

14. Fromm E. Bull / E. Fromm and H. Jehn // Alloy Phase Diagrams. – 1984. – Vol. 5. – P. 324.
 15. Garaj S. Graphene synthesis by ion implantation / S. Garaj, W. Hubbard, J.A. Golovchenko // Appl. Phys. Lett. – 2010. – Vol. 97. – P. 183103.
 16. Role of Hydrogen in Chemical Vapor Deposition Growth of Large Single-Crystal Graphene / I. Vlassioug [et al.] // ACS Nano. – 2011. – Vol. 5, № 7. – P. 6069-6076.

ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ СТИМУЛЯЦИЯ КАК СПОСОБ УПРАВЛЕНИЯ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ КЛЕТОК

Ю. Н. Куницкая, О. С. Свистун, Е. Н. Голубева, П. М. Булай

Стремительное развитие современных клеточных технологий требует создания новых и более эффективных методов управления пролиферативной активностью клеток. Как известно, существуют не только биохимические, но и физические способы регуляции клеточной пролиферации, среди которых особое место занимает регуляция пролиферативной активности воздействием внешнего электрического поля. В свою очередь действие электрического поля может быть направлено на изменение величины равновесного трансмембранного потенциала. Было показано, что в процессе деления клеток трансмембранный потенциал имеет различное значение на разных стадиях роста клеток [1]. Воздействуя каким-либо образом на данный параметр можно регулировать скорость пролиферации клеток. В связи с этим, электрическая стимуляция может рассматриваться в качестве эффективного метода управления клеточной активностью.

В результате исследований были разработаны два протокола проведения электрической стимуляции клеток внешним электрическим полем. Клетки подвергали воздействию электрического поля через 8 часов после посева клеток, длительность воздействия составляла 12 часов. Определение параметров функциональной активности проводили через 4 часа после прекращения воздействия стимуляции (Протокол 1). Согласно второму протоколу (далее Протокол 2) стимуляция запускалась через 24 часа, остальные параметры соответствовали Протоколу 1 [2]. Были использованы 4 режима воздействия внешнего электрического поля (табл.), включающие в себя контрольный образец (4 режим).

Таблица

Режимы электрической стимуляции

Режим	1	2	3	4
Амплитуда положительной фазы, В/м	20	20	6,6	0
Амплитуда отрицательной фазы, В/м	20	20	6,6	0
Период положительной фазы, мс	1	1	1	1
Период отрицательной фазы, мс	1	1	1	1
Количество импульсов в трейне (пачке), шт	3	1	3	1
Частота следования трейнов, Гц	10	10	10	10

