

Регистрация влияния миллиметровых волн на клетки дрожжей с помощью динамических спеклов

* А. В. Якунов, А. О. Лесовая

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,
г. Киев, 01601, Украина, e-mail: yakunov@univ.kiev.ua

Поступила 27.01.2020

После доработки 12.03.2020

Принята к публикации 14.03.2020

С помощью метода декорреляции динамических спеклов исследовано в реальном времени влияние электромагнитных волн миллиметрового диапазона на подвижность клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, осажженных на стеклянную подложку. Подвижность биологических клеток, у которых отсутствует естественная функция передвижения, определяется, в первую очередь, броуновским движением. Установлено, что под воздействием излучения на частотах в диапазоне 41–42 ГГц в зависимости от частоты происходит увеличение или уменьшение подвижности клеток, связанное с соответствующим изменением сил электростатического сцепления с поверхностью подложки. Впервые продемонстрировано прямое действие миллиметровых волн на электрическую подсистему изолированной клетки.

Ключевые слова: биологические эффекты миллиметровых волн, динамические спеклы, декорреляция, адгезия, диэлектрофорез

УДК 577.35:57.043:576.322

DOI: 10.5281/zenodo.3970471

ВВЕДЕНИЕ

Биологические эффекты электромагнитных волн миллиметрового диапазона (ЭМВ ММД), открытые более 50 лет назад и успешно применяющиеся в медицинской практике, микробиологической, биохимической и пищевой технологии, до сих пор не имеют общепризнанного объяснения и остаются предметом дискуссий [1, 2]. Одним из возможных механизмов принято считать непосредственное воздействие ЭМВ на заряженные группы и ионные токи в мембранных структурах [3]. Предполагается, что под действием электромагнитного поля могут изменяться скорость диффузии через биологические мембраны, ориентация и конфирмация биологических макромолекул, состояние электронной структуры свободных радикалов и др. с последующим влиянием на активность регуляторной системы клетки. В то же время такое воздействие должно влиять на электрические характеристики мембраны (поляризацию, поверхностную плотность заряда), изменения которых можно зарегистрировать физическими методами в реальном времени.

Вероятно, наиболее перспективными в смысле достоверной восприимчивости к ЭМВ ММД следует считать культуру дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (*S.cerevisiae*). Результаты классических экспериментов Грюндлера и Кальмана [4] неоднократно воспроизводились в различных модификациях [5–8], где подтвердились значения частот, облучение на которых способно ускорять или угнетать рост клеток, уровень мощности, оказывающей биологическое воздействие, оптимальное время экспозиции и другие параметры.

Кроме того, дрожжи проявляют высокую чувствительность к другим физическим факторам. Сообщалось [9], что под воздействием магнитного поля и слабого рентгеновского излучения происходит специфическая, с признаками упорядочения агрегация клеток *S.cerevisiae* на поверхности кремния. Поскольку дрожжевая клетка лишена функции передвижения, то изменения в ее расположении следует отнести к чисто физическим проявлениям взаимодействия с внешним полем и/или поверхностью.

В представленной работе исследовано влияние ЭМВ ММД на подвижность клеток дрожжей *S.cerevisiae*, осажженных на стеклянную подложку. Для регистрации сигнала применяется анализ динамических спеклов, получивший в последнее время широкое распространение в исследованиях по относительно медленной динамике биологических систем клеточного уровня [10].

ИДЕЯ МЕТОДА

При рассеянии когерентного лазерного излучения на шероховатой поверхности или в оптически неоднородной среде образуется зернистая картина – спекл-структура (или просто – спеклы). Случайный характер спеклов обусловлен интерференцией большого числа вторичных волн одинаковой частоты, но со случайными амплитудами и фазами. Если параметры поверхности или неоднородной среды меняются со временем, спеклы также будут изменяться. В частности, если неоднородной средой является прозрачная жидкость со взвешенными в ней микрочастицами, частота мерцания спеклов будет связана определенным

соотношением со скоростью броуновского движения частиц [11].

