

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ШИРОКОПОЛОСНОГО ТЕРАГЕРЦОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК

© 2013 г. М. В. Дука (Цуркан)*, аспирант; И. В. Кудрявцев** *** ****, канд. биол. наук; М. К. Серебрякова****; Ю. С. Несговорова*, студентка; И. В. Назарова****, студентка; А. С. Трулев**; О. А. Смолянская*, канд. физ.-мат. наук; В. Г. Беспалов*, доктор физ.-мат. наук; А. В. Полевщиков ** *** ****, доктор биол. наук

* Национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург

** Федеральное государственное бюджетное учреждение “Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины” Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук, Санкт-Петербург

*** Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток

**** Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

E-mail: tsurkan.maria@yandex.ru

С целью определения границ биологически безопасных предельно допустимых уровней импульсного терагерцового (ТГц) излучения разработан макет установки для облучения культур клеток, находящихся в жидкой среде, широкополосным ТГц излучением диапазона частот 0,05–1,2 ТГц. Исследовано воздействие ТГц излучения на функциональную активность клеток ряда биологических культур, в том числе тимоцитов и спленоцитов мышей. Влияние оценивали при помощи проточной цитометрии с использованием анализа интенсивности флуоресценции ДНК связывающих красителей. Показано, что терагерцовое излучение со средней плотностью мощности до 10 мкВт/см² и длительностью воздействия в 1 минуту не оказывает влияния на изменение функциональной активности клеток. Не обнаружено статистически достоверных изменений в соотношении живых и находящихся на разных стадиях апоптоза клеток, а также в распределении клеток по фазам клеточного цикла. Сделан вывод о возможности применения ТГц излучения с такими характеристиками для задач медицинской спектроскопии.

Ключевые слова: ТГц излучение, предельно допустимые уровни облучения, проточная цитометрия, анализ интенсивности флуоресценции ДНК связывающих красителей.

Коды OCIS: 320.7160, 170.1530, 170.1420.

Поступила в редакцию 30.07.2013.

Введение

В последнее десятилетие наблюдается быстрый рост как числа используемых когерентных источников в терагерцовой (ТГц) области частот электромагнитного спектра, так и различных ТГц технологий и приборов, применяемых в системах безопасности, мониторинга, в научных исследованиях по физике, биологии, химии, медицине и в других областях. ТГц излучение применяется для визуализации, голо-

графирования и томографии различных объектов, при дистанционном зондировании, в спектроскопии химических и биологических объектов [1].

Терагерцовая область частот охватывает спектральный диапазон колебательных, вращательных и трансляционных линий широкого класса органических и биологических молекул [2, 3]. При формировании изображений ТГц широкополосным импульсным излучением возможно получение разрешения до 100 мкм

при высоком отношении сигнал/шум из-за малости рэлеевского рассеяния излучения в этом диапазоне [4]. В этой связи ТГц диагностика является чрезвычайно многообещающей, так как глубина проникновения излучения значительно больше, чем это возможно с оптической когерентной томографией. Диагностика биотканей импульсным ТГц излучением является идеальной, неконтактной, неионизирующей и безопасной технологией неразрушающего контроля.

Разрабатываемые в настоящее время технологии, использующие ТГц излучение в биомедицинской томографии и спектроскопии, выгодно отличаются от ряда современных методов исследования. Основное преимущество ТГц диагностики патологий от существующих методов диагностики — это возможность за одно сканирование осуществить обработку спектральных свойств биоткани, т.е. распознать патологию и одновременно осуществить визуализацию ее внутренней структуры, с целью определения патологии.

Бесконтактный анализ состояния кожи человека с помощью ТГц излучения, с целью определения онкологических заболеваний, является одним из приоритетных направлений исследований. Среди актуальных задач — создание мобильного прибора для анализа состояния кожи, создание базы данных ТГц спектров клеток кожи человека, измерение биофизических параметров кожи, создание методики диагностики, а также определение границ биологически безопасных предельно допустимых уровней импульсного ТГц излучения. Последней задаче посвящена тема настоящей статьи.