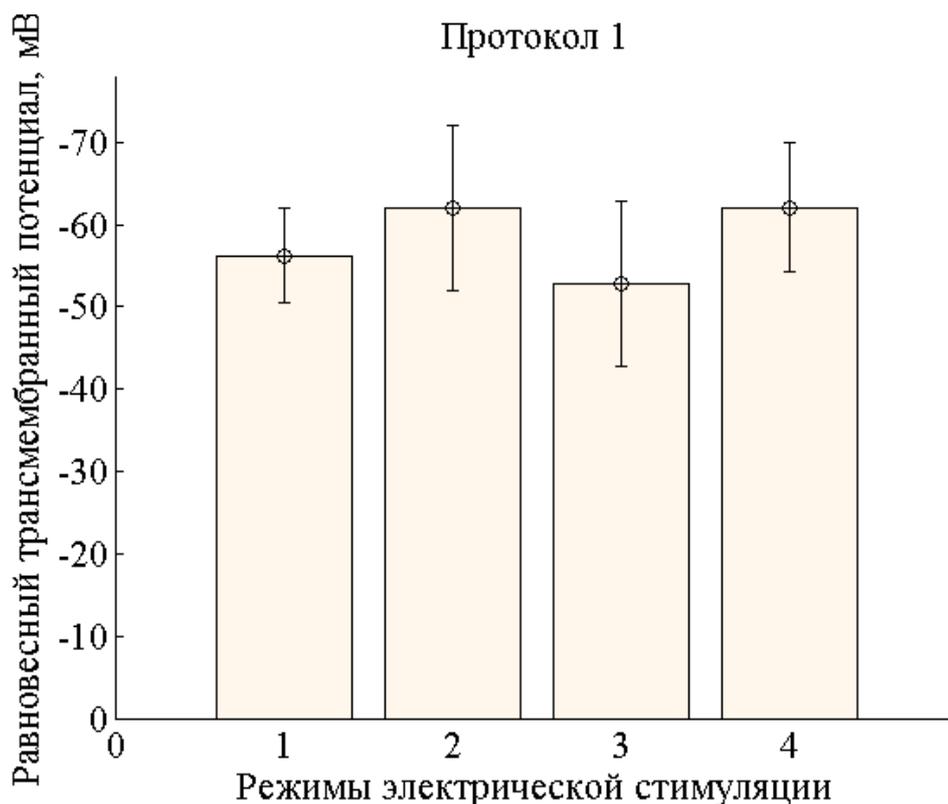


Рис. 1. Равновесный трансмембранный потенциал (мВ) клеток глиомы крысы линии С6, Протокол 1

При воздействии внешнего электрического поля в соответствии с Протоколом 1 наблюдалась как гиперполяризация, так и деполяризация плазматической мембраны (рис. 1), в то время как при экспозиции клеток к внешнему электрическому полю в соответствии с Протоколом 2 наблюдалась либо гиперполяризация плазматической мембраны, либо незначительное изменение величины трансмембранного потенциала относительно контрольного образца (рис. 2).

В результате исследований была произведена оценка трансмембранного электрического потенциала на внутренней мембране митохондрий (далее митохондриальный потенциал) методом конфокальной флуоресцентной микроскопии. Установлено, что при воздействии внешнего поля на клетки согласно первому протоколу происходит не только уменьшение, но и увеличение митохондриального потенциала (рис. 3а). В клетках, подвергшихся воздействию поля в соответствии с Протоколом 2 в основном наблюдалось повышение митохондриального потенциала (рис. 3б). Из анализа данных, представленных на рис. 3, следует, что для обоих протоколов направление изменения величины митохондриального и трансмембранного потенциалов по сравнению с контролем во втором и третьем режимах совпадало: наблюдалось увеличение и уменьшение обоих параметров соответственно.

