

Р.О. Шаталова¹, С.А. Гурова¹, В.А. Ревкова², И.В. Ильина³, Д.С. Ситников³

ВЛИЯНИЕ МОЩНОГО НЕИОНИЗИРУЮЩЕГО ТЕРАГЕРЦОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ЗДОРОВЫЕ И ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА НЕЙРАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

¹Обнинский институт атомной энергетики – Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»
(Московский инженерно-физический институт), Обнинск.²Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи
и медицинских технологий ФМБА России, Москва.³Объединенный институт высоких температур РАН, Москва

Контактное лицо: Дмитрий Сергеевич Ситников: sitnik.ds@gmail.com

РЕФЕРАТ

Цель: Изучение влияния мощного импульсного когерентного неионизирующего терагерцового (ТГц) излучения на формирование фокусов двунитевых разрывов ДНК и пролиферативную активность нейрональных клеток человека.

Материал и методы: Облучаемые клеточные культуры – нейральные прогениторные клетки, полученные методом прямого репрограммирования (drNPCs), клетки нейробластомы (SK-N-BE). Облучение клеток осуществляется последовательностью импульсов ТГц-излучения с пиковой удельной мощностью ~20 ГВт/см² и напряженностью электрического поля 2,8 МВ/см.

Результаты: Показано, что непродолжительное воздействие (30 мин) не оказывает влияние на пролиферативную активность как нейральных прогениторных клеток, так и клеток нейробластомы. ТГц-излучение не вызывает значимого увеличения фокусов γH2AX ни в одной из исследуемых линий клеток.

Ключевые слова: неионизирующее излучение, терагерцовое излучение, гистон H2AX, пролиферативная активность, нейральные стволовые клетки, нейробластома SK-N-BE

Для цитирования: Шаталова Р.О., Гурова С.А., Ревкова В.А., Ильина И.В., Ситников Д.С. Влияние мощного неионизирующего терагерцового излучения на здоровые и опухолевые клетки человека нейрального происхождения // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2021. Т. 66. № 5. С.5–10.

DOI: 10.12737/1024-6177-2021-66-5-5-10

Введение

Гипотеза о возможности электромагнитного излучения оказывать влияние на внутриклеточные процессы была высказана еще несколько десятилетий назад [1]. В настоящий момент в научной общественности устоялись два подхода к оценке механизмов воздействия неионизирующего излучения терагерцового диапазона. Помимо теплового (в силу сильного поглощения ТГц-излучения водой в клетках), поддерживается механизм нетермического воздействия. Согласно последнему, ТГц-излучение участвует в формировании когерентных мод, способных оказывать влияние на кинетику биологических процессов. В частности, влияние ТГц-излучения на ДНК (включая формирование двуцепочечных разрывов), было предсказано в теоретической работе Б.С. Александрова и соавт. [2, 3] и оказывать влияние на проницаемость мембран [4, 5], но и менять паттерны метилирования ДНК [6]. Было показано, что деметилирование ДНК в опухолевых клетках позволяет восстановить экспрессию проапоптотических генов. В работе [7] констатировали различную чувствительность разных типов нейрональных клеток к ТГц-облучению, связанную с подавлением экспрессии синаптических белков SYN и PSD95. В других исследованиях отмечалось временное увеличение проницаемости мембран в клетках линии фетохромоцитомы (PC12) [8] и пирамидальных клетках гиппокампа [9]. Также отмечалось, что ТГц-излучение может подавлять пролиферацию опухолевых стволовоподобных клеток в линиях гепатокарциномы печени (Huh7 и Hep3B), а также пролиферацию опухолевых клеток рака шейки матки (HeLa) и нейробластомы (SH-SY5Y).

Появление двуцепочечных разрывов ДНК может инициировать геномную нестабильность здоровых клеток и привести к их злокачественной трансформации. Ключе-

вым компонентом репарации ДНК является гистон H2AX, который быстро фосфорилируется по четырем остаткам серина от карбоксильного конца с образованием γH2AX на формирующихся сайтах двунитевых разрывов (ДВР) [10]. В течение 30 мин, после образования ДВР большое количество молекул γH2AX формируется в хроматине вокруг места разрыва, создавая фокус, в котором накапливаются белки, участвующие в репарации ДНК и ремоделировании хроматина. Как это ни парадоксально, индукция ДВР может быть как причиной злокачественной трансформации клеток, так и стать способом лечения [11].

В данной работе проведен сравнительный анализ пролиферативной активности нейральных прогениторных клеток (drNPC) и клеток нейробластомы (SK-N-BE) человека, облученных мощным неионизирующим излучением терагерцового диапазона. Кроме того, определили влияние ТГц-излучения на формирование фокусов фосфорилирования гистона H2AX в данных типах клеток.

