

УДК 577.31

П. А. Авроров¹, Е. Н. Чесноков¹, Г. А. Цветовская^{2, 3, 5},
Е. Д. Чикова^{2, 3}, В. П. Мальцев^{1, 2, 4}, А. В. Чернышев^{1, 2}

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 Центр новых медицинских технологий в Академгородке
ул. Пирогова, 25/4, Новосибирск, 630090, Россия

⁴ ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Кольцово Новосибирской обл., 630559, Россия

⁵ Институт химической биологии и фундаментальной медицины
пр. Акад. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия

E-mail: chern@kinetics.nsc.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИМПУЛЬСНОГО ИНФРАКРАСНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ОПТИЧЕСКИЕ И РЕЗИСТЕНТНЫЕ К ГЕМОЛИЗУ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ

Резистентность к гемолизу эритроцитов, находящихся в лизирующем изотоническом водном растворе хлорида аммония, проявляется в динамике изменения их оптических свойств. Оптические свойства эритроцитов регистрировались по светорассеянию от одиночных клеток на сканирующем проточном цитометре. Экспериментально показано, что в процессе гемолиза динамика изменения интегральной интенсивности светорассеяния эритроцитов различается для облученной и необлученной крови. Проведено сравнение данного эффекта при воздействии на цельную кровь терагерцового импульсного излучения лазера на свободных электронах и инфракрасного излучения непрерывного CO₂ лазера той же средней мощности в двух режимах облучения – непрерывном и прерывистом. На основе полученных результатов можно сделать предположение, что наблюдаемый эффект от импульсного инфракрасного излучения малой средней мощности вызван нестационарным тепловым нагревом эритроцитов.

Ключевые слова: эритроциты, импульсное инфракрасное излучение, лазер на свободных электронах, гемолиз, сканирующий проточный цитометр.

Введение

Изучение биологических объектов является одним из традиционных направлений исследований с применением инфракрасного излучения, а в последнее время все больший интерес у исследователей вызывает его терагерцовый диапазон. Работы в этой области можно разделить на два типа: 1) использование терагерцового излучения для «зондирования» (спектроскопия [1; 2; 3], получение изображений [4; 5; 6], детектирование [7] и пр.) и 2) воздействие излучения

на биологические объекты разного уровня организации (многоклеточные [8; 9], клетки [10; 11], биомолекулы [12; 13]). Появление и распространение лазеров на свободных электронах (ЛСЭ) решило проблему источников импульсного лазерного излучения достаточной мощности и произвольной длины волны терагерцового диапазона для биологических исследований [14; 15]. До настоящего времени, большинство работ в этой области было посвящено исследованию тонких пленок или обезвоженного биологического материала. Это объясняется

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 07-04-00356 и 08-02-91954), интеграционных программ Сибирского отделения РАН (№ 2009-37 и 2009-7), программы Президиума РАН (№ 2009-27), а также научной школы НШ-387.2008.4 (руководитель С. В. Нетесов).

тем, что обычно в нативных биологических объектах существенную долю занимает вода, которая хорошо поглощает инфракрасное излучение, в том числе и в терагерцовом диапазоне. Обращая внимание на спектр поглощения воды [15] на рис. 1 видно, что экстинкция воды меняется от 10^2 до 10^4 см^{-1} в диапазоне от 0,1 до 20 ТГц. Это ограничивает глубину проникновения излучения диапазоном от единицы до сотни микрон. Интересно, что в этом диапазоне находятся размеры биологических клеток, что в принципе позволяет «просветить насквозь» нативную (живую) клетку терагерцовым излучением. Однако в литературе встречается относительно мало работ, посвященных воздействию терагерцового излучения на клетки [10; 11]. Это связано с тем, что требуется особая методика, при которой воздействующее излучение существенно не поглощается средой, окружающей клетку, и при этом клетка остается нативной. Другая проблема при работе с клетками заключается в получении статистически достоверной информации, требующей измерения большого количества клеток, так как каждая клетка может вести себя в эксперименте по-разному.

