

УДК 575.224:599.323.4

## ФЕМТОСЕКУНДНОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ АКТИВИРУЕТ ЕСТЕСТВЕННУЮ ЗАЩИТУ ОРГАНИЗМА МЫШЕЙ *in vivo*

© 2021 г. Член-корреспондент РАН Г. Р. Иваницкий<sup>1</sup>, С. И. Заичкина<sup>1</sup>, А. Р. Дюкина<sup>1,\*</sup>, В. И. Юсупов<sup>2</sup>, С. С. Сорокина<sup>2</sup>, О. М. Розанова<sup>1</sup>, Е. Н. Смирнова<sup>1</sup>, Д. П. Ларюшкин<sup>1</sup>, Н. В. Минаев<sup>2</sup>, М. М. Поцелуева<sup>1</sup>

Поступило 19.06.2021 г.  
После доработки 29.07.2021 г.  
Принято к публикации 29.07.2021 г.

Показана возможность индукции цитогенетических повреждений в костном мозге, изменения точности лимфоидных органов и состава крови у мышей, облученных низкоинтенсивным фемтосекундным лазерным излучением при плотности потока энергии 5.1, 10.4 и 52 мДж/см<sup>2</sup> (0.5 мВт в течение 5, 10 и 50 с) *in vivo*. С помощью теста “радиационный адаптивный ответ” (0.1 Гр + 1.5 Гр) было обнаружено, что при воздействии на мышей фемтосекундным лазерным излучением в низких дозах наблюдается защитный эффект, т.е. активация естественной защиты организма в том же узком диапазоне плотности потока энергии (2–16 мДж/см<sup>2</sup>), как и при облучении рентгеновским излучением в дозе 0.1 Гр (4 мДж/см<sup>2</sup>). Полученные данные позволяют предположить схожий механизм активации естественной защиты организма при облучении малыми дозами как ионизирующего, так и неионизирующего излучений.

**Ключевые слова:** фемтосекундное лазерное излучение, рентгеновское излучение, мышцы, микроядра, тимус, селезенка, состав крови

**DOI:** 10.31857/S2686738921060032

Известно, что биологические эффекты лазерных излучений зависят от длины волны, длительности воздействия, частоты импульсов, механизмов взаимодействия с облученной тканью и размера ее участка. Изучение механизмов воздействия этих излучений позволило создать различные приборы, применяемые в медицинской практике [1–3]. Созданные в середине восьмидесятых годов фемтосекундные лазеры (ФС), обладающие уникальными свойствами, совершили революцию не только в лазерной физике, но и в физике в целом. Длительность лазерных импульсов составляет от нескольких фс ( $10^{-15}$  с) до нескольких сотен фс. Основными преимуществами фемтосекундного излучения по сравнению с другими импульсными лазерами, помимо малой длительности импульсов, являются высокая пиковая (МВт) и малая средняя (мВт) мощности, что при низкой фокусировке предполагает отсутствие термиче-

ских эффектов. Следует также учитывать, что большая плотность квантов света в ультракоротких импульсах позволяет запустить так называемые многофотонные процессы. Широкое применение ФС лазеры получили в медицине, в частности в офтальмологии, хирургии и других сферах.

Положительные терапевтические эффекты такие, как ускорение ранозаживления, усиление иммунной, нейроэндокринной и антиоксидантной систем, нормализующих уровень холестерина и фосфолипидов, а также эффективность в офтальмологии, хирургии и других областях медицинской практики в основном наблюдаются при больших и средних мощностях низкоинтенсивных лазерных излучений [4]. Что касается биологических эффектов низких доз ФС лазерных излучений на организм млекопитающих *in vivo*, то в настоящий момент они недостаточно изучены, а отдельные имеющиеся результаты трудно сопоставимы в связи с использованием разных объектов, доз, энергий и особенностей оборудования. Количество работ по созданию новых лазеров и использованию их в медицине опережает количество работ по комплексному исследованию биологических реакций и их последствий у облученных животных.

Ранее, нами при изучении цитогенотоксических эффектов на мышцах, предоблученных малыми дозами ионизирующего излучения (гамма и

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия

<sup>2</sup> Институт фотонных технологий Федерального научного исследовательского центра “Кристаллография и фотоника” Российской академии наук, Москва, Троицк, Россия

\*e-mail: dyukina@rambler.ru

рентген) и затем дополнительно облученных большой дозой, был обнаружен защитный эффект, так называемый феномен “адаптивный ответ” (АО) [5]. Положительный эффект низких доз известен также как радиационный гормезис, который проявляется в качестве защитного эффекта различных форм жизнедеятельности организма [6]. Нами был получен эффект гормезиса на мышцах, облученных рентгеновским излучением в дозе 0.1 Гр по продолжительности жизни [7]. Для сравнения этого феномена при действии малых доз ионизирующего излучения было проведено большое комплексное исследование влияния непрерывного низкоинтенсивного He–Ne лазерного (632.8 нм) и светодиодного инфракрасного (850 нм) излучений на клеточные реакции мышечной ткани, облученных нетерапевтическими низкими дозами, плотность потока энергии которых соответствовала энергиям адаптирующих доз ионизирующего излучения [8, 9]. Анализ результатов показал, что эти дозы не повышали уровня спонтанных цитогенетических повреждений, а при последующем облучении животных выявляющей дозой 1.5 Гр рентгеновского излучения (РИ) были также обнаружены значимые, одинаковые по величине защитные эффекты в той же области доз, как и у положительного контроля при предварительном облучении РИ. Полученные результаты позволили предположить связь индукции радиационного АО с известным феноменом активации естественной защиты организма (гормезис), что позволило в дальнейших модельных экспериментах на мышцах использовать для ее выявления схему радиационного АО (0.1 Гр + 1.5 Гр через 1 сут).

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы было проверить эффективность использования низких доз неионизирующего низкоинтенсивного импульсного ФС лазерного излучения (длина волны 525 нм, длительность импульса 200 фс) в качестве фактора активации естественной защиты с помощью теста радиационный “адаптивный ответ” в цельной крови и кровеносных органах мышечной ткани.

В работе использовали 2-месячных самцов белых нелинейных мышечной линии закрытой популяции SHK (24–28 г), которые содержались в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН. Все манипуляции проводили согласно нормативно-правовым актам Федерации европейских научных ассоциаций о порядке экспериментальной работы с использованием животных (FELASA). План экспериментов был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биологической безопасности и биоэтике (протокол № 8 от 17.02.2020). Животных облучали в область носа ФС лазерным излучением (525 нм, 200 фс, частота импульсов 70 МГц), при мощности 0.5 мВт в течение 5, 10 и 50 с, что соответствует рассчитанным величинам плотности потока

энергии (флюенса) 5.1, 10.4 и 52 мДж/см<sup>2</sup>. Эти дозы облучения брали исходя из результатов, полученных при действии He–Ne лазерного излучения и РИ на мышечную ткань, для которых ранее была определена область доз, активирующих естественную защиту (2–16 мДж/см<sup>2</sup>) [10].

В качестве положительного контроля животных облучали по той же схеме АО рентгеновским излучением в дозах 0.1 и 0.5 Гр на установке РУТ (4 и 20 мДж/см<sup>2</sup>, 0.1 Гр/мин, 200 кВ, 2 кВ/мкм, 8 мА, 1.0 мм Cu и 1.0 мм Al), (ЦКП “Источники излучения” ИБК РАН, Пущино). Через сутки все группы животных дополнительно облучали РИ в дозе 1.5 Гр (60 мДж/см<sup>2</sup>), а через 28 ч после этого животных выводили из эксперимента методом декапитации и производили забор органов и тканей. На каждую экспериментальную точку использовали не менее 5 мышечных тканей.

С помощью стандартных методик были определены уровень цитогенетических повреждений в костном мозге подсчетом полихроматофильных (ПХЭ) эритроцитов с микроядрами (МЯ) [11], клеточность тимуса и селезенки по отношению среднего абсолютного веса органа к среднему весу животного в группе, а также показатели клеточного состава цельной крови с помощью прибора Beckman Coulter. Достоверность различий между группами оценивали с помощью непараметрического критерия *U* Манна–Уитни. Вероятность ошибки  $p < 0.05$  считали достаточной для вывода о статистической значимости различий полученных данных.

В табл. 1 представлены данные по измерению количества цитогенетических повреждений после облучения мышечной ткани адаптирующими дозами исследованных источников излучений и через 28 ч выявляющей дозой 1.5 Гр РИ. Видно, что в данном диапазоне плотности потока энергии не увеличивался уровень спонтанных цитогенетических повреждений (необлученный контроль). Предварительная обработка животных ФС лазерным излучением при плотности потока 10.4 мДж/см<sup>2</sup> и последующим воздействием рентгеновского излучения в дозе 1.5 Гр по схеме радиационного АО вызывала уменьшение цитогенетических повреждений в клетках костного мозга, т.е. активировала естественную защиту. Другие плотности потока ФС лазерного излучения не вызывали защитного эффекта, что совпало с положительным контролем в той же области доз.