Материал и методы

Описание системы ТГц-установки для облучения клеток

Для облучения клеток импульсами мощного терагерцового излучения была собрана экспериментальная установка, подробно описанная в работе [12] и представленная на рис. 1 (а). Источником ТГц-излучения является органический кристалл OH1 (6) [(2-(3-(4-гидроксистирил) - 5,5-диметилцикло-гекс-2-енилиден) малонитрил] (Rainbow Photonics, Швейцария), накачка которого осуществляется инфракрасными импульсами лазерного излучения фемтосекундной длительности. Лазерная установка (1) (ООО Авеста, Россия) на основе кристалла хром:форстерит обеспечивает генерацию импульсов длительностью 115 ± 5 фс на длине волны 1240 нм с энергией 1,1 ± 0,05 мДж,

следующих с частотой 100 Гц. На выходе из нелинейного кристалла ОН1 формируется импульс ТГц-излучения длительностью $\sim 0,5$ пс, с шириной спектра 0,2-3 ТГц (рис. 1 б) и (в)) и энергией более десяти микроджоулей [13]. Узел поляризационного ослабителя (3) и линзовый телескоп (4) используются для создания оптимальной плотности энергии в кристалле (6). Эффективность преобразования лазерного излучения в терагерцовое составляет 2–3 %. Для отсечения лазерного излучения, непосредственно после кристалла ОН1 устанавливался ТГц фильтр (LPF8,8-47, ООО Тидекс, Россия) с пропусканием в ТГц области ~ 70 %. Для достижения максимальной интенсивности (и, соответственно, напряженности электрического поля) ТГц-импульсов при облучении клеток необходимо сфокусировать ТГц-излучение в пятно минимального размера. Эта задача решается с использованием зеркального телескопа (7) и параболического зеркала (8) с относительным отверстием 1:1.

Облучаемая клеточная культура (10) на дне чашки Петри (9) с пластиковым дном помещается в фокальную плоскость указанного зеркала. Для поддержания оптимальных условий во время облучения используется инкубационная ячейка (11) (Ibidi, Германия), закрепленная на трехкоординатном моторизованном столике (12). Для упрощения процесса установки чашки Петри в схеме было собрано плечо оптического контроля. В нем использовалась схема инвертированного микроскопа, состоящего из микрообъектива (13) (40 $\times$, NA=0,6) и ПЗС-камеры (14) (VSC-756-USB, ООО Видеоскан, Россия). Моторизованный столик (12) позволял перемещать чашку Петри между «терагерцовым» и «оптическим» плечом. Резкое изображение клеток на дисплее видеокамеры означало располо-

жение монослоя клеток в плоскости перетяжки ТГц-пучка. Терагерцовая часть схемы собрана в осушаемом боксе (15), наполненном осушаемым воздухом из осушителя (16) (ADS3, Сессато) с помощью безмасляного компрессора (17) (SB4-100.OLD15T, Remeza).

Культивирование НСК (drNPCs) и клеток нейробластомы человека (SK-N-BE)

Нейральные прогениторные клетки человека (drNPCs) были любезно предоставлены компанией New World Laboratories, Inc. (Laval, QC). Клетки поддерживали в культуральной среде для пролиферации NeuroCult-NS-A #05750, #05753 StemCell Technologies; Канада) с добавлением 1 % B27 (#17504044, Gibco, США), 20 нг/мл EGF (#713008, Biolegend, США) и 40 нг/мл FGF2) (#571506 Biolegend, США) на чашках Петри (TPP, Швейцария), покрытых матригелем в разведении 1:200 (#356234, Matrigel Basement Membrane Matrix, BD biosciences, США). Клетки нейробластомы (SK-N-BE) культивировали в DMEM/F12 (Gibco, USA), с добавлением 10 % ФБС (Gibco, USA), 2 mM L-глутамин (GlutaMAX, (Gibco), 1 %-го раствора антибиотика-антимикотика (Gibco, USA). Клетки культивировали в условиях инкубатора в чашках Петри при 37 °C и 5 % CO₂. За сутки до эксперимента клетки пересевали переносили в культуральные чашки с полимерным дном и специальными силиконовыми вставками (ibidi, №80466). Для этого клеточную линию обрабатывали раствором Accutase (#07920 StemCell Technologies; Canada), подсчитывали общее количество клеток и переносили в культуральные чашки в концентрации $5 \cdot 10^4$ клеток/см². Для поддержания кислотно-основного баланса среды во

