

УДК 616-006: 612.62.

ВЛИЯНИЕ ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ПОКАЗАТЕЛИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ

Воронова О.С., Генинг Т.П., Светухин В.В.

ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск,
e-mail: Naum-53@yandex.ru

В эксперименте на белых беспородных мышах с перевиваемой опухолью рака шейки матки на различных стадиях роста оценивали *in vivo* влияние фемтосекундного лазерного излучения (ФСЛИ) различной интенсивности на параметры оксидативного стресса в неоплазме. Установлено, что уровень малонового диальдегида, возрастающий в динамике опухолевой прогрессии, увеличивается под влиянием ФСЛИ на 20-е сутки роста опухоли и незначительно снижается на 30-е сутки ее роста. Динамика активности ферментов антиоксидантной системы в неоплазме была разнонаправленной и зависела как от фазы опухолевого роста, так и от дозы ФСЛИ. Нарастание процессов окисления на фоне снижения активности антиоксидантных ферментов и нарастания активности СОД, характеризующее нарастание оксидативного стресса, при ФСЛИ установлено в неоплазме на 20-е сутки развития опухоли.

Ключевые слова: рак шейки матки, фемтосекундное лазерное излучение, оксидативный стресс

THE INFLUENCE OF FEMTOSECOND LASER RADIATION ON PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS IN TUMOR TISSUE IN AN EXPERIMENTAL CERVICAL CANCER

Voronova O.S., Gening T.P., Svetukhin V.V.

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, e-mail: Naum-53@yandex.ru

This study traces the effect of femtosecond laser radiation (FSLR) of varying intensity on the parameters of oxidative stress in neoplasms in an experiment *in vivo* on white inbred mice with transplantable tumor of cervical cancer at different stages of growth. Level of malondialdehyde, catalase, superoxide dismutase, glutathione reductase and glutathione transferase to estimate oxidative stress in tumor tissue were determined. The results show that the level of malondialdehyde are increasing in the dynamics of tumor progression, as well as the content of this product in neoplasm increased under the influence of FSLR on 20 th day of tumor growth and decreased slightly on 30 th day of growth. Multidirectional dynamics of the activity of antioxidant system's enzymes in the neoplasm depended both on the phase tumor growth, and the dose of FSLR. Oxidative stress increases on the background of decreased activity of antioxidant enzymes. Oxidative stress increases on the background of decreased activity of antioxidant enzymes and growth of superoxide dismutase activity.

Keywords: cervical cancer, femtosecond laser radiation, oxidative stress

Состояние гомеостаза, характеризующееся увеличением содержания свободно-радикальных молекул, получило название «оксидативный стресс» [9]. Причиной его может быть увеличение продукции свободных радикалов и (или) снижение эффективности антиоксидантных систем. Оксидативный стресс может быть локальным и генерализованным, умеренным (когда модифицируются и разрушаются отдельные молекулы) и сильным (приводит к гибели клеток и групп клеток) [6]. Основной повреждающий эффект свободных радикалов заключается в разрушении мембран клеток, модификации белков и ДНК [7]. Полагают, что использование лазерного излучения с высокой импульсной мощностью увеличивает глубину проникновения. При этом поражения клетки будут везде, где присутствует растворенный кислород: в ядре, митохондриях, активируя апоптоз и вызывая повреждение ДНК [4]. Использование лазеров в клинике основывается на таких биологических эффектах, как фотодеструктивное действие света, используемое, в частности,

в лазерной хирургии, и фотохимическое действие света, лежащее в основе его терапевтического использования.

Фемтосекундный волоконный эрбиевый лазер является совместной уникальной разработкой Научного центра волоконной оптики РАН и Ульяновского государственного университета. Основными преимуществами данного типа лазеров является малая длительность импульса, высокая пиковая (кВт) и малая средняя (мВт) мощности, что позволяет предполагать отсутствие выраженных термических эффектов. В медицине эти лазеры используются в качестве голографического пинцета и оптического скальпеля.

