

А. Ф. Мунзарова^{1,2}, Е. Л. Зеленцов³, А. С. Козлов¹

¹ Институт химической кинетики и горения СО РАН
ул. Институтская, 3, Новосибирск, 630090, Россия

² Новосибирский государственный университет
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия

³ ОАО «МЦ Интегральная медицина»
Красный пр., 54, Новосибирск, 630090, Россия

E-mail: alina.munzarova@gmail.com

ВОЗДЕЙСТВИЕ ТЕРАГЕРЦОВОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА АГРЕГАЦИЮ ЭРИТРОЦИТОВ ЗДОРОВОЙ КРОВИ*

Работа посвящена актуальному направлению исследований – взаимодействию терагерцового излучения и биологических структур. Рассматривается влияние терагерцового излучения Новосибирского лазера на свободных электронах на агрегацию и морфологию эритроцитов подготовленных образцов крови *in vitro*. Определена безопасная мера воздействия лазерного излучения на эритроциты, выявлены специфические эффекты, возникающие в эритроцитах крови при действии терагерцового излучения и приводящие к неразрушающей индивидуальной клетки дезагрегации эритроцитов. Разработана методика пробоподготовки исследуемых объектов, получения и анализа микрофотографий на основе классифицирования эритроцитов и частиц модельной коллоидной системы по площади на классы, соответствующие индивидуальным и агрегированным частицам. Установлено, что 5-секундная экспозиция пробы эритроцитов объемом 200 мкл терагерцовым излучением с длиной волны 130–146 мкм и средней плотностью мощности 8–10 Вт/см² не приводит к видимым изменениям морфологии клеток и количества агрегированных частиц. Экспозиция более 25 с может приводить к лизису эритроцитов. При экспозиции в течение 10–15 с среднее количество эритроцитов в составе агрегатов понижается на 10–15 %, в ряде случаев – до 80 %.

Ключевые слова: терагерцовое излучение, агрегация эритроцитов, лазер на свободных электронах.

Введение

Одной из главных причин недостатка кислорода в биологических тканях является нарушение циркуляции крови в сосудах и капиллярах. За доставку кислорода в ткани и органы тела отвечают эритроциты, содержащие белок гемоглобин, связывающийся с кислородом. Таким образом, нормальное кислородное питание тканей зависит от состояния и поведения красных кровяных клеток. Эритроциты обладают способностью агрегировать, что является естественным феноменом кровообращения, однако в ряде

случаев это может иметь критические последствия.

Феномен агрегации эритроцитов был описан в конце XIX – начале XX в. в работах С. М. Лукьянова (1883 г.) [1], С. Д. Балаховского (1928 г.) [2]. Агрегация красных кровяных телец в присутствии фибриногена изучалась R. Fahraeus в 1929 г. [3], а воздействие на этот процесс декстранов и последствия влияния агрегации эритроцитов на микроциркуляцию описаны G. Thorsen и H. Hunt в 1950 г. [4]. Эра исследования внутрисосудистой агрегации эритроцитов как формы патологии началась с работ

* Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП СЦСТИ.

М. Knisely [5–7], который обратил внимание на то, что в большинстве тяжелых патологических состояний кровь меняет свои свойства и стекает по стенкам пробирки неравномерно, а подобно грязи или илу. Одновременно он наблюдал в сосудах прерывистый кровоток с образованием эритроцитарных агрегатов. Это явление получило название «заиливание крови» (blood sludge).

Появление в крови большого количества агрегатов различной формы и величины существенно отражается на состоянии микроциркуляции и, следовательно, на функционировании всех органов и систем [8].