Одновременно с измерением цитогенетических повреждений в костном мозге мышечной ткани измеряли индексы массы тимуса и селезенки, которые практически не отличались от таковых значений у необлученных, контрольных животных. В то время как при облучении мышечной ткани только в дозе 1.5 Гр индекс массы тимуса снижался на 40% (рис. 1). Предобработка мышечной ткани ФС лазерным излучением

**Таблица 1.** Количество полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в клетках костного мозга мышей, предоблученных малыми дозами ФС лазера и РИ, и затем облученных в дозе 1.5 Гр

Условие опыта	Число мышей	Поглощенная энергия, мДж	Плотность потока энергии, мДж/см <sup>2</sup> доза излучения	Число ПХЭ	Число ПХЭ с МЯ	Доля ПХЭ с МЯ, %
<b>Фемтосекундный лазер</b>						
0 чистый	10			20000	99	0.49 ± 0.09
5 с	5	0.3 ± 0.1	5.1 ± 0.5	20000	81	0.41 ± 0.13
10 с	5	1.5 ± 0.5	10.4 ± 3.5	20000	76	0.38 ± 0.11
50 с	5	7.5 ± 2.5	52 ± 16	20000	95	0.48 ± 0.15
5 с + 1.5 Гр	5			15000	883	5.90 ± 0.20
10 с + 1.5 Гр	5			17000	819	4.82 ± 0.27*
50 с + 1.5 Гр	5			15000	1010	6.70 ± 0.10
<b>Рентгеновское излучение</b>						
0.1 Гр	5	1.6	4	20000	86	0.43 ± 0.03
0.5 Гр	5	8	20	20000	697	3.50 ± 0.11
0.1 Гр + 1.5 Гр	5			20000	692	3.46 ± 0.17*
0.5 Гр + 1.5 Гр	5			20000	1206	6.03 ± 0.17
1.5 Гр	10	24	60	20000	1347	6.70 ± 0.03

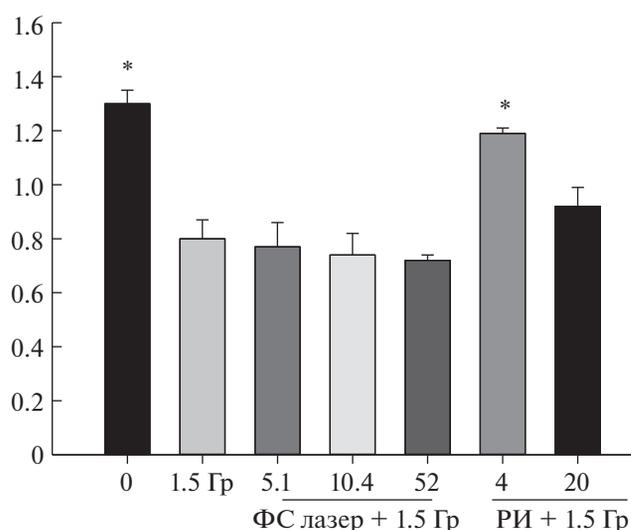
\* $p < 0.05$  по сравнению с группой животных, облученных в дозе 1.5 Гр.

и последующим облучением в дозе 1.5 Гр не восстанавливала индекс массы тимуса до контрольного значения, в отличие от рентгеновского излучения в дозе 4 мДж/см<sup>2</sup>. Аналогичные данные были получены на селезенке.

На рис. 2 показано влияние различных доз ФС лазерного излучения на такие показатели формулы крови как концентрация лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов и уровень гемоглобина и гематокрита при последующем облучении выявляющей дозой в 1.5 Гр. На рис. 2а, 2б, 2в отмечено значительное снижение концентрации лейкоцитов и тромбоцитов (на 40–45%), в то время как уровень гемоглобина, гематокрита и концентрация эритроцитов (рис. 2б, 2г, 2д) снизились на меньшую величину – ≈15–20%. При этом действие фактора активации естественной защиты (4 мДж/см<sup>2</sup> + 1.5 Гр), т.е. облучение дозой 0.1 Гр и затем выявляющей дозой 1.5 Гр не оказало ожидаемого эффекта на исследуемые показатели крови, т.е. не индуцировало адаптивного ответа организма по данному критерию.

