

СИНХРОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КЛЕТКАХ И ВО ВНЕКЛЕТОЧНОЙ СРЕДЕ, ИНДУЦИРОВАННЫЕ НИЗКОИНТЕНСИВНЫМ ЛАЗЕРНЫМ ОБЛУЧЕНИЕМ

С.Д. Захаров, С.А. Скопинов, Н.А. Панасенко, С.Н. Перов, С.В. Яковлева,
Е.Б. Вольф, Б.В. Еремеев, Е.Д. Лейб

Обнаружены согласованные во времени изменения деформируемости эритроцитов и показателя преломления содержащего их физиологического раствора, индуцированные низкоинтенсивным излучением He-Ne лазера, свидетельствующие об общей природе этих эффектов.

Сравнительный анализ особенностей проявления эффектов низкоинтенсивного излучения He-Ne лазера в "живых" /1/ и "неживых" /2/ системах позволил аргументировать гипотезу /3/ об их общей природе, проявляющейся через единый первичный фотоакцептор — молекулярный кислород посредством изменений в структуре водного раствора. Одним из критических способов проверки данной гипотезы является изучение временных корреляций индуцированных лазером клеточных и водно-структурных изменений в одном совместном эксперименте. Такие измерения на суспензии эритроцитов человека выполнены, и в настоящей заметке изложены их результаты.

Приготовление суспензии с объемной долей клеток $\rho = 0,4 - 2,0\%$, оксигенированной до установления равновесия с атмосферным воздухом, проводилось по методике, изложенной в /4/. Для облучения использовался лазер ЛГ-38 с длиной волны $\lambda = 632,8$ нм и мощностью $P \approx 40$ мВт. Плотность потока излучения контролировалась с помощью калиброванного фотодиода и в среднем составляла $q = 13$ мВт/см². В процессе облучения одновременно измерялись коэффициент деформируемости эритроцитов ϵ под действием сдвиговых напряжений внутри капилляров с помощью лазерного цитодифрактометра /4/ и показатель преломления n раствора на D-линии Na (589 нм) путем измерения угла полного внутреннего отражения на рефрактометре типа Аббе ИРФ-454Б. Предметный столик рефрактометра и контур рециркуляции цитодифрактометра поддерживались при одной и той же температуре $T = 31 \pm 0,5$ °С, что обеспечивалось прокачкой теплоносителя (воды) вдоль последовательно соединенных водяных рубашек этих приборов с помощью термостата U-15. Облучение суспензии проводилось непрерывно в цитодифрактометре, откуда пробы малыми порциями (0,03 см³) переносились в рефрактометр.

Результаты измерений для одного из типичных случаев представлены на рис. 1. Непрерывные кривые получены аппроксимацией экспериментальных точек по методу наименьших квадратов. Указанные на рис. 1 погрешности выбраны максимальными среди аппаратных погрешностей и ошибок статистической обработки результатов. В отсутствие облучения ϵ испытывает временной дрейф, а n остается постоянным в пределах ошибок измерений.

В процессе облучения $\epsilon(t)$ проявляет стандартное поведение, обнаруживая характерный максимум /4/. Зависимость $n(t)$ имеет сходный вид. Максимумы ϵ и n совпадают по времени в пределах ошибок и при указанных выше условиях опытов достигаются в интервале 5–6 мин. Изменения $\Delta\epsilon_{\max}$ и Δn_{\max} в результате лазерного воздействия достигают величин 0,05 – 0,1 и $(0,5 - 0,6) \cdot 10^{-3}$, соответственно.

Деформируемость эритроцитов связана с упругими характеристиками молекулярных компонент мембраны и цитоскелета /5/ и, следовательно, является свойством, присущим отдельной клетке. В то же время показатель преломления является характеристикой электронной поляризуемости молекул в исследуемой среде и при фиксированных температуре и плотности зависит от ее химического состава и структурных особенностей /6/. Наблюдаемые изменения n вызваны изменениями водной, а не клеточной компоненты суспензии. Чтобы продемонстрировать это, применим принцип аддитивности рефракции, используемый для многокомпонентных растворов. В соответствии с формулой Лоренц — Лорентца этот принцип может

быть выражен в виде $(n^2 - 1)/(n^2 + 2) = V_s r_s + V_c r_c$, где V_s и V_c — объемная доля, а r_s и r_c — молярная рефракция соответственно растворителя и клеточной фазы, причем $V_c + V_s = 1$. Если теперь, от противного, предположить, что рефракция внеклеточной среды за время облучения остается постоянной, а весь прирост Δn_{\max} обязан вкладу клеток, то из данных рис. 1 и с помощью формулы Лоренц — Лорентца получим оценку $(\Delta n_c)_{\max}/n_s \sim 0,02$, что соответствует изменению параметра $(n_c/n_s - 1)$ на 40%. Это противоречит результатам наших измерений коэффициента экстинкции, проведенных в тех же экспериментальных условиях: поперечное сечение рассеяния на эритроцитах в течение, по крайней мере, 6 мин остается постоянным [7], тогда как при рассчитанном выше изменении показателя преломления внутриклеточной среды оно должно было бы измениться на десятки процентов, поскольку существенно зависит от параметра $(n_c/n_s - 1)$.

