

О первичных механизмах терапевтического действия низкоинтенсивного лазерного излучения

С. В. Москвин

ФГУ Государственный научный центр лазерной медицины ФМБА России, Москва

Основная сложность, стоящая перед исследователями механизмов терапевтического действия низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ), заключается в многообразии процессов, происходящих в живых тканях и организмах. Еще больше проблем вызывает изучение 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. Самым важным, на наш взгляд, является определение первичных механизмов взаимодействия, на которых базируется вся цепочка дальнейших (вторичных) процессов.

Накоплен большой 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 лазерного излучения, обосновать максимально эффективные параметры терапевтического воздействия данного физического фактора. Указанная задача может быть решена только 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. В этом принципиальное отличие НИЛИ от других методов фототерапии, где зависимость от дозы часто носит нарастающий в широких пределах характер.

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 до 10,6 мкм. Это кажется на первый взгляд странным, так как 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. По-

лучается, что для каждой длины волны существует 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.

Однако разобраться именно с первичными механизмами биологического действия НИЛИ принципиально важно, так как заблуждение на начальном этапе в ряде случаев может привести к неправильным выводам в клинической практике. Отсутствие убедительной теоретической основы не позволяет развивать лазерную терапию, прогнозировать результат воздействия и разрабатывать наиболее эффективные методики лечения.

Так как же на самом деле развиваются индуцированные НИЛИ биологические процессы? Можно ли проследить всю цепочку от процесса первичного акта поглощения квантов электромагнитного излучения оптического диапазона до формирования терапевтического эффекта? 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 рисунке представлена схематично практически вся последовательность реакций, начиная с момента поглощения фотона и заканчивая реакцией различных систем организма. Данная схема может быть дополнена деталями патогенеза конкретного заболевания.

С чего все начинается? Полученные Т. Каги и соавт. (1994) данные убедительно доказывают, что подобные эффекты могут быть вызваны только термодинамическими реакциями при поглощении лазерного (когерентного, монохроматического и поляризованного) излучения внутриклеточными компонентами. Теоретически можно предположить, что при воздействии лазерного излучения возможен локальный нагрев акцепторов на десятки градусов. Хотя процесс длится очень короткий промежуток времени – около 10^{-12} с, этого вполне достаточно для весьма значительных тер-

Информация для контакта: Москвин Сергей Владимирович – вед. науч. сотр. ГНЦЛМ, проф. каф. восст. мед. ИПК ФМБА, д-р биол. наук, канд. техн. наук, тел./факс (499) 250-55-44, e-mail: 7652612@mail.ru, <http://www.matrixmed.ru/>



Последовательность развития биологических эффектов от лазерного воздействия.

динамических 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. По нашему мнению, в качестве акцептора может выступать любой внутриклеточный компонент, имеющий полосу поглощения, характерную 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, по нашему мнению, принципиально важный момент.

При незначительных локальных «возмущениях», недостаточных для перевода молекулы в новое конформационное состояние, может сравнительно сильно измениться конфигурация молекул. Возможно определенное изменение структуры молекулы, 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. 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 (Гудвин Б., 1966; Москвин С. В., 2003).

Из этого в определенной степени становится понятным, почему эффект достигается при воздействии именно лазерным излучением и наиболее важным является такое его свойство, как монохроматичность, или малая ширина спектральной линии. Если она будет сравнима с полосой поглощения макромолекулы

(30 нм и более), то такое излучение вызовет колебание *всей* энергетической уровневой и произойдет лишь слабый, на доли градуса, нагрев *всей* молекулы. Тогда как узкий спектр, характерный для лазерного излучения (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. Проводя условную, но вполне наглядную аналогию, процесс можно представить так: при концентрации увеличительным стеклом солнечного света на точку можно поджечь бумагу, тогда как при освещении рассеянным светом всей ее поверхности, ничего не происходит.

Следствием фотоиндуцированного «поведения» макромолекул является высвобождение ионов кальция из кальциевого депо. При этом увеличивается концентрация Ca^{2+} в цитозоле (свободной части воды) (Смолянинова Н. К. и соавт., 1990; Alexandratou E. и соавт., 2003). Во всех исследованиях эти изменения отмечались лишь в совокупности с другими процессами, не выделяя данное явление особым образом. В связи с чем нами впервые было высказано предположение, что увеличение концентрации Ca^{2+} в цитозоле является именно основным механизмом, запускающим лазериндуцированные процессы, и что все физиологические изменения, происходящие вследствие этого на самых различных уровнях, кальцийзависимые (Москвин С. В., 2003).

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%) (Марри Р. и соавт., 1993), т.е. 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 (Смолянинова Н. К. и соавт., 1990; Alexandratou E. и соавт., 2003).

4. Ca^{2+} -индуцированное изменение митохондриального мембранного потенциала и увеличение внутриклеточного pH приводит к увеличению продукции АТФ и в конечном итоге стимулирует пролиферацию

(Кару Т. Й., 2000; Schaffer M. и соавт., 1997). Стимуляция видимым светом приводит к повышению уровня внутриклеточного цАМФ практически синхронно с изменением концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в первые минуты после воздействия (Daniolos A. и соавт., 1990), 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, синаптотамин, белки S100 и аннексины, которые отвечают за активацию различных Ca^{2+} -чувствительных процессов в клетках (John L. и соавт., 2001; Palecek J. и соавт., 1999).

