УДК 535.2–577.344.3

**А.С. Курков^{1,2}, О.С. Воронова¹, Т.П. Генинг¹, Д.Р. Долгова¹,
А.Б. Песков¹, Т.В. Абакумова¹, И.О. Золотовский¹**

¹ Ульяновский государственный университет, Ульяновск, Россия

² Институт общей физики РАН, Москва, Россия

ВЛИЯНИЕ ПИКОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ IN VIVO НА ЭРИТРОЦИТЫ И КОЖУ МЫШЕЙ

Установлены существенные изменения структуры кожи после облучения различной интенсивности пикосекундным лазерным излучением на длине волны 1560 нм и пиковой мощностью около 4 кВт, в том числе такие изменения, как утолщение эпидермиса, увеличение функциональной активности ядер, возникновение инфильтрации разной степени в зависимости от интенсивности облучения. Установлена активность антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы увеличивается относительно контроля после воздействия лазерного излучения в обоих режимах. Зафиксированы признаки оксидативного стресса.

Ключевые слова: пикосекундное лазерное излучение (ПСЛИ), перекисное окисление липидов, оксидативный стресс, эпидермис, дерма.

**A.S. Kurkov^{1,2}, O.S. Voronova¹, T.P. Gening¹, D.R. Dolgova¹,
A.B. Peskov¹, T.V. Abakumova¹, I.O. Zolotovskii¹**

¹ Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

² Institute of General Physics RAS, Moscow, Russian Federation

EFFECT OF PICOSECOND LASER IRRADIATION IN VIVO ON RED BLOOD CELLS AND SKIN OF MICE

Substantial changes are found in the structure of the skin after irradiation by varying – intensity picosecond laser radiation at a wavelength of 1,560 nm and a peak power of about 4 kW: including such changes as a thickening of the epidermis, the increase of the functional activity of the nuclei, varying degrees of infiltration of occurrence depending on the intensity of exposure. It is established the activity of antioxidant enzymes: superoxide dismutase is increased relative to controls after exposure to laser light in both modes. Signs of oxidative stress are observed.

Keywords: picosecond laser radiation, lipid peroxidation, oxidative stress, the epidermis, the dermis.

Введение

Лазерное излучение сегодня широко используется в медицинской практике. С терапевтическими целями используется низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ). Однако о возможности использования НИЛИ в онкологии не существует единой точки зрения. Использовать низкоинтенсивное лазерное излучение в этой области пытаются в сочетании с экзогенным фотосенсибилизатором [1, 2], но в силу ряда объективных причин метод остается уделом единичных специализированных клиник.

Одним из механизмов воздействия лазерного излучения на биологические ткани является фоторазрушение – совокупность механических эффектов, которые обычно сопровождают процесс образования плазмы при более высоких плотностях мощности, таких как образование пузырей и генерация ударной волны [3]. Если пробой происходит внутри мягкой ткани или жидкости, то может иметь место образование ударных волн, играющих основополагающую роль в перфорировании мембраны. Они возникают, если длительность лазерного импульса меньше характерного времени распространения волн напряжения за пределы фокального объема и составляет (для ИК-диапазона) менее 100 пс [4].

Использованный пикосекундный лазерный комплекс с малой, средней и большой пиковой мощностью, возможно, реализует механизм фоторазрушения биологических объектов. Представляется, что именно данный механизм лазерного воздействия на ткани (не сопряженный с их термическим перегревом и разрушением) может найти наиболее широкое применение в клинической практике. Однако для клинического использования пикосекундных лазерных комплексов необходимы исследования по изучению механизма их воздействия.

1. Объект и методы исследования

Объектом исследования послужили белые беспородные половозрелые мыши, которые были разделены на две экспериментальные группы. Животные подвергались пикосекундному лазерному излучению (ПСЛИ) в дозе $3,8 \text{ Дж/см}^2$ в разных режимах.

В качестве источника излучения использовался пикосекундный волоконный (эрбиевый) лазер с рабочей длиной волны $\lambda = 1560 \text{ нм}$,

длительностью импульсов $1,4 \cdot 10^{-12}$ с, пиковой мощностью $3,72 \cdot 10^3$ Вт и средней выходной мощностью $20 \cdot 10^{-3}$ Вт, являющийся совместной разработкой Института общей физики РАН и Ульяновского государственного университета.