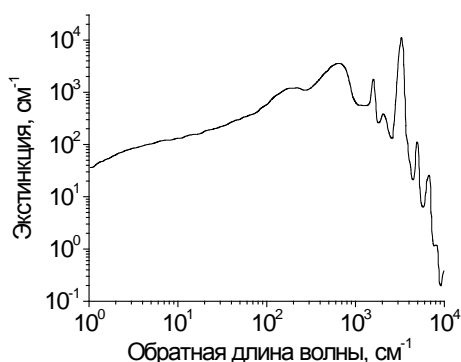


Рис. 1. Коэффициент поглощения воды при комнатной температуре [15]

Одним из процессов, позволяющих выявить физиологическое изменение в подвергшихся облучению эритроцитах, может служить их лизис (гемолиз) в изотоническом водном растворе хлорида аммония NH_4Cl [16]. В процессе гемолиза вследствие проникновения ионов NH_4^+ внутрь клетки эритроциты сначала увеличиваются в объеме, меняя форму от нативной (двояковогнутой диск) до сферической, а затем лопаются от нарастающего внутриклеточного осмоти-

ческого давления. Привлекательность данного вида гемолиза для динамической диагностики эритроцитов заключается в том, что время протекания процесса находится в удобном временном диапазоне: время сферизации и время жизни сферизованных клеток составляет несколько минут (это время можно регулировать, меняя концентрацию ионов HCO_3^- в окружающей клетку водной среде). Это достаточно длительный промежуток времени для измерения динамики популяции эритроцитов на автоматическом анализаторе одиночных клеток, в частности на проточном цитометре, который может измерять оптические свойства одиночных клеток с большой скоростью (до нескольких тысяч клеток в секунду), обеспечивая требуемую статистическую достоверность. Кроме того, в данном временном диапазоне можно пренебречь более медленными процессами метаболизма и энергозависимых мембранных ионообменников эритроцита, так что динамика гемолиза лимитируется скоростью работы основного (занимающего 25 % поверхности мембраны) энергозависимого мембранного анионного обменника эритроцита – белка по лю бы 3 [16]. Таким образом, если терагерцовое излучение модифицирует мембранные белки, в частности белок полосы 3, это повлияет на скорость данного вида гемолиза, что будет свидетельством изменения резистентных свойств эритроцитов.

Целью настоящей работы было исследование изменения свойства резистентности эритроцитов к гемолизу при воздействии на цельную кровь импульсного терагерцового лазерного излучения, генерируемого ЛСЭ, и инфракрасного излучения CO_2 лазера. Ввиду того что терагерцовое излучение поглощается в поверхностном слое крови толщиной в несколько микрон, для решения проблемы равномерного облучения всех эритроцитов образца была применена методика интенсивного перемешивания крови магнитной мешалкой. Для измерения светорассеяния одиночных эритроцитов в процессе гемолиза использовался сканирующий проточный цитометр [17], который ранее уже применялся авторами для измерения как морфологических (объем, концентрация гемоглобина, индекс сферичности), так и динамических (проницаемость и предел прочности мембраны) параметров эритроцитов [16; 18].

Инструментальная часть

Для подготовки образцов использовалась цельная периферическая кровь из локтевой вены здоровых доноров (без предварительного наложения жгута и массажа предплечья), взятая с помощью шприца в одноразовую пластиковую пробирку с антикоагулянтом EDTA. Образцы крови использовались в экспериментах при комнатной температуре (20 °С) в течение трех часов.

Схема установки по облучению образцов крови приведена на рис. 2. В качестве источника терагерцового излучения использовался лазер на свободных электронах [12; 13; 19] Сибирского центра фотохимических исследований и технологий СО РАН. В качестве источника инфракрасного излучения на длине волны 10 мкм использовался непрерывный CO₂ лазер. Для уменьшения средней мощности излучения (в целях предотвращения перегрева образцов) при сохранении исходной пиковой мощности на пути распространения излучения ставился прерыватель – вращающийся непроницаемый (для излучения) металлический диск с небольшим (занимающим 1/9 поверхности диска) проницаемым окном, позволяющим уменьшить среднюю частоту следования импульсов в 9 раз. В результате параметры облучения ЛСЭ (после прерывателя) были следующие: длина волны 130 или 154 мкм, длительность импульса 70 пс, плотность пиковой мощности 0,9 кВт/см², плотность средней мощности 5 мВт/см², средняя частота повторения импульсов 0,62 МГц (в 9 раз меньше частоты ЛСЭ до прерывателя, 5,6 МГц). Облучение CO₂ лазером осуществлялось в двух режимах: 1) непрерывный (прерыватель остановлен); 2) импульсный (прерыватель вращается, обеспечивая частоту импульсов 50 Гц с длительностью импульса 2 мс) с пиковой мощностью излучения в 9 раз выше средней мощности.

