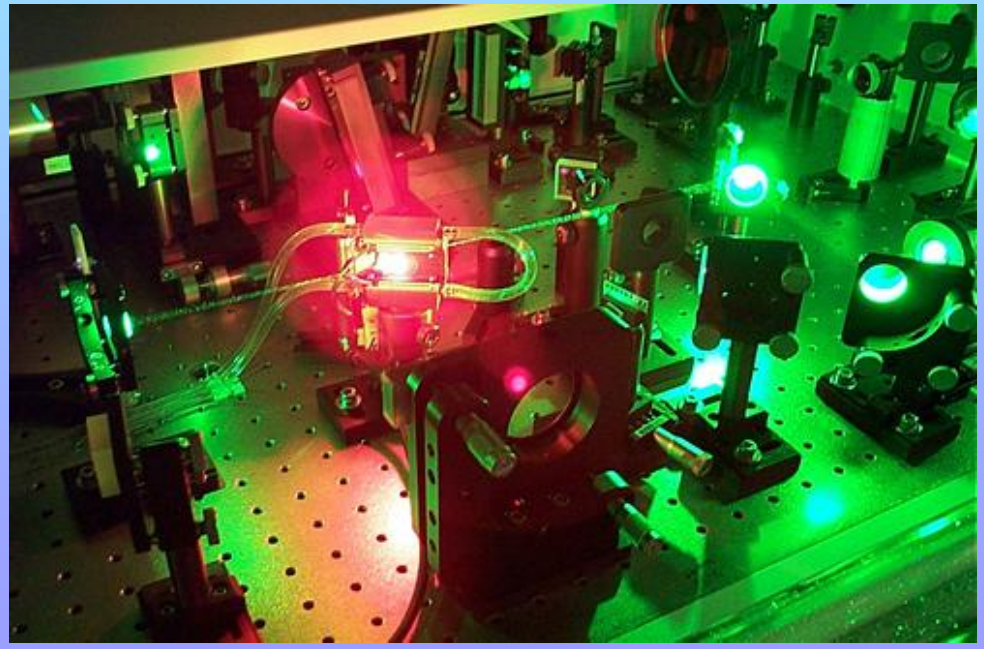
ФОТОДИНАМИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ С ДЛИНОЙ ВОЛНЫ 525 НМ В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ И КОСТНОМ МОЗГЕ МЫШЕЙ *IN VIVO*

Дюкина А. Р.[1], Заичкина С.И.[1], Розанова О.М.[1], Сорокина С.С.[1], Смирнова Е.Н.[1], Шемяков А.Е., Поцелуева М.М.[1], Наумов А.А.[1], Минаев Н.В.[2], Юсупов В.И.[2]

[1]Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
[2]Институт фотонных технологий ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, г. Москва, г. Троицк, Россия

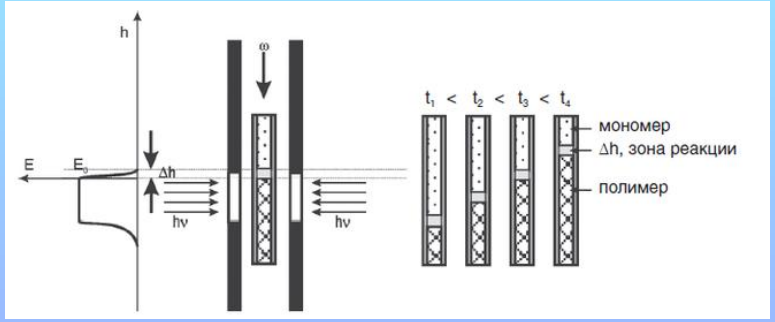
3 Октября 2019, г. Обнинск

Созданные в середине восьмидесятых годов фемтосекундные лазеры, обладающие уникальными свойствами (ультракороткий импульс 10^{-15} и высокая пиковая мощность - ТВт), совершили революцию не только в лазерной физике, но и в физике в целом. В настоящее время лазерные медицинские технологии широко используются в экспериментальной и клинической медицине, при этом в зависимости от конечной цели применяют лазерное излучение различной интенсивности.

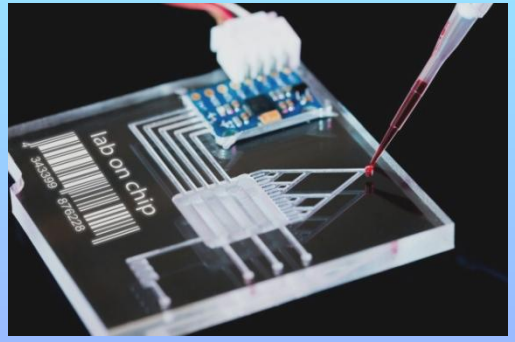


Фемтосекундные лазерное излучение широко применяется в различных медицинских приборах для лечения терапевтических и хирургических заболеваний, причем данных по использованию этих приборов в хирургии больше, чем в экспериментальных исследованиях его биологического действия на животных и их потомках *in vivo*. Побочные исследования их использования в медицине практически не изучены.

Модификация полимеров

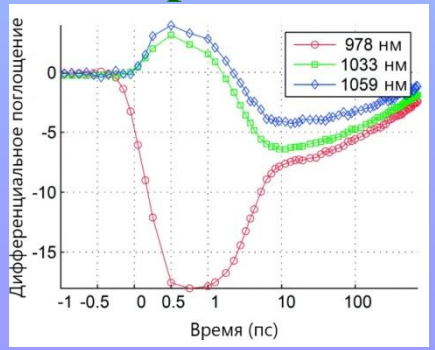


Гравировка (холодный огонь)



Лазерная хирургия

Спектроскопия



Ранее нами было проведено большое комплексное исследование действия непрерывного низкоинтенсивного лазерного (632,8 нм) и светодиодного ИК излучений (850 нм) на клеточные реакции мышей и их потомков по уровню продукции АФК в цельной крови и цитогенетических повреждений в костном мозге.

Анализ данных по генотксичности показал, что эти излучения не влияли на уровень спонтанных цитогенетических повреждений в кроветворных органах и в цельной крови, в связи с этим было решено дооблучить животных после обработки лазером высокой дозой рентгеновского излучения (+ 1.5 Гр).

В результате были получены значимые защитные эффекты, как по уровню продукции АФК в крови, так и по уровню цитогенетических повреждений в клетках костного мозга и в других органах, по сравнению с непредобработанными животными.

И в дальнейших исследованиях по поиску защитных веществ, индуцирующих скрытые изменения в организме, которые не выявляются традиционными методами скрининга, для активации естественной защиты, мы используем так называемый тест «адаптивный ответ».

Целью было проверить эффективность использования неионизирующего низкоинтенсивного импульсного ФС лазерного излучения в качестве фактора активации естественной защиты организма с помощью теста «адаптивный ответ».

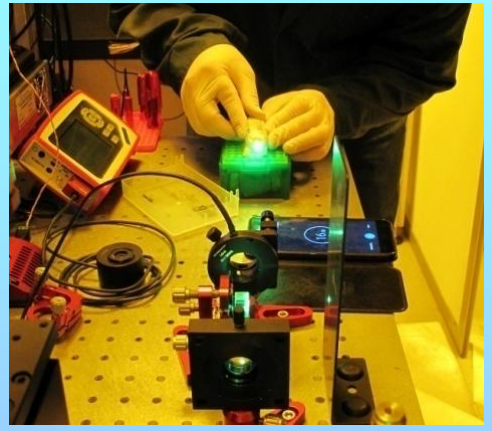
Основные задачи:

1) Выявить влияние низкоинтенсивного фемтосекундного лазерного излучения на уровень продукции АФК и клеточный состав в цельной крови мышей, на уровень цитогенетических повреждений в клетках костного мозга и на индекс массы тимуса и селезенки;

2) Выявить возможность и закономерности защитного действия в кроветворных органах (костный мозг, селезенка и тимус) и цельной крови мышей, предоблученных фемтосекундным лазерным излучением с помощью теста «адаптивный ответ».

ОБЪЕКТ. Эксперименты проводили на двухмесячных самцах мышей линии SHK.

ОБЛУЧЕНИЕ животных ФС лазером проводили в г. Троицке, в Институте фотонных технологий на разработанном ими лазере «АВЕСТА»:



длина волны	**525 нм**
длительность импульса	200 фс
частота следования импульсов	70 МГц,
мощности	0.05, 0.5 и 5 мВт
Диаметр пучка облучения	2.5 мм
экспозиция,	1, 5, 10, 30 и 50 с

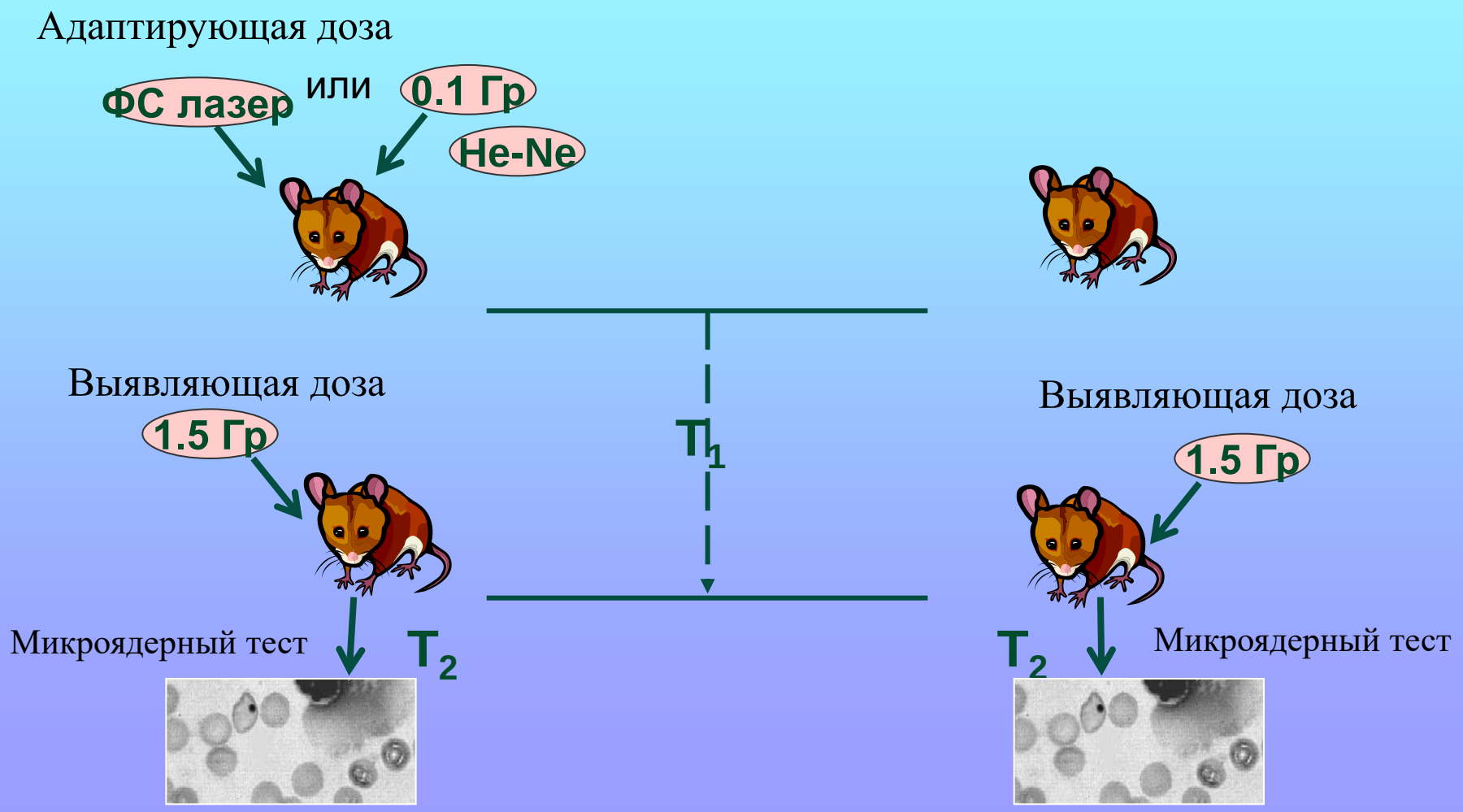
что соответствует рассчитанным физиками величинам плотности потока энергии 0.1 – 52 мДж/см^2.

В качестве положительных контролей животные были облучены непрерывным He-Ne лазерным излучением (**632.8** нм, 0.7 мВт, 0.16 мВт/см^2) в течение 5 и 100 с (2 и 40 мДж/см^2) и рентгеновским излучением в дозе 0.1 Гр на установке РУТ (4 мДж/см^2, 0.1 Гр/мин, 200 кВ, сила тока 8 мА, фильтры 1.0 мм Cu и 1.0 мм Al).

Через сутки все группы животных дополнительно облучали рентгеновским излучением в дозе 1.5 Гр (60 мДж/см^2) по отработанной ранее нами схеме (0.1 Гр + 1.5 Гр). На каждую экспериментальную точку использовали не менее 5 мышей.

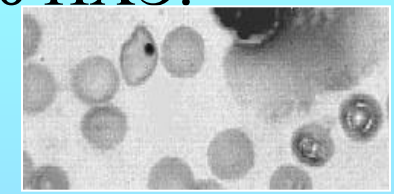
Схема радиационного адаптивного ответа

Дозу облучения мышей ФС лазером брали исходя из данных положительных контролей, для которых ранее была определена область доз активирующих естественную защиту от 2 до 30 мДж/см2.



Методы

- Уровень цитогенетических повреждений оценивали с помощью подсчета ПХЭ с МЯ в клетках костного мозга. На каждом препарате анализировали не менее 2000 ПХЭ.



- Массу тимуса и селезенки рассчитывали по отношению величины среднего веса органа к величине среднего веса животного в группе.

- Уровень продукции АФК в цельной крови измеряли методом люминол – зависимой хемилюминесценции.

- Гематологический анализ крови проводили по стандартной методике, определяли на гематологическом анализаторе крови Beckman Coulter A c *T.

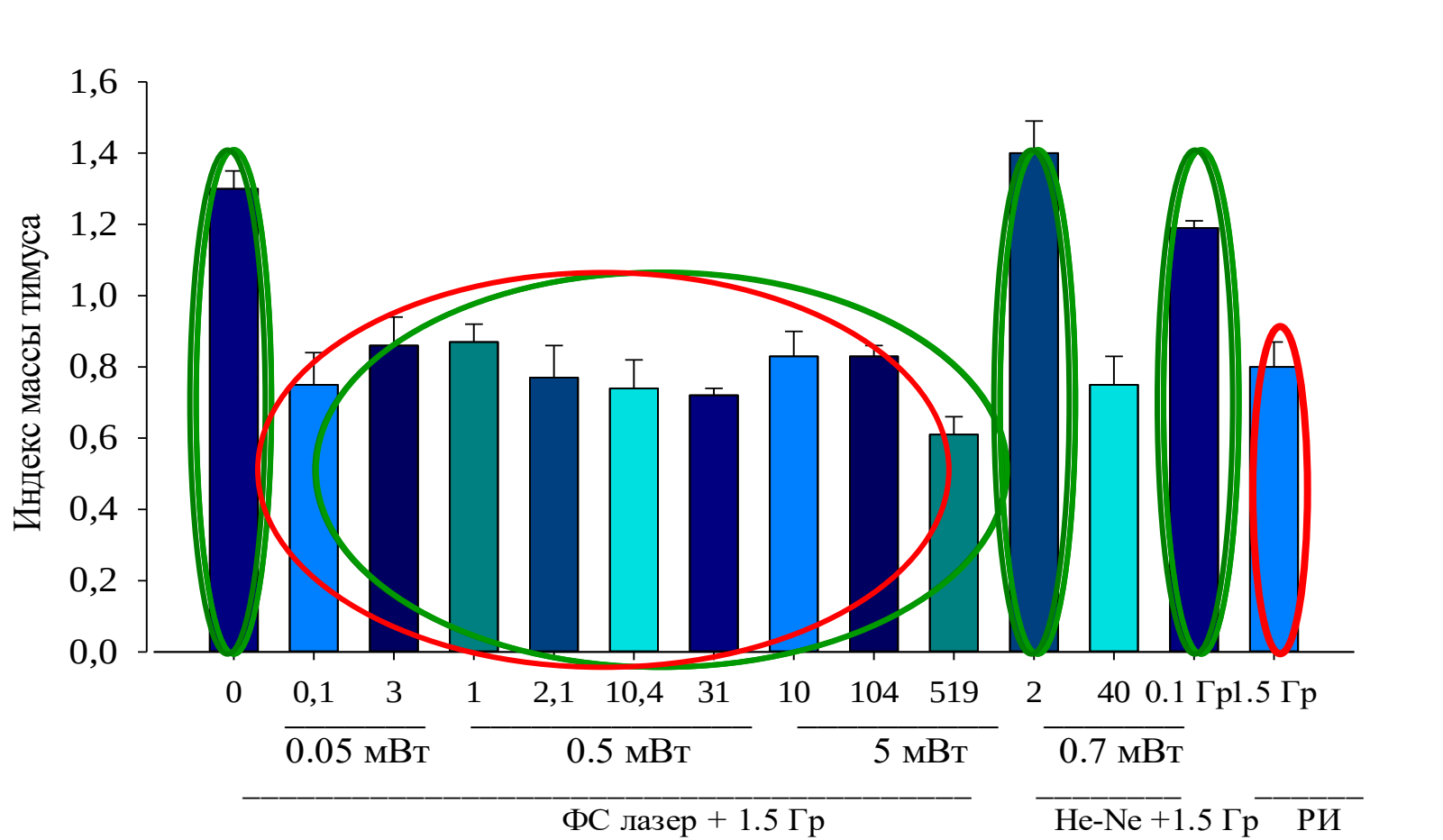
Количество полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в клетках костного мозга мышей, облученных ФС и He-Ne лазерами и РИ

Мощность, мВт	Время, с	Плотность потока энергии, мДж/см^2	Число ПХЭ	Число ПХЭ с МЯ	Доля ПХЭ с МЯ, %
Фемтосекундный лазер, фон					
0 чистый	0		20 000	99	**0.49±0.09**
0.05	1	0.1±0.03	15 000	50	0.33±0.12
0.05	30	3±0.1	20 000	101	0.51±0.11
0.05	120	12±0.5	15 000	125	**0.83±0.14**
0.5	1	1±0.3	20 000	95	0.48±0.15
0.5	5	5±0.5	20 000	81	0.41±0.13
5	1	10±3	15 000	65	0.43±0.07
5	2	21±7	25 000	99	0.40±0.18
5	5	52±16	15 000	75	0.50±0.03
5	10	104±35	20 000	94	0.47±0.10
5	50	519±172	25 000	90	0.36±0.09
He-Ne фон					
0.7	5 с	2	10 000	31	0.31±0.10
0.7	100 с	40	10 000	43	0.43±0.12
Рентгеновское излучение					
0,1 Гр/мин	60 с	4	20 000	86	0.43±0.03

Количество полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в клетках костного мозга после облучения мышей адаптирующими дозами ФС и He-Ne лазеров и РИ в дозе 0.1 Гр и затем выявляющей дозой 1.5 Гр