Для облучения мышей помещали в специальный фиксатор с отверстием таким образом, чтобы участок облучения диаметром 1 см находился на уровне отверстия в районе боковой поверхности грудной клетки. Перед облучением кожу выбривали от шерсти. Схема опыта представлена в табл. 1.

Таблица 1

Схема эксперимента

Характеристики	Опыт I ($n = 12$)	Опыт II ($n = 12$)
Кратность облучения	1	4
Интенсивность облучения, Вт/см ²	$25,5 \cdot 10^{-3}$	$6,37 \cdot 10^{-3}$
Суммарная доза облучения, Дж/см ²	3,8	3,8

Мышей в первой экспериментальной группе облучали однократно, во второй – четырехкратно. Однократное облучение проводилось в течение 5 мин на расстоянии 5 см. При четырехкратном воздействии мыши подвергались лазерному облучению в течение 5 мин на расстоянии 10 см ежедневно. Суммарная доза в обоих случаях составила $3,8$ Дж/см² и была выбрана на основании полученных нами ранее результатов. Было установлено, что фемтосекундное лазерное облучение в дозах аналогичного порядка не влияет на параметры редокс-зависимых процессов в эритроцитах доноров [5].

Эксперимент проводился в соответствии с правилами гуманного обращения с животными, которые регламентированы положениями Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации от 1964 года, дополненной в 1975, 1983 и 1989 годах.

Морфологические методы исследования. Для гистологического исследования брали аутопнат кожи мышей диаметром 1 см в участке, подвергнутому лазерному воздействию. Фиксацию материала проводили в 10%-м нейтральном формалине. Серийные срезы окрашивались гематоксилин-эозином. Морфометрия структур кожи проводилась с помощью видео-тест-системы, включающей микроскоп Motis, цифровую видеокамеру JVC (Япония) и компьютерную программу денси-

тофотометрии «Мекос-Ц1» (Россия). Полученные морфометрические данные подвергали статистической обработке по Т-тесту для несвязанных случаев. Достоверность различия средних арифметических (p) с помощью t -критерия Стьюдента при 5%-м уровне значимости [6].

Биохимические методы исследования. В гемолизате эритроцитов (1:10) определяли уровень продуктов перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов (ДК), кетодиенов (КД), сопряженных триенов (СТ), оснований Шиффа (ОШ), малонового диальдегида (МДА)) и активность ферментативного звена антиоксидантной системы: каталазы, глутатион-S-трансферазы (ГТ), супероксиддисмутазы (СОД). Уровень ДК, КД, СТ и ОШ определяли спектрофотометрически по методике И.А. Волчегорского (2000) в гептан-изопропанольных экстрактах. Содержание этих продуктов рассчитывали по отношению оптических плотностей изопропанольной и гептановой фаз $E_{232/220}$ (ДК), $E_{278/220}$ (КД и СТ), E_{400}/E_{220} (ОШ) и представляли в единицах индекса окисления (е.и.о.). Уровень МДА (мкмоль/л) определяли в тесте с тиобарбитуровой кислотой по методу Л.И. Андреевой. Активность СОД (в у.е.) определяли по методу М. Nishikimi в модификации Е.Е. Дубининой, каталазы (ммоль/мин/л) – по А.И. Карпищенко, ГТ (ммоль/мин/л) – по W.H. Habig. Рассчитывали коэффициент активности «перекисное окисление липидов / антиоксидантная защита» (ПОЛ/АОЗ), который представляется как отношение $E_{232} + E_{278} + E_{400}$ к $E_{\text{каталазы}} + E_{\text{СОД}}$. E_{232} – концентрация ДК, E_{278} – концентрация КД и СТ, E_{400} – концентрация ОШ, $E_{\text{каталазы}}$ – активность каталазы ($E_{\text{холостой пробы}}$ к $E_{\text{опытной пробы}}$), $E_{\text{СОД}}$ – активность СОД в условных единицах.