Подходы традиционной медицины к «борьбе» с агрегацией эритроцитов связаны с введением в организм лекарственных веществ либо проведением интервенционных мероприятий, что, безусловно, может быть оправданно в критических ситуациях. Современный прогресс в развитии мощных источников неионизирующего терагерцового излучения открывает широкий простор исследователям в развитии физиотерапевтических методов воздействия на живые системы. На сегодняшний день в свете активного развития средств дистанционного и неразрушающего контроля (сканеров), использующих терагерцовую область частот, все более актуальным становится исследование воздействия терагерцового излучения на биологические системы.

Таким образом, были предприняты попытки исследования воздействия излучения на клеточные популяции и биомолекулы, которые показали, что терагерцовое излучение может вызывать специфические последствия. Исследования [8–11] показали, что при экспозиции биомолекулы могут сохранять свою химическую структуру и биологические функции. Огромный интерес представляет выявление подобных эффектов для такой сложно организованной формы организма, как клетка крови.

В настоящей работе рассматривается влияние терагерцового излучения Новосибирского лазера на свободных электронах на агрегацию и морфологию эритроцитов подготовленных образцов крови *in vitro*.

Методика эксперимента

Производился забор периферической крови здоровых добровольцев, образцы подготавливались по стандартной методике.

В ходе исследований параллельно был поставлен эксперимент на модельной коллоидной системе биологической жидкости на основе животных жиров, в связи с тем, что модельная система достаточно стабильна и эксперименты с ней более воспроизводимы.

Контрольные образцы как крови, так и модельной системы претерпевали термическое (не лазерное) нагревание до температуры тела и ультразвуковое воздействие (44 кГц, 55 Вт/л). Остальные образцы предназначались для последующего воздействия терагерцового излучения с различным временем экспозиции не сфокусированным пучком на длинах волн 130–200 мкм и средней плотности мощности 10 Вт/см², при различном времени выдержки крови до облучения, а до гистологического исследования.

Все образцы исследовались при помощи оптической микроскопии при увеличении 300–630 раз, в нативной форме. После получения изображений производили их обработку в компьютерной программе с целью получения статистически достоверных данных соотношения количества одиночных эритроцитов и их агрегатов.

Результаты и обсуждение

Определено оптимальное время экспозиции для данной мощности лазера, которое составило 10–15 с. При экспозиции менее 5 с дезагрегации эритроцитов отмечено не было, при экспозиции более 20–25 с отмечен лизис эритроцитов вследствие разрушения мембран клеток. Количество клеток в агрегатах при времени экспозиции 10–15 с в среднем понижается на 10–15 %, при этом число отдельных эритроцитов пропорционально увеличивается. Ниже (рис. 1) приведены снимки, полученные в результате микроскопического исследования эритроцитов. Следует отметить, что в зависимости от времени экспозиции менялась морфология отдельных эритроцитов. При экспозиции 5 с не было зафиксировано никаких видимых изменений морфологии клеток: эритроциты сохраняли форму диска, как и в контрольном образце. При увеличении времени экспозиции наблюдался сфероцитоз, т. е. эритроциты принимали овальную форму, но их целостность сохранялась. После 25 с экспозиции можно наблюдать лизис эритроцитов.

