



УДК 544.032.65:576.52:57.018.2:577.35.2.5

© 2008

М. И. Корпан, Н. П. Галаган, член-корреспондент НАН
Украины И. С. Чекман, П. М. Бабиц, В. В. Чащина,
В. Л. Осауленко, Н. М. Мошковская, И. В. Гриценко, И. Л. Орел,
В. Фиалка-Мозер

Действие низкоинтенсивного лазерного излучения на мембраны эритроцитов крови человека

The effect of low-intensity laser irradiation (LI) on human erythrocyte membranes was studied, by using densities of 0.5, 1.2, 3.5, and 10 J/cm². The obtained data, concerning the deformation ability of erythrocytes, ζ -potential, and a number of erythrocyte structures able to adsorb dye AB, show that the critical dose of LI in the present experiments was about 3 J/cm². At higher doses of LI, changes of the erythrocyte surface are observed, testifying in favor of changes in membrane structures and their physico-chemical properties.

Низкоинтенсивное лазерное излучение (ЛИ) получило широкое распространение в лечении и реабилитации различных заболеваний [1, 2]. Молекулярные механизмы терапевтического действия ЛИ окончательно не установлены. Высказаны предположения, что хромофорами в красной области спектра могут быть порфирины, а также их производные, молекулы ферментов-антиоксидантов (супероксиддисмутаза, каталаза, церулоплазмин), компоненты дыхательной цепи (флавопротеины и цитохромы), молекулярный кислород [3, 4]. Белковый, липидный и углеводный компоненты биомембраны имеют существенное значение в механизме действия различных внешних факторов [5, 6].

Несмотря на значительное количество исследований по действию ЛИ на клетки крови, остаются недостаточно изученными вопросы, связанные с его действием на параметры поверхности эритроцитов. Поэтому целью проведенного нами исследования было определение влияния возрастающих доз ЛИ на величину заряда эритроцитов крови доноров и возможные изменения в их высокополимерных молекулярных структурах (ВПМС) и форме клеток.

Материалы и методы. Для определения отрицательного заряда клеточной поверхности используют метод микроэлектрофореза клеток [7, 8]. Электрофоретическая подвижность (ЭФП), которая прямо пропорциональна градиенту потенциала внешнего электрического поля, диэлектрической постоянной среды, электрокинетическому потенциалу и обратно пропорциональна вязкости среды. Зависимость между этими величинами определяется

уравнением Смолуховского, предложенным для определения ЭФП коллоидных частиц или клеток:

$$V = \frac{HD\zeta}{4\pi\eta}, \quad (1)$$

где V — электрофоретическая скорость частиц или клеток; H — градиент потенциала внешнего электрического поля (или напряженность внешнего электрического поля); D — диэлектрическая постоянная среды (для воды $D = 81$); ζ — дзета-потенциал, или электрокинетический заряд клетки, или электроотрицательный заряд клеточной поверхности; η — вязкость среды (для воды $\eta \approx 1$ мПа · с); 4π — коэффициент.

Электрофоретическая скорость зависит от расстояния, на которое перемещается частица (мкм) в сетке окуляра-микрометра в одну сторону, а также времени перемещения (с) этого пути. При градиенте потенциала 1 В/см электрофоретическая скорость называется электрофоретической подвижностью (ЭФП), которая имеет размерность $\mu \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, где $\mu = 1 \cdot 10^{-4}$ см, и обычно обозначается U .

Напряженность электрического поля H определяется по формуле

$$H = \frac{ip}{hs}, \quad (2)$$

где i — сила тока, А; p — удельное сопротивление буферного раствора; h — высота камеры, см; s — глубина камеры, см.

Величина отрицательного заряда клеточной поверхности клеток крови ζ (дзета-потенциал) прямо пропорциональна ЭФП и рассчитывается в соответствии с приведенной ниже формулой (3), если известны из опытных данных их ЭФП (U), вязкость (η) и диэлектрическая постоянная среды (D):

$$\zeta = 4\pi\eta \frac{U}{HD}. \quad (3)$$

Величины, входящие в уравнение (1), выражены в абсолютных электростатических единицах. Для получения результатов ζ -потенциала клеток в милливольтгах правая часть уравнения умножается на коэффициент пересчета, равный 300^2 , а подвижность клеток (U) выражается в $\mu/\text{с}$, где $\mu = 1 \cdot 10^{-4}$ см.