Цельная кровь (с EDTA) помещалась пипеткой в несколько одинаковых лунок планшета (стандартный планшет для ИФА, плоскодонный, без крышки) по 200 мкл в каждую лунку. Лунки были цилиндрические, диаметром 7 мм и глубиной 11 мм. Сверху лунки с кровью закрывались тонкой полиэтиленовой пленкой (толщиной 25 мкм, проницаемой для излучения) для предотвращения испарения образцов (при этом

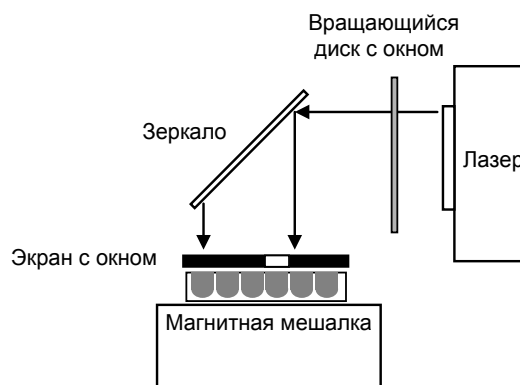


Рис. 2. Схема установки для облучения образцов крови

оставался воздушный зазор величиной 2 мм между поверхностью крови и полиэтиленовой пленкой) и металлическим экраном с окошком, предотвращающим облучение контрольных образцов. Лазерное излучение заводилось сверху в лунку через окошко в экране. Диаметры лазерных лучей были много больше диаметра лунки: для лазера на свободных электронах диаметр луча составлял ~ 20 см, а для CO₂ лазера ~ 10 см (для расширения диаметра луча использовалась линза). Планшет с кровью устанавливался на магнитной мешалке, а в каждой лунке находился отрезок стальной проволоки диаметром 0,5 и длиной 4 мм, посредством которой кровь интенсивно перемешивалась во время облучения. Необходимость перемешивания была вызвана тем, что эффективная глубина проникновения излучения с используемыми длинами волн (10, 130, 154 мкм) в кровь составляет около 30 мкм, и следовало обеспечить регулярный подъем клеток из глубины на поверхность и увод клеток с поверхности в глубину, с тем чтобы все клетки образца получили одинаковую дозу в течение всей процедуры облучения. Облучение каждого образца длилось 20 мин при средней плотности мощности 5 мВт/см² (кроме одного эксперимента при непрерывном излучении CO₂ лазера с плотностью мощности 20 мВт/см²). Данная мощность и длительность облучения были выбраны такими же, как и в известных из литературы экспериментах, где был зарегистрирован эффект от импульсного терагерцового излучения ЛСЭ, воздействующего на лимфоциты в цельной крови [11]. В каждом эксперименте участвовало по 8 лунок с кро-

вью: из них 2 лунки в центре облучались, а остальные 6 лунок не облучались (для контроля), но были в одинаковых прочих условиях с облучаемыми лунками (с той же интенсивностью перемешивались магнитной мешалкой и пр.).

