

Экспериментальное исследование влияния комбинированного применения лазерного воздействия эндодиссектора Nd-YAG и биостимулирующего низкоэнергетического гелий-неонового лазера на культуру клеток пигментного эпителия сетчатки

Сабурина И.Н.^{1,2}, Копаев С.Ю.³, Копаева В.Г.³, Кошелева Н.В.^{1,4}, Борзенко С.А.³

¹ — ФГБНУ «НИИ общей патологии и патологической физиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

² — Государственное бюджетное общеобразовательное учреждение дополнительного профессионального образования Российская медицинская Академия последипломного образования, 123995, Москва, ул. Баррикадная, 2/1

³ — Центр фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Федорова» Минздрава, 127486, Москва, Бескудниковский бульвар, 59А

⁴ — Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

Разработка и внедрение более эффективных, безопасных и доступных методов микрохирургии глаза является важной задачей для современной офтальмологии. Проведенные нами исследования in vitro показали, что комбинированное использование высокоэнергетического эндодиссектора Nd-YAG 1,44 мкм и биостимулирующего излучения низкоинтенсивного гелий-неонового лазера 632 нм, доставляемых одним световодом, оказывает положительное влияние на монослойную культуру клеток пигментного эпителия сетчатки. Отсутствие изменения фенотипа клеток, высокая пролиферативная активность свидетельствуют о стимулирующем действии исследуемого излучения. Продемонстрированная активация синтеза противовоспалительных белков: циклооксигеназы-2 и простагландина-2 в экспериментальных сериях независимо от вида и времени облучения приводит к активации репаративных процессов, снижению патологических изменений, как на клеточном, так и на органно-тканевом уровнях.

Ключевые слова: офтальмохирургия, катаракта глаза, лазерная микрохирургия, клетки пигментного эпителия сетчатки

Введение

В настоящее время известно много работ об использовании разных видов энергии в клинической практике, в том числе и офтальмологической. Первым видом энергии, применяемым для хирургической реабилитации пациентов с катарактой, был ультразвук [3, 5, 25, 34]. Однако ультразвуковая энергия, обладая положительными свойствами (способность разрушать хрусталик глаза в условиях минимального операционного поля) вызывала изменения в тканевых структурах глаза [16, 21, 35, 36]. Предложенное и опробованное в эксперименте эксимерлазерное излучение не нашло применения в клинике из-за опасения негативных проявлений ультрафиолетового излучения, таких, как клеточные мутации [22, 26, 30, 33]. Использование эрбиевого лазера выявило ряд преимуществ (отсутствие нагревания лазерного наконечника) целесообразности применения твердотельных ИАГ лазеров [31, 32]. Исследования научной группы российских офтальмологов [10, 20] показали, что оптимальным для цели разрушения хрусталика является излучение неодимового ИАГ (Nd-YAG) лазера с оригинальной длиной волны 1,44 мкм, которая ранее не использовалась в офтальмологии [1, 6]. Однако эффективность медицинских технологий, в том числе и в офтальмохирургии, должна быть максимально безопасной. Известно, что любое хирургическое вмешательство уже в первой фазе альтерации индуцирует синтез простагландинов и повышает интенсивность окислительных реакций, вызывающих развитие воспалительного процесса и повреждение тканей глаза [14, 21]. В настоящее время известно много работ о поло-

жительном воздействии гелий-неонового лазера на различные ткани, в том числе и глазные [2, 4, 13, 17, 23, 29]. Установлено, что при взаимодействии данного излучения с различными тканями в результате сложных фотохимических процессов проявляются противовоспалительный, десенсибилизирующий, рассасывающий эффекты, а также наблюдается стимулирующее влияние на процессы репарации и трофики [18, 24, 27, 28]. В клинике ФГБУ «МНТК МГ им. акад. С.Н. Федорова» группа офтальмологов: В.Г. Копаева, С.М. Аскерова, С.Ю. Копаев предположила инновационный способ комбинированного использования высокоэнергетического эндодиссектора Nd-YAG 1,44 мкм и биостимулирующего излучения низкоинтенсивного гелий-неонового лазера 632 нм, доставляемых одним световодом [11].

В настоящее время ни в отечественной, ни в зарубежной литературе нет ответа на целый ряд вопросов. Не известно, какой эффект на внутриглазные структуры будет оказывать гелий-неоновый лазер в условиях интраоперационного, эндоокулярного применения, когда источник света находится в полости глаза, и кроме того, работает одновременно с другим излучением. Не исчезнет ли биостимулирующий эффект гелий-неонового лазера под воздействием высокоэнергетического излучения Nd-YAG лазера 1,44 мкм. Имеющиеся на сегодня наблюдения касаются использования лазера при наружном облучении, когда свет идет через воздух и склеру или через роговицу [4, 13, 15]. Исследование влияния эндолазерного прямого воздействия световода в полости глаза, где свет действует непосредственно на сетчатку не проводилось из-за объек-

тивных причин (сложность проведения таких исследований непосредственно на больных). В настоящее время множество исследований проводится на животных по стандартным и проверенным протоколам [8]. Чтобы снизить количество лабораторных животных, были предложены альтернативные методы — компьютерное моделирование и исследования *in vitro* на культурах эукариотических клеток. Последний метод получил наибольшее распространение и даже был внесен в регламенты и стандартные протоколы производства парфюмерно-косметической продукции Российской Федерации и Европы (ТР ТС 009/2011 «О безопасности парфюмерно-косметической продукции», ЕС No 1223/2009).

Клетки, выращиваемые *in vitro*, свободные от влияния систем организма, являются наиболее адекватной и предпочтительной моделью для исследований [9]. В настоящее время культуру клеток, потенциально, можно получить практически из любого органа или ткани человека или животного. Клеточные культуры представляют собой генетически однородную популяцию клеток, растущих в постоянных условиях. Исследователь может изменять эти условия в определенных пределах, что позволяет ему оценивать влияние на клетки самых различных факторов. Так, интересные исследования были проведены по влиянию лазерно-индуцированной флуоресценции на модели культуры диплоидных клеток человека [19]. Метод лазерно-индуцированной флуоресценции разрабатывался для контроля состояния органа, подготавливаемого для трансплантации. Использование культивируемых клеток позволило авторам подобрать оптимальные условия лазерного воздействия, не повреждающие клетки. Культуры тканей глаза человека уже используют для проведения экспериментальных исследований безопасности применения разных видов лазерного излучения [7].

