

УДК 615.849.19

Москвин С.В.

Термодинамическая модель механизмов терапевтического действия низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ)

Moskvin S.V.

A thermodynamic model of biological mechanisms under low-level laser irradiation

ФГУ «Государственный научный центр лазерной медицины ФМБА России»

В статье рассмотрена модель механизмов биологического действия низкоинтенсивного лазерного излучения. Показано, что первичным механизмом запуска ответных реакций живого организма на лазерное воздействие является возникновение градиента температуры при поглощении энергии лазерного излучения с последующим высвобождением Ca^{2+} из клеточного депо и активации кальцийзависимых процессов (пролиферация, вазодилатация, противовоспалительное действие и др.). *Ключевые слова:* низкоинтенсивное лазерное излучение, механизмы биологического и терапевтического действия, кальцийзависимые процессы.

This article analyses the model of mechanisms which take place in biological effects of low-level laser light. It has been shown by the author that the primary triggering mechanism of response reactions in a living organism to laser impact is a temperature gradient which develops after laser light absorption with the following Ca^{2+} releasing out of cellular depots and after the activation of calcium-dependent processes (proliferation, vasodilatation, anti-inflammatory effects, etc.). *Key words:* low-level laser irradiation, mechanisms of biological and therapeutic effects, calcium-dependent processes.

В фотобиологии, рассматривающей специфическое действие света – фотохимические реакции, фотосинтез, фототаксис и др., изучаются процессы взаимодействия пары акцептор-фотон, обеспечивающей фотобиологический эффект. Для каждого фотоиндуцированного процесса имеется свой акцептор (поглотитель) фотонов света с заданной энергией или, иначе, излучение с определенной длиной волны.

Однако автоматический перенос «акцепторной» модели на исследование биологического действия НИЛИ не может удовлетворительно объяснить уже имеющиеся экспериментальные и клинические данные. Возможно, к рассмотрению данного вопроса необходимо подойти с принципиально других позиций, в том числе и в методологическом плане. Дальнейшее развитие лазерной терапии настоятельно требует рассматривать НИЛИ как внешний фактор, обеспечивающий только *запуск* физиологических реакций, т. е. необходимо исследовать биологические эффекты с позиций *динамического* взаимодействия НИЛИ – биологический объект, а не статичной модели акцептор-фотон.

Основная сложность, стоящая перед исследователями механизмов биологического действия НИЛИ, заключается в многообразии процессов, происходящих в живых тканях и организмах. Еще большие проблемы возникают при изучении межклеточных взаимодействий и физиологических процессов на органном уровне. В настоящее время исследованы только некоторые локальные участки регуляции биологических процессов и совсем мало обнаружено общих закономерностей.

Накоплен колоссальный объем научных данных о характере частных примеров ответных реакций различных биологических структур на воздействие НИЛИ. Необходимо проанализировать результаты научных исследований в плане обобщения разрозненных данных, и выяснив механизмы биологического действия НИЛИ, обосновать максимально эф-

фективные параметры терапевтического воздействия лазерным излучением. Данная задача может быть решена традиционными биологическими методами, методами системного анализа.

Первым обращает на себя внимание тот факт, что эффект вызывает только *оптимальная доза* НИЛИ. При уменьшении или увеличении дозы в достаточно узком диапазоне эффект уменьшается или отсутствует вовсе.

Другой, удивительный, на первый взгляд, факт, – отсутствие так называемого спектра действия, т. е. специфической зависимости биологического действия НИЛИ от длины волны падающего света, эффекты проявляются во всем исследованном спектральном диапазоне, от 0,337 мкм до 10,6 мкм. Это кажется, возможно, странным, т. к. каждый акцептор в биологической структуре имеет достаточно узкую полосу поглощения (так называемый спектр действия) и излучение с другой длиной волны не может вызвать фотобиологической реакции. Получается, что для каждой длины волны свой «индивидуальный» акцептор?

Эти и другие данные, например, зависимость эффекта от частоты модуляции, когерентности, поляризации и т. д., вынуждают рассматривать данное явление совсем не как фотобиологическую реакцию.

