

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА БИОМОЛЕКУЛЫ КРОВИ

На основании литературных данных, собственных спектральных исследований образцов цельной крови обсуждаются гипотезы механизма фотовоздействия низкоинтенсивного лазерного излучения на кровь. Анализируются спектральные проявления фотохимических реакций, инициируемых в крови терапевтическими дозами светового облучения; сопоставляются методики пробоподготовки цельной крови и ее компонентов, а также спектральные характеристики облученной цельной крови больных и здоровых доноров.

Низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ) – один из методов эфферентной терапии, который достаточно эффективно применяется в различных областях современной медицины [1, 2]. В руководствах и учебниках [1, 2, 3] обобщен опыт использования лазера в терапии, разработана теория, удовлетворительно объясняющая эффекты облучения. Тем не менее, несмотря на существующие нормативные документы [3, 4], клиницисты используют различные (в некоторых случаях произвольно выб-

ранные) режимы, условия облучения, по-разному контролируют реакцию организма и оценивают эффективность лечения. Это, во многом, связано с тем, что до настоящего времени нет единого мнения о механизмах действия НИЛИ на цельную кровь, о первичных фотоакцепторах и фотоэффектах, происходящих на молекулярном уровне, которые первичны при взаимодействии с электромагнитным излучением [1-3, 5-8].

Разрозненность научных и практических данных приводит к эмпирическому подходу применения НИЛИ в клинической практике и, как следствие, недостаточной эффективности лазерной терапии.

В клинической практике используются следующие способы доставки излучения к тканям организма при проведении сеансов лазеротерапии:

- Экстракорпоральное или внутривенное лазерное воздействие на кровь.
- Подведение излучения к патологическому очагу с помощью эндоскопа.
- Чрезкожное воздействие на болевую точку или проекцию органа.
- Воздействие на рефлекторные точки акупунктуры [7, 9, 10].

При любом способе лазерного облучения в формировании биологического отклика на фотовоздействие непременно вовлекаются форменные элементы крови. Существует несколько гипотез, отражающих предполагаемый первичный эффект воздействия НИЛИ.

• Первой и наиболее очевидной гипотезой механизма действия НИЛИ, безусловно, является конверсия поглощенной энергии излучения в тепло. Этот "тепловой" механизм многократно обсуждался в литературе, однако он часто на практике неоправданно игнорируется, ибо существует мнение, и имеются многочисленные экспериментальные данные, что при уровнях энергий, используемых в НИЛТ, нагрев тканей не превышает $0,1^{\circ}\text{C}$ [11], что, по мнению большинства специалистов, пренебрежимо мало. Это действительно так, если говорить о средней температуре ткани в области облучения, хотя вся разница между нормой и общим болезненным состоянием у человека составляет по шкале температур не более $0,3-0,4^{\circ}\text{C}$. Как отмечает М.А. Каплан в [12], а также другие авторы [13], лазерное излучение способно приводить не только к общему среднему нагреву тканей, но и к существенной локальной неоднородности температурного градиента в тканях, особенно на уровне одной клетки или ее органелл. А это уже более заметно может влиять на константы скорости биохимических реакций, может приводить к деформации клеточных мембран, изменению их электропотенциалов. Механизм действия НИЛИ – быстрый локальный нагрев и перегрев внутриклеточных структур и молекул клетки и ускорение на этой основе каскада специфических клеточных биохимических реакций. Протекание эндотермических химических реакций зависит, как показывают многие физические исследования, в общем случае не только от средней подводимой тепловой энергии к реагентам, но и от скорости и частоты нагрева, которые могут влиять на

константы термодинамических реакций [13]. Это может дать толчок к пониманию особенностей импульсной низкоинтенсивной лазерной терапии (НИЛТ) в сравнении с непрерывным излучением.

