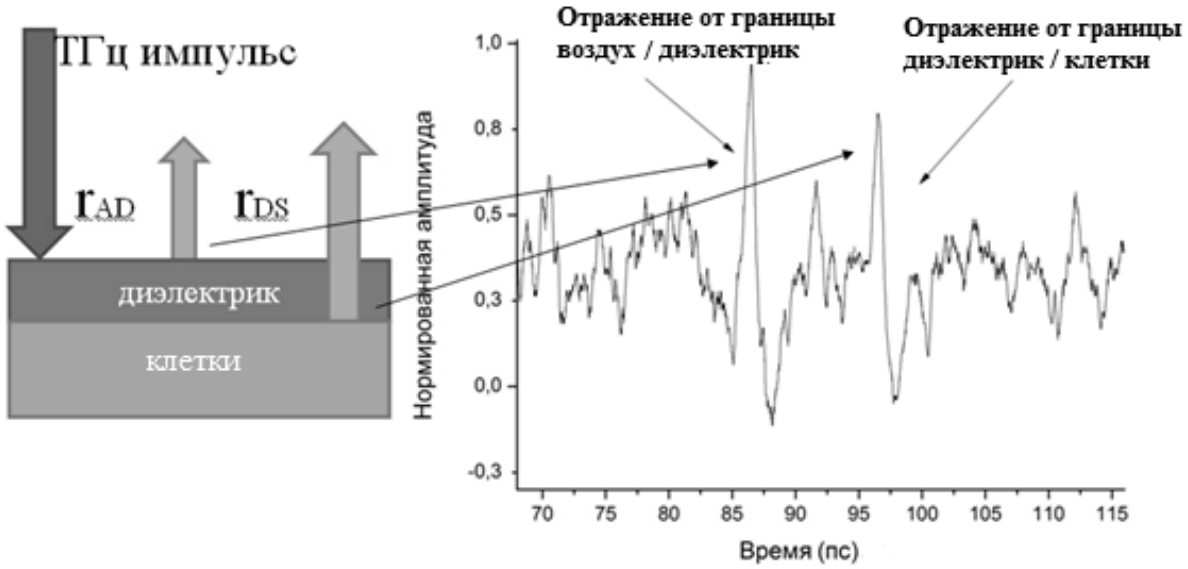


Рисунок 3.8 - Метод детектирования отражения излучения от объекта с опорным диэлектриком. r_{AD} - отражение от границы воздух/опорный диэлектрик, r_{DS} - от границы опорный диэлектрик/клетки

Отношение спектров комплексных амплитуд отражений от границы раздела опорный диэлектрик/клетки $\hat{E}_S(\nu)$ и воздух/опорный диэлектрик $\hat{E}_D(\nu)$ может быть выражено следующим образом:

$$\frac{\hat{E}_S(\nu)}{\hat{E}_D(\nu)} = \frac{t_{AD}\,\hat{r}_{DS}\,t_{DA}}{r_{AD}} \exp\left(i\frac{4\pi n_D d_D \nu}{c}\right), \tag{3.1}$$

где n_D – дисперсия показателя преломления опорного диэлектрика, d_D - толщина диэлектрика. t_{DA}, t_{AD}, r_{AD}, $\hat{r}_{DS}$ - коэффициенты пропускания и отражения Френеля, нижние индексы указывают на исследуемые среды: воздух (A), диэлектрик (D), слой нервных клеток (S). Коэффициенты Френеля для опорного диэлектрика и воздуха считаются действительными, так как в сухом воздухе и диэлектрике отсутствует поглощение ТГц импульса.

Дисперсия комплексного показателя преломления слоя клеток может быть выражена следующей формулой: $\hat{n}_S = n'_S - jn_S''$. Из выражения (3.1) получены следующие формулы для расчёта дисперсии мнимой и действительной частей показателя преломления слоя клеток:

$$n'_S = \frac{n_D(1-R^2)}{1+R^2+2R\cos\theta}, \tag{3.2}$$

$$n''_S = n_D \frac{-2R\sin\theta}{1+R^2+2R\cos\theta}. \tag{3.3}$$

Также из выражения (3.1) получено выражение для дисперсии коэффициента поглощения излучения в слое нервных клеток:

$$\alpha_S = \frac{4\pi\upsilon n_D}{c} \frac{-2R\sin\theta}{1+R^2+2R\cos\theta}. \tag{3.4}$$

Глубина проникновения излучения в слой клеток выражена следующим отношением:

$$\delta = \frac{1}{\alpha_S}. \tag{3.5}$$

Когда толщина и показатель преломления опорного диэлектрика известны, то амплитуда R и фаза θ коэффициента отражения Френеля от границы раздела опорный диэлектрик/клетки могут быть получены экспериментально. В данной работе в качестве материала опорного диэлектрика использовался полистирол. Так как $\mu = 1$, действительная и мнимая части диэлектрической проницаемости слоя клеток ($\hat{\varepsilon} = \varepsilon' - j\varepsilon''$) рассчитываются, принимая что $\hat{\varepsilon} = \hat{n}^2$.

3.4.2.2. Расчёт дисперсии показателя преломления опорного диэлектрика

Из формулы (3.1) получено выражение для частотной дисперсии показателя преломления опорного диэлектрика:

$$n_D = \frac{2 - R_E + 2\sqrt{1 - R_E}}{R_E} n_A, \qquad (3.6)$$

где R_E - отношение спектров комплексных амплитуд отражений от границы раздела опорный диэлектрик/клетки $\hat{E}_S(\nu)$ и воздух/опорный диэлектрик $\hat{E}_D(\nu)$, n_A - показатель преломления воздуха.

Толщина диэлектрика составляет 0,983 мм. На частоте υ=0,5 ТГц значение n_D=1,62. Кроме того, было получено не только одно среднее значение показателя преломления, но также его частотная дисперсия (Рисунок 3.9).

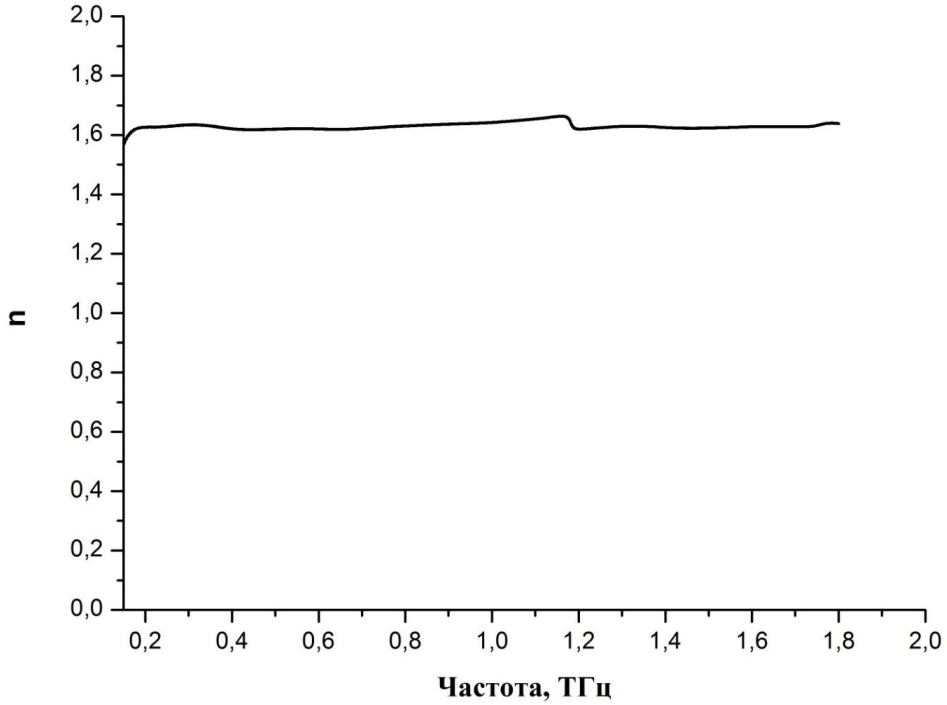


Рисунок 3.9 - Частотная дисперсия показателя преломления опорного диэлектрика

3.4.2.3. Результаты расчётов оптических свойств нервных клеток

Для нервных клеток были рассчитаны дисперсии: показателя преломления (Рисунок 3.10), диэлектрической проницаемости (Рисунок 3.11), коэффициента поглощения и глубины проникновения ТГц излучения (Рисунок 3.12).

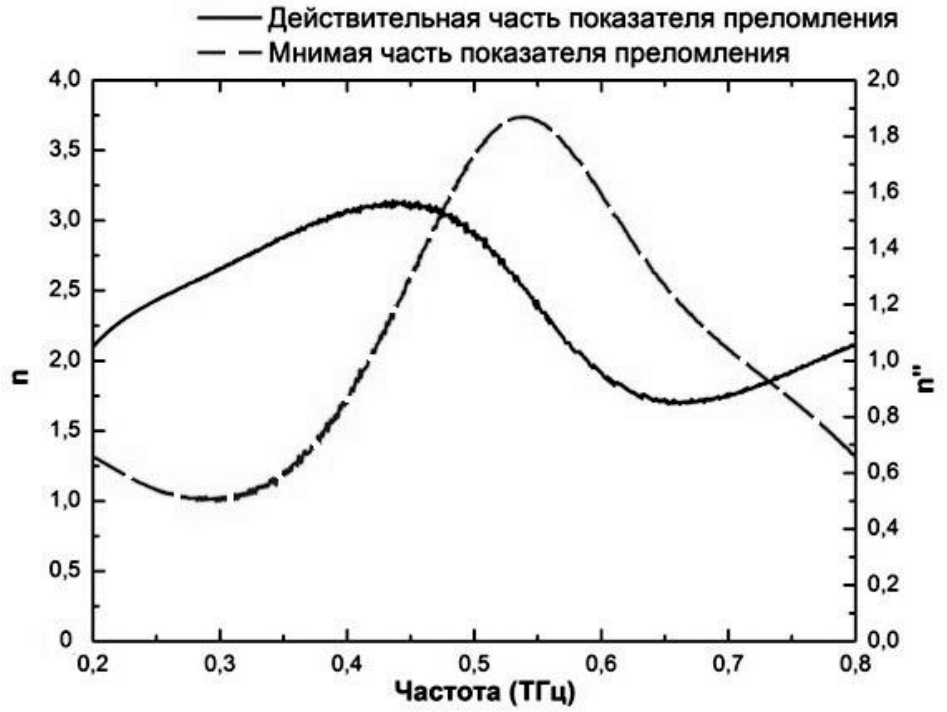


Рисунок 3.10 - Действительная и мнимая части показателя преломления нервных клеток

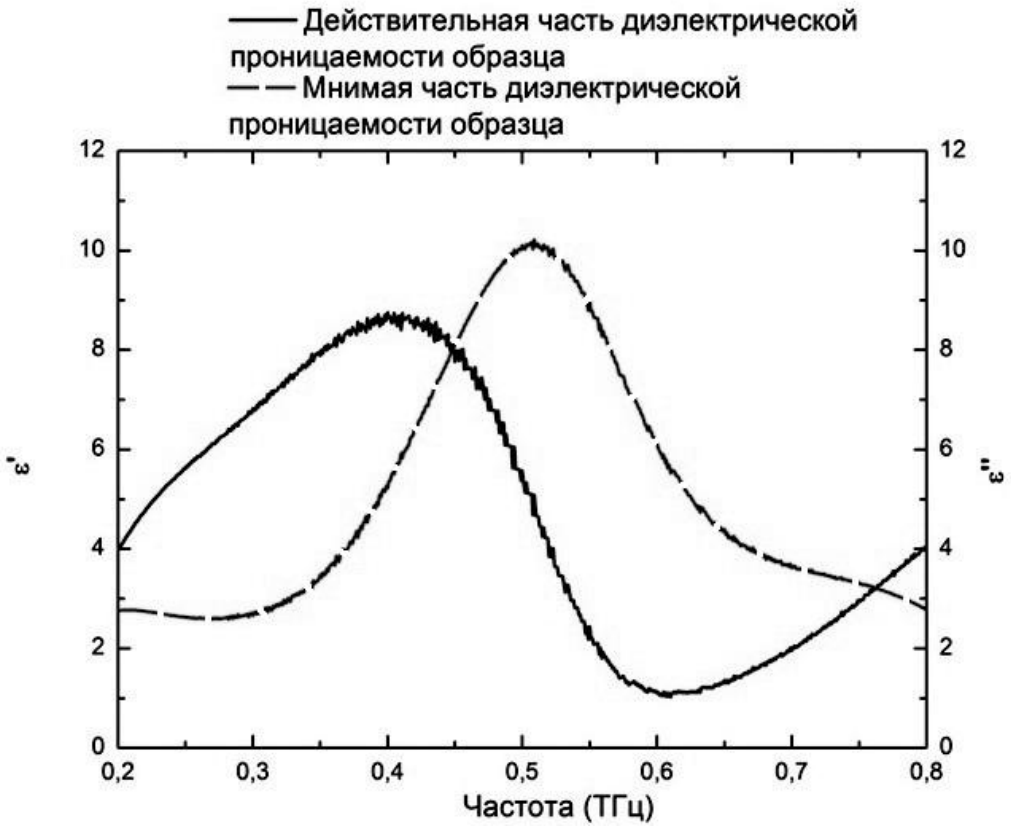


Рисунок 3.11 - Действительная и мнимая части диэлектрической проницаемости нервных клеток

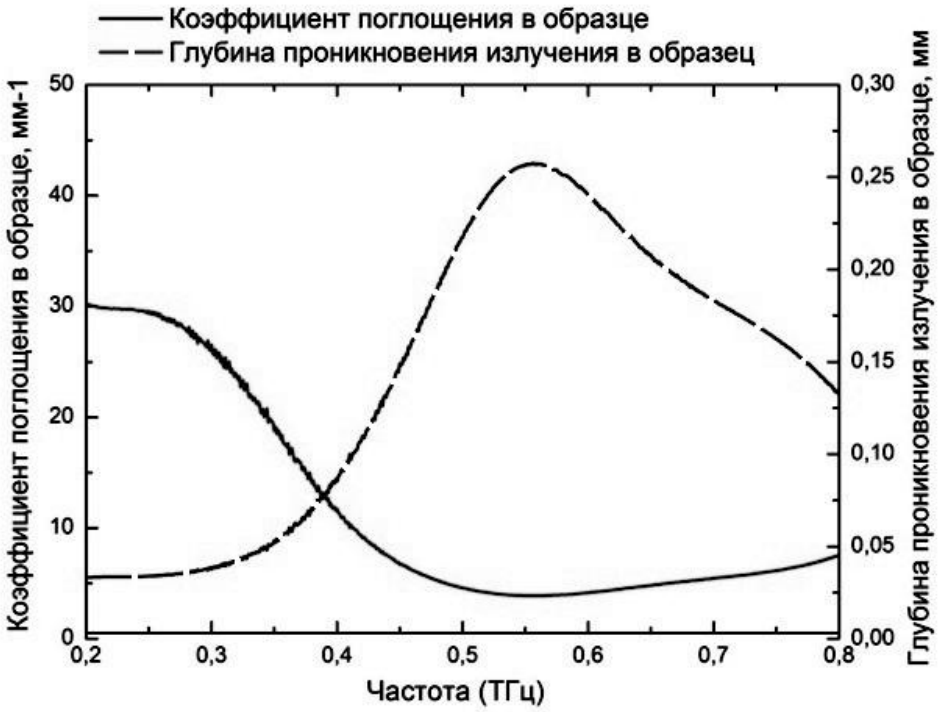


Рисунок 3.12 - Коэффициент поглощения и глубина проникновения излучения в нервные клетки

Таким образом, показано, что максимум коэффициента поглощения нервных клеток, равный 43 мм$^{-1}$, приходится на частоту 0,55 ТГц. В этом же диапазоне распределена основная мощность генерируемого ТГц сигнала. В работе [135] был измерен коэффициент поглощения нерва, изъятый при сосудистой хирургии. Его значение для 0,55 ТГц составляло порядка 175 см$^{-1}$, что соответствует 17,5 мм$^{-1}$. Эти значения одного порядка, а различие в них обусловлено разным типом нервной ткани.

3.5. Численное моделирование спектральных характеристик нервных клеток методом конечных разностей во временной области

3.5.1 Метод конечных разностей во временной области

В данной работе было проведено 3D численное моделирование экспериментально исследуемых структур в программе CST Microwave Studio. Расчет в программе реализуется через метод пространственной

дискретизации – метод конечных разностей во временной области (Finite Difference Time Domain, FDTD).

