

**С.Д. Захаров, И.М. Корочкин, А.Н. Солдатов, Е.В. Бабенко, Б.В. Еремеев,
Г.М. Капустина, Ю.П. Полунин, В.Б. Суханов, А.С. Шумейко**

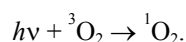
ПРИМЕНЕНИЕ ЛАЗЕРА НА ПАРАХ МЕДИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПЕРВИЧНОГО ФОТОАКЦЕПТОРА ПРИ ЛАЗЕРНОЙ ТЕРАПИИ

Для проверки концепции фотогенерации синглетного кислорода как первичного акта реакции клеток на облучение в полосах поглощения кислорода применялась установка, состоящая из цитодифрактометра, лазера на красителе с накачкой лазером на парах меди. Полученные результаты лазеротерапии в полосе поглощения синглетного кислорода подтверждают эту концепцию.

1. Введение

Использование низкоинтенсивного лазерного излучения для лечебных целей [или лазерной терапии (ЛТ)], несмотря на тридцатилетний мировой опыт, нуждается в строгом обосновании. Для этого необходимо выполнить три основных требования. Новый метод должен давать воспроизводимые результаты в независимых медицинских учреждениях. Кроме того, молекулярный или иной агент, реагирующий с фотонами и инициирующий предлагаемый терапевтический эффект, должен быть идентифицирован в экспериментах на клетках. Наконец, следует продемонстрировать, что лечебный эффект в клинике достигается с помощью одного и того же агента.

Первое требование ранее было выполнено с избытком [1–3]. В цикле исследований [4–9], по крайней мере для некоторых спектральных интервалов, удалось удовлетворить и второму требованию. В частности, для наиболее распространенного варианта ЛТ с применением He–Ne-лазера (632,8 нм) было показано, что при облучении красных клеток крови (эритроцитов) за процесс, напоминающий клеточную биостимуляцию [10], отвечает реакция фотогенерации синглетного кислорода (ФГСК):



В реакции участвует кислород, растворенный во внеклеточном пространстве, а не связанный с биомолекулами (например, гемоглобином).

Результаты исследования клеток крови были получены методом регистрации спектров действия с использованием лазеров с плавной перестройкой длины волны и оригинального диагностического метода цитодифрактометрии (эридифракции) [11].

Было обнаружено, что механизм ФГСК доминирует при воздействии излучения, по крайней мере, в четырех узких интервалах видимого и ближнего ИК-диапазонов. В их число входит полоса видимого диапазона спектра 630 – 650 нм, включающая линии 633 нм He–Ne-лазера, полоса 580 – 590 нм, перспективная для медицинских применений. В данном сообщении описаны результаты завершающей части этого цикла. Ее цель – удовлетворить третьему требованию, т.е. проверить, действительно ли ФГСК-механизм лежит в основе лечебного эффекта ЛТ. Клинические исследования выполнялись нами в наиболее продвинутом к настоящему времени режиме внутривенного облучения, получившем официальное признание (за его разработку двое из авторов настоящего сообщения И.М. Корочкин и Г.М. Капустина удостоены Государственной премии СССР).

2. Аппаратура и методы

Облучение пациентов выполнялось с помощью установки для медико-биологических исследований, разработанной авторским коллективом под руководством А.Н. Солдатова в Томском госуниверситете. Блок-схема установки показана на рис. 1.

Лазер на парах меди типа «Малахит» [12] генерировал на длинах волн 510,6 и 578,2 нм в импульсно-периодическом режиме со средней мощностью до 1000 мВт при длительности импульсов 20 – 30 нс и с частотой следования 12 – 18 кГц.

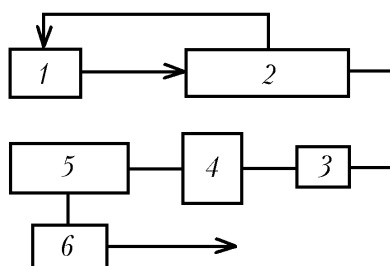


Рис. 1. Блок-схема экспериментальной установки: 1 – источник питания; 2 – лазерная трубка; 3 – дисперсионные элементы; 4 – лазерный преобразователь на красителе МЛК-02; 5 – аттенуатор; 6 – световод для переноса лазерного излучения

Лазер «Малахит» использовался для накачки красителей. В качестве лазера на красителях применялся малогабаритный преобразователь типа МЛК-02 [13] со сменной кюветой-насосом, позволяющей заменять активную среду без переустройства оптической схемы. Для получения генерации в желтой области спектра использовался краситель родамин В, в красной – родамин 6Ж. Длительность импульса генерации составляла 10–15 нс, а ширина линии излучения 1–2 нм.

