

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ЭРИТРОЦИТЫ В ИНФРАКРАСНОЙ ПОЛОСЕ ПОГЛОЩЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА

Р.В. Амбарцумян, П.Г. Елисеев, Б.В. Еремеев, С.Д. Захаров, Б.И. Махсудов

Путем регистрации деформируемости клетки в реальном масштабе времени методом дифракции Фраунгофера изучено действие лазерного излучения в области 1,27–1,32 мкм на эритроциты. Селективность воздействия свидетельствует о том, что за биоэффект ответственно фотовозбуждение молекул O_2 в синглетное состояние $^1\Delta_g^+$

Факт воздействия монохроматического лазерного излучения на живые биообъекты в настоящее время хорошо документирован /1/. Однако природа первичного фотохимического акта не установлена. На этот вопрос может дать ответ только идентификация спектра действия /2/. В работе /3/ в диапазоне 0,4 – 1,0 мкм по скорости синтеза ДНК получен спектр действия на клетки монохроматического излучения He-Ne лазера. В /4/ этот спектр отождествлен со спектром запрещенных переходов молекулярного кислорода, и высказано предположение о том, что за биологический эффект ответственные генерируемые при облучении молекулы кислорода в синглетном состоянии, которые в химическом отношении являются высокоактивными. Этот механизм отличается от рассмотренных ранее процессов фотосенсибилизации кислорода при возбуждении эндогенных хромофоров и увеличения активности ферментов в электронно-возбужденных состояниях /3,5/. Согласно /4/, наибольшая чувствительность (по дозе облучения) должна наблюдаться в области 1,27 мкм, отвечающей переходу O-O в молекуле кислорода $^3\Sigma_g^- \rightarrow ^1\Delta_g^+$ /6/.

В данной работе получен спектр действия лазерного излучения на клетки в области длинноволнового края поглощения молекулярного кислорода в полосе $^3\Sigma_g^- \rightarrow ^1\Delta_g^+$. При таком подходе исключаются процессы фотосенсибилизированного возбуждения кислорода и теплового воздействия, поскольку $da/d\lambda$ (где a — коэффициент поглощения) для воды и для молекулярного кислорода в исследуемой области спектра имеют различные знаки.

Возможность решения задачи в такой постановке определялась разработкой метода контроля за состоянием клеток (в данном случае эритроцитов) в реальном масштабе времени. Конкретно контролировались эластичность мембраны эритроцитов и их объем в зависимости от дозы облучения для различных длин волн при одинаковом уровне падающей мощности.

Схема экспериментальной установки показана на рис. 1. Свежеполученные эритроциты дважды отмылись при центрифугировании в растворе ЭДТА, суспендировались в физрастворе Тирде до конечной объемной концентрации 0,4% и заливались в контур рециркуляции объемом 8 см³, термостабилизированный при 30 °С. Суспензия с помощью перистальтического насоса прокачивалась при постоянном расходе 1 см³/с через плоскую кювету размером 50 × 25 мм² с зазором 130 мкм, в которой реализовывалось установившееся пульсирующее течение со средней скоростью сдвига 130 с⁻¹. Расстояние от смесителя до кюветы поток проходил за 5 с. Суспензия облучалась в течение 40 мин в смесителе объемом 5,5 см³ непрерывным излучением полупроводниковых инъекционных лазеров на основе зарощенных мезаполосковых гетероструктур InGaAsP/InP /7/. Излучение направлялось через световод диаметром 50 мкм, выходной торец которого располагался на расстоянии 5 см от поверхности суспензии (расходимость на выходе световода 20°, мощность 5 мВт). Для сравнения одновременно проводились контрольные измерения в тех же условиях без облучения.

Наблюдение за воздействием излучения на клетки осуществлялось в процессе облучения с помощью просвечивания кюветы зондирующим лучом He-Ne лазера с диаметром пучка 1,5 мм, расходимостью $0,5 \cdot 10^{-3}$ рад и мощностью 0,3 мВт. Эритроциты имели форму двояковогнутого диска с максимальным диаметром около 8 мкм и относительный показатель преломления примерно 1,05. Под действием сдвиговых напряжений потока они удлинялись и ориентировались. Рассеяние зондирующего пучка на движущихся эритроцитах происходило в режиме, близком к однократному. В дальней зоне наблюдалась дифракционная картина, которая имела вид эллипса, повернутого на $\pi/2$ относительно направления движения клеток.