Использование ФСЛИ в терапии поверхностно локализованных опухолей позволило бы существенно снизить лучевую нагрузку на пациента.

В соответствии с вышеизложенным целью исследования было изучение влияния ФСЛИ на показатели оксидативного стресса в опухолевой ткани при экспериментальном раке шейки матки (РШМ).

Материал и методы исследования

В эксперименте на белых беспородных мышках с перевиваемой опухолью рака шейки матки (РШМ-5), банк опухолевых штаммов РОНЦ им. Н.Н. Блохина) оценивали влияние ФСЛИ различной интенсивности на неоплазму *in vivo*. Был использован фемтосекундный импульсный волоконный эрбиевый лазер с характеристиками: длительность импульса – $100 \cdot 10^{-15}$ с; промежуток между импульсами – $200\text{--}250 \cdot 10^{-15}$ с; средняя мощность – 1,25 мВт; пиковая мощность – 6 кВт, длина волны – 1,55 мкм, частота 50 МГц. Плотность энергии на биоткань (Э), Дж/см², рассчитывали по формуле:

$$\text{Э} = W/S,$$

где W – выходная энергия излучения, Дж; S – площадь лазерного пятна на биоткани, см².

Выходную энергию для импульсно-периодического режима определяли из соотношения:

$$W = P(t_u/t_u + t_n) \cdot t,$$

где P – выходная мощность излучения, Вт; t – время воздействия, с; t_u – длительность импульса, с; t_n – длительность паузы, с.

При режиме излучения на расстоянии 10 см (площадь воздействия 3,14 см²) средняя плотность энергии на ткань (энергетическая доза) за одну процедуру

составляла 0,24 Дж/см² за 10 минут и 0,36 Дж/см² за 15 минут, но при этом облучение проходило в импульсном режиме при огромной пиковой интенсивности, равной 1910,8 Вт/см² в момент импульса, и средней интенсивности – 0,0004 Вт/см². Процедуры проводились ежедневно, при 10 процедурах 10-минутного лазерного облучения суммарная энергетическая доза лазерного излучения за курс составила 2,4 Дж/см². При 10-кратном облучении в режиме 15 минут на расстоянии 10 см суммарная плотность энергии на ткань составила 3,6 Дж/см².

Для оценки показателей оксидативного стресса в опухолевой ткани определяли уровень малонового диальдегида (МДА) (мкмоль/л/мг), активность супероксиддисмутазы (СОД) (у.е./мг), каталазы (ммоль/с/мг), глутатионредуктазы (ГР) (ммоль/мин/мг) и глутатионтрансферазы (ГТ) (ммоль/мин/мг).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программ Microsoft Excel 2003 и Stata 6.0.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что уровень МДА в неоплазме изменяется под влиянием ФСЛИ (табл. 1).

Таблица 1

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

Эксп. ФСЛИ группа	Доза		
	Без облучения $n = 12$	$\text{Э}_{\text{сред}} = 2,4 \text{ Дж/см}^2 \ n = 12$	$\text{Э}_{\text{сред}} = 3,6 \text{ Дж/см}^2 \ n = 12$
20-е сутки РШМ-5	$27,94 \pm 1,600$	$32,17 \pm 1,150^*$	$33,92 \pm 2,780^*$
30-е сутки РШМ-5	$36,30 \pm 1,220$	$32,44 \pm 0,960^*$	$33,81 \pm 1,490$

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

Как следует из данных табл. 1, уровень МДА возрастает в динамике опухолевой прогрессии, что не противоречит данным литературы об усилении перекисного окисления липидов при прогрессировании неоплазмы [1]. В то же время существует мнение, согласно которому активность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в опухолевых клетках снижена, что связано с изменением липидного состава клеточных мембран в сторону преобладания насыщенных жирных кислот [2].

Концентрация свободных радикалов в тканях организма находится под контролем антиоксидантных систем (АОС). Ферментативное звено АОС представлено, в частности, СОД, которая трансформирует супероксиданион в пероксид водорода и кислород, каталазой, которая может участвовать в превращении пероксида водорода в воду и кислород, глутатионпероксидазой (ГП), которая участвует

в инаktivации пероксида водорода и пероксиднитрита.