Излучение вводилось в сменные кварцевые световоды диаметром 0,4 мм, дистальный конец которых предназначался для облучения пациентов. Среднюю мощность излучения на выходе световода можно было варьировать в пределах от 0,3 до 50 мВт, контролируя калориметром ИМО-4С.

Для удобства измерения длины волны в условиях клиники была специально разработана миниатюрная приставка по схеме дифракционного спектрографа с Z-образным оптическим путем. В качестве дисперсионного элемента в ней использовалась дифракционная решетка 1200 штр/мм. Излучение вводилось таким образом, чтобы визуально контролировать длину волны на выходе световода. Отсчет длины волны и ширины спектра осуществлялся по шкале, прокалиброванной по линиям излучения на длине волны 510,6 и 578,2 нм с точностью 1 нм.

В ряде процедур в качестве источника облучения использовался также стандартный аппарат АЛОК-1М с непрерывным He–Ne-лазером мощностью до 3 мВт, имеющий выход на аналогичный световод. Процедура терапевтического облучения с помощью такого лазера и рекомендуемые дозы описаны в [14].

Техника измерений с помощью цитодифрактометра изложена в [15]. Контролируемой величиной является безразмерный показатель удлинения эритроцитов в кювете цитодифрактометра. В наших исследованиях величина измерялась спустя 20 мин после ввода пробы в циркулирующий внутри прибора физиологический раствор.

Больные ишемической болезнью сердца, имевшие назначения на лазерную терапию, подбирались добровольно в однородные группы по 4 – 10 человек (всего около 100 человек). Стандартный курс лечения обычно состоял из 5 – 6 лазерных процедур. В наших экспериментах по причинам безопасности пациенты подвергались экспериментальному облучению один раз за курс, во время первой процедуры.

Эксперимент проводился следующим образом. На выходе световода подбирались необходимые параметры лазерного излучения. Затем световод через полую иглу шприца вводился врачом в вену пациента и при этом забиралась капля крови (необходимый объем пробы составлял 0,125 мл) для измерения начального значения параметра $\varepsilon(0)$. С этого момента началось облучение. Через обусловленный интервал времени t световод на мгновение вынимался из иглы, при этом капля крови выдавливалась внутренним давлением и использовалась для контроля $\varepsilon(t)$, а световод вновь вставлялся для продолжения облучения.

На полученной таким образом кривой $\varepsilon(t)$ для каждого пациента определялось время t , при котором величина $\varepsilon(t)$ достигала максимума. Предварительными исследованиями было показано, что оно соответствовало оптимальной дозе облучения для данного пациента при конкретных условиях лазерной процедуры.

Спектр действия строился как зависимость $t_m^{-1}(\lambda)$, приведенная к одному и тому же значению средней мощности излучения P на выходе световода. Чтобы подобная редукция была корректной, производилась проверка линейности функции $t^{-1}(P)$ в пределах значений использованной мощности.

3. Результаты и обсуждение

При исследовании эффектов ЛТ в желтой области спектра, ранее не применяемой для внутреннего облучения крови, были предприняты дополнительные меры для уменьшения количества опытов. С этой целью большая часть измерений была выполнена вблизи ожидаемого центра линии, находящегося в интервале 586 – 587 нм, согласно спектру действия, полученному в экспериментах по облучению эритроцитов [9], а также на предполагаемых краях линий.

Кривая зависимости цитодифрактометрического показателя от времени облучения на длине волны $\lambda = 586$ нм при различных значениях средней мощности показана на рис. 2. Она имеет тот же вид, что и в экспериментах на клетках. Отчетливо заметно, что по мере увеличения мощности максимум кривых смещается в сторону более коротких моментов времени t , свидетельствуя о более раннем достижении оптимальной дозы.

Воздействие на длине волны 592 нм при средней мощности 5 мВт не оказывало заметного влияния на показатель в продолжение 15-минутного внутреннего облучения. Также не удалось заметить существенных изменений показаний цитодифрактометра при облучении на другом краю линии поглощения кислорода, вблизи $\lambda = 578$ нм. В этом случае использовалось излучение желтой линии лазера на парах меди, причем мощность излучения на выходе световода поднималась вплоть до 20 мВт.

