

УДК 616-006: 612.62

## ВЛИЯНИЕ ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ПРО- И АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС МЫШЕЙ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ\*

О.С. Воронова<sup>1</sup>, Т.П. Генинг<sup>1</sup>, А.А. Сысолятин<sup>2</sup>, В.В. Светухин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ульяновский государственный университет,  
<sup>2</sup>Научный центр волоконной оптики РАН, Москва

В работе рассмотрено влияние фемтосекундного лазерного излучения на изменение параметров оксидативного стресса в эритроцитах, плазме крови и неоплазме мышей с экспериментальным раком шейки матки (РШМ-5). Дана оценка изменений показателей системы «перекисное окисление липидов – антиоксиданты» (ПОЛ-АО) в эритроцитах, плазме крови и неоплазме РШМ-5 на разных сроках роста опухоли под воздействием фемтосекундного лазерного излучения с пиковой мощностью 6 кВт при средней 1,25 мВт.

**Ключевые слова:** рак шейки матки, перекисное окисление липидов, антиоксиданты, оксидативный стресс.

**Введение.** Проблема злокачественного роста является на сегодня одной из самых актуальных в биологии и медицине [11]. Показана роль активных форм кислорода (АФК) и инициируемого ими перекисного окисления липидов (ПОЛ) в механизмах канцерогенеза [10; 18]. АФК являются основным источником свободных радикалов, избыточное образование которых приводит к повреждающему действию на клетки [15]. Важную роль в защите клеток от повреждающего действия АФК играет система антиоксидантной защиты (АОЗ) [14]. Снижение активности антиоксидантной системы или ее несостоятельность способствуют повышению активности ПОЛ, что в конечном итоге приводит к мембранопатологическим процессам [1]. Состояние, при котором происходит активация ПОЛ на фоне депрессии или недостаточности естественных антиоксидантных систем, называется окислительным стрессом. Соотношение про- и антиоксидантного статуса организма играет важную роль в возникновении и развитии неоплазмы [16].

Рак шейки матки (РШМ) – одна из актуальных проблем онкогинекологии. По данным ВОЗ, ежегодно в мире выявляется около

500 тыс. новых случаев, более 270 тыс. женщин умирают от РШМ [22]. В России в последние десятилетия отмечаются высокий показатель запущенности РШМ и увеличение числа больных молодого возраста [13].

Широкому использованию лазеров в онкологической клинике препятствует отсутствие единой точки зрения на возможность стимуляции лазерным излучением (ЛИ) пролиферации опухолевого узла и процессов метастазирования, невозможность воздействия в точных границах опухоли без повреждения здоровых тканей, а также отсутствие данных об изменении биологического портрета злокачественных опухолей различной тканевой организации при воздействии ЛИ с различными параметрами.

В разрушении раковой опухоли исходным повреждающим агентом может быть синглетный кислород, что объясняется его высокой химической активностью [5]. Он может участвовать в цепных свободно-радикальных реакциях, окислять аминокислоты в белках, гуанин в ДНК, инициировать ПОЛ [21]. Итогом подобных нарушений при превышении репаративных возможностей клетки становится ее деструкция. Светокислородный эффект (СКЭ) заключается в активировании или повреждении биосистем оптическим излучением (в зависимости от световой дозы) посредством прямого перевода растворенного в

\* Работа поддержана грантом Президента РФ № 16.120.11-836-МК и госзадаaniem Министерства образования и науки РФ № 4.1219.2011.

них молекулярного кислорода в синглетное состояние [5]. Л.В. Корси с соавт. [9] в работах по воздействию ЛИ на клетки опухоли установили, что облучение на длине волны 1268 нм приводит к образованию синглетного кислорода и индуцируемых им реакций окисления, так как ближний инфракрасный диапазон является спектром поглощения кислорода [2; 6].

Показано, что существует определенная предельная мощность антиоксидантной системы клеток и (или) организма: антиоксидантная система успешно справляется только с определенным количеством свободных радикалов, появляющихся в единицу времени [9]. Если этот порог превысить, то можно ожидать появления необратимых повреждений, которые при достаточном количестве могут вызвать гибель клеток. Для увеличения СКЭ, вероятно, требуется увеличение интенсивности ЛИ, что возможно за счет увеличения импульсной мощности при сохранении средней мощности [19].

**Цель исследования.** Изучение влияния фемтосекундного лазерного излучения (ФСЛИ) на про- и антиоксидантный статус мышей в динамике экспериментального рака шейки матки.