Измерялись полуоси эллипса a и b ($a > b$), соответствующие первому дифракционному минимуму. Измерения могли проводиться непосредственно на экране и путем покадрового фотографирования. Для разделения эффектов ориентации клеток, эластичности мембраны и изменения клеточного объема (средних значений во всей пробе) осуществлялись, во-первых, плавное вращение кюветы относительно двух осей, одна из которых совпадала с осью потока (угол Φ), а другая — с поперечной осью кюветы вдоль зазора (угол θ), и, во-вторых, остановка насоса и осаждение клеток на дно наклоненной кюветы ($\theta \geq 30^\circ$). Начальные отсчеты углов соответствуют ориентации кюветы, при которой ее плоскость перпендикулярна зондирующему лучу. Было обнаружено, что эритроциты как до, так и в процессе облучения ориентируются параллельно плоскости кюветы и удлиняются вдоль оси потока.

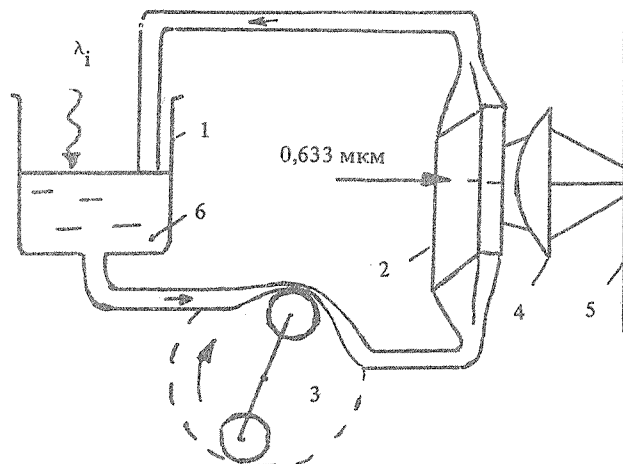


Рис. 1. Схема эксперимента: 1 — смеситель, 2 — оптическая кювета, 3 — перистальтический насос, 4 — линза, 5 — экран, 6 — суспензия эритроцитов.

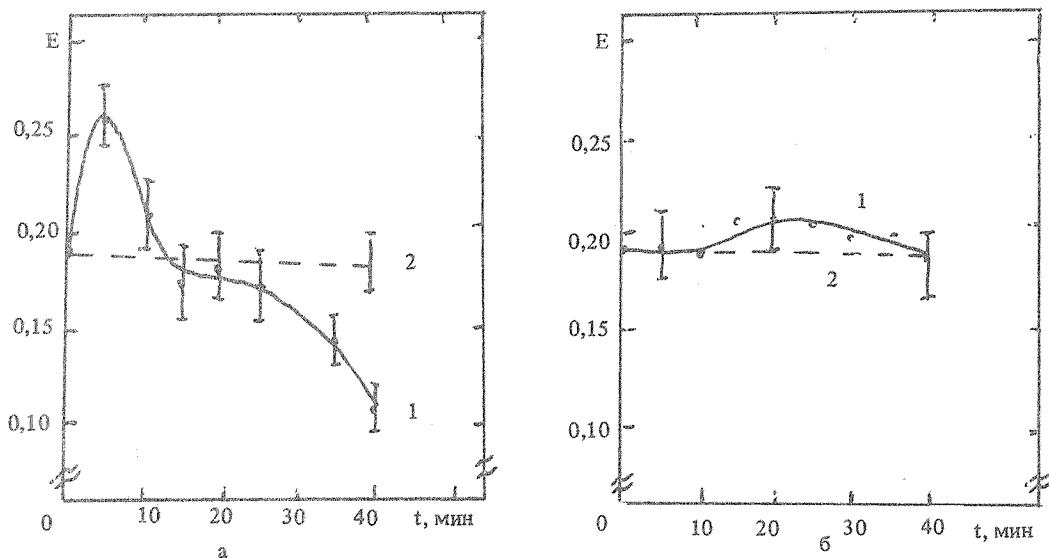


Рис. 2. Зависимость относительного удлинения эритроцитов $E = (a - b)/(a + b)$ от времени при облучении непрерывным монохроматическим излучением (1) и в контроле (2). Мощность лазера — 5 мВт, $\lambda_1 = 1,274$ мкм (а), $\lambda_2 = 1,329$ мкм (б).

Зависимость относительного удлинения эритроцитов $E = (a - b)/(a + b)$ от времени при ориентации кюветы $\Phi = 0$ и $\theta = 0$ представлена на рис. 2. Погрешности измерений ($\delta a/a = 6\%$, $\delta b/b = 4\%$) объясняются неодинаковым удлинением эритроцитов, находящихся в различных по высоте зазора участках кюветы, пульсирующим характером потока и рядом других факторов.

