

УДК 57.085-57.043:577.3474.2

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ
НА ОРГАНИЗМ ТЕПЛОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ**

© 2013 Т.В.Абакумова, Д.Р. Долгова, С.О. Генинг, В.А. Остаточников

Ульяновский государственный университет

Поступила в редакцию 21.03.2013

В данной статье изучено влияние фемтосекундного эрбиевого волоконного лазера на состояние системы “перекисное окисление липидов-антиоксиданты” плазмы и эритроцитов крови белых мышей при плотности потока энергии 0,6 и 1,2 Дж/см² и пиковой интенсивности излучения 6 кВт. Также проведено гистологическое исследование кожи мышей в зоне облучения. Установлено, что фемтосекундное лазерное излучение при изученных плотностях потока энергии вызывает повышение уровня функционирования параметров изучаемой системы в эритроцитах. В плазме после облучения в дозе 0,6 Дж/см² наблюдается разнонаправленная динамика уровня малонового диальдегида и глутатион-трансферазы, что предполагает возможность возникновения оксидативного стресса. Выявлено дозозависимое утолщение эпидермиса, появление гиперкератоза и лимфоцитарной инфильтрации в зоне облучения. Ключевые слова: фемтосекундное лазерное излучение, перекисное окисление липидов, антиоксиданты.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для генерации сверхкоротких импульсов используют твердотельные лазеры на основе титан-сапфировых кристаллов (Ti:Sp, длина волны излучения ~ 800 нм), иттербиевых кристаллов (Yb, длина волны излучения ~ 1040 нм) и волоконные лазеры, в том числе лазеры на волокнах, легированных эрбием (Er, длина волны излучения ~ 1550 нм). Фемтосекундные волоконные лазеры используются в биологии и медицине при многофотонной микроскопии, оптической когерентной томографии и при ограниченной микрохирургии, например, на роговице глаза [5, 6]. Компактность, низкая стоимость и стабильность фемтосекундных волоконных лазеров предоставляет возможность иметь источник фемтосекундного лазерного излучения (ФСЛИ) без необходимости покупки дополнительного дорогостоящего и сложного оборудования [2].

Абакумова Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии и патофизиологии, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной биологии. E-mail: taty-abakimova@yandex.ru
Долгова Динара Ришатовна, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии и патофизиологии медицинского факультета. E-mail: tonika_rainbow@mail.ru
Генинг Снежанна Олеговна, студент 5 курса медицинского факультета, стажер-исследователь Научно-исследовательского технологического института им. С.П. Капицы. E-mail: sgening@bk.ru

Остаточников Владимир Александрович, младший научный сотрудник Научно-исследовательского технологического института им. С.П. Капицы. E-mail: ost.vld@yandex.ru

Терапевтическое применение лазеров в медицине основано на действии низкоинтенсивного и низкоэнергетического излучения, когда уровни интенсивностей и доз излучения исключают возможность прямой тепловой деструкции биологических структур, однако вызывают модификацию клеток [3]. Недеструктивная модификация мембран лежит в основе наблюдаемых на общепатологическом уровне эффектов биостимуляции. Преимущество лазерного излучения реализуется за счет хорошей его дозируемости, бесконтактности, бескровности и за счет этого абластичности, стерильности и дает возможности получать эффект на различной глубине.

Механизм воздействия ультракоротких лазеров, сочетающих высокую пиковую мощность (6 кВт) с малой длительностью импульса (100·10⁻¹⁵с), на живые структуры не изучен.

Ключевым моментом при этом является вопрос о первичном фотоакцепторе лазерного излучения. Одним из таких акцепторов может являться эндогенный кислород, который под действием света в определенных спектральных интервалах переходит в высокорективную форму и, вступая в биохимические реакции с ближайшим биосубстратом, вызывает модификацию клеточных мембран.

