

Ю. С. Ольшевская<sup>1</sup>, А. С. Козлов<sup>2</sup>, А. К. Петров<sup>2</sup>,  
Т. А. Запара<sup>1</sup>, А. С. Ратушняк<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Конструкторско-технологический институт вычислительной техники СО РАН  
ул. Институтская, 6, Новосибирск, Россия  
E-mail: ratush@mail.ru

<sup>2</sup> Институт химической кинетики и горения СО РАН  
ул. Институтская, 3, Новосибирск, Россия

## ВЛИЯНИЕ ТЕРАГЕРЦОВОГО (СУБМИЛЛИМЕТРОВОГО) ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

В рамках задачи выявления механизмов действия терагерцового (субмиллиметрового) излучения на биологические объекты проведен экспериментальный анализ его влияния на процессы трансмембранного транспорта в клеточных системах. Комплекс исследований с использованием красителей, которые не проникают через интактные мембраны (Трупан Blue) и выявляющих жизнеспособные клетки (BCECF-AM), а так же электрофизиологический анализ показал, что излучение с длиной волны 130 мкм создает условия проникновения в живые клетки не проникающих в норме соединений. Возможно, проникновение красителя обусловлено обратимыми нарушениями барьерных свойств мембраны нейронов, возникающими при воздействии 130 мкм волн. Излучение с длиной волны 150 мкм таких свойств не проявляет. Полученные результаты, вероятно, открывают перспективу разработки методов направленной транспортировки в клетки биологически активных соединений.

*Ключевые слова:* терагерцовые волны, субмиллиметровое излучение, лазер на свободных электронах, нейроны, проницаемость клеточных мембран.

Yu. S. Ol'shevskaya, A. S. Kozlov, A. K. Petrov, T. A. Zapara, A. S. Ratushnyak

### CELL MEMBRANE PERMEABILITY UNDER THE INFLUENCE OF TERAHERTZ (SUBMILLIMETER) LASER RADIATION

Within the framework of the task of revealing the mechanisms of the action of terahertz (submillimeter) radiation on biological objects, the influence of terahertz (submillimeter) radiation on the processes of transmembrane transport in cell systems was experimentally analyzed. Complex research using dyes which do not penetrate through intact membranes (Trypan Blue) and reveal viable cells (BCECF-AM) together with electrophysiological analysis has shown that radiation with a 130-micron wavelength creates conditions for penetration of compounds that usually do not go through the membrane of living cells. The penetration of dye may be conditioned by reversible disturbance in the barrier properties of neuron membranes under the action of 130-micron waves. Radiation with a wavelength of 150 microns does not show such properties. The received results may offer the challenge of developing methods of directed transport of biologically active compounds into cells.

*Keywords:* terahertz waves, submillimeter radiation, free-electron laser, neurons, cell membrane permeability

### Введение

Перспективы использования новых источников когерентного не ионизирующего излучения в диапазоне терагерцовых волн для медицинской диагностики [1–2], создания систем безопасности [3] делают актуальными фундаментальные задачи выявления механизмов его действия на биологические объекты. В рамках этой задачи представляется важным изучение влияния

такого излучения на процессы трансмембранного транспорта в клеточных системах. Подобные исследования представляют как теоретический, так и практический интерес. Роль транспорта в осуществлении живой клеткой своих базовых функций чрезвычайно широка. Он играет роль как в основных гомеостатических реакциях клеток, в поддержании жизнедеятельности так и в органо- и тканеспецифических процессах [4]. Контроль и возможность направленной мо-

дификации трансмембранного транспорта позволит управлять многими реакциями, улучшать введение в клетки различных биологически активных соединений и фармакологических препаратов. Особенно это важно в задачах направленной модификации клеток при биотехнологических и генно-инженерных работах и исследованиях. В данной работе проведен экспериментальный анализ воздействия субмиллиметрового лазера на проницаемость клеточных мембран.

### Методы

Работа проведена на изолированных культивируемых вне организма нейронах моллюска *Lymnaea stagnalis*. Для получения изолированных нейронов использовали методику, сочетающую ферментативную обработку окологлоточных ганглиев с последующей механической дефрагментацией клеточных агрегатов [5]. Ферментативная обработка ганглиев проводилась в физиологическом растворе, содержащем 0,3–0,5 % протеазы (Protease type XIV, Sigma, USA) в течение 12–18 часов при температуре +4°C. Культивирование осуществлялось в физиологическом растворе следующего состава (мМ): NaCl (55), KCl (1,6), CaCl<sub>2</sub> (4), MgCl<sub>2</sub> (1,5), NaHCO<sub>3</sub> (10) с pH 7,6–7,8 без добавок аминокислот при температуре 6–10 °С, в специальных камерах на пластиковой подложке, прозрачной для волн исследуемого диапазона. Воздействие терагерцовыми волнами проводили в этих же камерах объемом 0,5–1 мл при температуре 20–24 °С. Температуру регистрировали электронным термометром, датчик которого помещался в рабочую камеру вне поля действия излучения.

