

УДК577.344.3

ВЛИЯНИЕ ВОЛОКОННОГО ВКР-ЛАЗЕРА НА ЭРИТРОЦИТЫ КРЫС

Л.В. Полуднякова¹, Т.П. Генинг¹, Л.А. Белозерова²

¹Ульяновский государственный университет,

²Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова

Исследовалось влияние волоконного ВКР-лазера на эритроциты крыс. Установлено, что лазерное излучение с используемыми дозами усиливает процессы липопероксидации мембран эритроцитов и стимулирует активность клеточных ферментов антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: эритроциты, высокоинтенсивное лазерное излучение, перекисное окисление липидов, антиоксиданты.

Введение. К настоящему времени лазерное излучение прочно вошло в медицинскую практику. Прежде всего это высокоинтенсивное лазерное излучение, используемое в хирургии для нанесения поверхностных и глубоких разрезов, испарения поверхностных дефектов кожи, коагуляции и карбонизации тканей, их стерилизации. Достаточно высока терапевтическая эффективность низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ), наблюдаемая при лечении самого широкого круга заболеваний. В сочетании с фотосенсибилизатором НИЛИ применяется для избирательного разрушения опухолей (фотодинамическая терапия [3]). Однако метод фотодинамической диагностики и терапии в силу ряда вполне объективных причин остается уделом единичных специализированных учреждений. В основе причин ограничения широкого использования этого метода лежат: 1) необходимость введения экзогенных фотосенсибилизаторов; 2) высокая их фототоксичность; 3) длительность периода накопления фотосенсибилизатора опухолью (24–48 часов) и длительность снижения его концентрации в здоровой ткани; 4) относительная тропность к некоторым доброкачественным опухолям; 5) возможность аллергических реакций и высокая стоимость фотосенсибилизаторов [9]*.

В течение ряда лет защищается идея, согласно которой инфракрасный свет ($\lambda=1264\pm 4$ нм) может напрямую возбуждать молекулы кислорода в биологических системах и тем самым вызывать регулирование метаболизма или даже гибель клеток («светокислородный эффект») [4; 5]. Исследования в этом направлении основываются на гипотезе профессора Р.В. Амбарцумяна о механизме генерации синглетного кислорода при возбуждении линий поглощения молекулярного кислорода [1].

Для подтверждения гипотезы была проведена серия экспериментов на суспензиях эритроцитов, микробах, клеточных культурах опухолей и солидных опухолях животных [4; 5; 6; 7]. Авторы отмечают, что наиболее высокая биологическая активность лазерного воздействия, особенно на опухоли, наблюдается на длине волны 1268 нм. Для получения устойчивого цитотоксического эффекта требуется увеличение плотности импульсной мощности [7]. Полученные данные являются обоснованием для совершенно нового метода лечения онкологических заболеваний – прямой фотохимической деструкции опухолей без использования экзогенных сенсбилизаторов.

Для создания мощных источников возбуждения синглетного кислорода наиболее простым представляется ВКР-преобразование излучения иттербиевого волоконного лазера [8]. Эффект вынужденного комбинаци-

* Работа поддержана ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России 2009–2013 гг.»

онного рассеяния (ВКР) – нелинейный эффект, который становится сильным в протяженных волоконных световодах за счёт концентрации интенсивного излучения на большой длине [2].

Научным центром волоконной оптики РАН совместно с Ульяновским государственным университетом разработан уникальный непрерывный иттербиевый волоконный ВКР-лазер с рабочей мощностью до 5,5 Вт и длиной волны 1,26–1,27 мкм. Его характеристики должны помочь реализовать идею прямой фотодинамической терапии [8].

Для эффективного и безопасного лечения необходимы четкие представления о механизме действия этого физического фактора на биологическую систему. Эффекты лазерного излучения часто изучаются на стандартном модельном объекте – эритроцитах. О состоянии их мембран можно судить по системе «перекисное окисление липидов (ПОЛ) – антиоксиданты (АО)». Литературных данных, посвященных воздействию ВКР-лазеров на эритроциты, мы не обнаружили.

Цель исследования. Оценка уровня ПОЛ и активности ферментов антиоксидантной системы защиты в эритроцитах при высокоинтенсивном непрерывном лазерном воздействии.

