

УДК 616.31-039.57

**Т.П. Генинг¹, О.С. Воронова¹, Д.Р. Долгова¹, Т.В. Абакумова¹,
Л.В. Полуднякова¹, А.С. Курков^{1, 2, 3, 4}, И.О. Золотовский¹**

¹ Ульяновский государственный университет, Ульяновск, Россия

² Институт общей физики РАН им. А.М. Прохорова, Москва, Россия

³ Лаборатория фотоники Пермского научного центра УрО РАН, Пермь, Россия

⁴ Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

ВЛИЯНИЕ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ДЛИНЕ ВОЛНЫ 1265 НМ НА РЕДОКС-ЗАВИСИМЫЕ ПРОЦЕССЫ В ОРГАНИЗМЕ-ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕ

Исследуется влияние непрерывного лазерного излучения на длине волны 1265 нм на редокс-зависимые процессы в организме-опухоленосителе с привитым раком шейки матки РШМ-5. Рассматривается возможность использования указанного диапазона длин волн для фотодинамической терапии на основе светоокислородного эффекта. Вместе с тем проанализирована возможность развития побочных эффектов, в частности лазериндуцированного канцерогенеза, под воздействием лазерного излучения на соответствующей длине волны.

Ключевые слова: ВКР-лазер, оксидативный стресс, редокс-зависимые процессы, рак шейки матки.

**T.P. Gening¹, O.S. Voronova¹, D.R. Dolgova¹, T.V. Abakumova¹,
L.V. Poludniakova¹, A.S. Kurkov^{1, 2, 3, 4}, I.O. Zolotovskii¹**

¹ Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

² A.M. Prokhorov Institute of General Physics of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation,

³ Photonics Laboratory of Perm Scientific Centre of Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation,

⁴ Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russian Federation

THE EFFECT OF LASER RADIATION AT 1265 NM ON REDOX-DEPENDENT PROCESSES IN TUMOR-BEARING ORGANISMS

We study the effect provided by a quasi-continuous wave laser operating at the wavelength of 1265 nm on redox-dependent processes in tumor-bearing organism implanted with cervical cancer-5 (CC5). The laser wavelength is eligible for potential applications in photodynamic therapy based on light-oxygen effect. Also, we analyze possible side effects, in particular, laser-induced carcinogenesis.

Keywords: Raman laser, oxidative stress, redox-dependent processes, cervical cancer.

1. Введение

Высокоинтенсивное лазерное излучение используется в хирургии для нанесения поверхностных и глубоких разрезов, испарения поверхностных дефектов кожи, коагуляции и карбонизации тканей, их стерилизации. В ряде работ показана перспективность использования высокоинтенсивного лазерного излучения вынужденного комбинационного рассеивания (ВКР) для лечения онкологических заболеваний [1–3]. В течение нескольких лет активно анализируется идея, согласно которой инфракрасный свет инициирует фотохимические реакции, напрямую возбуждая молекулы кислорода в биологических системах [4–10]. Тем самым происходит фотогенерация синглетного кислорода из растворенного в клетках молекулярного кислорода. Вступая в реакцию с биомолекулами, он может участвовать в цепных свободнорадикальных реакциях, вызывать окисление белковых молекул, инициировать процессы перекисного окисления липидов. Результатом такого воздействия может стать гибель клеток путем некроза или апоптоза.

Мощным источником излучения, способным эффективно работать в этой области, может служить ВКР-лазер с накачкой от иттербиевого волоконного лазера [11]. В работах [2, 3] с использованием перестраиваемого ВКР-лазера на примере органических жидкостей и клеточных культур показано, что максимальная генерация синглетного кислорода достигается при облучении на длине волны 1264–1270 нм. Линия поглощения O_2 в этой области спектра наиболее активна ввиду практически полного отсутствия поглощения конкурирующими хромофорами. При этом ширина спектра действия по полувысоте составляет 15–20 нм. В работе [12] приведены результаты клинического применения ВКР-лазера с длиной волны излучения 1262 нм, которые показали исключительную перспективность использования таких излучателей для лечения онкологических заболеваний. В настоящей работе оценена возможность инициировать оксидативный стресс в опухолевой ткани рака шейки матки с помощью непрерывного лазерного излучения на длине волны 1265 нм. Вместе с тем проведена оценка влияния квазинепрерывного лазерного излучения с рабочей длиной волны 1265 нм на редокс-зависимые процессы в организме-опухоленосителе.