Отметим, что наблюдаемые изменения не обязательно связаны с такими же изменениями в объеме суспензии внутри облучаемого объема, а, возможно, проявляются в непосредственной близости от стенок, таких как поверхность кюветы рефрактометра.

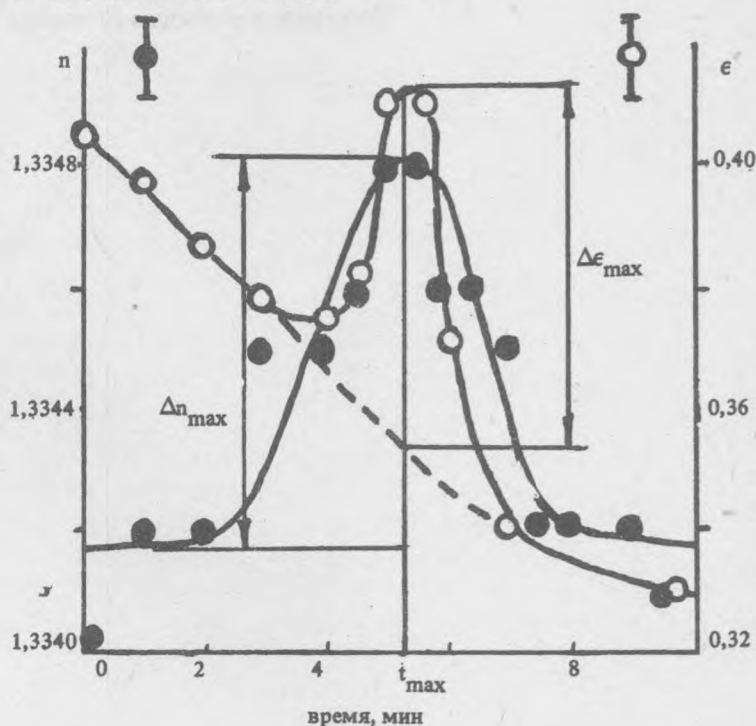


Рис. 1. Кинетика деформируемости эритроцитов (○) и показателя преломления внеклеточной среды (●) в процессе лазерного облучения циркулирующей суспензии эритроцитов. Начало облучения отвечает $t = 0$. Пунктиром показан временной ход ϵ без облучения, $n(t)$ без облучения не обнаруживает значимых отличий от $n(0)$. Условия опыта: $\lambda = 632,8$ нм, $\rho = 1,8$ об.%, $P = 38$ мВт, $q = 12,7$ мВт/см², $T = 31 \pm 0,5$ °С.

Из полученных данных следует, что биоэффект не локализован целиком внутри клеток, а связан также с интегральными изменениями в дисперсионной среде. Возможное объяснение наблюдаемых эффектов заключается в возникновении взаимосогласованных изменений структуры физиологического раствора и клеточной мембраны в результате взаимодействия на границе раствор — мембрана [3], в пользу чего свидетельствуют фотоиндуцированные ($\lambda \sim 633$ нм) структурные изменения, наблюдаемые в прозрачных многокомпонентных метастабильных растворах [8] в присутствии растворенного кислорода. Релаксация фотовозбужденных молекул синглетного кислорода в микрообластях биораствора, возможно, выполняет роль пускового механизма, инициирующего кооперативные процессы перестройки метастабильной структуры раствора с участием водородных связей [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Захаров С. Д. и др. Краткие сообщения по физике ФИАН, № 1, 15 (1989).
2. Скопинов С. А., Яковлева С. В. Письма в ЖТФ, 13, 68 (1987).
3. Захаров С. Д., Скопинов С. А., Чудновский В. М. Труды Всесоюзной конференции по лазерной медицине. Владивосток, изд. ДВО АН СССР, 1989.
4. Амбарцумян Р. В. и др. Краткие сообщения по физике ФИАН, № 10, 35 (1987).
5. Захаров С. Д. Краткие сообщения по физике ФИАН, № 2, 3 (1986).
6. Бацанов С. С. Структурная рефрактометрия. М., Высшая школа, 1976.
7. Захаров С. Д. и др. В сб. "Методы лазерной биофизики и их применение в биологии и медицине". Тарту, ТГУ, 1989, с. 23.
8. Минц Р. И. и др. Письма в ЖТФ, 14, 1850 (1988).

Поступила в редакцию 27 ноября 1989 г.