Результаты оценки активности компонентов АОС представлены в табл. 2.

Из данных, представленных в таблице, следует, что активность ряда ферментов АОС зависела от стадии развития опухоли: существенно и значимо в неоплазме на 30-е сутки роста возрастает активность СОД и ГТ. Опухолевая трансформация сопровождается изменением внутриклеточных метаболических процессов, в том числе образования и утилизации активных метаболитов кислорода. В литературе нет единой точки зрения относительно продукции H_2O_2 неоплазмой экспериментальных опухолей [8, 10]. Основная часть H_2O_2 , ингибирующая размножение клеток, в митохондриях образуется в результате реакции дисмутации O_2^- , катализируемой СОД. Содержание СОД в клетках возрастает в ответ на повышение концентрации O_2^- . Усиленное образование H_2O_2 , возможно, компен-

сируется повышенным содержанием глутатионзависимых ферментов, в частности, ГТ, участвующих в разложении перекисей. Таким образом, в динамике прогрессиро-

вания экспериментальной опухоли РШМ-5 имеет место возрастание в неоплазме уровня МДА при одновременном увеличении активности СОД и ГТ.

Таблица 2

Активность ферментов АОС опухолевой ткани РШМ при воздействии ФСЛИ

Показатели	Эксп. группы	РШМ 20 суток			РШМ 30 суток		
		Без облучения n = 12	$\bar{D}_{\text{сред}} = 2,4 \text{ Дж/см}^2$ n = 12	$\bar{D}_{\text{сред}} = 3,6 \text{ Дж/см}^2$ n = 12	Без облучения n = 12	$\bar{D}_{\text{сред}} = 2,4 \text{ Дж/см}^2$ n = 12	$\bar{D}_{\text{сред}} = 3,6 \text{ Дж/см}^2$ n = 12
ГР, ммоль/мин/мг		0,24 ± 0,008	0,24 ± 0,009	0,25 ± 0,006	0,21 ± 0,016	0,17 ± 0,004*	0,14 ± 0,005*
ГТ, ммоль/мин/мг		0,47 ± 0,076	0,75 ± 0,070*	0,56 ± 0,077	1,50 ± 0,292	1,74 ± 0,120	0,64 ± 0,065*
СОД, у.е./мг		9,23 ± 0,930	12,92 ± 1,920*	17,10 ± 1,400*	26,57 ± 2,00	8,15 ± 0,200*	14,86 ± 3,410*
Каталаза, ммоль/с/мг		0,75 ± 0,345	0,53 ± 0,110	1,05 ± 0,169*	0,54 ± 0,100	0,45 ± 0,073	0,81 ± 0,019*

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

Под влиянием ФСЛИ дозой 2,4 Дж/см² в неоплазме на 20-е сутки развития РШМ статистически значимо возросло количество МДА (см. табл. 1) при одновременном снижении активности каталазы и возрастании активности СОД (см. табл. 2). На 30-е сутки опухолевого роста в ткани РШМ под влиянием ФСЛИ снижалось количество МДА (см. табл. 1) и волнообразно, в зависимости от дозы ФСЛИ, изменялась активность АОС ферментов (см. табл. 2).

В работах С.Д. Захарова и А.В. Иванова [3] показано, что светокислородный эффект развивается в клетках опухоли идентично фотодинамическому эффекту, и гибели клетки при достаточно большой дозе облучения предшествуют 3 стадии. В начальной стадии реакция клетки носит характер стереотипного возбуждения и имеет определенный порог. Продолжающееся облучение приводит к нарастанию в клетке окисления. В ней приостанавливаются процессы, связанные с пролиферацией. Поток электронов и протонов, идущий в норму из клетки для «борьбы» с окислением во внешней среде, уменьшается. Часть его (пропорциональная лучевой нагрузке) участвует в клетке при замене связей типа R–O или S–S на R–H или S–H, что способствует внутренней репарации.