2. Материал и методы исследования

Исследование проводили на белых беспородных мышах с экспериментальным раком шейки матки (РШМ-5, опухолевый штамм из НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН) (рис. 1).



Рис. 1. Мышь с опухолью РШМ-5 на 30-е сутки после прививки опухоли

В качестве источника излучения применялся ВКР-лазер с использованием двукратного рамановского излучения иттербиевого волоконного лазера с длиной волны 1125 мкм. В качестве среды преобразователя применялось стандартное телекоммуникационное волокно. Максимальная непрерывная выходная мощность используемого излучения составила около 4 Вт на длине волны (1265 ± 3) нм. Соответствующий спектр излучения представлен на рис. 2.

Плотность энергии лазерного излучения, поглощаемого биотканью (\mathcal{E} , Дж/см²), с учетом большей (по сравнению с глубиной проникновения лазерного излучения, составляющей на длине 1265 нм менее 1,5 мм) толщины облучаемой биоткани рассчитывалась из простейшего соотношения: $\mathcal{E} = Pt/S$, где P – средняя мощность излучения, Вт; t – время облучения, с; S – площадь лазерного пятна на биоткани, см². При облучении в режиме 10 мин доза высокоинтенсивного излучения составляла 0,1 Дж/см², а при двухминутном облучении – 0,02 кДж/см²;

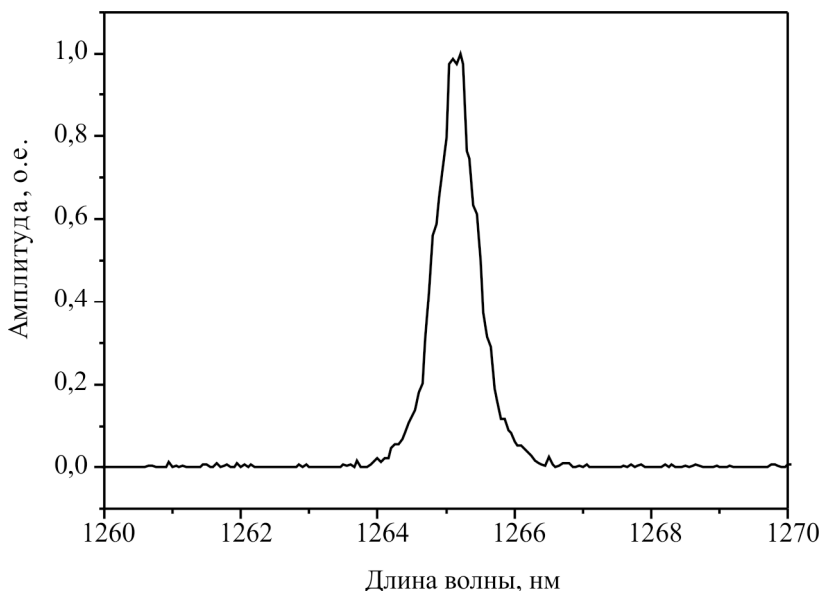


Рис. 2. Спектр излучения ВКР-лазера

таким образом, суммарная доза 10 сеансов в первом случае составила 1 кДж/см^2 , а во втором – $0,2 \text{ кДж/см}^2$.