Методика проведения лизиса эритроцитов в изотоническом водном растворе NH_4Cl была стандартной [16]. Непосредственно перед экспериментами составлялся лизирующий раствор из расчета 0,15 Моль NH_4Cl и 3 мМоль NaHCO_3 на 1 л обезгаженной дистиллированной воды. Обезгаживание проводилось по стандартной методике методом кипячения и последующего охлаждения воды без доступа воздуха для удаления растворенного CO_2 , который существенно повышает скорость гемолиза эритроцитов в изотоническом растворе хлорида аммония. Для повышения степени воспроизводимости экспериментальных результатов проводилось единовременное обезгаживание исходного водного раствора, из которого затем готовились все пробы для проведения гемолиза. Содержание остаточных газов не контролировалось, но так как обезгаживание проводилось единообразно для всех образцов, можно предполагать, что содержание остаточных газов в них было одинаковым (что важно для наблюдения относительного эффекта).

Для измерения клеток в реальном времени процесса гемолиза цельная кровь разбавлялась в 1 000 раз лизирующим раствором в пробирке, из которой клетки непосредственно поступали в сканирующий проточный цитометр (СПЦ). СПЦ позволяет измерять угловую зависимость между падающим и

рассеянным светом (индикатрису) интенсивности светорассеяния от одиночных частиц (клеток аггратов и пр.) со скоростью до 500 частиц в секунду. Используемая в данной работе конфигурация СПЦ измеряет индикатрису светорассеяния в диапазоне полярных углов от 5 до 60°, интегрируя светорассеяние по азимутальному углу от 0 до 180°. Из каждой пробы, поступающей на измерение СПЦ, записывали более 5 000 сигналов светорассеяния одиночных частиц.

Пример сигнала светорассеяния, регистрируемый СПЦ от одиночной клетки, приведен на рис. 3. Прямоугольный «провал» на рисунке означает переключение каналов аналого-цифрового преобразователя (АЦП). В СПЦ есть два разных фотоприемника: 1) «триггерный» для регистрации пересечения частицей поперечного лазерного луча (для привязки по времени прохождения частицей определенной точки измерительной системы СПЦ) и 2) «индикатрисный» для регистрации угловой функции светорассеяния (индикатрисы) одиночной частицы в продольном лазерном луче. Аналоговые сигналы от разных фотоприемников поступают на разные каналы многоканального АЦП с разным нулевым уровнем. Триггерный сигнал запускает (с определенной временной задержкой) переключение каналов между измерением триггера и индикатрисы. В момент такого переключения на выходе АЦП и наблюдается «прямоугольный провал», равный разности нулевых уровней каналов. Характерная осциллирующая структура сигнала, состоящего из минимумов и максимумов, является следствием интерференции лазерного излучения на клетке и содержит важную информацию, позволяющую во многих случаях идентифицировать определенные типы клеток.

Сигнал светорассеяния зависит от оптических параметров клетки, которые задаются ее морфологическим строением (размер, плотность, форма, внутренняя структура). Если клетка претерпевает морфологические изменения, то это приводит к изменению ее сигнала светорассеяния. Известно, что в процессе гемолиза в изотоническом водном растворе NH_4Cl эритроциты вначале сферизуются, а затем, пребывая некоторое время в сферической форме, лопаются. Оптические свойства клетки можно характеризовать по интегральному сигналу светорассеяния, интегрируя СПЦ сигнал светорассеяния от



Рис. 3. Регистрируемый на СПЦ сигнал светорассеяния от одиночной клетки: большему времени соответствует меньший угол светорассеяния

частицы по времени – от 0 до 1,8 мс (см. рис. 3). Тогда временную динамику популяции эритроцитов в процессе гемолиза можно изобразить на графике в координатах «интегральная интенсивность СПЦ сигнала светорассеяния – время» в виде цитограммы, т. е. совокупности точек, каждая из которых соответствует единичной клетке. Теоретически интегральная интенсивность светорассеяния зависит от объема, формы, показателя преломления и угла ориентации эритроцита относительно падающего излучения.