Материалы и методы. Исследования проводились на эритроцитах белых крыс. Рабочая взвесь эритроцитов ресуспендировалась в 0,85 % NaCl в соотношении 1:1 и помещалась в пластиковую кювету. Облучение велось волоконным ВКР-лазером ($\lambda=1265$ нм) непрерывно с максимальной выходной мощностью 5,5 Вт. При этом дозы, получаемые суспензией эритроцитов составили: 7,8; 10,8; 39; 54; 78; 108; 156 и 216 Дж/см². Интенсивность ПОЛ оценивалась спектрофотометрически с учетом разведения (1:100). В эритроцитах определяли концентрацию малонового диальдегида (МДА) по Л.И. Андреевой (1988); активность каталазы, глутатион-S-трансферазы (ГТ) по А.И. Карпищенко (1999) и супероксиддисмутазы (СОД) по Nishikimi (1972). В надосадочной жидкости гемоглобинцианидным методом определялся уровень

гемоглобина. Статистическая значимость полученных результатов оценивалась с помощью критерия Стьюдента (в Stata 6.0). Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Результаты представлены в табл. 1. Важным показателем функционального состояния мембран клеток является интенсивность процессов липопероксидации в них. Нами было изучено влияние высокоинтенсивного непрерывного облучения на процессы липопероксидации мембран эритроцитов по уровню МДА. Проведенные исследования показали, что значения МДА при лазерном облучении в дозах 7,8, 39 и 78 Дж/см² остаются на уровне контрольных значений. При других используемых нами параметрах облучения наблюдается выраженное усиление липопероксидации эритроцитарных мембран, о чем свидетельствует достоверно значимое повышение МДА по сравнению с контролем.

Высокоинтенсивное лазерное излучение активизировало ферментативное звено антиоксидантной защиты. Наиболее выраженным и достоверным оказалось повышение уровня активности СОД, катализирующей дисмутацию супероксида в кислород и пероксид водорода. При этом динамика дозозависимого изменения активности фермента носила волнообразный характер. Активность глутатион-S-трансферазы эритроцитов также возрастает при всех используемых дозах высокоинтенсивного ВКР-лазерного облучения. При этом уровень данного фермента постепенно нарастает и достигает максимума при дозе воздействия 39 Дж/см², а затем постепенно снижается, достигая контрольного уровня при дозе 216 Дж/см². В результате исследования было установлено, что облучение ВКР-лазером при дозе 7,8 Дж/см² не активизировало каталазу. Более высокие дозы высокоинтенсивного лазерного облучения вызывают повышение активности данного антиоксидантного фермента.

Возможно, в инициации наблюдаемого свободно-радикального окисления участвует синглетный кислород, образовавшийся в результате прямой фотогенерации:

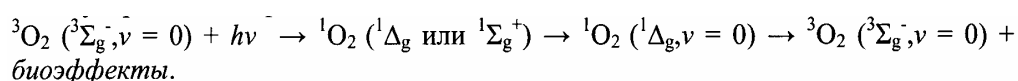


Таблица 1

Состояние системы «ПОЛ – АО» в эритроцитах при воздействии ВКР-лазером

Доза излучения (Дж/см ²)	МДА (мкмоль/л)	Каталаза (ммоль/мин·л)	ГТ (ммоль/мин·л)	СОД (усл. ед/л)	Гемоглобин (г/л)
Контроль	152,15±11,41	9,25±0,73	0,033±0,007	0,421±0,048	1,57±0,13
7,8	150,35±8,93	9,06±0,71	0,041±0,004	1,733±0,330*	3,35±0,53*
10,8	192,38±8,98*	11,57±0,52*	0,046±0,007*	1,357±0,405*	4,15±0,47*
39	156,35±12,25	11,36±1,18	0,057±0,005*	1,858±0,494*	3,55±0,32*
54	184,16±5,76*	12,32±0,57*	0,050±0,006*	1,653±0,387*	4,20±0,54*
78	148,91±12,92	10,91±0,91	0,048±0,005	2,032±0,537*	3,76±0,75*
108	221,57±9,63*	10,99±0,63	0,047±0,004*	1,207±0,289*	4,30±0,46*
156	208,91±11,71*	15,10±0,97*	0,050±0,002	2,033±0,460*	2,92±0,38*
216	215,81±15,19*	10,89±0,60	0,034±0,010	1,410±0,336*	3,31±0,51*

Примечание. * – различия с контрольной группой статистически значимы ($p < 0,05$).