В результате в клетке развивается окисление. Однако предполагается, что при этом активируются антиоксидантные ферменты. Закисление сопровождается торможением гликолиза. Клетка, возможно, направляет исходные соединения гликолиза напрямую на восстановление окисленных молекул. При этом, возможно, идет разрушение ли-

зосом, сопровождающееся высвобождением гидролаз, разрушающих субклеточные структуры, и снижением pH.

Этой стадии, вероятно, соответствует динамика изменений уровня МДА и АОС в ткани РШМ на 20-е сутки развития опухоли при ФСЛИ в дозе 2,4 Дж/см².

Авторы полагают, что при возрастании лучевой нагрузки наступает повреждение систем ионного транспорта и осмотическое набухание клетки.

Данная схема перехода клетки от активирования к деструкции при воздействии излучения – одна из многих, предложенных на сегодня, однако, она позволяет наиболее полно интерпретировать динамику компонентов системы «перекисное окисление липидов – антиоксиданты», определяющую возникновение окислительного стресса, при воздействии на неоплазму РШМ ФСЛИ.

Согласно данным литературы [5], установившиеся опухоли характеризуются низким уровнем ненасыщенных жирных кислот и повышенным содержанием холестерина, что делает мембраны опухолевых клеток ригидными. Опухоли РШМ на 30-е сутки развития, видимо, следует отнести к установившимся. ФСЛИ в использованных дозах не изменяет в клетках опухоли уровня МДА и приводит к снижению активности ферментов АОС, что, в свою очередь, также может быть интерпретировано, как окислительный стресс.

Заключение

Результаты изучения влияния различных доз ФСЛИ на неоплазму при экспериментальном РШМ позволяют предполагать

развитие в клетках оксидативного стресса, наиболее выраженного на 20-е сутки роста опухоли, при средней дозе ФСЛИ 2,4 Дж/см².

Работа поддержана грантом ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.».

Список литературы

1. Антонеева И.И. Уровень перекисного окисления липидов и ферментативное звено антиоксидантной системы плазмы крови, эритроцитов и опухолевой ткани при раке яичников // Вестник новых медицинских технологий. – 2005. – №2. – С. 13–14.
2. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте / Е.Б. Бурлакова [и др.]. – М.: Наука, 1975. – 211 с.
3. 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, № 3. – С. 192–214.
4. Корси Л.В. Лазерный способ фотохимической деструкции опухолей без экзогенных сенсibilizаторов / Л.В. Корси, В.Г. Соколов // Лазерно-оптические системы и технологии» ФГУП «НПО Астрофизика: сб. статей. – М., 2009. – С. 101–106.
5. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания / Е.Б. Менщикова [и др.]. – Новосибирск, 2008. – 175 с.

6. Beckman K.B. The free radical theory of aging matures / K.B. Beckman, B.N. Ames // Phys. Rev. – 1998. – Vol. 78. – P. 548–581.

7. Berlett B.S. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress / B.S. Berlett, E.R. Stadtman // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272. – P. 20313–20316.

8. Dorward A. Mitochondrial contributions to cancer cell physiology: Redox balance, cell cycle, and drug resistance / A. Dorward, S. Sweet, R. Moorehead // J. Bioenerg. Biomembr. – 1997. – Vol. 29. – P. 385–392.

9. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function // Physiol. Rev. – 2002. – Vol. 82. – P. 47–95.

10. Yaleotti T. Oxyradical sources, scavenger systems and membrane damage in cancer cells / T. Yaleotti, L. Masotti, S. Borrello // Oxygen radicals: Systemic Events and Disease Processes. – Baser; Karger. – 1990. – P. 129–148.

Рецензенты:

Антонеева И.И., д.м.н., зав. гинекологическим отделением ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер», г. Ульяновск;

Каталымов Л.Л., д.б.н., профессор кафедры анатомии, физиологии и гигиены человека ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова», г. Ульяновск.

Работа поступила в редакцию 23.11.2011.