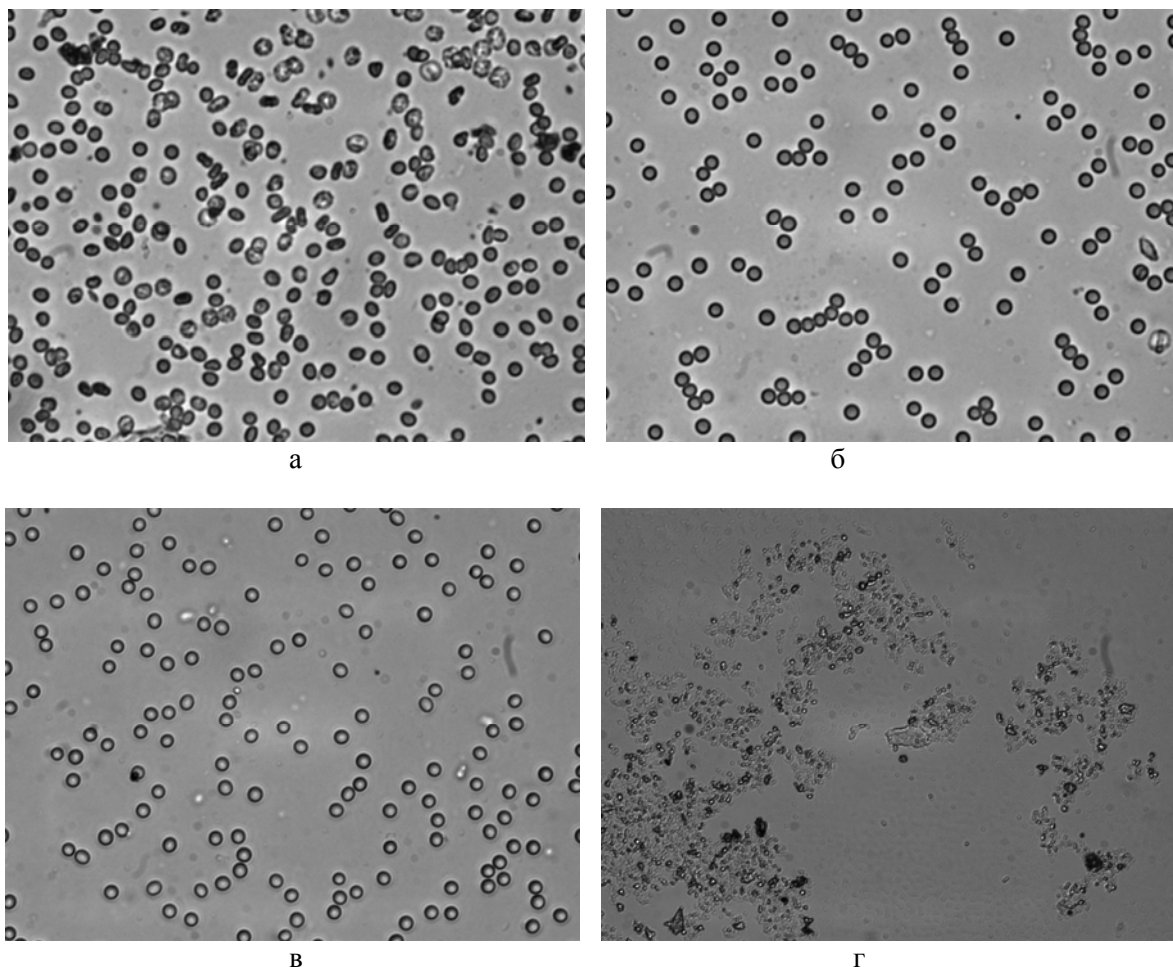


Рис. 1. Снимки образцов крови, полученные при помощи оптической микроскопии при увеличении в 400 раз: а – контрольный образец; б–г – образцы 5-, 15-, 25-секундной экспозиции соответственно. При 25-секундной экспозиции терагерцовым излучением с длиной волны 130 мкм происходит лизис эритроцитов

Таким образом, для индивидуальных эритроцитов оптимальным временем экспозиции, при котором не наблюдается видимых изменений морфологии клеток, можно считать 0–15 с. За это время не происходит видимых повреждений клеток, но наблюдаются изменения в степени агрегации эритроцитов.

На рис. 2 представлены изображения, полученные после обработки микроснимков, а также приведен график (рис. 3) зависимости количества эритроцитов в агрегатах от времени экспозиции.

Приведенные результаты показывают, что процентное содержание агрегированных эритроцитов в крови уменьшается со временем. Минимальная степень агрегации достигается при 25-секундной экспозиции. Таким образом, экспозиция образцов тера-

герцовым излучением сказывается на снижении степени агрегации. Количество клеток в агрегатах при времени экспозиции от 5 до 25 с в среднем понижается на 10–15 %, при этом число индивидуальных эритроцитов пропорционально увеличивается.