При развитии фотоотклика клетки происходит смена трех последовательных стадий, которые при достаточно большой дозе воздействия проявляются последовательно одна за другой. Реакция клетки на воздействие облучения начинается стереотипным возбуждением и проявляется в синхронном увеличении мембранной лабильности. Продолжающееся облучение приводит к нарастанию в клетке окисления, что вынуждает клетку перейти к активной самозащите (ферментативная борьба с окислением молекулярных структур). При возрастании фотодинамической нагрузки наступает третья фаза фотоотклика клетки – повреждение системы ионного транспорта и осмотическое набухание клетки. В результате уменьшается концентрация всех молекул и тормозятся биохимические процессы. Продолжающееся воздействие приводит к критическому набуханию клетки и наступает ее разрыв [4].

О повреждении мембран эритроцитов при лазерном воздействии свидетельствует достоверное повышение уровня гемоглобина в надосадочной жидкости. Следует отметить небольшой спад уровня гемоглобина в надосадке при дозе облучения 156 и 216 Дж/см² по сравнению с более низкими дозами воздействия, что может быть связано с термиче-

ской денатурацией гемоглобина при данных режимах воздействия [9].

Заключение. Воздействие высокоинтенсивного непрерывного лазерного излучения с используемыми параметрами усиливает процессы липопероксидации мембран эритроцитов и стимулирует активность ферментов антиоксидантной защиты.

1. Амбарцумян, Р.В. Лазерная фотохимическая деструкция злокачественных опухолей без экзогенных сенсibilизаторов / Р.В. Амбарцумян, В.И. Кишко, В.Г. Соколов // V Международный форум «Высокие технологии XXI века». – М., 2004. – С. 339.

2. Бабин, С.А. Волоконные лазеры: достижения и перспективы / С.А. Бабин // Наука Сибири. Ежедневная газета сибирского отделения РАН. – №50 (2785). 23 декабря 2010 г.

3. Владимиров, Ю.А. Лазерная терапия: настоящее и будущее / Ю.А. Владимиров // Соросовский образовательный журн. – 1999. – №12. – С. 2–8.

4. Захаров, С.Д. Светокислородный эффект в клетках и перспективы его применения в терапии опухолей / С.Д. Захаров, А.В. Иванов // Квантовая электроника. – 1999. – №9. – С. 192–214.

5. Захаров, С.Д. Структурные перестройки в водной фазе клеточных суспензий и белковых растворов при светокислородном эффекте / С.Д. Захаров и др. // Квантовая электроника. – 2003. – Т. 33, №3. – С. 149–162.

6. *Иванов, А.В.* Физические основы лазерных методов в онкологии : дис. ... д-ра физ.-мат. наук / А.В. Иванов. – М., 2003. – 359 с.

7. *Корси, Л.В.* Лазерный способ фотохимической деструкции опухолей без экзогенных sensibilizаторов / Л.В. Корси, В.Г. Соколов // Лазерно-оптические системы и технологии : сб. ст. – М., 2009. – С. 101–106.

8. *Курков, А.С.* Волоконный ВКР-лазер для прямой фотодинамической терапии / А.С. Курков. – Режим доступа : phch.mrsu.ru/2009-2/pdf/2Kurkov.pdf.

9. *Прокопьев, В.Е.* Биофизические механизмы воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения на биологические ткани и оптические методы диагностики их состояния : дис. ... д-ра физ.-мат. наук / В.Е. Прокопьев. – Томск, 2004. – 282 с.

10. *Ямайкина, И.В.* Денатурация гемоглобина – первая стадия термогемолита эритроцитов / И.В. Ямайкина, Е.А. Черницкий // Биофизика. – 1989. – Т. 34, №4. – С. 656–659.

THE EFFECT OF FIBER RAMAN-LASER ON ERYTHROCYTES OF RATS

L.V. Poludnyakova¹, T.P. Gening¹, L.A. Belozerova²

¹*Ulyanovsk State University,*

²*Ulyanovsk State Pedagogical University*

The effect of fiber RAMAN-laser on erythrocytes of rats was investigated. It was established that laser irradiation with doses used increases lipid peroxidation in membranes of red blood cells and stimulates the activity of cellular antioxidant enzymes.

Keywords: red blood cells, RAMAN-laser irradiation, lipid peroxidation, antioxidants.