По результатам исследований отмечается как стимулирующий, так и угнетающий эффект воздействия ТГц излучения на различных уровнях биологической организации [3, 5]. Поэтому необходимо определить биологически безопасные уровни ТГц излучения, которые могут применяться в системах ТГц спектроскопии и одновременно исключают появление каких-либо первичных биологических эффектов, как это было сделано ранее для других диапазонов излучения. На первом этапе такой работы помогает использование в качестве объекта изучения клеточных систем.

При оценке влияния излучения на клетки важно изучить, не провоцирует ли оно преждевременную смерть клеток и не влияет ли оно на их процесс деления. Оба эти эффекта можно оценить методом проточной цитометрии

с использованием анализа интенсивности флуоресценции ДНК-связывающих красителей [6]. В основе работы проточного цитофлуориметра лежит принцип “гидродинамического” фокусирования. Через проточную ячейку движется постоянный ток изотонического раствора под определенным давлением, которое называют “обжимающим”. Внутри проточной ячейки находится специальный зонд, предназначенный для подачи анализируемого образца. В нашем случае таковым является суспензия одиночных клеток. Условия работы прибора подобраны так, что за счет разницы давлений в зонде и в “обжимающей” жидкости происходит гидродинамическая фокусировка “струи-в-струе”: образуются два ламинарных потока жидкости, которые не перемешиваются между собой. Размер внутренней струи сопоставим с размерами анализируемых клеток, которые в результате “гидродинамической фокусировки” выстраиваются друг за другом. В определенном месте клетки пересекают поток излучения источника света. Именно здесь происходит регистрация их параметров — относительного размера, структуры организации цитоплазмы и ядра, а в случае предварительной окраски клеток флуоресцентными красителями — интенсивности их флуоресценции в различных частях спектра (для большинства красителей в диапазоне 450–750 нм) [6]. В нашем случае, после воздействия широкополосного ТГц излучения, мы оценивали жизнеспособность клеток и их распределение по фазам клеточного цикла, анализируя интенсивность флуоресценции ДНК-связывающих красителей.

В настоящее время имеется ряд работ, посвященных влиянию ТГц излучения и оценке этого влияния с помощью различных красителей. Нарушение морфологии мембран и внутриклеточных структур наблюдается при облучении на частоте 2,5 ТГц (при плотности мощности 30 мВт/см²) в изолированных нейронах *Lymnaea stagnalis* с использованием красителя трипанового синего [7, 8]. С этим же красителем было показано, что излучение на частоте, близкой к 2,31 ТГц, может вызывать обратимые нарушения барьерных свойств мембраны нейронов [3].

В экспериментах с фибробластами кожи человека под воздействием ТГц излучения с частотой 2,52 ТГц (при плотности мощности 227 мВт/см² и длительности импульса 12 секунд) с помощью красителей отмечен эффект повышения проницаемости клеточной мембраны.

При меньшей продолжительности облучения эффект был отрицательным [9].

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что ТГц излучение повышает проницаемость мембраны. Однако эти данные были получены с использованием непрерывных источников излучения, и вопрос о влиянии импульсного широкополосного ТГц излучения остается открытым. С целью определения границ биологически безопасных и предельно допустимых уровней импульсного ТГц излучения основными задачами данной работы являлись: разработка макета устройства для ТГц облучения клеток, разработка методик облучения и исследование его влияния на биологические объекты с использованием цитофлуорометрии.

Материалы и методы

Экспериментальная установка для исследования воздействия импульсного ТГц излучения. Один из наиболее используемых методов генерации импульсного ТГц излучения заключается в том, что при возбуждении поверхности фотополюпроводника лазерным излучением фемтосекундной длительности создаются свободные носители заряда, движение которых в электрическом поле (приповерхностном, вследствие эффекта Дембера или приложенном извне) и возникающий при этом ток $J(t)$ вызывают генерацию электромагнитного импульса $E(t) \approx \partial J / \partial t$. Импульс обычно имеет вид одного колебания со спектром, определяемым фурье-преобразованием его временной формы. Поверхность полупроводника работает при этом как динамическая фотопроводящая антенна, излучающая импульсы широкополосного ТГц излучения [1, 10].

