

УДК 612.017.1 [616-092.19+612.112.3]

К ВОЗМОЖНОСТИ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В ЭРИТРОЦИТАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ ФЕМТОСЕКУНДНОМ ЛАЗЕРНОМ ИЗЛУЧЕНИИ

© 2012 Д.Р. Долгова Т.В. Абакумова, О.С. Воронова

Научно-исследовательский технологический институт,
Ульяновский государственный университет

Поступила в редакцию 20.11.2012

С целью оценки влияния фемтосекундного лазерного излучения (ФСЛИ) с различной плотностью потока энергии на морфофункциональное состояние в эритроцитах периферической крови определяли уровень малонового диальдегида (МДА), активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатион-трансферазы (ГТ). В эритроцитах также оценивали топологию и ригидность методом сканирующей зондовой микроскопии. Использовали ФСЛИ волоконного эрбиевого лазера с характеристиками: длительность импульса — $82 \cdot 10^{-15}$ с; средняя мощность 1,26 мВт; пиковая мощность 6 кВт; длина волны — 1,55 мкм. Плотность потока облучения варьировала от 0,10 до 2,70 Дж/см². Установлено, что уровень МДА, являющегося показателем интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ), значительно не изменялся, варьируя в интервале от 430 до 509 мкмоль/л. Изменение активности ферментов антиоксидантной защиты — СОД и каталазы — было дозозависимым: наиболее выраженное повышение их активности имело место при плотности потока облучения 0,10 Дж/см². Активность ГТ при всех использованных плотностях потока облучения не отличалась от контроля. Данные СЗМ свидетельствуют об изменении топологии и волнообразном возрастании ригидности мембраны эритроцитов при увеличении плотности потока энергии ФСЛИ.

Ключевые слова: фемтосекундное лазерное излучение, эритроциты, сканирующая зондовая микроскопия.

Использование лазеров в клинике основывается на таких биологических эффектах, как фотодеструктивное действие света, используемое в лазерной хирургии, и фотохимическое действие света, лежащее в основе его терапевтического использования [1-4]. Фемтосекундное лазерное излучение (ФСЛИ) характеризуется малой длительностью импульса, высокой средней интенсивностью во время действия импульса, высокой временной и пространственной когерентностью. Высокая пиковая интенсивность ФСЛИ может вызывать гибель клеток, однако, причины её могут быть различны: от термокоагуляции мембранных белков до повреждения генетического аппарата клетки. В медицине эти лазеры используются в качестве голографического пинцета и оптического скальпеля [5], а также применяется для размягчения костной ткани [6]. Использование ФСЛИ в онкологии потребует значительного увеличения дозы [7], что диктует необходимость оценки влияния ФСЛИ на макроорганизм

Долгова Динара Ришатовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной биологии.

E-mail: monika_rainbow@mail.ru

Абакумова Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной биологии.

E-mail: taty-abakutova@yandex.ru

Воронова Ольга Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной биологии.

E-mail: baby13.87@mail.ru

в целом и, в первую очередь, на клетки крови.

Целью исследования явилось оценка морфофункционального состояния эритроцитов периферической крови доноров в зависимости от плотности потока энергии при воздействии ФСЛИ.

Материалы и методы исследования: Объектом исследования послужили эритроциты донорской крови. В работе использован фемтосекундный волоконный эрбиевый лазер, который является совместной разработкой Научного центра волоконной оптики РАН и Ульяновского государственного университета. Лазер обладает следующими характеристиками: длительность импульса — $82 \cdot 10^{-15}$ с; средняя мощность 1,26 мВт; пиковая мощность 6 кВт; длина волны — 1,55 мкм.

Расчеты по плотности потока энергии при облучении фемтосекундным лазером. Клетки облучали в пластиковых кюветах высотой 1 см. Для расстояния 3 см (при диаметре пучка = 0,6 см) и 5 см (при диаметре = 1 см) и исходных энергетических характеристиках лазера плотность потока энергии на биоткань (\mathcal{E}) рассчитывали по формуле [8]: $\mathcal{E} = W/S$, где W — выходная энергия излучения, Дж; S — площадь лазерного пятна на биоткани, см².