В эксперименте с модельной коллоидной системой показано, что образцы после 5–7 с экспозиции демонстрируют снижение количества агрегированных частиц модельного коллоида до 20 %.

После программной обработки снимков, полученных при помощи оптической микроскопии, можно наблюдать последствия взаимодействия модельной системы с терагерцовым излучением (рис. 4).

Об эксперименте с модельной коллоидной системой можно сделать следующие выводы. В зависимости от времени воздей-

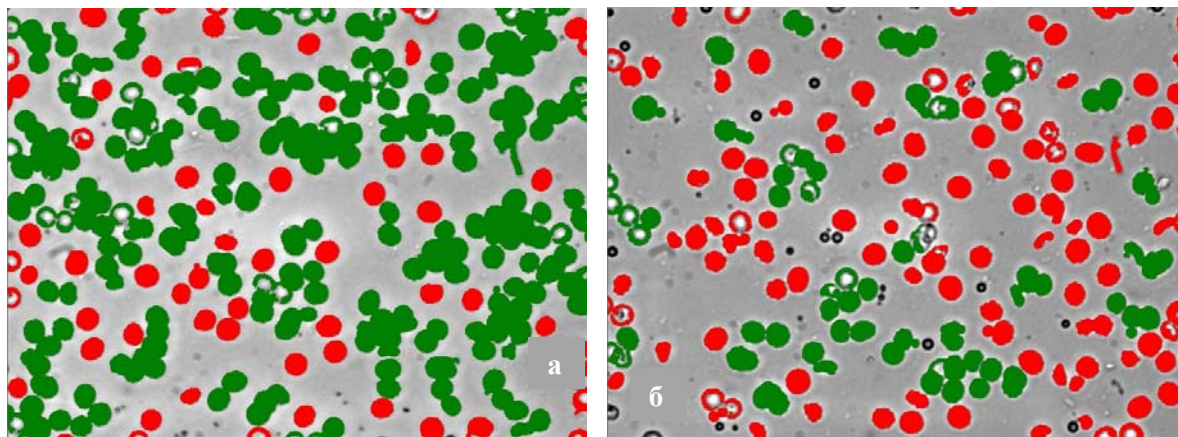


Рис. 2. Обработанные микрофотографии образцов крови: *а* – контроль; *б* – 5 с; *в* – 15 с. Объекты разделены на два класса по площадям: красным цветом обозначены индивидуальные эритроциты, зеленым – агрегированные. Степень агрегации эритроцитов: контрольный образец – 25 %, образец после 5-секундной экспозиции – 27 %, образец после 15-секундной экспозиции – 16 %