При комнатной температуре (18 °С) вязкость изотонического солевого раствора равна 0,01 П, диэлектрическая постоянная раствора составляет 81, уравнение (1) принимает вид

$$\zeta = 14 \cdot U \text{ мВт}. \quad (4)$$

Изменения, происходящие на клеточной поверхности эритроцитов под действием внешнего фактора, можно также оценивать количественно благодаря ее возможности адсорбировать некоторые красители, связывающиеся специфически с олигосахаридными структурами ее рецепторов [7, 8]. Последние в значительной мере определяют физико-химические свойства мембраны (вязкость, эластичность, упругость) [9], от которых зависит форма эритроцитов. Их суспензия состоит из клеток разной формы, основные из которых дискоциты (двояковогнутые клетки), эхиноциты (клетки с выростами), сфероциты (клетки сферической формы) [10]. Нормальный эритроцит человека в стационарных условиях имеет вид дискоцита. Такая форма клетки имеет площадь на 20% больше, чем у сфероцита, что

является более выгодным для реологических свойств крови, а также поддержания кислородного обеспечения и прооксидантно-антиоксидантного состояния организма. По переходу дискоцита через эхиноцит в сфероцит можно судить о состоянии мембраны эритроцита под действием влияющих на нее факторов [11].

Исследования выполнены с суспензиями эритроцитов, стабилизированных раствором “Глюгицир”, крови доноров, которые были получены из Киевского городского центра переливания крови МЗО Украины. В состав “Глюгицира” входили следующие компоненты (дано на объем 50 мл): натрий гидроцитрат (двухзамещенный) для инъекций — 1 г, глюкоза (в пересчете на безводную) — 1,5 г, вода для инъекций — до 50 мл. Для консервирования донорской крови соотношение препарата и крови составляло 1 : 4. В процессе экспериментов использовали также суспензии эритроцитов, отмытых от консерванта, 0,14 М NaCl или 3,8% цитратом натрия. В этих случаях применяли 3-кратное центрифугирование в течение 10 мин при 3000 об./мин.

Количество клеток в 1 мл рассчитывали с использованием камеры Горяева и микроскопа “Биолам” (ЛОМО). Воздействие лазером SV 1417–04N с длиной волны 0,695 мкм на суспензию эритроцитов осуществляли с интенсивностью 0,5, 1, 2, 3, 5 и 10 Дж/см² соответственно в течение 28 с, 56 с, 1 мин 51 с, 2 мин 47 с, 4 мин 38 с, 9 мин 16 с. Мощность излучения лазером равнялась 50 мВт. Доза D рассчитывалась по формуле $D = Pt$, где P — мощность лазера, мВт; t — время излучения.

Для определения заряда клеточной поверхности использовали метод микроэлектрофореза клеток [8]. Эксперименты проводили в растворе 0,19% цитрата натрия с 0,28 М глюкозы.

В исследовании использовали прибор для определения электрофоретической скорости клеток в специально сконструированной ячейке, где с помощью секундомера и окулярной сетки измеряется под микроскопом скорость перемещения каждой клетки в электрическом поле. В состав установки входили микроскоп, электрофоретическая ячейка, система подачи суспензии клеток в растворе, прибор для проведения электрофоретических исследований, видеокамера и персональная ЭВМ. В качестве микроскопа использовали микроскоп МБИ-3 с объективом 20× с фокусным расстоянием 1,6 мм, окуляром 10×, общим оптическим увеличением 300×.

Для удобства работы изображение клеток при помощи видеокамеры Mustek G-Smart Mini, установленной на окуляре микроскопа с помощью специального переходного устройства, передавалось в ПЭВМ, на экране дисплея которой возможна индикация изображения движения клеток под действием электрического поля, а также запоминание этого видеоизображения на жестком диске.

Суспензию клеток в обозначенном выше растворе вводили в ячейку, куда подавалось напряжение 10 В/см². Путь, пройденный клеткой, как правило, составлял 16 мкм, что прослеживалось с помощью сетки, вмонтированной в микроскоп. Длительность пробега составляла 4–5 с. Измерения проводили, периодически изменяя направленность движения клеток, что достигалось сменой направления поля. Вычисляли среднее из 40–60 измерений, сделанных в равном количестве в одну и другую сторону.

Величину электрокинетического заряда клеток (ζ -потенциал) рассчитывали из ЭФП клеток в соответствии с формулами, приведенными выше.

