

УДК 57.085-57.043:577.3474.2

ВЛИЯНИЕ ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ С ДЛИНОЙ ВОЛНЫ 1550 НМ НА КРОВЬ И КОЖУ МЫШЕЙ

Генинг Т.П., Воронова О.С., Абакумова Т.В., Долгова Д.Р., Золотовский И.О.

ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет»,

Ульяновск, e-mail: naum-53@yandex.ru

В эксперименте на белых мышах исследовали влияние фемтосекундного лазерного излучения с пиковой интенсивностью 6 кВт в дозах 0,6 и 1,2 Дж/см² на кровь и кожу в зоне облучения. Оценивались показатели системы «перекисное окисление липидов – антиоксиданты» в эритроцитах и плазме крови животных до и после воздействия фемтосекундного лазерного излучения, а также гистологические препараты кожи мышей. Установлено повышение уровня функционирования системы «перекисное окисление липидов – антиоксиданты» в эритроцитах после воздействия фемтосекундным лазером в используемых дозах и возможность возникновения оксидативного стресса в плазме крови после облучения в дозе 0,6 Дж/см². Отмечено триггерное воздействие фемтосекундного лазерного излучения на изученные показатели крови и дозозависимое утолщение эпидермиса, разрастание плотной фиброзной ткани, появление гиперкератоза и лимфоцитарной инфильтрации в зоне облучения.

Ключевые слова: фемтосекундное лазерное излучение, перекисное окисление липидов, антиоксиданты

EFFECT OF FEMTOSECOND LASER IRRADIATION WITH A WAVELENGTH OF 1550 NM ON THE BLOOD AND SKIN OF MICE

Gening T.P., Voronova O.S., Abakumova T.V., Dolgova D.R., Zolotovskiy I.O.

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

The effect of femtosecond laser irradiation with a peak intensity of 6 kW at doses of 0,6 and 1,2 J/cm² on the blood and skin in the area of exposure was examined in an experiment on white mice. The performance of the «lipid peroxidation – antioxidants» in the red blood cells and plasma of animals blood before and after exposure to femtosecond laser pulses, as well as histology of the skin of mice was evaluated. We have found increased levels of the system «lipid peroxidation – antioxidants» in red blood cells after exposure to femtosecond laser at both doses and the possibility of oxidative stress in the blood plasma after exposure to a dose of 0,6 J/cm². Trigger effect of femtosecond laser radiation on the studied blood parameters and dose-dependent thickening of the epidermis, the appearance of hyperkeratosis and lymphocytic infiltration, proliferation of dense fibrous tissue was observed.

Keywords: femtosecond laser radiation, lipid peroxidation, antioxidants

В настоящее время лазерные медицинские технологии широко используются в экспериментальной и клинической медицине. При этом в зависимости от конечной цели применяют лазерное излучение различной интенсивности. Биологические эффекты воздействия лазерного излучения на организм определяются механизмами взаимодействия излучения с тканями и зависят от длины волны излучения, длительности импульса (воздействия), частоты следования импульсов, площади облучаемого участка, а также от биологических и физико-химических особенностей облучаемых тканей и органов [2]. Биологические эффекты, возникающие при воздействии лазерного излучения на организм, условно подразделяют на 2 группы:

а) первичные эффекты – органические изменения, возникающие непосредственно в облучаемых живых тканях (прямое облучение);

б) вторичные эффекты – неспецифические изменения, возникающие в организме в ответ на облучение (длительное облучение диффузно отражённым излучением).

Клинические наблюдения, равно как и экспериментальные данные, полученные

на изолированных клетках и лабораторных животных, сами по себе не позволяют ответить на вопрос о первичных молекулярных механизмах действия лазерного облучения на биологические структуры, но дают возможность сформулировать рабочую гипотезу о возможных первичных механизмах. Общепризнанным условием эффективного применения лазеров в терапии различных болезней является знание ключевой фото-молекулярной реакции, запускающей терапевтический процесс. Одной из рабочих гипотез считается гипотеза прямого возбуждения эндогенного кислорода в тканях лазерным излучением инфракрасного спектра, а именно на длине волны 1270 нм [3, 4]. Доказано, что инфракрасное лазерное излучение может переводить растворенный в тканях молекулярный кислород в синглетное состояние, такой эффект назвали светоокислородным [3]. Синглетный кислород обладает очень высокой химической активностью [3]: он может участвовать в цепных свободно-радикальных реакциях, окислять аминокислоты в белках, гуанин в ДНК, инициировать перекисное окисление липидов [8]. После выяснения первичного механизма – фотовозбужде-

ния молекул кислорода в биожидкостях организма (крови) в состоянии синглетного молекулярного кислорода – возникает ряд принципиальных вопросов по физике происходящих явлений [4]. Одновременно неизвестны механизмы последующей реализации процессов регенерации, апоптоза или некроза и их зависимость от биологического портрета облучаемых тканей и дозы облучения. Полагают, что усиление светокислородного эффекта возможно при увеличении интенсивности лазерного излучения (ЛИ). Последнее может быть за счет увеличения импульсной мощности при сохранении средней мощности [7]. Основными преимуществами фемтосекундных лазеров является малая длительность импульса, высокая пиковая (кВт) и малая средняя (мВт) мощности, что позволяет предполагать отсутствие выраженных термических эффектов. Однако на сегодня не изучен локальный и системный механизм действия фемтосекундного лазерного излучения на организм млекопитающих *in vivo*.