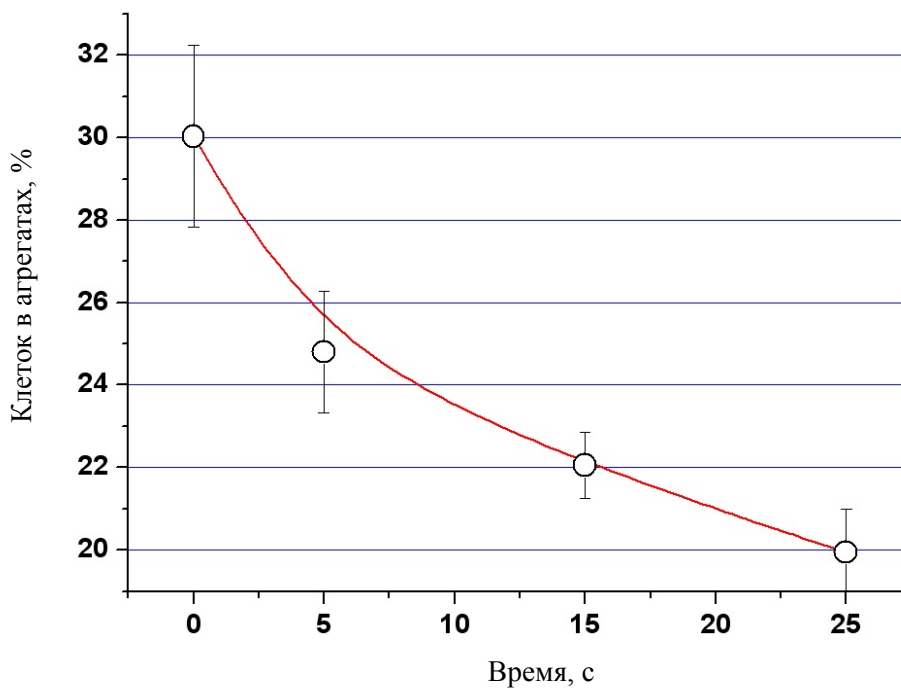


Рис. 3. Изменение количества агрегированных эритроцитов с ростом времени воздействия на них терагерцовым излучением с длиной волны 130 мкм. Указано среднее квадратическое отклонение

ствия терагерцового излучения на систему возникают различные последствия. В отличие от контрольного образца, который не подвергался экспозиции, образцы после 5 и 7 с экспозиции демонстрируют наименьшую степень агрегации частиц. После 15 с экспозиции терагерцовым излучением наблюдается повышение степени агрегации коллоидных частиц.

Предположение о причинах воздействия терагерцового излучения на объекты в водной среде

Вода в жидкой фазе является сильным поглотителем терагерцового излучения. Из-за сильного поглощения водой терагерцовое излучение проникает внутрь образца крови

не глубже десятка микрон, а значит, не воздействует на эритроциты непосредственно. Учитывая, что излучение ЛСЭ – импульсное (5,6 МГц), и мощность в импульсе может достигать до 1 МВт, было выдвинуто предположение, что воздействие на эритроциты вызвано прохождением мощных ультразвуковых волн.

Результаты специально проведенного эксперимента показали, что пьезомикрофон, помещенный в кювету с дистиллированной водой, регистрировал сигнал при воздействии терагерцового излучения. Сигнал от пьезомикрофона поступал на цифровой осциллограф. Записывалось одновременно два канала: с микрофона (сигнал) и с металлического фланца (шум). При отсутствии излучения частотные спектры обоих каналов идентичны.