Для оценки изменений в ВПМС использовали метод [9] с применением 0,005%-го раствора красителя альцианового синего (АС) (“Sigma-Aldrich Chemie GmbH”, Германия), приготовленного на 0,9%-м растворе NaCl. Метод состоит в определении концентрации АС

в растворе до и после окрашивания клеток и расчете количества, адсорбированного их поверхностными структурами красителя. Количество АС в растворе до и после окрашивания клеток (соответственно C_0 и C) определяли по его оптической плотности при $\lambda = 617$ нм на спектрофотометре "Specord M-40". Концентрацию АС рассчитывали по калибровочным кривым. Расчет количества АС, сорбированного суспензией эритроцитов (Q_1), проводили согласно [7] по формуле

$$Q_1 = C_0 - C, \quad (5)$$

где Q_1 рассчитывалось в граммах или в процентах АС в исходном растворе. Величину адсорбции АС в расчете на одну клетку (Q_2) суспензии эритроцитов до и после воздействия на них лазера с определенной интенсивностью рассчитывали по формуле

$$Q_2 = \frac{C_0 - C}{nV}, \quad (6)$$

где n — количество клеток в 1 мл; V — объем окрашиваемой суспензии (мл), который определяется емкостью кювет спектрофотометра.

Форму эритроцитов оценивали с применением той же системы визуализации, что и в экспериментах с микроэлектрофорезом клеток с той лишь разницей, что в данном случае использовали инвертированный микроскоп МБИ-12, позволивший применить метод фазового контраста. Исследовали форму эритроцитов без (контрольные пробы) и после (опытные пробы) облучения лазером различной интенсивности. Суспензию, содержащую не более 10^8 кл/мл, отмывали от консерванта, как указывалось выше, с использованием 0,14 М NaCl. Подсчитывали под микроскопом количество следующих форм клеток: дискоцитов, эхиноцитов и сфероцитов. Рассчитывали также соотношение количества дискоцитов к количеству сфероцитов.

Результаты экспериментов обрабатывали методами описательной статистики, дисперсионного и регрессионного анализа [12].

Результаты исследования и их обсуждение. В результате определения электрофоретического потенциала установлено, что с увеличением интенсивности ЛИ существует определенная тенденция к уменьшению значений стандартного отклонения электрокинетического потенциала от его контрольного значения. Данные регрессионного анализа подтверждают вывод об уменьшении электрофоретического потенциала при увеличении дозы ЛИ. Наибольшая разница в значениях потенциала между средними значениями контрольных и опытных суспензий эритроцитов наблюдается при интенсивности ЛИ 5 Дж/см² (табл. 1). Не исключено, что под действием ЛИ происходила фотохимическая диссоциация различных молекулярных комплексов на поверхности эритроцитов и частичное разрушение гликопротеинов ВПМС, аналогично тому, как это наблюдается при действии УФ облучения на эритроциты [6]. Первоначальное снижение электрофоретического потенциала на поверхности и дальнейшее его увеличение при увеличении дозы ЛИ до 10 Дж/см², возможно, зависит от перераспределения количества различных форм эритроцитов, что подтвердилось дальнейшими экспериментами (см. ниже). Однако вопрос требует дополнительного изучения, поскольку эффект лежит на грани чувствительности эксперимента.

В табл. 1 представлены также данные по действию ЛИ на сорбционную способность красителя АС эритроцитами. С помощью дисперсионного анализа установлено, что разнородность экспериментального материала значительно существеннее влияет на показатель Q_2 ,

чем интенсивность ЛИ. Однако следует отметить, что интенсивность ЛИ существенно влияет на дисперсию результатов: при увеличении ЛИ от 0,5 до 5 Дж/см². При дальнейшем увеличении интенсивности ЛИ наблюдается стабилизация дисперсии. Следует отметить тот факт, что именно начиная с дозы ЛИ 3 Дж/см², наблюдаем значения Q , отличающиеся от контроля. Хотя здесь не выявлены статистически значимые различия, имеется некоторая тенденция в снижении сорбционной способности красителя поверхностными структурами клетки, что согласуется с предположениями, высказанными при анализе величин ζ -потенциала.

Как следует из табл. 1, в зависимости от интенсивности ЛИ изменяется соотношение различных форм эритроцитов. Об этом свидетельствуют также средние значения количества клеток, приведенные в табл. 2.