**Материалы и методы.** Модель рака шейки матки воспроизводили путем перевивки опухолевого штамма, приобретенного в НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (г. Москва) на белых инбредных мышках подкожно в подмышечную область.

В эксперименте использовался фемтосекундный эрбиевый лазер, являющийся разработкой Центра волоконной оптики РАН при участии Центра Нанотехнологий НИТИ Ульяновского государственного университета, излучающий в ближнем инфракрасном диапазоне ( $\lambda=1550$  нм) и работающий в импульсном режиме ( $\tau_{\text{имп.}}=100 \cdot 10^{-15}$  с) с пиковой мощностью 6 кВт, средней мощностью 1,25 мВт.

Импульсный режим лазера имеет определенные преимущества: при импульсной подаче излучения за время, равное длительности импульса, ткани, расположенные на максимальной глубине проникновения лазерного луча, получают значительно больше энергии,

чем при облучении непрерывным НИЛИ, так как происходит более полная утилизация атомами и молекулами импульсной энергии [7]. Также импульсное воздействие способствует образованию в тканях волн сжатия и разрежения, распространение которых обеспечивает общее действие излучения на организм. Импульсный режим генерации излучения исключает развитие «привыкания» биологических тканей к действию излучения [13]. Кроме того, значение длины волны, на которой излучает лазер, находится в инфракрасном диапазоне в полосе поглощения кислорода, такое излучение работает ~ в 20 раз эффективнее, чем в красной полосе, что согласуется со спектром поглощения кислорода [6].

При режиме излучения на расстоянии 10 см (площадь воздействия  $3,14 \text{ см}^2$ ) средняя плотность энергии на ткань (энергетическая доза) за одну процедуру составляла  $0,24 \text{ Дж/см}^2$  за 10 мин и  $0,36 \text{ Дж/см}^2$  за 15 мин, но при этом облучение проходило в импульсном режиме при огромной пиковой интенсивности, равной  $1910,8 \text{ Вт/см}^2$  в момент импульса. Процедуры проводились ежедневно, при 10-и процедурах 10-минутного лазерного облучения суммарная энергетическая доза лазерного излучения за курс составляла  $2,4 \text{ Дж/см}^2$ . При 10-кратном облучении в режиме 15 мин на расстоянии 10 см суммарная плотность энергии на ткань составляла  $3,6 \text{ Дж/см}^2$ .

Для биохимического исследования использовали ткань опухоли, плазма крови и эритроциты. Гомогенат опухоли готовился на растворе сахарозы в соотношении 1:9. Для анализа использовали супернатант, который получали центрифугированием при 7000 оборотов.

Интенсивность ПОЛ оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА) в тесте с тиобарбитуровой кислотой по методу Л.И. Андреевой и др. [3]. Для оценки деятельности системы АОЗ использовали звено ферментативных антиоксидантов, анализируя активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионредуктазы (ГР), глутатион-S-трансферазы (ГТ).