В соответствии с вышеизложенным представляется актуальным оценить влияние ультракоротких импульсов на теплокровных животных. **Целью** нашего исследования было изучение влияния ФСЛИ с длиной волны 1550 нм на кровь и кожу здоровых мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили белые нелинейные половозрелые мыши, которых облучали фемтосекундным (ФС) лазером при разных плотностях потока энергии.

В качестве источника излучения использовался ФС эрбиевый лазер, 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, являющийся совместной разработкой Научного центра волоконной оптики РАН и Центра нанотехнологий Ульяновского государственного университета.

Животные экспериментальной группы подвергались десятикратному ежедневному лазерному облучению. При облучении фемтосекундным лазером средняя плотность потока энергии на ткань (энергетическая доза) за одну процедуру составляла 0,06 Дж/см² в течение 2,5 минут и 0,12 Дж/см² в течение 5 минут. При этом облучение проходило в импульсном режиме при огромной пиковой интенсивности 1910,8 Вт/см. В первом случае облучения суммарная плотность потока энергии ЛИ на ткань за курс составила 0,6 Дж/см², а во втором - 1,2 Дж/см².

Для оценки системы “перекисное окисление липидов - антиоксиданты” (ПОЛ-АО) в эритроцитах и плазме крови определяли уровень малонового диальдегида (МДА) в тесте с тиобарбитуровой кислотой [1], а также активность ферментов системы антиоксидантной защиты (АОЗ): каталазы и глутатион-S-трансферазы (ГТ) [4].

После облучения проводили гистологическое исследование кожи мышей с облучаемого участка. Для этого кожные лоскуты фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезвоживали в спиртах, заключали в парафин. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 5-7 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином.

Статистическая значимость полученных ре-

зультатов оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При облучении интактных мышей ФС лазером в дозах 0,6 и 1,2 Дж/см² в эритроцитах статистически значимо возрастает уровень МДА. При этом резкое увеличение его (625,15 мкмоль/л против 408,97 мкмоль/л в контроле) при плотности потока энергии 0,6 Дж/см² сменяется снижением при увеличении плотности потока энергии до 1,2 Дж/см² (475,00 мкмоль/л).

Динамика показателей активности антиоксидантных ферментов – каталазы и ГТ – в принципе была аналогичной: повышение при плотности потока энергии 0,6 Дж/см² и снижение при 1,2 Дж/см² (табл. 1). В плазме крови значимое изменения – снижение уровня МДА и возрастание активности каталазы – имело место только при плотности потока облучения 0,6 Дж/см² (табл.1). Уровень МДА при облучении в энергетической дозе 0,6 Дж/см² снижается более чем в 1,5 раза относительно контроля ($5,64 \pm 0,71$ против $9,4 \pm 2,22$ в контроле).

Полученные результаты позволяют предполагать, что система ПОЛ-АО в эритроцитах мышей после облучения ФС лазером в используемых дозах переходит на более высокий уровень функционирования, это согласуется с данными предыдущих исследований [7]. Разнонаправленные изменения параметров системы ПОЛ-АО в плазме крови при ФСЛИ с плотностью потока энергии 0,6 Дж/см² позволяют говорить о возможности возникновения оксидативного стресса.

Данные, полученные в результате гистологических исследований, указывают на то, что ФСЛИ может оказывать дозозависимое влияние на гистологические структуры кожи облучаемых животных.

Таблица 1. Активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах и плазме крови мышей после воздействия разных доз ФСЛИ

Плотность потока энергии ФСЛИ Показатель	Без облучения	0,6 Дж/см ²	1,2 Дж/см ²
эритроциты			
ГТ, ммоль/мин/л	0,326±0,065	0,602±0,06*	0,504±0,04*
Каталаза, ммоль/мин/л	1,72±1,3	7,26±2,7*	6,27±1,24*
плазма крови			
ГТ, ммоль/мин/л	0,022±0,001	0,026±0,005	0,021±0,001
Каталаза, ммоль/мин/л	0,9±0,12	1,88±0,62*	1,12±0,14

