

П.М. Ларионов*, А.Н. Малов**, Н.А. Маслов**, А.М. Оришич**

Применение метода ЛИФ для исследования влияния УФ-излучения на биологические ткани

* *Институт патологии кровообращения МЗ РФ,*

** *Институт теоретической и прикладной механики СО РАН, г. Новосибирск*

Поступила в редакцию 27.01.2000 г.

Метод лазерно-индуцированной флуоресценции (ЛИФ), возбуждаемой излучением импульсного УФ-лазера, широко используется для исследования биотканей. Однако УФ-излучение приводит к некоторым изменениям в изучаемой ткани. В результате экспериментального исследования показано, что под воздействием УФ-излучения изменяется спектр ЛИФ поперечно-полосатой мышцы. В частности, происходит заметное ослабление интенсивности полосы флуоресценции триптофана (330 нм). Показано, что ее интенсивность зависит от числа импульсов, причем при меньшей энергии возбуждающего излучения интенсивность спадает медленнее. Получена количественная информация о сечении инактивации триптофана. Подтвержден вывод о соизмеримости сечений инактивации триптофана и цистина в области длин волн 248 нм. Тем не менее, хотя под воздействием лазерного излучения в ткани и происходят изменения, за время снятия спектров ЛИФ (~30 импульсов) они не успевают сильно превысить величину случайного разброса и изменения в спектрах ЛИФ, вызванные излучением лазера, не сказываются на получаемых результатах.

В настоящее время импульсные лазеры ультрафиолетового диапазона широко используются в медицине в качестве хирургического инструмента, а также для диагностических целей. Особая роль здесь принадлежит эксимерным лазерам. Они с успехом применяются в клинической практике для лечения ряда офтальмологических заболеваний [1, 2], в ангиопластике при лечении атеросклероза коронарных артерий [3], в кардиохирургии при лазерной реваскуляризации миокарда [4], при обработке кости [5] и прочее. При разработке методов лечения с использованием ультрафиолетового излучения требуется учет фотобиологических процессов, происходящих в макромолекулах (биополимеры – белки и ДНК), клетках и других веществах, составляющих биоткани, под воздействием падающего и рассеянного света [6].

В работе [7] исследована возможность применения лазерно-индуцированной флуоресценции (ЛИФ), возбуждаемой излучением эксимерных лазеров, для диагностики ткани сердца человека при различной степени поражения кальцинозом. Показано, что применение коротковолновых ($\lambda = 248$ нм) источников возбуждения позволяет изучить люминесценцию в широком спектральном интервале и наблюдать существенную перестройку спектра ЛИФ мышцы сердца при ее поражении кальцинозом. Насыщение тканей кальцием изменяет спектры ЛИФ, это открывает перспективу применения ЛИФ для диагностики степени поражения кальцинозом при проведении кардиохирургических операций на открытом сердце, пластической кардиохирургии.

В экспериментах, описанных в [7], интенсивность лазерного излучения была ниже порога фотоабляции в 20–50 раз, и излучение не вызывало макроскопических изменений. Однако энергия кванта УФ-излучения с длиной волны 248 нм являлась достаточно высокой и могла вызывать деструктивно-модифицирующие реакции [6], приводящие к изменению в составе ткани и, соответственно, в спектре ЛИФ.

Цель данной работы состояла в изучении влияния УФ-излучения с $\lambda = 248$ нм на биологическую ткань.

