

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

УДК 616.15-092-074:615.831.7
Поступила 28.03.2012 г.



Т.П. Генинг, д.б.н., профессор, зав. кафедрой физиологии и патофизиологии; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной биологии Научно-исследовательского технологического института;
Д.Р. Арсланова, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной биологии Научно-исследовательского технологического института;
Т.В. Абакумова, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной биологии Научно-исследовательского технологического института;
В.В. Светухин, д.ф.-м.н., профессор, директор Научно-исследовательского технологического института;
И.И. Антонеева, д.м.н., профессор кафедры онкологии и лучевой диагностики; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной биологии Научно-исследовательского технологического института;
С.О. Генинг, студентка, стажер-исследователь лаборатории молекулярной и клеточной биологии Научно-исследовательского технологического института

Ульяновский государственный университет, Ульяновск, 432017, ул. Толстого, 42

Цель исследования — оценка влияния на морфофункциональное состояние эритроцитов периферической крови доноров фемтосекундного лазерного излучения с различной плотностью потока энергии.

Материалы и методы. В эритроцитах периферической крови определяли уровень малонового диальдегида (МДА), активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионтрансферазы, оценивали топологию и ригидность мембран методом сканирующей зондовой микроскопии. Использовали фемтосекундное лазерное излучение волоконного эрбиевого лазера длительностью импульса $82 \cdot 10^{-15}$ с, средней мощностью 1,26 мВт, пиковой мощностью 6 кВт, длиной волны — 1,55 мкм. Плотность потока облучения варьировала от 0,10 до 2,70 Дж/см².

Результаты. Установлено, что уровень МДА, являющегося показателем интенсивности перекисного окисления липидов, при любой плотности потока энергии лазера значимо не меняется, варьируя в интервале от 430 до 509 мкмоль/л. Изменение активности ферментов антиоксидантной защиты — СОД и каталазы — дозозависимо: наиболее выраженное повышение ее отмечается при плотности потока облучения 0,10 Дж/см². Активность глутатионтрансферазы при всех использованных плотностях потока облучения не отличается от контроля. Данные сканирующей зондовой микроскопии свидетельствуют об изменении топологии и волнообразном возрастании ригидности мембраны эритроцитов при увеличении плотности потока энергии фемтосекундного лазерного излучения.

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

English

Morphofunctional State of Peripheral Blood Erythrocytes after Femtosecond Laser Treatment

T.P. Gening, D.Bio.Sc., Professor, Head of the Department of Physiology and Pathophysiology; Leading Research Worker, the Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Scientific Research Technological Institute;

D.R. Arslanova, PhD, Senior Research Worker, the Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Scientific Research Technological Institute;

T.V. Abakumova, PhD, Senior Research Worker, the Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Scientific Research Technological Institute;

V.V. Svetukhin, D.Phys.-Math.Sc., Professor, Director of Scientific Research Technological Institute;

I.I. Antoneeva, D.Med.Sc., Professor, the Department of Oncology and Radiodiagnosis; Leading Research Worker, the Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Scientific Research Technological Institute;

S.O. Gening, Student, Trainee Research Worker, the Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Scientific Research Technological Institute

Ulyanovsk State University, Tolstoy St., 42, Ulyanovsk, Russian Federation, 432017

Для контактов: Генинг Татьяна Петровна, тел. раб. 8(8422)32-70-71; e-mail: Naum-53@yandex.ru

The aim of the investigation was to assess femtosecond laser effect on morphofunctional state in peripheral blood erythrocytes exposed to radiation flux density variations.

Materials and Methods. We determined the level of malondialdehyde (MDA), the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione-transferase, and assessed topology and rigidity of erythrocyte membranes using scanning probe microscopy. In the experiment we used erbium fiber laser with pulse duration of $82 \cdot 10^{-15}$ s, peak and average power of 6 kW and 1.26 mW, respectively, and wavelength of 1.55 μm ; radiation flux density being within the range from 0.10 to 2.70 J/cm².