- Сторонники второй – полагают, что лазерное излучение активизирует некоторые ферменты-акцепторы, спектр поглощения которых совпадает с его энергетическим спектром. Считают, что такими акцепторами для He-Ne лазеров являются железо- и медьсодержащие ферменты (каталаза, церулоплазмин, супероксиддисмутаза, НАДФН-дисмутаза), а также молекулы эндогенного порфирина. Поглощая энергию лазерного излучения, ферменты-акцепторы запускают регулируемые ими биохимические процессы. Данный механизм был предложен В.А. Овсянниковым (1987 г.), в его основе лежит поглощение лазерной энергии молекулами, участвующими в энергетическом цикле клетки, и, таким образом, за счет энергии лазерного излучения происходит нормализация клеточного энергетического цикла [6].

Классическими и фундаментальными работами по механизмам НИЛТ стали исследования, проводившиеся на протяжении многих лет (и проводящиеся сейчас) под руководством Т.Й. Кару [14]. В публикациях автор на основе анализа различных спектров действия (зависимости биологических откликов клеток от длины волны) и спектров поглощения делает вывод, что эффекты лазерной биостимуляции являются следствием электронного возбуждения хромофоров Su_A и Su_B в молекуле терминального фермента дыхательной цепи цитохром-с-оксидазы.

- Третья гипотеза предполагает неспецифическое действие излучения на биополимеры (белки, липиды, мембраны, ферменты), в результате которого меняется их конформационное строение и функциональное состояние. Энергия, необходимая для конформационных переходов, невелика, поэтому НИЛИ может влиять на электронно-конформационные взаимодействия [15, 16].

- По четвертой гипотезе, в результате действия НИЛИ образуются активные формы кислорода, которые индуцируют окислительные процессы. На первый взгляд, такое предположение кажется невероятным, однако оно не лишено смысла. Молекула кислорода имеет в оптическом диапазоне несколько полос поглощения, правда очень слабых, и одна из них включает длину волны He-Ne лазера. Еще важнее то, что, если акт поглощения фотона совершился, то, согласно данным молекулярной спектроскопии, должен образоваться синглетный молекулярный кислород (СМК). Эта частица хорошо известна своей высокой биологической активностью [17].

В работах С.Д. Захарова и А.В. Иванова [13], а также С.П. Гладких [18] неоднократно сообщалось о возможности прямой фотогенерации синглетного кислорода в диапазоне длин волн 600–1300 нм, что приводит к окислительному повреждению клеточных и субклеточных мембран, к перекисному окислению циклических соединений (холестерина, порфиринов и т. д.) и соединений алифатического ряда (фосфолипиды, жир-

ные кислоты и др.). При любом лазерном воздействии этот механизм может иметь место, и обычная лазерная терапия может, видимо, оказывать не только стимулирующее, но и прямое деструктивное воздействие на ткани и органы пациента по механизму фотодинамической терапии.

Г.А. Залеская и соавторы [18, 19] на основании приведенных спектральных данных крови и ее компонентов сделали вывод, что в основе терапевтических эффектов, инициированных как ультрафиолетовым облучением крови (УФОК), так и внутривенным лазерным облучением крови (ВЛОК), лежит один механизм – изменение баланса между парработкой активных форм кислорода и их ингибированием антиоксидантами.

Исходя из вышеизложенных гипотез действия НИЛИ, можно сделать вывод, что фотохимических и фотофизических вариантов использования энергии лазерного излучения при НИЛТ для влияния на физиологию и функциональное состояние живых систем может быть достаточно много.

Поскольку область исследования является мультидисциплинарной, то закономерным является значимый вклад специалистов-оптиков в разработку практических и теоретических основ низкоинтенсивной лазерной терапии. Первые аргументы в пользу применения лазера были получены специалистами в области прикладной оптики на основании анализов видимых спектров крови [7], так как они отражают первичные фотобиологические эффекты, происходящие под действием НИЛИ на молекулярном уровне.

В основе метода спектроскопии лежит измерение интенсивности пропускания или поглощения электромагнитного излучения веществом в зависимости от длины волны света. Большинство спектральных исследований влияния НИЛИ проведены в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах. Это обусловлено тем, что в области волновых чисел $2000\text{--}700\text{ см}^{-1}$ ИК спектры многих органических молекул настолько сложны, что отнесение всех полос поглощения/пропускания к отдельным функциональным группам и связям вызывает значительные трудности даже при наличии обширного экспериментального материала. Существуют трудности в пробоподготовке для последующей записи спектров цельной крови и ее компонентов. Поэтому известно лишь сравнительно небольшое количество научных работ, посвященных изучению и интерпретации спектров крови и ее компонентов в средней инфракрасной области [19-22]. Однако именно в средней ИК-области, особенно в интервале $2000\text{--}700\text{ см}^{-1}$, сосредоточены характеристические колебания функциональных групп и связей органических веществ. В связи с уникальностью химического состава каждой отдельной пробы ИК-спектр цельной крови в средней инфракрасной области [21], по сути, является его аутентичной характеристикой.