В процессе набухания (сферизации) эритроцита сохраняется площадь клеточной мембраны, но увеличивается объем клетки, что влечет уменьшение ее показателя преломления и изменение формы, а также среднего угла ориентации в потоке при измерении СПЦ. Таким образом, если в процессе предварительного облучения произошли существенные изменения показателя преломления, формы или объема клетки, это проявится в последующем гемолизе в изотоническом растворе хлорида аммония по изменению зависимости интегрального светорассеяния от времени на измеренной цитограмме. Примеры таких полученных нами цитограмм гемолиза показаны на рис. 4 и 5 для необлученных и облученных эритроцитов. Видно, что динамические цитограммы облученных и необлученных эритроцитов могут отличаться, и для выбора меры такого отличия в данной работе используется следующая процедура. Для каждого выбранного значения времени по динамической цитограмме определяется среднее значение «интегральной интенсивности СПЦ сигнала светорассеяния» эритроцитов, зарегистрированных в течение небольшого временного интервала около этого момента времени. Далее, делением средней интегральной интенсивности на ее значение в начальный момент времени определяется относительная средняя интегральная интенсивность, которая и является мерой отличия гемолиза облученных и необлученных эритроцитов.

Результаты и обсуждение

На рис. 6–10 приведены полученные временные зависимости относительной средней интегральной интенсивности СПЦ сигнала светорассеяния для измеренных в

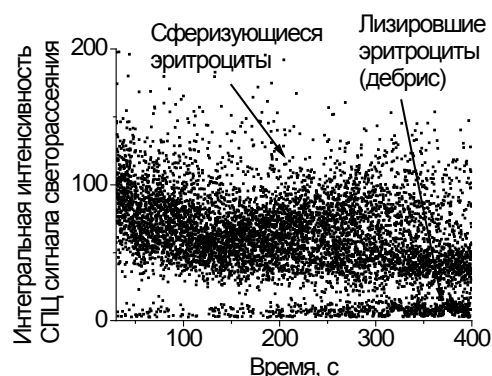


Рис. 4. Цитограмма лизиса необлученных эритроцитов

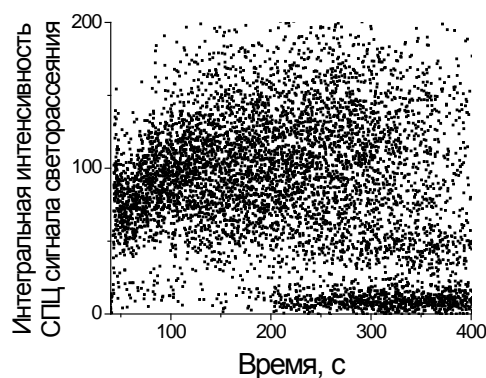


Рис. 5. Цитограмма лизиса эритроцитов, облученных непрерывным CO_2 лазером с плотностью мощности излучения 20 мВт/см^2 (без прерывателя)

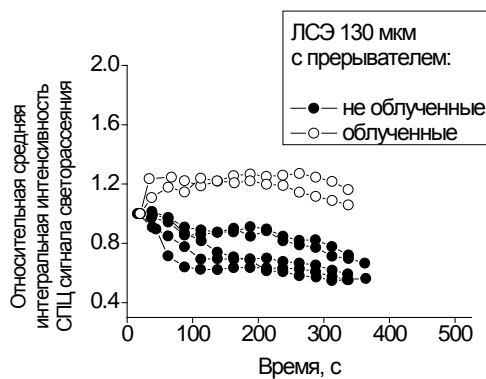


Рис. 6. Динамика интенсивности светорассеяния эритроцитов: излучение ЛСЭ на 130 мкм при средней плотности мощности 5 мВт/см^2 (полые кружки) после прерывателя

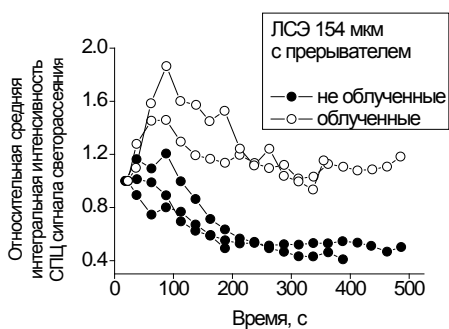


Рис. 7. Динамика интенсивности светорассеяния эритроцитов: излучение ЛСЭ на 154 мкм при средней плотности мощности 5 мВт/см² (полые кружки) после прерывателя