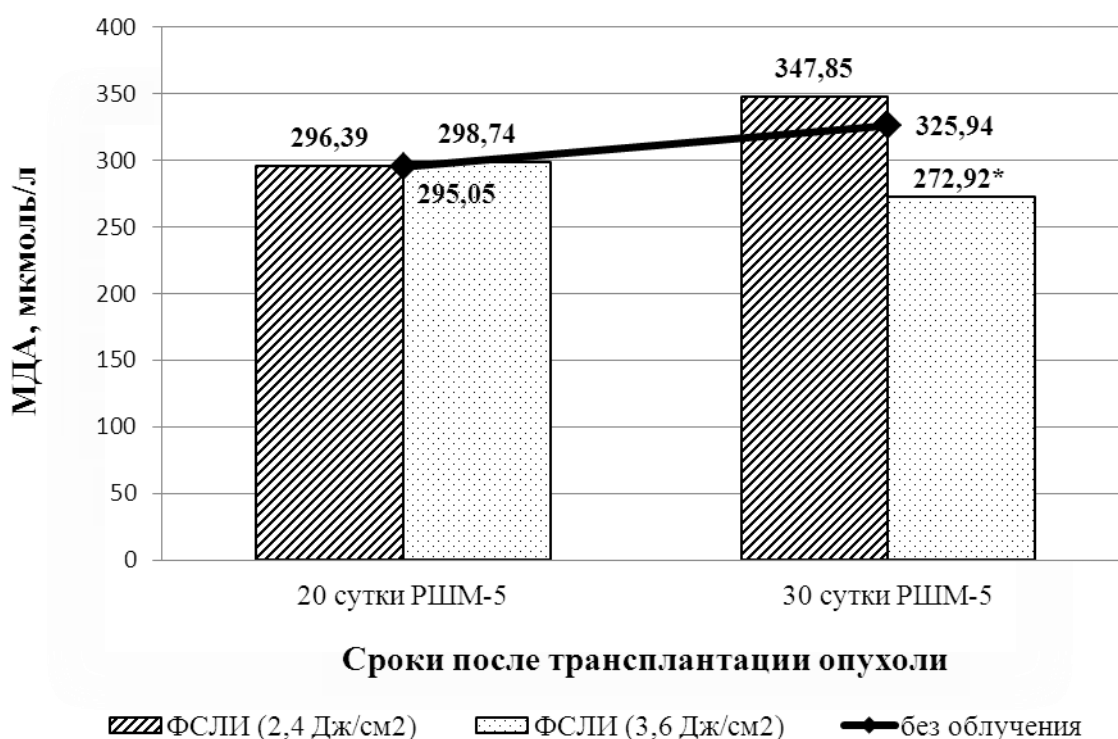
Определение активности СОД проводили по методу Е.Е. Дубининой [4] и М. Nishikimi

[20]; активности каталазы, ГТ и ГР оценивали по А.И. Карпищенко [9]. Активность антиоксидантных ферментов (АОФ) и уровень МДА пересчитывались на 1 мг белка для опухолевой ткани. Определение белка проводили по методу Брэдфорда [14].

Математическая обработка данных проводилась с применением непараметрического U-критерия Манна-Уитни ( $p \leq 0,5$ ).

**Результаты и обсуждение.** Воздействие ФСЛИ на мышей изменяет показатели системы ПОЛ-АО и в опухолевой ткани, и на

уровне организма в целом. На 20-е сутки после трансплантации опухоли у мышей с РШМ-5 после 10-кратного облучения фемтосекундным лазером в разных дозах уровень МДА в эритроцитах остается на том же уровне, что и у мышей, не подвергавшихся лазерному облучению и находящихся на тех же сутках развития опухоли. На 30-е сутки после трансплантации опухоли воздействие в течение 10 дней ФСЛИ на мышей в дозе 2,4 Дж/см<sup>2</sup> повышает, а в дозе 3,6 Дж/см<sup>2</sup> – снижает уровень МДА (рис. 1).



**Рис. 1.** Влияние различных доз ФСЛИ на уровень МДА в эритроцитах мышей с РШМ-5 на разных сроках после трансплантации опухоли

**Примечание.** \* – данные, статистически значимо отличающиеся от данных без облучения,  $p \leq 0,05$ .

Воздействие ФСЛИ на 20-е сутки роста опухоли дозозависимо и достоверно повышает активность СОД в эритроцитах, а на 30-е сутки снижает ее (рис. 2). Уровень каталазы также повышается при воздействии ФСЛИ на мышей с РШМ-5 на 20-е сутки после трансплантации. На 30-е сутки после трансплантации опухоли ФСЛИ не вызывает видимых изменений уровня каталазы в эритроцитах мышей (рис. 2).

Уровень ГТ в эритроцитах при облучении животных-опухоленосителей снижается с увеличением дозы лазерного облучения до 3,6 Дж/см<sup>2</sup> на всех изученных стадиях роста опухоли. Активность ГР в эритроцитах мышей с РШМ-5 изменяется аналогично активности ГТ: наблюдается снижение активности фермента при облучении животных с РШМ-5.