Как же на самом деле развиваются индуцированные НИЛИ биологические процессы? Можно ли проследить всю цепочку от первичного акта поглощения до выздоровления пациента? Можно ли полно и достоверно объяснить имеющиеся научные факты и на их основе разрабатывать максимально эффективные методики лечения? На наш взгляд, есть все основания для утвердительного ответа на эти вопросы.

Механизмы биологического действия НИЛИ на организм необходимо рассматривать только с позиции общности природы, как воздействующего излучения, так и организации живой материи.

На рис. представлена схематично практически вся последовательность реакций, начиная от первичного акта поглощения фотона и заканчивая реакцией различных систем организма.

С чего все начинается? Представленные выше факты и полученные Т.И. Кагу с соавт. (1994) данные убедительно доказывают, что подобные эффекты могут быть вызваны только *термодинамическими нарушениями* при поглощении лазерного (когерентного, монохроматического и поляризованного) излучения внутриклеточными компонентами. Теоретические оценки показывают, что при воздействии лазерным излучением возможен локальный нагрев акцепторов на десятки градусов. Хотя процесс длится очень короткий промежуток времени — около 10^{-12} с — этого вполне достаточно для весьма значительных термодинамических изменений как в группе хромофоров непосредственно, так и в окружающих областях, что приводит к существенным изменениям свойств молекул и является пусковым моментом индуцированной лазерным излучением реакции. Подчеркнем еще раз, что в качестве акцептора может выступать *любой* внутриклеточный компонент, имеющий полосу поглощения для данной длины волны. Т. е. начальным пусковым моментом биологического действия НИЛИ является не фотобиологическая реакция как таковая, а *локальный* нагрев (возникновение локального градиента температуры). Это принципиально важный момент.

При незначительных локальных возмущениях, не достаточных для перевода молекулы в новое конформационное состояние, может сравнительно сильно измениться геометрия, конфигурация молекул. Структуру молекулы как бы «ведет», чему способствует возможность поворотов вокруг одинарных связей главной цепи, не очень строгие требования, предъявляемые к линейности водородных связей, и т. д. Это свойство макромолекул может решительным образом влиять на их функционирование. Для эффективного преобразования энергии достаточно возбуждать такие степени свободы системы, которые медленно обмениваются энергией с тепловыми степенями свободы. Предположительно, способность к направленным конформационным изменениям, т. е. к механическому движению под действием локальных возмущений, есть отличительная особенность белковых макромолекул, и требуемые релаксационные изменения вполне могут быть индуцированы лазерным излучением низкой, «терапевтической» интенсивности [2, 6].

Становится понятным, почему эффект достигается при воздействии именно *лазерным* излучением и наиболее важным является такое его свойство,



Рис. Последовательность развития биологических эффектов от лазерного воздействия

как монохроматичность или малая ширина спектральной линии. Если она будет сравнима с полосой поглощения макромолекулы (30 нм и более), то такое излучение вызовет колебание *всех* энергетических уровней и произойдет лишь слабый, на доли градусов, нагрев *всей* молекулы. Тогда как узкий спектральный диапазон, характерный для лазерного излучения (порой менее 3 нм), вызовет так необходимый нам для эффекта *локальный* нагрев уже на десятки градусов, когда вся энергия лазера будет выделяться на *небольшом локальном участке* макромолекулы, вызывая термодинамические изменения, достаточные для запуска дальнейшего физиологического отклика.

Следствием фотоиндуцированного «поведения» макромолекул является высвобождение ионов кальция из кальциевого депо. При этом увеличивается концентрация Ca^{2+} в цитозоле (свободной части воды) [8, 10]. Во всех исследованиях эти изменения отмечались лишь в совокупности с другими процессами, не выделяя данное явление каким-то образом, и только нами впервые было высказано предположение, что увеличение концентрации Ca^{2+} в цитозоле является именно основным механизмом, запускающим лазериндуцированные процессы, а также замечено, что все физиологические изменения, происходящие вследствие этого на самых различных уровнях, — кальцийзависимые [6].

Почему мы обращаем внимание именно на ионы кальция? Причин этому несколько.

1. Кальций в наибольшей степени находится в специфически и неспецифически связанном состоянии, как в клетках (99,9%), так и в крови (70%) [5], т. е. принципиально существует возможность значительного увеличения концентрации свободных ионов кальция, и этот процесс действительно обеспечивается не одним десятком механизмов.