Биохимические методы исследования: Интенсивность ПОЛ оценивали по уровню вторичного продукта — МДА в тесте с тиобарбитуровой кислотой [9]. Активность СОД определяли по Дубининой Е.Е. (1986) [10]. Определение активности каталазы, глутатион-S-трансферазы (ГТ)

Таблица 1. Плотность потока энергии в зависимости от длительности облучения и средней мощности фемтосекундного лазера

Длительность облучения (мин)	1	1	3	5	3	10	5	10
Расстояние (см)	3	5	3	3	5	3	5	5
$\bar{\mathcal{E}}$ средняя, Дж/см ²	0,10	0,27	0,29	0,48	0,81	0,96	1,35	2,70

проводили по Карпищенко А.И. [11]. Оптическую плотность исследуемых параметров оценивали с помощью спектрофотометра Genesys UV-10 (Thermo Scientific, США).

Морфологические методы исследования: Для оценки топологии и ригидности мембраны эритроцитов использован метод сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) (Solver Pro, NT-MDT, г. Зеленоград, Россия). Использовались фирменные кремниевые зонды с жесткостью 0,2 N/n, радиус закругления кончика составлял примерно 50 nm. Эритроциты сканировались в полуконтактном режиме. Ригидность мембран оценивалась по модулю Юнга, который рассчитывали согласно теории Герца [12]. Для выяснения различий между данными, полученными в эксперименте и контрольной группе применялся непараметрический U-критерий Манна-Уитни (Stata 6.0). Статистически достоверными считались данные при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение. В результате проведенных исследований установлено, что уровень МДА в эритроцитах после ФСЛИ при различных плотностях потока энергии (от 0,10 Дж/см² до 2,70 Дж/см²) статистически значимо не изменяется, варьируя в интервале от 430 до 509 мкмоль/л.

Предполагается, что компоненты ферментативного звена антиоксидантной системы (АОС) – СОД и каталаза являются акцепторами лазер-

ного излучения [13]. В связи с этим представляет интерес выяснение влияния ФСЛИ на активность этих ферментов в эритроцитах. При облучении эритроцитов было установлено снижение активности каталазы при плотности потока энергии 0,27 Дж/см². При повышении плотности потока энергии активность фермента остается ниже контрольных значений (рис. 1). Возможно, подобное изменение активности каталазы может быть связано с возникновением конформационных перестроек в её активном центре под влиянием лазерного излучения.

Повышение активности СОД после ФСЛИ было дозозависимым (рис.2). Наибольшие показатели активности имели место при плотностях потока энергии – 0,10, 0,27, 0,48 и 0,81 Дж/см² при том, что при 0,29 Дж/см² активность фермента резко снижалась. В последующем колебания активности сохранялись, однако, были менее выражены.

Активность ГТ при воздействии ФСЛИ при всех использованных дозах значимо не отличалась от таковой до облучения. Таким образом, полученные результаты позволяют предположить возможность антиоксидантной активности ФСЛИ при воздействии на эритроциты *in vitro*.

В работах Л.В.Корси с соавт. [15] показано, что при облучении эритроцитов в различных спектральных диапазонах полупроводниковыми лазерами, лазерами на красителях и твердотельным титан-сапфировым лазером деформируемость эритроци-



Рис. 1. Активность каталазы в эритроцитах в зависимости от плотности потока энергии ФСЛИ

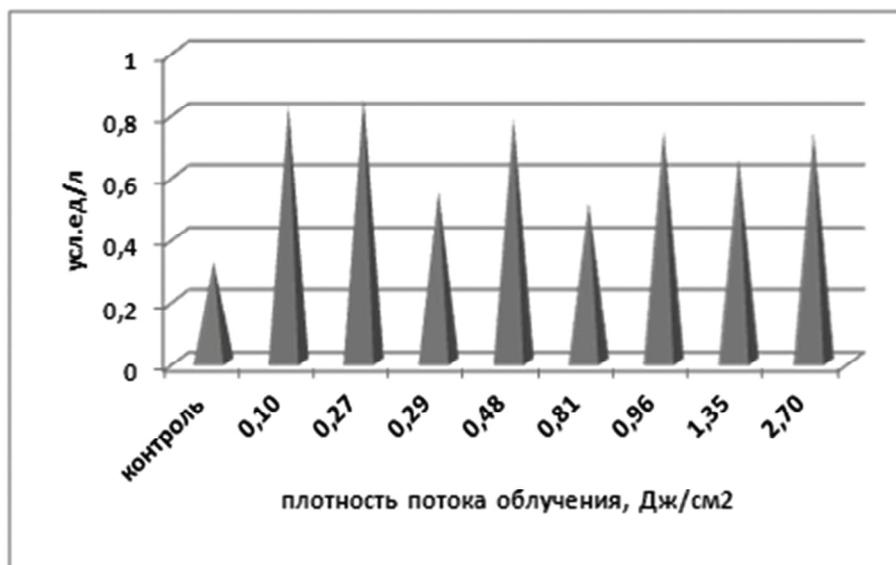


Рис. 2. Активность СОД в эритроцитах в зависимости от плотности потока энергии ФСЛИ