В литературе описаны различные методики пробоподготовки и критерии оценки влияния НИЛИ на спектральные характеристики крови и

ее компонентов. Так в публикациях Р.А. Зорикова [22] использовался следующий способ проведения преаналитического этапа: несколько капель исследуемой плазмы крови равномерно наносили на поверхность оптической подложки и высушивали при температуре $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что после проведенного полного курса ВЛОК в комплексной терапии ближайшего послеоперационного периода в ИК спектрах больных полоса $1510 \pm 10 \text{ см}^{-1}$ разделяется на дуплет “амид-1” и “амид-2” и приближается к ИК спектрам доноров. Данный эффект указывает на процессы восстановления биохимического состава крови больных и на правильность проводимого лечения. Однако изменение ИК спектров оценивалось без программ математической статистики, на основании визуальных изменений спектров.

В патенте № 2098820 РФ определение воздействия НИЛИ на кровь [23] осуществлялось следующим образом. Кровь больного до и после сеанса ВЛОК высушивали на открытых чашках Петри при комнатной температуре и регистрировали ИК спектры методом таблеток в КВг или тонком слое вещества в виде суспензии в тонком слое вазелинового масла между крышками из КВг. В тех случаях, когда кровь больного реагирует на лазерное излучение, соотношение высот пиков “Н1175/Н1140” уменьшается не менее чем на 15% от начального соотношения.

Основные недостатки данных методик: исключение форменных элементов и водной составляющей крови и длительное высушивание крови или нагревание плазмы крови. Спектральные свойства биологических жидкостей в указанных случаях способны резко изменяться.

В публикациях Г.А. Залесской [8, 19] влияние фотореакций, инициированных терапевтическими дозами облучения крови оптическим излучением *in vivo* в средней ИК-области, оценивалось чаще всего на основании анализа ИК спектров эритроцитарной массы. Основными результатами данных исследований являются изменения ИК-спектров при терапевтических дозах оптического излучения, которые свидетельствуют о конформационных переходах в макромолекулах форменных элементов крови. Данные изменения могут быть связаны с процессами оксигенации-деоксигенации гемоглобина. Указанный способ требует многоэтапной пробоподготовки крови, сопряжен с большим числом легко изменяющихся и трудно контролируемых параметров (неоднократность и продолжительность центрифугирования, количество оборотов центрифуги, температура, объем образца и др.).

Г.А. Залесской впервые [8, 19] проведено изучение воздействия НИЛИ *in vivo* на ИК-спектры цельной крови без предварительного высушивания пробы. Для измерений в средней ИК-области образцы приготавливали в виде пленок толщиной несколько микрон на подложках из кристаллов KRS, на которые наносились дозированные количества крови. Данная методика позволяет установить структурные перестройки и межмолекулярные взаимодействия, протекающие в цельной крови, под влиянием НИЛИ. Предложенная методика дает лишь качественную карти-

ну результатов взаимодействия НИЛИ с кровью, но не позволяет делать какие-либо расчеты параметров воздействующих излучений, и, таким образом, отсутствует количественная оценка спектров. Кроме того, чтобы установить, что установленные изменения ИК спектров крови и ее компонентов происходят исключительно под действием НИЛИ требуется стандартизация условий пробоподготовки.

Во всех перечисленных публикациях не указывались сведения об интервале времени от момента забора образцов до снятия ИК-спектров, не учитывались рН, температура, диагноз пациента. Учет данных факторов в преаналитическом этапе позволит, минимизировать артефакты и может дать новый подход к пониманию целого ряда биологических закономерностей воздействия НИЛИ как на цельную кровь, так и организм в целом.