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

2. Результаты исследования

При изучении гистологических препаратов кожи оценивалось состояние всех слоев эпидермиса, дермы, придатков кожи, сосудов дермы и подкожной жировой клетчатки. Выяснено, что облучение в обоих режимах вызывает нарушения гистоархитектоники кожи. Ростковый слой эпидермиса животных первой и второй экспериментальных групп был увеличен за счет увеличения объема клеток данного слоя (табл. 2).

Таблица 2

Морфометрические показатели кожи мышей после воздействия ПСЛИ

Но- мер п/п	Характеристики	Контроль	Опыт I	Опыт II
1	Толщина эпителия	$10,953 \pm 2,054$	$12,408 \pm 2,882^*$	$12,788 \pm 2,851^*$
2	Площадь ядер шиповатого слоя	$23,651 \pm 5,724$	$29,447 \pm 5,725^*$	$29,741 \pm 7,484^*$
3	Площадь ядер базального слоя	$12,470 \pm 3,214$	$17,945 \pm 2,873^*$	$11,581 \pm 4,168^{\blacksquare}$
4	Площадь ядер эпителиоцитов сальных желез	$21,966 \pm 5,133$	$27,596 \pm 5,438^*$	$25,479 \pm 7,319^{\blacksquare}$
5	Площадь цитоплазмы эпителиоцитов сальных желез	$183,409 \pm 61,200$	$171,359 \pm 79,320$	$169,544 \pm 0,109$

Примечание: * – данные, статистически значимо отличающиеся от контроля, $p \leq 0,05$; $\blacksquare$ – данные, статистически значимо отличающиеся от данных опыта I, $p \leq 0,05$.

При оценке толщины эпителия установлено, что показатели имеют правильное распределение. При этом диаграммы данных опыта I и опыта II практически эквивалентны, их основное общее отличие от диаграммы показателей контрольной группы – наличие правого «хвоста» (около 5 % наблюдений, превышающих значение 16,5; именно они тянут медиану вправо, но благодаря этим «хвостам» различие показателей с контролем в обеих опытных группах достоверны) (см. табл. 2).

Ядра кератиноцитов базального и шиповатого слоев более светлые и крупные, что указывает на их активную функциональную деятельность. Кератиноциты шиповатого слоя после обоих режимов облучения имеют округлые светлые ядра с заметными ядрышками, площадь ядер достоверно увеличена и в опыте I, и в опыте II относительно контроля (см. табл. 2). При этом в первом режиме облучения с интенсивностью $25,5 \cdot 10^{-3}$ Вт/см² наблюдаются отдельные кератиноциты в состоянии легкой степени вакуолизации. Данное явление является обратимым. В целом эпидерма без патологических изменений. Площадь ядер кератиноцитов базального слоя достоверно увеличена относительно контроля только после облучения с большей интенсивностью (опыт I).

В сосочковом и сетчатом слоях дермы животных первой и второй опытных групп изменений не обнаружено: коллагеновые волокна окрашены равномерно, их набухания и гомогенизации не наблюдается. Сосуды сетчатого слоя дермы не расширены и не переполнены кровью, что говорит об отсутствии патологических процессов в дерме.

Облучение в обоих режимах вызывает достоверное увеличение площади ядер эпителиоцитов сальных желез, при этом площадь цитоплазмы значимо не изменяется (см. табл. 2).

Наблюдаются изменения в гиподерме после облучения в одноразовом режиме с интенсивностью $25,5 \cdot 10^{-3}$ Вт/см²: в некоторых участках встречается выраженная периваскулярная лимфоидно-лейкоцитарная инфильтрация (рис. 1, 2). В прилегающей к гиподерме и кожной мышце соединительной ткани наблюдается скопление макрофагов и плазмоцитов.

Рис. 1. Микрофотография тонкой кожи мыши контрольной группы, ув. 10×10, гематоксилин-эозин

Рис. 2. Микрофотография тонкой кожи мыши 1-й опытной группы, в гиподерме – периваскулярная инфильтрация, ув. 10×10, гематоксилин-эозин

При облучении в четырехразовом режиме с интенсивностью $6,37 \cdot 10^{-3}$ Вт/см² в междольковой соединительной ткани подкожной жировой клетчатки и в эндомизии, перимизии выявляется умеренная диффузная лимфоидно-лейкоцитарная инфильтрация с преобладанием зернистых лейкоцитов и со скоплением небольших групп макрофагов и плазмоцитов (рис. 1, 3).