За основу нами была взята схема ТГц излучателя, разработанная для облучения нервных клеток [11]. Она была модернизирована для облучения клеток, находящихся в жидкой среде. Так как такие клетки осаждаются на дно планшета, необходимо подавать излучение снизу. Для оперативного слежения за выходной мощностью ТГц излучения без прерывания облучения объектов часть излучения подавали на оптико-акустический приемник (рис. 1).

В схеме установки излучение фемтосекундного лазера FL-1 с активной средой Yb:KYW (длина волны 1040 нм, длительность импульса 120 фс, частота следования импульсов 75 МГц,

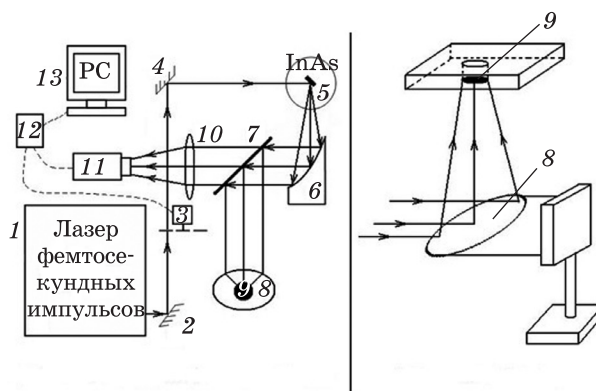


Рис. 1. Блок-схема терагерцового фотометра. На схеме: 1 – лазер FL-1, 2, 4 – зеркала, 3 – механический модулятор, 5 – магнит, с размещенным внутри кристаллом InAs, 6, 8 – параболические зеркала, 7 – светоделительная кремниевая пластина, 9 – объект, помещенный в ячейку планшета, 10 – линза, 11 – оптико-акустический приемник, 12 – синхронный усилитель, 13 – персональный компьютер.

средняя мощность 1 Вт) падало под углом 45° на зеркала (2, 4) с коэффициентом отражения $R \approx 100\%$. Перед тем как попасть на полупроводниковый кристалл, ТГц излучение модулировали механическим модулятором (3) с частотой 13 Гц, затем оно подавалось под углом 45° на кристалл InAs, помещенный в специальную систему с магнитной индукцией $B = 2,2$ Тл (5). При возбуждении фотоносителей фемтосекундным лазерным импульсом в кристалле InAs, из-за наличия приповерхностного электрического поля, эффекта Дембера и скрещенного магнитного поля системы, происходила генерация ТГц излучения [10], которое 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 (10) с фокусным расстоянием 5 см на оптико-акустический приемник (ОАП) GC-1P фирмы Tuedex с чувствительностью 1×10^5 В/Вт и скоростью отклика 30 мс (11). Другая часть излучения, отраженная от кремниевой пластины, попадала на второе параболическое зеркало (8), которое направляло излучение в виде сходящегося пучка вверх на объект (9). Поте-

ри ТГц излучения на планшете, в котором находились клетки, составляли 20%. Сигнал с ОАП поступал на синхронный усилитель LIA-MV-150 фирмы FEMTO и далее на аналогово-цифровой преобразователь с USB выходом на персональный компьютер, где получаемые данные обрабатывались с помощью программы, написанной в среде LabView. Генерируемое ТГц излучение имело полосу частот 0,05–1,7 ТГц с максимумом сигнала на 0,5 ТГц, длительность ТГц импульса составляла 2,5 пс. В диапазоне 1,2–1,7 ТГц сигнал не превышал 1% от максимального, поэтому мы считаем подходящим для воздействия диапазон 0,05–1,2 ТГц. Облучение образцов проводили в течение одной минуты. Мощность ТГц излучения варьировали с помощью фильтров и с учетом поглощения планшетом она составляла 30; 2 и 0,1 мкВт. При площади облучения 3,14 см² плотность мощности составляла 9,55; 0,63 и 0,03 мкВт/см². Эксперименты проводили при температуре 20 °С. Для каждой культуры клеток было проведено 3 серии экспериментов. В каждой серии облучение на каждой мощности проводили 3 раза. В качестве контроля для каждой из мощностей использовали лунки планшета, которые не подвергались действию облучения.

