

## ОПТИМИЗАЦИЯ ИМПУЛЬСНОГО РЕЖИМА В ФОТОТЕРАПИИ

В.М. Вахтель<sup>1</sup>, В.В. Вдовин<sup>2</sup>, Б.А. Зон<sup>1</sup>, В.М. Данилов<sup>3</sup>, А.А. Кунин<sup>3</sup>,

П.А. Лукьянович<sup>4</sup>, С.Н. Панкова<sup>3</sup>, А.Н. Редькин<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Воронежский государственный университет, Воронеж

<sup>2</sup> Дорожная клиническая больница на станции Воронеж-1 ОАО «РЖД», Воронеж

<sup>3</sup> Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко, Воронеж

<sup>4</sup> ООО «Роспромформ», Санкт-Петербург

На основе анализа первичных механизмов фотостимуляции рассмотрена гипотеза о блокировке синтеза АТФ как об основной причине стимулирующего воздействия. Обоснована роль импульсного режима светового излучения и сделаны оценки его параметров. Представлены результаты двух клинических исследований: подбора оптимизированных параметров импульсного режима стимулирующего излучения при терапии в стоматологии и статистической обработки анализов крови, полученных при проведении операций холецистэктомии с использованием импульсного излучения с найденными оптимизированными параметрами. На основе статистической обработки анализов крови обнаружено в среднем двукратное по сравнению с контрольной группой снижение роста СОