

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

На примере опухолевой ткани рака шейки матки исследовалась возможность лазерного инициирования оксидативного стресса. Для инициирования использовался лазерный комплекс с рабочей длиной волны 1265 нм, попадающей в область резонансного поглощения молекулярного кислорода. Источником излучения в экспериментах служил волоконный ВКР-лазер на основе двукратного каскадного преобразования излучения иттербиевого лазера с длиной волны 1125 мкм.

Ключевые слова: волоконный ВКР-лазер, оксидативный стресс, рак шейки матки.

1. Введение

Проблема роста злокачественной опухоли является на сегодня одной из самых актуальных в биологии и медицине [1]. В работах [2, 3] показана роль активных форм кислорода и инициируемого ими перекисного окисления липидов (ПОЛ) в механизмах канцерогенеза. Важную роль в защите клеток от повреждающего действия активных форм кислорода играет система антиоксидантной защиты [4]. Состояние, при котором на фоне депрессии или недостаточности естественных антиоксидантных систем происходит активация ПОЛ, называется окислительным стрессом [5].

Наиболее эффективным агентом, приводящим к поражению раковых клеток, принято считать синглетный кислород, что объясняется его высокой химической активностью [6], поскольку он может участвовать в цепных свободнорадикальных реакциях, окислять аминокислоты в белках, гуанин в ДНК и инициировать ПОЛ [7]. Итогом подобных нарушений при превышении репаративных возможностей клетки становится ее деструкция. Светоокислородный эффект заключается в активировании или повреждении биосистем оптическим излучением (в зависимости от световой дозы) посредством прямого фотовозбуждения растворенного в них молекулярного кислорода в синглетное состояние.

Одна из полос (наиболее активная) фотовозбуждения синглетного кислорода локализована в области 1.26–1.27 мкм [8, 9]. Линия поглощения O_2 в этой области спектра наиболее активна ввиду практически полного отсутствия поглощения конкурирующими хромофорами. Мощным источником излучения, способным эффективно ра-

ботать в этой области, может служить ВКР-лазер с накачкой от иттербиевого волоконного лазера [10]. В работах [11, 12] 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. При этом ширина спектра действия по высоте составляет 15–20 нм. В работе [13] 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.

2. Материалы и методы исследования

Для получения модели рака шейки матки (РШМ-5) на белых беспородных мышах использовали опухолевый штамм, полученный в НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН (Москва).

Источником излучения служил ВКР-лазер с двукратным рамановским преобразованием излучения иттербиевого волоконного лазера ($\lambda = 1125$ мкм) [14]. Активной средой рамановского преобразователя было телекоммуникационное волокно. Максимальная выходная мощность ВКР-лазера составила около 4 Вт на длине волны 1265 нм, спектр его излучения представлен на рис.1.

Поглощенная биотканью доза F определяется соотношением $F = W/S$, где W – поглощенная тканью энергия лазерного излучения (в Дж); S – площадь лазерного пятна на облучаемой биоткани (в $см^2$). При облучении в течение 10 мин доза высокоинтенсивного излучения составит 106.2 Дж/ $см^2$, а при двухминутном воздействии она будет в 5 раз меньше. Таким образом, суммарная доза после 10 таких сеансов в первом случае составит 1062 Дж/ $см^2$, во втором – 212 Дж/ $см^2$.

Интенсивность процессов ПОЛ оценивалась по содержанию вторичного продукта, малонового диальдеги-

Т.П.Генинг, О.С.Воронова, Д.Р.Долгова, Т.В.Абакумова, И.О.Золотовский, С.О.Генинг. Ульяновский государственный университет, Россия, 432700 Ульяновск, ул. Л.Толстого, 42; e-mail: rafzol.14@mail.ru

Е.М.Шолохов, А.С.Курков. Институт общей физики им. А.М.Прохорова РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 38; Ульяновский государственный университет, Россия, 432700 Ульяновск, ул. Л.Толстого, 42

Поступила в редакцию 27 июля 2012 г.

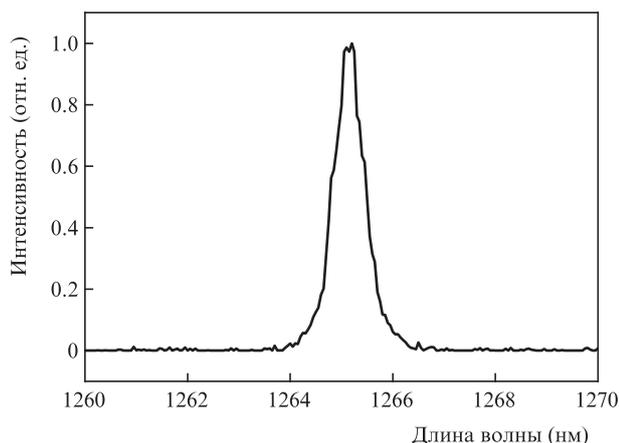


Рис.1. Спектр излучения ВКР-лазера.

да (МДА) в опухолевой ткани животных с РШМ-5 в тесте с тиобарбитуровой кислотой по модифицированному методу Л.И.Андреевой [15]. При изучении ферментативного звена антиоксидантной защиты активность супероксиддисмутазы (СОД) определялась по методу Е.Е.Дубининой и М.Nishikimi [16, 17], каталазы (КТ), глутатионредуктазы (ГР) и глутатионтрансферазы (ГТ) – по методу А.И.Карпищенко [18]. Для определения белка использовался метод М.М.Брэдфорда [19].

Для морфологического исследования применялась компьютерная видеотест-система с программой денситофотометрии Mesos C1. При анализе гистологических срезов опухоли рассчитывались удельные объемы опухолевой паренхимы, опухолевой стромы и участков некроза, а также митотический и апоптотический индексы.

Статистическая значимость полученных результатов оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Различия между группами считали достоверными при параметре статистической достоверности $p \leq 0.05$.

3. Результаты исследования и их обсуждение

Исследования влияния непрерывного лазерного излучения на длине волны 1265 нм (длина волны резонансного поглощения молекулярного кислорода O_2) на неоплазму установили, что облучение с дозой 212 Дж/см² на 30-е сутки после трансплантации опухоли достоверно уменьшает уровень МДА (рис.2). Динамика активности ферментов разнонаправленна: наблюдается отрицательная ди-

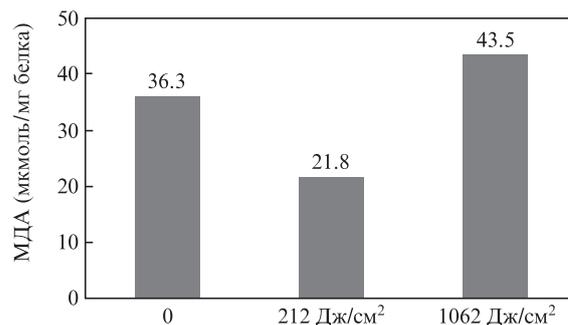
Рис.2. Уровень МДА в неоплазме на 30-е сутки роста ткани РШМ-5 после облучения ВКР-лазером при дозах $F = 0, 212$ и 1062 Дж/см².

Табл.1. Показатели системы антиоксидантной защиты в неоплазме на 30-е сутки роста ткани РШМ-5 после облучения ВКР-лазером.

Показатель	Число замеров и доза облучения		
	$n = 16$ ($F = 0$)	$n = 12$ ($F = 212$ Дж/см ²)	$n = 12$ ($F = 1062$ Дж/см ²)
ГР (ммоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹)	0.212±0.016	0.418±0.013*	0.238±0.023
ГТ (ммоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹)	1.502±0.292	0.509±0.051*	0.602±0.078*
СОД (усл. ед.·мг ⁻¹)	26.57±6.02	29.01±1.25	8.48±0.24*
КТ (ммоль·с ⁻¹ ·мг ⁻¹)	0.537±0.100	0.442±0.083	0.667±0.287

* – данные, статистически значимо отличающиеся от данных без облучения, $p \leq 0.05$.

намика в активности ГР при положительной динамике ГТ и значимо не меняющихся показателях уровня каталазы и СОД (табл.1).

Доза облучения 1062 Дж/см² при тех же сроках роста опухоли вызывает противоположные изменения в системе ПОЛ–антиоксиданты: отмечается повышение уровня МДА в неоплазме (рис.2) и одновременно статистически значимое снижение активности СОД и ГТ при достоверно не изменяющемся уровне ГР (табл.1). Такая динамика может свидетельствовать о развитии оксидативного стресса в опухолевой ткани.

Морфологическая оценка опухолевой ткани РШМ-5 после облучения ВКР-лазером показала, что лазерное воздействие способствует значимому снижению апоптотического индекса (табл.2). При этом митотический индекс достоверно не изменяется (табл.2), а объемы участков некроза (рис.3,б) и опухолевой стромы (рис.3,в) увеличиваются.

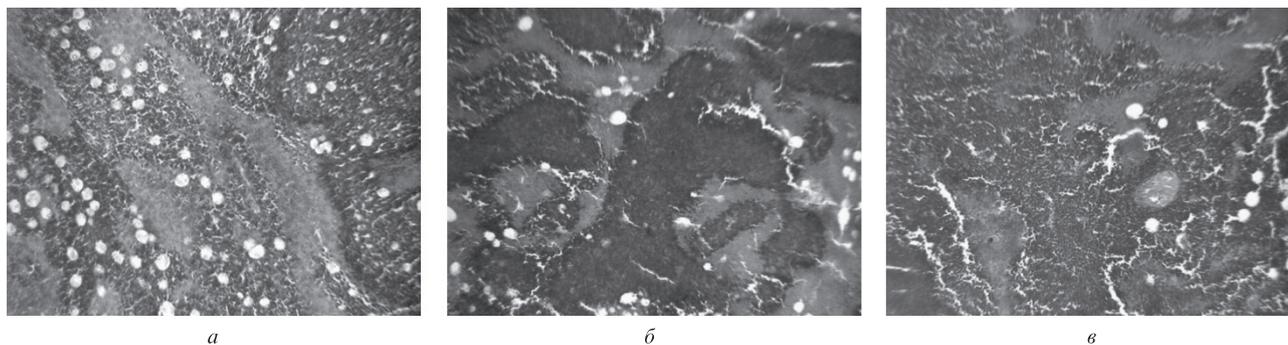
Рис.3. Микрофотографии (×400) биоткани опухоли РШМ-5 на 30-е сутки: без облучения (а) и после облучения дозой 212 (б) и 1062 Дж/см² (в). Окраска гематоксилин-эозин.