Исследовали влияние лазера на свободных электронах (Сибирского центра фотохимических исследований) В экспериментах использовались излучение с длиной волны 130 и 150 мкм при средней мощности от 0,5 до 20 мВт/см<sup>2</sup> и экспозиции 10 с. Величина мощности регулировалась перемещением рабочей камеры относительно отражателя со сферической поверхностью размещенного в луче лазера и измерялась измерителем средней мощности ИМО-3 в плоскости объекта.

Функциональное состояние электровозбудимых клеток оценивали по мембранному потенциалу нейронов [6]. Регистрацию проводили по стандартной методике внутриклеточного отведения стеклянными микроэлектродами (сопротивление 30–60 МОм), заполненными 2,5 М KCl. Сигнал усиливался, преобразовывался с помощью аналогоцифрового преобразователя (L-CARD, Россия) и фиксировался вычислительным комплексом.

Жизнеспособность клеток и целостность мембраны определялась с помощью красителей: трипанового синего (Trypan Blue, Sigma) используемого, для селективного окрашивания мертвых клеток (947Da) [7] и флуоресцентного красителя BCECF-AM (Invitrogen) проникающего в клетку и активируемого внутриклеточными ферментными системами [8].

Усредненные результаты представлены как mean + SEM (среднее ± стандартная ошибка среднего). Достоверность различий между группами нейронов оценивались по критерию U (Манна-Уитни).

### Результаты и обсуждение

Ранее было обнаружено, что излучение в терагерцовом диапазоне может оказывать влияние на морфологию и регенерацию нейронов [9]. Для проверки предположения, что излучение в терагерцовом диапазоне может оказывать дестабилизирующий эффект на клеточные мембраны был применен бензидиновый краситель проникающий только в клетки с поврежденными мембранами - трипановый синий.

Обнаружили, что воздействие излучения с длиной волны 130 мкм приводит к появлению клеток окрашенных трипановым синим. Так как этот краситель может проникать в клетки только через сквозные гидрофильные поры в мембране то можно предположить, что такие поры образуются при облучении на данной длине волны.

Обнаружена зависимость количества окрашенных нейронов от мощности излучения на длине волны 130 мкм (рис. 1). Такое воздействие на нейроны приводило и к появлению разрушенных клеток (через 0,5–2 часа). Однако морфологические характеристики некоторых клеток захватив-