Метод конечных разностей во временной области [162] использует в своей основе центрально – разностную дискретизацию уравнений Максвелла во времени и пространстве, позволяющую рассчитывать взаимодействия электромагнитных волн с трехмерными объектами. Для расчетов пространство задачи разбивается на элементарные ячейки. На рисунке 3.12 представлен пример такой ячейки компонентами поля E и H на гранях, который иллюстрирует связь между компонентами поля в уравнениях Максвелла.

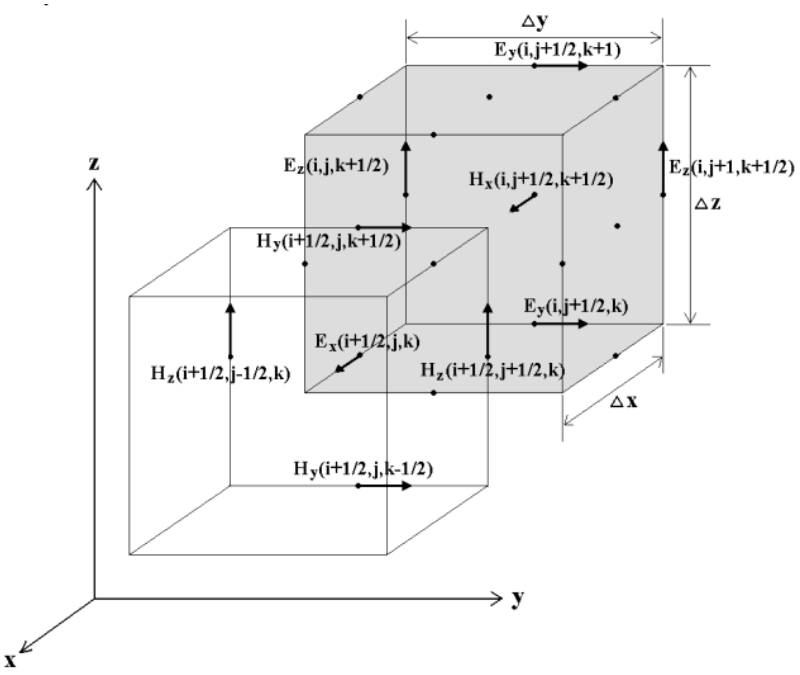


Рисунок 3.12 - Относительное расположение векторов электрического и магнитного полей в элементарной ячейке пространства [163]

Размер пространственной сетки разбиения выбирается таким образом, чтобы электромагнитное поле вблизи элемента разбиения изменялось незначительно. Поэтому размер сетки составляет обычно порядка доли длины волны. Так как в нашем случае длина волны варьируется от 150 до 3000 мкм, минимальный размер сетки был выбран на уровне 1,16 мкм, а

максимальный – 11,05 мкм. В связи с тем, что само пространство задачи различно по однородности моделируемых структур, разброс размеров определялся необходимостью точности расчета в конкретной точке пространства. Пример такого разбиения для модели гидратированных клеток представлен на рисунке 3.13.

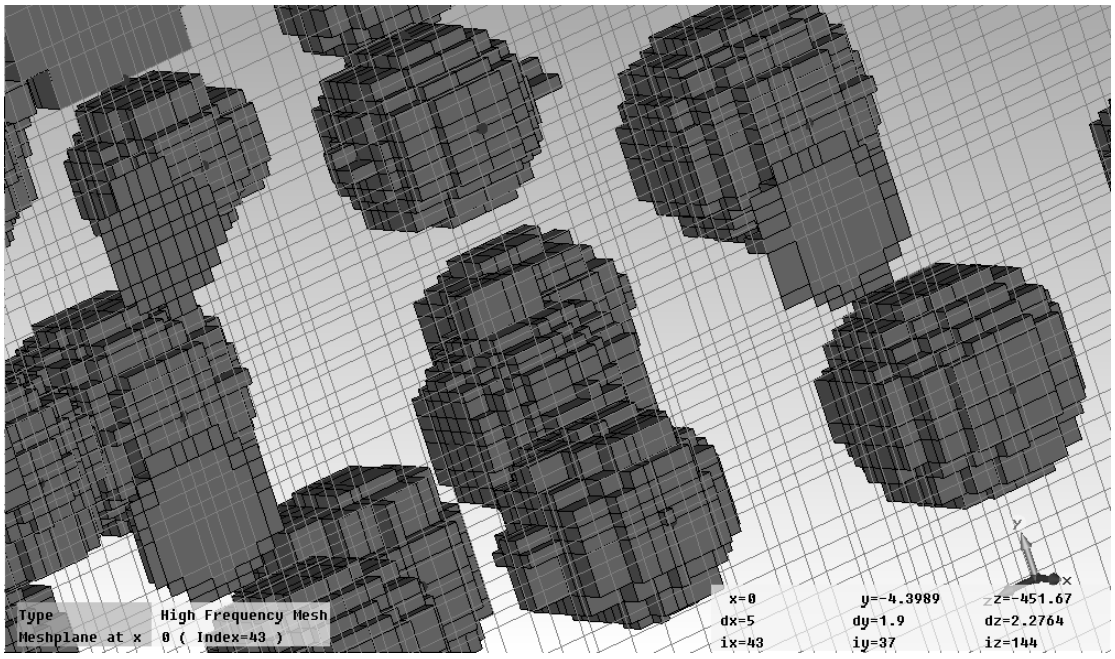


Рисунок 3.13 - Пространственная сетка разбиения в области расчета модели гидратированных клеток

Распределение значений диэлектрической или магнитной проницаемости материалов по частоте определяло микроприроду материалов. Необходимый нам частотный диапазон 0,1-2 ТГц задавался импульсом, представленным на рисунке 3.14.

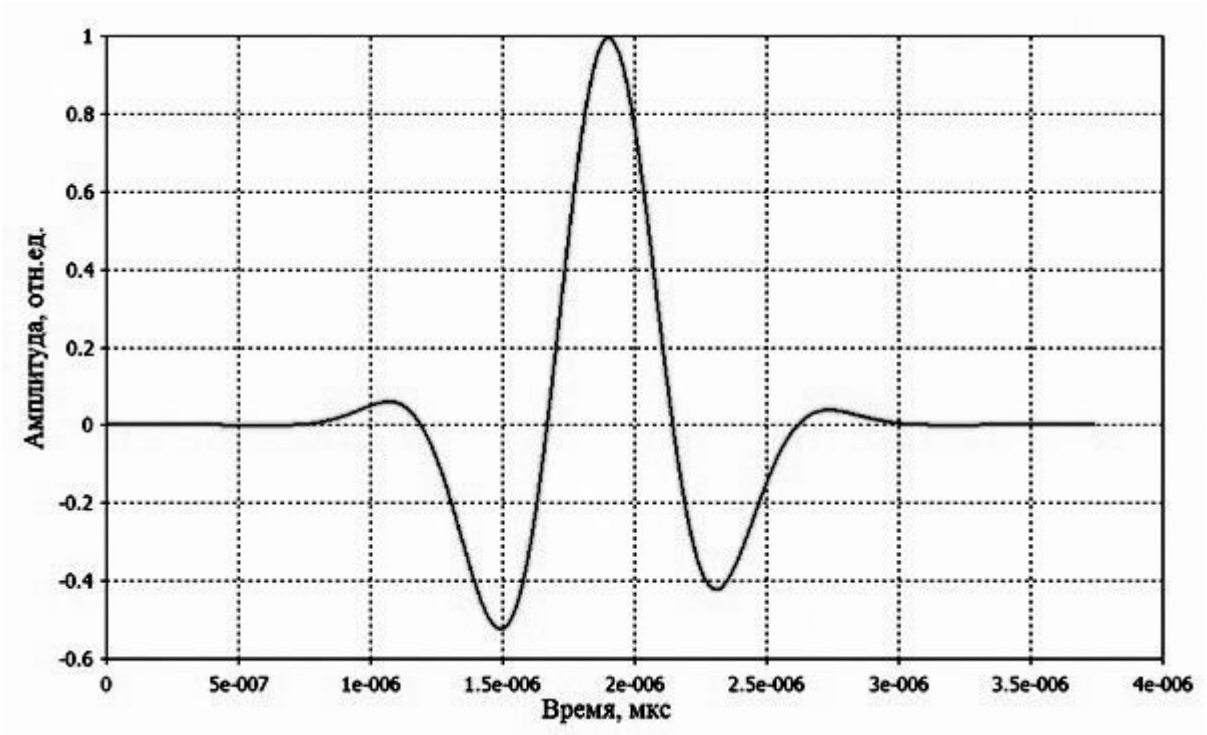


Рисунок 3.14 - Временная форма ТГц сигнала для диапазона 0,1-2 ТГц в программе CST Microwave studio

3.5.2. Моделирование нервных клеток

Нервные клетки были смоделированы, как гидратированные структуры, вследствие повышенного процентного содержания в них воды (78 %). Дисперсия диэлектрической проницаемости воды, которая использовалась в моделировании, показана на рисунке 3.15 [160, 164].

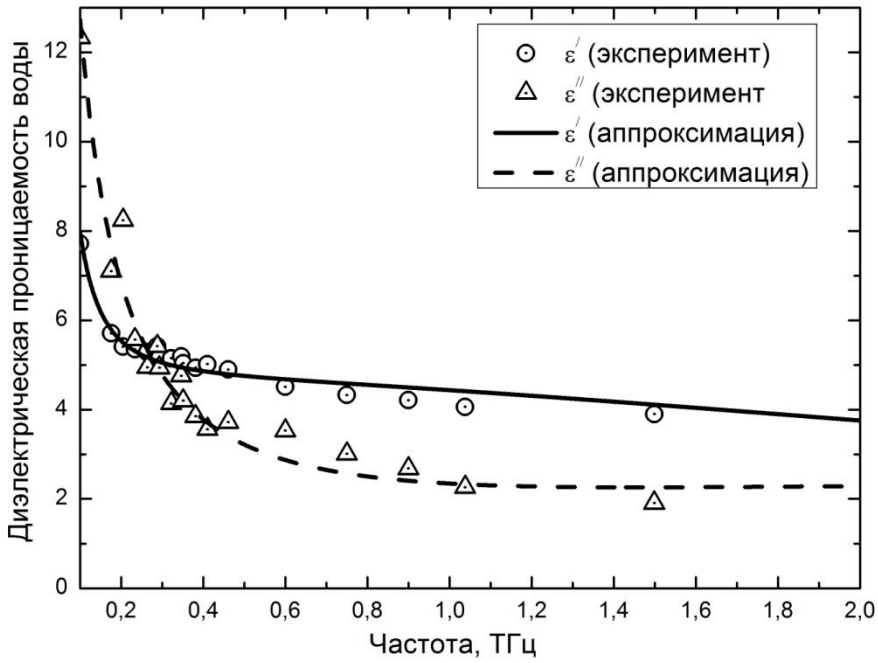


Рисунок 3.15 – Дисперсия диэлектрической проницаемости воды

Были рассмотрены две структуры: 1) двухслойная структура: подложка / слой гидратированного биологического объекта (Рисунок 3.16а); 2) подложка / биологический объект из гидратированных сферических частиц (Рисунок 3.16б).

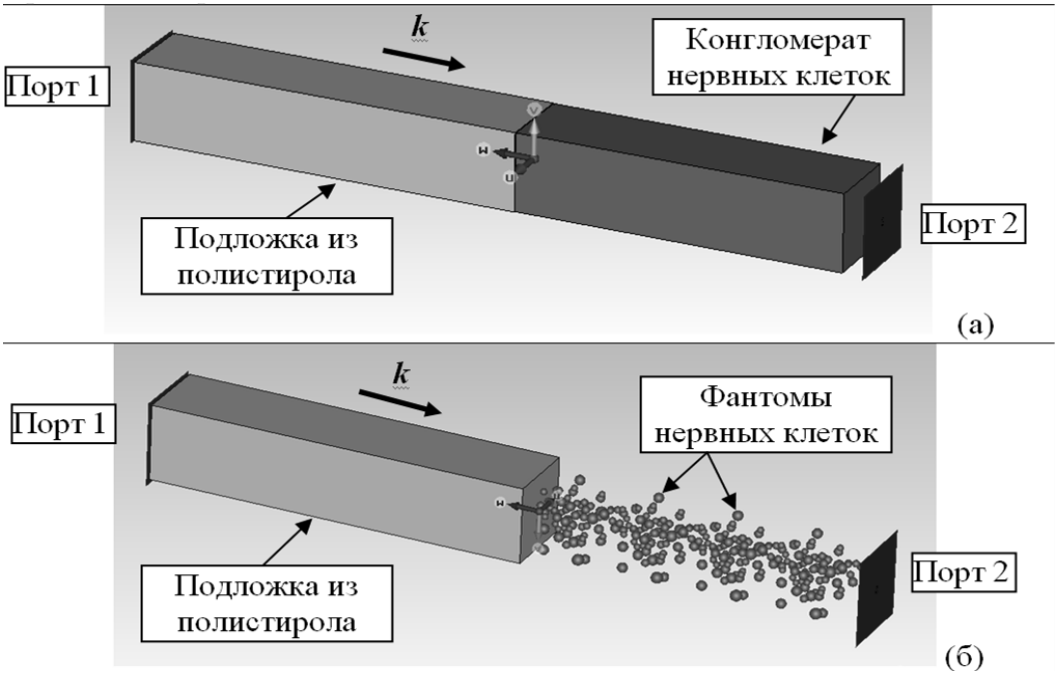


Рисунок 3.16 – Модель исследуемого объекта в программной среде CST Microwave Studio а) подложка / слой гидратированного биологического объекта; б) подложка/ биологический объект из гидратированных сферических частиц [153]

Модель ганглия была смоделирована в виде скопления фантомов нервных клеток, которые благодаря большим размерам, вносят основной вклад в спектральные характеристики биологического объекта. Шванновские и глиальные клетки не учитывались в моделировании. Нервные клетки были представлены в виде хаотически расположенных сферических резонаторов диаметром d = 17 – 22 мкм. Конгломерат клеток имел толщину h = 800 мкм и был расположен на подложке из полистирола (ε = 4,326) [165] с толщиной l = 950 мкм. Исследуемая структура в свободном пространстве возбуждалась плоской электромагнитной волной в частотном диапазоне 0,1 – 2 ТГц. В связи с тем, что размеры мембраны (толщина 0,01 мкм) и ядра (диаметр 1 мкм) не сопоставимы с длиной волны терагерцового диапазона, различные органеллы нервных клеток не учитывались в моделировании. Биологический объект находился между двумя портами: излучатель (порт 1) и приёмник (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 исследования влияния размеров нервных клеток на спектр отражения были смоделированы структуры с тремя распределениями клеток по диаметрам: 20 до 30 мкм, от 20 до 40 мкм и от 20 до 50 мкм. Распределение клеток по диаметрам, D, в каждом диапазоне предполагалось нормальным с плотностью вероятности:

$$f(D) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{(D - \bar{D})}{2\sigma^2} \right], \tag{3.7}$$

где $\bar{D}$ - среднее значение диаметра клеток, σ - стандартное отклонение. В каждом указанном диапазоне значения диаметров задавались с помощью генератора случайных чисел. Результаты распределения количества клеток по диаметру представлены на рисунке 3.17.