В рамках проведенного эксперимента оценивалась интенсивность процессов ПОЛ в эритроцитах и плазме крови животных с РШМ-5 и интактных животных как до, так и после воздействия лазерного излучения на длине волны, соответствующей резонансному поглощению кислорода – 1265 нм по содержанию вторичного продукта ПОЛ малонового диальдегида (МДА). Активность ферментативного звена антиоксидантной системы (АОС) оценивали по уровню супероксиддисмутазы (СОД) каталазы, глутатионредуктазы (ГР) и глутатион-S-трансферазы (ГТ). Определение белка проводили по методу Брэдфорда [13, 14].

Статистическая значимость полученных результатов оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия между группами считали достоверными при $p \leq 0,05$ [15, 16].

3. Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенных исследований было установлено, что квазинепрерывное лазерное облучение на длине волны (1265 ± 3) нм здоровых мышей приводит к достоверному дозозависимому увеличению уровня МДА в эритроцитах при одновременном повышении активности ферментов АОС (табл. 1).

Таблица 1

Показатели системы ПОЛ – АО в эритроцитах мышей с экспериментальным РШМ после воздействия лазерного излучения в различных дозах

Показатель		МДА, мкмоль/л	СОД, у.е.	Каталаза, моль/с/л	ГР, ммоль/ мин/л	ГТ, ммоль/ мин/л
Здоровые N = 12	без облучения	219,65±7,57	1,46±0,10	17,13±0,64	0,43±0,03	0,14±0,02
	0,2 кДж/см ²	279,66±13,32*	2,04±0,12*	55,51±4,62*	0,53±0,04*	0,26±0,01*
	1 кДж/см ²	376,07±16,78*	1,64±0,18	74,32±18,56*	0,52±0,04*	0,24±0,03*
Мыши с РШМ-5 (30-е сутки) N = 12	без облучения	325,94±14,36	1,46±0,14	60,09±3,02	0,61±0,06	0,56±0,06
	0,2 Дж/см ²	260,86±18,22*	1,22±0,23	49,41±1,77*	0,72±0,09	0,18±0,01*
	1 кДж/см ²	318,5±27,91	1,25±0,12	65,93±6,04	0,78±0,09	0,70±0,08

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

У мышей с РШМ-5 на 30-е сутки после трансплантации опухоли облучение лазером ВКР в дозе 0,2 кДж/см² статистически значимо снижает уровень МДА, активность ГТ и каталазы. Уровень СОД и ГР колеблется в пределах коридора нормы. Снижение активности ферментов АОС может быть связано с уменьшением уровня МДА. При облучении в дозе 1 кДж/см² уровень МДА в эритроцитах мышей на 30-е сутки после трансплантации опухоли достоверно не изменяется, так же, как и активность ферментов АОС (см. табл. 1).

Показатели системы ПОЛ-АОС в плазме крови при облучении лазером с указанной длиной волны имеют разнонаправленную динамику (табл. 2). Наблюдается значительное повышение уровня МДА при одновременном повышении ГТ и неизменной активности остальных ферментов АОС у здоровых мышей при облучении в дозе 0,2 кДж/см². Доза в 1 кДж/см² вызывает уменьшение уровня МДА и снижение активности АОС в плазме крови здоровых мышей.

У мышей на 30-е сутки после трансплантации РШМ-5 отмечено значительное снижение уровня МДА после облучения ВКР-лазером в дозе 0,2 кДж/см² и его повышение при облучении в дозе 1 кДж/см². Динамика активности ферментов АОС при облучении в дозе 0,2 кДж/см² разнонаправленна. При облучении в дозе 1 кДж/см² снижается уровень каталазы при неизменной активности других ферментов АОС. Все вышеперечисленное позволяет говорить о развитии сильного оксидативно-

го стресса при поглощенной дозе лазерного излучения свыше 1 кДж/см² (см. табл. 2).