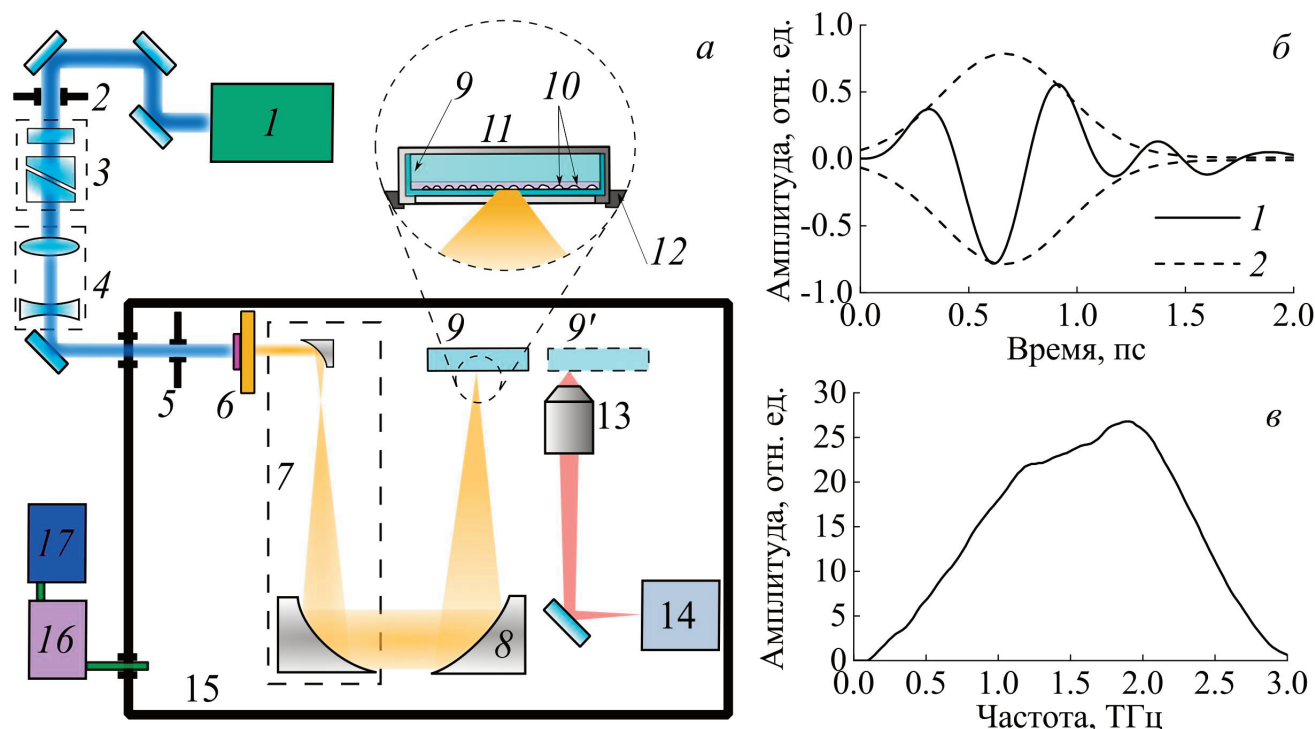


Рис. 1. а) Схема экспериментальной установки: 1 – фемтосекундный лазер, 2, 5 – ирисовые диафрагмы, 3 – поляризационный ослабитель, 4 – линзовый телескоп, 6 – кристалл ОН1 с фильтром, 7 – зеркальный телескоп, 8 – фокусирующее параболическое зеркало, 9 и 9' – чашка Петри в ТГц и видео-каналах, 10 – клетки, 11 – инкубационная ячейка, 12 – трехкоординатный столик, 13 – микрообъектив, 14 – ПЗС-камера, 15 – осушаемый бокс, 16 – адсорбционный осушитель, 17 – воздушный компрессор. б) временной профиль ТГц-импульса: 1 – профиль электрического поля, 2 – гауссова огибающая; в) спектр ТГц импульса

Fig. 1. а) Experimental scheme: 1 – femtosecond laser, 2, 5 – iris diaphragms, 3 – polarizing attenuator, 4 – lens telescope, 6 – OH1 crystal with THz filter, 7 – mirror telescope, 8 – focusing parabolic mirror, 9 and 9' – Petri dish in THz and video channels, 10 – cells, 11 – incubation cell, 12 – 3D motorized stage, 13 – microobjective, 14 – CCD camera, 15 – drying box, 16 – adsorption dryer, 17 – air compressor. б) time profile of a THz pulse: 1 – electric field profile, 2 – Gaussian envelope; в) THz pulse spectrum

время облучения, предварительно к культуральной среде добавляли раствор 15 мМ HEPES (Gibco). Подготовленные чашки были разделены на 2 группы для каждой линии клеток: экспериментальную (подвергаемую воздействию импульсов ТГц-излучения) и группу параллельного контроля (содержащуюся в тех же условиях, но без внешнего ТГц воздействия). Для включения EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) в ДНК за сутки до облучения добавляли заранее приготовленный раствор EdU к клеточной культуре в конечной концентрации 10 мкМ в ДМСО (ThermoFisher Click-iT® Alexa Fluor 647 Plus EdU, Carlsbad, CA, USA).