Табл.2. Морфометрические показатели опухолевой ткани после облучения ВКР-лазером.

Доза облучения (Дж/см ²)	Удельные объемы (%)			Митотический индекс (‰)	Апоптотический индекс (‰)
	опухолевой паренхимы	опухолевой стромы	участков некроза		
0	65.34±2.78	0.20±0.04	34.64±2.76	18.00±3.18	67.00±4.25
212	58.24±3.99*	0.32±0.04*	41.45±3.96	16.88±3.13	31.25±5.00*
1062	56.79±18.80	0.36±0.11	42.86±18.73	16.25±1.25	41.88±1.88*

* – данные, статистически значимо отличающиеся от данных без облучения, $p \leq 0.05$.

4. Заключение

В настоящей работе показано:

1. Лазерное облучение на длине волны 1265 нм дозозависимо вызывает в солидной опухоли РШМ-5 изменение показателей системы ПОЛ – антиоксиданты, которое может свидетельствовать о возможности развития оксидативного стресса.

2. Непрерывное лазерное облучение экспериментальной опухоли РШМ-5 излучением с длиной волны 1265 нм с суммарной дозой 1062 Дж/см² приводит к увеличению участков некроза и объема стромы.

3. Лазерное излучение на длине волны 1265 нм (в области резонансного поглощения молекулярного кислорода) может эффективно использоваться для разрушения солидных тканей злокачественных опухолей, например рака шейки матки.

Полученные результаты указывают на перспективность применения рассмотренных ВКР-лазеров для фотодинамической терапии, основанной на светокислородном эффекте и не предполагающей использования сенсibilizаторов [6]. Так, данная методика может выгодно отличаться от традиционных (лучевого и хирургического) методов лечения онкозаболеваний, в том числе рака шейки матки, отсутствием местных, органных и системных осложнений, возможностью неоднократного повторения лечебных процедур, относительной дешевизной и практическим отсутствием противопоказаний.

Работа выполнена в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.», госзадания Минобрнауки РФ.

1. Максимов С.Я. *Практическая онкология*, **10**, 117 (2009).
2. Ланкин В.З. *Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях* (М.: Наука, 2001).
3. Das U.N. *Med. Sci. Monot.*, **8**, 79 (2002).
4. Смирнова Л.П. *Сибирский онкологический журн.*, **1**, 65 (2002).
5. Чеснокова Н.П. *Типовые патологические процессы* (Саратов: Изд. Саратовского медицинского ун-та, 2004).
6. Захаров С.Д., Иванов А.В. *Квантовая электроника*, **29**, 192 (1999).
7. Schweitzer C., Schmidt R. *Chem. Rev.*, **103**, 1685 (2003).
8. Krasnovsky A.A., Drozdova N.N., Ivanov A.V., Ambartsumian R.V. *Biochemistry (Moscow)*, **68**, 963 (2003).
9. Krasnovsky A.A. Jr., Roumbal Ya.V., Ivanov A.V., Ambartsumian R.V. *Chem. Phys. Lett.*, **430**, 260 (2006).
10. Курков А.С., Дианов Е.М., Парамонов В.М., Гурьянов А.Н., Лаптев А.Ю., Хопин В.Ф., Умников А.А., Вечканов Н.И., Медведков О.И., Васильев С.А., Бубнов М.М., Егорова О.Н., Семенов С.Л., Першина Е.В. *Квантовая электроника*, **30**, 791 (2000).
11. Anquez F., Courtade E., Sivery A., Suret P., Randoux S. *Opt. Express*, **18**, 22928 (2010).
12. Anquez F., El Yazidi-Belkoura I., Randoux S., Suret P., Courtade E. *Photochem. Photobiol.*, **88**, 167 (2012).
13. Yusupov A.S., Goncharov S.E., Zalevskii I.D., Paramonov V.M., Kurkov A.S. *Laser Phys.*, **20**, 357 (2010).
14. Bednyakova A.E., Fedoruk M.P., Kurkov A.S., Sholokhov E.M., Turitsyn S.K. *Laser Phys.*, **21**, 290 (2011).
15. Андреева Л.И. *Лабораторное дело*, **11**, 41 (1988).
16. Дубинина Е.Е., Шугалей И.В. *Успехи современной биологии*, **113**, 7181 (1993).
17. Nishikimi M. et al. *Biol. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 849 (1972).
18. Карпищенко А.И. *Медицинские лабораторные технологии*, **1**, 164 (1998).
19. Bradford M.M. *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).