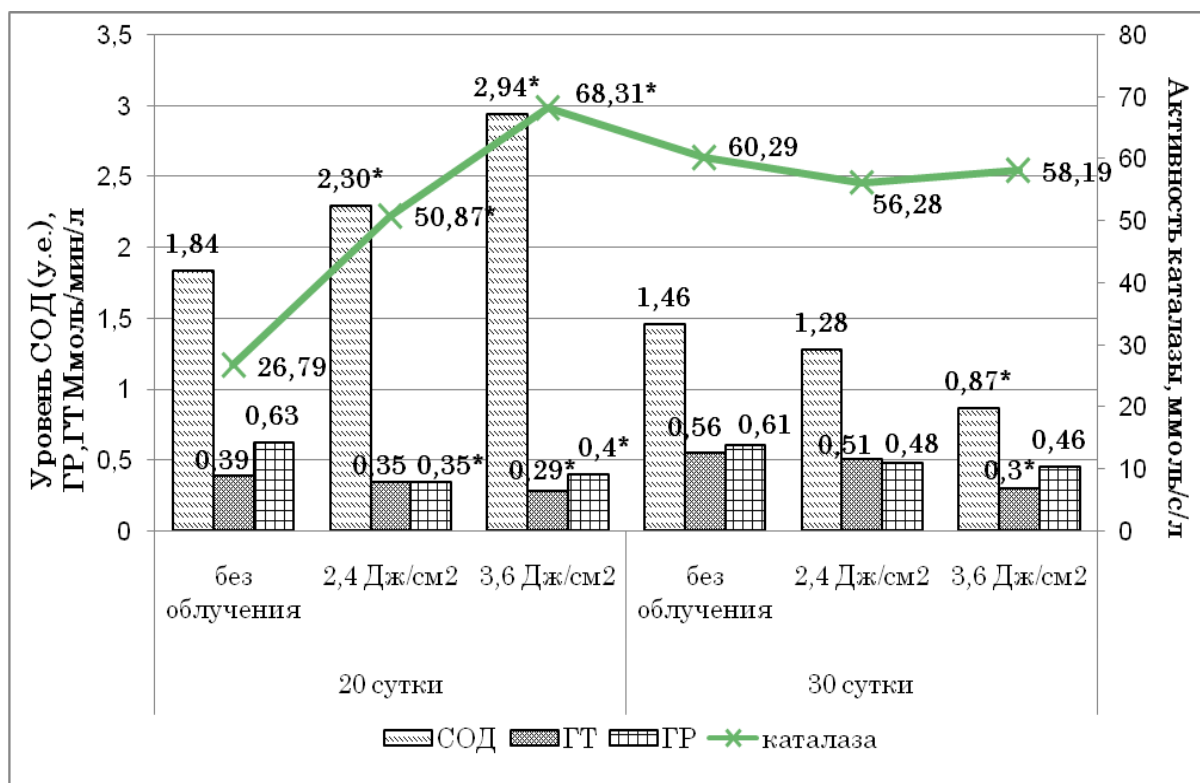


Рис. 2. Активность антиоксидантных ферментов в динамике прогрессирования РШМ-5 до и после воздействия ФСЛИ

При облучении фемтосекундным (ФС) лазером повышается уровень МДА в плазме крови животных-опухоленосителей на 20-е сутки после трансплантации опухоли. На 30-е сутки после трансплантации РШМ-5 уровень МДА увеличивается при воздействии ФСЛИ в дозе 2,4 Дж/см<sup>2</sup> и уменьшается при повышении дозы облучения до 3,6 Дж/см<sup>2</sup> (табл. 1).

Облучение мышей на 20-е сутки после трансплантации РШМ-5 в обеих дозах по-

вышает активность каталазы в плазме крови. На 30-е сутки облучение фемтосекундным лазером не приводит к достоверным изменениям в активности каталазы. Динамика изменений ГТ в плазме крови мышей с опухолью после облучения аналогична динамике активности каталазы. Уровень ГР снижается после фемтосекундного лазерного облучения на 20-е сутки роста опухоли, а на 30-е сутки изменяется волнообразно и дозозависимо (табл. 1).

Таблица 1

**Показатели системы ПОЛ-АО в плазме крови мышей на разных стадиях развития РШМ-5 после воздействия ФСЛИ**

Эксп. группа	Показатель	МДА	Каталаза	ГР	ГТ
		Мкмоль/л	Ммоль/с/л	Ммоль/мин/л	Ммоль/мин/л
Мыши с РШМ-5 (20 суток) n=12	Без облучения	2,64±0,30	0,053±0,090	0,033±0,008	0,027±0,003
	2,4 Дж/см <sup>2</sup>	3,40±0,59*	0,501±0,062*	0,020±0,005	0,036±0,004*
	3,6 Дж/см <sup>2</sup>	4,65±0,44*	0,133±0,069*	0,018±0,004*	0,049±0,005*
Мыши с РШМ-5 (30 суток) n=12	Без облучения	6,23±0,31	0,172±0,061	0,005±0,001	0,038±0,003
	2,4 Дж/см <sup>2</sup>	6,99±0,48	0,168±0,060	0,026±0,006*	0,031±0,003
	3,6 Дж/см <sup>2</sup>	5,02±0,67	0,163±0,076	0,017±0,005*	0,042±0,004

Примечание. \* – данные, статистически значимо отличающиеся от данных без облучения, p ≤ 0,05.