Таблица 2

Показатели системы ПОЛ – АО в плазме крови мышей с РШМ-5 после облучения лазером ВКР в дозах 0,2 и 1 кДж/см²

Экспериментальная группа		Показатель	МДА, мкмоль/л	Каталаза, ммоль/с/л	ГР, ммоль/мин/л	ГТ, ммоль/мин/л
Интактный контроль <i>n</i> = 16	без облучения		2,95±0,24	0,100±0,019	0,014±0,004	0,016±0,003
	0,2 кДж/см ²		3,82±0,20*	0,104±0,037	0,016±0,008	0,033±0,005*
	1 кДж/см ²		1,03±0,00*	0,040±0,007*	0,019±0,003	0,006±0,002*
Мыши с РШМ-5 (30-е сутки) <i>N</i> = 13	без облучения		6,23±0,31	0,172±0,061	0,005±0,001	0,038±0,003
	0,2 кДж/см ²		1,82±0,46*	0,070±0,040*	0,022±0,004*	0,036±0,004
	1 кДж/см ²		10,7±1,26*	0,099±0,060	0,005±0,001	0,035±0,002

* данные, статистически значимо отличающиеся от данных без облучения, *p* < 0,05.

4. Заключение

Таким образом, в рамках настоящей работы получены результаты, указывающие на сильное влияние непрерывного лазерного излучения на длине волны 1265 нм на мышей с привитым раком шейки матки. Показано, что влияние непрерывного лазерного излучения на соответствующей длине волны носит сильный дозозависимый характер. Излучение в дозе 0,2 кДж/см² увеличивало уровень МДА при одновременном повышении активности каталазы и ГТ в плазме крови и эритроцитах. Облучение в дозе 1 кДж/см² приводило к значимому увеличению уровня ПОЛ в эритроцитах при одновременном уменьшении в плазме крови интактных животных. Активность ферментов АОС при этом также увеличивалась в эритроцитах и снижалась в плазме крови. Полученная динамика параметров системы ПОЛ – АОС позволяет предполагать, что исследуемые источники лазерного излучения в организме интактных животных вызывают переход системы ПОЛ – АОС на более высокий уровень функционирования, не стимулируя при этом возникновение оксидативного стресса. Воздействие лазерного излучения на мышей с РШМ-5 зависит от дозы облучения. При облучении ВКР-лазером с рабочей длиной волны 1265 нм в дозе 0,2 кДж/см² на 30-е сутки после трансплантации опухоли отмечено понижение уровня МДА и активности АОС в эритроцитах, плазме крови. Увеличение дозы облучения до 1 кДж/см² на 30-е сутки после трансплантации опухоли

ли приводит к повышению уровня МДА при сниженной активности АОС в плазме крови, показатели в эритроцитах при этом значимо не изменяются. Показано, что при воздействии непрерывным лазерным облучением на длине волны 1265 нм в дозе 1 кДж/см² в организме животных-опухоленосителей возникает сильный оксидативный стресс. Представляется, что данный эффект может быть использован для лечения ряда онкозаболеваний, например рака шейки матки типа РШМ-5.

На основании проведенных экспериментов с высокой степенью точности можно сделать следующие выводы:

1. Лазерное облучение на длине волны 1265 нм инициирует развитие сильного оксидативного стресса солидной опухоли (на примере солидной опухоли рака шейки матки), степень выраженности которого зависит от дозы поглощенного излучения.

2. Кроме того, можно предположить, что узкополосное лазерное излучение на длине волны 1265 нм (в области резонансного поглощения молекулярного кислорода) может эффективно использоваться для разрушения солидных злокачественных опухолей, например рака шейки матки.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации.

Список литературы

1. Анализ эффективности использования непрерывного лазерного излучения с длиной волны 1265 нм для инициирования оксидативного стресса в ткани солидной злокачественной опухоли / Т.П. Генинг, О.С. Воронова, Д.Р. Долгова, Т.В. Абакумова, И.О. Золотовский, Е.М. Шолохов, А.С. Курков, С.О. Генинг // Квантовая электроника. – 2012. – № 42 (9). – С. 805–807.