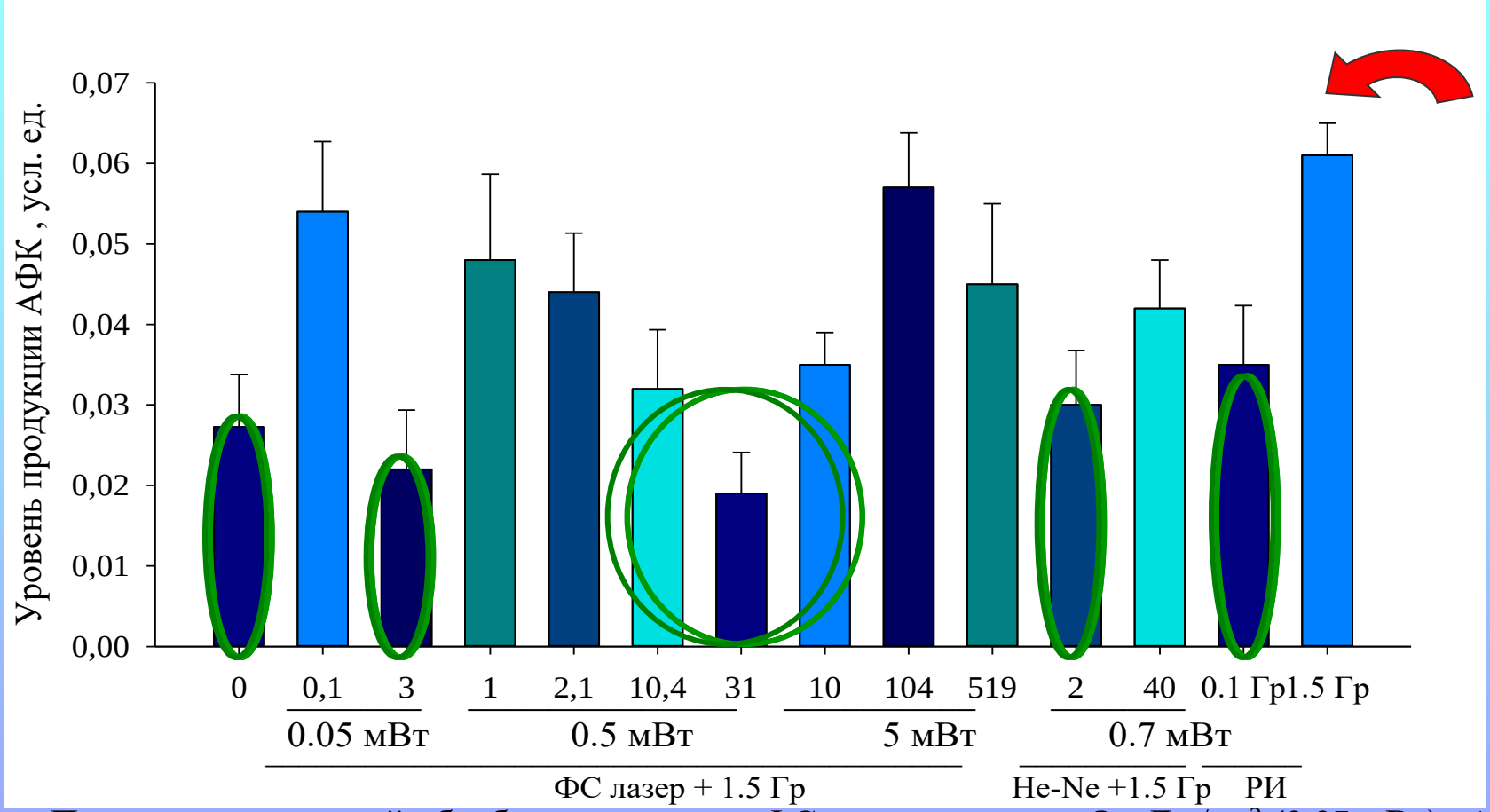
Мощность, мВт	Время, с	Плотность потока энергии, мДж/см^2	Число ПХЭ	Число ПХЭ с МЯ	Доля ПХЭ с МЯ, %
Фемтосекундный лазер					
0.05	1	0.1±0.03	14 000	759	5.4±0.15
0.05	**30**	**3±0.1**	**12 000**	**491**	**4.09±0.10**
0.5	1	1±0.3	20 000	1245	6.2±0.14
0.5	5	2.1±0.7	15 000	283	5.9±0.20
0.5	**10**	**10.4±3.5**	**17 000**	**819**	**4.82±0.27**
0.5	**30**	**31**	**15 000**	**643**	**4.3±0.12**
0.5	50	52±17	15 000	1010	6.7±0.10
5	**1**	**10±3**	**18 000**	**934**	**5.05±0.19**
5	2	21±7	15 000	984	6.56±0.26
5	5	52±16	20 000	1177	5.89±0.33
He-Ne лазер					
0.7	**5 с**	**2**	**20 000**	**761**	**3.80±0.23**
0.7	100 с	40	10 000	561	5.61±0.13
Рентгеновское излучение					
0.1 Гр/мин	**60 с**	**4**	**10 000**	**346**	**3.46±0.17**
1 Гр/мин	**90 с**	**60**	**17 000**	**1145**	**6.7±0.03**

Зависимости индекса массы тимусов у мышей, облученных адаптирующими дозами ФС и He-Ne лазеров и РИ в дозе 0.1 Гр и затем выявляющей дозой 1.5 Гр



Предобработка мышей всеми дозами ФС лазера и последующим облучением в дозе 1.5 Гр не влияла на индекс массы тимуса, т.е. приводила к его уменьшению, в отличие от He-Ne лазерного и рентгеновского излучений в дозах 2 и 4 мДж/см^2, соответственно.

Уровень продукции АФК в клетках крови мышей, облученных адаптирующими дозами ФС и He-Ne лазеров и РИ в дозе 0.1 Гр и затем выявляющей дозой 1.5 Гр



При предварительной обработке животных ФС лазером в дозах 3 мДж/см^2 (0.05 мВт), 10.4 и 31 мДж/см^2 (0.5 мВт) и 10 мДж/см^2 (5 мВт), которые индуцировали защиту по МЯ тесту, при последующем воздействии рентгеновского излучения в дозе 1.5 Гр, наблюдалась тенденция к уменьшению уровня продукции АФК. Другие дозы излучения ФС лазера не изменяли уровень продукции АФК. Полученные эффекты совпали с положительными контролями в той же области доз.

Заключение

В результате проведенных экспериментов было обнаружено, что при воздействии на мышей неионизирующим низкоинтенсивным импульсным ФС лазерным излучением наблюдается активация естественной защиты организма по тесту «адаптивный ответ» в том же узком диапазоне плотности потока энергии, зависящем от мощности, что и при облучении непрерывным He-Ne лазерным и рентгеновским излучением.

Полученные данные позволяют предположить схожий механизм активации естественной защиты организма изученными излучениями и могут быть использованы для стандартизации условий применения ФС лазеров в биологии и медицине.

Спасибо за внимание

Механизмы действия лазерного излучения на организм

- **Первичные реакции**
- поглощение кванта света - образование электронного возбуждения - миграция энергии электронного возбуждения - возникновение возбужденных состояний молекул - образование свободных радикалов - стереохимическая перестройка молекул.
- **Вторичные реакции**
- изменение электрического поля клетки, химизма ткани, активация ферментных систем, в частности сукцинатдегидрогеназы, НАД.Н2, НАДФ.Н2, активация ядерного аппарата клеток системы ДНК-РНК-белок, активация окислительно-восстановительных, биосинтетических систем.

Механизмы действия лазерного излучения на организм

Воздействие низкоинтенсивного лазерного излучения на биологические ткани зависит от активизации биохимических реакций, индуцированной лазерным светом, а также от физических параметров излучения. Под влиянием НИЛИ атомы и молекулы биологических тканей переходят в возбужденное состояние, активнее участвуют в физических и физико-химических взаимодействиях. В качестве фотоакцептора могут выступать различные сложные органические молекулы: белки, ферменты, нуклеиновые кислоты, фосфолипиды, и др., а также и простые неорганические молекулы (кислорода, двуокиси углерода, воды).