2. Необычайная универсальность действия Ca^{2+} на всех уровнях регулирования многочисленных физиологических процессов.

3. Внутриклеточная концентрация Ca^{2+} чрезвычайно мала – 0,1-10 мкм/л, поэтому высвобождение даже небольшого абсолютного количества этих ионов из связанного состояния приводит к существенному относительному повышению концентрации Ca^{2+} в цитозоле [8, 10].

4. Ca^{2+} -индуцированное изменение митохондриального мембранного потенциала и увеличение внутриклеточного pH приводит к увеличению продукции АТФ и в конечном итоге стимулирует пролиферацию [3, 24]. Стимуляция видимым светом приводит к повышению уровня внутриклеточного цАМФ, практически синхронно с изменением концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , в первые минуты после воздействия [13], способствуя, таким образом, регуляции, осуществляемой кальциевыми насосами.

5. Также задействуется и другой механизм через Ca^{2+} -связывающие белки: кальбиндин, кальретинин, парвальбумин и эффекторы, такие, как тропонин С, СаМ, синапсотоагмин, белки S100 и аннексины, которые отвечают за активацию различных Ca^{2+} -чувствительных процессов в клетках [17, 21].

6. Наличие различных колебательных контуров тесно связано с динамикой высвобождения и регулирования уровня кальция. Дело в том, что локальное повышение концентрации Ca^{2+} не заканчивается равномерной диффузией ионов в цитозоле или включением механизмов закачивания излишков кальция во внутриклеточные депо, а сопровождается *распространением волны повышенной концентрации Ca^{2+}* внутри клетки и вызывает многочисленные кальцийзависимые процессы [10, 25]. Ионы кальция, высвобождаемые одним кластером специализированных канальцев, диффундируют к соседним и активируют их. Этот механизм скачкообразного распространения позволяет начальному местному сигналу запустить глобальные волны и колебания концентраций Ca^{2+} [11].

7. В некоторых случаях волны Ca^{2+} очень ограничены в пространстве, например, в амакриновых клетках сетчатки, в которых местные сигналы с дендритов используются для расчета направления движения [14]. Вдобавок к таким внутриклеточным волнам информация может распространяться от клетки к клетке посредством межклеточных волн, как это было описано для эндокринных клеток [15], гастролы позвоночных [27] и для интактной перфузируемой печени [22]. В некоторых случаях межклеточные волны могут переходить с одного типа клеток на другие, как это бывает в случае эндотелиальных клеток и клеток гладкой мускулатуры [29].

Что происходит после того, как волны повышенной концентрации Ca^{2+} стали распространяться под влиянием НИЛИ в цитозоле клетки и между групп клеток?

Использование НИЛИ получило широкое распространение в различных областях медицины именно благодаря тому, что немногочисленные

универсальные по своей природе первичные фото-биологические реакции вызывают самые разнообразные биохимические и физиологические реакции в организме. Вторичные эффекты представляют собой комплекс адаптационных и компенсационных реакций, возникающих в результате реализации первичных эффектов в тканях, органах и целостном живом организме и направленных на его восстановление:

- 1) активизацию метаболизма клеток и повышение их функциональной активности;
- 2) стимуляцию репаративных процессов;
- 3) противовоспалительное действие;
- 4) активизацию микроциркуляции крови и повышение уровня трофического обеспечения тканей;
- 5) анальгезирующее действие;
- 6) иммуностимулирующее действие;
- 7) рефлексогенное действие на функциональную активность различных органов и систем.

Все эти процессы – кальцийзависимые! Рассмотрим более подробно, как именно происходят представленные выше физиологические изменения.

Активизация метаболизма клеток и повышение их функциональной активности происходит, в первую очередь, вследствие кальцийзависимого повышения редокс-потенциала митохондрий, их функциональной активности и синтеза АТФ [3, 16, 24].