Изменяющиеся во времени спеклы регистрируются в виде цифровой видеозаписи и анализируются с помощью того или иного алгоритма в зависимости от поставленной задачи [10]. Одним из распространенных методов анализа однородной динамической спекл-картины является метод декорреляции [12], который в своей основе использует вычисление временной автокорреляционной функции интенсивности когерентного света, рассеянного на подвижных оптических неоднородностях. Автокорреляционная функция определяет характерные масштабы времени, на которых движение рассеивающих центров скоррелировано, то есть зависит от их положения в предыдущие моменты времени.

Пусть $S(i, j, t)$ – интенсивность пикселя с координатами $\{i, j\}$ в момент времени t . Тогда нормированная автокорреляционная функция интенсивности этого пикселя определяется как:

$$C(i, j, \tau) = \frac{1}{T - \tau} \sum_{t=0}^{T-\tau} S(i, j, t) \cdot S(i, j, t + \tau) \cdot \Delta t, \quad (1)$$

где T – время регистрации; τ – время задержки; Δt – временное разрешение (определяется условиями эксперимента). Из полной спекл-картины, регистрируемой матрицей видеокамеры, выделяется центральный прямоугольный участок с однородной засветкой. Автокорреляционная функция усредняется по этому участку:

$$\langle C(\tau) \rangle = \frac{1}{(i_e - i_b)(j_e - j_b)} \sum_{i=i_b}^{i_e} \sum_{j=j_b}^{j_e} C(i, j, \tau), \quad (2)$$

где $\{i_b, j_b\}$, $\{i_e, j_e\}$ – начальные и конечные координаты выделенного прямоугольного участка.

При анализе динамических спеклов ансамбля случайных центров рассеяния автокорреляционная функция обычно убывает со временем. То есть происходит декорреляция спекл-картины. В отдельных случаях автокорреляционная функция может быть аппроксимирована простой аналитической функцией, параметры которой имеют очевидный физический смысл. Например, время корреляции – параметр, определяющий скорость затухания автокорреляционной функции, – будет меньше у спекл-картины, сформированной более быстрыми центрами рассеяния. Сравнивая этот параметр у одного и того же клеточного образца при различных внешних воздействиях, можно судить об их влиянии на подвижность клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Схема измерительной установки показана на рис. 1. Дрожжевая суспензия помещалась в тонком ($d = 0,2$ мм) слое между гипотенузной гранью поворотной призмы AP-90 и покровным стеклом. Излучение ММД от генератора Г4-141 (выходная мощность ~ 20 мВт) подавалось сверху через волновод с прямоугольным сечением, своим торцом вплотную соприкасавшимся с верхней поверхностью покровного стекла. Управление частотой излучения генератора осуществлялось в режиме внешней перестройки частоты в диапазоне 41,00–42,00 ГГц, с дискретностью 0,02 ГГц. Излучение гелий-неонового лазера (длина волны 632,8 нм, мощность 2 мВт) попадало изнутри на гипотенузную грань призмы, где вследствие нарушенного полного внутреннего отражения проходило в суспензию и частично рассеивалось на дрожжевых клетках. Часть рассеянного света собиралась линзой на фоточувствительную матрицу видеокамеры (KAYTON USB-camera) с разрешением 640×360 и скоростью съемки $F = 30 \text{ с}^{-1}$.

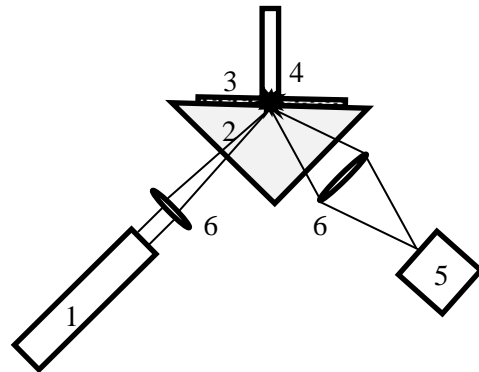


Рис. 1. Схема установки: 1 – гелий-неоновый лазер; 2 – поворотная призма; 3 – тонкий слой с дрожжевой суспензией; 4 – выходной волновод генератора ЭМВ ММД; 5 – видеокамера; 6 – собирающие линзы.