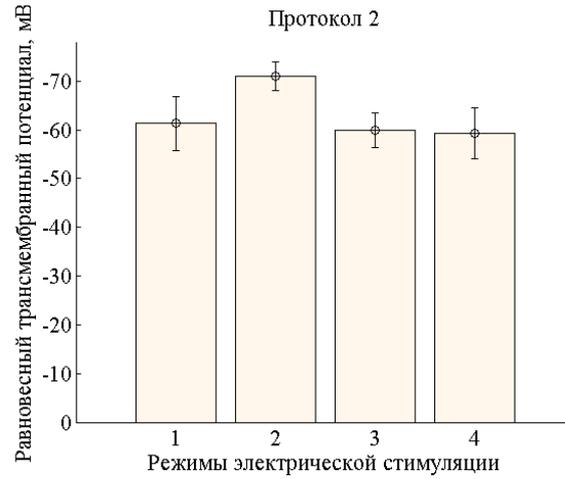


Рис. 2. Равновесный трансмембранный потенциал (мВ), Протокол 2

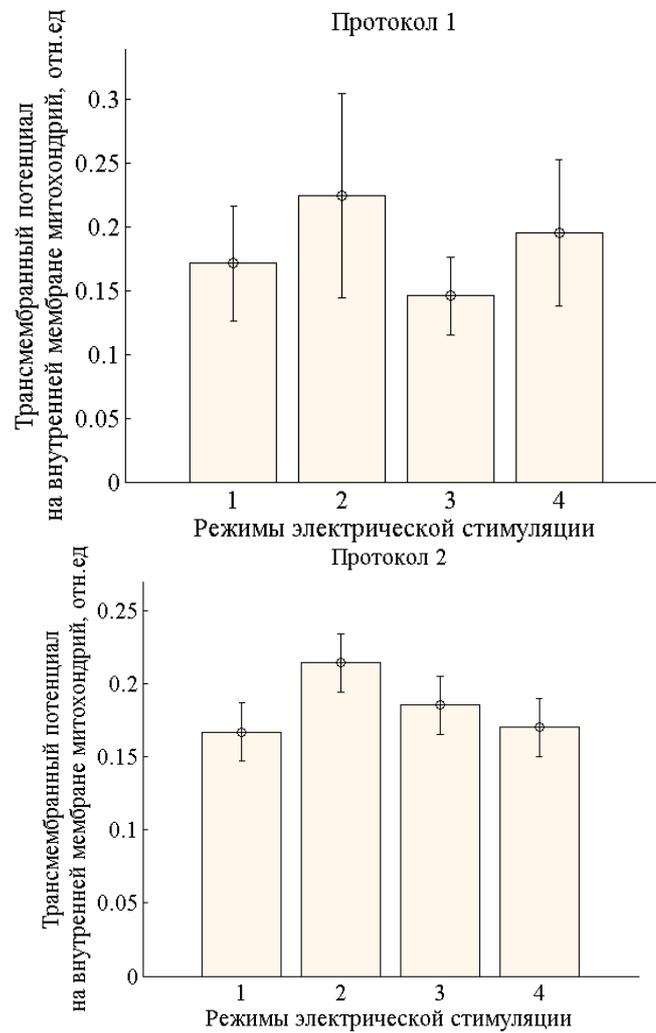


Рис. 3. Митохондриальный трансмембранный потенциал (мВ),
Протокол 1

a – Протокол 1, *б* – Протокол 2

Митохондрии являются не только важнейшим источником энергии в клетке, но выполняют целый ряд других функций. Нарушив процесс дыхания и/или целостность митохондрий, изменив величину потенциала на внутренней мембране митохондрий можно индуцировать апоптоз опухолевых клеток или способствовать стимуляции процессов деления клеток. Изменение равновесного трансмембранного потенциала, обусловленное действием внешнего электрического поля, может приводить к изменению в функционировании митохондрий. В настоящей работе установлено, что изменения в величинах трансмембранного и митохондриального потенциалов коррелируют с результатами оценки жизнеспособности клеток при действии внешнего электрического поля. В режимах с гиперполяризованной плазматической мембраной и высоким значением митохондриального потенциала по отношению к контрольному образцу наблюдается уменьшение числа жизнеспособных клеток (режим 2, Протокол 1 / режимы 1-3, Протокол 2). Так же в режимах с гиперполяризованной плазматической мембраной наблюдалось резкое повышение генерации супероксидных анион-радикалов. Усиление продукции супероксидных анион-радикалов может выступать в качестве одного из этапов запуска процесса гибели клеток.

Таким образом, в результате исследований подобран режим воздействия внешним электрическим полем, позволяющий стимулировать (амплитуда 6,6 В/м, 3 стимулирующих импульса) либо ингибировать деление клеток (режим 1-3, Протокол 2). Показано, что длительная гиперполяризация плазматической мембраны в результате электрической стимуляции способствует замедлению прохождения клеткой фаз клеточного цикла и, возможно, приводит к гибели клеток. Полученные данные свидетельствуют о том, что электрическая стимуляция может использоваться в качестве универсального метода регуляции пролиферативной активности клеток. Полученные данные имеют важное практическое значение, так как могут быть использованы как в клеточной инженерии, так и в разработке новых и повышении эффективности уже существующих методов противоопухолевой терапии.

Литература

1. Куницкая Ю. Н., Голубева Е. Н., Булай П. М / Влияние хронической электрической стимуляции на пролиферативную активность клеток линии С6 // Международная научная конференция «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» – 17 – 20 июня – 2014 г.
2. Куницкая Ю. Н., Голубева Е. Н. Равновесный трансмембранный потенциал опухолевых клеток линий С6, НЕр-2с и НЕК при пролиферации/ // Сборник работ 70-й научной конференции студентов и аспирантов Белорусского государственного университета, 15–18 мая 2013 г., Минск: В 3 ч. Ч. 1 / Белорус. гос. ун-т.– Минск: Изд. центр БГУ, 2013. – С. 134-137.