2. A highpower tunable Raman fiber ring laser for the investigation of singlet oxygen production from direct laser excitation around 1270 nm / F. Anquez, E. Courtade, A. Sivery, P. Suret, S. Randoux // Opt. Express. – 2010. – Vol. 18 (22). – P. 22928–22936.

3. Cancerous cell death from sensitizer free photoactivation of singlet oxygen / F. Anquez, I. El Yazidi-Belkoura, S. Randoux, P. Suret, E. Courtade // Photochem. Photobiol. – 2012. – No. 88. – P. 167–174.

4. Raman fiber laser for the drug-free photodynamic therapy / A.S. Yusupov, S.E. Yoncharov, J.D. Zalevskii, V.M. Paramonov, A.S. Kurkov // Laser Physics. – 2010. – Vol. 20. – P. 357–359.

5. Первичные механизмы неспецифического воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения на эритроциты с участием молекулярного кислорода / С.Д. Захаров, С.А. Скопинов, В.М. Чудновский [и др.] // Изв. АН СССР. Сер.: Физика. – 1990. – № 54 (8). – С. 1629–1635.

6. Захаров С.Д., Иванов А.В. Светокислородный эффект в клетках и перспективы его применения в терапии опухолей // Квантовая электроника. – 1999. – № 29 (3). – С. 192–214.

7. Zakharov S.D., Ivanov A.V. Light-oxygen effect as a physical mechanism for activation of biosystems by quasi-monochromatic light (a review) // Biophysics. – 2005. – Vol. 50 (1). – P. 64–85.

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

9. Activation of Molecular Oxygen by Infrared Laser Radiation in Pigment-Free Aerobic System / A.A. Krasnovsky, N.N. Drozdova, A.V. Ivanov, R.V. Ambartsumian // Biochemistry (Moscow). – 2003. – Vol. 68. – P. 963–966.

10. Solvent dependence of the steady-state rate of $1O_2$ generation upon excitation of dissolved oxygen by cw 1264 nm laser radiation in air-saturated solutions: Estimates of the absorbance and molar absorption coefficients of oxygen / A.A. Krasnovsky, Ya.V. Roumbal, A.V. Ivanov, R.V. Ambartsumian // Chem. Phys. Lett. – 2006. – Vol. 430. – P. 260–264.

11. Raman Laser Based on a Fiber with Variable Mode Structure / A.E. Bednyakova, M.P. Fedoruk, A.S. Kurkov, E.M. Sholokhov, S.K. Turitsyn // Laser Phys. – 2011. – Vol. 21 (2). – P. 290–293.

12. Юсупов А.С., Захаров С.Д. Лазероиндуцированный светокислородный эффект в онкологической практике // Креативная хирургия и онкология. – 2011. – № 2. – С. 24–32.

13. Bradford M.M. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.

14. Кнорре Д. Г., Мызина С. Д. Биологическая химия. – М.: Высшая школа, 2000. – 479 с.

15. Mann H.B., Whitney D.R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other // Annals of Mathematical Statistics. – 1947. – Vol. 18. – P. 50–60.

16. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. – Л.: Медицина, 1973. – 141 с.