При оценке влияния ФСЛИ на неоплазму установлено, что уровень МДА возрастает при воздействии ФСЛИ на 20-суточную опу-

холь и снижается при воздействии на опухоль через 30 суток после трансплантации (табл. 2).

Таблица 2

**Уровень МДА (мкмоль/мг) в неоплазме экспериментального РШМ при воздействии разных доз ФСЛИ**

Доза ФСЛИ	Без облучения	Э <sub>сред.</sub> =2,4 Дж/см <sup>2</sup>	Э <sub>сред.</sub> =3,6 Дж/см <sup>2</sup>
<b>Сроки опухоли</b>			
20 сутки n=12	27,94±1,60	32,17±1,15*	33,92±2,78*
30 сутки n=12	36,30±1,22	32,44±0,96*	33,81±1,49

**Примечание.** \* – данные, статистически значимо отличающиеся от данных без облучения, p≤0,05.

Изучение активности системы АОЗ в неоплазме может являться биохимическим критерием эффективности ФС лазерного облучения.

Облучение ФС лазером на 20-е сутки после трансплантации РШМ-5 не влияет в неоплазме на активность ГР, одновременно

увеличивая активность СОД (табл. 3). Уровень каталазы и ГТ изменяется волнообразно в зависимости от дозы облучения. На 30-е сутки после перевивки опухоли активность ГТ и ГР снижается при возрастании активности СОД и каталазы.

Таблица 3

**Активность ферментов АОЗ в опухолевой ткани РШМ-5 на разных сутках после трансплантации опухоли при воздействии разных доз ФСЛИ**

Группы	РШМ 20 суток			РШМ 30 суток		
	Без облучения n=20	Э <sub>сред.</sub> =2,4 Дж/см <sup>2</sup> n=12	Э <sub>сред.</sub> =3,6 Дж/см <sup>2</sup> n=12	Без облучения n=20	Э <sub>сред.</sub> =2,4 Дж/см <sup>2</sup> n=12	Э <sub>сред.</sub> =3,6 Дж/см <sup>2</sup> n=12
ГР ммоль/мин/мг	0,24±0,008	0,240±0,009	0,250±0,006	0,210±0,016	0,170±0,004*	0,140±0,005*
ГТ ммоль/мин/мг	0,470±0,076	0,750±0,070*	0,560±0,077	1,50±0,292	1,74±0,120	0,64±0,065*
СОД у.е./мг	9,23±0,93	12,92±1,92*	17,10±1,40*	26,57±2,00	8,15±0,20*	14,86±3,41*
Каталаза ммоль/с/мг	0,750±0,345	0,530±0,110	1,050±0,169	0,540±0,100	0,450±0,073	0,810±0,019*

**Примечание.** \* – данные, статистически значимо отличающиеся от данных без облучения, p≤0,05.

**Заключение.** По результатам нашего исследования установлено, что ФСЛИ в используемых дозах изменяет уровень функционирования системы ПОЛ-АО в неоплазме при облучении на начальных этапах роста опухоли и приводит к возникновению оксидативного стресса в неоплазме РШМ-5 при облучении на стадии интенсивного роста опухоли. Облучение фемтосекундным лазером в обеих изученных дозах в эритроцитах и плазме крови повышает уровень функционирования системы ПОЛ-АО, но не приводит к возникновению оксидативного стресса.

1. *Алексеева, Н.В.* Современные способы оценки процессов пероксидации в организме при заболеваниях у детей / Н.В. Алексеева, Э.А. Юрьева, Б.М. Махачев // Пособие для врачей. – М., 2000. – С. 3–46.

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

3. *Андреева, Л.И.* Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л.И. Андреева, Л.А. Кожемякин, А.А. Кишкун // Лабораторное дело. – 1988. – №11. – С. 41–43.