Стимуляция репаративных процессов зависит от Ca^{2+} на самых различных уровнях. Кроме активизации работы митохондрий при повышении концентрации свободного внутриклеточного кальция активируются протеинкиназы, принимающие участие в образовании мРНК [28]. Также ионы кальция являются аллостерическими ингибиторами мембрансвязанной тиоредоксинредуктазы, фермента, контролирующего процесс синтеза пуриновых дизоксирибонуклеотидов в период активного синтеза ДНК и деления клеток [Родуэлл В., 1993]. В физиологии раневого процесса, кроме того, активно участвует основной фактор роста фибробластов (bFGF), синтез которого и активность зависят от концентрации Ca^{2+} [Abdel-Naser M.B., 1999].

Противовоспалительное действие НИЛИ и его влияние на микроциркуляцию обусловлено, в частности, кальцийзависимым высвобождением медиаторов воспаления, таких, как цитокины [26], или также кальцийзависимым выделением клетками эндотелия оксида азота (NO) – предшественника фактора расслабления стенок кровеносных сосудов (EDRF) [20].

Поскольку кальцийзависимым является экзоцитоз [12], в частности, высвобождение нейромедиаторов из синаптических везикул [21], то процесс нейромодуляторной регуляции полностью контролируется концентрацией Ca^{2+} , а следовательно, подвержен и влиянию НИЛИ. Кроме того, известно, что Ca^{2+} является внутриклеточным посредником действия ряда гормонов, в первую очередь, медиаторов ЦНС и ВНС [1], что также предполагает участие эффектов,

вызванных лазерным излучением в нейрогуморальной регуляции.

Взаимодействие нейроэндокринной и иммунной систем не изучено в достаточной степени, но установлено, что цитокины, в частности ИЛ-1 и ИЛ-6, действуют в обоих направлениях, играя роль модуляторов взаимодействия этих двух систем [7]. НИЛИ может влиять на иммунитет как опосредованно через нейроэндокринную регуляцию, так и непосредственно через иммунокомпетентные клетки (что доказано в экспериментах *in vitro*). К числу ранних пусковых моментов бласттрансформации лимфоцитов относится кратковременное повышение концентрации свободного внутриклеточного кальция, который активирует протеинкиназу, принимающую участие в образовании мРНК в Т-лимфоцитах [28], что, в свою очередь, является ключевым моментом лазерной стимуляции Т-лимфоцитов [4]. Воздействие НИЛИ на клетки фибробластов *in vitro* приводит также к повышенной генерации внутриклеточного эндогенного γ -интерферона [9, 23].

Теперь, когда перед нами представлена полная картина механизмов действия НИЛИ, можно получить ответы на некоторые вопросы.

Например, чем объяснить дозозависимый характер эффектов? При увеличении дозы растёт и локальная температура, что вызывает высвобождение Ca^{2+} , но как только количество ионов кальция в цитозоле начинает превышать определённый критический уровень, включаются механизмы закачивания Ca^{2+} в кальциевые депо и эффект исчезает.

Почему в импульсном режиме эффект выше, при дозах, в 100–1000 раз меньших? Потому что время термодинамической релаксации макромолекул (10^{-12} с) значительно меньше длительности импульса (10^{-7} с), и очень короткий, в нашем понимании, импульс мощностью в ватты оказывает большее влияние на локальное термодинамическое равновесие, чем непрерывное излучение в единицы милливатт.

Разработанная нами модель позволяет не только объяснить уже имеющиеся факты, но на ее основе можно делать выводы, как о прогнозировании результатов влияния НИЛИ на физиологические процессы, так и о возможности повышении эффективности лазерной терапии.

Таким образом, методами системного анализа показано, что в биологических эффектах НИЛИ в качестве первичного действующего фактора выступает термодинамический сдвиг (возникновение локального градиента температуры), приводящий к высвобождению ионов кальция из депо с последующей активацией кальцийзависимых биохимических и физиологических процессов. Причем направленность этих ответных реакций может быть различна, что определяется дозой и локализацией воздействия, а также исходным состоянием организма.