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

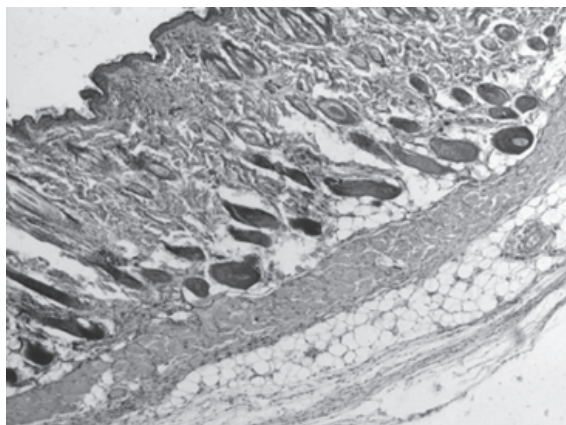


Рис. 1. Контроль, общий план.

Окраска гематоксилин-эозином, увеличение 20х

В контрольных образцах эпидермис и дерма обычного гистологического строения. В подкожно-жировой клетчатке — слабая лимфоидно-лейкоцитарная инфильтрация с преобладанием нейтрофильных лейкоцитов (рис. 1). Облучение при плотности потока энергии $0,6 \text{ Дж/см}^2$ приводит к утолщению эпидермиса и появлению гиперкератоза по поверхности. Дерма и подкожно-жировая клетчатка при этом обычного гистологического строения, без воспалительной инфильтрации (рис. 2). Облучение при плотности потока энергии $1,2 \text{ Дж/см}^2$ приводит к утолщению эпидермиса и появлению гиперкератоза по поверхности. Дерма при этом умеренно утолщена за счёт разрастания плотной фиброзной ткани (очаги фиброзирования дермы), с сильной лимфоцитарной инфильтрацией (рис. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ФСЛИ дозозависимо повышает активность компонентов системы ПОЛ-АО в эритроцитах облученных животных. Наиболее выраженные изменения наблюдаются при плотности потока облучения $0,6 \text{ Дж/см}^2$. В плазме животных при $0,6 \text{ Дж/см}^2$ отмечено снижение уровня продукта ПОЛ — малонового диальдегида — и повышение фермента, утилизирующего перекись водорода, — каталазы. Вероятно, система ПОЛ-АО эритроцитов более чувствительна к воздействию ФСЛИ. Таким образом, на основании полученных результатов, можно сделать вывод о том, что ФСЛИ изменяет уровень функционирования системы ПОЛ-АО крови лабораторных животных при облучении *in vivo*, что может быть использовано для терапии в экспериментальной онкологии.

Работа поддержана Гос.заданием министерства образования и науки Российской Федерации.

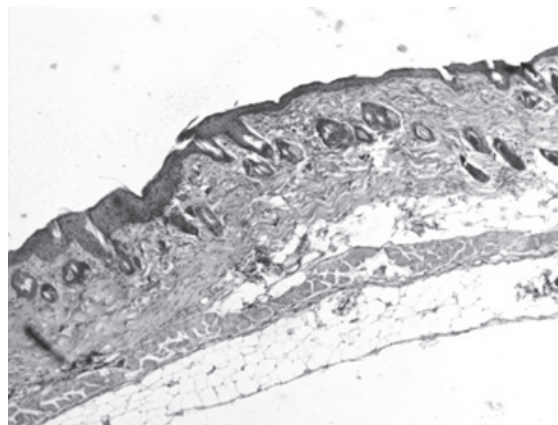


Рис. 2. После облучения при плотности потока энергии $0,6 \text{ Дж/см}^2$.

Окраска гематоксилин-эозином, увеличение 20х.