Цель настоящей работы — исследовать влияние одновременного воздействия двух видов разноцелевого излучения: высокоэнергетического эндодиссектора Nd-YAG 1.44 мкм и биостимулирующего излучения низкоинтенсивного гелий-неонового лазера 632 нм на клетки пигментного эпителия сетчатки.

Методы исследования

Исследование проводили на клетках пигментного эпителия сетчатки (РПЭ), сравнивая культуры *in vitro* после одновременного воздействия эндодиссектора Nd-YAG 1,44 мкм (Nd-YAG) и биостимулирующего излучения низкоинтенсивного гелий-неонового лазера 632 нм (ГН) в 1 серии эксперимента со 2 серией эксперимента, где не присутствовал Nd-YAG лазер, но проводилось облучение клеточных культур He-Ne лазером с разной экспозицией — 3 и 10 минут. Контролем служили интактные клеточные культуры РПЭ. Аутопсированный материал был предоставлен Глазным тканевым банком Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Федорова» Минздрава России.

В 1 серии эксперимента первичная культура РПЭ глазного яблока человека была получена из 12 аутопсированных глаз от 12 индивидуумов (возраст доноров 65—68 лет), на которых была выполнена микроинвазивная лазерная фактоэмульсификация с использованием двух видов лазерного излучения (высокоэнергетического эндодиссектора

Nd-YAG 1.44 мкм и биостимулирующего низкоинтенсивного гелий-неонового лазера 0,63 мкм). Энергию эндодиссектора использовали так же, как в клинике, в виде отдельных импульсов, направляемых на ядро и фрагменты хрусталика. Гелий-неоновый лазер в это время был включен в непрерывном режиме на протяжении всего процесса разрушения и вымывания фрагментов хрусталика.

Во 2 серии та же клеточная культура была получена из 12 парных аутопсированных глаз тех же индивидуумов, в которых не производилось оперативное вмешательство с комбинированным лазерным воздействием. Половина из них подвергалась облучению He-Ne лазером с разной экспозицией — 3 и 10 мин. Другая, не облученная, половина клеточной культуры составила третью — контрольную серию эксперимента. Время экспозиции облучения клеточных культур 3 мин и 10 мин было выбрано, исходя из того, что первый срок экспозиции излучения (3 мин) должен показать наличие или отсутствие положительного биологического воздействия, а второй (10 мин) — наличие или отсутствие отрицательного эффекта.

Первичные культуры клеток РПЭ

Промытые глазные яблоки в первой и второй серии опыта разрезали по зубчатой линии, удаляли передний сектор глазного яблока, отделяли стекловидное тело и нейральную часть сетчатки от пигментного эпителия сетчатки, наполняли глазную чашу раствором Хэнкса с ЭДТА и инкубировали (20 мин, 25°C). Отделившиеся от сосудистой оболочки глаза клетки пигментного эпителия переносили в стерильную ростовую среду, равномерно распределяли в чашках Петри диаметром 35 мм и помещали в инкубатор с CO₂ (37°C, 5% CO₂).

Подготовка культур клеток РПЭ для последующего облучения He-Ne лазером 0,63 мкм и культивирования

После того, как первичные культуры РПЭ достигали 80% конfluenceности, клетки снимали с культуральных чашек в 1-й, 2-й и контрольной серии опыта с помощью растворов версена и 0,25%-ного трипсина, суспензию осаждали методом центрифугирования (7 мин, $g = 100 \text{ см}^2/\text{с}$), часть клеток высевали на 96-луночные планшеты (Corning-Costar) в плотности 10 000 кл. на 1 лунку, оставшиеся клетки использовали для иммунофенотипического анализа клеточных культур, соответствующих нулевому пассажу — P0.

В 1-й серии опыта клеточные культуры РПЭ, выделенные из глазных яблок, в которых выполнялась лазерная фактофрагментация с использованием высокоэнергетического эндодиссектора Nd-YAG лазера и биостимулирующего низкоинтенсивного He-Ne лазера, культивировали на 96 луночных планшетах без дополнительного облучения He-Ne лазером.

Во 2-й серии опыта каждый планшет разделяли на три группы по 32 лунки:

1) лунки с клетками, которые подвергали облучению He-Ne лазером в течение 3 минут через 2 суток после пассирования на культуральные планшеты;

2) лунки с клетками, которые подвергали облучению He-Ne лазером в течение 10 минут через 2 суток после пассирования на культуральные планшеты;

3) контрольные лунки, в которых клетки не подвергали облучению.

Дальнейшие действия с клеточными культурами в 1-й и 2-й сериях опыта ничем не различались.

Все культуры клеток РПЭ культивировали в CO₂ инкубаторе в стандартных условиях (37°C; 5% CO₂). Планшеты помещали на 1 сут. в термостатируемую камеру прибора Cell-IQ (Chip Man Technologies, Финляндия). Через 1 сут. клетки снимали с лунок планшетов с помощью растворов версена и 0,25%-ного трипсина. Считали, что это культуры клеток первого пассажа — P1. Часть клеток оставляли на лунках планшетов в плотности 10 000 кл/лунку и продолжали культивировать в термостатируемой камере прибора Cell-IQ (Chip Man Technologies, Финляндия) в стандартных условиях (37°C; 5% CO₂) в течение 3 суток для изучения фенотипа и пролиферации исследуемых клеток. Оставшиеся клетки пассировали на чашки Петри и культивировали в CO₂ инкубаторе в стандартных условиях (37°C; 5% CO₂) в течение трех суток. Через 3 суток все экспериментальные и контрольные клеточные культуры считали клеточными культурами второго пассажа — P2. Каждую группу клеток второго пассажа — P2 разделяли на три части и исследовали следующими методами:

- 1) проточной цитофлуориметрии;
- 2) белкового иммуноблота;
- 3) полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

Во всех сериях эксперимента использовалась автоматическая документация результатов эксперимента при помощи метода световой пейтраферной микроскопии. Это замедленная автоматическая фоторегистрация состояния клеточных культур, которую осуществляли на приборе Cell-IQ (Chip Man Technologies, Финляндия) с покадровым интервалом 20 мин в течение 1 сут. непосредственно после облучения и с покадровым интервалом 30 мин в течение 3 сут. после пассирования культур в 1-й, 2-й сериях и в контроле. Пейтраферную фоторегистрацию осуществляли с помощью программного обеспечения Cell-IQ Imagen. Фотоматериалы анализировали с помощью программного обеспечения Cell-IQ Analyzer. Дополнительно использовали метод визуализации морфологии клеток на световом инвертированном микроскопе с фазовым контрастом СКХ41 (Olympus, Япония). Фоторегистрацию производили перед облучением, через 1 час, одни сутки и четверо суток после облучения цифровой камерой Invenio3S (Olympus, Япония) в программе DeltaPix (Olympus, Япония).