Видеозапись в формате *avi* с помощью программы *ImageJ* преобразовывалась в набор матриц размером 640×360 , каждый элемент которых имел значение от 0 до 255, то есть соответствовал определенной интенсивности в «серой» шкале. Дальнейшая обработка данных (выделение центрального прямоугольного участка размером 213×120 , попиксельное вычисление автокорреляционной функции, усреднение и аппроксимация) осуществлялась с помощью прикладных программ *MathCAD* и *OriginLab*.

Дрожжевая культура *S. cerevisiae* выращивалась по стандартной методике [8], после чего дважды промывалась с помощью центрифугирования и разводилась физиологическим раствором в базовой концентрации $C_0 = 10^8 \text{ см}^{-3}$. Дрожжи

полностью оседали на дно примерно за 20–25 минут, о чем можно было судить по выходу сигнала в стационарный режим. Все измерения проводились при комнатной температуре.

Дополнительно был измерен тепловой эффект, возникающий вследствие поглощения ЭМВ ММД в тонком слое воды. Для этого использовалась методика определения температуры с помощью температурно-чувствительного флуоресцентного красителя родамина 6Ж [13]. В описанной выше схеме дрожжевую суспензию замещали водным раствором красителя, гелий-неоновый лазер – полупроводниковым (длина волны 405 нм, мощность 50 мВт). Перед видеокамерой располагали стеклянный светофильтр ЖЗС18. Регистрировалась интенсивность флуоресценции водного раствора Р6Ж, которая линейно зависит от температуры.

РЕЗУЛЬТАТЫ И АНАЛИЗ

Производительность экспериментальной установки была оценена путем сравнения «паразитной» декорреляции сигнала, порождаемой естественной механической вибрацией и собственным шумом матрицы приемника, с «полезной» декорреляцией, обусловленной введением в зондируемую лазером область клеток дрожжей. На рис. 2 показаны нормированные автокорреляционные функции, полученные из динамических спекл-картин от чистого физраствора (контроль) и суспензии клеток для двух разных концентраций. Из рис. 2 видно (верхняя зависимость), что внешние факторы приводят к небольшой декорреляции, которая определяет порог чувствительности.

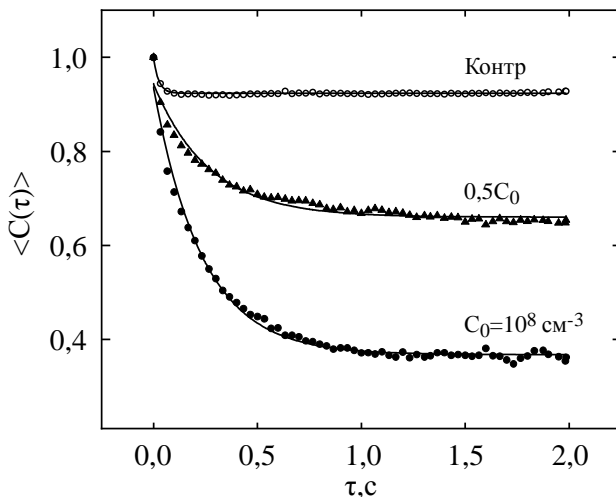


Рис. 2. Нормированные автокорреляционные функции контрольной спекл-картины и динамических спеклов, полученных на двух образцах с разными концентрациями клеток.

Корреляционные кривые, полученные для двух концентраций, хорошо аппроксимируются затухающей экспоненциальной функцией:

$$y(t) = a \cdot e^{-t/\tau} + c, \quad (3)$$

где c – уровень плато, определяемый вкладом статической спекл-картины от рассеяния на поверхностях призмы и линз, τ имеет смысл времени корреляции. Экспоненциальный характер затухания свидетельствует о случайном, характерном для броуновского движения перемещении клеток по поверхности [11].