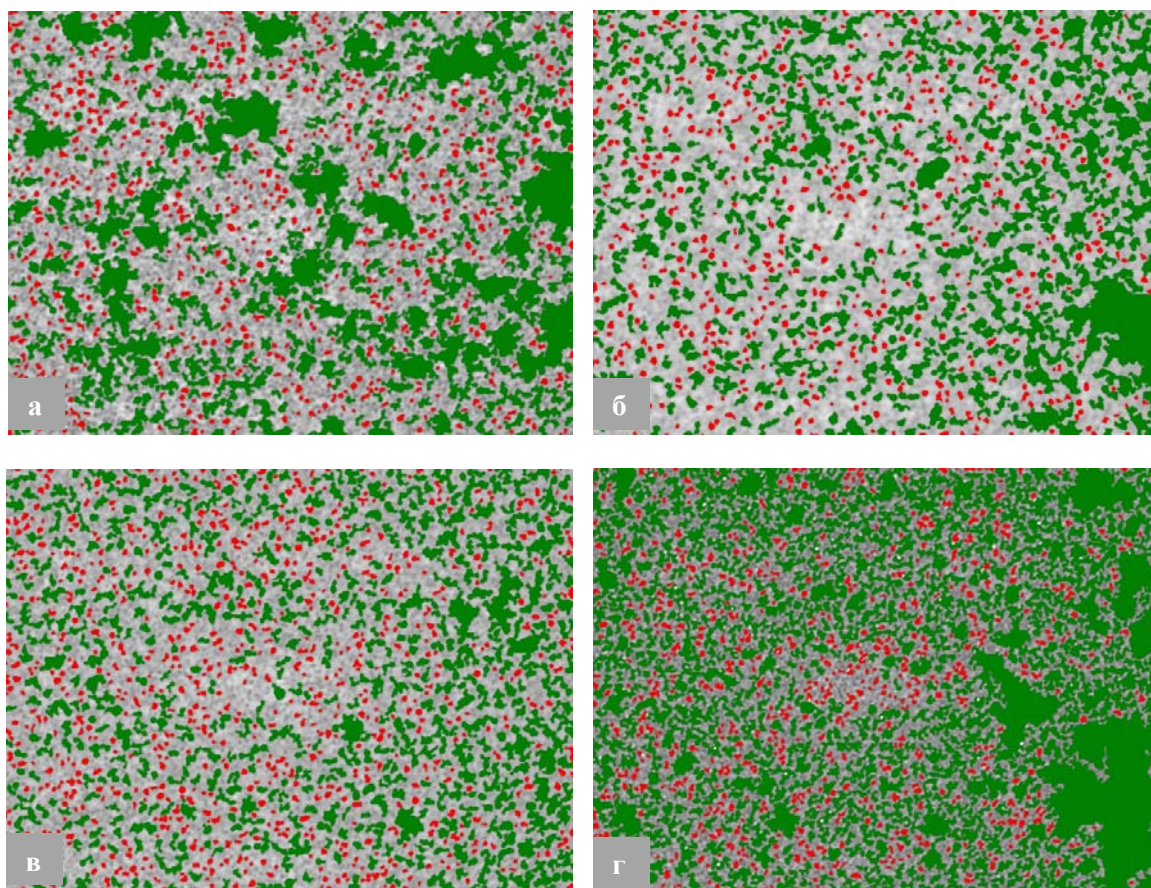


Рис. 4. Обработанные микрофотографии образцов модельной коллоидной системы: контрольный образец (а) и образцы после 5-, 7-, 15-секундной экспозиции (б, в и г соответственно). Объекты разделены на два класса по площадям: индивидуальные и агрегированные частицы. Количество частиц в агрегатах: контрольный образец – 33 %; после 5-секундной экспозиции – 20 %; после 7-секундной экспозиции – 17 %; после 15-секундной экспозиции – 39 %