Целью нашего исследования было изучение влияния фемтосекундного лазерного излучения (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 в разных дозах.

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) [5].

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 результатов 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 при плотности потока энергии 0,6 Дж/см² сменяется снижением при увеличении плотности потока энергии вдвое (рис. 1).

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).

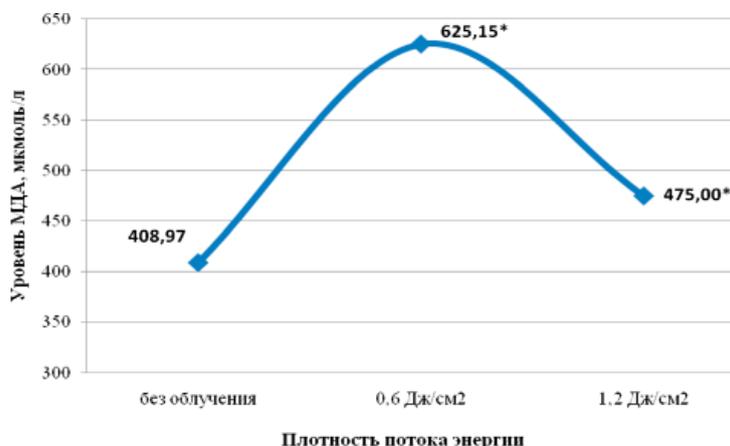


Рис. 1. Уровень малонового диальдегида (мкмоль/л) в эритроцитах интактных мышей после воздействия ФСЛИ.

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

Таблица 1

Активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах мышей после воздействия разных доз ФСЛИ

| Показатель | Плотность потока энергии ФСЛИ | | |
|-----------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------|
| | Без облучения | 0,6 Дж/см ² | 1,2 Дж/см ² |
| 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* |

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

В плазме крови значимое изменения – снижение уровня МДА и возрастание активности каталазы – имело место только при плотности потока облучения 0,6 Дж/см² (табл. 2).

Таблица 2

Влияние различных доз ФСЛИ на показатели системы ПОЛ-АО плазмы крови интактных мышей

| Показатель | Плотность потока энергии ФСЛИ | | |
|-----------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------|
| | Без облучения | 0,6 Дж/см ² | 1,2 Дж/см ² |
| МДА, мкмоль/л | 9,4 ± 2,22 | 5,64 ± 0,71* | 7,95 ± 1,34 |
| 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, $p \leq 0,05$.

Результаты биохимического исследования позволяют сделать вывод о том, что система ПОЛ-АО в эритроцитах мышей после облучения ФС лазером в используемых дозах переходит на более высокий уровень функционирования. Разнонаправленные изменения параметров системы ПОЛ-АО в плазме крови при ФСЛИ с плотностью потока энергии 0,6 Дж/см² позволяют предполагать возможность возникновения оксидативного стресса.

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

В контрольных образцах эпидермис и дерма обычного гистологического строения. В подкожно-жировой клетчатке – слабая лимфоидно-лейкоцитарная инфильтрация с преобладанием нейтрофильных лейкоцитов (рис. 2). Облучение при плотности потока энергии 0,6 Дж/см² приводит к утолщению эпидермиса и появлению гиперкератоза по поверхности. Дерма и подкожно-жировая клетчатка при этом обычного гистологического строения, без воспалительной инфильтрации (рис. 3). Облучение при плотности потока энергии 1,2 Дж/см² приводит к утолщению эпи-

дермиса и появлению гиперкератоза на поверхности. Дерма при этом умеренно утолщена за счёт разрастания плотной фиброзной ткани (очаги фиброзирования дермы) с сильной лимфоцитарной инфильтрацией (рис. 4).

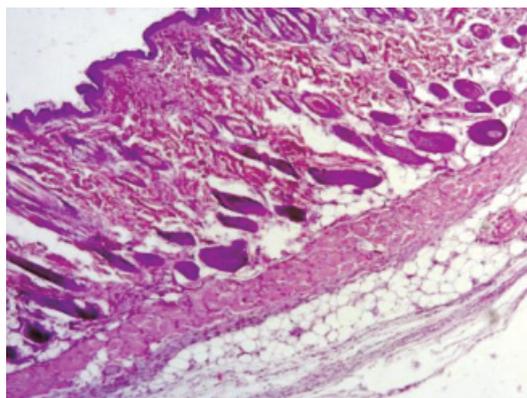


Рис. 2 Контроль, общий план. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение ×20

Таким образом, на основании результатов, полученных в данном исследовании, и результатов, полученных нами ранее [9], можно сделать вывод о том, что фемтосекундное лазерное излучение может оказывать триггерное (пусковое) воздействие на

биохимические показатели крови, при этом вызывая дозозависимые изменения в гистологических структурах кожи облучаемых животных.