6. Наличие различных колебательных контуров тесно связано с динамикой высвобождения и регулирования уровня кальция. Нам представляется, 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, вызывающей многочисленные кальцийзависимые процессы (Alexadratou E. и соавт., 2003; Tsien R., Poenie M., 1986). 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+} (Berridge M. и соавт., 2000).

7. В некоторых случаях изменения содержания уровня Ca^{2+} очень ограничены в пространстве, например в амакриновых клетках сетчатки, в которых местные сигналы с дендритов используются для расчета направления движения (Euler T. и соавт., 2002). Вдобавок к таким внутриклеточным волнам информация может распространяться от клетки к клетке посредством межклеточных волн, как это было описано для эндокринных клеток (Fauquier T. и соавт., 2001), гастролы позвоночных (Wallingford J. и соавт., 2001) и для интактной перфузируемой печени (Robb-Gaspers L., Thomas A., 1995). В некоторых случаях межклеточные волны могут переходить с одного типа клеток на другие, как это бывает в случае эндотелиальных клеток и клеток гладкой мускулатуры (Yashiro Y., Duling B., 2000).

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

Согласно данным литературы, использование НИЛИ получило широкое распространение в различных областях медицины именно благодаря тому, что немногочисленные универсальные по своей природе первичные фотобиологические 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.

По нашему мнению, все эти процессы являются кальцийзависимыми. Рассмотрим более подробно, как именно осуществляются 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 (Кару Т., 2000, Filippin L. и соавт., 2003; Schaffer M. и соавт., 1997).

Стимуляция репаративных процессов зависит от содержания Ca^{2+} на самых различных уровнях. Кроме активизации работы митохондрий при повышении концентрации свободного внутриклеточного кальция активируются протеинкиназы, принимающие участие в образовании матричной РНК (мРНК) (Watman N. и соавт., 1988). Также ионы кальция являются аллостерическими ингибиторами мембранно-связанной тиоредоксинредуктазы, фермента, контролирующего процесс синтеза пуриновых дизоксирибонуклеотидов в период активного синтеза ДНК и деление клеток (Родуэлл В., 1993). В физиологии раневого процесса, кроме того, активно участвует основной фактор роста фибробластов (bFGF), синтез которого и активность зависит от концентрации Ca^{2+} (Abdel-Naser M., 1999).

Противовоспалительное действие НИЛИ и его влияние на микроциркуляцию обусловлено, в частности, кальцийзависимым высвобождением медиаторов воспаления, таких как цитокины (Uhlen P. и соавт., 2000), или также кальцийзависимым выделением клетками эндотелия оксида азота (NO) – предшественника фактора расслабления стенок кровеносных сосудов (EDRF) (Muggey R. и соавт., 1996).

Поскольку кальцийзависимым является экзоцитоз (Carafoli E. и соавт., 2001), в частности высвобождение нейромедиаторов из синаптических везикул (Palecek J. и соавт., 1999), то процесс нейрогуморальной регуляции в значительной мере или даже 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 центральной и вегетативной нервной системы (Греннер Д., 1993), 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 (Ройт А. и соавт., 2000). НИЛИ может влиять на иммунитет как опосредованно, через нейроэндокринную регуляцию, так и непосредственно, через иммунокомпетентные клетки (что доказано в экспериментах *in vitro*). К чис-

лу ранних пусковых моментов бласттрансформации лимфоцитов относится кратковременное повышение концентрации свободного внутриклеточного кальция, который активирует протенкиназу, принимающую участие в образовании мРНК в Т-лимфоцитах (Watman N. и соавт., 1988), что в свою очередь является ключевым моментом лазерной стимуляции Т-лимфоцитов (Мантейфель В. М., Кару Т. Й., 1999). Воздействие НИЛИ на клетки фибробластов *in vitro* приводит также к повышенной генерации внутриклеточного эндогенного γ -интерферона (Adachi Y. и соавт., 1999; Rosenspire A. и соавт., 2000).

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

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

Каким образом можно объяснить более высокий эффект воздействия в импульсном режиме при дозах в 100–1000 раз меньших? Нам представляется, что время термодинамической релаксации макромолекул (10^{-12} с) значительно меньше длительности импульса (10^{-7} с) и очень короткий, в нашем понимании, импульс мощностью, измеряемой в ваттах, оказывает большее влияние на локальное термодинамическое равновесие, чем непрерывное излучение мощностью в единицы милливатт.

Изложенные нами теоретические положения не только позволяют объяснить уже имеющиеся факты, но на их основе можно делать выводы как о прогнозировании результатов влияния НИЛИ на физиологические процессы, так и о возможности повышения эффективности лазерной терапии.