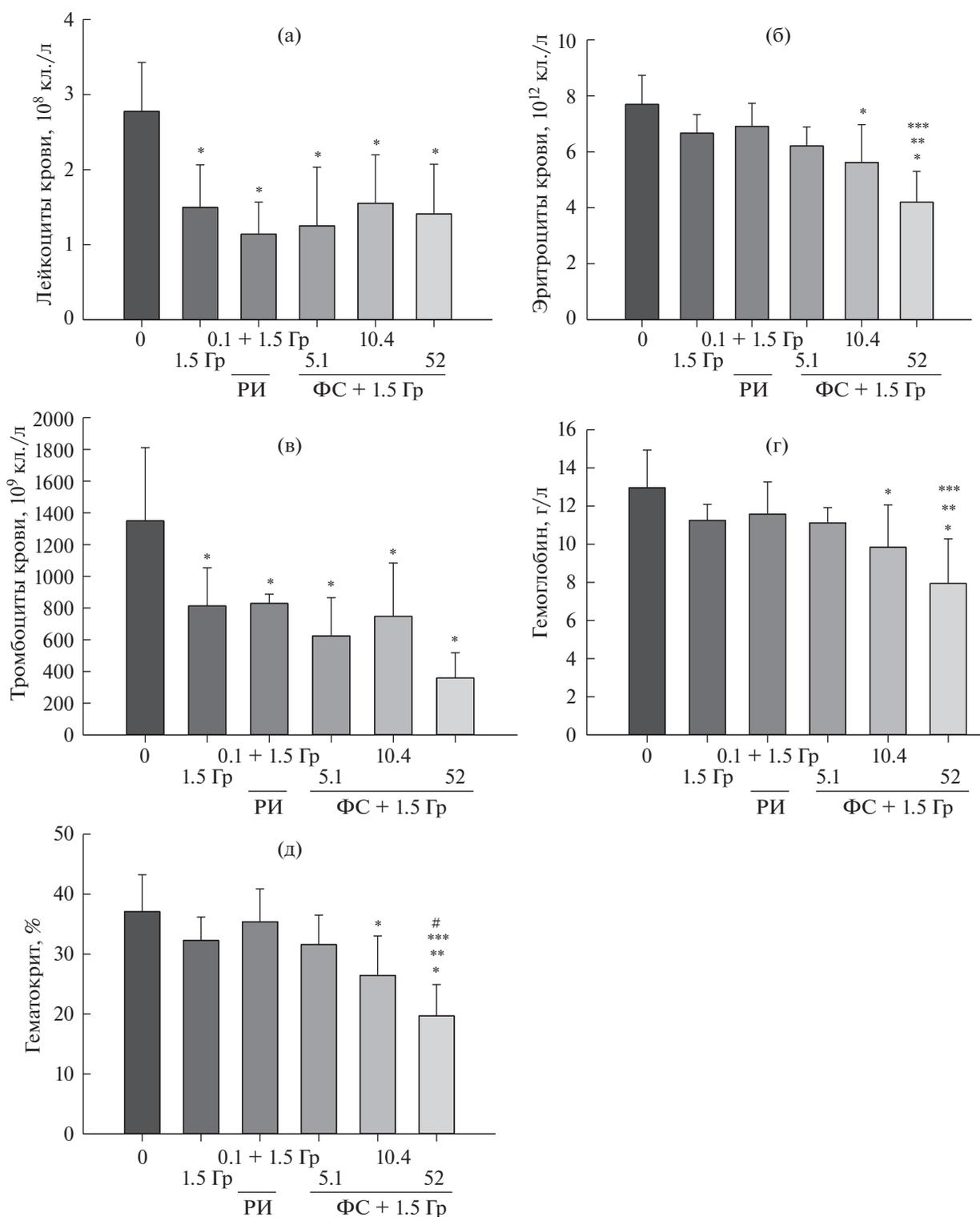
Воздействие адаптирующими дозами низкоинтенсивного ФС лазерного излучения и РИ в дозе 0.1 Гр и затем выявляющей дозой 1.5 Гр достоверно показало, что увеличение дозы облучения от 5.1 до 52 мДж/см<sup>2</sup> (5–50 с) ведет к увеличению повреждающего действия на показатели крови, что максимально наглядно сказалось на снижении концентрации тромбоцитов, эритроцитов, уровня гематокрита и гемоглобина.

В связи с вышеизложенным можно заключить, что исследование показателей крови через 28 ч после выявляющего облучения в дозе 1.5 Гр не способствовало нормализации показателей крови, т.е. развитию АО, что может быть связано с необходимостью более длительного времени для его проявления.