Поглощение энергии приводит к резкому увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и стимуляции кальцийзависимых процессов: ускорение течения внутриклеточных биохимических реакций свободнорадикального типа, увеличение содержания свободных, не связанных с белками и кристаллизационной водой форм биологически активных молекул, активация накопления и высвобождения АТФ, восстановление клеточных мембран, активация пролиферации и пр. Таким образом, происходит неспецифическая стимуляция биохимической активности тканей, подверженных лазерному облучению. Многие молекулярные акцепторы НИЛИ связаны с клеточными мембранами и, переходя в электронно-возбужденное состояние, повышают биоэнергетическую активность клеточных мембранных комплексов и фиксированных на мембранах ферментативных систем, поддерживающих жизнедеятельность и синтетические процессы в клетке.

Адаптирующая доза активирует:

- **Репаративные процессы**,

  (репарацию повреждений ДНК через включение ряда белков, активацию генов, кодирующих ферменты репарационной системы (синтез и репарация ДНК- тимидин-киназа и рибонуклеотид редуктаза). Основными механизмы восстановления ДНК при АО могут быть рекомбинационная и эксцизионная репарации ДНК. Происходит стимуляция белковых факторов репарации. Предполагается участие в АО и ДНК-лигазы, ДНК-гликозилазы и других белков репарации

- **Синтез эндогенных стрессорных белков**,

  (БТШ70) при этом металлотионеины играют важную роль в инактивации свободных радикалов и защите от радиации

- **Индукцию систем антиоксидантной защиты**

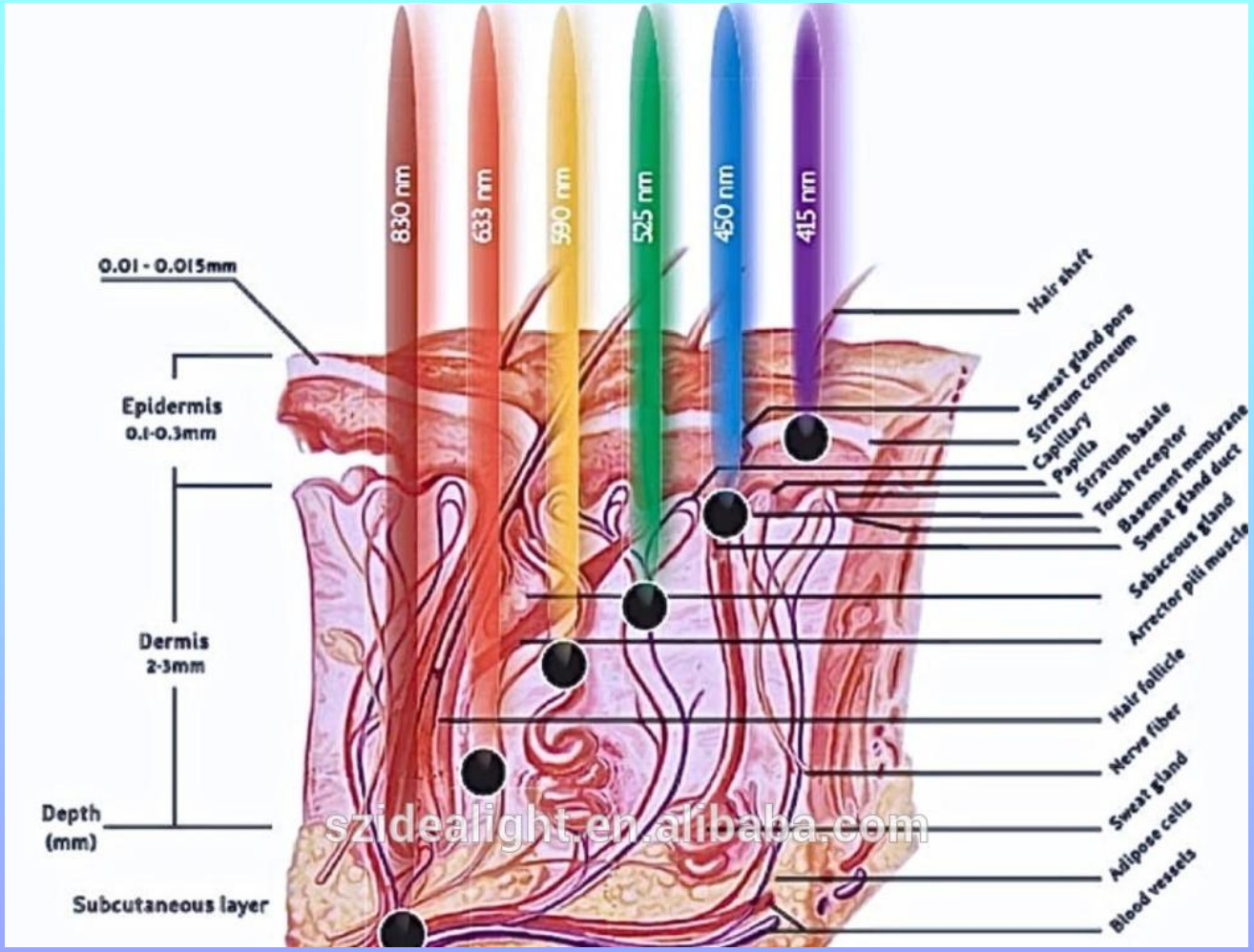
  (снижение уровня ПОЛ, увеличение СОД, глютатион пероксидазы, каталазы). Каталаза расщепляет перекись водорода с образованием воды и молекулярного кислорода, а пероксидазы восстанавливают перекись до воды специальными субстратами, например, глютатионом. Глютатиону принадлежит особая роль, что связано со способностью восстанавливать перекись водорода, а также обезвреживать вторичные метаболиты.