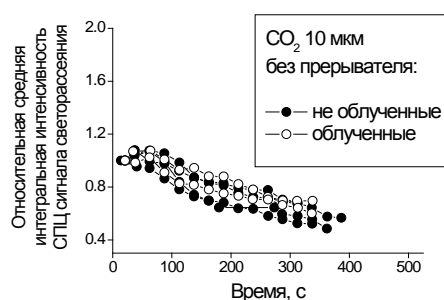


Рис. 8. Динамика интенсивности светорассеяния эритроцитов: излучение СО₂ лазера при плотности мощности 5 мВт/см² (полые кружки), без прерывателя

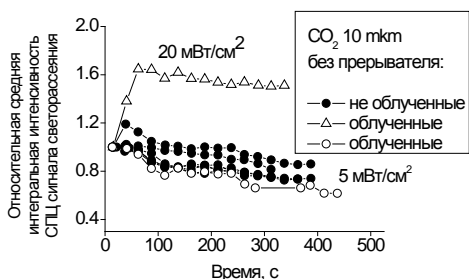


Рис. 9. Динамика интенсивности светорассеяния эритроцитов: излучение СО₂ лазера при 5 мВт/см² (полые кружки) и 20 мВт/см² (полые треугольники), без прерывателя

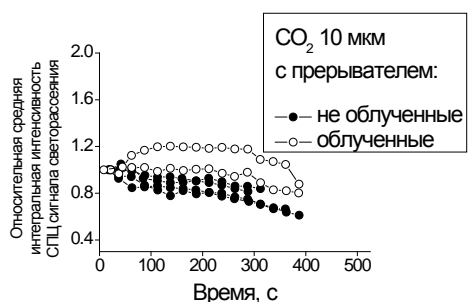


Рис. 10. Динамика интенсивности светорассеяния эритроцитов: излучение СО₂ лазера при средней плотности мощности 5 мВт/см² (полые кружки) после прерывателя

процессе гемолиза разных проб эритроцитов – как необлученных, так и облученных с использованием ЛСЭ и СО₂ лазеров. Из рисунков видно, что качественно эффект проявляется схожим образом для обоих источников лазерного излучения: в процессе гемолиза относительная средняя интегральная интенсивность СПЦ сигнала светорассеяния для облученных эритроцитов со временем становится больше, чем для необлученных. Количественно при одной и той же средней мощности излучение СО₂ лазера в прерывистом режиме (см. рис. 10) вызывает больший эффект, чем в непрерывном (см. рис. 8), но меньший чем импульсное терагерцовое излучение (см. рис. 6, 7), т. е. эффект больше при меньшем времени импульса. В случае непрерывного излучения СО₂ лазера, как видно из рис. 9, для достижения заметного эффекта требуется значительно большая средняя мощность (20 мВт/см²), а при мощностях 5 мВт/см² эффект не наблюдается на фоне разброса экспериментальных данных по разным контрольным образцам.

Полученные результаты могут быть объяснены возникновением нестационарного теплового нагрева эритроцитов при поглощении импульсного излучения. При одинаковой средней мощности импульсный нагрев более эффективно модифицирует белки, чем непрерывный, ввиду более высокой пиковой мощности и относительно длительного (по сравнению со временем импульса) времени релаксации больших белковых молекул. Действительно, из литературы известно [20], что времена релаксации различных процессов в белках находятся в широком диапазоне и могут достигать десятков секунд (например, для кинетики сворачивания-разворачивания).

Заключение

В данной работе применена методика измерения в реальном времени динамики лизиса эритроцитов в изотоническом водном растворе хлорида аммония для регистрации эффекта воздействия импульсного инфракрасного лазерного излучения с длиной волны 10, 130 и 154 мкм на оптические свойства и свойства резистентности эритроцитов к гемолизу. Для определенности, используемая мощность 5 мВт/см² и длительность 20 мин облучения были выбраны