По полученным данным построены характеристика линейности и спектр действия, приведенный к средней мощности 1 мВт (рис. 3). Хотя последний и имеет всего три значения, но они полностью согласуются с данными [9].

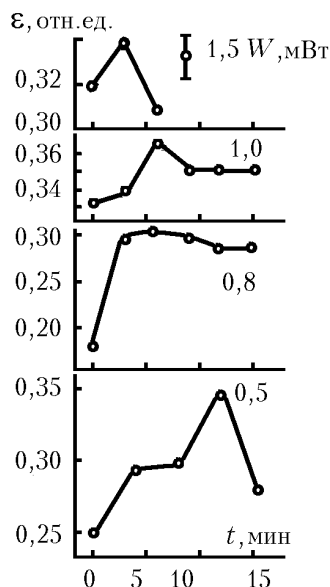


Рис. 2. Зависимость цитодифрактометрического показателя ϵ от времени облучения на длине волны 586 нм для различных значений средней мощности лазерного излучения W

Подчеркнем, что отсутствие эффекта на $\lambda = 592$ или 578 нм не может интерпретироваться как доказательство бесперспективности излучения на этих длинах волн для целей ЛТ. Отсюда лишь следует, что такое излучение в малых дозах не эффективно для облучения крови. Однако в [16] отмечается, что для наружного облучения (при ином механизме действия) излучение на $\lambda = 578$ нм приносит больным некоторое облегчение.

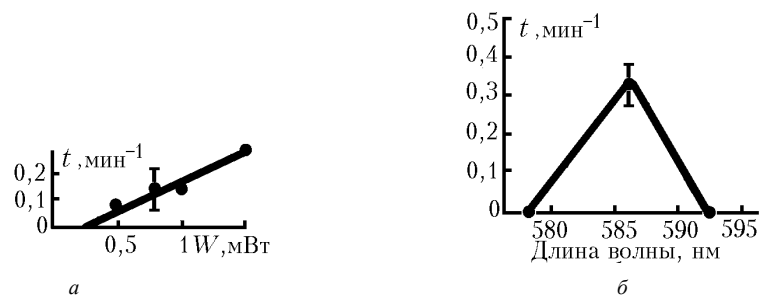


Рис. 3. Характеристика линейности цитодифрактометра на длине волны 586 нм (а) и спектр действия для лазерной терапии (б) в области длин волн 578 – 592 нм

В диапазоне длин волн 627–650 нм исследователи испытывали меньшие опасения. Примеры зависимостей цитодифрактометрического показателя от времени облучения показаны на рис. 4.

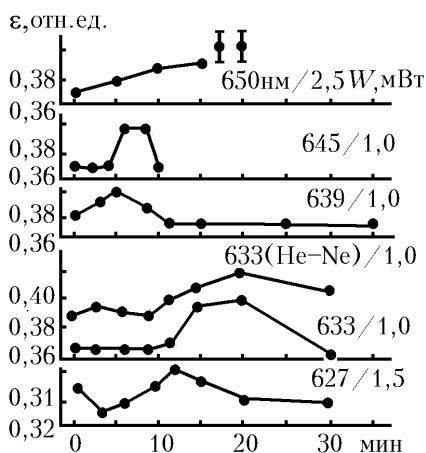


Рис. 4. Цитодифрактометрический показатель ϵ в области длин волн 627 – 650 нм

Облучение на $\lambda = 633$ нм выполнялось при одной и той же средней мощности двумя разными лазерами, работающими в импульсно-периодическом и непрерывном режимах. Совпадение значений t в обоих вариантах демонстрирует свойства накопления модификаций биомолекул при реализации механизма ФГСК [6].

Спектр действия в диапазоне 627 – 660 нм, построенный в пределах линейного участка зависимости $t(P)$, показан на рис. 5. Он соответствует спектру действия для экспериментов *in vitro* [8] и контуру полосы поглощения кислорода [17], растворенного во фреонах.