Облучение клеток

Облучение клеточной культуры осуществлялось в течение заданного времени 30 мин последовательностью импульсов ТГц-излучения, следующих с частотой $f_p = 100$ Гц. Размер облученной области клеток определялся размером сфокусированного ТГц-пучка ~ 490 мкм по уровню $1/e^2$. Энергия терагерцевых импульсов, достигающих клеточной культуры, с учетом пропускания через пластиковое дно и воздушную атмосферу в боксе (влажность 2–3 % при нормальных условиях) составляла $W_{THz} = 11,5$ мкДж, что соответствовало пиковой мощности импульса $P_{peak} \approx 37$ ГВт. Методика оценки значений пиковой удельной мощности и напряженности электрического поля ТГц-импульса в фокальной плоскости параболы была изложена ранее в [14], а соответствующие значения составили $I_{THz} \approx 20$ ГВт/см² и $E_{THz} \approx 2,8$ МВ/см. Отличительной особенностью используемой экспериментальной установки является низкая частота следования ТГц-импульсов по сравнению с зарубежными исследованиями (как правило 1 кГц), а, следовательно, и низкое значение средней мощности ТГц-излучения $P_{av} = W_{THz} f_p = 1,1$ мВт при высоких пиковых значениях P_{peak} . Полученные ранее оценки показали, что термическое воздействие на клеточную культуру минимально, а нагрев в области воздействия не превышает 2,8 °C [15].

Иммуноцитохимический анализ

Для проведения иммуноцитохимического анализа клетки фиксировали в чашке Петри 4 %-ым раствором забуференного формалина, содержащим 0,1 % сапонина в течение 20 мин при комнатной температуре с последующей двукратной промывкой DPBS. Далее клетки инкубировали в течение 1,5 ч при 37 °C с первичными поликлональными антителами кролика против γ H2AX (разведение 1:1000, abcam11174), предварительно растворенным в DPBS с 0,5 % Triton-X100 и 0,5 % Tween 20, с добавлением 1 %-ой козьей сыворотки для блокирования неспецифического связывания антител. После инкубации клетки промывали трижды DPBS с 0,5 % Triton-X100 и 0,5 % Tween 20 и инкубировали в течение 1 часа со вторичными козьими антикроличьими IgG (H+L) антителами (конъюгированные с Alexa Fluor 488 в разведении 1:400; Invitrogen USA), также растворенными в DPBS с 0,5 % Triton-X100 и 0,5 % Tween 20, с добавлением 1 %-ой козьей сыворотки. Затем чашки Петри промывали трижды DPBS.

Для обнаружения EdU клетки фиксировали 4 %-ым раствором забуференного формалина, трижды промывали DPBS с 0,5 % Triton-X100 и 0,5 % Tween 20 и инкубировали с Click-iT® Plus реакционным коктейлем, включающим Alexa Fluor 633 в течение 1 ч. Затем чашки Петри промывали дважды DPBS и окрашивали на другие антитела согласно приведенному выше протоколу. Ядра клеток окрашивали красителем Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific).

Последующее иммунофлуоресцентное исследование проводили с использованием системы флуоресцентной визуализации CELENA® S Digital Imaging System.

Статистический анализ

Оценка количества фокусов двунитевых разрывов проводилась на основе соотношения количества гистонов γ H2AX в перерасчете на количество клеток в S-фазе в зоне облучения. Эксперимент проводили в трехкратной повторности. Данные статистического анализа представлены в виде подсчета среднего и среднеквадратичного отклонения. Анализ статистической значимости данных для малых выборок проводили с помощью критерия Стьюдента с поправкой Крамера–Уэлча. Расчет проводился по формуле:

$$T_{\text{эмп}} = \frac{\sqrt{m \times n} |\bar{x} - \bar{y}|}{\sqrt{m \times S_x^2 + n \times S_y^2}}, \quad (1)$$

где m и n – объем анализируемых выборок; $\bar{x}$ и $\bar{y}$ – среднее значение для выборок x и y соответственно; S_x^2 и S_y^2 – дисперсия значений данных выборок. Полученный результат сравнивался с $T_{\text{кр}} = 1,96$ для данных степеней свободы ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

В данной работе оценку генотоксического действия ТГц-излучения определяли с помощью количественного анализа фокусов фосфорилирования H2AX гистона (γ H2AX). Количественная оценка образованных фокусов характеризует силу воздействия и его характер. В конце 20-го века было выяснено, что одним из ранних этапов ответа клетки на возникновение двунитевых разрывов является фосфорилирование гистона H2AX по серину 139 [10]. Генотоксический стресс приводит к накоплению γ H2AX на участках повреждения ДНК всего за несколько минут после повреждения, который в дальнейшем начинает распространяться по миллионам пар оснований из этих участков повреждения. Считается, что двунитевые разрывы ДНК наиболее опасны для дальнейшей судьбы клеток, так как они могут привести к клеточной гибели или неопластической трансформации. Небольшое количество двунитевых разрывов может быть исправлено системой репарации и не оказывать влияния на жизнедеятельность клетки; наличие одиночных разрывов в клетке вообще является нормой.

Также значительное количество фокусов γ H2AX может быть обнаружено у стареющих клеток и клеток, идущих по естественному пути клеточной смерти – апоптозу. Кроме того, в S-фазе клеточного цикла клетки проходит активная репликация, которая требует деконденсированного состояния хроматина и приводит к увеличению его количества, что пропорционально повышает количество фокусов γ H2AX [16]. Поэтому оценка изменения числа фокусов фосфорилирования гистонов была проведена в клетках, находящихся не в синтетической фазе. Для идентификации клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла, использовали включение 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) в структуру ДНК EdU-тимидина, в котором концевая алкиновая группа заменяет метильную группу в 5-м положении. Он легко включается в ядерную ДНК во время репликации посредством механизма очистки, присутствующего в клетках эукариотов. В присутствии меди алкин EdU реагирует с азид-содержащим флуорохромом, образуя стабильную ковалентную связь [17].