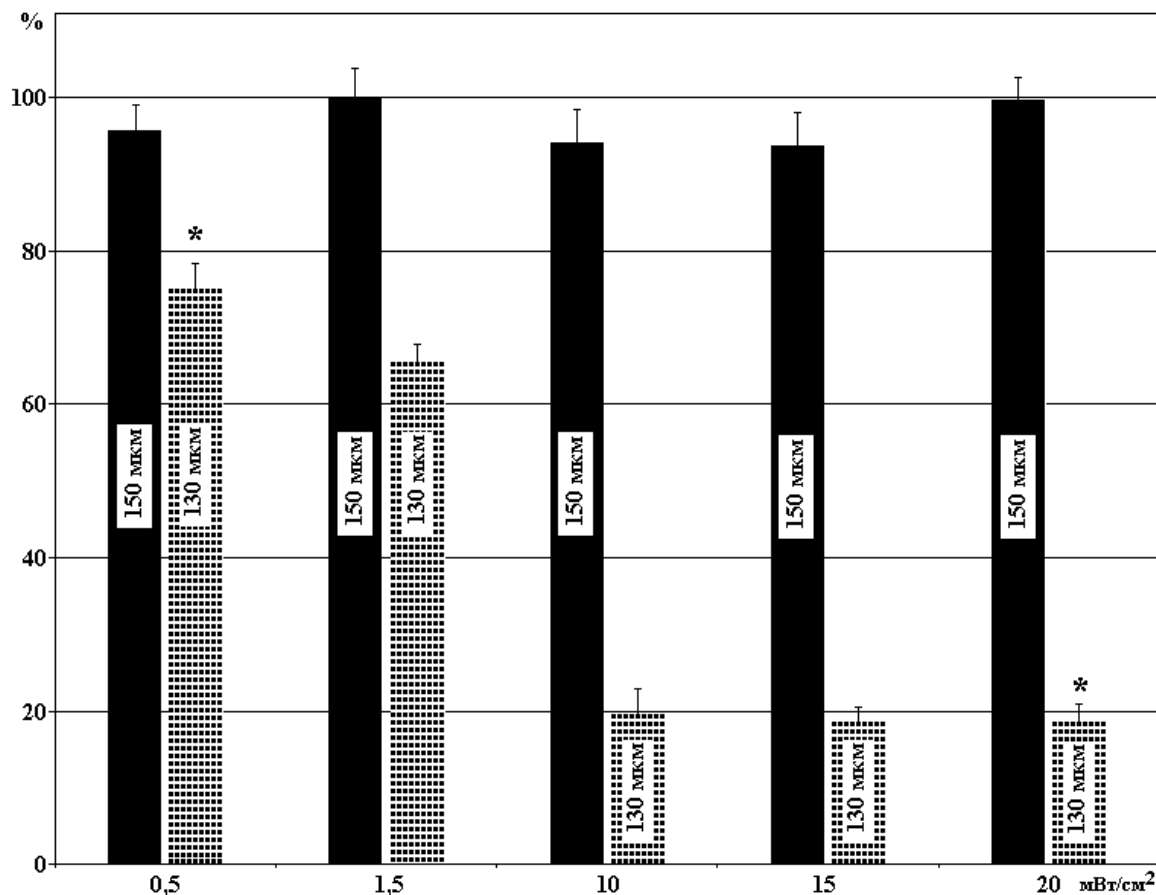


Рис. 1. Зависимость количества жизнеспособных клеток (не окрашенных Тгуран Blue) от длины волны и мощности излучения в процентах от общего количества подвергнутых воздействию излучения клеток. По оси ординат: процент жизнеспособных клеток от общего количества исследованных. По оси абсцисс: мощность излучения

ших краситель не отличались от живых. В этих клетках краситель, как правило, распределялся неравномерно, в отдельных их регионах (рис. 2, а). Число таким образом окрашенных клеток не увеличивалось в процессе дальнейшей инкубации с красителем (24–48 часов).

При облучении клеток в тех же условиях, но с длиной волны 150 мкм были отмечены только единичные равномерно окрашенные нейроны (см. рис. 1).

Основу клеточных мембран составляет бимолекулярный слой фосфолипидов. Непрерывность бислоя фосфолипидов, которые относятся к жидким кристаллам, определяет барьерные и механические свойства клетки. Возможно, что излучение в терагерцовом диапазоне, как и другие внешние воздействия (тепловые флуктуации поверхно-

сти бислоя, осмотическое давление, перекисное окисление липидов) может вызвать нарушение непрерывности бислоя фосфолипидов с образованием структурных дефектов типа сквозных гидрофильных пор. Известно, что радиус гидрофильных пор, возникающих в мембранах при повреждающих воздействиях, колеблется от 2 до 9 нм [10]. Такие поры в отличие от белковых ионных каналов не обладают выраженной избирательностью, они пригодны для транспорта ионов, молекул воды и высокомолекулярных веществ [4]. Если поры в процессе образования приобретают размеры, соизмеримые с толщиной мембраны может происходить ее разрушение [10].

Размеры возникших гидрофильных липидных пор после прекращения дестабилизирующего воздействия благодаря процессу