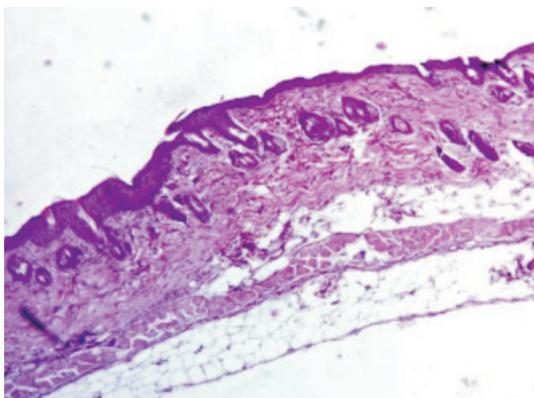


Рис. 3. После облучения при плотности потока энергии 0,6 Дж/см². Окраска гематоксилин-эозином, увеличение ×20

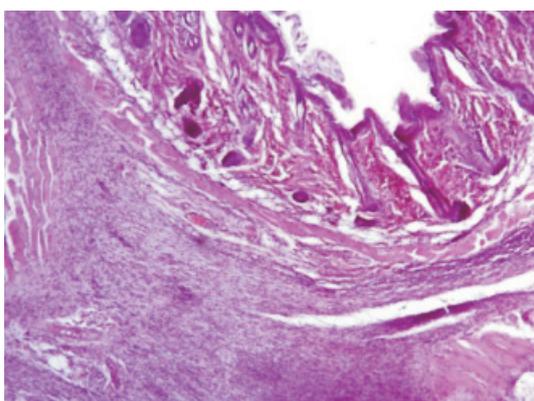


Рис. 4. После облучения при плотности потока энергии 1,2 Дж/см². Окраска гематоксилин-эозином, увеличение ×20

Работа поддержана Государственным заданием Минобрнауки РФ.

Список литературы

1. Андреева Л.И. 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.
2. Владимиров Ю.А. Три гипотезы о механизме действия лазерного облучения на клетки и организм человека // Эфферентная медицина. – М.: ИБМХ РАМН, 1994 – С. 51–67.
3. Захаров С.Д. Светокислородный эффект – физический механизм активации квазимonoхроматическим из-

лучением / С.Д. Захаров, А.В. Иванов. – Препринт. М., 2006. – 50 с.

4. Иванов А.В. Прямое возбуждение фотонами эндогенного молекулярного кислорода – фотофизический акт терапевтического действия лазерного излучения // Лазерная медицина. – 2006. – № 1. – С. 4–9.

5. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии и диагностика: Справочник: в 2 т. – СПб.: Интермедика, 1999. – С. 27–28.

6. 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.

7. He H. 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. – Vol. 95.

8. Schweitzer C. Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen, / C. Schweitzer, R. Schmidt // Chem. Rev. – 2003. – Vol. 103. – P. 1685–1757.

9. Voronova O. 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.

References

1. Andreeva L.I., Kozhemyakin L.A., Kishkun A.A. *Laboratornoe delo*, 1988, no. 11, pp. 41–43.
2. Vladimirov YU.A. *Efferentnaya meditsina*. Moscow, IBMX RAMN, 1994, pp. 51–67.
3. Zakharov S.D., Ivanov A.V. *Svetokislородnyy effect fizicheskiy mekhanizm aktivatsii k vazimonokhromaticheskim izlucheniem*. Moscow, 2006, 50 p.
4. Ivanov A.V. *Lazernaya meditsina*, 2006. no.1, pp. 4–9.
5. Karpischenko A.I. *Meditsinskie laboratornye tekhnologii i diagnostika: Spravochnik 2tomakh*. Saint Petersburg, Intermedika, 1999. pp. 27–28.
6. Korsi L.V., Sokolov V.G. *Lazerno-opticheskiyesistemy i tekhnologii*. Moscow, FGUP NPO Astrofizika, 2009, pp. 101–106.
7. He H., Chan K.T., Kong S.K. *Appl. Phys. Lett.*, 2009, Vol. 95.
8. Schweitzer C., Schweitzer C., Schmidt R. *Chem. Rev.*, 2003., Vol. 103. pp. 1685–1757.
9. Voronova O., Sysoliatin A., Zolotovskii I. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2012, Vol. 9, p. 6.

Рецензенты:

Каталымов Л.Л., д.б.н., профессор кафедры «Анатомия, физиология и гигиена человека», ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова», г. Ульяновск;

Любин Н.А., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой морфологии, физиологии и фармакологии, ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия», г. Ульяновск.

Работа поступила в редакцию 08.05.2013.