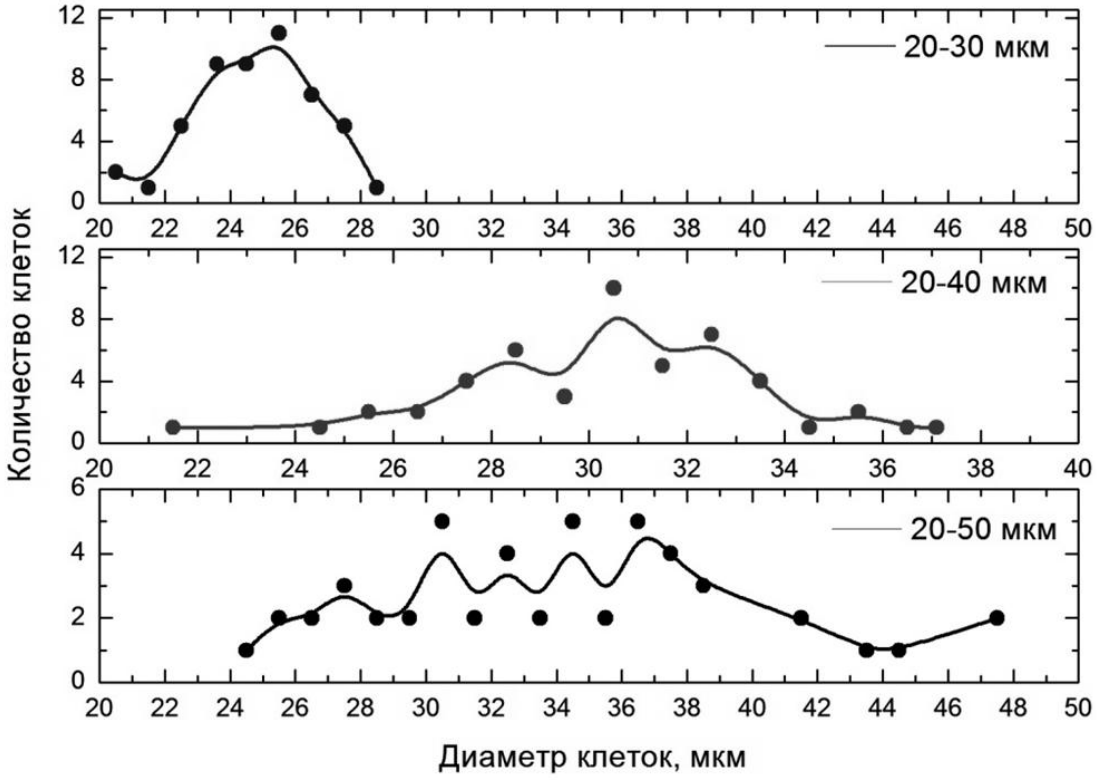


Рисунок 3.17 - Функция распределения клеток по диаметрам [153]

3.5.3. Результаты моделирования

Спектральные линии на частотах 0,41; 0,49; 0,56; 0,64 ТГц, полученные экспериментально, с некоторым сдвигом хорошо согласуются с пиками коэффициента отражения на частотах 0,423; 0,474; 0,544, 0,600 и 0,710 ТГц, полученными в численном моделировании двухслойной структуры подложка-слой гидратированного биологического объекта (Рисунок 3.18). Они связаны с размерными резонансными эффектами на оптической длине структуры. Спектральные особенности на частотах выше 0,80 ТГц в численном моделировании также связаны с резонансами Фабри–Перо на толщине исследуемой структуры для случая слабой дисперсии комплексной диэлектрической проницаемости воды (Рисунок 3.15).

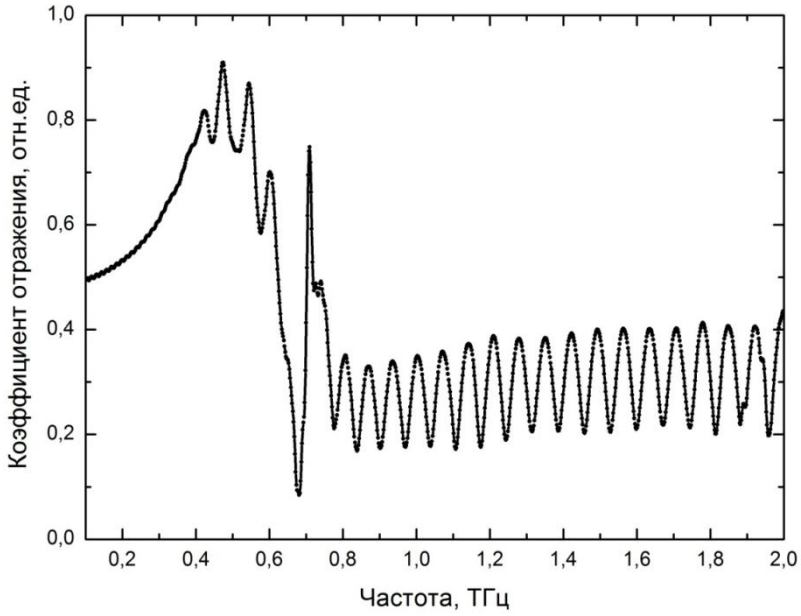


Рисунок 3.18 - Численно смоделированный ТГц спектр коэффициента отражения двухслойной структуры подложка-объект

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 (Рисунок 3.19). Эти спектральные

особенности могут быть вызваны размерными резонансными эффектами на нервных клетках и не связаны с межмолекулярными взаимодействиями гидратированных компонент клетки.

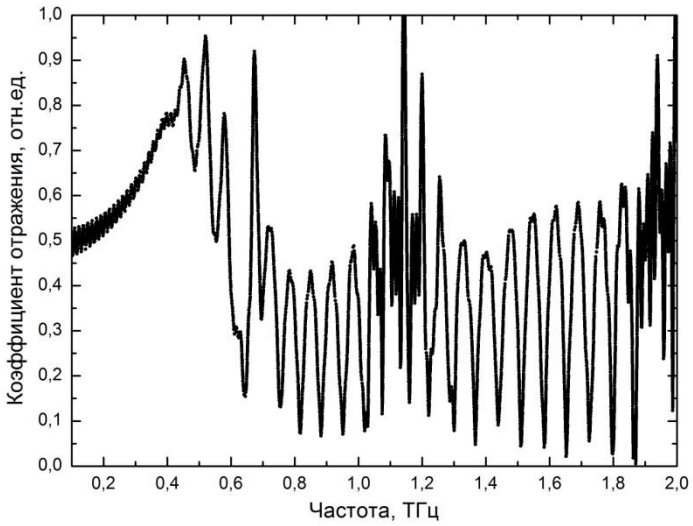


Рисунок 3.19 - Численно смоделированный спектр коэффициента отражения двухслойной структуры подложка-объект с геометрическими свойствами ганглия

Для выяснения причины возникновения этих пиков были смоделированы спектры отражения ганглий с разным распределениями нервных клеток по диаметрам: 20 - 30 мкм, 20 - 40 и 20 - 50 мкм (Рисунок 3.20). При изменении функции распределения диаметров клеток заметно смещение резонансных пиков в спектре коэффициента отражения, что подтверждает размерные эффекты на нервных клетках. В спектре отражения для клеток с распределением диаметров 20 - 30 мкм появляются резонансы в диапазоне частот 1,65 - 1,75 ТГц, которые хорошо согласуются с экспериментальным спектром.

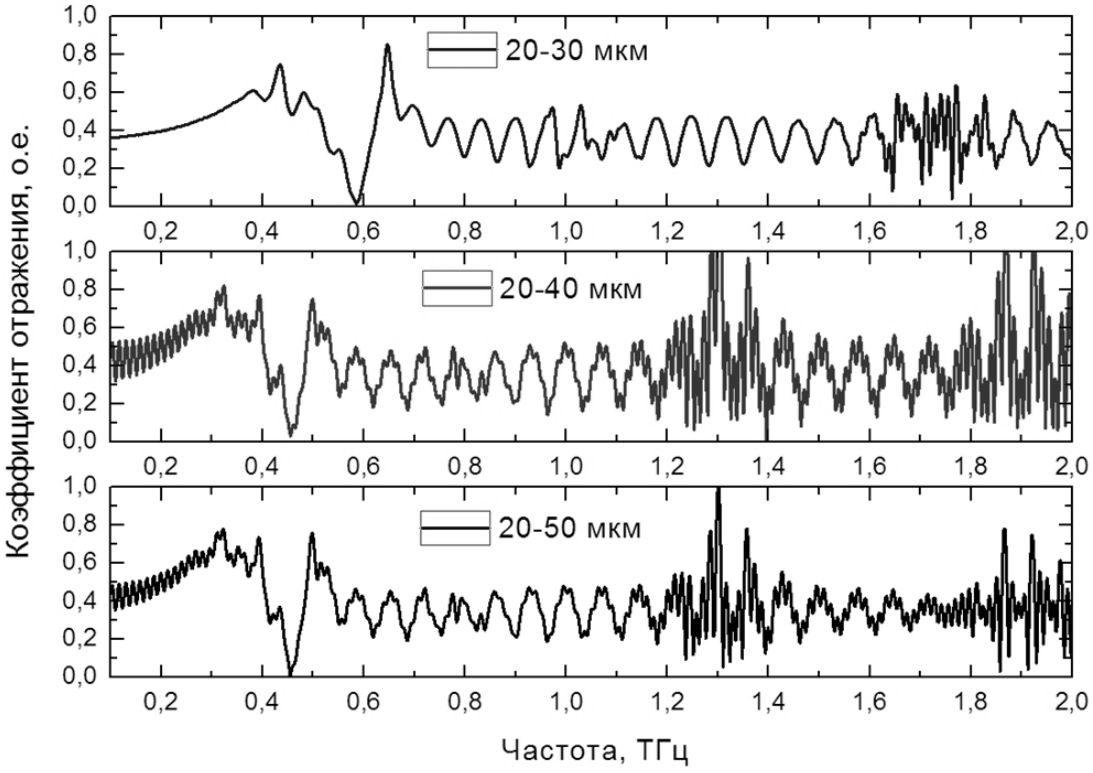


Рисунок 3.20 - Численно смоделированные ТГц спектры коэффициента отражения нервных клеток с размерами 20 - 30 мкм, 20 - 40 и 20 - 50 мкм

Пики на частотах 1,65 и 1,69 ТГц, полученные в эксперименте, вызваны резонансными размерными эффектами на клетках с диаметрами от 20 до 30 мкм (Рисунок 3.20).

3.5.4. Сравнительный анализ результатов спектров отражения, полученных численно и экспериментально

Анализируя спектры коэффициента отражения исследуемых биообъектов можно определить механизмы эффектов, которые могут быть получены на различных частотах. Путем сравнительного анализа спектральных линий из эксперимента на частотах 1,11; 1,67 и 1,80 ТГц, где коэффициент отражения минимален, с пиками поглощения воды (Таблица 3.1), можно утверждать, что на этих частотах биологический эффект будет обусловлен поглощением излучения водой.

Таблица 3.1 - ТГц частоты спектральных линий поглощения воды [166-168]

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	1,795	

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 с низким отражением 1,2 - 1,6 ТГц и до 1 ТГц влияние вызвано высоким поглощением излучения [153].

Заключение к 3 главе

В данной главе было продемонстрировано стимулирующее воздействие ТГц импульсного излучения на рост нейритов сенсорных ганглий, которое имеет дозозависимый эффект и достигает максимума при плотности мощности ТГц излучения 0,872 мкВт/см^2. На основе сравнительного анализа спектров отражения нервных клеток выявлены механизмы его влияния, полученных в эксперименте и численном моделировании в программном пакете CST Microwave Studio в диапазоне частот от 0,1 до 2 ТГц:

1) в диапазонах частот от 0,1 до 1 ТГц и от 1,2 до 1,6 ТГц явно выражен механизм воздействия, связанный с поглощением излучения;

2) на частотах 1,10; 1,16; 1,65 и 1,69 ТГц обнаружен размерный резонансный эффект влияния, связанный с возникновением стоячих волн в биологическом объекте.

Так как основная мощность ТГц импульса распределена в диапазоне частот от 0,20 до 1,10 ТГц, следовательно, основной вклад во влияние импульсного излучения на нейриты вносит поглощение 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 непрерывными источниками ТГц излучения большой мощности для активизации их роста. Подробное описание данного исследования приводится в работе автора [153].

ГЛАВА 4. Исследование спектров ДНК методами терагерцовой спектроскопии

Спектральный анализ различных биомолекул позволяет получить огромный массив данных об их строении, функционировании и взаимодействии, являясь ценным источником диагностической информации о молекулярно-биологических и клеточных процессах.

Спектры поглощения макромолекул в диапазоне терагерцовых частот формируются благодаря коллективным диэлектрическим взаимодействиям групп атомов, которые образуют отдельные домены либо молекулу в целом. Поэтому любые изменения спектральных профилей являются отражением структурных конформационных изменений макромолекул. Ряд исследователей отмечают, что спектры поглощения веществ являются специфичными в зависимости от их конформационных и стереометрических характеристик в терагерцовом диапазоне частот [169].

В частности, спектроскопические исследования нуклеотидов и нуклеозидов — мономеров ДНК — показывают, что каждое из азотистых оснований имеет свои особенности, выраженные в различных коэффициентах отражения и поглощения в твердой фазе в диапазоне 0,5-3,5 ТГц [170]. Различаются также спектральные характеристики искусственно синтезированных одно- или двухцепочечных молекул ДНК [171]. Графики поглощения для разных образцов ДНК имеют достоверно значимые отличия даже при слабом спектральном разрешении, а использование более современных моделей спектрометров позволяет четко различать спектры ДНК в зависимости от их мономерного состава [172].

В ТГц диапазоне частот располагаются линии поглощения как вращательно-колебательных переходов в группах взаимодействующих атомов, принадлежащих одной макромолекуле, так и линии поглощения,

которые соответствуют дальнодействующим взаимодействиям. Так, в спектре поглощения образцов ДНК выделяются колебательные моды электронов, связанные с топологическим напряжением спиральной молекулы и растяжением водородных связей между азотистыми основаниями при взаимном движении разнонаправленных цепочек ДНК [173]. Поэтому спектральный анализ ДНК может сказать многое о ее конформационной и топологической структуре, в том числе трехмерной, из чего можно сделать выводы о степени пространственной укладки и, следовательно, функциональной активности определенных участков. Спектроскопия в диапазоне терагерцовых частот весьма полезна, если нужно получить информацию о взаимодействии различных атомных групп, связанных жесткими ковалентными связями внутри группы и слабыми, прежде всего водородными — между собой.

Поскольку структура биологических макромолекул (нуклеиновых кислот, белков, витаминов и гормонов) самым радикальным образом влияет на их функциональность, такая информация представляется весьма ценной для определения особенностей клеточных процессов. В связи с этим, исследование спектров ДНК с целью определения ее собственных частот является несомненно актуальной задачей. Комбинация широкополосных спектрометров на основе фемтосекундных лазеров и спектрометров с использованием прецизионных источников, позволяет наиболее эффективно изучать спектры сложных молекул и продвинуться в применении ТГц спектроскопии для реальных задач [174].

4.1. Описание методики получения и пробоподготовки образцов ДНК

Для проведения исследований использовалась деградированная ДНК сельди (Канада) в виде сухого порошка. ДНК сельди – один из самых распространенных объектов исследования, что позволяет сопоставлять полученные данные с известными данными из литературы. Образцы ДНК приготовлялись в виде пленок на двух различных подложках

(полиэтиленовой и кварцевой), которые обеспечивали хорошее пропускание в ТГц диапазоне. В качестве растворителя использовались ректифицированный этиловый спирт и дистиллированная вода. Порошок ДНК смешивался в различных концентрациях с растворителем (0,05 г/мл, 0,25 г/мл, 1 г/мл) и помещался на подложку, где оставался высыхать (в атмосферных условиях) до появления твердой пленки [175].

Методика проведения измерений заключалась в приготовлении образцов, затем измерении спектра подложки без образца. Для этого подложка очищалась ректифицированным спиртом, промывалась в дистиллированной воде и после высушивалась. Далее проводилось измерение спектра образцов ДНК. Для проверки воспроизводимости результатов регистрация спектра для каждого образца проводилась три раза.

Для проведения исследований на прецизионном спектрометре на основе синтезатора частоты на лампах обратной волны и высокодобротного резонатора образцы ДНК приготовлялись в растворе с дистиллированной водой в полиэтиленовых банках. Для эксперимента были использованы два образца с массой ДНК 0.5 г и 1,7 г в растворе с 20 мл. воды (0,025 и 0,085 г/мл соответственно).

4.2. Описание методики импульсной терагерцовой спектроскопии

Первым этапом работы стало измерение спектра ДНК с помощью спектрометра на основе фемосекундного лазера, что позволило получить общую картину спектра и определить области выраженного поглощения.

Экспериментальная схема представлена на рисунке 4.1. Излучение фемтосекундного иттербиевого-KGW лазера (FL-1, фирма СОЛАР, длительность импульса излучения 160 фс, длина волны излучения 1040 нм, средняя мощность излучения 1 Вт, частота следования имульсов 75 МГц). Это излучение делилось светоделителем СД на два пучка в соотношении 1/100. Мощный пучок через линию задержки шел на полупроводник InAs, размещенный в центре постоянного магнита М (1.8 Тл). После магнита стоял

фильтр Ф, который отсекал излучение накачки. Сгенерированное ТГц излучение, сначала сколлимированное, а затем сфокусированное системой параболических зеркал ПЗ1 и ПЗ2 в кристалл CdTe, где наводило двулучепреломление. Исследуемый образец размещался в терагерцовом пучке между двумя софокусными линзами для возможности измерения малоразмерных образцов. Излучение второго пробного пучка, отразившись от светоделителя и пройдя через поляризатор П и сквозное отверстие в ПЗ2, также падало на кристалл CdTe. Схема измерения двулучепреломления подробно рассмотрена в главе 2.2. Для повышения соотношения сигнала к шуму использовался синхронный усилитель СУ с оптико-механическим модулятором (LIA-MV-150, FEMTO).