Рис. 3. Микрофотография тонкой кожи мыши 2-й опытной группы, в гиподерме слабая диффузная инфильтрация, ув. 10×10, гематоксилин-эозин

В результате проведенных биохимических исследований установлено, что уровень инициальных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) изопропанольной фазы, включающих ДК, в эритроцитах увеличивается при облучении в обоих использованных режимах, но более значительно при одноразовом облучении с большей интенсивностью ($p \leq 0,05$) (рис. 4). Подъем уровня ДК может свидетельствовать об инициации процессов ПОЛ.

Уровень первичных продуктов ПОЛ гептановой фазы значимо снижен относительно контроля в опыте I при одноразовом облучении в дозе 3,8 Дж/см² ($p \leq 0,05$) и в опыте II, когда облучение проводилось при меньшей интенсивности ($p \leq 0,05$) (см. рис. 4).

Рис. 4. Уровень ДК изопропанольной и гептановой фаз в эритроцитах после облучения (количество ДК выражено в единицах индекса окисления E_{232}/E_{220})

Уровень КД и СТ в изопропанольной и гептановой фазах изменяется аналогично изменению уровня ДК в эритроцитах (рис. 5). Увеличивается уровень КД и СТ в изопропанольной фазе после воздействия лазерного излучения при снижении содержания этих продуктов в гептановой фазе. Причем изменения наиболее выражены при воздействии излучения большей интенсивности (см. рис. 5). Нами установлено повышение уровня шиффовых оснований – третичных продуктов ПОЛ – в гептановой и изопропанольной фазах после ПСЛИ в обоих режимах (табл. 3). Высокий индекс ОШ/ДК свидетельствует о накоплении конечных продуктов ПОЛ, их превалировании над первичными, т.е. завершенности процесса липопероксидации, выраженной активации процессов ПОЛ с накоплением повреждающих мембраны продуктов – ОШ [7], а следовательно, высоком риске разрушения мембранных структур.

Рис. 5. Уровень КД и СТ изопропанольной и гептановой фаз в эритроцитах после облучения (количество КД и СТ выражено в единицах индекса окисления E_{278}/E_{220})

Таблица 3

Содержание ОШ и индекс ОШ/ДК в гептановой и изопропанольной фазах в эритроцитах после воздействия лазерного излучения

Испытание	ОШ (400/220)		ОШ/ДК	ОШ/ДК
	Гепт.	Изопроп.	Гепт.	Изопроп.
Контроль	$0,040 \pm 0,009$	$0,307 \pm 0,038$	0,06	0,70
Опыт I	$0,096 \pm 0,032^*$	$0,501 \pm 0,079^*$	0,18	0,87
Опыт II	$0,068 \pm 0,012^*$	$0,325 \pm 0,049$	0,12	0,63

Примечание: количество ОШ и ДК выражено в единицах индекса окисления E_{400}/E_{220} ; * – данные, статистически значимо отличающиеся от данных контроля, $p < 0,05$.

С целью оценки антирадикальной системы защиты в эритроцитах определяли уровень активности ферментов СОД, каталазы и ГТ в эритроцитах. При оценке активности антиоксидантных ферментов в эритроцитах мы установили: уровень ГТ значимо не изменился под действием различных режимов лазерного излучения, при этом уменьшалась активность каталазы (табл. 4).

Таблица 4

Активность ферментов антиоксидантной системы в эритроцитах мышей после воздействия ПСЛИ

Ферменты	Контроль	Опыт I	Опыт II
ГТ (ммоль/мин/л)	$1,309 \pm 0,099$	$1,104 \pm 0,083$	$1,533 \pm 0,387$
Каталаза (ммоль/мин/л)	$944,32 \pm 97,93$	$611,37 \pm 66,26^*$	$711,82 \pm 71,52^*$
СОД (у.е.)	$0,478 \pm 0,050$	$0,922 \pm 0,064^*$	$0,684 \pm 0,063^*$

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

Активность СОД, фермента, являющегося важнейшим компонентом антиоксидантной защиты организма, увеличивается относительно контроля после воздействия лазерного излучения в обоих режимах. Причем при облучении более высокой интенсивности в одноразовом режиме, уровень СОД возрастает значимо больше (см. табл. 4).

