

УДК 61:57:616-006:616-092

БИОХИМИЧЕСКИЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭРИТРОЦИТОВ БОЛЬНЫХ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ЗАБОЛЕВАНИЯ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ ФЕМТОСЕКУНДНЫМ ЛАЗЕРОМ IN VITRO

© 2013 О.С. Воронова¹, Д.Р. Долгова¹, А.А. Сысолятин²

¹Ульяновский государственный университет

²Научный центр волоконной оптики РАН, г. Москва

Поступила в редакцию 21.06.2013

В данной статье рассмотрено влияние фемтосекундного лазерного излучения на эритроциты доноров и больных РШМ на разных стадиях in vitro, проведен анализ состояния системы «перекисное окисление липидов - антиоксиданты» и ригидности эритроцитов до и после воздействия фемтосекундным лазерным излучением в разных дозах.

Ключевые слова: рак шейки матки, фемтосекундное лазерное излучение.

Рак шейки матки (РШМ) занимает 3–е место в структуре заболеваемости женщин России злокачественными новообразованиями (после рака молочной железы и эндометрия) и 1–е место в структуре смертности от онкогинекологической патологии у женщин в возрасте от 20 до 40 лет, достигая 60% [5]. Заболевание относят к разряду «визуальных локализаций», при этом качество диагностики не улучшается. В России начальный рак выявляют у 15,8% первичных больных, запущенный РШМ стадий III–IV – в 39,5% наблюдений [2].

Почти половина женщин умирают в течение первого года, как следствие выявления болезни в III–IV стадиях [6]. Лучевая терапия и хирургический метод считаются стандартными для лечения местнораспространенных форм РШМ. Но их результаты остаются неудовлетворительными.

Анализ данных литературы за последнее время свидетельствует, что в мире наряду с развитием классического лабораторного исследования маркеров рака большое внимание уделяется изучению показателей гомеостаза организма больного [7]. Известно, что состояние биохимического гомеостаза определяет как возможность развития опухоли, так и характер течения злокачественного процесса. В свою очередь длительное воздействие новообразования

на организм неизбежно сказывается на его функциональных возможностях [3]. Злокачественные опухоли способны влиять на систему крови, в том числе изменять биохимические и морфофункциональные показатели эритроцитов [1]. На сегодня показана роль окислительного стресса в развитии РШМ [10]. В литературе существуют данные об увеличении перекисного окисления липидов и возможном нарушении антиоксидантного статуса у больных с РШМ [8, 9].

Существующие консервативные методы лечения фоновых и предраковых заболеваний шейки матки и вульвы малоэффективны, а хирургические (диатермокоагуляция, электроконизация, криодеструкция, вульвэктомия), дающие сравнительно высокий процент положительных результатов и получивших широкое распространение, имеют ряд недостатков. С созданием квантовых генераторов – инструментов, обладающих уникальными свойствами, – появилась возможность принципиально по-новому воздействовать на опухолевые клетки. В медицине практикуется разрушение патологической ткани мощным лазерным излучением (ЛИ), а также неповреждающее воздействие на опухоль низкоэнергетического, в частности, гелий-неонового лазера [4].

Но широкому использованию лазеров в онкологии препятствует малоизученность системных эффектов ЛИ на организм, разнообразие источников ЛИ и сложность в подборе правильных доз. Проведение экспериментов in vivo невозможно без экспериментов in vitro.

В связи с этим главной целью нашего исследования явилось изучение воздействия фемтосекундного импульсного лазерного излучения на редокс-зависимые процессы в эритроцитах больных РШМ на разных стадиях, а также на ригидность мембран эритроцитов.

Воронова Ольга Сергеевна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник Научно-исследовательского технологического института им. С.П.Капицы Ульяновского государственного университета. E-mail: baby13.87@mail.ru

Долгова Динара Ришатовна, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии и патофизиологии медицинского факультета Ульяновского государственного университета; tonika_gainbow@mail.ru

Сысолятин Алексей Александрович, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории технологии волоконных световодов. E-mail: alexs@lure.gpi.ru

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования послужили эритроциты периферической крови больных РШМ на клинических стадиях, подвергшихся обследованию в гинекологическом отделении Ульяновского областного клинического онкологического диспансера и находившихся на Ia (начальный процесс), Ib-2a, (местно-ограниченный процесс), 2b-4 (распространенный процесс) стадиях по FIGO.

Облучение эритроцитов проводили в пластиковых кюветах фемтосекундным (ФС) лазером, являющимся совместной разработкой Научного центра волоконной оптики РАН и Ульяновского государственного университета (длительность импульса – 100 фс; средняя мощность = 1,25 мВт; пиковая мощность = 6 кВт). При облучении использовалось по 4 разных временных режима (1, 3, 5, 10 минут) на расстоянии 3 и 5 см, В итоге, дозы облучения составили 0,10; 0,27; 0,29; 0,48; 0,81; 0,96; 1,35; 2,7 Дж/см².