Культуры клеток. В качестве объектов исследования были выбраны культуры клеток следующих линий: адгезионные культуры А-549 (клетки карциномы легкого человека), ВТ-20 (клетки аденокарциномы молочной железы), COLO 320 HSR (клетки карциномы сигмовидной кишки), суспензионные культуры – НМС-1 (линия клеток, обладающих свойствами незрелых тучных клеток), U937 (клеточная линия лейкоза гистиоцитов человека), HL-60 (клетки промиелоидной лейкемии человека).

Культивирование клеток осуществляли в соответствии с рекомендациями “Банка клеточных культур” ЦИН РАН. Для постановки экспериментов клетки пересевали в лунки 24-луночного плоскодонного планшета (“Sarstedt”, Германия). После облучения клетки инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 24 часов. Полученную суспензию клеток использовали для постановки экспериментов, описанных ниже.

В качестве объектов исследования были также использованы тимоциты и спленоциты мышей линии СВА. Полученную после подготовки клеточную суспензию (200 мкл, 5×10⁶ клеток/мл) вносили в лунки 24-луночного плоскодонного планшета. После облучения

культуры спленоцитов и тимоцитов инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 3 часов. Полученную суспензию клеток использовали для постановки экспериментов, описанных ниже.

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 и 9,6×72 мкм соответственно. Для регистрации сигналов по “малоугловому” (светорассеяние под углом 1°–8°) и “боковому” (рассеивание под углом 90°) светорассеянию, характеризующему размер и структуру (сложность организации цитоплазмы и ядра) клеток, использовали фотодетекторы с ослабителями. При помощи этих двух параметров происходит выявление популяции клеток, удаление из зоны анализа слипшихся клеток и различного рода частиц (пузырьки воздуха, агрегаты белков культуральной среды, крупные кристаллы солей растворов и т.п.), не соответствующих по своим характеристикам исследуемым клеткам. Для регистрации флуоресценции использовали систему фильтров и ФЭУ (регистрация сигналов в пределах 200–800 нм), предназначенных для детектирования флуоресценции строго определенных длин волн, характерных для красителей, применяемых для оценки характеристик ДНК клеток.

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 [12]. Особенностью этих веществ, помимо небольшой молекулярной массы, является способность стехиометрическим образом связываться с нуклеиновыми кислотами клетки. Подобного рода взаимодействие 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 область спектра около 509 нм. Поэтому перед фотоэлектронным умножителем устанавливали фильтр для регистрации флуоресценции

YO-PRO-1 (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. Существенное различие между данными красителями заключается в способности проникать в клетки, билипидный слой мембраны которых для них непроницаем. Так, за накопление YO-PRO-1 внутри цитоплазмы отвечают ионные каналы P2RX7 [13, 14]. В живых клетках накопления YO-PRO-1 не происходит, так как эти каналы неактивны или обладают малой способностью транспортировать краситель через мембрану. 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. 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, который обладает несколько иными свойствами. Йодистый пропидий не имеет 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 к YO-PRO-1, тогда как клетки, находящиеся на более поздних стадиях апоптоза, будут эффективно окрашиваться обоими красителями. Окраску клеток различных клеточных линий проводили по рекомендациям, приведенным в [12]. Анализ полученных результатов проводили при помощи программного обеспечения Kaluza™ (“Beckman Coulter”, США).