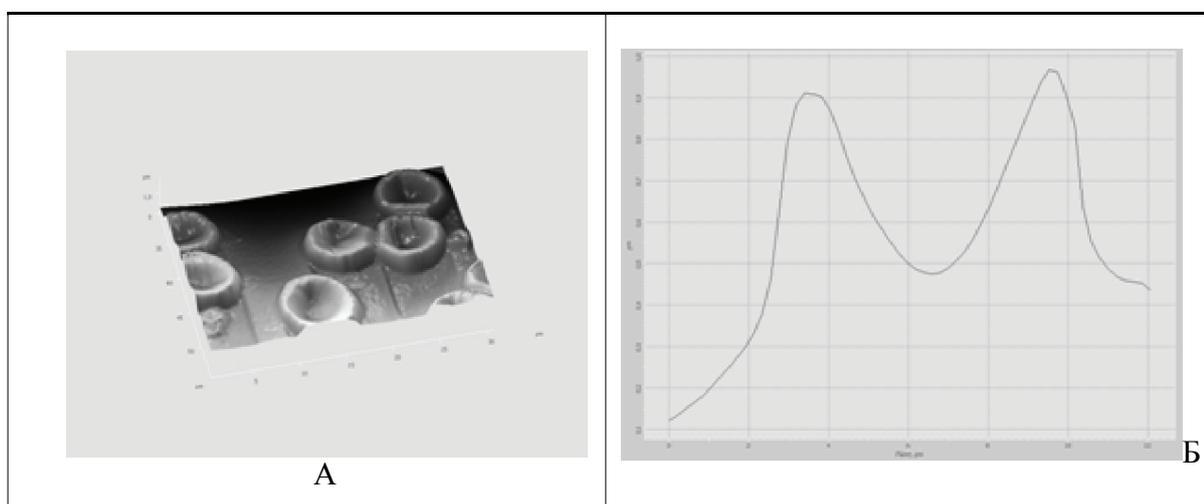


Рис. 3. Изображение в 3D (А) и боковое сечение профиля (Б) интактных эритроцитов

тов имеет резонансный характер, подобный половым спектрам поглощения молекулярного кислорода при высоком давлении. Нами при сканировании образцов интактных эритроцитов методом СЗМ обнаружены, в основном, нормоциты (рис.3).

После воздействия ФСЛИ при плотности потока энергии 0,29 Дж/см² цитоархитектура эритроцитов меняется. На сканированном снимке появляются обратимо деформированные формы – эхиноциты (рис.4). Их появление в физиологических условиях связано с изменением ионной проницаемости мембраны, с нарушением работы каналов. При дозах 0,81 и 0,96 Дж/см² появляются сфероциты, что четко видно на 3D-изображении (рис.5).

При воздействии дозами 1,35 и 2,70 Дж/см² практически все эритроциты на сканированных образцах представляют собой сфероциты. Они могут быть неправильной формы с измененными линейными размерами.

С 1990-х годов в биомедицинских исследованиях активно используется метод сканирующей зондовой микроскопии, который предоставил возможность изучать параметры клеток, не прибегая к длительной и сложной фиксации, тем самым минимально искажая получаемую информацию. Метод СЗМ позволяет измерять локальные упругие свойства поверхности клеток [16]. Исследования, проведенные с применением сканирующей зондовой микроскопии свидетельствуют о том, что ФСЛИ вызывает уменьшение упругоэластических свойств мембраны эритроцитов, что сопровождается увеличением значений ригидности (табл. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ФСЛИ с плотностью потока от 0,10 до 2,70 Дж/см² не изменяет значительно уровень МДА в эритроцитах, но повышает активность каталазы и СОД. Наиболее выражено это повышение при