Таким образом, в биологических (терапевтических) эффектах НИЛИ в качестве первичного действующего фактора выступает термодинамический сдвиг (возникновение локального градиента температуры), приводящей 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. Биохимия человека / Марри Р., Гренер Д., Мейес П. и др. – М.: Мир, 1993. – Т. 1–2.
2. Гренер Д. // Биохимия человека / Под ред. Р. Марри и др. – М.: Мир, 1993. – Т. 2. – С. 158–169.
3. Гудвин Б. Временная организация клетки. – М.: Мир, 1966.
4. Кару Т. Й. // Низкоинтенсивная лазерная терапия / Под ред. С. В. Москвина, В. А. Буйлина. – М.: «Фирма «Техника», 2000. – С. 71–94.
5. Мантейфель В. М., Кару Т. Й. // Докл. АН. – 1999. – Т. 365, № 2. – С. 267–269.
6. Москвин С. В. Лазерная терапия в дерматологии: вителиго. – М.: НПЛЦ «Техника», 2003.
7. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. – М.: Мир, 2000.
8. Смольянинова Н. К., Кару Т. Й., Зеленин А. В. // Докл. АН СССР. – 1990. – Т. 315, № 5. – С. 1256–1259.

9. Adachi Y., Kindzelskii A. L., Ohno N. et al. // J. Immunol. – 1999. – Vol. 163. – P. 4367–4374.
10. Alexandratou E., Yova D., Handris P. et al. // Photochem. Photobiol. Sci. – 2003. – Vol. 1, N 8. – P. 547–552.
11. Berridge M. J., Lipp P., Bootman M. D. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2000. – Vol. 1, N 1. – P. 11–21.
12. Carafoli E., Santella L., Brance D., Brisi M. // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. – 2001. – Vol. 36. – P. 107–260.
13. Daniolos A., Lerner A. B., Lerner M. R. // Pigment Cell Res. – 1990. – Vol. 3, N 1. – P. 38–43.
14. Euler T., Detwiler P. B., Denk W. // Nature. – 2002. – Vol. 418. – P. 845–852.
15. Fauquier T., Guerineau N. C., McKinney R. A. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98. – P. 8891–8896.
16. Filippin L., Magalhaes P. J., Di Benedetto G. et al. // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278, N 40. – P. 39224–39234.
17. John L. M., Mosquera-Caro M., Camacho P., Lechleiter J. D. // J. Physiol. (Lond.). – 2001. – Vol. 535. – P. 3–16.
18. Karu T. I. Photobiology of low-power laser therapy. – London et al.: Harwood Acad. Publishers, 1989.
19. Karu T., Tiphlova O., Esenaliev R. et al. // J. Photochem. Photobiol. B.: Biology. – 1994. – Vol. 24. – P. 155–161.
20. Murrey R. K. et al. Harper's biochemistry 25 th ed. – Appleton & Lange, 1996, – Stamford, 2000. – 927 p.
21. Palecek J., Lips M. B., Keller B. U. // J. Physiol. (Lond.). – 1999. – Vol. 520. – P. 485–502.
22. Robb-Gaspers L. D., Thomas A. P. // J. Biol. Chem. – 1995. – Vol. 270. – P. 8102–8107.
23. Rosenspire A. J., Kindzelskii A. L., Petty H. R. // Biophys. J. – 2000. – Vol. 79. – P. 3001–3008.
24. Schaffer M., Sroka R., Fuchs C. et al. // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. – 1997. – Vol. 40, N 3. – P. 253–257.
25. Tsien R. Y., Poenie M. // Trends in Biochemical Sciences. – 1986. – Vol. 11, N 11. – P. 450–455.
26. Uhlen P. et al. // Nature. – 2000. – Vol. 277. – P. 694–697.
27. Wallingford J. B., Ewald A. J., Harland R. M., Fraser S. E. // Curr. Biol. – 2001. – Vol. 11. – P. 652–661.
28. Watman N. P., Crespo L., Davis B. et al. // Cell. Immunol. – 1988. – Vol. 111, N 1. – P. 158–166.
29. Yashiro Y., Duling B. R. // Circ. Res. – 2000. – Vol. 87. – P. 1048–1054.

Поступила 14.03.12

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: низкоинтенсивное лазерное излучение, механизмы биологического и терапевтического действия, кальцийзависимые процессы

В статье рассмотрена модель механизмов биологического и лечебного 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.).

ON THE PRIMARY MECHANISMS OF THE THERAPEUTIC ACTION OF LOW-INTENSITY LASER RADIATION

Moskvin S.V.

Federal state institution "State Research Centre of Laser Medicine" Russian Federal Medico-Biological Agency

Key words: low-intensity laser radiation, mechanisms of biological and therapeutic action, calcium-dependent processes

A model of the primary mechanisms of therapeutic action of low-intensity laser radiation is considered. It is shown that the principal mechanisms triggering the response of a living organism to the action of laser radiation are the formation of a temperature gradient after absorption of the radiation energy and the subsequent release of Ca^{2+} from the intracellular depot pool resulting in the activation of the calcium-dependent processes, cell proliferation, vasodilation, anti-inflammatory processes, etc.