Программное обеспечение спектрографом осуществлялось через виртуальный прибор, созданный в среде разработки LabView, который управлял задержкой и процессом измерения и позволял осуществлять запись временного профиля ТГц импульса. Вторым программным пакетом с помощью Фурье-преобразования временной формы импульса рассчитывался спектр излучения. Спектр пропускания образца определялся как модуль разницы между спектром подложки и спектром образца, разделенный на спектр подложки.

Полученное ТГц излучение обладает следующими параметрами: спектральный диапазон 0,1÷2 ТГц, средняя мощность ТГц излучения порядка 50 мкВт, частота следования импульсов 75 МГц, мощность импульса как минимум 200 мВт, длительность импульса 2,5 пс. Схема регистрации установки обеспечивает частотную погрешность меньше 5,5 ГГц [174].

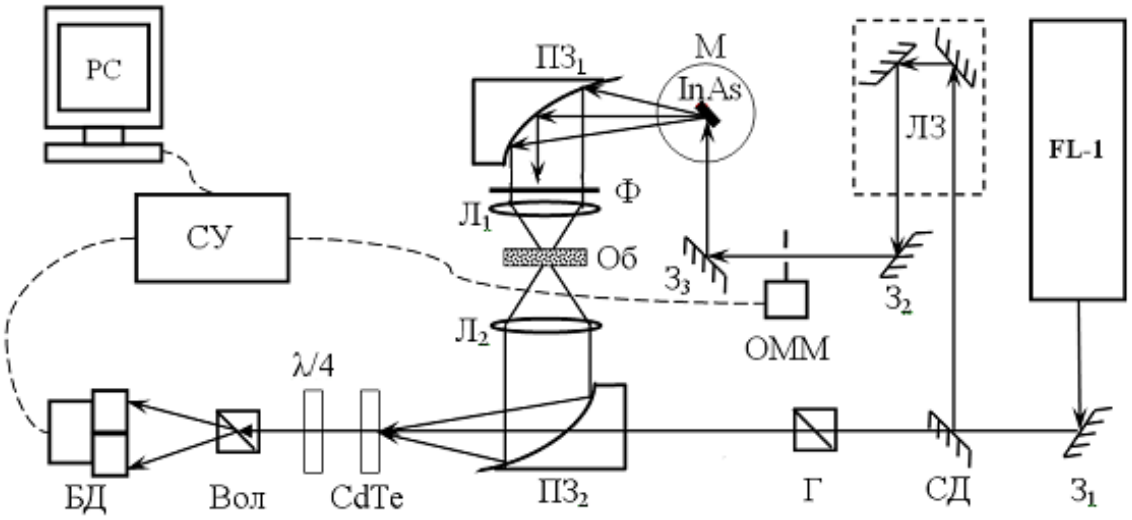


Рисунок 4.1 - Схема ТГц спектрографа TS-5. FL-1 – Yb:KYW лазер фемтосекундных световых импульсов, $З_1$, $З_2$, $З_3$ – плоские зеркала, СД – светоделитель ЛЗ – линия задержки, ОММ – оптико-механический модулятор, InAs – кристалл InAs, М – постоянный магнит, Г – призма Глана, $ПЗ_1$ и $ПЗ_2$ – параболические зеркала, Ф – фильтр, $Л_1$ и $Л_2$ – линзы, Об – объект, CdTe – ЭО кристалл, λ/4 – фазовая пластинка, Вол – призма Волластона, БД – балансный детектор, СУ – синхронный усилитель, PC – компьютер [174]

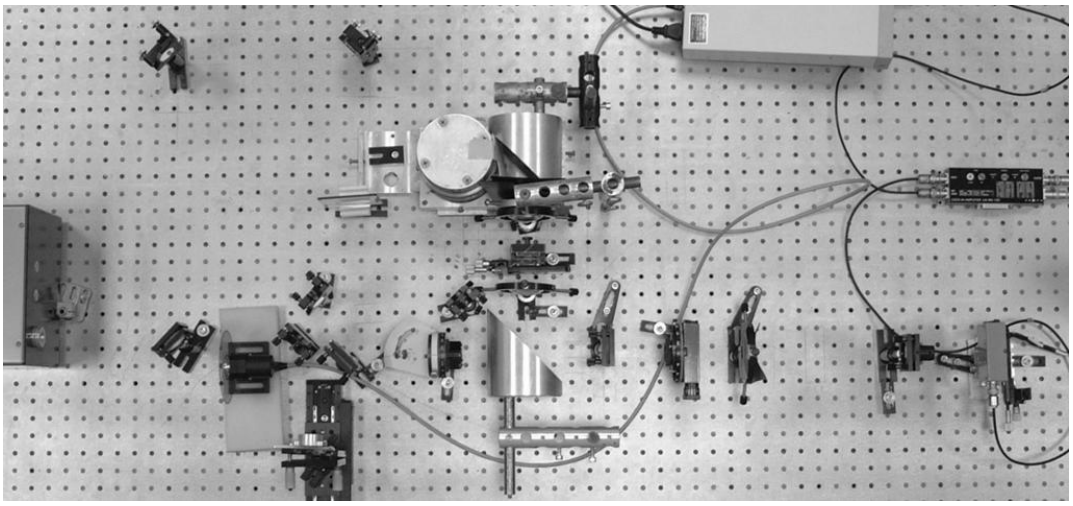


Рисунок 4.2 - Фотография ТГц спектрографа

4.3. Экспериментальное исследование спектральных характеристик ДНК с помощью методики импульсной терагерцовой спектроскопии

Спектры пропускания образцов ДНК (в пленках) на двух подложках (полиэтиленовая, кварцевая), полученные с помощью спектрометра на фемтосекундном лазере, представлены на рисунке 4.3 [174].

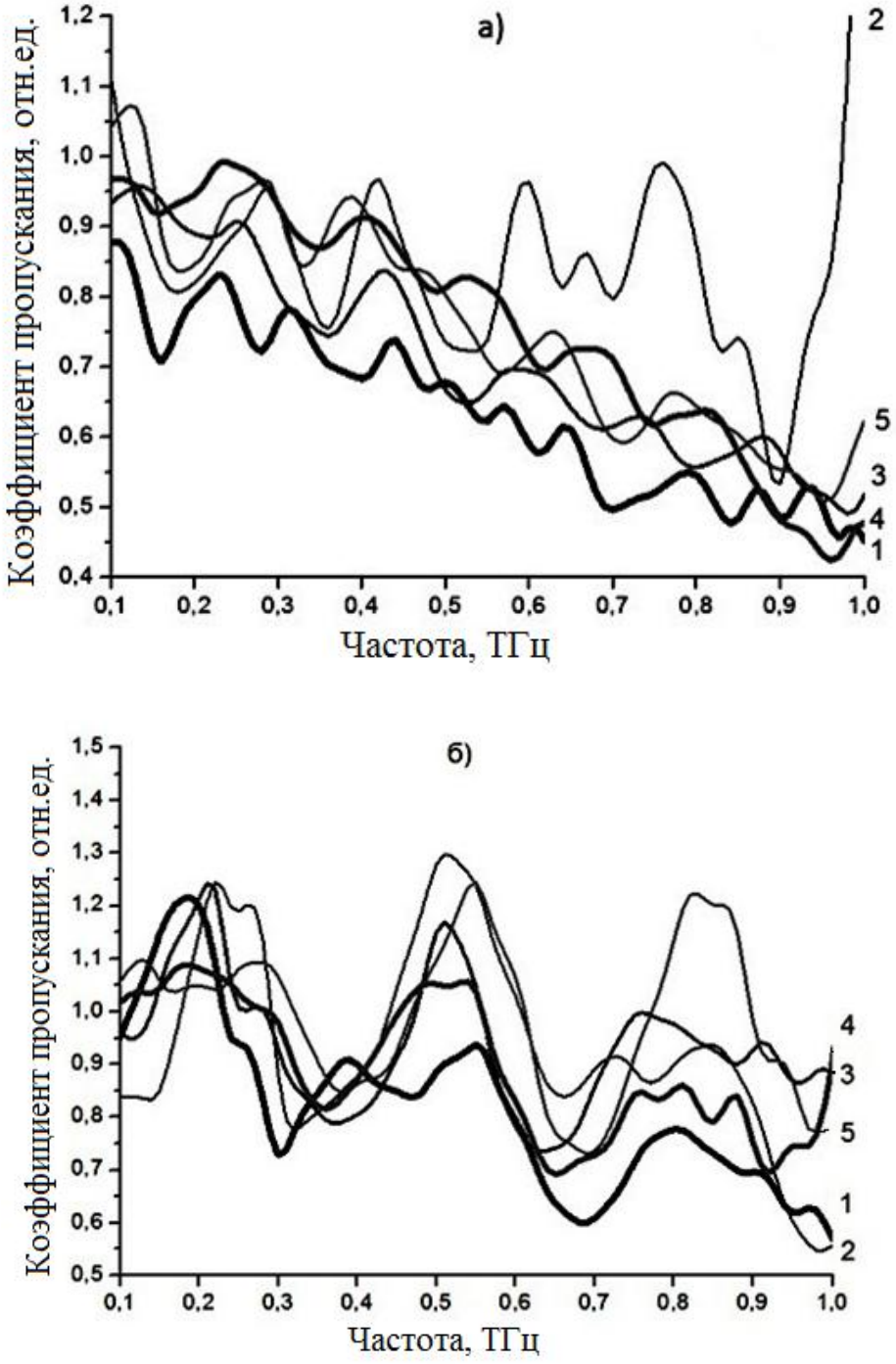


Рисунок 4.3 - Спектры ДНК различной концентрации с использованием различных растворителей, усредненные по трем измерениям: 1 – ДНК в концентрации 1 г/мл, вода в качестве растворителя, 2 – ДНК в концентрации

0,25 г/мл, вода в качестве растворителя, 3 – ДНК в концентрации 0,05 г/мл, вода в качестве растворителя, 4 – ДНК в концентрации 1 г/мл, спирт в качестве растворителя, 5 – ДНК в концентрации 0,05 г/мл, спирт в качестве растворителя; а) полиэтиленовая подложка б) кварцевая подложка [174]

Наиболее интенсивные полосы поглощения образцов ДНК (в пленках), представлены в таблице 4.1.

Таблица 4.1. Зарегистрированные линии поглощения образцов ДНК методом широкополосной ТГц спектроскопии [174]

	Частоты линий поглощения образцов ДНК с водой, ТГц	Частоты линий поглощения образцов ДНК со спиртом, ТГц
Полиэтиленовая подложка	0,159; 0,180; 0,360; 0,401; 0,525 (0,527); 0,549; 0,610; 0,635; 0,687; 0,700	0,159; 0,18; 0,331; 0,350; 0,569; 0,625; 0,710; 0,749
Кварцевая подложка	0,302; 0,321; 0,372; 0,467; 0,630; 0,660; 0,689	0,360; 0,380; 0,655; 0,687

Таким образом, в рабочий диапазон прецизионного спектрометра на ВР попадают шесть полос поглощения: 0,304 ТГц; 0,321 ТГц; 0,331 ТГц; 0,350 ТГц; 0,360 ТГц и 0,372 ТГц [174].

Как и в работе [172] есть некоторые различия в спектрах образцов, полученных с различными материалами подложки, полиэтиленом или кварцем, в частности, в относительной интенсивности отдельных пиков поглощения.

Все наблюдаемые различия в спектрах раствора ДНК на кварцевых и полиэтиленовых подложках были присуждены наличию эффектов

ориентации макромолекул на границе между раствором и подложкой. Результаты [172] показывают, что взаимодействие между ДНК и материалом подложки является значительным и, вероятно, провоцируется зарядами поверхности подложки. Это взаимодействие приводит к тому, первый монослой биомолекул адсорбируется на подложке в конкретных направлениях. Эффекты ориентации вносят значительный вклад в резонансные особенности спектров в ТГц диапазоне частот. Несмотря на эти различия, резонансные частоты наибольших пиков воспроизводятся во всех пленках.

4.4. Описание методики непрерывной терагерцовой спектроскопии

Для того чтобы убедиться в точности результатов, на втором этапе работы с применением прецизионного спектрометра на основе синтезатора частоты на лампах обратной волны (ЛОВ) и высокодобротного резонатора (Рисунок 4.4), обеспечивающего спектральное разрешение менее 10 кГц. Диапазон 0,300-0,375 ТГц был исследован более подробно в Институте физики микроструктур РАН Нижнего Новгорода.

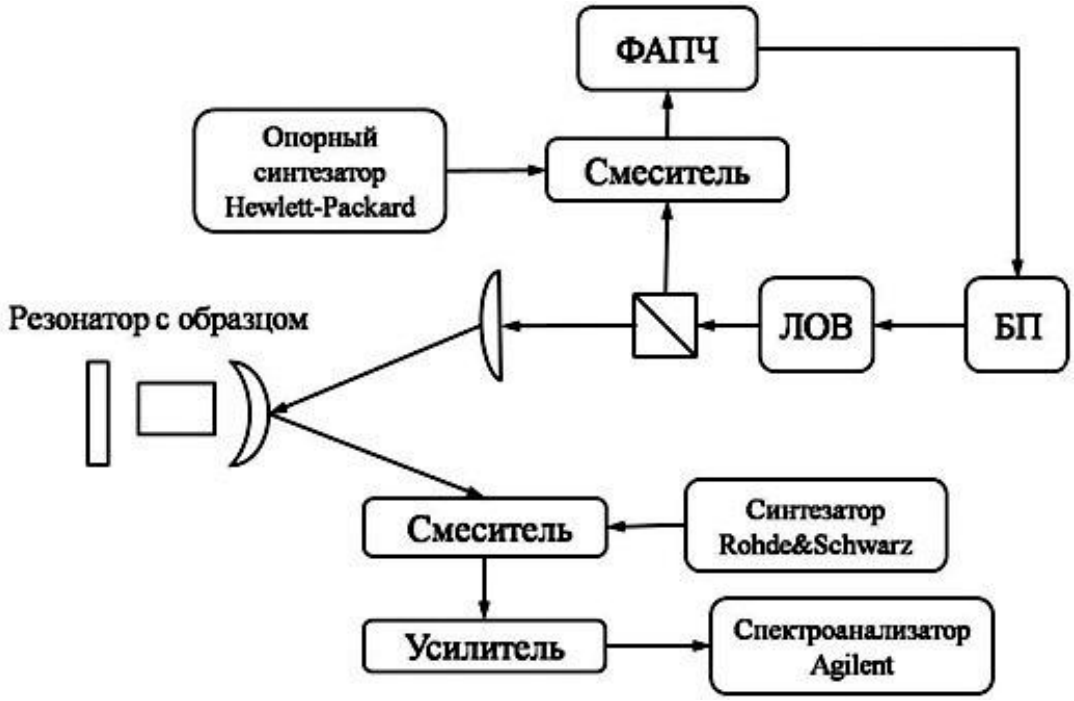


Рисунок 4.4 - Схема экспериментальной установки с использованием высокодобротного резонатора [174]

Синтезатор частоты включает в себя ЛОВ, блок питания и управления частотой ЛОВ, систему фазовой автоподстройки частоты ФАПЧ, состоящую из гармонического смесителя, опорного синтезатора частоты Hewlett-Packard и фазового детектора ФД, а также устройств квазиоптики. Приемная система включает в себя гармонический смеситель, в качестве гетеродина используется синтезатор частоты Rohde&Schwarz.

Сигнал синтезатора, многократно прошедший через образец, выводится через прямоугольное отверстие одного из зеркал резонатора. Далее сигнал подается через волновод на смеситель, к которому подключен синтезатор Rohde&Schwarz. Сигнал промежуточной частоты (ПЧ) через усилитель подается на вход спектроанализатора Agilent.

Одним из эффективных способов повышения чувствительности спектроскопического анализа является применение высокодобротных резонаторов (ВР). Спектральные измерения различных веществ с использованием ВР могут быть выполнены двумя способами: первый из них связан с регистрацией изменения резонансной частоты и добротности резонатора. Второй - основан на регистрации изменения интенсивности и

характеристик затухания излучения (импульсного или непрерывного), прошедшего через ВР, в котором находится образец. При этом, благодаря тому, что используемые резонаторы являются высокодобротными системами, даже небольшое изменение их характеристик (сдвиг резонансной частоты, изменение добротности) за счет присутствия изучаемого образца может быть зарегистрировано в эксперименте. Спектроскопия с использованием ВР хорошо развита в инфракрасном диапазоне и используется для различных приложений [176-178],в том числе, и для анализа биомолекул [179].