References

1. Gening T.P., Voronova O.S., Dolgova D.R., Abakumova T.V., Zolotovskii I.O., Sholokhov E.M., Kurkov A.S., Gening S.O. Analiz effektivnosti ispol'zovaniia nepreryvnogo lazernogo izlucheniia s dlinoi volny 1265 nm dlia initsirovaniia oksidativnogo stressa v tkani solidnoi zlo-kachestvennoi opukholi [Analysis of the effectiveness of the use of CW laser radiation with wavelength 1265 nm for the initiation of oxidative stress in the tissue of solid malignant tumors]. *Kvantovaia elektronika*, 2012, no. 42 (9), pp. 805-807.
2. Anquez F., Courtade E., Sivery A., Suret P., Randoux S. A high-power tunable Raman fiber ring laser for the investigation of singlet oxygen production from direct laser excitation around 1270 nm. *Opt. Express*, 2010, vol. 18 (22), pp. 22928-22936.
3. Anquez F., El Yazidi-Belkoura I., Randoux S., Suret P., Courtade E. Cancerous cell death from sensitizer free photoactivation of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.*, 2012, no. 88 (1), pp. 167-174.
4. Yusupov A.S., Yoncharov S.E., Zalevskii J.D., Paramonov V.M., Kurkov A.S. Raman fiber laser for the drug-free photodynamic therapy. *Laser Physics*. 2010, vol. 20 (2), pp. 357-359.
5. Zakharov S.D., Skopinov S.A., Chudnovskii V.M. [et al.] Per-vichnye mekhanizmy nespetsificheskogo vozdeistviia nizkointensivnogo lazernogo izlucheniia na eritrotsity s uchastiem molekuliarnogo kisloroda [Primary mechanisms of nonspecific effects of low-intensity laser radiation on erythrocyte with the participation of molecular oxygen]. *Izvestiia Akademii nauk USSR. Seriya "Fizika"*, 1990, no. 54 (8), pp. 1629-1635.
6. Zakharov S.D., Ivanov A.V. Svetokislorodnyi effekt v kletkakh i perspektivy ego primeneniia v terapii opukholei [Svetosilinyh effect in cells and perspectives of its application in the therapy of tumors]. *Kvantovaia elektronika*, 1999, no. 29 (3), pp. 192-214.
7. Zakharov S.D., Ivanov A.V. Light-oxygen effect as a physical mechanism for activation of biosystems by quasi-monochromatic light (a review). *Biophysics*, 2005, vol. 50 (1), pp. 64-85.
8. Schweitzer C., Schmidt R. Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen. *Chem. Rev.*, 2003, vol. 103, pp. 1685-1757.
9. Krasnovsky A.A., Drozdova N.N., Ivanov A.V., Ambartsumian R.V. Activation of Molecular Oxygen by Infrared Laser Radiation in Pigment-Free Aerobic System. *Biochemistry (Moscow)*, 2003, vol. 68, pp. 963-966.

10. Krasnovsky A.A., Roumbal Ya.V., Ivanov A.V., Ambartzumian R.V. Solvent dependence of the steady-state rate of $1O_2$ generation upon excitation of dissolved oxygen by cw 1264 nm laser radiation in air-saturated solutions: Estimates of the absorbance and molar absorption coefficients of oxygen. *Chem. Phys. Lett.*, 2006, vol. 430, pp. 260-264.

11. Bednyakova A.E., Fedoruk M.P., Kurkov A.S., Sholokhov E.M., Turitsyn S.K. Raman Laser Based on a Fiber with Variable Mode Structure. *Laser Phys.*, 2011, vol. 21 (2), pp. 290-293.

12. Iusupov A.S., Zakharov S.D. Lazeroindutsirovannyi svetokislorodnyi effekt v onkologicheskoi praktike [Laserengraving light-oxygen effect in Oncology practice]. *Kreativnaia khirurgiia i onkologiia*, 2011, no. 2, pp. 24-32.

13. Bradford M.M. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, pp. 248-254.

14. Knorre D.G., Myzina S.D. Biologicheskaiia khimiia [Biological chemistry]. Moscow: Vysshiaia shkola, 2000, 479 p.

15. Mann H.B., Whitney D.R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Annals of Mathematical Statistics*, 1947, vol. 18, pp. 50-60.

16. Gubler E.V., Genkin A.A. Primenenie neparametricheskikh kriteriev statistiki v mediko-biologicheskikh issledovaniiaxh [The use of non-parametric criteria of statistics in biomedical research]. Leningrad: Meditsina, 1973, 141 p.

Получено 15.10.2014