Большая концентрация клеток соответствует меньшему уровню плато и в свою очередь большему соотношению «сигнал/шум». Базовая концентрация $C_0 = 10^8 \text{ см}^{-3}$ представляется оптимальной, поскольку осевшие на дно клетки занимают примерно половину площади в области лазерного зондирования. Наблюдение осадка под микроскопом показало, что между клетками сохраняется небольшое свободное пространство, позволяющее считать их малые перемещения относительно независимыми.

Из приведенных корреляционных кривых видно, что оптимальный интервал для вычисления времени корреляции составляет $T = 2 \text{ с}$.

На рис. 3 показана динамика поведения времени корреляции в течение 10 минут после полного оседания клеток на поверхность и в отсутствие каких-либо контролируемых внешних воздействий. Каждое значение τ_0 рассчитывалось по $F \cdot T = 60$ точкам. Доверительные интервалы определялись ошибкой аппроксимации для параметра τ_0 . Из рис. 3 видно, что последовательность значений представляет собой стационарный временной ряд с дисперсией, не превышающей доверительный интервал единичного измерения. Постоянство времени корреляции отражает тот факт, что в течение данного интервала времени не происходит спонтанной агрегации клеток (то есть укрупнения центров рассеяния) и предположение об их относительной изолированности представляется вполне корректным.

Рис. 4 демонстрирует реакцию клеток дрожжей на действие ЭМВ ММД с максимальной выходной мощностью 20 мВт и частотами 41,74 ГГц (а) и 41,84 ГГц (б). При включении генерации происходит быстрое, в пределах времени $T = 2 \text{ с}$ уменьшение (а) и увеличение (б) параметра τ на величину, как минимум, вдвое превосходящую доверительный интервал. То есть излучение определенной частоты индуцирует изменение подвижности дрожжевых клеток в сторону ускорения либо замедления. При выключении генерации параметр τ возвращается к исходному (в пределах ошибки) значению. При последующих включе-

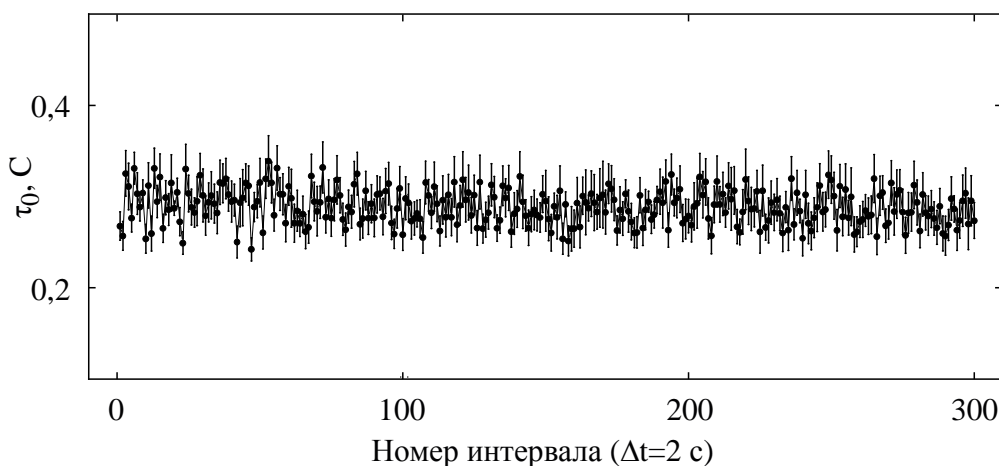


Рис. 3. Динамика поведения времени корреляции спекл-картины в отсутствие внешнего воздействия на клетки.

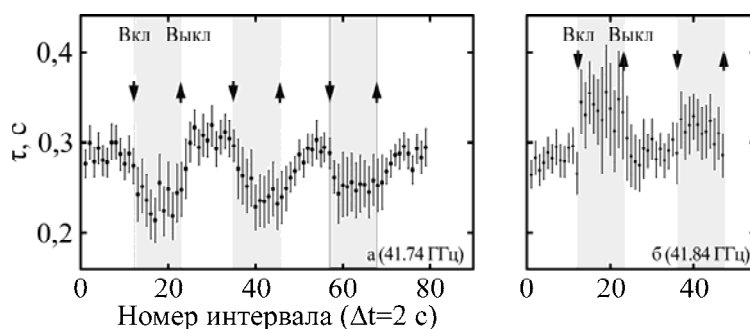


Рис. 4. Изменение времени корреляции спекл-картины при включении и выключении излучения ММД двух частот.