**Рис. 1.** Зависимости индекса массы тимусов у мышей, облученных адаптирующими дозами ФС лазерного излучения и РИ, и затем облученных в дозе 1.5 Гр от величины адаптирующей дозы.

\*—  $p < 0.05$  по сравнению с группой животных, облученных в дозе 1.5 Гр.



**Рис. 2.** Зависимость изменений показателей крови мышей, облученных адаптирующими дозами ФС лазерного излучения и РИ, и затем облученных в дозе 1.5 Гр от величины адаптирующей дозы. Данные представлены как  $M \pm SD$ , уровень значимости: \* –  $p \leq 0.05$  относительно 0, \*\* –  $p \leq 0.05$  относительно 1.5 Гр; \*\*\* –  $p \leq 0.05$  относительно 4 МДж/см<sup>2</sup> + 1.5 Гр; # –  $p \leq 0.05$  относительно ФС лазерного излучения 5.1 мДж/см<sup>2</sup> + 1.5 Гр (ANOVA с тестом Бонферрони  $n = 16$  (контроль, 0),  $n = 10$  (1.5 Гр);  $n = 5$  (все остальные группы)).

В результате проведенных экспериментов было обнаружено, что при воздействии на мышей неионизирующим низкоинтенсивным импульс-

ным ФС лазерным излучением в низких дозах наблюдается защитный эффект по тесту радиационный “адаптивный ответ” в том же узком диапазо-

не плотности потока энергии, как и при облучении рентгеновским излучением в дозе 0.1 Гр (4 мДж/см<sup>2</sup>).

В настоящий момент существует большое количество предположений и различных гипотез механизмов активации естественной защиты организма при легких стрессах, вызванных низкими дозами различных физических (ионизирующие и неионизирующие излучения) и химических агентов, главным образом в связи с такими феноменами малых воздействий, как гормезис и АО. Известно, что все они активируются в одной или очень близкой области доз (плотность потока энергии) в зависимости от условий. Что является триггером этих процессов, до сих пор не известно.

Установлено, что действие лазерного и светодиодного излучения низкой интенсивности на биологические объекты приводит к резкому повышению иммунитета, запуску механизма гипериндукции эндогенного интерферона, вызывает дозозависимые изменения продукции цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-6), оксида азота и активности естественных киллерных клеток мышей [12–14].

Показаны роль контроля транскрипции и активации процессов репарации ДНК и антиоксидантных систем [15–19], фотоакцепторных молекул цитохром с-оксидазы – терминального фермента электрон-транспортной цепи митохондрий [20], железо- и медь-содержащих ферментов, таких как супероксиддисмутаза, каталаза и церулоплазмин, участвующих в антиокислительных процессах [21], пути выживания и смерти клеток (апоптоза), UPR ответа (эндоплазматический ответ на стресс) и других цитопротективных процессов, включая аутофагию и регуляцию клеточного цикла [22] в отношении феноменов гормезиса и АО при воздействии низкоинтенсивных ионизирующих, лазерных, светодиодных излучений и химических агентов на организм как *in vitro*, так и *in vivo*.

По количеству факторов, запускающих процессы гормезиса и АО, свидетельствующих об активации естественной защиты организма и количеству реакций организма в одной и той же области потоков энергии, нам кажется, что триггерный механизм естественной защиты организма неспецифичен.

Полученные данные позволяют предположить схожий механизм активации естественной защиты организма при облучении малыми дозами как ионизирующего, так и неионизирующего излучений.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа по влиянию фемтосекундного лазерного излучения на органы кроветворения при облучении мышей выполнена на базе ФГБУН ИТЭБ РАН в рамках выполнения фундаментальных научных исследований