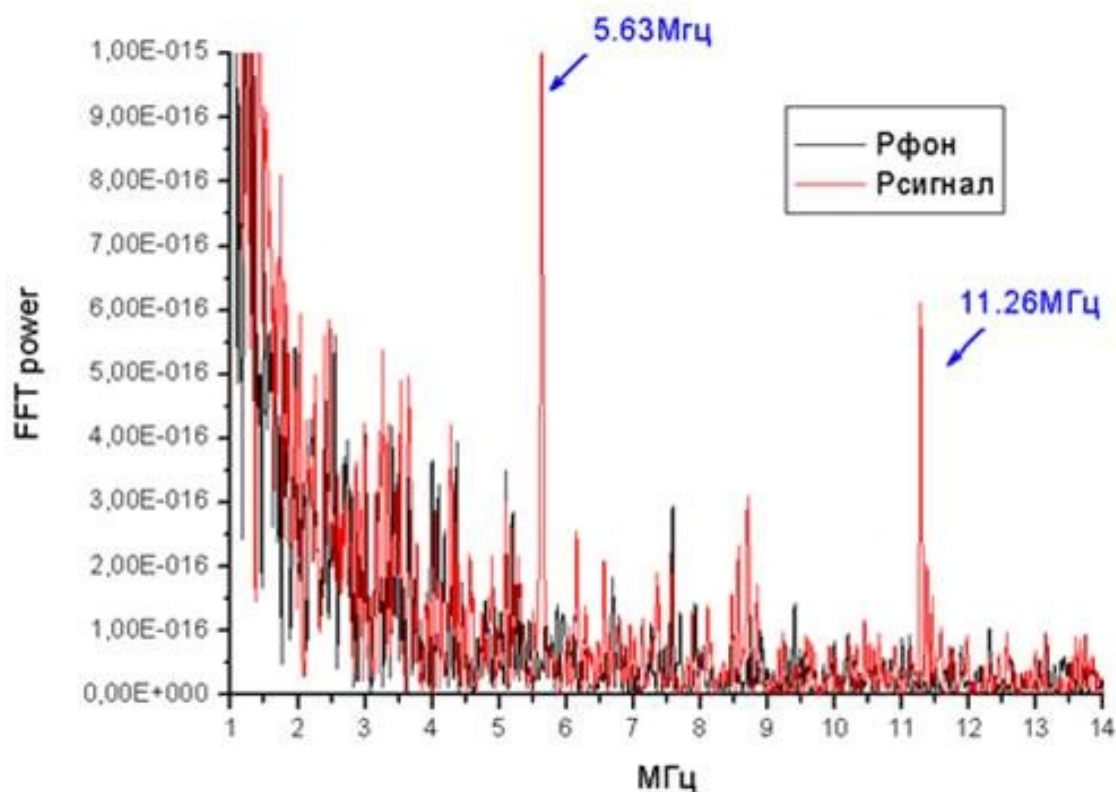


Рис. 5. Частотный спектр сигнала при экспозиции (сигнал) и без экспозиции (фон). (Быстрое преобразование Фурье (англ. FFT) сигнала с пьезомикрофона. По горизонтали отложена частота в МГц, по вертикали – мощность сигнала)

На рис. 5 представлен фоновый сигнал и сигнал от пьезомикрофона при экспозиции лазером. Отчетливо видны пики на собственной частоте 5,6 МГц – частоте следования импульсов излучения лазера на свободных электронах, и на ее гармонике – 11,26 МГц. Таким образом, при помощи пьезомикрофона уверенно регистрируется звуковая волна с частотой 5,6 МГц. Значит, можно предположить, что в экспериментах с образцами крови эффект дезагрегации клеток достигался действием ультразвуковых волн, причем в контрольных образцах крови, которые подвергались независимому термическому нагреву и ультразвуковому воздействию (44 кГц, 55 Вт/л), такого эффекта не наблюдалось.

Заключение

В ходе проведенных экспериментов с кровью и модельной коллоидной системой продемонстрирован аналогичный эффект

дезагрегации частиц. В то же время имеются и некоторые отличия, связанные с различиями в свойствах мембран эритроцитов и жировых частиц. Таким образом, терагерцовое облучение образцов коллоидных растворов сказывается на снижении степени агрегации частиц, в частности эритроцитов.

В результате проведенной работы отработана методика пробоподготовки исследуемых объектов, получения и анализа микрофотографий на основе классифицирования эритроцитов и частиц модельной коллоидной системы по площади на классы, соответствующие индивидуальным и агрегированным частицам. Разработана методика изготовления модельной водно-жировой суспензии с различной долей агрегированных частиц. В процессе исследования образцов периферической крови установлено, что 5-секундная экспозиция пробы эритроцитов объемом 200 мкл терагерцовым излучением с длиной волны 130–146 мкм и

средней плотностью мощности 8–10 Вт/см² не приводит к видимым изменениям морфологии клеток и количества агрегированных частиц. Экспозиция более 25 с может приводить к лизису эритроцитов.

При экспозиции образцов крови объемом 200 мкл терагерцовым излучением с длиной волны 130–146 мкм в течение 10–15 с среднее количество эритроцитов в составе агрегатов понижается на 10–15 %, в отдельных экспериментах – до 80 %. Количество агрегированных частиц модельного коллоида снижается до 20 %.