Оценка жизнеспособности и пролиферации клеток

Количество жизнеспособных клеток подсчитывали с помощью автоматического счетчика клеток Cell Counter (Invitrogen, США) перед пассированием на культуральные планшеты (0-й пассаж), через 1 сут. после облучения перед пассированием (1-й пассаж) и через 4 суток после облучения (2-й пассаж) перед иммунофенотипическим и молекулярным анализами. Для подсчета перед центрифугированием суспензии снятых с культурального пластика клеток из общего объема суспензии отбирали 10 мкл, которые смешивали с 10 мкл 4%-ного раствора трипанового синего, окрашивающего нежизнеспособные клетки. Смесь суспензия—краситель наносилась на рекомендованное производителем стекло-слайд, который помещали в прибор, анализирующий количество и диаметр жизнеспособных и нежизнеспособных клеток. Результаты представляли в цифровом и графическом видах.

С помощью проточной цитофлуориметрии анализировали экспрессию следующих поверхностных белков: CD14, CD45, CD34, CD90 и CD105 в первичных культурах клеток 0-го пассажа и 2-го пассажа в 1-й, 2-й сериях опытов и в контроле. Для проведения анализа культивированные клетки снимали с чашек Петри с использованием растворов версена и 0,25%-ного трипсина, центрифугировали (7 мин, $g = 100 \text{ см}^2/\text{с}$), к полученному осадку добавляли 700 мкл раствора фосфатно-солевого буфера (pH = 7,4) с добавлением 1% эмбриональной сыворотки крови плодов коровы и аликвотировали по 100 мкл. К каждой пробе согласно рекомендованным производителями протоколам добавляли антитела, конъюгированные с флуоресцентными метками FITC fluorescein isothiocyanate, PE — phycoerythrin, PC5 Phycoerythrin-Cyanin 5.1, ECD — Phycoerythrin-Texas Red-X (Beckman Coulter, США) и инкубировали 15 мин при комнатной температуре в темноте. После этого пробы центрифугировали (5 мин, 400 g), осадок ресуспендировали в 1 мл раствора фосфатно-солевого буфера (pH = 7,4) с добавлением 1% эмбриональной сыворотки крови плодов коровы и переносили в пробирки для проточного цитофлуориметра. Результаты оценивали на проточном цитофлуориметре FC500 (Beckman Coulter, США) с помощью программы CXP Software.

Исследование экспрессии генов культур клеток

Для выделения тотальной РНК, применяли TRI Reagent (Sigma, США). При удалении примеси геномной ДНК, РНК обрабатывали ДНКазой I (Fermentas, Германия). РНК переосаждали в 4 M LiCl, концентрацию обработанной РНК измеряли на спектрофотометре Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, США). Для дальнейшего молекулярно-биологического анализа с помощью ПЦР проводили синтез кДНК, который выполняли с использованием обратной транскриптазы M-MLV (Евроген, Россия) и рандомных гексануклеотидов (Силекс, Россия).

На заключительном этапе анализа экспрессии генов культур клеток проводили ПЦР в реальном времени (Real Time PCR), ПЦР проводили с помощью набора Colorad-Taq (Силекс, Россия) и специфических олигонуклеотидов (Литех, Россия) на амплификаторе MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, США). ПЦР проводили на автоматическом амплификаторе 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) с использованием смеси qPCRmix-HS SYBR + ROX (Евроген, Россия). Расчет относительной экспрессии гена выполняли методом $\Delta\Delta C_t$ с учетом эффективности ПЦР, определенной методом построения стандартных кривых (Bookout et al., 2002). Анализ продуктов ПЦР, плазмид и их фрагментов проводили с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием (0,5 мкг/мл). Гели просматривали и фотографировали в системе документации Gel Doc XR, далее изображения обрабатывали в программе Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad Laboratories, США).

Белковый иммуноблот (Western blotting)

Исследование проводили по стандартному протоколу. Клетки лизировали с помощью буфера (Reporter Lysis Buffer, BDBioscience), белки экстрактов клеток разделяли

с помощью электрофореза в 18% полиакриламидном геле (40 мА, 29 В 1,5 часа), перенос белков осуществляли на мембрану из поливинилденфторида (2 мА/см², 20В, 2 часа). Использовали первичные антитела к СОХ-2 и РGE2 (Thermo Scientific) и видоспецифичные вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Thermo Scientific). Белки визуализировали с использованием коммерческого набора по инструкции производителя (Bookout A.L., Cummins C.L., Mangelsdorf D.J., 2002). Результаты регистрировали с помощью системы гель-документирования Gel Doc XR Plus (BioRad, США).