ниях наблюдается тенденция к ослаблению эффекта, то есть происходит своего рода адаптация.

Последняя особенность несколько усложняет исследование частотной зависимости на одном образце, поскольку характер и параметры следующей реакции могут быть связаны не только с другой частотой ЭМВ, но и с адаптацией клеток к облучению.

Для четырех образцов дрожжей были проведены измерения реакции на воздействие ЭМВ ММД разных частот в интервале $\Delta f = (41,00-42,00)$ ГГц с дискретностью $\delta f = 0,02$ ГГц. Полный перебор частот осуществлялся случайным образом, на каждой частоте время облучения составляло $T = 2$ с. Таким образом, общее время облучения каждого образца составляло $T\Delta f/\delta f = 100$ с. Заметное ослабление реакции к концу процедуры облучения частично скрывало потенциальную биологическую активность тех или иных частот, поэтому полученные результаты следует рассматривать как выборочные.

Реакция дрожжевых клеток на ЭМВ ММД отдельных частот	
f , ГГц	$\tau/\tau_0 \pm \sigma$
41,20	$1,3 \pm 0,2$
41,38	$1,4 \pm 0,3$
41,62	$1,3 \pm 0,3$
41,66	$0,7 \pm 0,2$
41,74	$0,6 \pm 0,2$
41,84	$1,8 \pm 0,7$

В таблице приведены усредненные по четырем сериям результаты измерений для некоторых частот с наиболее выраженным откликом, которые свидетельствуют о существовании двух типов реакции – «положительной» и «отрицательной», соответствующих увеличению и уменьшению подвижности клеток. Этот факт можно считать аргументом в пользу нетеплового механизма наблюдаемого явления.

Кроме того, измерения теплового эффекта с помощью флуоресцентного красителя показали, что при включении генератора ЭМВ ММД сразу на максимальную мощность (20 мВт) наблюдается кратковременное ($\sim 1-2$ с), слабое повышение температуры ($< 0,4^\circ\text{C}$) в облучаемой области. Затем из-за большой поверхности теплообмена температура тонкого слоя раствора красителя быстро возвращалась к температуре окружающей среды ($\sim 20^\circ\text{C}$). При выключении генератора никаких температурных изменений образца не наблюдалось.

Поскольку мощность поглощенных ЭМВ и соответственно кратковременное повышение температуры были максимальными в верхних слоях образца, влияние конвекции на перемещение клеток, осевших на нижнюю поверхность, представляется маловероятным.

ОБСУЖДЕНИЕ

Подвижность биологических клеток, у которых отсутствует естественная функция

передвижения, определяется в первую очередь броуновским движением, характер которого зависит от вязкости среды, температуры, формы и размеров клеток, и рассчитывается по классической формуле Эйнштейна-Смолуховского [14]. Средний квадрат смещения задается выражением:

$$\langle S^2 \rangle = 4kTt\mu^{-1}, \quad (4)$$

где k – постоянная Больцмана; T – абсолютная температура; t – время; μ – коэффициент трения. Если не учитывать взаимодействия клетки с поверхностью, то коэффициент трения равен:

$$\mu = 6\pi\eta rs, \quad (5)$$

где η – вязкость среды; r – средний радиус клетки; s – ее формфактор. Размеры дрожжевой клетки *S.cerevisiae* составляют 4–6 мкм, что для водной среды при комнатной температуре соответствует среднему смещению за единицу времени ~ 1 мкм/с [14]. Величину того же порядка дает оценка частоты мерцания спекла [11]. Очевидно, что влияние поверхности вносит существенную поправку в коэффициент трения и соответственно изменяет скорость перемещения.