В лаборатории экологической физиологии Ресурсного центра УО "МГУ имени А.А. Кулешова" были проведены 19 серий экспериментов облучения крови не только больных, но и здоровых доноров *in vitro* лазером с длиной волны $\lambda=670$ нм (5 мВт, время облучения – 10 мин.). Последующий анализ проб крови методом ИК-спектроскопии выявили особенности, характеризующие влияние низкоинтенсивного оптического излучения на биомолекулы цельной крови. Предварительный анализ показал, что используемое для терапевтических целей НИЛИ в условиях *in vitro* практически не вызывает изменение конформационных состояний биомолекул крови здоровых доноров, положение основных полос пропускания остается стабильным, изменения ИК спектров не обнаружены. В ИК-спектрах крови больных ишемической болезнью сердца после облучения лазером наблюдалось уменьшение интенсивности дуплетной полосы амид I (1654 см^{-1}) и амид II (1540 см^{-1}). Зафиксированы изменения в ИК-спектрах в диапазоне волн $1470\text{--}1180 \text{ см}^{-1}$, которые можно объяснить качественными и количественными изменениями определенных макромолекул, входящих в состав цельной крови, в основном фосфолипидов, протеинов, глюкозы, холестерина. Характер этих изменений не имеет каких-либо закономерностей и требует более детального изучения данного вопроса.

Приведенный анализ информации в области исследования и экспериментальных данных свидетельствует о необходимости системного фундаментального подхода к изучению биопроцессов, инициируемых световым излучением в живом организме, указывает на актуальность развития методов ИК-спектральной диагностики крови и ее компонентов. ИК-спектроскопия позволяет проводить анализ микропроб, она высокоинформативна и важна как при исследовании процессов, протекающих на молекулярном уровне, инициируемых в крови, так и для биомедицинского применения НИЛИ.

Надежность спектроскопических данных может быть обеспечена тщательным сравнением с результатами клинических исследований, проводимых различными группами ученых, практикующих врачей, а также

стандартизацией условий проведения исследований методом ИК-спектроскопии.

Автор выражает свою признательность старшему преподавателю Л.П. Максе за ценные консультации и помощь в регистрации ИК спектров цельной крови, кандидату биологических наук Н.В. Акуличу за помощь в анализе литературных данных и результатов собственных исследований.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. **Улащик, В.С.** Физиотерапия : универсальная медицинская энциклопедия / В.С. Улащик. – Минск : Книжный Дом, 2008. – 640 с.
2. **Пономаренко, Г.Н.** Частная физиотерапия : учеб. пособие / Г.Н. Пономаренко. – М. : ОАО “Издательство «Медицина»”, 2005. – 744 с.
3. **Ушаков, А.А.** Практическая физиотерапия / А.А. Ушаков. – 2-е изд. – М. : ООО “Медицинское информационное агентство”, 2009. – 608 с.
4. **Илларионов, В.Е.** Современные методы физиотерапии: руководство для врачей общей практики (семейных врачей) / В.Е. Илларионов, В.Б. Симоненко. – М. : ОАО “Издательство «Медицина»”, 2007. – 176 с.
5. **Захаров, С.Д.** Светокислородный эффект – физический механизм активации биосистем квазимонохроматическим излучением / С.Д. Захаров. – М., 2006. – 50 с. – (Препринт / Физический институт им. П.Н. Лебедева, ФИАН (РАН)).
6. **Овсянников, В.А.** О возможном механизме селективного воздействия лазерных излучений на раковые опухоли / В.А. Овсянников // V-я Всесоюзная конференция “Оптика лазеров” : сб. науч. ст. – СПб., 1987. – С. 314–316.
7. **Марочков, А.В.** Внутрисосудистое лазерное облучение крови, механизмы взаимодействия и клиническое применение / А.В. Марочков. – Минск : Полибиг, 1996. – 85 с.
8. **Залеская, Г.А.** Молекулярные механизмы действия фототерапии / Г.А. Залеская, В.С. Улащик // Журнал прикладной спектроскопии. – 2009. – Т. 79. – № 1. – С. 51–75.
9. Экстракорпоральное облучение полного объема циркулирующей крови низкоэнергетическим гелий-неоновым лазером / В.И. Карандашев [и др.] // Вестн. Росс. Акад. мед.наук. – 1994. – № 4. – С. 51–54.
10. **Илларионов, В.Е.** Основы лазерной терапии / В.Е. Илларионов. – М. : Респект, 1992. – 128 с.
11. **Доровских, В.А.** Влияние низкоэнергетических лазеров на свободнорадикальное окисление липидов в микросомах печени и активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и каталазы эритроцитов / В.А. Доровских, Е.А. Бородин // Лазерная медицина. – 1998. – Т. 2. – № 3. – С. 16–20.
12. **Каплан, М.А.** Лазерная терапия – механизмы действия и возможности / М.А. Каплан // тезисы Межд. конф. “Laser Health’97”. – Москва, 1997. – С. 88–92.