Для исследований спектров флуоресценции биологических тканей была собрана экспериментальная установка. В качестве источника облучения использовался газоразрядный KrF эксимерный лазер с длиной волны $\lambda = 248$ нм (или XeCl с $\lambda = 308$ нм) и энергией в импульсе 10–15 мДж. Длительность излучения лазера составляла 5 нс и импульсная мощность $\sim 2 \cdot 10^6$ Вт. Для ослабления зондирующего излучения служил набор фильтров. Излучение лазера с помощью оптической системы подавалось на предметный столик из слабофлуоресцирующего материала, на котором помещались исследуемые ткани. Площадь исследуемой области составляла ~ 10 мм². С помощью зеркала и линз данный участок ткани отображался на входную щель монохроматора, на выходе которого был расположен фотоприемник. В установке использовались двойной зеркальный призмный монохроматор ДМР-4 с дисперсией на длине волны 400 нм порядка 4 нм/мм и фотоэлектронный умножитель ФЭУ-106 с областью спектральной чувствительности 170–950 нм. С помощью светоделительной пластины часть излучения лазера подавалась на опорный приемник – коаксиальный фотоэлемент ФЭК-22 с областью спектральной чувствительности 220–650 нм. Фототоки приемников интегрировались на емкостях и подавались на аналогово-цифровую систему обработки сигналов КАМАК, после чего запоминались на персональном компьютере.

Эксперименты выполнялись в двух режимах. Первый – режим сканирования спектра с шагом между отдельными импульсами излучения 0,5–5 нм. Ширина щелей монохроматора соответствовала величине спектрального разрешения 0,5–5 нм в диапазоне сканирования (соответственно шагу). Величина сигнала с фотоумножителя делилась на величину опорного сигнала, чтобы убрать зависимость результата измерения от пульсаций мощности лазера. При обработке спектров производились нормировка сигнала на чувствительность ФЭУ в зависимости от длины волны и поправка на нелинейность дисперсионной характеристики монохроматора.

Второй режим – монохроматор устанавливался на фиксированную длину волны, и наблюдалось развитие интенсивности флуоресценции на данной длине волны в зависимости от времени (числа импульсов).

Экспериментальные результаты

Исследование влияния дозы УФ-излучения, полученной биологическим материалом, на структуру спектра лазерно-индуцированной люминесценции было проведено на примере облучения поперечно-полосатой мышцы.

На рис. 1 приведены спектры ЛИФ мышцы до (1) и после (2) облучения 2000 импульсов. Доза облучения Q составила 10 мДж/см^2 за импульс. Различные участки спектра реагировали на это по-разному. Произошло заметное (более чем в 2 раза) ослабление флуоресценции полосы с центром вблизи 330 нм. Интенсивность ЛИФ на полосе 450 нм возросла.

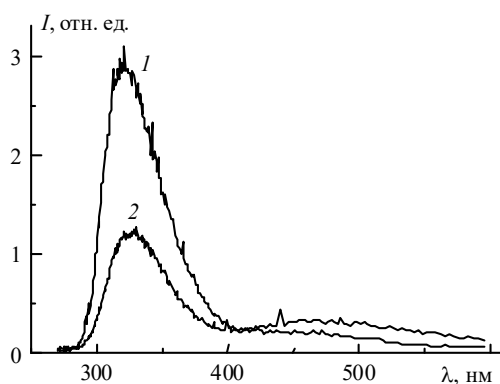


Рис. 1

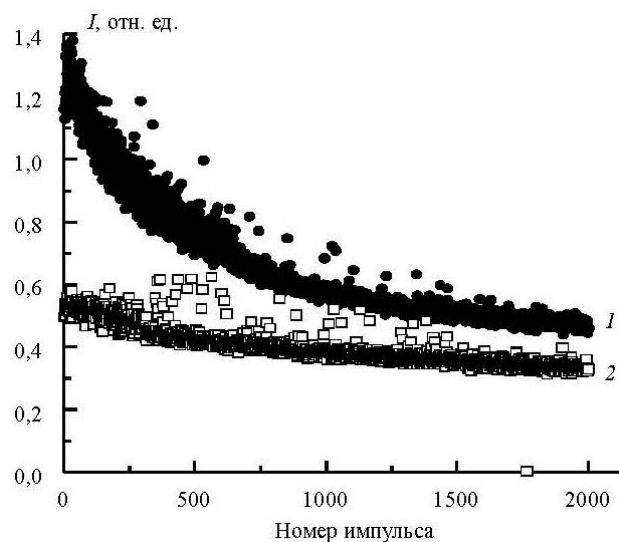


Рис. 2

Было исследовано изменение интенсивности флуоресценции поперечно-полосатой мышцы на длине волны 330 нм в зависимости от числа импульсов лазерного излучения. На рис. 2 приведены графики изменения относительной интенсивности ЛИФ поперечно-полосатой мышцы при облучении лазерным излучением с $\lambda = 248 \text{ нм}$ с уровнем дозы Q , равной 10 (1) и $2,5 \text{ мДж/см}^2$ (2) за импульс.