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 ну-

клеиновых кислот, встраиваясь в пространство между остатками нуклеотидов, находящихся в соседних нитях. Поскольку связывание йодистого пропидия с ДНК стехиометрическое, т.е. строго пропорционально количеству ДНК, находящихся в ядре клетки, то на гистограммах, полученных с проточного цитометра, можно выделить следующие основные области, соответствующие различным стадиям клеточного цикла [15]. 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 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 флуоресценции окрашенных клеток. В фазе G_2 и во время митоза содержание ДНК и количество хромосом удваиваются ($4N$). Следствием этого является то, что интенсивность флуоресценции клеток в фазах G_2/M клеточного цикла будет ровно в два раза превосходить таковую для клеток, имеющих диплоидный набор ДНК (G_0/G_1). В 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 [16]. Для каждого из образцов анализировали не менее 10000 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 , выраженного в процентах от общего числа проанализированных клеток.

Результаты

Данные, полученные при оценке жизнеспособности клеток с помощью ДНК-связывающих красителей йодида YO-PRO-1 и йодистого пропидия PI 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.

На втором этапе работы исследовали распределение клеток по фазам клеточного цикла при воздействии ТГц излучения. Процентное соотношение таковых в контрольных и облученных образцах также не отличалось друг от друга.

На рис. 2 приведен пример полученной нами гистограммы для клеток линии НМС-1. На каждой из гистограмм по оси абсцисс приве-