Измерения при остановке потока с ориентацией кюветы $\Phi = 0$, $\theta = 30^\circ$ показали, что величина $\xi = \arccos(b/a)$, характеризующая форму клетки, изменяется в процессе облучения незначительно: для $\lambda_1 = 1,274$ мкм от $\xi_0 = 29^\circ$ до $\xi_e = 31^\circ$ (в начале и в конце облучения), в контрольном опыте $\xi_0 = \xi_e = 29^\circ$, а для $\lambda_3 = 1,329$ мкм $\xi_0 = 27^\circ$, $\xi_e = 34^\circ$ (в контроле $\xi_0 = \xi_e = 27^\circ$). Относительная ошибка во всех измерениях 10%. Эти данные можно сравнить со значениями ξ , полученными в калибровочных опытах с осмотическим набуханием, при изменении формы клетки от исходной двояковогнутой ($\xi = 30^\circ$) к набухшей сферической ($\xi = 0$).

В другой серии измерений в тех же условиях использовалось облучение эритроцитов диодным лазером с длиной волны $\lambda_2 = 1,288$ мкм при средней мощности 7 мВт в импульсно-периодическом режиме (длительность импульсов 30 мкс, частота следования 10^3 Гц). Характер изменения $E(t)$ оказался аналогичным результатам, приведенным выше для λ_1 . Однако, если время появления первого максимума $\tau_M(\lambda_1)$ на кривой $E(t)$ равнялось примерно 5 мин, то $\tau_M(\lambda_2) \approx 15$ мин. При этом относительные величины этих максимумов совпадают и составляют примерно 40%. Возможный биоэффект от зондирующего He-Ne лазера по предварительным измерениям пренебрежимо мал и в данных экспериментах учитывается в контрольных опытах.

Из рис. 2а видно, что относительное удлинение клеток в конце облучения на длине волны λ_1 заметно уменьшается. Поскольку при этом форма клеток, характеризуемая величиной ξ , мало изменяется, можно сделать вывод о преимущественном влиянии эластичных свойств мембраны на изменение клеточного удлинения под действием сдвиговых напряжений в потоке: в конце облучения мембрана становится более жесткой. Поведение клеток в начальной стадии облучения до τ_M является наиболее важным, так как при этом возмущение клетки минимально, а эффект оказывается значительным и противоположным асимптотическому: эластичность мембраны на этом участке растет. Известно, что повышение жесткости мембраны предшествует разрушению эритроцита [8]. На этом основании можно было бы интерпретировать интервал времени до τ_M , когда происходит противоположный эффект, как стадию "стимуляции" клетки. За моментом τ_M наступает стадия "деградации", временной ход которой для живой клетки может быть немонотонным. Из рис. 2б видно, что относительное удлинение клеток при облучении на длине волны λ_3 практически не отличается от контрольных измерений. Разумеется, полученные результаты нельзя автоматически переносить на поведение клеток *in vivo* и, тем более, на реакцию надклеточных и более сложных структур.

Согласно гипотезе о прямом фотовозбуждении молекул O_2 в синглетное состояние [4] биологического эффекта на $\lambda_3 = 1,329$ мкм не должно наблюдаться, поскольку поглощение на этой длине волны отсутствует; этот вывод соответствует экспериментальным данным. Согласно [9], где изучался переход $^3\Sigma_g^- \rightarrow ^1\Delta_g^+$ в O_2 , растворенном в фреоне, коэффициент поглощения a на $\lambda_1 = 1,274$ мкм в пять раз превосходит значение, полученное на $\lambda_2 = 1,288$ мкм. В эксперименте дозы, необходимые для получения одинакового эффекта (достижения первого максимума деформируемости мембраны), отличаются в три раза, что является удовлетворительным согласием, учитывая отсутствие информации о форме линии O_2 , растворенного в воде и липидной фазе мембраны. Альтернативный механизм возбуждения эндогенного хромофора с передачей энергии на O_2 на этих длинах волн маловероятен. Тепловой механизм по указанным выше причинам исключается.

Авторы благодарны Н.Г. Басову за поддержку, Н.А. Панасенко и В.А. Симонову за помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тезисы докладов Всесоюзной конференции по применению лазеров в медицине, Красноярск, изд. Медицина, 1985.
2. Конев С. В., Вологовский И. Д. Фотобиология. Наука и техника, Минск, 1979.
3. Кару Т. И. и др. Квантовая электроника, 10, 1771 (1983).
4. Ambartsumian R. V. Proc. of EKOOSA-86. Italia, Fiorenzia, 1987.
5. Зубкова С. М. Биологические науки, № 7, 30 (1978).
6. Evans F. Chem. Commun., 1, 367 (1969).
7. Богатов А. П. и др. Квантовая электроника, 1, 2294 (1974).
8. Leterrier F., Saint-Blancard J., Stoltz J. F. Clin. Hemorheology, 3, 53 (1983).
9. Matheson I. B. C., Lee J. Chem. Phys. Lett., 8, 173 (1971).

Поступила в редакцию 23 июня 1987 г.