Видно, что скорость уменьшения интенсивности ЛИФ зависит от величины дозы.

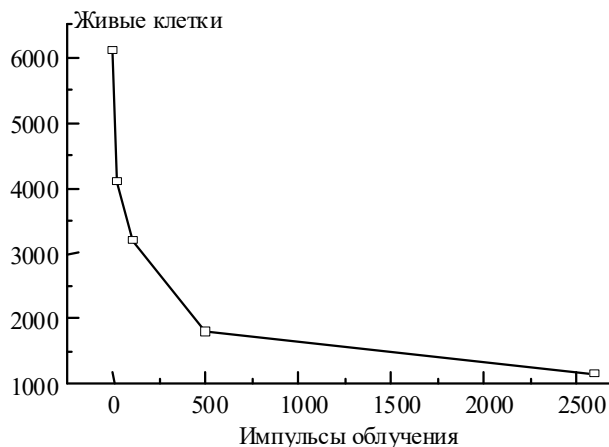


Рис. 3. Зависимость количества живых клеток лимфоцитов крови от количества импульсов облучения. Пробы облучались лазерным излучением с $\lambda = 248 \text{ нм}$ и плотностью энергии 10 мДж/см^2

Нами проведены измерения интенсивности гибели клеток от дозы облучения. Результаты таких измерений приведены на рис. 3. Наблюдаются быстрое уменьшение (в 6 раз) количества живых клеток в течение первых 500 импульсов и последующее замедление скорости гибели. В данных экспериментах было зафиксировано естественное уменьшение количества живых клеток за время проведения эксперимента. Так, в начале эксперимента концентрация живых клеток составляла 10200 в 1 мл, в конце эксперимента по прошествии суток в пробе, не подвергавшейся облучению УФ-излучением, – 6100 в 1 мл. В пробах, подвергшихся облучению, количество живых клеток уменьшилось за 2,5 ч более чем в 5 раз. Это позволяет разделить процессы естественной гибели клеток и разрушения их вследствие воздействия УФ-излучения.

Обсуждение результатов

Анализ спектра ЛИФ нормальной ткани (рис. 4) показывает, что в флуоресценции поперечно-полосатой мышцы можно выделить три полосы – 330, 370 и 450 нм, однако преобладает коротковолновая 330 нм. Полоса 450 нм четко выражена, но относительно слабая, тогда как полоса 370 нм подавлена более мощной рядом расположенной полосой 330 нм.

Хорошо известно, что интенсивная полоса 330 нм обусловлена свечением триптофана или белками, его содержащими [6, 8, 9]. В работе [10] при исследовании спектров ЛИФ аорты, возбуждаемых излучением 308 нм, показано, что полосы 370 и 450 нм обусловлены наличием в тканях волокнистых соединительных структур – коллагена и эластина, а провал между этими полосами объясняется перепоглощением флуоресценции в гемоглобине. Коллаген и эластин – это белковые соединительные ткани, в которых помимо триптофана присутствует множество других хромофоров [11]. Квантовый выход флуоресценции у них сравним с триптофановым и вносит существенный вклад в спектры ЛИФ тканей, в состав которых входит. Спектры ЛИФ коллагена и эластина очень похожи, с максимумами на длинах волн 383 и 379 нм соответственно. Однако они заметно раз-

личаются по ширине полос (40 и 70 нм). Оксигемоглобин имеет пик поглощения в области 418 нм, который хорошо совпадает с минимумом интенсивности ЛИФ (см. рис. 4).