Поэтому, ключевым узлом данной установки является высокодобротный резонатор, изготовленный из инваровых стержней, длиной 25 см, и круглых медных зеркал, диаметром 11 см. Инваровый сплав обеспечивает устойчивость резонатора к тепловым нагревам. Добротность резонатора составляет порядка 60 000.

Установим связь между измеряемыми в эксперименте величинами и коэффициентом поглощения образца. Для этого используем простую модель характеристики резонатора:

$$I_1(\omega) = \frac{I_0 / \alpha}{(\omega - \omega_0)^2 + \frac{1}{\alpha^2}}, \qquad (4.1)$$

где I_0- интенсивность падающего на резонатор излучения на частоте ω, ω_0 – резонансная частота резонатора, а параметр α учитывает все потери в резонаторе и фактически определяет его добротность.

При наличии исследуемого образца внутри резонатора в случае малого поглощения можно записать в виде:

$$I_2(\omega) = \frac{I_0 / \varepsilon}{(\omega - \omega_1)^2 + \frac{1}{\varepsilon^2}}, \qquad (4.2)$$

где $\varepsilon=\alpha+\gamma$ – суммарные потери в резонаторе, γ- величина, прямо пропорциональная коэффициенту поглощения образца ($\gamma=d\cdot\delta$, d-длина образца, δ- коэффициент поглощения образца), ω_1- новая резонансная частота

резонатора. Отсюда можно получить, что измеряя интенсивность прошедшего через резонатор излучения можно определить γ:

$$\gamma = \frac{I_2(\omega_1) - I_1(\omega_0)}{I_1(\omega_0)}\alpha \quad . \qquad (4.3)$$

Таким образом, проводя последовательные измерения поглощения γ для пустой полиэтиленовой кюветы, кюветы с дистиллированной водой и раствором ДНК, можно определить спектр поглощения последней.

4.5. Экспериментальное исследование спектральных характеристик ДНК с помощью методики непрерывной терагерцовой спектроскопии

Спектр поглощения ДНК в диапазоне 0,300-0,375 ТГц, полученный с помощью синтезатора частоты на ЛОВ и промеренный с шагом 3 ГГц представлен на Рисунке 4.5. В результате наиболее сильное поглощение наблюдается в следующих спектральных областях: 0,306 ТГц; 0,315 ТГц; 0,324 ТГц; 0,333 ТГц; 0,348ГГц; 0,360ГГц. Как нетрудно видеть, эти данные хорошо совпадают с результатами, полученными с использованием широкополосного ТГц спектрометра [174].

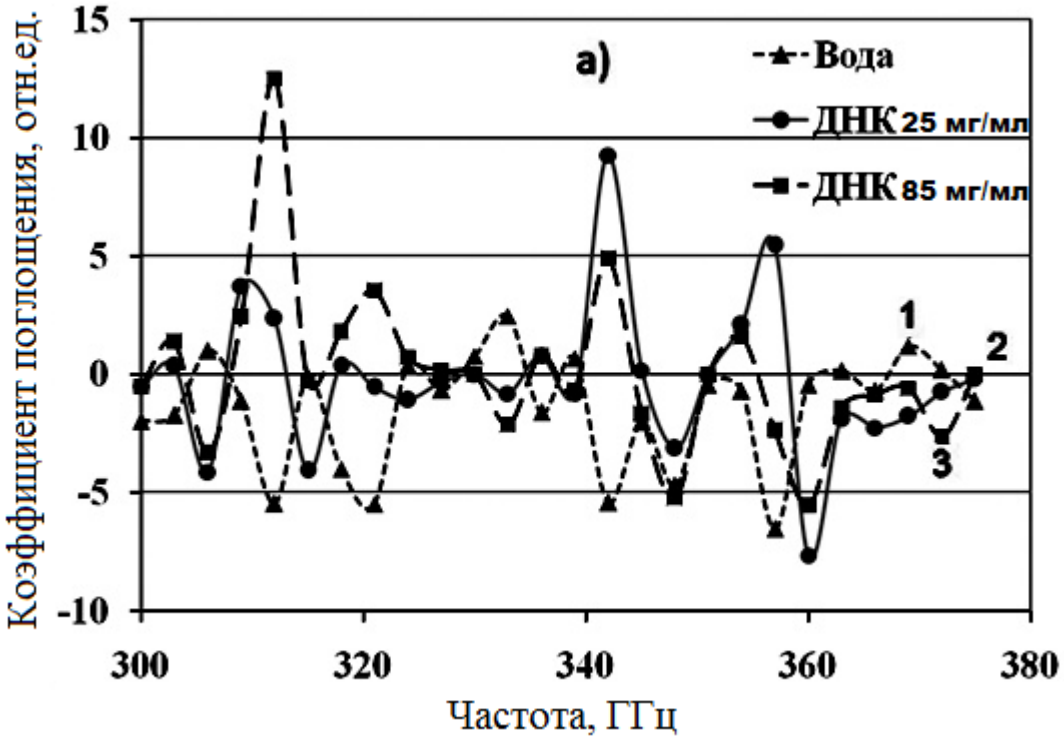


Рисунок 4.5 - 1- спектр воды, 2 – спектр ДНК малой концентрации, 3 – спектр ДНК большой концентрации, записанные в диапазоне 300-375 ГГц с шагом 3 ГГц [174].

Далее с шагом 200 МГц эти области были просканированы более подробно. Пример подробной записи таких полос поглощения (вблизи 0,360 ТГц), представляющий тонкую структуру итогового спектра, показан на рисунке 4.6 [174].

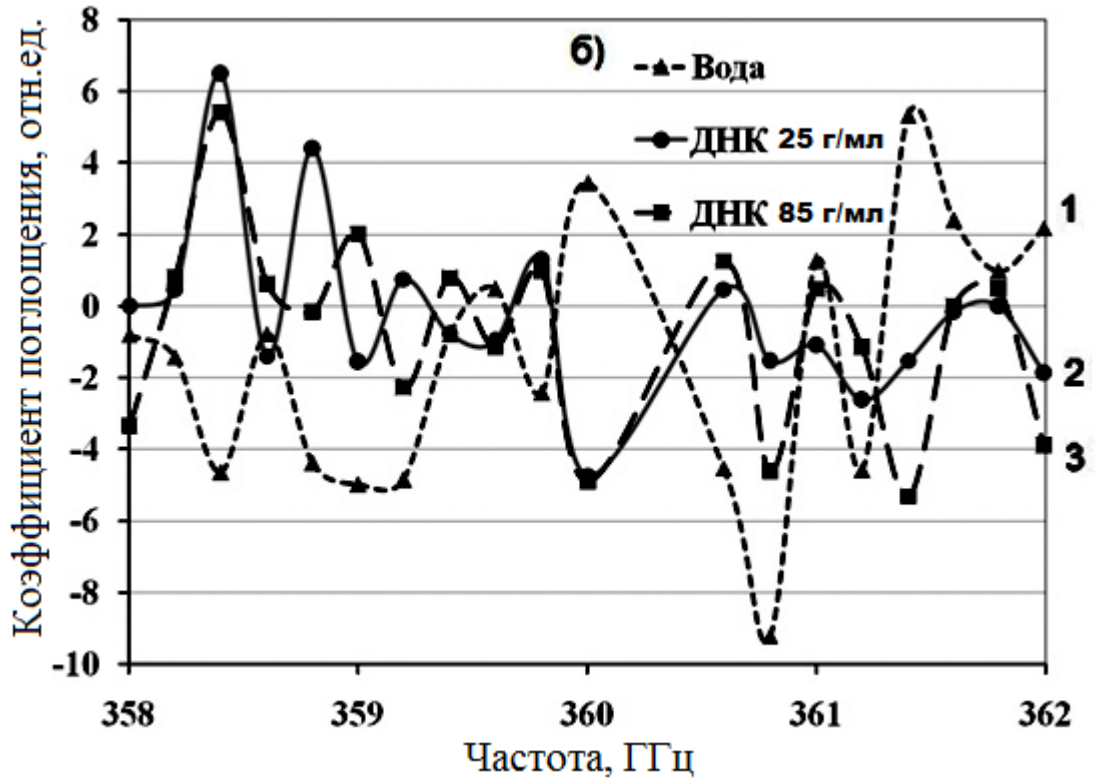


Рисунок 4.6 - 1- спектр воды, 2 – спектр ДНК малой концентрации, 3 – спектр ДНК большой концентрации, записанные в диапазоне 358-362 ГГц с шагом 200 МГц [174]

Спектральные линии поглощения с наибольшей интенсивностью (не менее 4 отн. ед.) по результатам всех измерений на прецизионном спектрометре представлены в таблице 4.2.

Таблица 4.2. Зарегистрированные линии поглощения образцов ДНК на прецизионном спектрометре в ТГц [174].

0,3046	0,3050	0,3106	0,3110	0,3138
0,3254	0,3472	0,3600	0,3608	0,3614

4.6. Анализ спектральных характеристик ДНК

Полученные данные были проанализированы путем сопоставления со спектрами воды [166], спектрами бактериальной ДНК в растворе с водой

[172] и спектрами ДНК сельди и ДНК лосося в твердом состоянии [180]. Результаты этих работ сведены в таблицу 4.3 [174].

Таблица 4.3. Частоты линий поглощения в ТГц диапазоне частот всех образцов по результатам работ [166, 172, 180].

Образец	Частоты линий поглощения, ТГц								
Вода [166]	0,321	0,342	0,420	0,489	0,550	0,588	0,648	0,675	0,720
Бактериальная ДНК в воде [172]	0,321	0,381	0,399	0,418	0,444	0,471	0,490	0,519	0,582
	0,600	0,633	0,667	0,688	0,709	0,727			
ДНК сельди [180]	0,306	0,339 0,336	0,375	0,402	0,441	0,465	0,507	0,609	0,630
	0,660	0,684	0,696	0,723					
ДНК лосося [180]	0,306	348	0,375	0,408	0,444	0,456 0,465	0,507	0,540	0,606
	0,633	0,660	0,675	0,690	0,726				

Спектральные линии поглощения ДНК сельди, лосося [180] и бактериальной ДНК [172] получены при помощи Фурье-спектрометра IFS-66 со спектральным разрешением порядка 7,5 ГГц. Отметим, что в работе [180] были изучены «сухие» образцы (пленки) без использования растворителей. Измерения пленок воды проводились на Фурье-спектрометре FT66v с разрешением 7,5 ГГц.

На рисунке 4.5 хорошо видно, что с учетом разрешения спектрометра FT66v, полосы поглощения воды на частотах 0,321 ТГц и 0,342 ТГц из [166] совпадают со спектральными линиями воды, измеренной в данном эксперименте на прецизионном спектрометре. Линия поглощения на частоте

0,321 ТГц также появляется в первой части эксперимента в образцах пленки ДНК при использовании в качестве растворителя воды [174]. Она же указана в качестве частоты линии поглощения бактериальной ДНК по результатам [172], как и линии на частотах 0,418; 0,490 и 0,582 ТГц. По всей видимости, данное утверждение является ошибочным, так как в данной работе бактериальная ДНК использовалась в растворе с водой, а эти линии крайне близки к линиям поглощения воды и не проявляются в экспериментах с другими типами ДНК. Такое же суждение можно вынести о линии 0,549 ТГц, полученной в первой части работы для пленок ДНК сельди (растворитель – вода) на полиэтиленовой подложке.

Спектральные линии поглощения ДНК из [180] с учетом спектрального разрешения спектрометра IFS-66 также хорошо совпадают с данными в обеих частях эксперимента. Так, например, линия 0,302 ТГц на широкополосном спектрометре, соответствует полосе поглощения на частоте 0,306 ТГц, полученной в работе [180] для образцов ДНК сельди и лосося. Стоит отметить, что на прицизионном спектрометре она расщепляется на две линии 0,3046 ТГц и 0,3050 ТГц, но, как и в [180], обладает значительной интенсивностью [174].

На прицизионном спектрометре зарегистрированы линии поглощения ДНК на частотах 0,3106; 0,3110; 0,3138 и 0,3254 ТГц, не проявляющиеся на импульсном широкополосном спектрометре, скорее всего в связи с недостаточным разрешением последнего – 5,5 ГГц.

Спектральные линии 0,339 ТГц и 0,375 ТГц из [180] как и результаты, полученные на прецизионном спектрометре, обладают низкой интенсивностью (Рисунок 4.5) [174]. Однако на частоте 0,331 ТГц проявляется поглощение пленки ДНК на подложке из полиэтилена при растворении в спирте, и в этом же диапазоне около 0,333 ТГц имеется пик поглощения ДНК средней интенсивности, полученный на прецизионном спектрометре. В спектре, полученном в первой части эксперимента, спектральные линии 0,372 ТГц и 0,380 ТГц имеют большую интенсивность и

повторяются на кварцевой подложке, как при использовании спирта, так и воды в качестве растворителей [174]. К тому же в работе [172] также имеется пик поглощения на частоте 0,381 ТГц.

Отметим, что в работе [180] отсутствует достаточно сильная группа полос вблизи частоты 0,360 ТГц, которая присутствует в обеих частях нашего эксперимента с использованием различных растворителях на разных подложках в твердом и жидком агрегатном состоянии (см. Рисунок 4.3 и Рисунок 4.6) и, скорее всего, данная частота соответствует частоте собственных колебаний в молекуле ДНК [174]. На прицизионном и широкополосных спектрометрах были также получены линии поглощения на частотах 0,3472 и 0,350 ТГц, отсутствующие для ДНК сельди, но совпадающие с линией поглощения ДНК лосося на 0,348 ТГц в работе [180].

Таким образом, спектры молекулы ДНК, полученные с помощью двух спектрометров, согласуются между друг другом, позволяя провести идентификацию полученных результатов [174]. Далее рассмотрим остальной диапазон частот, рассмотренный на широкополосном спектрометре и не вошедший в исследование на прицизионном спектрометре.

Частота линии поглощения 0,401 ТГц, возможно, соответствует частоте колебаний водородных связей между двумя цепочками ДНК, так как практически совпадает с линиями поглощения бактериальной ДНК на частоте 399 Ггц [172] и ДНК сельди [180].

Спектральные линии поглощения на частотах 0,467 ТГц, 0,630 ТГц (0,625 ТГц и 0,635 ТГц), 0,660 ТГц (0,655 ТГц) и 0,687 ТГц (0,689 ТГц), полученные в первой части работы для пленок деградированной ДНК сельди на различных подложках с разными растворителями прекрасно коррелируют с частотами спектральных линий поглощения ДНК сельди – 0,465 ТГц, 0,630 ТГц и 0,660 ТГц и близки к пику слабой интенсивности на частоте 0,684 ТГц по результатам [180] и соответствуют группе полос ДНК лосося 0,456 (0,465) ТГц, 0,633 ТГц, 0,660 ТГц и 0,690 ТГц. Так как частоты указанных спектральных линий также близки к линиям 0, 471 ТГц, 0,633 ТГц, 0,669 и

0,688 ТГц бактериальной ДНК [172], то есть получены для совершенно разных типов ДНК, то они соответствуют колебаниям водородных связей между двумя цепочками ДНК.

Спектральные линии 0,525 (0,527) ТГц, как и 0,610 ТГц, полученные при растворении ДНК сельди в воде в данном эксперименте, близки со спектральными линиями поглощения бактериальной ДНК на частоте 0,519 ТГц и 0,600 ТГц, соответственно. Однако на частоте 0,609 ТГц имеется пик поглощения ДНК слабой интенсивности из [180], поэтому частота линии поглощения 0,610 ТГц соответствует частоте колебаний водородных связей между двумя цепочками ДНК, а 0,525 (0,527) ТГц соответствует колебаниям, ответственным за изменение конформации молекулы ДНК при растворении в воде за счет образования межмолекулярных Н-связей. Линия 0,569 ТГц, как и 0,749 ТГц проявляется только при использовании спирта в качестве растворителя.

Спектральная линия 0,700 ТГц близка к линии поглощения 0,696 ТГц ДНК сельди [180], а пик поглощения на 0,710 ТГц совпадает с линией поглощения бактериальной ДНК на частоте 0,709 ТГц [172]. Так как частоты этих двух спектральных линий получены для разных растворителей, то, скорее всего, они соответствуют колебаниям водородных связей между двумя цепочками ДНК.

Все перечисленные выводы с учетом разрешения используемых спектрометров сведены в таблицу 4.4. В скобках указаны близкие спектральные линии поглощения, полученные на широкополосном ТГц спектрометре.