Список литературы

1. Лукьянов С. М. К вопросу о функциональных расстройствах сердца по отдельным полостям. СПб., 1883.
2. Балаховский С. Д. Реакция оседания эритроцитов. М.; Л.: ГИЗ, 1928. 149 с.
3. Fahraeus R. The Suspension Stability of the Blood // *Physiol. Rev.* 1929. Vol. 9. P. 241.
4. Thorsen G., Hint H. Aggregation, Sedimentation and Intravascular Sludging of Erythrocytes // *Acta Chir. Scand. Suppl.* 1950. P. 1–51.
5. Knisely M. H., Bloch E. H., Eliot T. S. Sludged Blood in Traumatic Shock // *Arch. Surg.* 1945. Vol. 51. P. 220.
6. Knisely M. H., Bloch E. H., Eliot T. S., Warner L. Sludged Blood // *Science.* 1947. P. 406–431.
7. Knisely M. H. Handbook of Physiology. Section 2 (Circulation). Baltimore: Williams & Wilkins, 1965. Vol. 3.
8. Engeset J., Dhall D. P., Matheson N. A. Measurement of Red Cell Aggregation and Dispersion // *Bibl. Anat.* 1969. Vol. 10. P. 80–84.
9. Ольшевская Ю. С., Козлов А. С., Петров А. К., Запара Т. А., Ратушняк А. С. Влияние терагерцового (субмиллиметрового) лазерного излучения на проницаемость клеточных мембран // *Вестн. Новосиб. гос. ун-та. Серия: Физика.* 2010. Т. 5, вып. 4. С. 177–181.
10. Zelentsov E. L., Sazhina T. V., Kozlov A. S., Petrov A. K. Interaction of the Terahertz Laser Irradiation with a Mammal Skeletal Muscle // *Int. Symp. «Terahertz Radiation: Generation and Application».* Novosibirsk, 2010.
11. Петров А. К., Козлов А. С., Тарабан М. Б., Горячковская Т. Н., Мальшикин С. Б., Попик В. М., Пельтек С. Е. Мягкая абляция биологических объектов под воздействием субмиллиметрового излучения ЛСЭ // *Докл. Академии наук.* 2005. Т. 404, № 5. С. 698–700.
12. Беспалов В. Г., Городецкий А. А., Грачев Я. В., Козлов С. А., Смолянская О. А. Влияние импульсного широкополосного терагерцового излучения на биологические ткани // *Научная сессия МИФИ-2010: Сб. науч. тр. М., 2010. Т. 3. С. 225–228.*

Материал поступил в редколлегию 24.12.2012

A. F. Munzarova, A. S. Kozlov, E. L. Zelentsov

EFFECT OF TERAHERTZ LASER IRRADIATION ON ERYTHROCYTE AGGREGATION IN HEALTHY BLOOD

The study is devoted to a topical field of research – the interaction of terahertz radiation with biological structures. This paper examines the impact of the Novosibirsk terahertz free electron laser on the aggregation and morphology of red blood cells of prepared blood samples in vitro. The aim of this study was to determine the safe action of the laser radiation on red blood cells and the identification of specific effects that arise in the erythrocytes under the action of terahertz radiation and lead to non-destructive disaggregation of individual cells of erythrocytes. The methodology of sample preparation of the objects, obtaining and analyzing micrographs based on the classification of red blood cells and particles model colloidal system of the area into classes corresponding to the individual and aggregate particles, was developed. Found that 5sec exposure of 200 mkl sample of red blood cells by the terahertz radiation with wavelength of 130–146 mm and an average power density of 8–10 W/cm² does not lead to visible changes in cell morphology and the number of aggregated particles. The exposure of more than 25 seconds can lead to lysis of erythrocytes. When exposed for 10–15 sec the average number of erythrocytes in the aggregates is reduced by 10–15 % in some cases – up to 80 %.

Keywords: terahertz radiation, erythrocyte aggregation, free electron laser.