Результаты и их обсуждение

Первично выделенные популяции клеток РПЭ в 1-й и во 2-й сериях опыта представляли собой прикрепленные к культуральному пластику отдельные островки полигональных и округлых эпителиальных клеток, с гранулами меланина в цитоплазме, отдельно разбросанные пигментированные эпителиальные клетки, а также фибробластоподобные клетки. Для получения чистой популяции клеток РПЭ первично прикрепленные островки пигментированных клеток через 5—7 суток культивирования выделяли с помощью стеклянных цилиндров диаметром 3 мм, переносили на новые чашки и продолжали культивировать до полного монослоя. Полученный монослой культуры РПЭ (P0) представлял собой гомогенную популяцию полигональных и округлых клеток эпителиального фенотипа, плотно прилегающих друг к другу с включениями гранул меланина в цитоплазме многих клеток. При пассировании и рассадке клеток в лунки экспериментальных планшетов в 1-й и 2-й сериях опыта наблюдалось уменьшение количества клеток РПЭ, содержащих гранулы ме-

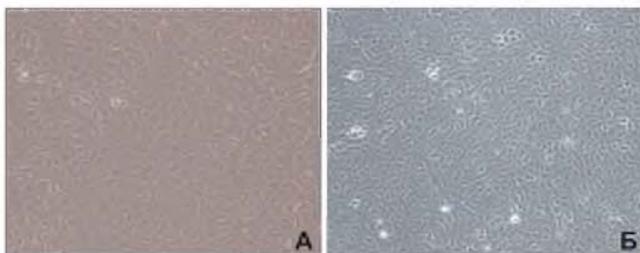


Рис. 1. Культура клеток РПЭ (P1): А — после воздействия двумя видами лазерного излучения в процессе факоэмульсификации, 1 пассаж. Световая микроскопия, ув. x20; Б — через 1 сут. после облучения He-Ne лазером в течение 3 мин, 1 пассаж. Световая микроскопия, ув. x10.

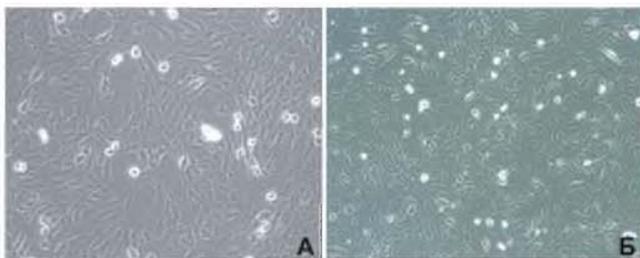


Рис. 2. Культура клеток РПЭ (P2): А — через 4 сут. культивации после облучения He-Ne лазером в течение 10 мин. Световая микроскопия, ув. x20; Б — после воздействия двумя видами лазерного излучения в процессе факоэмульсификации. Световая микроскопия, ув. x10.

ланина. В культурах клеток РПЭ второго пассажа лишь единичные клетки сохраняли пигментацию. Однако они сохраняли полигональный и овальный фенотип, характерный для эпителиальных клеток. Как видно на рис. 1, морфология клеток РПЭ на P1 и P2 в 1-й серии (после факоэмульсификации с Nd-YAG и He-Ne лазером) и 2-й серии опыта до облучения и после 3 мин и 10 мин воздействия He-Ne лазера не отличалась. Культуры как в 1-й, так и 2-й сериях опыта быстро пролиферировали, занимая 90—100% площади за 2—3 дня. В культуре клеток РПЭ после 3 мин и 10 мин облучения наблюдалось увеличение пролиферативной активности. Присутствие делящихся клеток в 1-й и 2-й сериях опыта наглядно продемонстрировано на рис. 2.

Жизнеспособность клеток РПЭ в 1 и во 2 серии опыта не изменялась и составляла от 97% до 100%, что было подтверждено с помощью автоматического счетчика клеток Cell Counter и продемонстрировано на рис. 3.

Цейтраферный анализ количества клеток на приборе Cell-IQ показал, что при культивировании клеток РПЭ после воздействия He-Ne лазера увеличивается пролиферация клеток по сравнению с контролем как в 1-й, так и во 2-й серии опыта. Результаты воздействия He-Ne лазера на пролиферативную активность культуры клеток РПЭ представлены в виде отдельных гистограмм на рис. 4 и графике пролиферации через 1 час, 1 сутки и 4 суток после 3 и 10 минут воздействия лазера в сравнении с контролем на рис. 5. Через 1 час не наблюдалось изменения индекса пролиферации по группам и составляло 2,3. Через 1 сутки индекс пролиферации после 10 мин облучения составил 2,6 и 2,4 после 3 мин облучения. В контроле он был равен 2,3. Через четверо суток наблюдалось незначительное снижение индекса пролиферации после 10 мин до 2,3, и практически не изменился после 3 мин облучения. В сравнении с контролем через четверо суток после облучения, в котором индекс пролиферации уменьшился до 2,1, в опытных группах после облучения оставался выше, что можно объяснить стимулирующим действием He-Ne лазера на пролиферацию клеточных культур РПЭ за счет увеличения синтеза ДНК и РНК.

Анализ культуры клеток РПЭ методом проточной цитофлуориметрии показал, что в контроле первичные, не пассированные, культуры (P0) экспрессируют CD14 — 10,7% от общего количества клеток в культуре, CD45 — 11,6%, CD34 — 0,9%, CD90 — 99,3% и CD105 — 78,9%. В культуре клеток РПЭ после второго пассажа (P2) по сравнению с клетками на нулевом пассаже (P0) доля CD90⁺ клеток во всех сериях опыта практически не изменялась, составляя 98,4—100%, CD105⁺ клеток увеличивалась до 79,5% в контроле, до 82% в 1-й серии опыта, до 81,2 после 3 мин облучения и до 77,9% после 10 мин облучения. Доля CD34⁺ клеток увеличивалась и варьировала в пределах от 0,3% до 1,9%, доля CD45⁺ клеток уменьшалась по сравнению с контролем и варьировала в пределах от 7,7% в культуре после 10 мин облучения до 12,3% в 1-й серии на P2. Доля CD14⁺ клеток заметно уменьшалась в контроле до 7,7% на P2 по сравнению с P0, а в опытных группах до 8,5% после 3 мин облучения и до 9,2% после 10 мин облучения и до 7,7% на P2 в 1-й серии опыта. Полученные по иммунофенотипированию культур РПЭ данные подтверждают гомогенность исследуемых культур и сохранение их фенотипа после облучения и культивирования.