Далее рассчитывали коэффициент активности перекисного окисления относительно антиоксидантной системы, который дает возможность оценить вероятность возникновения и выраженность оксидативного стресса в структурах эритроцитов [8]. Выявлена зависимость активности ПОЛ от режима облучения (табл. 5).

Таблица 5

Коэффициент активности ПОЛ/АОЗ в эритроцитах мышей после ПСЛИ

Испытание	Гептановая фаза	Изопропанольная фаза	Гептановая + изопропанольная фаза
Контроль	0,535	0,545	1,080
Опыт I	0,358*	0,610*	0,970
Опыт II	0,437*	0,567	1,005

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

Результаты эксперимента позволяют говорить о возможности возникновения оксидативного стресса в эритроцитах мышей после воздействия лазерного излучения высокой интенсивности в первом режиме.

3. Обсуждение результатов исследования

Результаты гистологического исследования позволяют предположить возможное повреждение кератина в кератиноцитах после воздействия пикосекундного лазерного излучения с интенсивностью $25,5 \cdot 10^{-3}$ Вт/см², о чем свидетельствует значимое увеличение ядер. Облучение большей интенсивности оказывает более жесткое воздействие на эпидермис, что проявляется в вакуолизации отдельных кератиноцитов, и на гиподерму, что проявляется в выраженной периваскулярной инфильтрации. Более щадящим является облучение с меньшей интенсивностью $6,37 \cdot 10^{-3}$ Вт/см², которое не вызывает патологических изменений в эпидермисе и дерме и обуславливает менее выраженную диффузную инфильтрацию в гиподерме.

На основании данных, полученных в эксперименте, можно сделать вывод о том, что после воздействия ПСЛИ (при интенсивностях $25,5 \cdot 10^{-3}$ и $6,37 \cdot 10^{-3}$ Вт/см²) перекисное окисление с участием неполярных липидов (гептановая фаза) менее интенсивное, чем ПОЛ

с участием фосфолипидов (изопропанольная фаза). Так как фосфолипиды являются одним из компонентов мембран эритроцитов, можно предположить, что мембраны эритроцитов после воздействия разных режимов пикосекундного лазерного излучения претерпевают структурно-функциональные изменения, связанные с усилением ПОЛ, что может приводить к усилению вязкоэластичных свойств мембран [9]. Пероксидные продукты окисления мембранных липидов в результате могут нарушать регулярную упаковку мембранного бислоя и вызывать образование дефектных зон в мембране. Глубина мембранных повреждений определяет конформационные перестройки активных центров мембранно-связанных ферментов, структуру и свойства рецепторных белков и такие функции эритроцитов, как связывание и транспортировку различных соединений, в том числе и лекарственных средств, поступающих в организм [10].

Заключение

Таким образом, ПСЛИ в используемых режимах, вероятно, влияет на гистологическую структуру кожи: облучение с интенсивностью $25,5 \cdot 10^{-3}$ Вт/см² вызывает незначительные изменения в эпидермисе и выраженные патологические изменения в гиподерме. Интенсивность облучения также оказывает влияние на редокс-статус эритроцитов, вызывая возникновение оксидативного стресса при увеличении интенсивности. При этом в большей степени влияет не доза, а интенсивность облучения. Наиболее подвержены изменениям после воздействия ПСЛИ фосфолипиды мембран эритроцитов.