Таблица 4.4. Анализ полученных в эксперименте пиков в спектрах поглощения ДНК сельди на основании литературных данных по спектральным линиям поглощения воды, бактериальной ДНК и порошка ДНК сельди в ТГц диапазоне частот [166, 172, 180]

Линия поглощения, ТГц	Анализ спектральных линий таблицы 4.1 и 4.2 с учетом данных таблицы 4.3.
0,3046; 0,3050 (0,302)	Собственные колебания в молекуле ДНК. Совпадают со спектральными линиями поглощения на 0,306 ТГц ДНК сельди и лосося [180]
0,321	Совпадает с резонансом поглощения воды [166] и, следовательно, не принадлежит ДНК
0,333 (0,331)	Собственные колебания в молекуле ДНК. Смещена на 3 ГГц от спектральной линии поглощения 0,336 (0,339) ТГц ДНК сельди [180]
0,3475 (0,350)	Собственные колебания в молекуле ДНК. Совпадают со спектральной линией поглощения 0,348 ТГц ДНК лосося [180]
0,360; 0,3608; 0,3614	Собственные колебания в молекуле ДНК. Группа полос получена впервые, повторяется на двух спектрометрах для разных подложек, растворителей и агрегатных состояний
0,372 (0,380)	Собственные колебания в молекуле ДНК. Смещена на 3 ГГц от спектральной линии поглощения 0,375 ТГц ДНК сельди [180] и совпадает со спектральной линией поглощения бактериальной ДНК 0,381 ТГц [172].
0,401	Колебания водородных связей между двумя цепочками ДНК. Совпадает с частотами спектральных линий поглощения ДНК сельди на частоте 0,402 ТГц [180] и бактериальной ДНК - 0,399 ТГц [172], смещена на 7 ГГц от спектральной линии поглощения ДНК лосося – 0,408 ТГц [180].
0,467	Колебания водородных связей между двумя цепочками ДНК.

	Совпадает с частотой спектральной линии поглощения ДНК сельди – 0,465 ТГц и соответствует группе полос ДНК лосося 0,456 (0,465) ТГц [180], смещена на 4 ГГц от спектральной линии поглощения 0,471 ТГц бактериальной ДНК [172].
0,525 (0,527)	Колебания, ответственные за изменение конформации молекулы ДНК при растворении в воде за счет образования межмолекулярных Н-связей. Смещена на 6 ГГц от спектральной линии поглощения бактериальной ДНК на 0,519 ТГц.
0,549	Совпадает с резонансом поглощения воды 0,550 ТГц [166] и, следовательно, не принадлежит ДНК.
0,569	Отвечает за колебания связей молекулы ДНК со спиртом, так как проявляется только для данного растворителя.
0,610	Собственные колебания в молекуле ДНК. Совпадает со спектральной линией поглощения ДНК сельди на частоте 0,609 ТГц [180], смещена на 4 ГГц от спектральной линии поглощения ДНК лосося на 0,606 ТГц [180].
0,630 (0,625; 0,635)	Колебания водородных связей между двумя цепочками ДНК. Совпадает с спектральной линией поглощения ДНК сельди на частоте 0,630 ТГц [180], смещена на 3 ГГц от спектральных линий поглощения ДНК лосося [180] и бактериальной ДНК [172] на 0,633 ТГц.
0,660 (0,655)	Собственные колебания в молекуле ДНК. Совпадают со спектральными линиями поглощения 0,660 ТГц ДНК сельди и лосося [180].
0,687 (0,689)	Колебания водородных связей между двумя цепочками ДНК. Совпадает со спектральной линией поглощения бактериальной ДНК на 0,688 ТГц [172], смещена на 3 ГГц от спектральных линий поглощения ДНК лосося на 0, 690 ТГц и ДНК сельди на частоте 0,684 ТГц [180].
700	Собственные колебания в молекуле ДНК. Смещена на 4 ГГц от

	спектральных линий поглощения 0,696 ТГц ДНК сельди [180].
0,710	Колебания водородных связей между двумя цепочками ДНК. Совпадает со спектральной линией поглощения бактериальной ДНК на 0,709 ТГц [172].
0,749	Отвечает за колебания связей молекулы ДНК со спиртом, так как проявляется только для данного растворителя.

На основании проведенного анализа можно сделать предположение, что частоты спектральных линий поглощения 0,3046 и 0,305 ТГц, 0,333 и 0,3475 ТГц, группы спектральных линий 0,360; 0,3608 и 0,3614 ТГц, а также 0,372; 0,610 и 0,700 ТГц принадлежат собственным колебаниям в молекуле ДНК. При этом полоса на 0,360 ТГц получена впервые в данном исследовании.

Частоты спектральных линий поглощения 0,401; 0,467; 0,630; 0,687 и 0,710ТГц, полученные для совершенно разных типов ДНК с использованием разных растворителей и без них, относятся к частотам колебаний водородных связей между двумя цепочками ДНК.

Частота спектральной линии поглощения 0,525 ТГц, полученная при использовании в качестве растворителя воды, соответствует колебаниям, ответственным за изменение конформации молекулы ДНК при растворении в воде за счет образования межмолекулярных Н-связей, так как близка к спектральной линии поглощения бактериальной ДНК [172], также растворенной в воде. Две спектральные линии поглощения на частотах 0,321 и 0,549 ТГц совпадают с резонансами поглощения воды на 0,321 и 0,550 ТГц [166] и, следовательно, не принадлежат ДНК.

Заключение к 4 главе

С помощью широкополосного импульсного спектрометра ТГц диапазона и прицизионного непрерывного спектрометра были получены и проанализированы спектры поглощения деградированной ДНК сельди в

диапазоне 0,1–1 ТГц. Первая часть исследования подробно описана в работе автора [175], а вторая в работе автора [174]. Исследования проведены для образцов твердой фазы в различных концентрациях с дистиллированной водой и этиловым спиртом на подложках из полиэтилена и кварца и образцов, растворенных в воде. Спектральные линии поглощения, полученные одновременно для образцов ДНК сельди на различных подложках с разными растворителями методами импульсной и непрерывной терагерцовой спектроскопии, а также расположенные в пределах разрешения спектрометров (7,5 ГГц) по отношению к результатам работы по исследованию ДНК сельди и лосося в твердой фазе [180] считались собственными спектральными линиями поглощения ДНК сельди. Таким образом, в настоящей работе следующие частоты были идентифицированы как собственные частоты ДНК: 0,3046; 0,305 ТГц, 0,333; 0,3475 ТГц, группа спектральных линий 0,360; 0,3608 и 0,3614 ТГц, а также 0,372; 0,610 и 0,700 ТГц. Группа спектральных линий 0,360; 0,3608 и 0,3614 ТГц была получена автором впервые.

Частоты спектральных линий поглощения 0,401; 0,467; 0,630; 0,687 и 0,710 ТГц, расположенные в пределах 7,5 ГГц по отношению к частотам линий поглощения как сельди с лососем [180], так и бактериальной ДНК [172], были отнесены к колебаниям водородных связей между двумя цепочками ДНК в связи с тем, что они были получены для разных типов ДНК с разными растворителями. Так как частота линии поглощения 0,525 ТГц, полученная с использованием воды в качестве растворителя, совпадает с частотой линии поглощения бактериальной ДНК, также растворенной в воде [172], она соответствует колебаниям, ответственным за изменение конформации молекулы ДНК при растворении в воде за счет образования межмолекулярных Н-связей.

Фактически такая информация является основой для создания методик диагностики состояния ДНК (структура, наличие мутаций) по собственным частотам и управления биохимическими реакциями через

активацию/дезактивацию связей с окружающими веществами. В данной главе также показана перспективность совместного использования спектроскопии на основе квазиоптических методов и методов прецизионной спектроскопии ТГц диапазона. Спектрометр с использованием фемтосекундного лазера позволяет за короткое время получить общую картину спектра исследуемого вещества, что дает возможность определить участки, представляющие интерес для прецизионных измерений. Развитый в данной работе метод ТГц спектроскопии, основанный на применении стабильных по частоте источников излучения и высокодобротного резонатора, позволяет изучать тонкую структуру сложных спектров биомолекул, что дает возможность практического использования полученных результатов для решения биологических задач.

Помимо этого стоит отметить, что в работе [182] математическим расчетом с использованием модели Пейярда – Бишопа–Доксуа было показано, что ТГц излучение через создание нелинейных неустойчивостей может создавать локальные денатурированные участки ДНК. Так как образование денатурированных участков влияет на процесс переноса зарядов в ДНК [182], который, как было показано, задействован как в процессах канцерогенеза [183, 184], мутагенеза [183, 185, 186], так и при репарации ДНК повреждений [187-189], это согласуется и может объяснять возникающие при воздействии ТГц излучения эффекты, такие как: увеличение количества мутаций у плодовых мушек и растений [43, 44]; геномная нестабильность [55], которая может повышать риск развития рака, изменение уровня экспрессии некоторых генов [53], а также повышение уровня белков, предполагающих процессы восстановления ДНК [37]. Поэтому информация о колебаниях водородных связей между цепями ДНК может стать ключом к пониманию механизмов воздействия ТГц излучения и управлению ими.

Заключение

1. Разработаны макет и методика облучения биологических клеток, находящихся в жидкой среде, широкополосным импульсным ТГц излучением диапазона 0,1 – 2 ТГц с длительностью импульса 2,5 пс. Показано, что воздействие импульсного терагерцового излучения мощностью 30; 2 и 0,1 мкВт не вызывает статистически достоверных изменений в соотношении живых и находящихся на разных стадиях апоптоза клеток фибробластов и в распределении их по фазам клеточного цикла.

2. Определена оптическая глубина проникновения ТГц излучения в слое фибробластов, которая достигает 210 мкм в диапазоне 0,1 – 1,1 ТГц.

3. Показано, что стимулирующее воздействие импульсного широкополосного терагерцового излучения в диапазоне 0,1-2 ТГц на пролиферативную активность нервных клеток выражено в усилении роста нейритов сенсорных ганглиев. Действие имеет дозозависимый эффект и достигает максимума при плотности мощности ТГц излучения 0,872 мкВт/см^2.

4. Предложена модель воздействия широкополосного ТГц излучения на нервные клетки в программном пакете CST Microwave Studio, позволяющая описывать взаимодействие ТГц излучения с многокомпонентной биологической средой на примере нервной ткани, содержащей клетки определенного диаметра с диэлектрическими свойствами воды.

5. На основе сравнительного анализа спектров отражения нервных клеток, полученных в эксперименте и численном моделировании, выявлено, что в диапазонах частот от 0,1 до 1 ТГц и от 1,2 до 1,6 ТГц преобладает поглощение излучения; на частотах 1,10; 1,16; 1,65 и 1,69 ТГц обнаружен размерный резонансный эффект влияния, связанный с возникновением стоячих волн в биологическом объекте.

6. Экспериментально получены данные, что молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) имеет максимумы поглощения в диапазоне от 0,1 до 1 ТГц. На основе сравнительного анализа экспериментальных данных, полученных в данной работе с литературными источниками сделаны выводы, что частоты группы линий 0,360; 0,3608 и 0,3614 ТГц, а также 0,372; 0,610 и 0,700 ТГц принадлежат собственным колебаниям в молекуле ДНК. Полосы на 0,360; 0,3608 и 0,3614 ТГц получены впервые в данном исследовании.

7. Идентифицированы частоты колебаний водородных связей между двумя цепочками ДНК: 0,401; 0,467; 0,630; 0,687 и 0,710ТГц.

8. Показано, что частота 0,525 ТГц соответствует колебаниям, ответственным за изменение конформации молекулы ДНК при растворении в воде за счет образования межмолекулярных Н-связей.

Автор выражает благодарность научному руководителю кандидату физико-математических наук Смолянской О.А. за содействие в выполнении данной работы и кандидату физико-математических наук Ходзицкому М.К. за полезные дискуссии. Кандидату физико-математических наук Ваксу В.Л. и кандидату физико-математических наук Собакинской Е.А. за помощь в проведении исследований спектров ДНК на спектрометре на основе синтезатора частоты на лампе обратной волны и высокодобротного резонатора. Доктору биологических наук Федорову В.И. за плодотворные обсуждения биологических аспектов воздействия терагерцового излучения.

Библиографический список использованной литературы

1. Румянцева О. А., Кузнецова Т.Е. Роль повреждения нервного аппарата роговицы в нарушении слезопродуцирующей функции после фоторефракционных операций // Казанский медицинский журнал . – 2002. – Т. 83. № 3 – С. 211-216.
2. Пат. 2442582 Российская Федерация, МПК A61K31/4468, A61P27/02, Стимулятор образования нейритов / Ябута Тихо, Яно Фумико, Азума Мицуйоси, Патентообладатель(и): Сэндзю Фармасьютикал Ко, ЛТД (Япония), Астеллас Фарма Инк. (Япония). – № 009142843/15, заявл. 18.04.2008; опубл. 20.02.2012. Бюл. №5 . – 21 с.
3. Wilmink G.J., Grundt J.E. Invited Review Article: Current State of Research on Biological Effects of Terahertz Radiation // J Infrared Milli Terahz Waves. – 2011. – V. 32. – P. 1074–1122.
4. Ольшевская Ю.С., Козлов А.С., Петров А.К. и др. Влияние терагерцового (субмиллиметрового) лазерного излучения на проницаемость клеточных мембран // Вестник НГУ. – 2010. – Т. 5. (4). – С. 177-181.
5. Olshevskaya, J. S., Ratushnyak, A. S., Petrov, A. K., Kozlov, A.S., Zapara, T. A. Effect of terahertz electromagnetic waves on neurons systems // Proceedings of the International Conference in Computational Technologies in Electrical and Electronics Engineering «IEEE Region 8 SIBIRCON 2008», 21 - 25 July 2008, Novosibirsk Scientific Center, Novosibirsk – 2008, – P. 210–211.
6. Bourne N., Clothier R. H., D'Arienzo M. and et.al. The effects of terahertz radiation on human keratinocyte primary cultures and neural cell cultures // Altern Lab Anim. – 2008. – V.36 (6). – P. 667-84.
7. Панков О.П. Низкоинтенсивная лазерная терапия в офтальмологии // Мед. газета. – 1998. – В. 55. – С. 8–9.
8. Globus T.R., Woolard D.L., Khromova T.and et.al. THz-spectroscopy of biological molecules // J. Bio. Phys. – 2003. – V. 29. №2. – P. 89-100.

9. Рапуано К. Дж. Роговица.М. : ГЭОТАР-Медиа, – 2010. – С. 317
10. Clarke N.D., Bee J.A. Innervation of the chick cornea analyzed in vitro // Invest.Ophthalm. Vis. Sci.1996. Vol. 37. P.1761—1771.
11. [Электронный ресурс]. URL: http://lwigalelab.wordpress.com/the-research/corneal-innervation (дата обращения: 10.06.2014).
12. Kohlhaas M. Corneal sensation after *cataract* and *refractive surgery*// J. Cataract. Refract. Surg. – 1998. – Vol. 24. – P. 1399—1409.
13. Murphy PJ., Corbett M.C. and et. al. Loss and recovery of corneal sensitivity following photorefractive keratectomy for myopia // J. Refract. Surg. – 1999. – V.15. – P. 38-45.
14. Kauffmann T., Bodanowitz S. and et. al. // Ger. J. Ophthalm. – 1996. – V. 5. – P. 508-512.
15. Kawakami J., Katakami C., Yamamoto M. // Nippon. Ganka. Gakkai. Zasshi. – 1996. – V.100. – P. 653-659.
16. Румянцева О.А., Ухина Т.В.// РМЖ, серия «Клиническая офтальмология». – 2001. – Т.1. № 4. – С.101-105.
17. [Электронный ресурс]. URL: http://www.okomed.ru/lasik.html (дата обращения: 10.06.2014).
18. Егоров В. В., Дутчин И. В., Смолякова Г. П. Эксимерлазерная хирургия и регенерация роговицы. Часть 1. Клинические разновидности регенерации роговицы при коррекции миопии методами ФРК и ЛАСИК // Рефракционная хирургия и офтальмология. ISSN 1681-5904. – 2006. – Т. 6, №3. – С. 4-9.
19. Шигина Н.А., Куман И.Г., Хейло Т.С. и др. Применение электрического тока в диагностике и лечении патологии зрительного нерва и сетчатки // Клиническая офтальмология. 2001. - Т.2, №2. - С. 66-69.
20. Линник Л.Ф. Научные предпосылки использования физических воздействий при лечении частичной атрофии зрительного нерва // Тезисы докладов VI съезда офтальмологов России. – 1994. – С. 96.