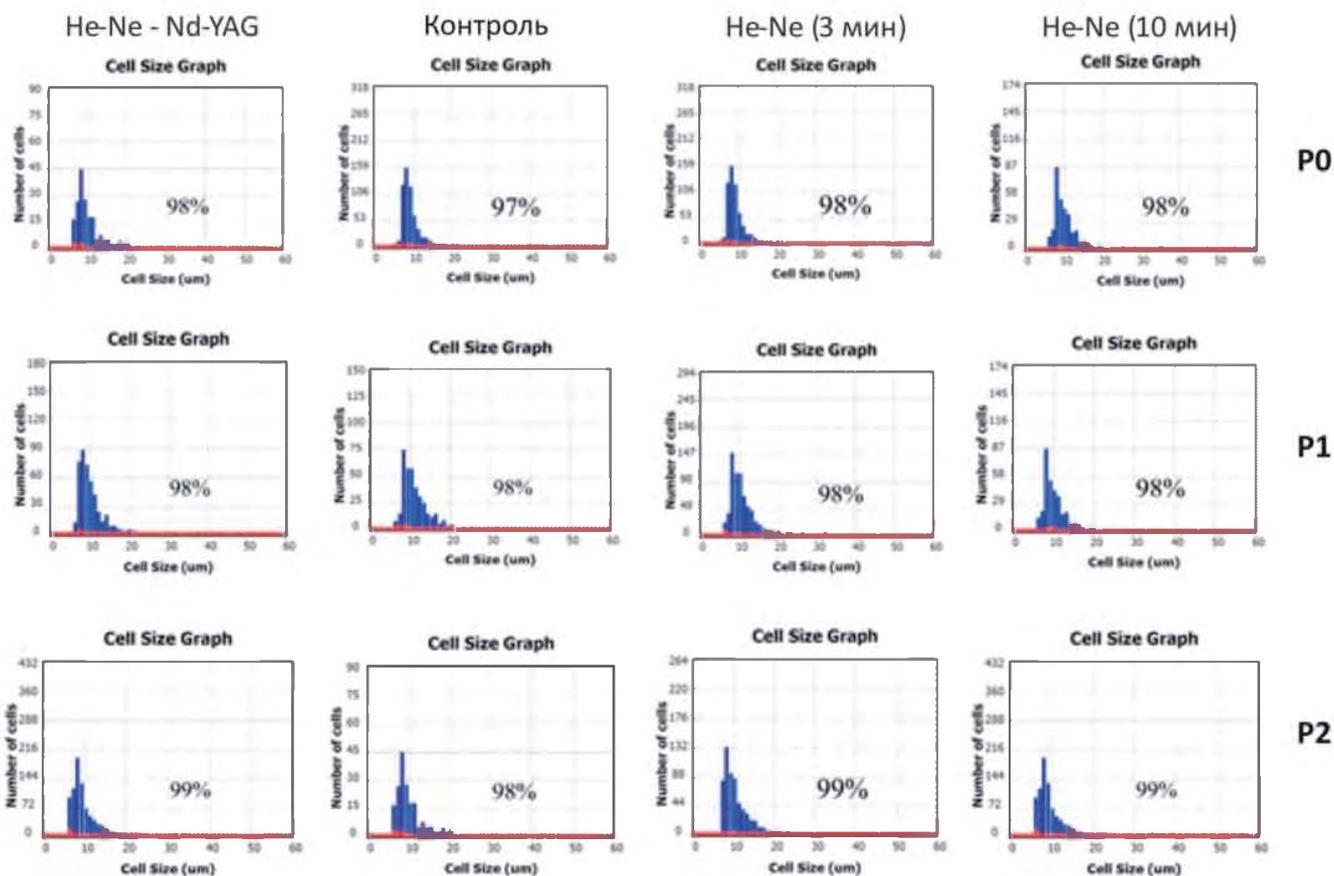


Рис. 3. Графики количественного распределения клеток РПЭ по размеру и жизнеспособности. Синим цветом отмечены жизнеспособные клетки, количество которых указано также в процентах от общего числа, красным — нежизнеспособные.

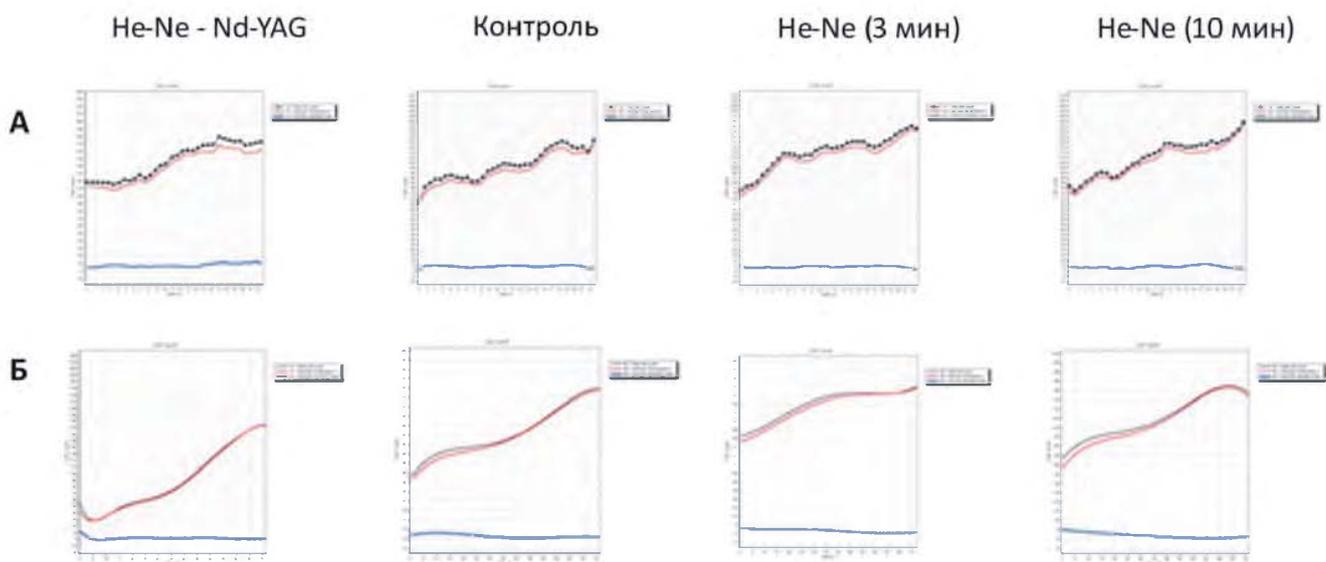


Рис. 4. Изменение количества клеток в культуре РПЭ. Цейтраферный анализ на приборе Cell-IQ: А — изменение количества клеток РПЭ в течение 1 сут. после культивирования в 1-й серии опыта и облучения клеточной культуры во 2-й серии опыта; Б — изменение количества клеток в культуре РПЭ в течение 3 суток после пассирования в 1-й серии и после облучения и пассирования во 2-й серии.