по темам ГЗ № 075-00381-21-00 и при частичной поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН в части облучения ФС лазером.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Мусаев М.М.* // Лазерная медицина. 2016. Т. 20. № 2. С. 16–20.
2. *Khadartsev A.A., Moskvyn S.V.* Laser blood illumination. The main therapeutic techniques. Moscow–Tver, 2018.
3. *Ma L.Y., Rong A., Jiang Y., Deng S.Y.* // Ophthalmology and therapy. 2021. V. 10. P. 137–150.
4. *Москвин С.В.* Основы лазерной терапии. Серия “Эффективная лазерная терапия”. Т. 1. М.-Тверь: ООО “Издательство “Триада”, 2016. 896 с.
5. *Zaichkina S.I., Klokov D.I., Rozanova O.M., et al.* // Genetika. 1998. Т. 34. № 7. С. 1013–1016.
6. *Кузин А.М.* // Радиобиология. 1985. Т. 31. № 1. С. 16–21.
7. *Балакин В.Е., Заичкина С.И., Клоков Д.Ю., и др.* // Доклад РАН. 1998. Т. 363. № 6. С. 843–845.
8. *Дюкина А.Р., Заичкина С.И., Розанова О.М.* // Радиационная биология. Радиозоология. 2011. Т. 51. № 5. С. 536–541.
9. *Дюкина А.Р., Заичкина С.И., Розанова О.М. и др.* // Мед. физика. 2014. № 4. Т. 64. С. 37–45.
10. *Заичкина С.И., Дюкина А.Р., Розанова О.М. и др.* // Бюл. эксп. биол. и мед. 2016. № 1. Т. 161. С. 32–35.
11. *Schmid W.* // Mutat. Res. 1975. V. 31. № 1. P. 9–15.
12. *Чудновский В.М., Леонова Г.Н., Скопинов С.А., Дроздов А.Л.* Биологические модели и физические механизмы лазерной терапии. Вл-ток: Дальнаука, 2002. 157 с.
13. *Черенков Д.А., Глушкова О.В., Новосёлова Е.Г. и др.* // Медицинская иммунология. 2005. Т. 7. № 2–3. С. 330.
14. *Новосёлова Т.В., Хренов М.О., Лунин С.М. и др.* // Биофизика. 2006. Т. 1. № 51. С. 123–135.
15. *Guo G., Yan-Sanders Y., Lyn-Cook B.D. et al.* // Mol. Cell. Biol. 2003. V. 23. P. 2362–2378.
16. *Murley J.S., Baker K.L., Miller R.C. et al.* // Free Radic. Biol. Med. 2011. V. 51. P. 1918–1925.
17. *Hou J., Wang F., Kong, P. et al.* // PLoS ONE. 2015. V.10. № 4. e0123316.
18. *Gal P., Stausholm M.B., Kovac I. et al.* // Lasers in Medical Science. 2018. V. 33. № 6. P. 1351–1362.
19. *Kabilan U., Graber T.E., Alain T., Klokov D.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 18. P. 6650.
20. *Elles J.T., Wong-Riley M.T., VerHoeve J. et al.* // Mitochondrion. 2004. V. 4. № 5–6. P. 559–567.
21. *Владимиров Ю.А., Клебанов Г.И., Борисенко Г.Г., Осипов А.Н.* // Биофизика. 2004. Т. 49. № 2. С. 339–350.
22. *Gueguen Y., Bontemps A., Ebrahimian T.G.* // Cell. Mol. Life Sci. 2019. V. 76. P. 1255–1273.

## LOW-INTENSITY FEMTOSECOND RADIATION ACTIVATES THE NATURAL DEFENSES OF MICE *in vivo*

Corresponding Member of the RAS G. R. Ivanitskii<sup>a</sup>, S. I. Zaichkina<sup>a</sup>, A. R. Dyukina<sup>a,#</sup>,  
V. I. Yusupov<sup>b</sup>, S. S. Sorokina<sup>a</sup>, O. M. Rozanova<sup>a</sup>, E. N. Smirnova<sup>a</sup>,  
D. P. Laryskin<sup>a</sup>, N. V. Minaev<sup>b</sup>, and M. M. Potselueva<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Photon Technologies Federal Scientific Research Center "Crystallography and Photonics"  
of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Troitsk, Russian Federation

#e-mail: dyukina@rambler.ru

The possibility of induction of cytogenetic damage in the bone marrow, changes in the cellularity of lymphoid organs and blood composition in mice irradiated with low-intensity femtosecond laser radiation at a power flux density of 5.1, 10.4, and 52 mJ/cm<sup>2</sup> (0.5 mW for 5, 10, and 50 s) *in vivo* have been shown. Using the test, the radiation adaptive response (4 mJ/cm<sup>2</sup> + 1.5 Gy), it was found that when mice were exposed to femtosecond laser radiation in high doses, the body's natural defenses were activated in the same narrow range of energy flux density as in the case of X-ray irradiation in dose of 0.1 Gy (4 mJ/cm<sup>2</sup>). The data obtained suggest a similar mechanism of activation of the body's natural defenses upon exposure to low doses of both ionizing and non-ionizing radiations.

*Keywords:* femtosecond laser radiation, X-rays, mice, micronuclei, thymus, spleen, blood composition