21. Оржешковский В.В., Гусева Н.Г. Магнитотерапия // Клиническая физиотерапия. – 1984. – С. 79-86.
22. Скурихина Л.А. Магнитотерапия // Техника и методики физиотерапевтических процедур: Справочник. М., – 1983. – С. 213-221.
23. Мумин А.Н. Вопросы физиотерапии, курортологии и реабилитации. Минск: Медицина, – 1981. – 106 с.
24. Еричев В.П., Хорошилова И.П., Калинина О.М. и др. Фокусированный ультразвук: экспериментально морфологические исследования // Вестн. офтальмол. – 1994. №1. – С. 20-23.
25. Думброва Н.Е., Сотникова Е.П., Горянова Н. А. Влияние алоэ на резистентность зрительно-нервного аппарата глаза // Офтальмол. журнал. – 1986. – №6. – С. 494-496.
26. Карушин О.И. Современные методы лечения атрофии зрительного нерва. Реферат. – 17с. [Электронный ресурс]. URL: http://www.reg-surgery.ru/3_2003/articles_ru/downloads/250503-003.pdf.
27. Аникина Е.Б.,Орбачевский Л.С., Шапиро Е.Ш. Низкоинтенсивные лазерные технологии в офтальмологии // Лазерная медицина. – 1997. – Т. 1. вып. 2. – С. 4-11.
28. Walther M., Fischer B. and et. all.Far-infrared vibrational spectra of all -trans, 9-cis and retinal measured byTHz time-domain spectroscopy // Chem. Phys. Lett. – 2000. – V. 332. – P. 389 -395.
29. Markelz A. G., Roitberg A., Heilweil E. J. Pulsed terahertz spectroscopy of DNA, bovine serum albumin and collagen between 0.1 and 2.0 THz // Chem. Phys. Lett. – 2000. – V. 320. – P. 42.
30. Arnone D.,Ciesla C., Corchia A. and et. al.. Applications of terahertz technology to medical imaging.// Proc. SPIE 3828 Terahertz Spectroscopy and Applications II. – 1999. – V. 209.
31. Woodward R.M., Wallace V.P., Arnone D.D. and et.al. Terahertz Pulsed Imaging of Skin Cancer in the Time and Frequency Domain // Journal of Biological Physics. – 2003. – V. 29. – P. 257–261.

32. Seung J.O., Huh Y.-M. ,Suh J.-S. and et.al. Cancer Diagnosis by Terahertz Molecular Imaging Technique Infrared Milli Terahz Waves.
33. Назаров М. М., Шкуринов А. П., Кулешов Е. А. и др.Терагерцовая импульсная спектроскопия биологических тканей // Квантовая электроника. – 2008. – №7. – С. 647–654.
34. Mittleman D., Jacobsen R., Nuss M. T-ray imaging // IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics. – 1996. – V.2 (3). – P. 679–691.
35. Federov V. Study of biological effects of electromagnetic radiation of submillimeter part of terahertz range // Biomeditsiknskaya Radioelektronika. – 2011. – V. 32, (10), P. 1074-1122.
36. Alexandrov B. S. and et. al. Non-thermal effects of terahertz radiation on gene expression in mouse stem cells // Biomed Opt Express. – 2011. – V. 2. – P. 2679–2689.
37. Wilmink G.J., Rivest B. D., Ibey B. L.and et.al. Quantitative investigation of the bioeffects associated with terahertz radiation // Proc. SPIE 7562. Optical Interactions with Tissues and Cells XXI. – 2010. – P.2679-89.
38. Blackman C. F., Benan, S.G.,Weil, C.M. and et.al. 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.
39. Hintzsche H. and et. al. Terahertz Radiation at 0.380 THz and 2.520 THz Does Not Lead to DNA Damage in Skin Cells In Vitro // Radiat Res. – 2013. – V. 179(1). – P. 38-45.
40. Demidova E.V. Studying the Non-Thermal Effects of Terahertz Radiation // Bioelectromagnetics. – 2013. – V. 34. – P. 15–21.
41. Киричук В.Ф., Андронов Е.В., Ефимова Н.В. Воздействие терагерцового облучения высокой мощности на агрегацию тромбоцитов и поведенческие реакции белых крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т.147. – №11.

42. Bondar, N. and et. al. Behavioral effect of terahertz waves in male mice // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2008. – V. 145 (4). – P. 401–405.
43. Hu N. THz irradiation of d. melanogaster // Applied infrared and optoelectronics. – 1987. – P. 7.
44. Federov, V. Comparative study of the effects of infrared, submillimeter, and millimeter EM radiation // Biophysics. – 2001. – V.46 (2). – P. 293–297.
45. He Z.-P., Su J.-W. Preliminary observation on the effect of submillimeter laser radiation on the somaclonal variation of rice // Proc. China-Japan Symposium on Plant Biotechnology. – 1988. – P. 49–51.
46. Dalzell D.R. Danielle R., McQuade J. and et. al. Damage thresholds for terahertz radiation // Optical Interactions with Tissues and Cells XXI. – 2010. – 105 p.
47. Webb S.J., Dodds D.D. Inhibition of bacterial cell growth by 136 gc microwaves // Nature. – 1968. – V. 218 (5139). – P. 374–375.
48. Zalyubovskaya N.P. and et. al. To biological activity of radiation in millimeter and submillimeter ranges// Eksperimental'noy i Klinicheskoy Radiologii. – 1970. – V. 6. – P. 202–205.
49. 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.
50. Храпко А.М., Реброва Т.Б., Беляков Е.В. Измерительная аппаратура и методика для исследования воздействия миллиметрового и субмиллиметрового излучения на биообъекты: Нетепловые эффекты миллиметрового излучения. М.1981. – С. 317-336.
51. Fedorov, V. Investigation of possibility of submillimeter laser using as instrument for diagnostics in medicine // International Conference on Lasers, Applications, and Technologies. – 2007. – P. 1–7.
52. Фёдоров В.И., Клементьев В.М., Хамоян А.Г. и др. Субмиллиметровый лазер как потенциальный инструмент медицинской диагностики. -

Миллиметровые волны в биологии и медицине. – 2009. – № 1-2. – С. 88–97.

53. Wilmink G.J., Ibey B.L., Roth C. L., Vincelette R. L., Rivest B. D., Horn C. B.,Bernhard J., Roberson D., Roach W. P. Determination of death thresholds and identification of terahertz (THz)-specific gene expression signatures // Optical Interactions with Tissues and Cells XXI. – 2010. – SPIE. 7562. – P. 75620K-75620K-8.
54. Siegel P. H., Pikov V. THz in Biology and Medicine: Towards Quantifying and Understanding the Interaction of Millimeter- and Submillimeter-Waves with Cells and Cell Processes // 2010. – SPIE Photonics West. – 7562
55. Korenstein-Ilan, A. and et. al., Terahertz radiation increases genomic instability in human lymphocytes // Radiation Research. – 2008. – V.170 (2). – P. 224–234.
56. Delevskii Yu. P. , Kiseliov V. K., Kamenev Yu. E. and et.al. Immunomodelling influence of the splenocytis irradiation by submillimeter laser radiation//Proceedings of the First Ukranian Simposium “Fizika i Tehnika Millimetrovyh i Submillimetrovyh Radiovoln (Physics and Techniques of Millimeter and Submillimeter Radiowaves)”. – 1991. – part 2. – P. 110–111.
57. Ostrovskiy, N.V. and et. al. Application of the terahertz waves in therapy of burn wounds // Infrared and Millimeter Waves and 13th International Conference on Terahertz Electronics. – 2005. – P. 937–952.
58. 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.
59. Kirichuk V., Tsymbal A., Use of Terahertz Electromagnetic Waves for Correcting Hemostasis Functions // Biomedical Engineering. – 2010. – V. 44 (1). – P. 11–14.

60. Kiselev V.K., Kuleshov E.M., Kamenev Yu.E. and et.al. Use of submillimeter laser technology in immunological studies // Radiotekhnicheskie Systemy Millimetrovogo i Submillimetrovogo Diapazonov. – 1991. – P. 176–181.
61. Xiong, S., Shaomin P., Influence of submillimeter laser radiation on the growth of paddy rice // Applied Lase. – 1986. – V.6 (33). – P. 46.
62. Peng S.,Influence of submillimeter laser radiation on the growth of black beans // Applied Laser. – 1987. – V.7 (33). – P. 169.
63. Xu M., Xiong S. FIR laser irradiation in wheat // Applied infrared and optoelectronics. – 1988. – V. 4. – P. 30.
64. Kirichuk, V. and et al. Use of terahertz electromagnetic radiation for correction of blood rheology parameters in patients with unstable angina under conditions of treatment with isoket, an NO donor // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2008. – V.146 (3). – P. 293–296.
65. 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 // Physics in Medicine and Biology. – 2002. – V.47 (21). – P. 3831.
66. Siegel P. H. Pikov V., Can neurons sense millimeter waves // SPIE Photonics West. – 2010. – P. 7562-17.
67. Вайсман Н. Я., Фёдоров В. И., Немова Е. Ф.и др. Выживаемость и продолжительность жизни DROSOPHILA MELANOGASTER после воздействия терагерцовым излучением // Успехи геронтол. – 2013. – Т. 26. № 4. – С. 631–637.
68. Doria A., Gallerano G.P., Giovenale E. and et. al. Infrared Physics & Technology. – 2004. – V 45. – P. 339.
69. Bock J. and et. al. Mammalian stem cells reporgramming in response to Terahertz Radiation // PLoS Biol. – 2010. – V. 5 (12) – P. 15806.
70. Kim K.-T. and et. al. High-power femtosecond-terahertz pulse induces a wound response in mouse skin // Sci. Rep.3. – 2013.

71. Alexandrov, B.S. and et. al. Specificity and Heterogeneity of Terahertz Radiation Effect on Gene Expression in Mouse Mesenchymal Stem Cells // Sci. Rep.3. – 2013.
72. Titova L.V., Ayesheshim K., Golubov A. and et.al. Intense THz pulses cause H2AX phosphorylation and activate DNA damage response in human skin tissue // Biomed. Opt. Express. – 2013. – V. 4. – P. 559-568.
73. Clothier R.H., Bourne N. Effects of THz Exposure on Human Primary Keratinocyte Differentiation and Viability // Journal of Biological Physics. – 2003. – V. 29 (2). – P. 179–185.
74. Angeluts A.A., Gapeyev A.B., Esaulkov M.N. Study of terahertz-radiation-induced DNA damage in human blood leukocytes // Quantum Electronics. – 2014. – V. 44 (3). – P. 247 – 251.
75. Scarfi, M.R. and et. al. THz Exposure of Whole Blood for the Study of Biological Effects on Human Lymphocytes // Journal of Biological Physics. – 2003. – V. 29 (2). – P. 171–176.
76. Ramundo-Orlando A. and et. al. Permeability changes induced by 130 GHz pulsed radiation on cationic liposomes loaded with carbonic anhydrase // Bioelectromagnetics. – 2007. – V. 28 (8). – P. 587–598.
77. Zeni O. and et. al. Cytogenetic observations in human peripheral blood leukocytes following in vitro exposure to THz radiation: a pilot study // Health Phys. – 2007. – V. 92 (4). – P. 349–57.
78. Panwar A. K. and et al. Terahertz imaging system for biomedical applications: current status // Int. J. Eng. Technol. – 2013. – V. 13 (2). – P. 33-39.
79. Yin, Xiaoxia, Ng, and et.al. Terahertz Imaging for Biomedical Applications. – 2012. – P. 316.
80. Weightman P. Prospects for the study of biological systems with high power sources of terahertz radiation // Physical Biology. – 2012. – V. 9 (5). – P.053001

81. Ольшевская Ю.С., Козлов А.С., Петров А.К. и др. Влияние на нейроны in vitro терагерцового (субмиллиметрового) лазерного излучения // Журн. высш. нервн. деятельности. – 2009. – Т. 59. № 3. – С. 353-359.
82. Авроров П.А., Чесноков Е.Н., Цветовская Г.А. и др. Исследование влияния импульсного инфракрасного излучения на оптические и резистентные к гемолизу свойства эритроцитов // Вестник НГУ. Сер. Физика. – 2009. – Т. 4. №.4. – С. 23-30.
83. Pal S.K., Peon J., A.H. Zewail Ultrafast surface hydration dynamics and expression of proteinfunctionality: alpha –Chymotrypsin // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2002. – V. 99 (24). – P. 15297–15302.
84. Pal S.K., Peon J., Zewail A.H. Biological water at the protein surface: dynamical solvationprobed directly with femtosecond resolution // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2002. – V.99(4). – P. 1763–1768.
85. Pal S.K.,. Zewail A.H. Dynamics of water in biological recognition // Chem Rev. – 2004. – V.104 (4). – P. 2099–2123.
86. Pal S.K. and et. al. Site- and sequence-selective ultrafast hydration of DNA // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2003. – V.100 (24). – P. 13746–13751.
87. Pal S.K., Zhao L., Zewail A.H. Water at DNA surfaces: ultrafast dynamics in minor grooverecognition // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2003. – V. 100 (14). – P. 8113–8118.
88. Ladanyi B.M. , Skaf M.S. Computer Simulation of Hydrogen-Bonding Liquids // Annual Review of Physical Chemistry. – 1993. – V. 44 (1). – P. 335–368.
89. Russo D., Hura G., Head-Gordon T. Hydration dynamics near a model protein surface // Biophys J. – 2004. – V.86 (3). – P. 1852–1862.
90. Yada H., Nagai M., Tanaka K. Origin of the fast relaxation component of water and heavy water revealed by terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy // Chemical Physics Letters. – 2008. – V. 464 (4–6). – P. 166–170.
91. Xie A. Excited-State Lifetimes of Far-Infrared Collective Modes in Proteins //Journal of Biological Physics. – 2002. – V. 28. – P. 147–154.

92. Fischer B. and et. al. Terahertz time-domain spectroscopy and imaging of artificial RNA // Opt Express. – 2005. – Vol 13 (14). – P. 5205–15.
93. Fischer B.M. Broadband THz Time-Domain Spectroscopy of Biomolecules, in Mathematics and Physics. Albert-Ludwigs-Universitat: Freiburg im Bresigau, – 2005. – P. 246.
94. Фролов В.А., Дроздова Г.А., Казанская Т.А и др. Патологическая физиология. М.: ОАО «Издательство «Экономика», – 1999. – 616 с.
95. Бецкий О.В., Девятков Н.Д., Кислов В.В. Миллиметровые волны низкой интенсивности в медицине и биологии // Вопросы физической метрологии. – 1999. – С. 44–81.
96. Голант М.Б. Биологические и физические факторы, обусловливающие влияние монохроматических электромагнитных излучений миллиметрового диапазона малой мощности на жизнедеятельность // Применение миллиметрового излучения низкой интенсивности в биологии и медицине. – 1985. – С. 21–36.
97. Бецкий О.В. Проблемы и перспективы КВЧ - терапии // Информационный сборник. Избранные вопросы КВЧ-терапии в клинической практике. – 1991. – №4. Вып. 61. – С. 166-180.
98. Frohlich. H. The extraordinary dielectric properties of biological materials and the action of enzymes // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1975. – V.72 (11). – P. 4211–4215.
99. Frohlich H. Further evidence for coherent excitations in biological systems// Phys Letters. – 1985. – V. 110 A (9). – P. 80–81.
100. Alexandrov B.S. and et al. DNA breathing dynamics in the presence of a terahertz field // Physics Letters A. – 2010. – V. 374 (10). – P. 1214–1217.
101. Chitanvis S.M. Can low-power electromagnetic radiation disrupt hydrogen bonds in dsDNA // Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics. – 2006. – V.44 (18). – P. 2740–2747.
102. Swanson E. Modelling DNA Response to THz Radiation // Phys. Rev. E. – 2010.

103. Reimers J.R. and et. al., Weak, strong, and coherent regimes of Fröhlich condensation and their applications to terahertz medicine and quantum consciousness // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – V. 106 (11). – P. 4219–4224.
104. Alexandrov B.S. Pre-melting dynamics of DNA and its relation to specific functions // Journal of Physics: Condensed Matter. – 2009. – V. 21 (3). – P. 034107.
105. Киричук В.Ф., Андронов Е.В., Мамонтова Н.В. и др. Влияние терагерцовых волн на частоте оксида азота, находящихся в скрещенных магнитном и электрическом полях, на реологические свойства крови больных нестабильной стенокардией // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2005. – № 3. – С. 34–38.
106. Креницкий А.П., Майбородин А.В., Тупикин В.Д. и др. Электродинамическая модель взаимодействия терагерцовых волн и атмосферного воздуха с биосредой в скрещенных постоянных магнитном и электрическом полях. Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2004. – № 11. – С. 35–45.
107. Андронов Е.В., Киричук В.Ф. ЭМИ ТГЧ на частоте 400 ГГц оксида азота как фактор для коррекции агрегационной активности тромбоцитов больных нестабильной стенокардии в условиях in vitro // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2006. – № 1 (11). – С. 22–27.
108. Цымбал А.А., Киричук В.Ф., Антипова О.Н. и др. Изменения уровня кортикостерона в крови у экспериментальных животных при воздействии терагерцевыми волнами на частоте атмосферного кислорода 129,0 ГГц на фоне острого и длительного стресса. Биомедицинская радиоэлектроника. – 2011. – № 8. С. 23–28.
109. Цымбал А.А. Изменения уровня кортикостерона в крови животных при воздействии терагерцевыми волнами на частоте атмосферного кислорода в норме и при стрессе // Проблемы физической биомедицины:

межрегиональный сборник научных работ с международным участием, Саратов: Изд-во СарГМУ. – 2011. – С. 319–321.