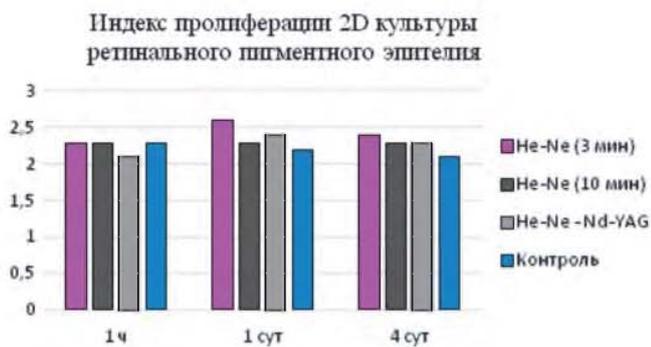


Рис. 5. Изменение индекса пролиферации в монослойной культуре клеток РПЭ в 1-й серии опыта при культивировании и во 2-й серии после воздействия He-Ne лазера через 1 час, 1 и 4 суток.

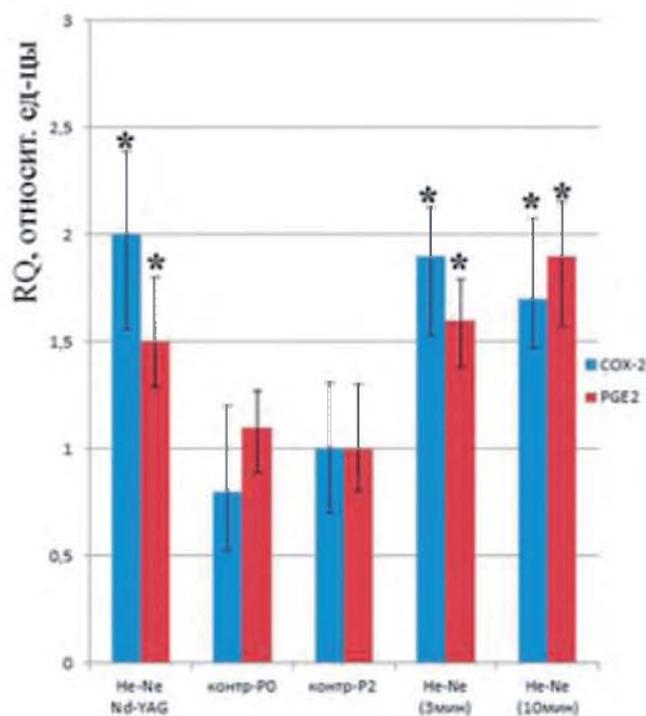


Рис. 6. Экспрессия генов COX-2 и PGE2 в культуре клеток РПЭ в контрольной и экспериментальных группах 1-й и 2-й серий. Отмечено стандартное отклонение. Звездочкой обозначено достоверное отличие значений относительно контрольных групп ($p < 0,05$).

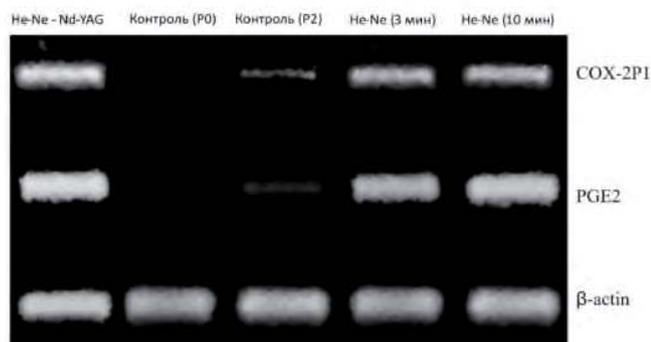


Рис. 7. Экспрессия белков COX-2 и PGE2 в культурах клеток РПЭ контрольных (P0 и P2) и экспериментальных групп 1-й и 2-й серий опыта (через 4 сут. после 3 мин и 10 мин облучения).

Методом ПЦР и белкового иммуноблота изучали экспрессию мРНК и уровень синтеза противовоспалительных белков: циклоксиогеназы-2 (COX-2) и простагландина-E2 (PGE2). Циклоксиогеназа-2 является конститутивным ферментом, который катализирует реакцию превращения арахидоновой кислоты в простагландин H2 (предшественник остальных простагландинов, простаглицлина и тромбоксана A2). Циклоксиогеназа-2 ключевой фермент синтеза простагландина-E2 в клетках. Методом ПЦР исследовано количественное соотношение относительной экспрессии генов COX-2 и PGE2 в контрольной и экспериментальных культурах. Значимое увеличение, по сравнению с контрольной группой, уровня экспрессии обоих противовоспалительных генов показано в экспериментальных группах независимо от того, на каком уровне, органо-тканевом или клеточном, проводили облучение и независимо от времени воздействия He-Ne лазера.

Сходное увеличение экспрессии на уровне мРНК и белковых продуктов противовоспалительных факторов циклоксиогеназы-2 (COX-2) и простагландина-E2 (PGE2) в клетках РПЭ было показано как после воздействия двух видов излучения в процессе фактоэмульсификации в 1-й серии опыта, так и во 2-й серии после 3 мин и 10 мин облучения первичных клеточных культур.

В количественном исследовании, проведенном методом ПЦР, был проанализирован относительный уровень экспрессии (RQ) противовоспалительных факторов циклоксиогеназы-2 (COX-2) и простагландина-E2 (PGE2), данные нормализовали по репортерному гену ODC и пробе с максимальным уровнем экспрессии. В культуре клеток РПЭ, выделенной из глаза, в котором была выполнена фактоэмульсификация с использованием двух видов излучения, и в культурах РПЭ после 3 мин и 10 мин воздействия He-Ne лазера, через четверо суток значимо возрас-тал уровень экспрессии мРНК генов, ответственных за синтез противовоспалительных факторов — простагландина E2 и циклоксиогеназы-2 в сравнении с контролем, что продемонстрировано на рис. 6.