Взаимодействие живой клетки с твердой поверхностью обычно рассматривается как одно из проявлений более общего явления – биологической адгезии [15]. Выделяются три уровня такого взаимодействия: физический, химический и биологический. На физическом уровне учитываются только электростатические силы между зарядом на мембране и локальным зарядом на поверхности. На химическом уровне принимаются во внимание силы межмолекулярного взаимодействия молекул мембраны и молекул/атомов поверхности. На биологическом уровне в процессе адгезии участвуют рецепторы (обычно белки), которые специфически реагируют изменением своей конформации на присоединение к ней определенных молекул.

Интенсивность взаимодействия на первых двух уровнях зависит от молекулярной конфигурации, микроструктуры и физических свойств поверхности, расстояния и взаимного расположения. Соответствующие силы сцепления действуют мгновенно, и они определяют так называемую быструю адгезию, которая не участвует в физиологических процессах клетки. Обусловленная взаимодействиями третьего уровня «медленная» адгезия обычно играет существенную (или даже определяющую) роль в функционировании клетки [15].

Исследования адгезии дрожжевых клеток на стекле показали, что в нейтральной среде силы сцепления определяются в основном силами электростатического взаимодействия [16].

Быстрая реакция дрожжевых клеток на воздействие ЭМВ ММД, зафиксированная в наших экспериментах, указывает на прямое физическое, а не биохимическое (опосредованное через изменение физиологического состояния) влияние поля на электрические параметры клетки. Изменения параметров, определяющих быструю адгезию, приводит к ускорению либо замедлению броуновского движения. Возможность двунаправленного воздействия согласуется с фактом существования биологических эффектов ЭМВ ММД разных знаков, а именно ускорением и замедлением скорости размножения [4, 6, 7].

Необходимо учесть еще один потенциально возможный механизм влияния внешнего поля на подвижность клетки – диэлектрофорез (ДЭФ) [17]. В неоднородном электрическом поле на нейтральную частицу действует сила, равная

$$\vec{F}_{DEP} = f(\epsilon_1, \epsilon_2) \cdot \vec{\nabla}(E^2), \quad (6)$$

где $f(\epsilon_1, \epsilon_2)$ – функция диэлектрических проницаемостей материала частиц и среды; E – модуль вектора напряженности электрического поля. Согласно приведенному выражению, частица втягивается в направлении сгущения силовых линий. Поскольку в выражение для ДЭФ-силы напряженность электрического поля входит в квадрате, это явление проявляется и в переменных полях. Не существует принципиального ограничения на частоту переменного поля; величина силы определяется в первую очередь диэлектрическими свойствами частицы и среды в данном частотном диапазоне.

Биологический ДЭФ (то есть движение живых клеток в неоднородных полях) продемонстрировал много интересных, до конца не объясненных особенностей, которые связывают с электрическими параметрами живых систем [17]. Возможность ДЭФ в области частот, соответствующей миллиметровому диапазону, и его роль в биологических эффектах ЭМВ ММД обсуждались в нашей ранней работе [18]. Нами также был обнаружен ДЭФ для пьезоэлектрических микрочастиц в поле ММВ, значительный градиент которому обеспечивает сильное поглощение в воде.

В эксперименте, описанном в настоящей статье, градиент поля ММВ направлен вверх. То есть ДЭФ способен частично компенсировать силы клеточного взаимодействия с поверхностью, уменьшить силу трения и соответственно привести к более интенсивному броуновскому движению. Остается открытым вопрос о природе двунаправленности влияния ЭМВ ММД в зависимости от частоты. Теоретически возможен отрицательный ДЭФ, проявля-

ющийся в выталкивании частицы из области сгущения силовых линий. Однако представляется маловероятной возможность его реализации в случае живой клетки [17]. Поэтому если ДЭФ и присутствует в обнаруженном нами явлении, то лишь как дополнительный фактор. В любом случае результаты наших экспериментов свидетельствуют о прямом, не опосредованном через функциональное состояние влиянии ЭМВ ММД на электрическую подсистему живой клетки.