Results. MDA level indicating lipid peroxidation intensity was found to change slightly varying from 430 to 509 $\mu\text{mol/l}$. The activity of antioxidant enzymes — SOD and catalase was revealed to depend on the energy density: its most pronounced activity increase was recorded for the radiation flux density of 0.10 J/cm². GT activity for all selected radiation energy densities was similar to that in control group. Scanning probe microscopy findings indicate erythrocyte topology modification as well as undulatory increase of erythrocyte membrane rigidity at increased energy density of femtosecond laser radiation.

Key words: femtosecond laser radiation; erythrocytes; scanning probe microscopy.

Одним из перспективных направлений биомедицинских исследований сегодня является использование в диагностике и лечении новых лазерных технологий, в основе которых лежат такие биологические эффекты, как фотодеструктивное действие света (в лазерной хирургии) и фотохимическое действие света (в терапии) [1–4]. Характерными чертами фемтосекундных лазеров являются малая длительность импульса, высокая средняя интенсивность во время действия импульса, высокая временная и пространственная когерентность. Высокая пиковая интенсивность фемтосекундного лазерного излучения (ФСЛИ) способна вызывать гибель клеток, однако причины ее 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 применяются для размягчения костной ткани [6]. Предполагаемое их использование в онкологии потребует значительного увеличения дозы излучения [7]. Все вышесказанное обуславливает необходимость оценки влияния ФСЛИ на макроорганизм в целом и в первую очередь на клетки крови.

Цель исследования — оценка влияния на морфофункциональное состояние эритроцитов периферической крови доноров фемтосекундного лазерного излучения с различной плотностью потока энергии.

Материалы и методы. 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 (Россия). 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 плотности потока энергии при облучении фемтосекундным лазером. Клетки облучали в пластиковых кюветах высотой 1 см. Для расстояния от источника лазерного излучения до поверхности эритроцита 3 см (при диаметре пучка 0,6 см) и 5 см (при диаметре 1 см) и при исходных энергетических характеристиках лазера плотность потока энергии на биоткань (\mathcal{E}) рас-

считывали по формуле [8]: $\mathcal{E} = W/S$, где W — выходная энергия излучения, Дж; S — площадь лазерного пятна на биоткани, см². Рассчитывали значения плотности при средней мощности лазера в зависимости от длительности облучения (табл. 1).

Биохимические методы исследования. Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по уровню вторичного продукта — малонового диальдегида (МДА). Активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатион-S-трансферазы (ГТ) определяли биохимически. Оптическую плотность исследуемых параметров оценивали с помощью спектрофотометра Genesys UV-10 (Thermo Scientific, США).

Морфологические методы исследования. Для оценки топологии и ригидности мембраны эритроцитов применяли метод сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) (Smena A, ф. NT-MDT, Зеленоград, Россия). Использовали фирменные кремниевые зонды с жесткостью 0,2 N/m, радиус закругления кончика составлял примерно 50 нм. Эритроциты сканировали в полуконтактном режиме. Ригидность мембран оценивали по модулю Юнга, который рассчитывали согласно теории Герца [9].

Для выяснения различий между данными, полученными в эксперименте и контрольной группе, применяли непараметрический U-критерий Манна–Уитни (Statistica 6.0). Статистически значимыми считали данные при $p \leq 0,05$.

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

Предполагается [10], что компоненты ферментативного звена антиоксидантной системы (АОС) — СОД и каталаза — являются акцепторами лазерного излучения, поэтому представляет интерес выяснение

Т а б л и ц а 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 |
| Эср, Дж/см ² | 0,10 | 0,27 | 0,29 | 0,48 | 0,81 | 0,96 | 1,35 | 2,70 |

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

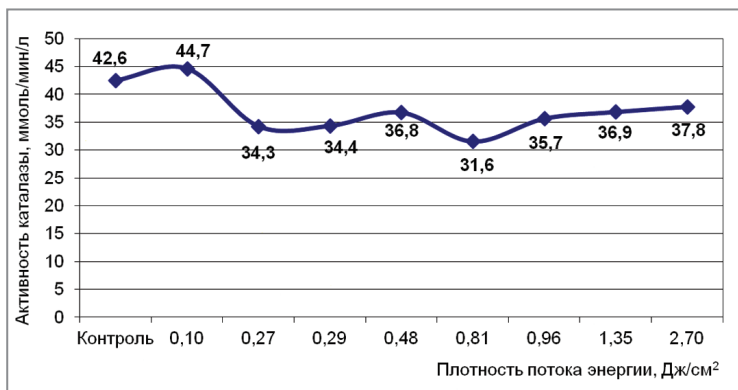


Рис. 1. Активность каталазы в эритроцитах в зависимости от плотности потока энергии фемтосекундного лазерного излучения