Полученные результаты были подтверждены и дополнены методом белкового иммуноблота. В 1-й серии при параллельном использовании эндодиссектора Nd-YAG лазера в процессе операции так же, как и во 2-й серии, где проводилось только облучение He-Ne лазером, увеличивается синтез белковых продуктов генов простагландина E2 и циклоксиогеназы-2. В первичных культурах контрольных серий белки COX-2 и PGE2 методом белкового иммуноблота не обнаружены. Сопоставление экспрессии исследуемых белков производили с экспрессией контрольного белка — β -актина, присутствовавшего во всех типах клеток. Как показано на рис. 7, в контрольных культурах, не подвергшихся облучению на втором пассаже были выявлены следовые количества белков COX-2 и PGE2. После облучения He-Ne лазером вне зависимости от длительности облучения и присутствия дополнительного лазерного излучения эндодиссектора Nd-YAG, уровень синтеза данных белков COX-2 и PGE2 значительно увеличивался, что выражалось в интенсивности свечения иммунных меток.

Заключение

После комбинированного одновременного использования высокоэнергетического эндодиссектора Nd-YAG 1,44 мкм и биостимулирующего излучения низкоинтен-

сивного гелий-неонового лазера 632 нм, доставляемых одним световодом, не выявлено фототоксического эффекта на клеточные культуры РПЭ. Отмечено проявление биостимулирующего эффекта на клеточном уровне. Увеличение экспозиции облучения клеточной культуры РПЭ гелий-неоновым лазером с 3 до 10 мин не изменяет положительной биологической реакции клеток. Следовательно, в процессе операции нет необходимости контролировать время воздействия He-Ne лазера.

Наблюдаемое в эксперименте увеличение экспрессии простагландина E2 и циклоксигеназы-2 в клетках после облучения He-Ne лазером, как интраоперационно эндоокулярно, в условиях, приближенных к клинической ситуации операции катаракты с использованием эндодиссектора Nd-YAG 1,44 мкм в сопровождении He-Ne лазера 0,63 мкм, так и на монослойных культурах после 3 мин и 10 мин облучения He-Ne лазером, свидетельствует о подтверждении стимулирующего действия He-Ne лазера на репаративные процессы. Активация синтеза белков циклоксигеназы-2 и простагландина-2 после облучения He-Ne лазером модулирует миграционную и пролиферативную активность клеток внутриглазных структур, что приводит к активации репаративных процессов, снижению патологических изменений, как на клеточном, так и на органно-тканевом уровнях.