ВЫВОДЫ

Таким образом, с помощью метода декорреляции динамических спеклов зарегистрировано в реальном времени влияние электромагнитных волн миллиметрового диапазона на электрические свойства клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Под воздействием излучения на частотах в диапазоне 41–42 ГГц происходит в зависимости от частоты увеличение или уменьшение подвижности клеток, связанное с соответствующим изменением сил электростатического сцепления с поверхностью подложки. Двухнаправленность отклика согласуется с фактом существования биологических эффектов ЭМВ ММД разных знаков. Полученные результаты свидетельствуют в пользу мембранного механизма биологического действия миллиметровых волн, а также могут лечь в основу новых методов иммобилизации клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Belyaev I. *Microwave Rev.* 2005, **11**(2), 13–29.
2. Belyaev I., Markov M.S. *Biophysical mechanisms for nonthermal microwave effects*. In: *Electromagnetic fields in biology and medicine*. London, New York: Boca Raton, 2015, P. 49–68.
3. Борисенко Г.Г., Полников И.Г., Казаринов К.Д. *СВЧ-техника*. 2007, **4**(492), 29–41.
4. Grundler W., Keilmann F. *Phys Rev Lett.* 1983, **51**(13), 1214–1216.
5. Андреев Е.А., Белый М.У., Иванченко И.А., Якунов А.В. *ЭОМ*. 1990, (1), 61–63.
6. Тишук С.П., Якунов А.В. *ЭОМ*. 1992, (3), 59–60.
7. Нижельская А.И., Якунов А.В. *Физика живого*. 2004, (1), 53–62.
8. Yakunov A.V., Nizhelska A.I., Marinchenko L.V., Marinchenko V.A. et al. *Surf Eng Appl Electrochem.* 2015, **51**(2), 156–161.
9. Steblenko L.P., Nigelska A.I., Naumenko S.N., Kuryliuk A.N. et al. *J Surf Invest.* 2017, **11**(1), 280–284.
10. Hector J. Rabal, Roberto A. Braga Jr. *Dynamic Laser Speckle and Applications*. CRC Press, 2009, 255 p.
11. Bandyopadhyay R., Gittings A.S., Suh S.S., Dixon P.K. et al. *Rev Sci Instrum.* 2005, **76**, 1–11.
12. Pobiedina V., Yakunov A. *Optical Micro-and Nanometrology*. International Society for Optics and Photonics, 2016, P. 98900–98911.
13. Kuzkova N., Popenko O., Yakunov A. *Int J Biomed Imaging*. 2014, 12–18.
14. Sewchand L., Rowlands S., Lovlin R.J.B. *Cell biophysics*. 1982, **4**(1), 41–46.
15. Taylor A.C. *Adhesion in biological systems*. Editor R. Manly. Elsevier., 1970, P. 51–70.
16. Mozes N., Marchal F., Hermesse M.P., Van Haecht J.L. et al. *Biotechnol Bioeng.* 1987, **30**(3), 439–450.
17. Pethig R.R. *Dielectrophoresis: Theory, methodology and biological applications*. John Wiley & Sons, 2017, 437 p.
18. Андреев Е.А., Тишук С.П., Якунов А.В. *Фундаментальные и прикладные аспекты применения миллиметрового электромагнитного излучения в медицине*. Киев: ВНК «Отклик», 1989, С. 106.

Summary

Using the method of decorrelation of dynamic speckles in real time, the influence of millimeter electromagnetic waves on the mobility of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells deposited on a glass substrate was studied. The mobility of biological cells that lack a natural function of movement is determined primarily by the Brownian motion. It was found that under the influence of radiation, at frequencies in a range of 41–42 GHz, depending on the frequency, an increase or a decrease in the cell mobility occurs, associated with a corresponding change in the forces of electrostatic adhesion to the substrate surface. A direct influence of millimeter waves on the electrical subsystem of an isolated cell is demonstrated for the first time.

Keywords: biological effects of millimeter waves, dynamic speckles, decorrelation, adhesion, dielectrophoresis