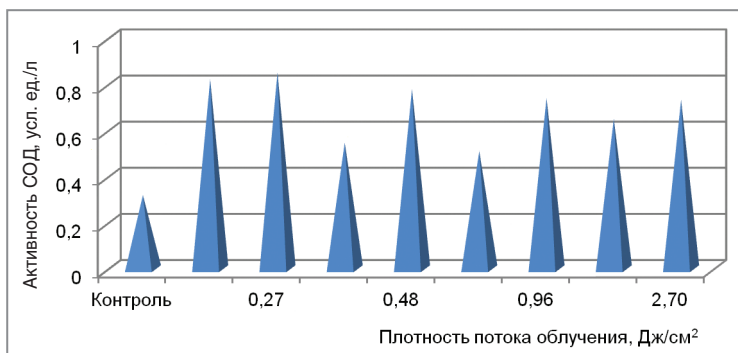


Рис. 2. Активность СОД в эритроцитах в зависимости от плотности потока энергии фемтосекундного лазерного излучения

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

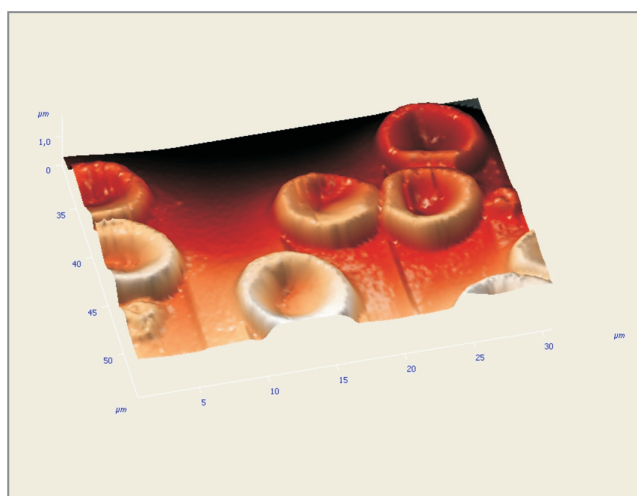
Активность ГТ после ФСЛИ при всех использованных значениях плотности потока энергии статистически значимо не отличалась от таковой до облучения.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить возможность антиоксидантной активности ФСЛИ при воздействии на эритроциты *in vitro*.

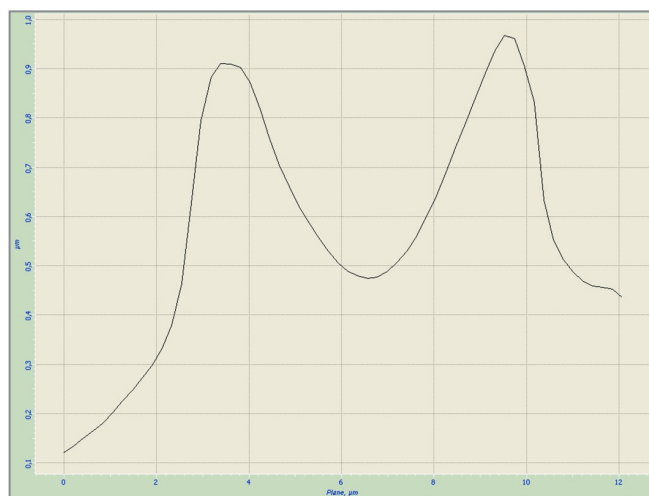
В работах Л.В. Корси с соавт. [11] показано, что при облучении эритроцитов в различных спектральных диапазонах полупроводниковыми лазерами, лазерами на красителях и твердотельным титан-сапфировым лазером деформируемость эритроцитов имеет резонансный характер, подобный полосам спектра поглощения молекулярного 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 цитоархитектоника 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 (рис. 6).