Список литературы

1. Алборова В.У., Копаев С.Ю., Копаева В.Г. Рефракционные результаты лазерной экстракции катаракт с Nd-YAG 1.44 мкм на автореальном глазу // Практическая медицина. — Офтальмология. — 2013. — №1—3 (70). — С. 84—85.
2. Басель Т.Б. Особенности реакции глазного яблока и нейроэндокринной системы организма при комплексном лечении передних увеитов излучением низкоинтенсивного гелий-неонового лазера: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — Одесса, 1988. — 19 с.
3. Бочаров В.Е. Ультразвуковая микрохирургия катаракты (факоэмульсификация): Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — М., 1977. — 28 с.
4. Васильев А.М. Низкоинтенсивная лазерная терапия в комплексном лечении больных герпетическими поражениями переднего отдела глаза в амбулаторных условиях: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — М., 2002. — 15 с.
5. Гундорова Р.А., Быков В.П., Бойко А.В. Ультразвуковая хирургия катаракты и стекловидного тела // Ультразвуковая диагностика и хирургия в офтальмологии. — М., 1980. — С. 30—32.
6. Дрягина О.Б., Копаев С.Ю., Копаева В.Г. Новый метод лазерного гемостаза конъюнктивальных сосудов глаза с излучением Nd: YAG 1.44 мкм // Вестник ОГУ. — 2013. — №4. — С. 75—77.
7. Журавлева Е.С., Сабурин И.Н., Борзенко С.А., Дога А.В., Кошелева Н.В., Качалина Г.Ф., Магарамов Д.А., Тонаева Х.Д. Экспериментальное исследование безопасности применения диодного лазера Iris Medical IQ 810 в клинике при лечении возрастной дегенерации макулы // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2011. — №3. — С. 16—21.
8. Каркищенко Н.Н. Клинические и альтернативные модели в лекарственной токсикологии // Биомедицина. — 2006. — №4. — С. 5—23.
9. Колокольцова Т.Д., Сабурин И.Н., Рыбаков А.С. Культура клеток как уникальная модель для исследования в современной биологии и медицине // Патогенез. — 2013. — №2. — С. 17—25.
10. Копаева В.Г., Андреев Ю.В. Лазерная экстракция катаракты. — М.: Офтальмология, 2011. — 261 с.
11. Копаева В.Г., Аскерова С.М., Копаев С.Ю., Шафиев А.Ч. Способ комбинированного использования неодимового ИАГ 1.44 мкм и гелий-неонового лазера в хирургии слезоотводящих путей // Заявка №2013131898. — Приоритет 11.07.2013. Решение ФИПС о выдаче патента от 14.07.2014.
12. Копаева В.Г., Копаев С.Ю. Основные достоинства отечественной лазерной хирургии катаракты // Вестник ОГУ. — 2012. — №12. — С. 94—97.
13. Копаева В.Г., Копаев С.Ю. Обобщение 15-летнего опыта лазерной хирургии катаракты // Практическая медицина. — Офтальмология. — 2013. — №1—3 (70). — С. 7—9.
14. Коростелева Н.Ф., Марченкова Т.Е. Ультразвуковая факоэмульсификация и ее влияние на эндотелий роговой оболочки // Офтальмохирургия. — 1991. — №2. — С. 21—26.
15. Линник Е.А., Сумская Л.В. Комбинированный метод лечения вторичных дистрофий роговицы лазерным облучением и мягкими контактными линзами // Лазерные методы лечения и ангиографические исследования в офтальмологии: Сб. науч. тр. — М., 1983. — С. 29—33.
16. Малюгин Б.Э. Медико-технологическая система хирургической реабилитации пациентов с катарактой на основе ультразвуковой факоэмульсификации с имплантацией ИОЛ: Автореф. дисс. на соискание ученой степени д.м.н. — М., 2002. — 49 с.
17. Панков О.П. Экспериментальное обоснование и клиническое использование низкоинтенсивного лазерного излучения в офтальмологии // Лазеры и аэроионы в биомедицине: Сб. докл., статей, сообщений и исследований. — Калуга, Обнинск, 1997. — С. 126—136.
18. Пешев Л.П. Основные механизмы действия лазерного излучения на биологические ткани // Клиническая лазерология: Практическое руководство для врачей. — Саранск — Калуга, 2008. — С. 21—46.
19. Фатюхина О., Колокольцова Т.Д., Трошкова Г.П. Оценка безопасности метода лазерно-индуцированной флюоресценции на модели культуры диплоидных клеток человека // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2007. — №4. — С. 203—206.
20. Федоров С.Н., Копаева В.Г., Андреев Ю.В. Лазерное излучение — принципиально новый вид энергии для хирургии хрусталика // Клиническая офтальмология. — 2000. — Т. 1, №2. — С. 43—47.
21. Ходжаев Н.С. Хирургия катаракты с использованием малых разрезов: клиничко-теоретическое обоснование: Автореф. дисс. на соискание ученой степени д.м.н. — М., 2000. — 48 с.
22. Bath P.E., Mueller G., Apple D.J. et al. Excimer laser lens ablation // Arch. Ophthalmol. — 1987. — Vol. 105. — P. 1164—1165.
23. Chentsova O.B., Ukhaneva G.L., Mozherenkov V.P., Karachenko L.N. The use of Helium-Neon laser unit LTM-01 in the treatment of the anterior segment of the eye // Ophthal. Zh. — 1985. — Vol. 40. — P. 473—474.
24. Conlan M.J., Rapley J.W., Cobb C.M. Biostimulation of wound healing by low energy laser irradiation A review // Journal of clinical periodontology. — 1996. — Vol. 23, №5. — P. 492—496.
25. Davison J.A. Reply to: Nichamin L.D. Acute intraoperative suprachoroidal hemorrhage (letter) // J. Cataract Refract. Surg. — 1994. — Vol. 20. — P. 107—108.
26. Dehm E.J., Puliafito C.A., Alder C.M. et al. Corneal endothelial injury in rabbits following excimer laser ablation at 193 and 248 nm // Arch. Ophthalmol. — 1986. — Vol. 104. — P. 1364—1368.
27. Hu W.P., Wang J.J., Yu C.L., Lan C.C.E., Chen G.S., Yu H.S. Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria // Journal of Investigative Dermatology. — 2007. — Vol. 127, №8. — P. 2048—2057.
28. Kim Y.G. Laser mediated production of reactive oxygen and nitrogen species; implications for therapy // Free radical research. — 2002. — Vol. 36, №12. — P. 1243—1250.
29. Niemi M. H. Laser-tissue interactions: fundamentals and applications. — Springer, 2007. — 271 p.
30. Puliafito C.A., Steinert R.F., Deutsch T.F., et al. Excimer laser ablation of the cornea and lens // Ophthalmol. — 1985. — Vol. 92. — P. 741—748.
31. Ross B.S., Puliafito C.A. Erbium-YAG and Holmium-YAG laser ablation of the lens // Laser in Surgery and Medicine. — 1994. — Vol. 15. — P. 74—82.
32. Snyder R.W., Noecker R.J., Jones H. In vitro comparison of phacoemulsification and erbium:YAG laser in lens capsule rupture // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 1994. — Vol. 35. — P. 1934.
33. Srivasan R., Braren B., Dreyfus R.W. Ultraviolet laser ablation of polyamide films // J. Appl. Phys. — 1987. — Vol. 61. — P. 372—376.

34. Steinert R.F., Puliafito C.A. YAG lasers in cataract surgery // Int. Ophthalmol. Clin. — 1987. — Vol. 27, №3. — P. 181—194.

35. Takahashi H., Sakamoto A. Takahashi R. et al. Free radicals in phacoemulsification and aspiration procedures // Arch. Ophthalmol. — 2002. — Vol. 120. — P. 1348—1352.

36. Topaz M., Motiei M., Assia E. et al. Acoustic cavitation in phacoemulsification: chemical effects, models of action and cavitation index // Ultrasound Med. Biol. — 2002. — Vol. 28. — P. 775—784.

Посмунна 19.12.2013

Experimental study of combined effect of Nd:YAG laser endodissector and biostimulating low-energy He-Ne laser on retinal pigment epithelium cell culture

Saburina I.N.^{1,2}, Kopaev S.Yu.³, Kopaeva V.G.³, Kosheleva N.V.^{1,4}, Borzenok S.A.³

¹ — FSBSI «Institute of general pathology and pathophysiology», 8, Baltiyskaya st., 125315, Moscow, Russia; e-mail: Saburina@mail.ru

² — Russian Medical Academy of Postgraduate Education, 2/1, Barrikadnaya st., 123995, Moscow, Russia

³ — Fyodorov Eye Microsurgery Complex FSBI, 59a, Beskudnikovsky boulevard, 127486, Moscow, Russia

⁴ — Lomonosov Moscow State University, Biological faculty, 119234, Moscow, Leninskie gory, 1, building 12

Development and adaptation of more effective, safe and available methods of eye microsurgery is an important objective in modern ophthalmology. The conducted in vitro study showed that combined use of high-energy Nd:YAG endodissector (1,44 mkm) and biostimulating low-energy beam of He-Ne laser (632 nm) delivered with one light guide, has a positive effect on monolayer cell culture of retinal pigment epithelium. The absence of changes in cell phenotype and high proliferative activity demonstrate stimulating effect of the studied beam. It was shown that in experimental groups independent of irradiation time synthesis of anti-inflammatory proteins cyclooxygenase-2 and prostaglandine-2 was induced, which resulted in activation of reparative processes, downregulation of pathological changes both on cellular and tissue-organ level.

Key words: *ophthalmosurgery, eye cataract, laser microsurgery, retinal pigment epithelium cells*