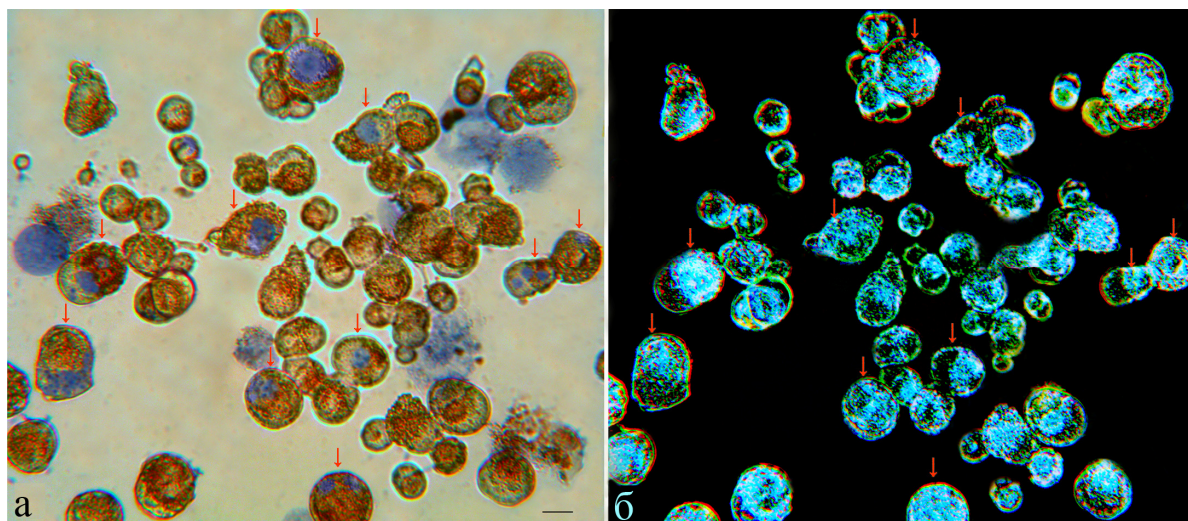


Рис. 2. Нервные клетки после воздействия лазерного излучения с длиной волны 130 мкм и мощностью 0,5 мВт: а – световая микроскопия с красителем Трипан Blue; б – флуоресцентная микроскопия с красителем BCECF-AM. Стрелками отмечены клетки окрашенные Трипан Blue (а) и Трипан Blue + BCECF-AM (б)

“затекания” могут сокращаться до размеров недостаточных для прохождения гидратированных ионов и высокомолекулярных веществ [11].

Для проверки предположения, что воздействие такого излучения может вызвать обратимые нарушения барьерных свойств мембраны, была проведена регистрация основной интегральной характеристики клетки – мембранного потенциала нейронов после воздействия излучения длиной волны 130 мкм.

Внутриклеточная микроэлектродная регистрация проводилась через сутки. Было обнаружено, что нейроны, не окрашенные трипановым синим, и клетки в которых этот краситель распределялся неравномерно, в отдельных регионах имеют нормальные для электровозбудимых клеток значения мембранного потенциала (порядка 60–70 мВ). Мембранный потенциал клеток равномерно окрашенных трипановым синим, был, как правило, пониженным или нулевым.

Другой вариант проверки жизнеспособности клеток был проведен с использованием красителя BCECF-AM. Краситель может проникать через неповрежденную плазматическую мембрану, и внутриклеточными эстеразами живых нейронов преобразовать-

ся во флуоресцентную форму BCECF. Была обнаружена флуоресценция не окрашенных клеток и некоторых клеток, захвативших трипановый синий (рис. 2, б). Это свидетельствует о том, что их мембрана способна к восстановлению после повреждения, и удержанию флуоресцентных зондов, приобретающих отрицательный заряд внутри клеток.

### Заключение

Комплекс проведенных исследований показывает, что излучения длиной волны 130 мкм может вызывать обратимые нарушения барьерных свойств мембраны нейронов. Излучение с длиной волны 150 мкм таких свойств не проявляет. Для определения молекулярных механизмов выявленных эффектов излучения на мембраны и возможности использования их для направленной транспортировки в клетки веществ с молекулярной массой больше, чем 947 Да необходимы дальнейшие исследования.

### Список литературы

1. Ashworth P. C., Pickwell-MacPherson E., Provenzano E. Terahertz pulsed spec-

trospecty of freshly excised human breast cancer // *Opt Express*. 2009. Vol. 17 (15). P. 12444–12454.

2. *Suen J. Y., Tewari P., Taylor Z. D. et al.* Towards medical terahertz sensing of skin hydration // *Stud. Health Technol. Inform.* 2009. Vol. 142. P. 364–368.

3. *Shen F., Ying Y. B.* Applications of terahertz spectroscopy and imaging techniques in food safety inspection // *Article in Chinese Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*. 2009. Vol. 29 (6). P. 1445–1449.

4. *Крутецкая З. И., Лонский А. Б.* Биофизика мембран. СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 1994. 287 с.

5. *Костенко М. А.* // *Цитология*. 1972. Т. 14, № 10. С. 1274–1278.

6. *Николлс Дж. Г., Мартин А. Р., Валлас Б. Дж. и др.* Ионные механизмы потенциала покоя // *От нейрона к мозгу*. М.: Едиториал УРСС, 2003. С. 88–101.

7. *Phillips H. J.* *Tissue Culture: Methods and Application* / Eds. P. K. Kruse, M. K. Patterson. N. Y., 1973. P. 406–408

8. *Michelle T. Z., Spence Ph. D.* pH indicators. *The Handbook: A guide to fluorescent probes and labeling technologies*, 2005. P. 937–955.

9. *Ольшевская Ю. С., Козлов А. С., Петров А. К. и др.* Влияние на нейроны терагерцового (субмиллиметрового) лазерного излучения // *ЖВНД*. 2009. Т. 59, № 3. С. 342–348.

10. *Sukharev S. I., Klenchin V. A., Serov S. M. et al.* Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores // *Biophys. J.* 1992. Vol. 63. No. 5. P. 1320–1327.

11. *Powell K. T., Weaver J. C.* Gel microdroplets and flow cytometry: rapid determination of antibody secretion by individual cells within a cell population // *Biotechnology*. 1990. Vol. 8. No. 4. P. 333–337.

08.09.2010