а



б

Рис. 3. Изображение в 3D (а) и боковое сечение профиля (б) интактных эритроцитов

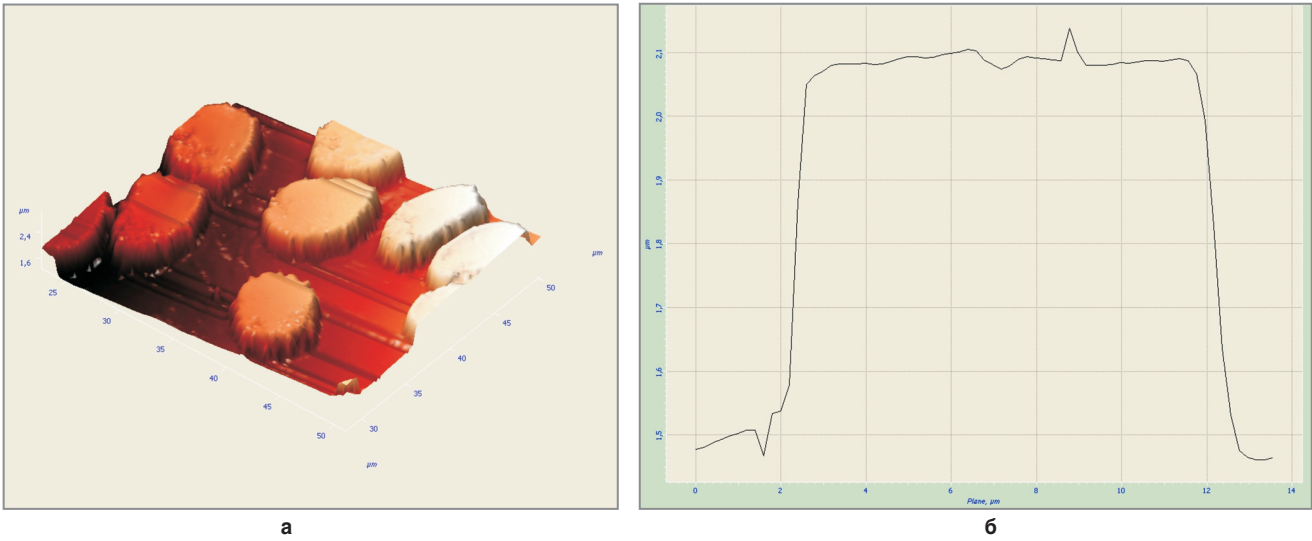


Рис. 4. Изображение в 3D (а) и боковое сечение профиля (б) эритроцитов после ФСЛИ при плотности потока энергии 0,29 Дж/см²