Для оценки ригидности эритроцитов использовали сканирующий зондовый микроскоп Smeпа А NT-MDT (Зеленоград) (СЗМ). Использовались фирменные кремниевые зонды с жесткостью 0,20 N/m. Радиус закругления кончика зонда составлял примерно 50 nm.

Для оценки системы «перекисное окисление липидов - антиоксиданты» (ПОЛ-АО) в эритроцитах определяли уровень малонового диальдегида (МДА) в тесте с тиобарбитуровой кислотой, а также активность ферментов системы антиоксидантной защиты (АОЗ): каталазы, глутатион-S-трансферазы (ГТ), супероксиддисмутазы (СОД).

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено, что облучение фемтосекундным ла-

зером *in vitro* эритроцитов доноров и больных РШМ приводит к достоверному дозозависимому увеличению уровня МДА в эритроцитах доноров при плотностях потока энергии (энергетических дозах) 0,96; 1,35 и 2,7 Дж/см², не вызывая значимых изменений при облучении с использованием меньших плотностей потока энергии (рис. 1). Значимое увеличение уровня МДА в эритроцитах больных РШМ после ФСЛИ обнаруживаются только лишь на стадии Ib-IIa при плотностях потока энергии 0,1; 0,29; 0,96 Дж/см² (рис. 1).

Показатели антиоксидантной системы (АОС) в эритроцитах больных РШМ на разных стадиях при облучении фемтосекундным (ФС) лазером имеют разнонаправленную динамику.

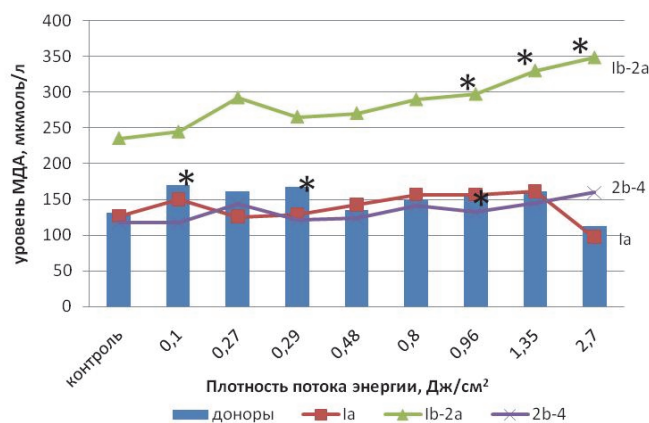
Не наблюдается достоверных изменений в уровне антиоксидантных ферментов в эритроцитах доноров после облучения ФС лазером в любых дозах (таб. 1, 2, 3).

Изменения активности ГТ после облучения отмечены только в эритроцитах больных на стадии заболевания Ia: уровень ГТ достоверно снижается при облучении эритроцитов в дозах 0,1; 0,29 и 0,48 Дж/см² (табл. 1).

Облучение *in vitro* практически во всех дозах вызывает изменения активности СОД в эритроцитах больных РШМ, причем наблюдается абсолютно противоположная динамика активности фермента после облучения в эритроцитах больных на разных стадиях: на стадиях Ia и 2b-4 облучение ФС лазером приводит к снижению, а на стадии Ib-2a, наоборот, к значимому повышению уровня СОД (табл. 2).

Активность каталазы эритроцитов больных РШМ под воздействием ФСЛИ на кровь *in vitro* изменяется только на стадиях Ia и Ib-2a. Маленькие дозы приводят к увеличению активности фермента относительно контрольных образцов, дозы свыше 0,48 Дж/см² снижают активность каталазы в эритроцитах больных (табл. 3).

На основании полученных данных о влиянии ФСЛИ на систему ПОЛ-АО в эритроцитах, можно предполагать о том возникновение оксидативного стресса в эритроцитах доноров после



Примечание: * - данные, статистически значимо отличающиеся от данных контроля, $p \leq 0,05$

Рис. 1. Уровень МДА в эритроцитах больных РШМ после воздействия ФСЛИ *in vitro*.