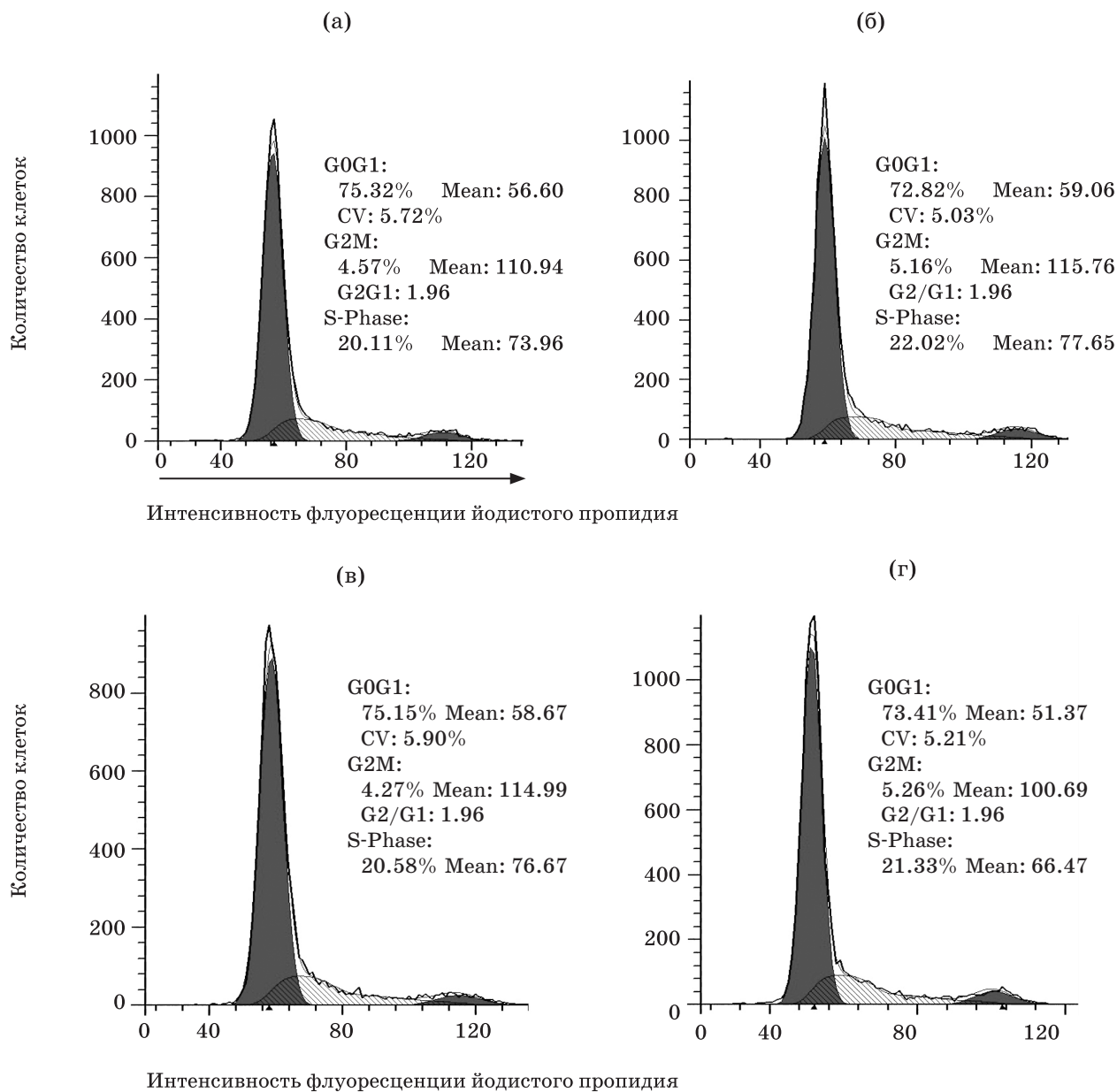


Рис. 2. Распределение клеток линии НМС-1 по фазам клеточного цикла. По оси абсцисс: интенсивность флуоресценции йодистого пропидия; по оси ординат: количество клеток. Гистограмма (а) – контрольные клетки, гистограммы (б), (в) и (г) – при облучении 0,1; 2 и 30 мкВт соответственно.

дена интенсивность флуоресценции йодистого пропидия, связывание которого пропорционально количеству ДНК в ядре клетки. Так, левый пик соответствует одиночному набору ДНК и фазам G_0/G_1 клеточного цикла. Штриховкой показаны клетки, находящиеся в S фазе клеточного цикла. Правый пик соответствует двойному набору ДНК и фазам G_2/M клеточного цикла. Видно, что терагерцовое излучение не оказывает влияния на распределение клеток по фазам клеточного цикла. Аналогичные результаты получены и для других клеточных линий.

Заключение

В рамках данного исследования были разработаны макеты и методика облучения биологических клеток, находящихся в жидкой среде, широкополосным импульсным ТГц излучением в диапазоне 0,05–1,2 ТГц с максимумом сигнала на 0,5 ТГц, длительностью импульса 2,5 пс. Слежение 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 красителей. С ее помощью оценивалась жизнеспособность клеток и их распределение по фазам клеточного цикла облученных и контрольных образцов.

В работе исследовались различные культуры клеток: как адгезионные культуры – клетки

карциномы легкого человека, клетки аденокарциномы молочной железы, клетки карциномы сигмовидной кишки, так и суспензионные культуры – линия клеток, обладающих свойствами незрелых тучных клеток, клеточная линия лейкоза гистиоцитов человека, клетки промиелоидной лейкемии человека, а также клетки первичных культур – тимоциты и спленоциты мышей линии СВА. С использованием макета и разработанной методики облучения, а также цитофлуориметрии ДНК-связывающих красителей показано, что воздействие импульсного ТГц излучения мощностью 30; 2 и 0,1 мкВт не оказывает существенного влияния на изменение функциональной активности клеток. Так, между контрольными и облученными образцами не обнаружено статистически достоверных изменений в соотношении живых и находящихся на разных стадиях апоптоза клетках, 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 воздействия для ТГц систем. В дальнейшем разработанные методики могут быть использованы для определения границы биологически безопасных энергетических порогов воздействия импульсного ТГц излучения на более сложные биологические объекты.

Работа выполнена в рамках реализации ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007–2013 годы” (ГК № 14.512.11.0020).