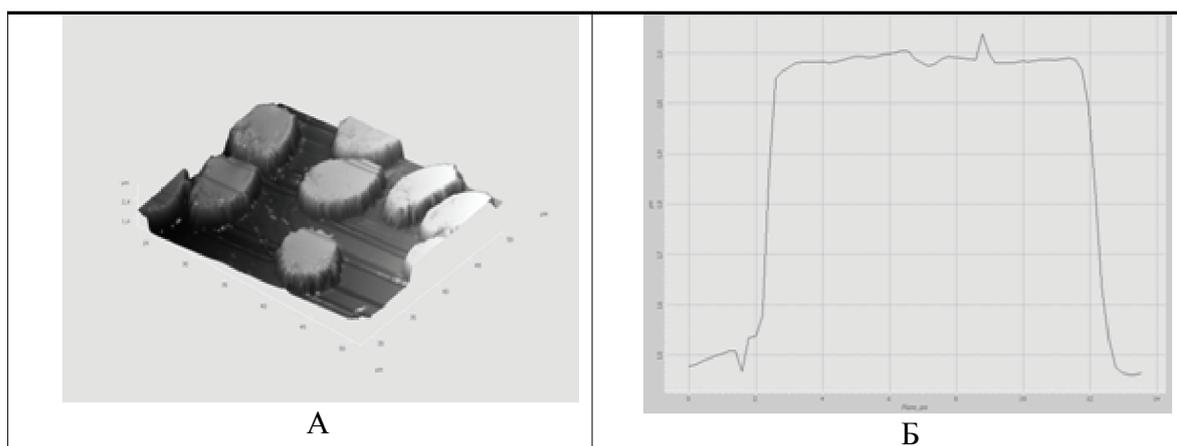


Рис. 4. Изображение в 3D (А) и боковое сечение профиля (Б) эритроцитов после ФСЛИ при плотности потока энергии 0,29 Дж/см²

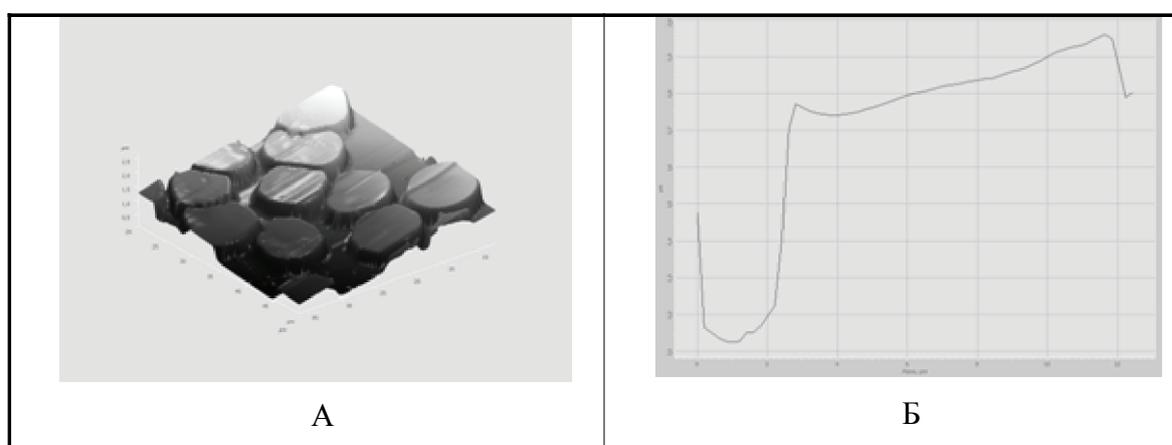


Рис. 5. Изображение в 3D (А) и боковое сечение профиля (Б) эритроцитов после ФСЛИ при плотности потока энергии 0,96 Дж/см²

Таблица 2. Ригидность эритроцитов при действии ФСЛИ

Плотность потока энергии Дж/см ²	Контроль	0,1	0,27	0,29	0,48	0,81	0,96	1,35	2,70
	Ригидность, Па	360,8±14,13	561,7±22,88*	515,9±14,96*	569,6±22,62*	550,1±29,95*	481,6±19,32*	496,3±26,43*	382,0±17,72

Примечание: * – данные статистически значимо отличные от таковых в контрольной группе

плотности потока облучения 0,10 Дж/см², что позволяет предполагать антиоксидантный эффект ФСЛИ. Данные СЗМ свидетельствуют об изменении топологии и возрастании ригидности мембраны эритроцитов под влиянием ФСЛИ.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках федеральных целевых программ «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009 - 2013 годы» и «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы»

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биологические модели и физические механизмы лазерной терапии / В.М.Чудновский, Г.Н.Леонова, С.А.Скопинов. Владивосток: Дальнаука, 2002. 256 с.
2. Механизмы действия и биологические эффекты низкоинтенсивного лазерного излучения / Н.И. Нечипуренко, И.Д. Пашковская, Ю.И. Степанова, Л.А. Василевская // Медицинские новости. 2008. №12. С.17-21.
3. Беляев В.И. Лазеры в клинической медицине // В. кн.: Руководство для врачей / Под ред. С.Д. Плетнева. М.: Медицина; 1996. 315 с.
4. Козлов В.И. Взаимодействие лазерного излучения с биотканями // В кн.: Применение низкоинтенсивных лазеров в клинической практике. М.: ГНЦ Лазерной медицины, 1997. С. 24-34.