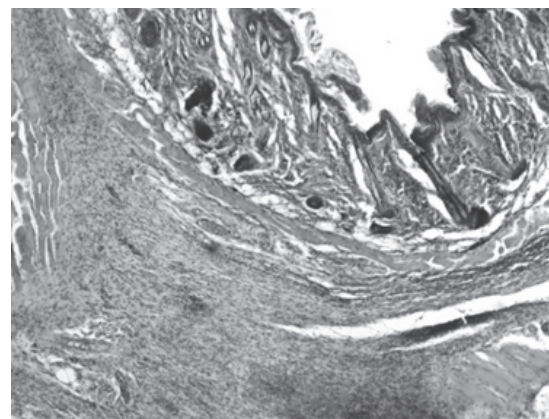


Рис. 3. После облучения при плотности потока энергии $1,2 \text{ Дж/см}^2$.

Окраска гематоксилин-эозином, увеличение 20х.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте стиобарбитуровой кислотой / *Л.И. Андреева, Л.А. Кожемякин, А.А. Кишкун* // Лаб.дело. 1988. №11. С. 41-43.
2. *Беспалов В.Г., С.А. Козлов, Крылов В.Н., Путилин С.Э.* Фемтосекундная оптика и фемтотехнологии. СПб: СПбГУИТМО, 2010. 234 с.
3. *Иванов А.В.* Прямое возбуждение фотонами эндогенного молекулярного кислорода - фотофизический акт терапевтического действия лазерного излучения // *Лазерная медицина*. 2006. №1. С.4-9.
4. *Медицинские лабораторные технологии и диагностика: Справочник: в 2 т. [под ред. А.И. Карпищенко].* СПб.: Интермедика, 1999. 544с.
5. *Li J.L., Gu M.* Surface plasmonic gold nanorods for enhanced two-photon microscopic imaging and apoptosis induction of cancer cells // *Biomaterials*. 2010.31(36). P.9492-8.
6. *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. V.95.Issue 12. P.345-350.

7. Trigger effect of femtosecond laser irradiation on blood plasma and red blood cells in intact mice // *O. Voronova,*

A. Sysoliatin, I. Zolotovskii et al. / Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2012. Vol. 9. Suppl. 1. P. 6.

THE INFLUENCE OF FEMTOSECOND LASER IRRADIATION ON WARM-BLOODED ANIMALS

© 2013 T.V. Abakumova, D.R. Dolgova, S.O. Gening, V.A. Ostatochnikov

Ulyanovsk State University

The article focuses on the influence of the femtosecond erbium fiber laser on the conditions of the "lipidperoxidation-antioxidants" system in plasma and erythrocytes of blood of white mice at the energy flowdensity of 0,6 and 1,2 J/cm². Histological research of mouse skin in the radiation zone has also been conducted. It is established that femtosecond laser irradiation at the studied energy flow density causes an increase in the functioning level of all parameters of the studied system in erythrocytes. In plasma after irradiation in a dose of 0,6 J/cm² multidirectional dynamics of malonicdialdehydeand glutathione-transferases levels is observed, suggesting the possibility of an oxidative stress. Dose-dependent epidermis thickening andthe emergence of hyperkeratosis and a lymphocytic infiltration wereobserved in a radiation zone after the influence of the femtosecond laser irradiation.

Keywords: femtosecondlaser radiation, lipidperoxidation, antioxidants

Tatiana Abakumova, Candidate of Biology, Associate Professor at the Physiology and Pathophysiology Department of the Medical Faculty, Senior Research Fellow at the Molecular and Cell Biology Laboratory, Research Institute of Technology named after S.P. Kapitsa. E-mail: taty-abakumova@yandex.ru

Dinara Dolgova, Candidate of Biology, Associate Professor at the Physiology and Pathophysiology Department of the Medical Faculty. E-mail: monika_rainbow@mail.ru

Snezhanna Gening, 5th year Student at the Medical Faculty at Ulyanovsk State University, Trainee Researcher at the Research Institute of Technology named after S.P. Kapitsa.

E-mail: sgening@bk.ru

Vladimir Ostatochnikov, Associate Research Fellow at the Research Institute of Technology named after S.P. Kapitsa.

E-mail: ost.vld@yandex.ru