На основании анализа проведенных исследований можно сделать заключение, что количество дискоцитов сначала уменьшается в сравнении с контролем, а затем возрастает и при увеличении интенсивности излучения до 10 Дж/см² превышает контрольные значения. Об этом свидетельствуют также и соотношение количества дискоцитов и сфероцитов (см. табл. 2), и результаты попарного сравнения части дискоцитов при разных значениях интенсивности ЛИ со значениями контроля (табл. 3). Таким образом, при интенсивности ЛИ 0,5, 1 и 2 Дж/см² количество дискоцитов заметно уменьшается в сравнении с контролем, а при интенсивности 10 Дж/см² — существенно увеличивается.

Начиная с дозы ЛИ 3 Дж/см² отмечается увеличение количества дискоцитов и сокращение количества сфероцитов. Известно [11], что трансформация эритроцита от дискоцита в сфероцит через промежуточные формы (эхиноциты) свидетельствует о нарушениях

Таблица 1. Значения биофизических параметров поверхности эритроцитов крови доноров человека (электрофоретический потенциал, параметр Q_2 , Д/С — отношение числа дискоцитов и сфероцитов) при действии на них ЛИ различной интенсивности

Интенсивность ЛИ, Дж/см ²	ζ -потенциал, мВ	$Q \cdot 10^{-10}$, г	Д/С
Контроль	29,03 ± 2,06	0,30 ± 0,078	1,07
0,5	28,15 ± 1,83	0,30 ± 0,078	0,67
1	28,08 ± 1,49	0,27 ± 0,083	0,44
2	28,02 ± 1,95	0,30 ± 0,094	0,73
3	28,01 ± 1,76	0,27 ± 0,110	1,22
5	27,51 ± 1,41	0,25 ± 0,118	1,32
10	28,16 ± 1,29	0,29 ± 0,117	1,70

Таблица 2. Средние значения разных типов эритроцитов (количество и %) в зависимости от интенсивности ЛИ

Типы эритроцитов	Интенсивность ЛИ, Дж/см ²													
	Контроль		0,5		1		2		3		5		10	
	Шт.	%	Шт.	%	Шт.	%	Шт.	%	Шт.	%	Шт.	%	Шт.	%
Дискоциты	134	38,67	86	29,90	58	22,44	77	31,73	131	39,76	134	41,50	114	44,64
Эхиноциты	66	18,82	59	20,25	43	18,18	48	18,35	68	19,22	58	17,52	37	16,64
Сфероциты	121	35,89	138	44,32	125	50,26	132	43,32	109	32,61	101	31,46	52	26,23
Деформованные эритроциты	22	6,15	20	5,42	17	6,67	18	6,60	33	7,89	26	7,25	20	8,87
Тени эритроцитов	2	0,47	0	0,11	4	2,46	3	0,92	1	0,52	10	2,27	9	3,62

Таблица 3. Попарное сравнение вклада дискоцитов в контрольной и опытной суспензии эритроцитов при действии различных доз ЛИ

Пара, которая сравнивается	Разница, %	Стандартная ошибка разницы, %	Критерий χ^2	Достигнутый уровень значимости (p)
Контроль — опыт, 0,5 Дж/см ²	10,46*	3,69	7,408	0,0065
Контроль — опыт, 1 Дж/см ²	15,36*	3,76	14,802	0,0001
Контроль — опыт, 2 Дж/см ²	11,14*	3,75	8,044	0,0046
Контроль — опыт, 3 Дж/см ²	0,54	3,71	0,004	0,9473
Контроль — опыт, 5 Дж/см ²	-1,89	3,77	0,178	0,6729
Контроль — опыт, 10 Дж/см ²	-10,30*	4,20	5,589	0,0181

*Разница является статистически достоверной при уровне значимости 0,05.

в мембране, в частности изменении ее эластичности, которое способствует разрыву клетки и наступлению гемолиза. В нашем исследовании увеличение количества теней эритроцитов, которое наблюдается при сокращении числа сфероцитов при более высоких дозах ЛИ, сопровождалось ростом количества дискоцитов, которые являются физиологически более полноценными клетками, способными обеспечить нормальное функционирование всей ткани. Возможно, что наблюдаемый нами рост количества дискоцитов при дозах выше 3 Дж/см² происходит за счет гемолиза определенного числа сфероцитов. Изменение отношения числа дискоцитов к числу сфероцитов (см. табл. 2) свидетельствует о том, что с увеличением интенсивности ЛИ с эритроцитами крови доноров происходят такие изменения, когда деформированные клетки разрушаются, а за счет этого увеличивается количество дискоцитов. Этим можно объяснить и увеличение ζ -потенциала при самой высокой дозе ЛИ, а также некоторое повышение сорбционной способности АС структурами клеточной поверхности эритроцита.