Список литературы

1. Квантовая терапия в онкологии. Экспериментальные и клинические исследования / Л.А. Дурнов, А.Я. Грабовщинер, Л.И. Гусев [и др.]. – М.: МИЛТА-ПКП ГИТ, 2002. – 94 с.
2. Callin M.A., Parasca S.V. Photodynamic therapy in oncology // Journal of optoelectronics and advanced materials. – 2006. – № 8 (3). – P. 1173–1179.
3. Niemz M.H. Laser-tissue interactions: fundamentals and applications. – Berlin, 2003.
4. Quinto-Su P., Venugopalan V. Mechanisms of laser cellular microsurgery. Methods in cell biology. – 2007. – Vol. 82.

5. Генинг Т.П., Арсланова Д.Р., Абакумова Т.В. Морфофункциональное состояние эритроцитов периферической крови после воздействия фемтосекундного лазерного излучения // Современные технологии в медицине. – 2013. – № 5 (1). – С. 58–63.

6. Хафизьянова Р.Х. Математическая статистика в экспериментальной и клинической фармакологии. – Казань: Медицина, 2006. – 374 с.

7. Anand P., Patil V.M., Sharma V.K. Schiff bases: a review on biological insights // International Journal of Drug Design and Discovery. – 2012. – № 3 (3). – P. 851–868.

8. Способ диагностики степени повреждения мозга при ишемии мозга: пат. 2197739 Рос. Федерация / Н.С. Орлова, Э.Г. Волкова, Ф.Х. Камилов. № 2000126823/14; заявл. 25.10.2000; опубл. 27.01.2003.

9. Ройтберг Г.Е. Метаболический синдром. – М: МЕДпресс-Информ, 2007. – 224 с.

10. Добротина Н.А., Копытова Т.В., Щелчкова Н.А. Характеристика функционального состояния мембран эритроцитов при эндогенной интоксикации больных хроническими распространенными дерматозами // Фундаментальные исследования. – 2010. – № 2. – С. 39–43.

References

1. Durnov L.A., Grabovshchiner A.Ia., Gusev L.I. [et al.] Kvantovaya terapiia v onkologii. Eksperimental'nye i klinicheskie issledovaniia [Quantum therapy in oncology. Experimental and clinical studies]. Moscow, 2002. 94 p.

2. Callin M.A., Parasca S.V. Photodynamic therapy in oncology. *Journal of optoelectronics and advanced materials*, 2006, no. 8 (3), pp. 1173–1179.

3. Niemz M. H. Laser-tissue interactions: fundamentals and applications. Berlin, 2003.

4. Quinto-Su P., Venugopalan V. Mechanisms of laser cellular microsurgery. *Methods in Cell Biology*, 2007, vol. 82.

5. Gening T.P., Arslanova D.R., Abakumova T.V. Morfofunktsional'noe sostoianie eritrotsitov perifericheskoi krovi posle vozdeistviia femtosekundnogo lazernogo izlucheniia [Morphofunctional state of red blood cells of peripheral blood after exposure to femtosecond laser pulses]. *Sovremennye tekhnologii v meditsine*, 2013, no. 5 (1), pp. 58–63.

6. Khafiz'ianova R.Kh. Matematicheskaiia statistika v eksperimental'noi i klinicheskoi farmakologii [Mathematical statistics in experimental and clinical pharmacology]. Kazan', 2006. 374 p.

7. Anand P., Patil V.M., Sharma V.K. Schiff bases: a review on biological insights. *International Journal of Drug Design and Discovery*, 2012, no. 3 (3), pp. 851-868.

8. Orlova N.S., Volkova E.G., Kamilov F.Kh. Sposob diagnostiki stepeni povrezhdeniia mozga pri ishemii mozga [The method for diagnosing the degree of brain damage in cerebral ischemia]. *Patent RF* no. 2197739, 2003.

9. Roitberg G.E. Metabolicheskii sindrom [Metabolic syndrome]. Moscow, 2007. 224 p.

10. Dobrotina N.A., Kopytova T.V., Shchelchkova N.A. Kharakteristika funktsional'nogo sostoianiia membran eritrotsitov pri endogennoi intoksikatsii bol'nykh khronicheskimi rasprostranennymi dermatozami [Characteristics of the functional state of erythrocyte membranes in patients with chronic endogenous intoxication common dermatoses]. *Fundamental'nye issledovaniia*, 2010, no. 2. pp. 39-43.

Получено 15.12.2015