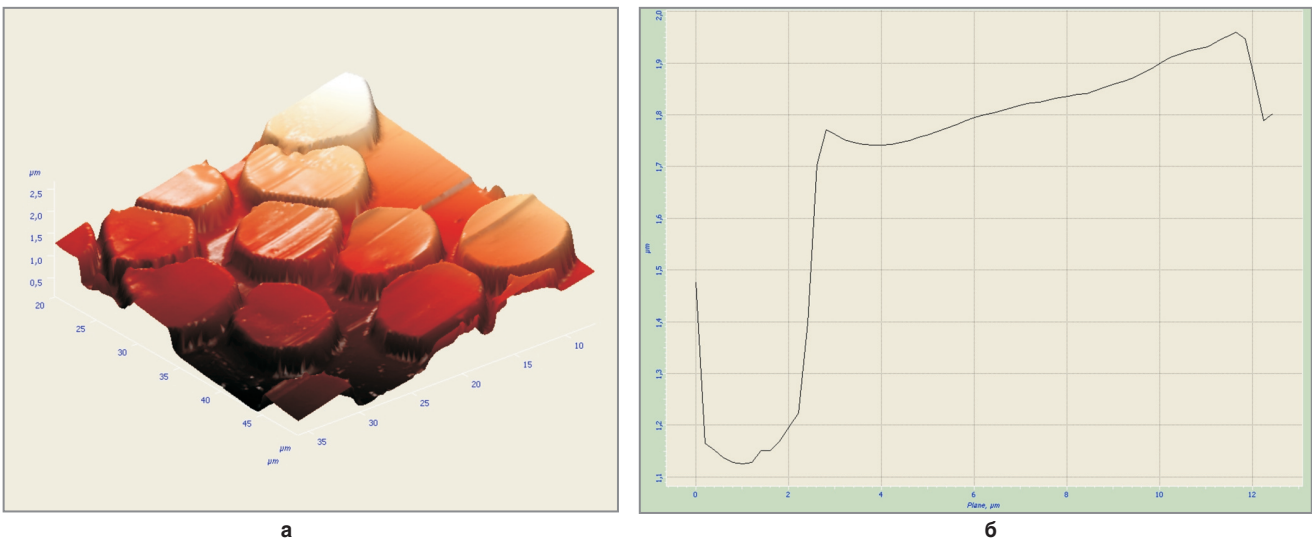


Рис. 5. Изображение в 3D (а) и боковое сечение профиля (б) эритроцитов после ФСЛИ при плотности потока энергии 0,96 Дж/см²

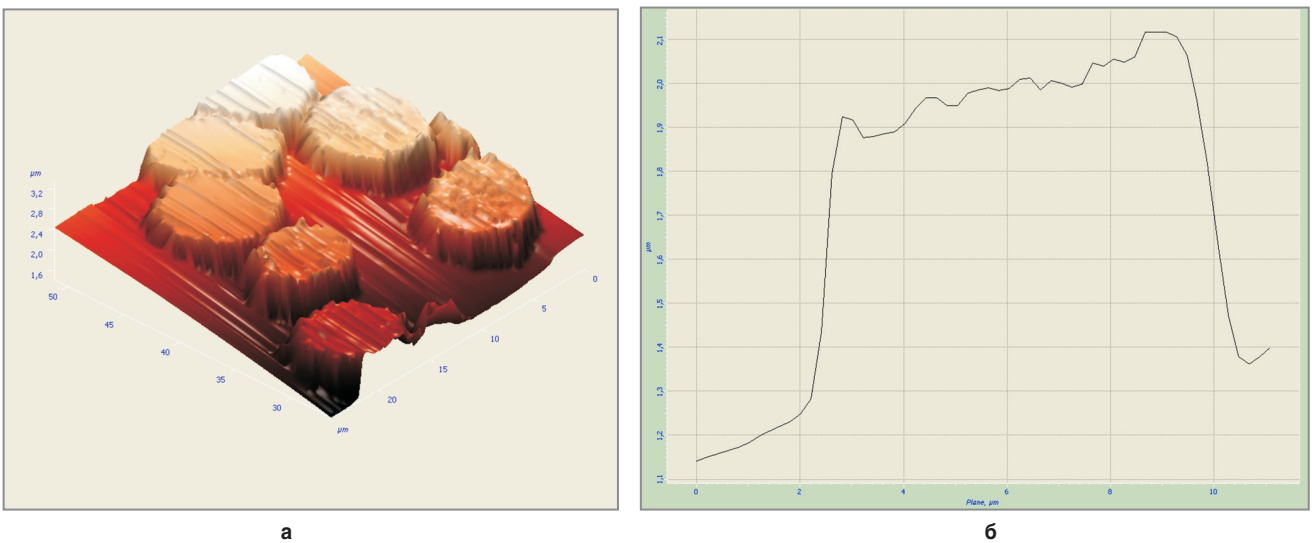


Рис. 6. Изображение в 3D (а) и боковое сечение профиля (б) эритроцитов доноров после ФСЛИ при плотности потока энергии 2,7 Дж/см²

Таблица 2

Ригидность эритроцитов при действии ФСЛИ

| | Плотность потока облучения, Дж/см ² | | | | | | | | |
|----------------|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| | Контроль | 0,1 | 0,27 | 0,29 | 0,48 | 0,81 | 0,96 | 1,35 | 2,70 |
| Ригидность, Па | 360,80± 14,13 | 561,70± 22,88* | 515,90± 14,96* | 569,60± 22,62* | 550,10± 29,95* | 481,60± 19,32* | 496,30± 26,43* | 382,00± 17,72 | 937,40 ±33,09* |

* — данные статистически значимо различаются со значениями в контрольной группе.