- **Изменение активности систем посттрансляционной модификации белков**

  (повышение уровня внутриклеточной цАМФ, изменение содержания кальция, которое стимулирует ПК С, мигрирующую в ядро и через фосфорилирование соответствующих факторов активирует специфическую группу генов. Продуктами их экспрессии могут быть как белки репарации ДНК, так и факторы транскрипции, регулирующие синтез генов-протекторов)

- **Селекцию,**

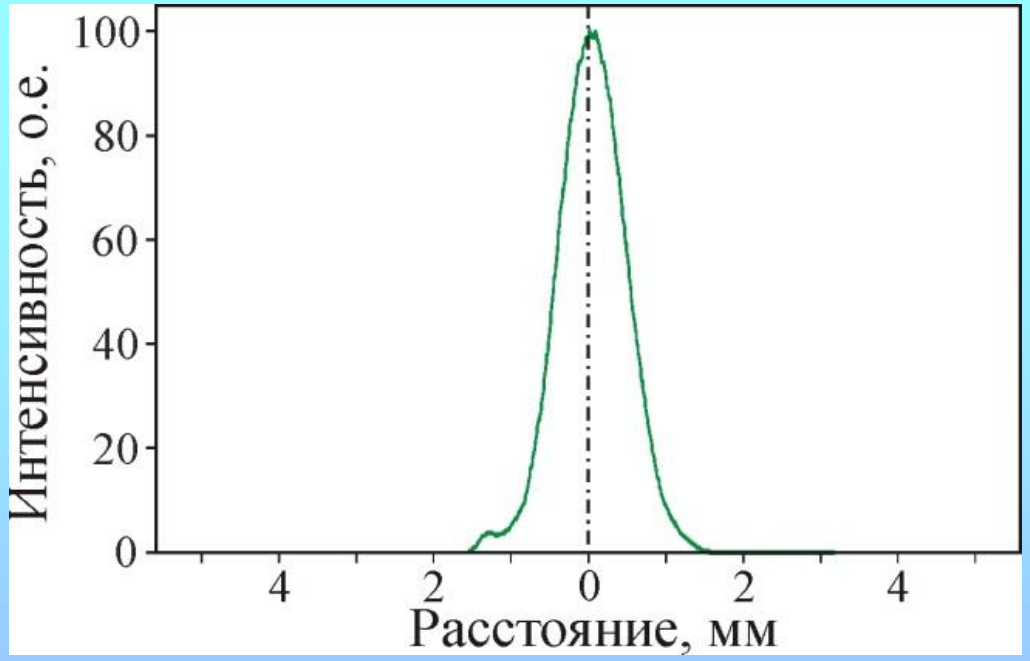
  решающую роль в формировании АО отводят селективной гибели наиболее радиочувствительных клеток по механизму апоптоза.



szidealight.en.alibaba.com

Одной из рабочих гипотез эффективного применения лазеров в терапии является знание ключевой фотомолекулярной реакции, запускающей терапевтический процесс, является гипотеза прямого возбуждения эндогенного кислорода – светокислородный эффект. Полагают, что усиление этого эффекта возможно при увеличении интенсивности лазерного излучения, что может наблюдаться за счет увеличения импульсной мощности. Однако на сегодня непонятен до конца не только локальный и системный механизм молекулярного действия ФС лазерного излучения, но и очень мало данных по изучению основных биологических реакций в организме млекопитающих *in vivo*. Положительные терапевтические эффекты в основном наблюдаются при больших и средних мощностях низкоинтенсивных лазерных излучений.

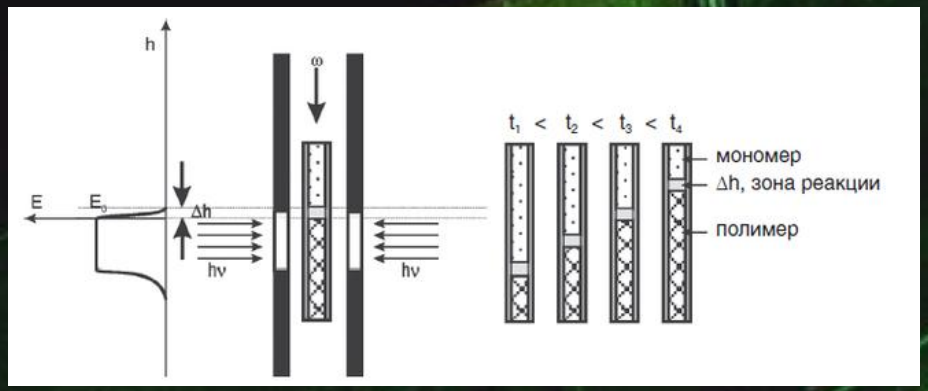
Светокислородный эффект (СКЭ) представляет собой повреждение, а при малых световых дозах — активирование клеток посредством фотогенерации молекулярного синглетного кислорода из растворенного в клетках O_2 согласно реакции $^3O_2 + h\nu \rightarrow {}^1O_2 \rightarrow$ биоэффект. Фазы проявления СКЭ аналогичны фазам фотодинамического эффекта.