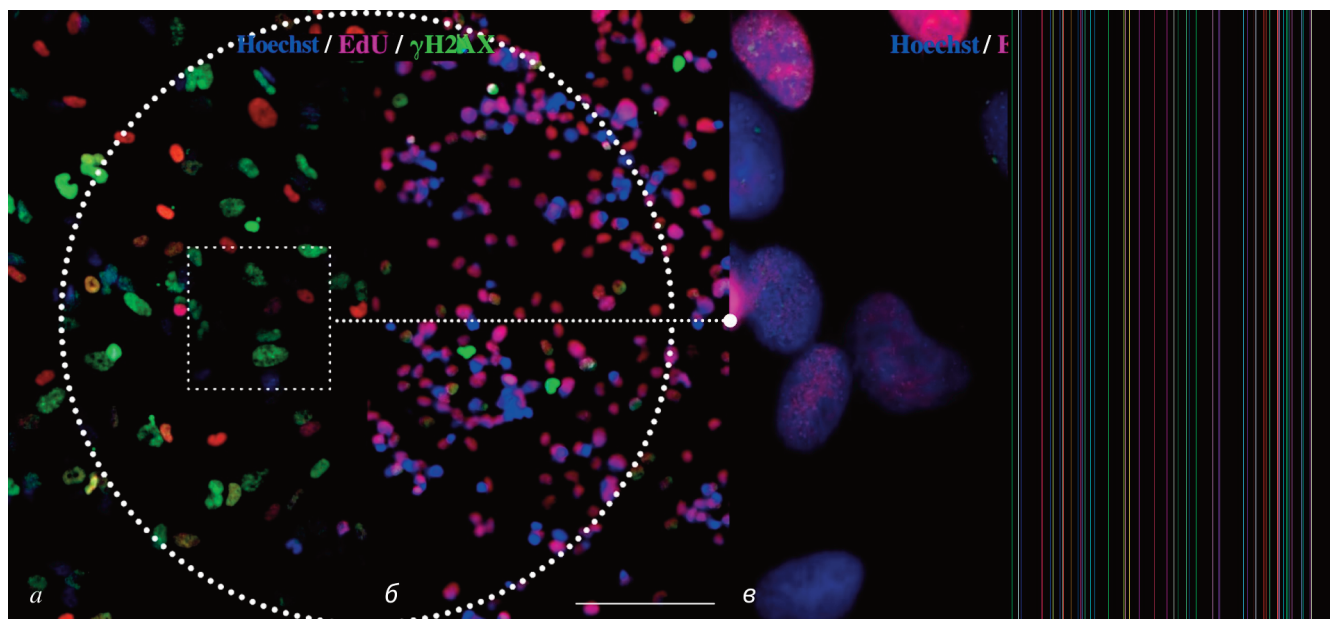


Рис. 2. Иммунофлуоресцентный анализ фокусов γ H2AX в (a) SK-N-BE и (б) drNPCs. Область, подвергнутая ТГц-воздействию, отмечена пунктирной линией. (в) Пример локализации фокусов γ H2AX в клетках нейробластомы (SK-N-BE). Фокусы (зеленые) обнаруживаются как в клетках, находящихся в синтетической фазе цикла (EdU, красный), так и в пост-синтетической. Масштабная линейка равна 100 мкм (а, б), 50 мкм (в)
Fig. 2. Immunofluorescence analysis of γ H2AX foci in (a) SK-N-BE and (b) drNPCs. The area affected by THz radiation is marked with a dashed line. (c) Example of γ H2AX foci localization in neuroblastoma cells (SK-N-BE). Foci (green) are found both in cells in the synthetic phase of the cycle (EdU, red) and in the post-synthetic phase. The scale bar is equal to 100 μ m (a, б), 50 μ m (в)

Результат формирования фокусов γ H2AX на разных стадиях клеточного цикла после воздействия ТГц-излучения представлен на рис. 2. Как следует из рисунка, большинство нейральных прогениторных клеток (drNPCs), а также клеток нейробластомы человека (SK-N-BE) находятся в S-фазе клеточного цикла. Это свидетельствует о высокой пролиферативной активности как нейральных прогениторных клеток, полученных методом прямого репрограммирования (drNPCs), так и клеток нейробластомы (SK-N-BE).