такими же, как и в известных из литературы экспериментах, где был зарегистрирован эффект от импульсного терагерцового излучения ЛСЭ на лимфоциты в цельной крови. Облученные и необлученные (контрольные) эритроциты измерялись автоматическим проточным анализатором одиночных частиц по светорассеянию – сканирующим проточным цитометром. Экспериментально показано, что инфракрасное облучение (как ЛСЭ, так и CO₂ лазером) существенно меняет временную динамику относительной средней интегральной интенсивности СПЦ сигнала светорассеяния эритроцитов при гемолизе в изотоническом водном растворе хлорида аммония, что может быть связано с изменением оптических свойств (реальной и мнимой частей показателя преломления) гемоглобина при облучении. При одинаковой средней плотности мощности 5 мВт/см² данный эффект проявляется качественно одинаково при длинах волн 10, 130 и 154 мкм, но количественно эффект тем больше, чем меньше время лазерного импульса, а при непрерывном излучении (CO₂ лазер) эффект пропадает (становится меньше статистического разброса данных по разным контрольным образцам). Показано, что данный эффект можно получить и при непрерывном лазерном излучении (CO₂ лазер), но при существенном увеличении плотности мощности (20 мВт/см²). Предположено, что наблюдаемый эффект от импульсного лазерного излучения малой средней мощности вызван нестационарным тепловым нагревом эритроцитов.

Список литературы

1. *Giovenale E., D'Arienzo M., Doria A., Gallerano G. P., Lai A., Messina G., Piccinelli D.* Absorbtion and Diffusion Measurements of Biological Samples Using a THz Free Electron Laser // *J. Biol. Phys.* 2003. Vol. 29. P. 159–170.
2. *Taday P. F., Bradley I. W., Arnone D.* Terahertz Pulse Spectroscopy of Biological Materials: L-Glutamic Acid // *J. Biol. Phys.* 2003. Vol. 29. P. 109–115.
3. *Yu B., Zeng F., Yang Y., Xing Q., Chechin A., Xin X., Zeylikovich I., Alfano R. R.* Torsional Vibrational Modes of Tryptophan Studied by Terahertz Time-Domain Spectroscopy // *Biophys. J.* 2004. Vol. 86. No. 3. P. 1649–1654.
4. *Berry E., Handley J. W., Fitzgerald A. J., Merchant W. J., Boyle R. D., Zinov'ev N. N., Miles R. E., Chamberlain J. M., Smith M. A.* Multispectral Classification Techniques for Terahertz Pulsed Imaging: An Example in Histopathology // *Med. Eng. Phys.* 2004. Vol. 26. No. 5. P. 423–430.
5. *Mair S., Gompf B., Dressel M.* Microspectroscopy and Imaging in the THz Range Using Coherent CW Radiation // *Physics in Medicine and Biology.* 2002. Vol. 47. No. 21. P. 3719–3725.
6. *Woodward R. M., Wallace V. P., Pye R. J., Cole B. E., Arnone D. D., Linfield E. H., Pepper M.* Terahertz Pulse Imaging of Ex Vivo Basal Cell Carcinoma // *J. Invest. Dermatol.* 2003. Vol. 120. No. 1. P. 72–78.
7. *Menikh A., Mickan S. P., Liu H., Maccoll R., Zhang X. C.* Label-Free Amplified Bioaffinity Detection Using Terahertz Wave Technology // *Biosens. Bioelectron.* 2004. Vol. 20. No. 3. P. 658–662.
8. *Smye S. W., Chamberlain J. M., Fitzgerald A. J., Berry E.* The Interaction between Terahertz Radiation and Biological Tissue // *Phys. Med. Biol.* 2001. Vol. 46. No. 9. P. 101–112.
9. *Fedorov V. I., Popova S. S., Pisarchik A. N.* Dynamic Effects of Submillimeter Wave Radiation on Biological Objects of Various Levels of Organization // *Intern. J. Infrared and Millimeter Waves.* 2003. Vol. 24. No. 8. P. 1235–1252.
10. *Clothier R. H., Bourne N.* Effects of THz Exposure on Human Primary Keratinocyte // *J. Biol. Phys.* 2003. Vol. 29. P. 179–185.
11. *Scarfi M. R., Romanò M., Pietro R., Zenni O., Doria A., Gallerano G. P., Giovenale E., Messina G., Lai A., Campurra G., Coniglio D., D'Arienzo M.* THz Exposure of Whole Blood for the Study of Biological Effects on Human Lymphocytes // *J. Biol. Phys.* 2003. Vol. 29. P. 171–176.
12. *Петров А. К., Козлов А. С., Тарабан М. Б. и др.* Мягкая абляция биологических объектов под воздействием субмиллиметрового излучения лазера на свободных электронах // *ДАН.* 2005. Т. 404, вып. 5. С. 698–700.
13. *Лаврик Н. Л., Немова Е. Ф.* Изучение действия терагерцового излучения лазера на свободных электронах на лиофилизированные образцы бычьего сывороточного альбумина методами ИК и УФ спектроскопии // *Вестн.*