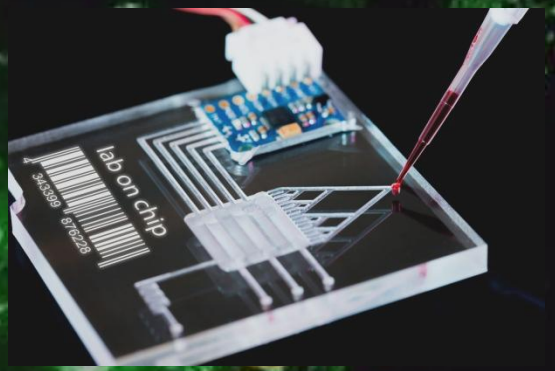
Профиль ФС лазерного пучка в области воздействия

Применение фемтосекундных лазеров

Модификация полимеров

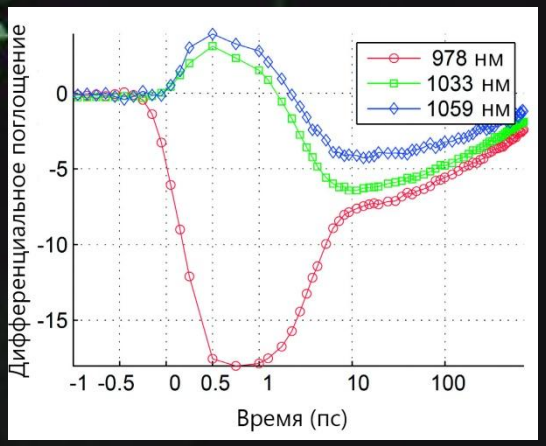


Гравировка (холодный огонь)



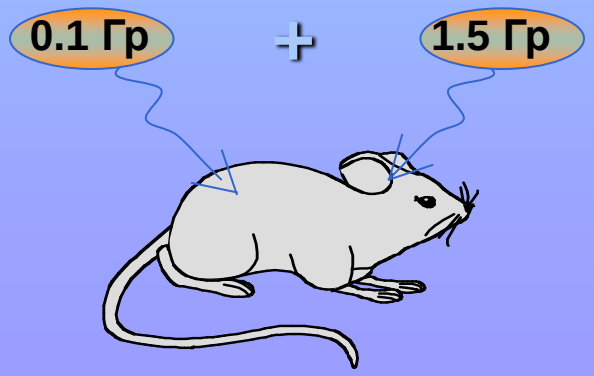
Лазерная хирургия

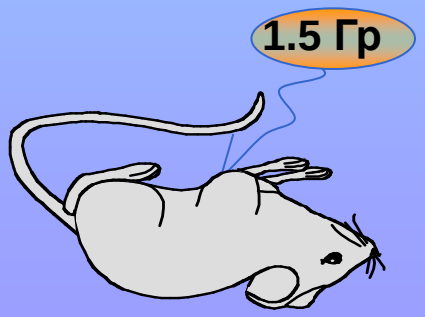
Спектроскопия



Адаптивный ответ

- предварительное облучение объекта в малых адаптирующих дозах приводит к снижению чувствительности к последующему выявляющему воздействию больших доз радиации





Уровни эпигенетической регуляции

три краеугольных эпигенетических механизма регуляции экспрессии генов:
метилирование ДНК, модификация гистонов и РНК-интерференция

1. ДНК (геном)	**Метилирование CpG, повторяющиеся последовательности, мутации отдаленных регуляторных элементов, транспозиции генетического материала**
2. РНК (транскриптом)	**РНК-интерференция: miРНК, siРНК, shРНК и др.; антисмысловые и нетранслирующиеся РНК, регуляторные мотивы пре-мРНК, альтернативный сплайсинг, редакция РНК**
3. Белки (протеом)	**Гистоновый код: метилирование/деметилирование лизина 4, 9 и 27 гистона H3, ацетилирование/деацетилирование гистонов H3 и H4; рибонуклеопротеиновые комплексы**

Радиационно-индуцированный эпигенетический «эффект свидетеля»

«Эффект свидетеля» проявляется на уровне не только конкретного органа, но и всего организма и поддерживается в течение длительного времени.

1. **Глобальное деметилирование генома, в том числе мобильных элементов и повторяющихся последовательностей;**
2. **Снижение уровня *de novo* метилтрансфераз DNMT 3a и 3b;**
3. **Снижение уровня метилсвязывающих белков MeCP2 и MBD2;**
4. **Потеря триметилирования лизина 20 гистона H4 и лизина 27 гистона H3, фосфорилирование серина 139 гистона H2A;**
5. **Гиперэкспрессия *miR*-194, мишенями которой являются *DNMT*3a и *MeCP2*.**

Эпигенетический «эффект свидетеля» поддерживается в культуре клеток не менее 20 пассажей. На уровне организма эффект передается потомству, преимущественно по мужской линии, не менее 2-х поколений.

1. **Снижении общего уровня метилирования генома;**
2. **Снижение уровня *de novo* метилтрансфераз DNMT 3a и 3b;**
3. **Снижение уровня метилсвязывающих белков MeCP2 и MBD2;**
4. **Фосфорилирование серина 139 гистона H2A.**

Гематологический анализ крови

- Состав крови определяли на гематологическом анализаторе крови Beckman Coulter A c *T

- Количество лейкоцитов, 10 8/л
- Количество эритроцитов, 10 12/л
- Гемоглобин, г/л
- Количество тромбоцитов, 10 9/л