13. **Захаров, С.Д.** Структурная модель неспецифического биостимулирующего действия лазерного излучения: роль слабопоглощающих фоторецепторов и альтерации структурного состояния растворов биомолекул / С.Д. Захаров // Действие электромагнитного излучения на биологические объекты и лазерная медицина / С.Д. Захаров. – Владивосток, 1989. – 235 с.
14. Изменение спектра поглощения монослоя живых клеток после низкоинтенсивного лазерного облучения / Т.Й. Кару [и др.] // ДАН. – 1998. – Т. 360. – № 2. – С. 267–270.
15. **Березин, Ю.Д.** Структурные особенности действия низкоинтенсивного лазерного излучения, переживающие ткани человека / Ю.Д. Березин, Р.А. Прочуханов, Т.И. Ростовцева // Тр. ДАН СССР. – 1983. – Т. 273. – № 3. – С. 734–736.
16. **Kaufmann, R.** Interaction of laser light with living systems: some base guide lines / R. Kaufmann // Proc. of the NATO Symp. on lasers in biol. and medicine. – New York, 1980. – P. 69–75.
17. **Шинкаренко, Н.В.** Химические свойства синглетного молекулярного кислорода и значение его в биологических системах / Н.В. Шинкаренко, В.Б. Алесковский // Успехи химии. – 1982. – Т. 51. – С. 713–735.
18. **Гладких, С.П.** Триггерные молекулярные механизмы формирования биологических эффектов при низкоэнергетической лазерной терапии / С.П. Гладких, Ю.В. Алексеев, С.П. Истомин // Использование лазеров для диагностики и лечения заболеваний : сб. науч. ст. – М. : Изд-во ЛАС, 1996. – С.7–11.
19. **Залеская, Г.А.** Спектральные проявления фотопроцессов, инициированных световым воздействием различных длин волн на кровь *in vivo* / Г.А. Залеская, В.С. Улащик // Докл. НАН Беларуси. – 2009. – Т. 53. – № 3. – С. 60–63.
20. **Мельников, М.Я.** Экспериментальные методы химической кинетики. Фотохимия : учеб. пособие / М.Я. Мельников [и др.] – М. : Изд-во Моск. ун-та, 2004. – 125 с.
21. **Быков, А.В.** Физические методы исследования : учеб. пособие / А.В. Быков, Г.Н. Демиденко, В.Ю. Долуда, Э.М. Сульман. – Тверь : ТГТУ, 2010. – 160 с.
22. **Зориков, Р.А.** Спектроскопический контроль эффективности лазеротерапии в комплексе интенсивной терапии послеоперационного периода у больных с токсическими зубом / Р.А. Зокиров, М.М. Самадов, А.А. Нурматов // Современная медицина и новые технологии. – Душанбе, 2010. – С. 35–38.
23. **Смирнова, М.С.** Способ определения индивидуальной чувствительности к низкоинтенсивному лазерному излучению (Патент RU 2098820) / М.С. Смирнова, А.С. Гордцев // Патенты и изобретений, зарегистрированных в РФ и СССР [Электронный ресурс]. – 2012. – Режим доступа : <http://www.findpatent.ru/patent/172/1725119.html>. – Дата доступа : 11.11.2013.

Поступила в редакцию 23.12.2013 г.