С 1990-х гг. 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. Этот метод позволяет измерять локальные упругие свойства поверхности клеток [12]. Исследования, проведенные с применением сканирующего зондового микроскопа Smena A, свидетельствуют о том, что ФСЛИ вызывает уменьшение упруговязкостных свойств мембраны эритроцитов, это сопровождается увеличением значений ригидности (табл. 2).

Таким образом, ФСЛИ дозозависимо изменяет ригидность и топологию эритроцитов.

Заключение. Фемтосекундное лазерное излучение с плотностью потока от 0,10 до 2,70 Дж/см² не изменяет значимо уровень МДА в эритроцитах, но повышает активность таких антиоксидантных ферментов, как каталаза и СОД. Наиболее выражено это повышение при плотности потока облучения 0,10 Дж/см², что позволяет предполагать антиоксидантный эффект фемтосекундного лазерного излучения. Данные сканирующей зондовой микроскопии свидетельствуют об изменении топологии и волнообразном возрастании ригидности мембраны эритроцитов при увеличении плотности потока энергии исследуемого излучения.

Работа поддержана гос. заданием Минобрнауки РФ.

Литература

1. Prindeze N.J., Moffatt L.T., Shupp J.W. Mechanisms of action for light therapy: a review of molecular interactions. *Exp Biol Med (Maywood)* 2012; 237(11): 1241–1248.
2. Нечипуренко Н.И., Пашковская И.Д., Степанова Ю.И., Василевская Л.А. Механизмы действия и биологические эффекты низкоинтенсивного лазерного излучения. *Медицинские новости* 2008; 12: 17–21.
3. Portillo Muñoz M., Lorenzo Luengo M.C., Sánchez Llorente J.M., Peix Sánchez M., Albaladejo A., García A., Moreno Pedraz P. Morphological alterations in dentine after mechanical treatment and ultrashort pulse laser irradiation. *Lasers Med Sci* 2012; 27(1): 53–58.
4. Perin B., Zaric B., Jovanovic S., Matijasevic J., Stanic J., Kopitovic I., Zvezdin B., Antonic M. Patient-related independent clinical risk factors for early complications following Nd: YAG laser resection of lung cancer. *Ann Thorac Med* 2012; 7(4): 233–237.
5. Ракитянский М.М., Агранат М.Б., Амитков С.И. Исследование биологических объектов на клеточном и субклеточном уровне с помощью фемтосекундного лазерного оптического пинцета-скальпеля. *Вестник трансплантологии и искусственных органов* 2009; 3: 31–36.

6. Girard B., Yu D., Armstrong M.R. Effects of femtosecond laser irradiation on osseous tissues. *Lasers Surg Med* 2007; 3: 273–285.
7. Thøgersen J., Knudsen C.S., Maetzke A. Reproductive death of cancer cells induced by femtosecond laser pulses. *Int J Radiat Biol* 2007; 5: 289–299.
8. Ежов В.В., Торчинов А.М., Гейниц А.В., Фириченко В.И. Некоторые биофизические аспекты контактной ИК-лазерной терапии шейки матки. *Лазерная медицина* 2008; 12(3): 15–17.
9. Ribeiro M.M., Franquelim H.G., Torcato I.M., Ramu V.G., Heras M., Bardaji E.R., Castanho M.A. Antimicrobial properties of analgesic kyotorphin peptides unraveled through atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 420(3): 676–679.
10. Freitinger Skalická Z., Zölzer F., Beránek L., Racek J. Indicators of oxidative stress after ionizing and/or non-ionizing radiation: Superoxid dismutase and malondialdehyde. *J Photochem Photobiol B* 2012; 117: 111–114.
11. Корси Л.В., Соколов В.Г. Лазерный способ фотохимической деструкции опухолей без экзогенных сенсibilizаторов. В кн.: *Лазерно-оптические системы и технологии*. М: ФГУП «НПО Астрофизика»; 2009; 101–106.
12. Pleskova S.N., Zaslavzkaja M.I., Guschina Yu.Yu., Koksharov I.A., Erastova Yu.G. Morphological investigation of human blood neutrophil phagocytosis in vitro by AFM. *Phys Low-Dim Struct* 2001; 3: 229–236.