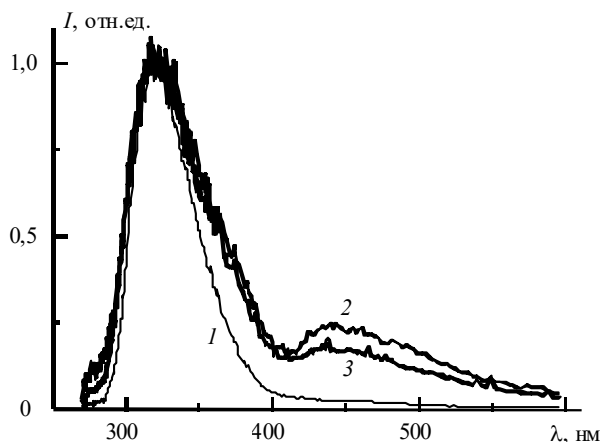


Рис. 4. Спектры ЛИФ здоровых тканей животного (свиньи). Длина волны возбуждения ЛИФ $\lambda = 248$ нм: 1 – мышца сердца; 2 – стенка аорты; 3 – клапан сердца

Таким образом, спектры ЛИФ здоровой ткани (см. рис. 4) определяются, по-видимому, вкладом флуоресценций триптофана, коллагена и эластина, а также поглощением в оксигемоглобине.

Известно, что деструктивно-модифицирующие реакции инициируются УФ-светом, а исключительную роль в качестве акцепторов биологически активного света играют нуклеиновые кислоты и белки [6].

Основными хромофорами нуклеиновых кислот являются пуриновые (аденин и цитозин) и пиримидиновые азотистые основания нуклеотидов. За поглощение света ответственна в основном электронная система колец с полосой, имеющей максимум в области 255–270 нм. Взаимодействие УФ-света с нуклеиновыми кислотами приводит к возникновению электронно-возбужденного состояния различных оснований, которые практически не люминесцируют, т. е. для всех оснований константа скорости тепловой диссипации энергии велика.

Основные хромофоры белков – это остатки ароматических аминокислот: прежде всего триптофана и в значительно меньшей степени тирозина и фенил-аланина, а также цистина. Цистиновая фотохимия проявляется в увеличении квантового выхода инактивации богатых цистином белков. В этом случае при длинноволновом облучении (270–310 нм) преобладает триптофановая фотоинактивация, а при коротковолновом (240–260 нм) – цистиновая. В интересующей нас области 248 нм цистин имеет соизмеримое с триптофаном поглощение. Однако цистин не флуоресцирует и не способен миграционным путем передавать поглощенную энергию триптофану. Данный вывод об определяющей роли триптофана в ЛИФ-диагностике биоткани подтверждается результатами наших экспериментов. Показано, что под действием УФ-света происходит дезактивация триптофана (см. рис. 1, полоса 330 нм).

Триптофановая фотоинактивация белков идет по одноквантовому одноударному механизму. В этом случае число выживших молекул описывается экспоненциальной зависимостью, получаемой из распределения Пуассона:

$$N = N_0 \exp(-\sigma D),$$

где N_0 – число исходных, а N – выживших молекул; σ – поперечное сечение инактивации; D – доза. Величина $D = Qn/h\nu$, где n – число импульсов лазера; $h\nu$ – энергия кванта света; Q – доза облучения за импульс, Дж/см².

Соответствие приведенного выражения и экспериментальной зависимости интенсивности ЛИФ от дозы (см. рис. 2) позволяет сделать вывод, что, по-видимому, фотоинактивация триптофана в наших экспериментах идет по одноквантовому одноударному механизму. Сравнение экспериментальной (см. рис. 2) и теоретической зависимостей позволило оценить сечение инактивации триптофана $\sigma \approx 3,2 \cdot 10^{-19}$ см². В работе [12] приведено сечение инактивации цистина, которое на длине волны 248 нм равно $3,4 \cdot 10^{-19}$ см², что хорошо согласуется с результатами наших измерений. Аналогичный механизм гибели клеток может быть связан с однофотонным, одноквантовым поглощением триптофана, входящего в состав клетки. В наших опытах зафиксировано качественное соответствие значений дозы облучения, при которой наблюдается уменьшение количества живых клеток (см. рис. 3) и интенсивности ЛИФ на длине волны 330 нм от поперечной полосы мускула (см. рис. 2).