* * * * *

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhang X.C., Xu J. Introduction to THz wave photonics. NY.: Springer, 2009. P. 246.
2. Globus T.R., Woolard D.L., Khromova T., Crowe T.W., Bykhuskaia M., Gelmont B.L., Hesler J and Samuels A.C. THz-spectroscopy of biological molecules // J. Bio. Phys. 2003. V.29. №2. P.89–100.
3. Цуркан М.В., Балбекин Н.С., Собакинская Е.А., Панин А.Н., Вакс В.Л. Исследование спектра ДНК методами ТГц спектроскопии // Опт. и спектр. 2013. Т. 144, №6. С. 981–986.
4. Humphreys K., Loughran J.P., Gradziel M., Lanigan W., Ward T., Murphy J.A., O'sullivan C. Medical applications of Terahertz Imaging: a Review of Current Technology and Potential Applications in Biomedical Engineering // Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2004. №2. 1302–5.
5. Wilminck G.J. and Grundt J.E. Invited review article: current state of research on biological effects of terahertz radiation // J. Infrared Millimeter Terahertz Waves. 2011. V.32. №10. P. 1074–1122.
6. Shapiro H.M. Practical Flow Cytometry / John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA., 4th edition. 2003. 681 p.
7. Olshevskaya, J.S., Ratushnyak, A.S., Pertov, A.K., Kozlov, A.S., Zapara, T.A. Effect of terahertz electromagnetic waves on neurons systems // Proc. “Computational Technologies in Electrical and Electronics Engineering, 2008. SIBIRCON 2008. IEEE Region 8 International Conference on”. 2008. С. 210–211.
8. Olshevskaya, J.S., Kozlov, A.S., Petrov, A.K., Zapara, T.A., Ratushnyak, A.S. Cell membrane permeability under the influence of terahertz laser radiation // Vestnik Novosibirsk State University. 2010. V. 5. №4. P. 177–181.

9. *Gerald J. Wilmink, Bennett L. Ibey, Caleb L. Roth, Rebecca L. Vincelette, Benjamin D. Rivest, Christopher B. Horn, Joshua Bernhard, Dawnlee Roberson, William P. Roach* // Determination of Death Thresholds and Identification of Terahertz-Specific Gene Expression Signatures. *Proc. SPIE*. 2010. V.7562. P.75620K–1 – 75620K–8.
 10. *Беспалов В.Г., Крылов В.Н., Путилин С.Э., Стаселько Д.И.* Генерация излучения в дальнем ИК диапазоне спектра при фемтосекундном оптическом возбуждении полупроводника InAs в магнитном поле // *Опт. и спектр*. 2002. Т.93. №1. С. 158–162.
 11. *Tsurkan M.V., Smolyanskaya O.A., Bespalov V.G., Penniyainen V.A., Kipenko A.V., Lopatina E.V., Krylov B.V.* Changing growth of neuritis of sensory ganglions by terahertz radiation // *Proc. Of SPIE*. 2012. V. 8261, 82610S–1.
 12. *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.
 13. *Stokes L., Jiang L.H., Alcaraz L., Bent J., Bowers K., Fagura M., Furber M., Mortimore M., Lawson M., Theaker J., Laurent C., Braddock M., Surprenant A.* Characterization of a selective and potent antagonist of human P2X(7) receptors, AZ11645373 // *Br.J.Pharmacol*. 2006. V.149. №7. P.880–887.
 14. *Glisic-Milosavljevic S., Waukau J., Jana S., Jailwala P., Rovensky J., Ghosh S.* Comparison of apoptosis and mortality measurements in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using multiple methods // *Cell Prolif*. 2005. V.38. №5. P.301–311.
 15. *Pozarowski P., Darzynkiewicz Z.* Analysis of cell cycle by flow cytometry // *Methods Mol.Biol*. 2004. V. 281. P.301–311.
 16. *Darzynkiewicz Z., Huang X.* Analysis of cellular DNA content by flow cytometry // *Curr. Protoc. Immunol*. 2004. Ch.5. Unit 5.7.
-