References

1. Prindeze N.J., Moffatt L.T., Shupp J.W. Mechanisms of action for light therapy: a review of molecular interactions. *Exp Biol Med (Maywood)* 2012; 237(11): 1241–1248.
2. Nechipurenko N.I., Pashkovskaya I.D., Stepanova Yu.I., Vasilevskaya L.A. Mekhanizmy deystviya i biologicheskie efekty nizkointensivnogo lazernogo izlucheniya [Mechanisms of action and biological effects of low-intensity laser radiation]. *Meditsinskie novosti — Medical News* 2008; 12: 17–21.
3. Portillo Muñoz M., Lorenzo Luengo M.C., Sánchez Llorente J.M., Peix Sánchez M., Albaladejo A., García A., Moreno Pedraz P. Morphological alterations in dentine after mechanical treatment and ultrashort pulse laser irradiation. *Lasers Med Sci* 2012; 27(1): 53–58.
4. Perin B., Zaric B., Jovanovic S., Matijasevic J., Stanic J., Kopitovic I., Zvezdin B., Antonic M. Patient-related independent clinical risk factors for early complications following Nd: YAG laser resection of lung cancer. *Ann Thorac Med* 2012; 7(4): 233–237.
5. Rakityanskiy M.M., Agranat M.B., Amitkov S.I. Issledovanie biologicheskikh ob'ektov na kletochnom i subkletochnom urovne s pomoshch'yu femtosekundnogo lazernogo opticheskogo pintseta-skal'pelya [The study of biological objects at the cellular and subcellular level using femtosecond laser optical forceps-scalpel]. *Vestnik transplantologii i isskustvennykh organov — Vestnik of Transplantology and Artificial Organs* 2009; 3: 31–36.
6. Girard B., Yu D., Armstrong M.R. Effects of femtosecond laser irradiation on osseous tissues. *Lasers Surg Med* 2007; 3: 273–285.
7. Thøgersen J., Knudsen C.S., Maetzke A. Reproductive death of cancer cells induced by femtosecond laser pulses. *Int J Radiat Biol* 2007; 5: 289–299.
8. Ezhov V.V., Torchinov A.M., Geynits A.V., Firichenko V.I. Nekotorye biofizicheskie aspekty kontaktnoy IK-lazernoy terapii sheyki matki [Some biophysical aspects of contact IR laser therapy

of cervix uteri]. *Lazernaya meditsina — Laser Medicine* 2008; 12(3): 15–17.

9. Ribeiro M.M., Franquelim H.G., Torcato I.M., Ramu V.G., Heras M., Bardaji E.R., Castanho M.A. Antimicrobial properties of analgesic kyotorphin peptides unraveled through atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 420(3): 676–679.

10. Freitinger Skalická Z., Zölzer F., Beránek L., Racek J. Indicators of oxidative stress after ionizing and/or non-ionizing radiation: Superoxid dismutase and malondialdehyde. *J Photochem Photobiol B* 2012; 117: 111–114.

11. Korsi L.V., Sokolov V.G. Lazernyy sposob fotokhimicheskoy destruktzii opukholey bez ekzogennykh sensibilizatorov. V kn.: *Lazerno-opticheskie sistemy i tekhnologii* [Laser method of tumor photochemical destruction without exogeneous sensilizer. In: Laser optical systems and technologies]. Moscow: FGUP "NPO Astrofizika"; 2009; 101–106.

12. Pleskova S.N., Zaslavzkaja M.I., Guschina Yu.Yu., Koksharov I.A., Erastova Yu.G. Morphological investigation of human blood neutrophil phagocytosis in vitro by AFM. *Phys Low-Dim Struct* 2001; 3: 229–236.