На рис. 3 столбчатая гистограмма количественно отображает процент клеток, содержащих EdU в SK-N-BE и drNPCs до и после ТГц воздействия. Можно заметить, что количество drNPC, находящихся в синтетической фазе, существенно выше, чем SK-N-BE как до облучения (~23 %), так и после (~18 %) ТГц-облучения. Это говорит о том, что культура нейральных прогениторных клеток, полученных методом прямого репрограммирования (drNPC) от здорового донора, имеет высокую пролиферативную активность, сопоставимую с опухолевыми клетками. Представленные значения демонстрируют от-

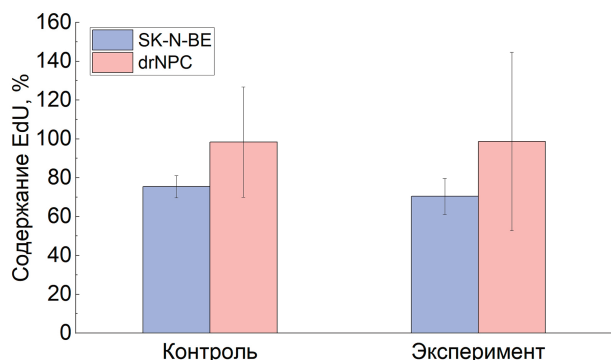


Рис. 3. Процентное содержание клеток, находящихся в синтетической фазе цикла, в культурах SK-N-BE и drNPCs до и после облучения, ($p < 0,05$)

Fig. 3. Percentage of cells in the synthetic phase of the cycle in SK-N-BE and drNPCs cultures before and after irradiation, ($p < 0,05$)

сутствие изменения пролиферативной активности в результате ТГц-облучения в культурах как здоровых, так и опухолевых клеток.

Ген H2AFX человека (H2AFX) картируется на хромосоме 11 в положении 11q23, в области, в которой часто обнаруживаются мутации или делеции при большом количестве онкологических заболеваний человека (плоскоклеточной карциноме головы и шеи, миелоидном и остром лимфоидном лейкозе, спорадическом раке молочной железы, неходжкинской лимфоме). Конститутивный уровень фокусов γ H2AX наблюдается в опухолевых клетках, а их большое количество снижает чувствительность к обнаружению разрывов ДНК, обусловленных воздействием химиопрепаратов или лучевой терапии. В работе [18] была изучена возможность того, что различия в количестве этих эндогенных очагов могут быть объяснены нестабильностью генома, потенциально связанной с нарушенным механизмом репарации.

В результате ТГц-облучения клеток нейробластомы (SK-N-BE) в экспериментальной группе наблюдается небольшое повышение фокусов гистонов ($N_{\text{ф/кл}} = 1,97 \pm 1,60$) по сравнению с контролем ($N_{\text{ф/кл}} = 1,36 \pm 1,44$), однако эти изменения статистически не значимы. В культуре нейральных прогениторных клеток (drNPCs) фокусов фосфорилирования гистона H2AX не обнаружено ни в экспериментальной, ни в контрольной группах. Обнаруженное количество фокусов гистонов $N_{\text{ф/кл}}$, приходящихся на одну клетку SK-N-BE, в экспериментальной группе ниже полученного ранее значения для клеточной культуры дермальных фибробластов человека [15] при том же времени облучения – 30 мин. Мы предполагаем, что причиной может быть более низкое значение пиковой удельной мощности ТГц-импульсов. Проведенные ранее исследования на фибробластах показали линейную зависимость количества фокусов гистонов как от энергии (а, следовательно, и от интенсивности импульса излучения) так и от времени ТГц-воздействия. Настоящее исследование является пилотным и соответствует минимальному времени облучения клеточных культур – 30 мин по сравнению с исследованием [19]. Мы пола-

гаем, что увеличение продолжительности воздействия может привести к формированию большего числа фокусов гистонов.

Отметим, что уровень фокусов γ H2AX в клетках нейробластомы выше, чем в нейтральных прогениторных клетках в контрольных группах. Вероятно, такая разница свидетельствует о нестабильности генома в опухолевых клетках по сравнению со здоровыми, что хорошо согласуется с литературными данными [20]. Анализ фокусов γ H2AX в опухолевых и здоровых клетках предполагает многообещающие результаты для планирования и проведения противоопухолевой терапии.

Заключение

В настоящей работе впервые представлены результаты исследования воздействия импульсов ТГц-излучения с пиковой удельной мощностью ~ 20 ГВт/см² и напряженностью электрического поля $\sim 2,8$ МВ/см на нейтральные прогениторные клетки (drNPCs) и клетки нейробластомы (SK-N-BE) человека. Показано, что не продолжительное воздействие (30 мин) не оказывает влияние на пролиферативную активность как нейтральных прогениторных клеток, так и клеток нейробластомы. ТГц-излучение не вызывает значимого увеличения фокусов γ H2AX ни в одной из исследуемых линий клеток.