110. Киричук В.Ф., Иванов А.Н., Цымбал А.А. и др. Механизм реализации физиологических эффектов волн терагерцового диапазона на частотах оксида азота // Миллиметровые волны в биологии и медицине. – 2009. – № 3 (55). – С. 58-65.

111. Киричук В.Ф., Цымбал А.А. Использование электромагнитного излучения терагерцового диапазона на частотах оксида азота для коррекции функционального состояния щитовидной железы при стрессе // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2010. – № 4. – С. 37–40.

112. Цымбал А.А., Киричук В.Ф., Куртукова М.О. Влияние длительного стресса и терагерцового излучения на частотах оксида азота на функциональную активность щитовидной железы // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2010. – Т. 6. № 4. – С. 767–771.

113. Полина Ю.В., Родзаевская Е.Б., Наумова Л.И. Уровень кортизола и морфология надпочечников под воздействием низкоинтенсивного электромагнитного излучения при стрессе // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2008. – № 1. – С. 127–130.

114. Цымбал А.А., Киричук В.Ф., Креницкий А.П. и др. Восстановление основных показателей метаболического статуса терагерцевыми волнами на частотах оксида азота 150,176... 150,664 ГГц в условиях эксперимента // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2011. – № 1. – С. 30–35.

115. Цымбал А.А. Изменения белкового спектра крови, активности глутатион-S-трансферазы, концентрации глюкозы и церулоплазмина при воздейсгвии терагерцевыми волнами на частотах оксида азота 150,176... 150,664 ГГц при остром стрессе // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2011. – № 8. – С. 30–35.

116. Маколинец В.И. Влияние облучения волнами субмиллиметрового диапазона на некоторые проявления иммунореактивности //Медицинская реабилитация, курортология и физиотерапия . – 1996. – № 1. – С. 33-35.
117. Киселёв В.К., Кулешов Е.М., Каменев Ю.Е. Влияние гипервысокочастотного низкоинтенсивного лазерного излучения субмиллиметрового диапазона длин волн на процессы регенерации костной ткани // Техника миллиметрового и субмиллиметрового диапазонов радиоволн. – 1993. – С. 73-78.
118. Киселев В.К., Маколинец В.И., Митряева Н.А., Радионов В.П. Влияние низкоинтенсивного терагерцового лазерного излучения на динамику роста карциномы Герена // Бюллетень медицинских Интернет-конференций, V. 2, Issue 6, – 2012, – P. 322-322.
119. Chan W.L., Deibel J., and Mittleman D.M., Imaging with terahertz radiation // Rep. Prog. Phys. – 2007. – №70 (8), – P. 1325–1379.
120. Zhang X.-C., Jingzhou Xu. Introduction to THz wave photonics. N.Y.: Springer Science + Business Media. – 2009. – P. 249.
121. Berry E, Walker GC, Fitzgerald AJ, Zinov'ev NN, Chamberlain M, et al. Do in vivo terahertz imaging systems comply with safety guidelines? // Journal of Laser Applications 15. – 2003. – P. 192–198.
122. ANSI Z136.1–2007, American National Standard for Safe Use of Lasers.
123. Europian Union, T.E.P.a.t.C.o.t.E., Directive 2006/25/EC of the European Parliament and of the Council. Official Journal of the European Union, – 2006. – №114 (1). – P. 38-59.
124. IEEE C95.1–2005 , IEEE Standard for Safety Levels With Respect to Human Exposure to Radio Frequency Electromagnetic Fields, 3 kHz to 300 GHz.
125. ICNIRP Statement on Far Infrared Radiation Exposure. Health Physics. – 2006. – №91 (6). – P. 630-645.

126. ГОСТ Р 50723-94 Лазерная безопасность. Общие требования безопастности при разработки и эксплуатации лазерных изделий – 1996. – 34 с.
127. Бецкий О.В., Лебедева Н.Н., Котровская Т.И. Стохастический резонанс в медицине и биологии // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2003. – №1. – С. 3-9.
128. Tata, D.B. and Waynant, R.W. Laser therapy: A review of its mechanism of action and potential medical applications // Laser & Photon. Rev., – 2011. – №5. – P.1–12.
129. Бецкий О. В., Лебедева Н. Н. Современные представления о механизмах воздействия низкоинтенсивных миллиметровых волн на биологические объекты // Миллиметровые волны в биологии и медицине. – 2001. – № 4. – С. 5–12.
130. Зайцева Н.В. , Юрьева Т.Н., Щуко А.Г., Малышев В.В., Способ диагностики эссенциальной мезодермальной дистрофии радужки глаза // Патент России № 2255660. – 2005. – Бюл. №19.
131. Thrane L., Jacobsen R.H., Uhd Jepsen P. and et.al. THz reflection spectroscopy of liquid water // Chem. Phys. Lett. – 1995. – V. 240. – P. 330.
132. Pedersen J., Keiding S. THz time-domain spectroscopy of nonpolar liquids // J. Of Quantum Electronics. – 1992. – V. 28.
133. Kind J., Schmuttenmaer C. Far-infrared dielectric propeties of polar liquids probed by femtosecond terahertz puls spectroskopy // J. Phys. Chem. – 1996. – V. 100.
134. Morino I., Yamada K., Maki A. Terahertz measurments of rotational transitions in vibrationally exited states of N2O // J. Of Molecular Spectroscopy. – 1999. – V. 196.
135. A. J. Fitzgerald. A. J., et al., "Catalogue of human tissue optical properties at terahertz frequencies," Journal of Biological Physics, – 2003– V 29, – P. 123-128.
136. [Электронный ресурс]. URL:

http://biology.stackexchange.com/questions/8994/fibroblast-cells-and-fibers (дата обращения: 10.06.2014).

137. Беспалов В. Г., Городецкий А. А., Денисюк И. Ю. и др. Методы генерации сверхширокополосных терагерцовых импульсов фемтосекундными лазерами // Оптический журнал. – 2008. – Т. 75, №10. – С. 636–642.

138. Царев М. В. Генерация и регистрация терагерцового излучения ультракороткими лазерными импульсами. Учебное пособие. Нижний Новгород: Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, – 2011. – 75 с.

139. Lee Y.-S. Principles of Terahertz Science and Technology. Springer, – 2009. – 337 p

140. Xu J., X.-C. Zhang THz science, technology and applications // Peking University Press. – 2007. – 70 p.

141. Shapiro H.M. Practical Flow Cytometry. NJ: John Wiley & Sons .Inc , – 2003. – 681 p.

142. Дука М.В., Кудрявцев И.В. , Серебрякова М.К. др. Исследование воздействия широкополосного терагерцового излучения на функциональную активность клеток // «Оптический журнал» , – 2013. – Т. 84 №11. – С. 16-23.

143. Cottet-Rousselle C., Ronot X., Leverve X. and et.al. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes // Cytometry A. – 2011. – V. 79 (6). – P. 405-425.

144. Wlodkowic D., Telford W., Skommer J. and et.al. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death // Methods Cell Biol. – 2011. – V. 103. – P.55-98.

145. Цуркан М.В., Кудрявцев И.В. , Серебрякова М.К. и др. Воздействие излучения диапазона 0,05-1,2 ТГц на мембранный потенциал митохондрий // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. 2013. – №4 (86). – С. 56-61.

146. Idziorek T., Estaquier J., De Bels F., Ameisen J.C. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability // J. Immunol. Methods. – 1995. – V. 185. №2. – P. 249-258.
147. Stokes L., Jiang L.H., Alcaraz L. and et.al. Characterization of a selective and potent antagonist of human P2X(7) receptors, AZ11645373 // Br.J.Pharmacol. – 2006. – V. 149. №7. – P. 880-887.
148. Glisic-Milosavljevic S., Waukau J., Jana S., and et. al. Comparison of apoptosis and mortality measurements in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using multiple methods // Cell Prolif. – 2005. – V. 38. №5. – P. 301-311.
149. Pozarowski P., Darzynkiewicz Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry // Methods Mol.Biol. – 2004. – V. 281. – P.301-311.
150. Darzynkiewicz Z., Huang X. Analysis of cellular DNA content by flow cytometry // Curr. Protoc. Immunol. – 2004. – 160 p.
151. Tsurkan M.V., Smolyanskaya O.A., Bespalov V.G. and et.al. Changing growth of neuritis of sensory ganglions by terahertz radiation // Proc. Of SPIE, – 2012. – P. 82610S-1 – 82610S-8.
152. Мунзарова А.Ф., Зеленцов Е.Л., Козлов А.С. Воздействие терагерцового лазерного излучения на агрегацию эритроцитов здоровой крови // Вестник НГУ. – 2013. – Т. 8. № 2. – С. 117-123.
153. Дука М.В., Дворецкая Л.Н., Бабелкин Н.С. и др. Численное и экспериментальное исследование механизмов влияния широкополосного импульсного терагерцевого излучения на нервные клетки // Квант. электроника. – 2014. – № 44 (8). – С.707–712.
154. Пол Дж. Культура клеток и тканей. М.: Медгиз, – 1963. – 347 с.
155. Гаврилюк Б.К., Сафронов В.Л. Органотипическое культивирование тканей. М.: Наука, – 1983. – 128 с.
156. Гичев Ю.П., Граудиня Ж.П. Культура ткани печени в гепатологии. Новосибирск: Наука, – 1986. – 88 с.

157. Низамов Р.С., Киясов А.П., Алимов И.М. и др. Иммуногистохимическое изучение фенотипов клеток в органотипической культуре печени эмбрионов крыс // Цитология. – 2001. – Т. 43. №1. – С. 92-98.

158. Цуркан М. В., Смолянская О. А., Брянцева Н. Г. Воздействие терагерцового излучения на рост нейритов // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. – 2013. – Т.1 (83) . – С. 60-65.

159. Sulatsky M. I., Duka M. V.,Smolyanskaya O. A. Stimulation of Neurite Growth under Broadband Pulsed THz Radiation // Physics of Wave Phenomena. – 2014. – V. 22. № 3. – P. 197–201.

160. Roenne C., Thrane L., Astrand P.O. and et. al. Investigation of the temperature dependence of dielectric relaxation in liquid water by THz reflection spectroscopy and molecular dynamics simulation // J Chem Phys. – 1997. – V. 107. – P. 5319-5331.

161. Wilmink G.J. Ibey B.L. and et. al. Development of compact terahertz time-domain spectrometer for the measurement of the optical properties of biological tissues//Journal of Biomedical Optics. – 2011. – V.16 (4). – 54 p.

162. Yee K.S. Numerical solution of initial boundary value problems involving Maxwell’s equations in isotropic media // IEEE Trans. Antennas Propag. – 1966. – V. 14. – P. 302–307.

163. Куклин Д. В. «Применение метода конечных разностей во временной области для расчета волновых процессов в протяженных подземных проводниках», Труды Кольского научного центра РАН, – 2011. – № 4. – 112 с.

164. Ronne C., Astrand P.-O., Keiding S.R. THz Spectroscopy of Liquid H20 and D20 // Physical Review Letters. – 1999. – V. 82. – P. 2888-2891.

165. Naftaly M., Miles R.E. Terahertz Time-Domain Spectroscopy for Material Characterization (Citations: 14) // Proceedings of the IEEE. – 2007. – V. 95 (8). – P. 1658 – 1665.

166. T.Globus, et all, Low-Terahertz spectroscopy of liquid water // Terahertz Physics, Devices, and Systems II, Terahertz Physics, Devices and Systems II // Proc. of SPIE. – 2007. – V. 6772. – 67720S-1–67720S-11.

167. Roggenbuck A., Schmitz H., Deninger A. and et.al. Coherent broadband continuous-wave terahertz spectroscopy on solid-state samples // New J. Phys. – 2010. – 12. – 043017.

168. Exter M., Fattinger Ch., Grischkowsky D. Terahertz time-domain spectroscopy of water vapor // Opt. Lett. 14, – 1989.– P. 1128-1130.

169. Markelz A., THz time domain spectroscopy of biomolecular conformational modes // Phys. Med. Biol. – 2002. – V. 47. – P.3 797–3805.

170. Fischer B.M. Far-Infrared vibrational modes of DNA components studied by terahertz time-domain spectroscopy. // Phys. Med. Biol. – 2002. .– V. 47. .– P. 3807 – 3814.

171. Rahman A., Stanley B., Rahman A.K. Ultrasensitive label-free detection and quantitation of DNA hybridization via terahertz spectrometry. // Proc. of SPIE. .– 2010. .– V. 7568.

172. Globus T. and et. al. Terahertz characterization of dilute solutions of DNA // Biomedical Vibrational Spectroscopy III: Advances in Research and Industry, Proc. of SPIE. – 2006. – V. 6093.

173. Globus T.R., Woolard D.L., Samuels A.C. Submillimeter-wave Fourier transform spectroscopy of biological macromolecules // J. of Appl. Phys. – 2002. – V. 91.

174. Цуркан М.В., Балбекин Н.С., Собакинская Е.А. и др. Исследование спектра ДНК методами ТГц спектроскопии. Оптика и спектроскопия // Оптика и Спектроскопия. – 2013. – Т. 114. № 6. – С. 981–986.

175. Цуркан М.В., Собакинская Е.А., Смолянская О.А. и др. Исследование спектра молекулы ДНК в терагерцовой области частот//Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. – 2012. – № 1 (77). – С. 15.

176. Yan W.-B. Trace gas analysis by diode laser cavity ring-down spectroscopy, Test and Measurement Applications of Optoelectronic Devices // Proceedings of SPIE. – 2002. – Vol. 4648. – P. 156.

177. Langridge J. M. and et. all., Cavity enhanced absorption spectroscopy of multiple trace gas species using a supercontinuum radiation source // OPTICS EXPRESS. – 2008. – Vol. 16.

178. Crosson, E. R. and et. al. Stable isotope ratios using cavity ring-down spectroscopy: Determination of 13C/12C for carbon dioxide in human breath // Anal. Chem. – 2002. – V.74 (9). – P.2003-2007.

179. McGarvey T. Finesse and sensitivity gain in cavity-enhanced absorption spectroscopy of biomolecules in solution // OPTICS EXPRESS. – 2006. – V. 14. P. 10441-10451.

180. Parthasarathy R. and et. all. Dielectric properties of biological molecules in the Terahertz gap // Appl. Phys. Lett. – 2005. – V. 87. – P. 113901-113903.

181. Alexandrov, B.S., et al., DNA breathing dynamics in the presence of a terahertz field // Physics Letters A. – 2010. – V.374 (10). – P. 1214–1217.

182. Шигаев А.С. Пономарёв О.А. Лахно В.Д. Теоретические и экспериментальные исследования открытых состояний ДНК. – 2013.– 664 с.

183. Armitage B. Photocleavage of Nucleic Acids. Chemical Reviews. – 1998. – V. 98. – P. 1171–1200.

184. Kawanishi S., Hiraku Y., Oikawa S. Mechanism of guanine- specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging // Mutation Research. – 2001. – V. 488. – P. 65–76.

185. Kino K., Sugiyama H. Possible cause of G-C→C-G transversion mutation by guanine oxidation product, imidazolone // Chemistry & Biology. – 2001.– V. 8. – P. 369–378.

186. Wagenknecht H.-A. Electron transfer processes in DNA: mechanisms, biological relevance and applications in DNA analytics // Natural Product Reports. – 2006. – V. 23. – P. 973–1006.

187. Genereux J.C., Boal A.K., Barton J.K. DNA-mediated Charge Transport in Redox Sensing and Signaling // Journal of American Chemical Society. – 2010. – V. 132. – P. 891–905.
188. Sontz P.A., Mui T.P., Fuss J.O and et.al. DNA charge transport as a first step in coordinating the detection of lesions by repair proteins // PNAS USA. – 2012. – V. 109. – P. 1856–1861.
189. Sontz P.A., Muren N.B., Barton J.K. DNA Charge Transport for Sensing and Signaling // Accounts of Chemical Research. – 2012. – V. 45. – P. 1792–1800.