Таблица 1. Активность ГТ в эритроцитах больных РШМ после воздействия ФСЛИ in vitro

Эср. стадия РШМ	Контроль	0,1 Дж/см ²	0,27 Дж/см ²	0,29 Дж/см ²	0,48 Дж/см ²	0,8 Дж/см ²	0,96 Дж/см ²	1,35 Дж/см ²	2,7 Дж/см ²
Доноры, n=12	0,131 ±0,015	0,14 ±0,032	0,126 ±0,026	0,121 ±0,025	0,14 ±0,025	0,136 ±0,021	0,126 ±0,017	0,126 ±0,017	0,136 ±0,018
Ia, n=12	0,2 ±0,016	0,161 ±0,006*	0,169 ±0,006	0,160 ±0,012*	0,152 ±0,012*	0,185 ±0,008	0,177 ±0,027	0,185 ±0,016	0,185 ±0,006
Ib-2a, n=12	0,162 ±0,018	0,149 ±0,02	0,155 ±0,02	0,145 ±0,019	0,147 ±0,047	0,157 ±0,017	0,152 ±0,019	0,147 ±0,018	0,149 ±0,015
2b-4, n=12	0,26 ±0,084	0,243 ±0,098	0,243 ±0,077	0,234 ±0,098	0,252 ±0,09	0,243 ±0,082	0,226 ±0,06	0,252 ±0,068	0,295 ±0,078

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

Таблица 2. Активность СОД в эритроцитах больных РШМ после воздействия ФСЛИ in vitro.

Эср. стадия РШМ	Контроль	0,1 Дж/см ²	0,27 Дж/см ²	0,29 Дж/см ²	0,48 Дж/см ²	0,8 Дж/см ²	0,96 Дж/см ²	1,35 Дж/см ²	2,7 Дж/см ²
Доноры, n=12	0,827 ±0,121	0,852 ±0,140	0,822± 0,233	0,511 ±0,206	0,651 ±0,194	0,548 ±0,2	0,734 ±0,239	0,78 ±0,216	0,741 ±0,143
Ia, n=12	1,35 ±0,234	0,78 ±0,053*	1,16 ±0,245	1,29 ±0,23	1,31 ±0,487	1,01 ±0,257	1,4 ±0,146	0,76 ±0,139*	1,19 ±0,075
Ib-2a, n=12	0,773 ±0,096	1,48 ±0,103*	1,35 ±0,084*	1,25 ±0,046*	1,62 ±0,089*	0,863 ±0,094	1,85 ±0,136*	1,56 ±0,072*	1,55 ±0,107*
2b-4, n=12	1,35 ±0,262	1,18 ±0,167	0,48 ±0,025*	1,23 ±0,063	0,97 ±0,282	1,18 ±0,167	0,816 ±0,168*	0,82 ±0,014*	0,75 ±0,149*

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

ФСЛИ, так как при повышении уровня МДА антиоксидантная активность не увеличивается. В эритроцитах больных на стадии Ib-2a вместе с повышением уровня МДА после воздействия ряда доз ФСЛИ также повышается активность СОД при неизменном уровне других антиоксидантных ферментов. Изменения в эритроцитах на других стадиях РШМ после воздействия ФС лазера являются единичными и не позволяют говорить о нарушениях в работе системы ПОЛ-АО.

Фемтосекундное лазерное излучение оказывает влияние на ригидность мембран эритроцитов (рис. 2). На всех стадиях РШМ облучение ФС

лазером приводит к увеличению ригидности мембран эритроцитов (рис. 2). При том, что облучение эритроцитов доноров при плотностях потока энергии 1,35 и 2,7 Дж/см² вызывает снижение ригидности мембран (рис. 2).

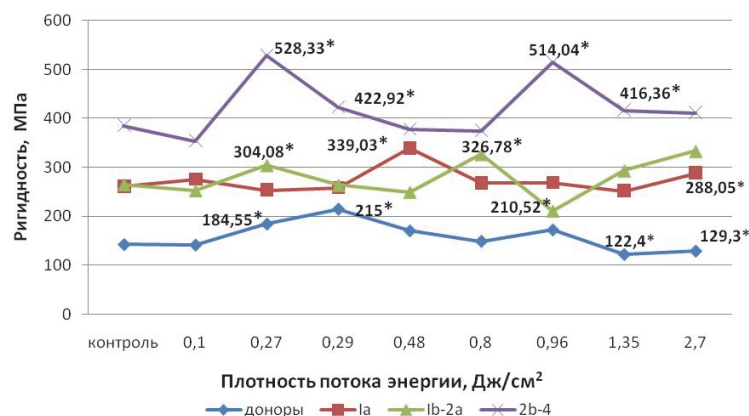
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из результатов исследования, можно сделать вывод о том, что воздействие ФСЛИ на эритроциты больных РШМ in vitro зависит от стадии заболевания. Наиболее выражены при этом изменения на IIб-IV клинической стадии заболевания.