Influence of Powerful Non-Ionizing Terahertz Radiation on Healthy and Tumor Human Cells of Neural Origin

R.O. Shatalova¹, S.A. Gurova¹, V.A. Revkova², I.V. Ilina³, D.S. Sitnikov³

¹National Research Nuclear University, MEPhI Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering, Obninsk, Russia

²Federal Research and Clinical Center of Specialized Medical Care and Medical Technologies, Moscow, Russia

³Joint Institute for High Temperatures, Moscow, Russia

Contact person: Dmitry Sergeevich Sitnikov: sitnik.ds@gmail.com

ABSTRACT

Purpose: Study of the influence of high-power pulses of coherent non-ionizing terahertz (THz) radiation on the formation of foci of double-strand DNA breaks and the proliferative activity of human neuronal cells.

Material and methods: Irradiated cell cultures are direct reprogramming neural progenitor cells (drNPCs), neuroblastoma cells (SK-N-BE). Cells are irradiated with a sequence of THz radiation pulses with a peak intensity of ~ 20 GW/cm² and electric field strength of 2.8 MV/cm. Irradiation lasts 30 mins.

Results: There is no statistically significant difference in the number of γ H2AX histone foci between experimental and control cell groups.

Conclusion: It was shown that a short exposure (30 min) of cells to THz radiation with intensity of 20 GW/cm² does not affect the proliferative activity of both neural progenitor cells and neuroblastoma cells and does not cause a significant increase in γ H2AX foci in any of the studied cell lines.

Key words: non-ionizing radiation, terahertz radiation, H2AX histone foci, proliferative activity, neural stem cells, SK-N-BE neuroblastoma

For citation: Shatalova RO, Gurova SA, Revkova VA, Ilina IV, Sitnikov DS. Influence of Powerful Non-Ionizing Terahertz Radiation on Healthy and Tumor Human Cells of Neural Origin. Medical Radiology and Radiation Safety. 2021;66(5):5–10.

DOI: 10.12737/1024-6177-2021-66-5-5-10

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

- Fröhlich H. Long-range coherence and energy storage in biological systems. *Int J Quantum Chem.* 1968;2(5):641–9. DOI: 10.1002/qua.560020505.
- Alexandrov BS, Gelev V, Bishop AR, Usheva A, Rasmussen KØ. DNA breathing dynamics in the presence of a terahertz field. *Phys Lett A.* 2010;374(10):1214–7. DOI: 10.1016/j.physleta.2009.12.077.
- Titova LV, Ayesheshim AK, Golubov A, Rodriguez-Juarez R, Woycicki R, Hegmann FA, et al. Intense THz pulses down-regulate genes associated with skin cancer and psoriasis: a new therapeutic avenue? *Sci Rep.* 2013;3(1):2363. DOI: 10.1038/srep02363.
- Ольшевская ЮС, Козлов АС, Петров АК, Запара ТА, Ратушняк АС. Влияние на нейроны in vitro терагерцового (субмиллиметрового) лазерного излучения. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова.* 2009;59(3):353–9. [Olsheskovskaya YUS, Kozlov AS, Petrov AK, Zapara TA, Ratushnyak AS. Effect of Terahertz (Submillimeter) Laser Radiation on Neurons in Vitro. *Journal of Higher Nervous Activity. I.P. Pavlova.* 2009; 59 (3): 353–9.]
- Zapara TA, Treskova SP, Ratushnyak AS. Effect of antioxidants on the interaction of terahertz (submillimeter) laser radiation and neuronal membrane. *J Surf Invest.* 2015;9(5):869–71.
- Cheon H, Paik JH, Choi M, Yang HJ, Son JH. Detection and manipulation of methylation in blood cancer DNA using terahertz radiation. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–10. DOI: 10.1038/s41598-019-42855-x.
- Tan SZ, Tan PC, Luo LQ, Chi YL, Yang ZL, Zhao XL, et al. Exposure Effects of Terahertz Waves on Primary Neurons and Neuron-like Cells Under Nonthermal Conditions. *Biomed Environ Sci.* 2019;32(10):739–54. DOI: 10.3967/bes2019.094.
- Perera PGT, Appadoo DRT, Cheeseman S, Wandiyanto J V, Linklater D, Dekiwadia C, et al. PC 12 pheochromocytoma cell response to super high frequency terahertz radiation from synchrotron source. *Cancers (Basel).* 2019;11(2):1–17. DOI: 10.3390/cancers11020162.
- Maskey D, Pradhan J, Aryal B, Lee C-M, Choi I-Y, Park K-S, et al. Chronic 835-MHz radiofrequency exposure to mice hippocampus alters the distribution of calbindin and GFAP immunoreactivity. *Brain Res.* 2010;1346(Maskey2010):237–46. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.05.045.
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks in Vivo. *J Cell Biol.* 1999;146(5):905–16. DOI: 10.1083/jcb.146.5.905.
- Barnes JL, Zubair M, John K, Poirier MC, Martin FL. Carcinogens and DNA damage. *Biochem Soc Trans.* 2018 Oct 19;46(5):1213–24. DOI: 10.1042/BST20180519.
- Sitnikov DS, Ilina I V, Pronkin AA. Experimental system for studying bioeffects of intense terahertz pulses with electric field strength up to 3.5 MV/cm. *Opt Eng.* 2020;59(06):061613. DOI: 10.1117/1.OE.59.6.061613.full
- Овчинников АВ, Чефонов ОВ, Ситников ДС, Ильина ИВ, Ашитков СИ, Агранат МБ. Источник терагерцового излучения с напряженностью электрического поля свыше 1 МВ/см на основе фемтосекундного хром-форстеритового лазера с частотой следования импульсов 100 Гц. *Квантовая электроника.* 2018;48(6):554–8. [Ovchinnikov AV, Chefonov OV, Sitnikov DS, Il'ina I V, Ashitkov SI, Agranat MB. A source of THz radiation with electric field strength of more than 1 MV cm⁻¹ on the basis of 100-Hz femtosecond Cr : forsterite