4. Дубинина, Е.Е. Биологическая роль супероксидного анион-радикала и супероксиддисмутазы в тканях организма / Е.Е. Дубинина // Успехи современной биологии. – 1989. – Т. 108, вып. 1 (4). – С. 3–18.
5. Захаров, С.Д. Светокислородный эффект в клетках и перспективы его применения в терапии опухолей / С.Д. Захаров, А.В. Иванов // Квантовая электроника. – 1999. – Т. 29, №12. – С. 192–214.
6. Иванов, А.В. Физические основы лазерных методов в онкологии : автореф. дис. ... д-ра физ.-мат. наук / А.В. Иванов. – М., 2003. – 49 с.
7. Илларионов, В.Е. Основы лазерной терапии / В.Е. Илларионов – М. : Респект, 1992. – 123 с.
8. Карпищенко, А.И. Медицинские лабораторные технологии и диагностика : справ. : в 2 т. / А.И. Карпищенко. – СПб. : Интермедика, 1999. – С. 27–28.
9. Корси, Л.В. Лазерный способ фотохимической деструкции опухолей без экзогенных сенсibilizаторов / Л.В. Корси, В.Г. Соколов // Сб. ст. «Лазерно-оптические системы и технологии» ФГУП «НПО Астрофизика». – М., 2009. – С. 101–106.
10. Ланкин, В.З. Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Ю.Н. Беленков. – М., 2001. – 78 с.
11. Максимов, С.Я. Первично-множественные опухоли органов репродуктивной системы / С.Я. Максимов // Практическая онкология. – 2009. – Т. 10, №2. – С. 117–123.
12. Морхов, К.Ю. Актуальные вопросы хирургического лечения рака шейки матки / К.Ю. Морхов, В.М. Нечушкин, В.В. Кузнецов // Практическая онкология. – 2009. – Т. 10, №2. – С. 93–100.
13. Оптимизация частотных характеристик инфракрасных лазерных воздействий / С.М. Зубкова и др. // Физ. медицина. – 1994. – Т. 4, №1–2. – С. 84.
14. Смирнова, Л.П. Тип тканевой организации опухоли в определении активности антиоксидантных ферментов / Л.П. Смирнова, И.П. Кондакова // Сибирский онкологический журн. – 2002. – №1. – С. 65–69.
15. Фархутдинов, Р.Р. Свободные радикалы, пролиферация и канцерогенез / Р.Р. Фархутдинов, Ш.И. Мусин, Ш.Р. Кзыргалин // Креативная хирургия. – 2011. – №2. – С. 109–112.
16. Чеснокова, Н.П. Типовые патологические процессы / Н.П. Чеснокова. – Саратов : Изд-во Саратовского мед. ун-та, 2004. – 400 с.
17. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
18. Das, U.N. A radical approach to cancer / U.N. Das // Med. Sci. Monot. – 2002. – Vol. 8, №4. – P. 79–92.
19. He, H. Mechanism of oxidative stress generation in cells by localized near-infrared femtosecond laser excitation / H. He, K.T. Chan, S.K. Kong // Appl. Phys. Lett. – 2009. – Vol. 95.
20. Nishikimi, M. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenacine methosulfate and molecular oxygen / M. Nishikimi, N. Appa, K. Yagi // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1972. – Vol. 46. – P. 849–854.
21. Schweitzer, C. Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen / C. Schweitzer, R. Schmidt // Chem. Rev. – 2003. – Vol. 103. – P. 1685–1757.
22. Waggoner, S.E. Cervical cancer / S.E. Waggoner // Lancet. – 2003. – Vol. 361 (9376). – P. 2217–2225.

## EFFECT OF FEMTOSECOND LASER RADIATION ON PROOXIDANT AND ANTIOXIDANT STATUS OF MICE WITH EXPERIMENTAL CERVICAL CANCER

O.S. Voronova<sup>1</sup>, T.P. Gening<sup>1</sup>, A.A. Sysoliatin<sup>2</sup>, V.V. Svetukhin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ulyanovsk State University,  
<sup>2</sup>Fiber Optics Research Center, RAS, Moscow

In this paper we consider the influence of femtosecond laser radiation on the change of parameters of oxidative stress in erythrocytes, plasma and neoplasms of mice with an experimental cervical cancer (CC-5). The changes in the system of the «lipid peroxidation – antioxidants» in erythrocytes, plasma and cervical neoplasms at different stages of tumor growth under the influence of femtosecond laser pulses with peak power of 6 kW at an average 1.25 mW was estimated.

**Keywords:** cervical cancer, lipid peroxidation, antioxidants, oxidative stress.