От деформируемости эритроцитов зависит кислородтранспортная функция крови и обеспечение достижения полезного приспособительного результата системы транспорта кислорода, что важно для улучшения функциональных показателей организма. Ухудшение этого показателя свидетельствует о тенденции к снижению количества кислорода, которое может диффундировать от капилляров в окружающую ткань. Проведенные исследования показали, что наибольшая деформируемость эритроцитов происходит в пределах доз ЛИ 0,5–3 Дж/см², что в организме может сопровождаться активацией системы транспорта кислорода. При дальнейшем повышении дозы ЛИ фактор деформируемости эритроцитов снижается, что приводит к увеличению числа дискоцитов, так называемых “эритроцитов в покое”. Количественное их повышение, наблюдаемое при более высоких дозах ЛИ (5–10 Дж/см²) будет приводить к затруднениям проникновения эритроцитов в капилляры, из-за чего будет ухудшаться и поступление кислорода в ткани, поскольку для проникновения в капилляры предпочтительны деформированные формы эритроцитов. В проведенных исследованиях имело место увеличение числа дискоцитов за счет более чувствительных к внешним воздействиям других форм эритроцитов.

Таким образом, данные по деформируемости эритроцитов, а также величине ζ -потенциала и количеству структур поверхности эритроцитов, способных адсорбировать краситель АС, показывают, что пороговая доза ЛИ составляет около 3 Дж/см². При более высоких дозах ЛИ наблюдаются изменения поверхности эритроцитов, свидетельствующие об изменениях структур мембран и их физико-химических свойств.

1. *Козлов В. И., Буйлин В. Н.* Лазеротерапия. – Москва: Медицина, 1993. – 149 с.
2. *Fialka-Moser V., Crevena R., Korpan M. et al.* Cancer rehabilitation. Particularly with aspects on physical impairment // *J. Rehabil. Med.* – 2003. – **35**, No 4. – P. 221–230.
3. *Клебанов Г. И.* Мембранные механизмы фотобиологического действия низкоинтенсивного лазерного излучения // *Мембраны.* – 2005. – № 6. – С. 87–97.
4. *Владимиров Ю. А.* Лазерная терапия: настоящее и будущее // *Соросовский образовательный журн.* – 1999. – № 12. – С. 2–8.
5. *Геннис Р.* Биомембраны. Молекулярная структура и функции. – Москва: Мир, 1997. – 622 с.
6. *Арцишевская Р. А., Самойлова К. А.* Функциональные и структурные изменения поверхности эритроцитов человека после облучения УФ лучами разной длины волны // *Цитология.* – 1983. – **25**, № 12. – С. 1387–1392.
7. *Козинец Г. И.* Интерпретация анализов крови и мочи. Клиническое значение анализов. – С.-Петербург: Саммит, 1997. – 123 с.
8. *Харамоненко С. С., Ракитянская А. А.* Электрофорез клеток крови в норме и патологии. – Минск: Беларусь, 1974. – 143 с.
9. *Bellary S. S., Arden W. W., Schwarz R. W. et al.* Effect of lipopolysaccharide, leukocytes, and monoclonal antilipid A antibodies on erythrocyte membrane elastance // *Shock.* – 1995. – **3**, No 2. – P. 778–783.
10. *Bessis M.* Red cell shapes: An illustrated classification and its rationale // *Nouv. rev. franç. hématol.* – 1972. – No 12(6). – P. 721–745.
11. *Гриценко І. В., Осауленко В. Л., Ройтман Є. М., Ляшенко Т. І., Галаган Н. П.* Мікроскопічні дослідження дії сорбенту “Силікс” на еритроцити крові людини // *Клініч. та експерим. патологія.* – 2004. – **3**, № 2, ч. 2. – С. 526–528.
12. *Гайдышев И.* Анализ и обработка данных: Специальный справочник. – С.-Петербург: Питер, 2001. – 752 с.

*Венский медицинский университет, Австрия
 Институт химии поверхности им. А. А. Чуйко
 НАН Украины, Киев
 Национальный медицинский университет
 им. А. А. Богомольца, Киев*

Поступило в редакцию 28.01.2008