Таблица 3. Активность каталазы в эритроцитах больных РШМ после воздействия ФСЛИ in vitro

Эср. стадия РШМ	Контроль	0,1 Дж/см ²	0,27 Дж/см ²	0,29 Дж/см ²	0,48 Дж/см ²	0,8 Дж/см ²	0,96 Дж/см ²	1,35 Дж/см ²	2,7 Дж/см ²
Доноры, n=12	0,116 ±0,026	0,122 ±0,031	0,092 ±0,01	0,087 ±0,017	0,09 ±0,015	0,101 ±0,009	0,075 ±0,013	0,094 ±0,011	0,082 ±0,015
Ia, n=12	0,103 ±0,011	0,137 ±0,04*	0,125 ±0,01*	0,091 ±0,02	0,062 ±0,009*	0,09 ±0,013	0,125 ±0,026	0,105 ±0,02	0,077 ±0,011*
Ib-2a, n=12	0,084 ±0,007	0,112 ±0,031	0,13 ±0,035*	0,132 ±0,035*	0,073 ±0,013	0,06 ±0,009*	0,105 ±0,013	0,077 ±0,013	0,092 ±0,021
2b-4, n=12	0,096 ±0,015	0,108 ±0,027	0,124 ±0,014	0,117 ±0,021	0,085 ±0,009	0,112 ±0,022	0,087 ±0,017	0,123 ±0,03	0,086 ±0,019

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



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

Рис. 2. Ригидность мембран эритроцитов больных РШМ на разных стадиях после воздействия ФСЛИ in vitro

Работа поддержана Гос. заданием Министерства образования и науки РФ и грантом Президента РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Изменение жесткости мембран эритроцитов у больных раком шейки матки под воздействием фемтосекундного лазерного излучения / С.О. Генинг, Т.В. Абакумова, Г.С. Аляпьев, Д.Р. Долгова // Вестник РГМУ. 2013. Специальный выпуск №1. С. 146-147.
2. Гинекология – национальное руководство [под ред. В.И. Кулакова, Г.М. Савельевой, И.Б. Манухина]. 2009. 1150 с.
3. Диагностика инвазивного рака мочевого пузыря по лабораторным показателям с использованием статистических решающих правил / Л.А. Державец, В.И. Прохорова, А.А. Машевский и др. // Онкоурология. 2006. №1. С. 14-17.
4. Захаров С.Д., Иванов А.В. Светокислородный эффект в клетках и перспективы его применения в терапии опухолей // Квантовая Электроника. 1999. Т. 29. № 12. С. 192-214.
5. Предоперационная химиолучевая терапия рака шейки матки с включением тегафура (предварительные данные) // Н.А. Илларионова, А.Н. Денисенко, С.С. Кузнецов и др. / Медицинский альманах. 2012. №4. С. 34-35.
6. Комплексное лечение больных раком шейки матки с высоким риском прогрессирования и применением неoadъювантной химиолучевой терапии / А.М. Муллагалеева, Р.Ш. Хасанов, Э.Ж. Шакирова // Практическая медицина. 2009. №4(36). С.67-70.
7. Новые опухолевые маркеры в онкоурологии // Н.С. Сергеева, И.Г. Русаков, Н.В. Маршуткина и др. / Актуальные вопросы лечения онкоурологических заболеваний: Мат-лы V Всерос. научно-практич. конф. с междунар. участием. Обнинск, 2-3 октября 2003 г. С. 144-145.
8. Circulating lipid peroxidation and antioxidant status in cervical cancer patients: a case-control study / V. Manju, J. Kalaivani Sailaja, N. Nalin i // Clin Biochem. 2002. V. 35(8). P. 621-625.
9. Lipid peroxidation and antioxidant status in cervical cancer patients/ S. Manoharan, K. Kolanjiappan, M. Kayalvizhi et al. // J. Biochem Mol Biol Biophys. 2002. V.3. P. 225-227.
10. Notani P.N. Global variation in cancer incidence and mortality. Current Science 2001. V. 81. P. 465-474.

BIOCHEMICAL AND MORPHOLOGICAL PARAMETERS OF RED BLOOD CELLS OF CERVICAL CANCER PATIENTS AT DIFFERENT DISEASE STAGES AFTER EXPOSURE FEMTOSECOND LASER IRRADIATION IN VITRO

© 2013 O.S. Voronova¹, D.R. Dolgova¹, A.A. Sysolyatin²

¹Ulyanovsk State University

²Fiber Optics Research Center of Russian Academy of Sciences, Moscow

The influence of femtosecond laser irradiation on red blood cells donors and patients with cervical cancer at different stages in vitro was considered in this article. The state of the “lipid peroxidation - antioxidants” and rigidity of red blood cells before and after exposure to femtosecond laser radiation in different doses was analyzed. Keywords: cervical cancer, femtosecond laser irradiation.

Olga Voronova, Candidate of Biology, Associate Research Fellow at the Research Institute of Technology named after S.P. Kapitsa. E-mail: baby13.87@mail.ru

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

Aleksey Sysolyatin, Candidate of Physics and Mathematics, Senior Research Fellow at the laboratory by Technology of Optical Fibers. E-mail: alexs@lure.gpi.ru