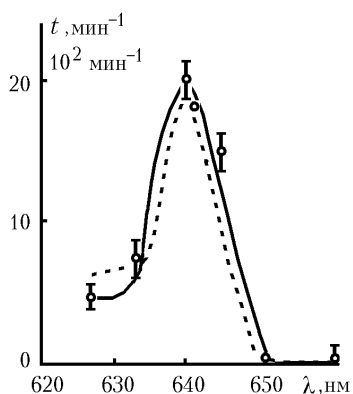


Рис. 5. Спектр действия лазерной терапии в диапазоне 627–660 нм (сплошная линия) и спектр поглощения растворенного во фреонах молекулярного кислорода [17] (точки)

Таким образом, при проведении внутривенной лазерной терапии с использованием для облучения лазера с $\lambda = 633$ нм наблюдаемый терапевтический эффект обусловлен поглощением фотонов молекулярным кислородом, растворенным в крови. Результаты экспериментов доказывают также аналогичность механизмов воздействия на кровь низкоинтенсивного лазерного излучения как в непрерывном, так и в импульсно-периодическом режимах.

1. Илларионов В. Е. // Основы лазерной терапии. М.: Респект, 1992. С. 23–31.
2. Корочкин И. М. // Диагностика и лечение в клинике внутренних болезней. М.: ИМГОМИ, 1989. С. 4–8.
3. Ohshira T. and Calderhead R. G. Low Level Laser Therapy: a Practical Introduction. Chichester, New York, 1988.
4. Захаров С. Д., Еремеев Б. В., Перов С. Н. // Кр. сообщения по физике. 1989. № 1. С. 15–16.
5. Данилов В. П., Захаров С. Д., Иванов А. В. и др. // ДАН СССР. 1990. Т 331. С. 1255–1258.
6. Захаров С. Д., Скопинов С. А., Чудновский В. М. и др. // Изв. АН СССР. Сер. Физич. 1990. Т. 54. С. 1629–1635.
7. Букин Г. В., Вольф Е. Б., Данилов В. П. и др. // Кр. сообщения по физике. 1991. № 1. С. 18–24.
8. Немцев И. З., Захаров С. Д., Лапшин В. П. и др. // Авиакосмическая и экологическая медицина. 1992. Т. 26. С. 57–62.
9. Захаров С. Д., Перов С. Н., Панасенко Н. А. и др. // J. of Russian Laser Research. 1995. V. 16. № 2. P. 186–187.
10. Амбарцумян Р. В., Елисеев П. Г., Еремеев Б. В. и др. // Кр. сообщения по физике. 1987. № 10. С. 35–37.
11. Zakharov S. Static and Dynamic Light Scattering in Medicine and Biology. Editors proc. // SPIEE. 1993. P. 181–189.
12. Воронов В. И., Полунин Ю. П., Солдатов А. Н., Шумейко А. С. // Оптика атмосферы и океана. 1993. Т. 6. № 6. С. 737–739.
13. Иванов А. И., Мирза С. Ю., Солдатов А. Н., Суханов В. Б. // Оптика атмосферы и океана. 1993. Т. 6. № 6. С. 740–742.
14. Капустина Г. М., Чапидзе Г. Э., Божуа М. Р. и др. Диагностика и лечение в клинике внутренних болезней / Под ред. И. М. Корочкина М.: ИМГОМИ, 1989. С. 9–16.
15. Еремеев Б. В. Селективное воздействие низкоинтенсивного лазерного ИК-излучения на эритроциты: Канд. дис. М.: ФИАН, 1989.
16. Евтушенко В. А., Бычков И. А., Солдатов А. Н., Зырянов Б. Н. // Оптика атмосферы и океана. 1993. Т. 6. № 6. С. 746–749.
17. Long C. and Kearns D. R. // J. Chem. Phys. 1973. V. 59. P. 5729–5736.

Томский государственный университет
И Московский мединститут
Физический институт РАН

Поступила в редакцию
24 октября 1995 г.

S. D. Zakharov, I. M. Korochkin, A. N. Soldatov, E. V. Babenko,
B. V. Eremeyev, G. M. Kapustina, Ju. P. Polunin, V. B. Sukhanov,
A. S. Shumeiko. **Use of Cu Lasers in Identification of Primary Photoacceptor in Laser Therapy.**

A setup consisting of cytodiffractometer and a dye laser pumped with Cu vapour laser was used to test the idea on the singlet oxygen photogeneration as the primary response of cells to exposure to irradiation within the oxygen absorption bands. The therapeutic results obtained verify the idea.