Под действием УФ-света ЛИФ коллагена и эластина (полосы 370 и 450 нм) не только не уменьшается, а наоборот, наблюдается ее рост. Особенность процесса возбуждения полос 370 и 450 нм проявлялась также в дополнительном увеличении времени флуоресценции. Механизм ЛИФ данных полос требует дополнительных исследований. Флуоресценция коллагена и эластина хотя и вносит существенный вклад в спектр ЛИФ ткани, но не может быть использована для исследования фотоинактивации биоткани.

Заключение

Наши эксперименты позволили получить количественную информацию о сечении инактивации триптофана. Подтвержден вывод работы [12] о соизмеримости сечений инактивации триптофана и цистина в области длин волн 248 нм. Видно, что интенсивность падает с числом импульсов, причем при меньшей энергии возбуждающего излучения падает медленнее.

Тем не менее, хотя под воздействием лазерного излучения в ткани и происходят изменения, одновременно за время снятия спектра (~30 импульсов) они не успевают сильно превысить величину случайного разброса, о котором также можно судить из приведенных графиков: он составляет примерно 10%. Таким образом, изменения в спектрах ЛИФ, вызванные излучением лазера, сказываются очень мало на всех описанных выше результатах.

1. Bagaev S.N., Razhev A.M., Zhupikov A.A. // SPIE. 1999. V. 3564. P. 94–100.
2. Bagaev S.N., Razhev A.M., Zhupikov A.A. // Laser Physics. 1998. V. 8. P. 794–798.
3. Baittle J.A. // N-E J-1 Med. 1996. V. 335. P. 1282–1289.
4. Klein M., Schulte H.D., Gams I. Transmyocardial laser revascularisation. Berlin: Springer, 1998.
5. Lustman J., Ulmannsky M., Fuxbruner A., Levis A. // Lasers Surg. Med. 1991. V. 11. P. 51–57.
6. Конев С.В., Волотовский И.Д. Введение в молекулярную фотобиологию. Минск: Наука и техника, 1971. 229 с.
7. Ларионов П.М., Малов А.Н., Оришич А.М., Шукин В.С. // Журнал прикладной спектроскопии. 1997. Т. 64. С. 539–541.
8. Приезжев А.В., Тучин В.В., Шубочкин А.П. Лазерная диагностика в биологии и медицине. М.: Наука, 1986. 199 с.

9. Черницкий Е.А., Слобожанина Е.И. Спектральный люминесцентный анализ в медицине. Минск: Наука и техника, 1989.
10. Baraga J.J., Rava R.P., Taroni P., Kittrell C. et al. // Lasers Surg. Med. 1990. V. 10. P. 245–261.
11. Deyl Z., Macek K., Adam M., Vancikova // Biochim. Biophys. Acta. 1980. V. 625. P. 248–254.
12. Setlow R., Doyle B. // Biochim. Biophys. Acta. 1957. V. 24. P. 27–41.

P.M. Larionov, A.N. Malov, N.A. Maslov, A.M. Orishich. **Application of LIF method to investigation of UV radiation influence on biological tissues.**

Method of laser-induced fluorescence (LIF) excited by UV pulse laser radiation is of great promise for biological tissue diagnostics. The UV radiation causes some changes in the tissue under study. As the result of experimental investigation performed, it is shown that UV radiation causes changes in the LIF spectra of the muscle. In particular, the tryptophan band (330 nm) intensity decrease was observed. This intensity decrease is slowing down with laser pulses power decrease. The tryptophan inactivation cross-section was obtained. The commensurability of tryptophan and cystine inactivation cross-sections in the 248 nm band was confirmed. Nevertheless, though UV radiation causes changes in the tissue, it does not effect the LIF spectra measurements, because during the measurements (~ 30 laser impulses) the changes do not exceed the error value.