Литература

1. Гренер Д. Действие гормонов / Под ред. Р. Марри и др. // Биохимия человека. 1993. Т. 2. М.: Мир. С. 158–169.
2. Гудвин Б. Временная организация клетки. М.: Мир, 1966. 251 с.
3. Кару Т.И. Первичные и вторичные клеточные механизмы лазерной терапии // Низкоинтенсивная лазерная терапия / Под ред. С.В. Москвина и В.А. Буйлина. М.: Фирма «Техника», 2000. С. 71–94.
4. Мантейфель В.М., Кару Т.И. Излучение He-Ne-лазера действует на Т- и не действует на В-лимфоциты. Цитофлуориметрический анализ хроматина // Докл. акад. наук. 1999. Том. 365. № 2. С. 267–269.
5. Марри Р., Гренер Д., Мейес П. и др. Биохимия человека: в 2 томах. М.: Мир, 1993. Т. 1–2.
6. Москвин С.В. Лазерная терапия в дерматологии: витилиго. М.: Техника, 2003. 125 с.
7. Роит А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. М.: Мир, 2000. 592 с.
8. Смольянинова Н.К., Кару Т.И., Зеленин А.В. Облучение He-Ne-лазером усиливает бласттрансформацию, вызванную фитогемагглютинином // Докл. акад. наук СССР. 1990. Т. 315. № 5. С. 1256–1259.
9. Adachi Y., Kindzelskii A.L., Ohno N. et al. Amplitude and frequency modulation of metabolic signals in Leukocytes: Synergistic role of IFN- γ in IL6- and IL-2-mediated cell activation // J. Immunol. 1999: 163. P. 4367–4374.
10. Alexandratou E., Yova D., Handris P. et al. Human fibroblast alterations induced by low power laser irradiation at the single cell level using confocal microscopy // Photochem. & Photobiol. Sci. 2003: 1 (8). P. 547–552.
11. Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. The versatility and universality of calcium signalling // Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2000: 1. P. 11–21.
12. Carafoli E., Santella L., Brance D., Brisi M. Generation, control, and processing of cellular calcium signals // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2001: 36. P. 107–260.
13. Daniolos A., Lerner A.B., Lerner M.R. Action of light on frog pigment cells in culture // Pigment Cell Res. 1990. Vol. 3. № 1. P. 38–43.
14. Euler T., Detwiler P.B., Denk W. Directionally selective calcium signals in dendrites of starburst amacrine cells // Nature. 2002: 418. P. 845–852.
15. Fauquier T., Guerineau N.C., McKinney R.A. et al. Folliculostellate cell network: A route for long-distance communication in the anterior pituitary // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98. 2001. P. 8891–8896.
16. Filippin L., Magalhaes P.J., Di Benedetto G. et al. Stable interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria // J. Biol. Chem. 2003: 10. P. 1074.
17. John L.M., Mosquera-Caro M., Camacho P., Lechleiter J.D. Control of IP₃-mediated Ca²⁺ puffs in *Xenopus laevis* oocytes by the Ca²⁺-binding protein parvalbumin // J. Physiol. (Lond.) 2001: 535. P. 3–16.
18. Karu T.I. Photobiology of Low-Power Laser Therapy. London, Paris, New-York: Harwood Acad. Publishers. 1989. 187 p.
19. Karu T., Tiphlova O., Esenaliev R. et al. Two different mechanisms of low-intensity laser photobiological effect on *Escherichia coli* // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1994. Vol. 24. P. 155–161.
20. Murrey R.K. et al. Harper's Biochemistry // Appleton & Lange, 1996. 700 p.
21. Palecek J., Lips M.B., Keller B.U. Calcium dynamics and buffering in motoneurons of the mouse spinal cord // J. Physiol. (Lond.). 1999: 520. P. 485–502.
22. Robb-Gaspers L.D., Thomas A.P. Coordination of Ca²⁺ signaling by intercellular propagation of Ca²⁺ waves in the intact liver // J. Biol. Chem. 1995: 270. P. 8102–8107.
23. Rosenspire A.J., Kindzelskii A.L., Petty H.R. Interferon- γ and sinusoidal electric fields signal by modulating NAD(P)H oscillations in polarized neutrophils // Biophys. J. 2000: 79. P. 3001–3008.
24. Schaffer M., Sroka R., Fuchs C. et al. Biomodulative effects induced by 805 nm laser light irradiation of normal and tumor cells // J. of Photochem. and Photobiol. B. Biology. 1997. Vol. 40 (3). P. 253–257.