Новосиб. гос. ун-та. Серия: Физика. 2007. Т. 2, вып. 4. С. 96–101.

14. *Grosse E.* THz Radiation from FELs and its Potential for Cell and Tissue Studies // *Phys. Med. Biol.* 2002. Vol. 47. No. 21. P. 3755–3760.

15. *Gallerano G. P.* Tera-Hertz Radiation in Biological Research, Investigations on Diagnostics and Study on Potential Genotoxic Effects // THz-BRIDGE Final report. Frascati. Italy. 2004. URL: <http://www.frascati.enea.it/THz-BRIDGE/>

16. *Chernyshev A. V., Tarasov P. A., Semionov K. A., Nekrasov V. M., Hoekstra A. G., Maltsev V. P.* Erythrocyte Lysis in Isotonic Solution of Ammonium Chloride: Theoretical Modeling and Experimental Verification // *J. Theor. Biol.* 2008. Vol. 251. P. 93–107.

17. *Maltsev V. P.* Scanning Flow Cytometry for Individual Particle Analysis // *Rev. Sci. Instr.* 2000. Vol. 71. P. 243–255.

18. *Yurkin M. A., Semyanov K. A., Tarasov P. A., Chernyshev A. V., Hoekstra A. G., Maltsev V. P.* Experimental and Theoretical Study of Light Scattering by Individual Mature Red Blood Cells by Use of Scanning Flow Cytometry and a Discrete Dipole Approximation // *Appl. Opt.* 2005. Vol. 44. P. 5249–5256.

19. *Bolotin V. P., Kairan D. A., Knyazev B. A. et al.* Status of Novosibirsk Free Electron Laser and First Experiments with High Power Terahertz Radiation // Preprint of Institute of Nuclear Physik. Novosibirsk, 2004. URL: <http://www.inp.nsk.su/publications>.

20. *Рубин А. Б.* Биофизика. М.: Кн. дом «Университет», 1999. Т. 1: Теоретическая биофизика. С. 297.

Материал поступил в редколлегию 12.05.2009

**P. A. Avrorov, E. N. Chesnokov, G. A. Tsvetovskaya, E. D. Chikova,
V. P. Maltsev, A. V. Chernyshev**

STUDY OF THE INFLUENCE OF PULSE INFRARED RADIATION ON OPTICAL AND HEMOLYSIS RESISTANT PROPERTIES OF ERYTHROCYTES

Resistance to hemolysis of erythrocytes in lysing isotonic water solution of ammonium chloride becomes apparent in the dynamics of the change of their optical properties. Optical properties of erythrocytes were registered on light scattering from single cells with a scanning flow cytometer. It was shown experimentally during hemolysis the dynamics of the change of the integral intensity of light scattering of erythrocytes is different for irradiated and non-irradiated human blood. Qualitatively, the effect is similar for the both sources of pulse radiation: at the beginning of hemolysis the mean integral intensity of irradiated erythrocytes is increasing more than that is of non-irradiated ones. Quantitatively, at the same mean power density the interrupted irradiation of CO₂ laser caused greater effect than continuous one, but less than pulsed terahertz irradiation, i.e. the effect is greater for shorter pulse. On the base of the obtained results one can suggest that the observed effect on pulse infrared radiation of low mean power caused by unsteady heating of erythrocytes.

Keywords: erythrocytes, pulse infrared radiation, free electron laser, hemolysis, scanning flow cytometer.