5. Исследование биологических объектов на клеточном и субклеточном уровне с помощью фемтосекундного лазерного оптического пинцета-скальпеля / М.М. Ракитянский, М.Б. Агранат, С.И. Амитков // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2009. №3. С.31-36.
6. Effects of femtosecond laser irradiation on osseous tissues / B. Girard, D. Yu, M.R. Armstrong // Lasers Surg. Med. 2007. Vol.3. P.273-85.
7. Reproductive death of cancer cells induced by femtosecond laser pulses / J. Thögersen C.S. Knudsen, A. Maetzke // Int.J.Radiat.Biol. 2007. Vol.5. P.289-99.
8. Некоторые биофизические аспекты контактной ИК-лазерной терапии шейки матки / В.В. Ежов, А.М. Торчинов, А.В. Гейнци, В.И. Фириченко // Лазерная медицина. 2008. Т.12. Вып.3. С.15-17.
9. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л.И.Андреева, Л.А. Кожемякин, А.А. Кишкун // Лаб. дело. 1988. №11. С.41-43.
10. Активность и изоферментный спектр супероксид-дисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека / Е.Е. Дубинина, Л.А. Сальникова, Л.Ф. Ефимова // Лаб. дело. 1983. №10. С.30-33.
11. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии (справочник). С-Пб.: Интермедика, 1999. 656 с.
12. Henderson R.M. Oberleithner H. Pushing, pulling, dragging, and vibrating renal epithelia by using atomic force microscopy // Am.J.Renal Physiol. 2000. Vol.278(5).P.689-701.
13. Мембраноклеточные эффекты лазерного облучения крови / А.В.Волотовская, Е.И.Слобожанина, В.С.Улащик // Лазерная медицина. 2005. №9(1). С.4-9.
14. Корси Л.В., Соколов В.Г. Лазерный способ фотохимической деструкции опухолей без экзогенных сенсibilizаторов // Сборник «Лазерно-оптические системы и технологии». М.: ФГУП «НПО Астрофизика», 2009. С.101-106.
15. Morphological investigation of human blood neutrophil phagocytosis in vitro by AFM / S.N.Pleskova, M.I.Zaslavskaja, Yu.Yu.Guschina, I.A.Koksharov, Yu.G.Erastova // Phys.Low-Dim.Struct. 2001. Vol.3. P.229-236.

MORPHOFUNCTIONAL STATE OF PERIPHERAL BLOOD ERYTHROCYTES AFTER FEMTOSECOND LASER TREATMENT

© 2012 D.R. Dolgova, T.V. Abakumova, O.S.Voronova

Research and Development Institute of Technology of Ulyanovsk State University

To estimate femtosecond laser effect on morphofunctional state in peripheral blood erythrocytes exposed to various radiation energy density we determined the level of malonic dialdehyde (MDA), activity of superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione-transferase (GT). Scanning probe microscopy was employed for assessment of erythrocyte topology and rigidity. Erbium fiber laser with the pulse duration of $82 \cdot 10^{-15}$ s, peak and average power of 6 kW and 1.26 mW, respectively, wavelength of λ 1,55 mm and energy density within the range from 0.10 to 2, 70 J/cm² was employed for the experiment. MDA level indicating lipid peroxidation was found to change very slightly within the range from 430 to 509 mmol / l. It was revealed that the activity of antioxidant enzymes – SOD and catalase depend on the energy density. Thus, the most pronounced activity increase was registered for the energy density of 0.10 J/cm². GT activity for all selected radiation energy densities was similar to control group. Data readout from Scanning probe microscopy indicates erythrocyte topology modification as well as undulatory increase of erythrocyte membrane rigidity with rising femtosecond laser radiation energy density.

Keywords: femtosecond laser radiation, erythrocyte, scanning probe microscopy.

Dimara Dolgova, Candidate of Biology, Senior Research Fellow at the Molecular and Cellular Biology Laboratory.

E-mail: monika_rainbow@mail.ru

Tatyana Abakumova, Candidate of Biology, Senior Research Fellow at the Molecular and Cellular Biology Laboratories.

E-mail: taty-abakumova@yandex.ru

Olga Voronova, Associate Research Fellow at the Molecular and Cellular Biology Laboratories. E-mail: baby13.87@mail.ru