- laser system. *Quantum Electron.* 2018;48(6):554–8. (In Russian) DOI: 10.1070/qel16681].
14. Sitnikov DS, Romashevskiy SA, Ovchinnikov A V, Chefonov O V, Savel'ev AB, Agranat MB. Estimation of THz field strength by an electro-optic sampling technique using arbitrary long gating pulses. *Laser Phys Lett.* 2019;16(11):115302. DOI: 10.1088/1612-202X/ab4d56.
15. Ситников ДС, Ильина ИВ, Гурова СА, Шаталова РО, Ревкова ВА. Исследование индукции двуниевых разрывов в фибробластах кожи человека терагерцевым излучением высокой интенсивности. *Известия Российской Академии Наук Серия Физическая.* 2020;84:1605–16. DOI: 10.31857/s0367676520110277. [Sitnikov DS, Ilyina I V, Gurova SA, Shatalova RO, Revkova VA. Studying the Induction of Double-Strand Breaks in Human Fibroblasts by High-Intensity Terahertz Radiation. *Bull Russ Acad Sci Phys.* 2020;84(11):1370–4. (In Russian) DOI: 10.3103/S1062873820 110-246].
16. Dhuppar S, Roy S, Mazumder A. γ H2AX in the S Phase after UV Irradiation Corresponds to DNA Replication and Does Not Report on the Extent of DNA Damage. *Mol Cell Biol.* 2020;40(20). DOI: 10.1128/MCB.00328-20.
17. Bourge M, Fort C, Soler M, Satiat-Jeunemaitre B, Brown SC. A pulse-chase strategy combining click-EdU and photoconvertible fluorescent reporter: tracking Golgi protein dynamics during the cell cycle. *New Phytol.* 2015;205(2):938–50. DOI: 10.1111/nph.13069.
18. Yu T, MacPhail SH, Banáth JP, Klovov D, Olive PL. Endogenous expression of phosphorylated histone H2AX in tumors in relation to DNA double-strand breaks and genomic instability. *DNA Repair (Amst).* 2006;5(8):935–46. DOI: 10.1016/j.dnarep.2006.05.040.
19. Sitnikov DS, Ilyina I V, Revkova VA, Konoplyannikov MA, Kalsin VA, Baklaushchev VP. Effect of high-power pulses of terahertz radiation on cell viability. In: 2020 International Conference Laser Optics (ICLO). IEEE; 2020. p. 1. DOI: 10.1109/ICLO48556.2020.9285431.
20. Nagelkerke A, Span PN. Staining Against Phospho-H2AX (γ -H2AX) as a Marker for DNA Damage and Genomic Instability in Cancer Tissues and Cells. In: Koumenis C, Coussens LM, Giaccia A, Hammond E, editors. *Tumor Microenvironment.* Springer International Publishing; 2016. p. 1–10. PMID: 27325258 DOI: 10.1007/978-3-319-26666-4_1

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследования выполнены с использованием УНУ «Лазерный тераваттный фемтосекундный комплекс», входящий в состав ЦКП «Лазерный фемтосекундный комплекс» ОИВТ РАН при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-02-00762.

Участие авторов.

Разработка концепции исследования и сборка экспериментальной схемы – Ситников Д.С.; разработка дизайна исследования, работа с клеточной культурой, исследование ТГц воздействия – Ревкова В.А.; проведение экспериментов по облучению клеток – Ситников Д.С., Ильина И.В., Гурова С.А., Шаталова Р.О., статистическая обработка данных – Гурова С.А., Шаталова Р.О., написание и научное редактирование текста – все авторы.

Поступила: 16.03.2021. Принята к публикации: 21.04.2021.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The studies were carried out using the UNU "Laser terawatt femtosecond complex", which is part of the Center for Collective Use "Laser femtosecond complex" of the Joint Institute for High Temperatures of the Russian Academy of Sciences with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research within the framework of scientific project No. 19-02-00762.

Contribution. Development of the research concept and assembly of the experimental scheme - D. Sitnikov; development of research design, work with cell culture, study of THz exposure - Revkova VA; conducting experiments on irradiation of cells - Sitnikov D.S., Ilyina I.V., Gurova S.A., Shatalova R.O., statistical data processing - Gurova S.A., Shatalova R.O., writing and scientific editing of text - all authors.

Article received: 16.03.2021. Accepted for publication: 21.04.2021.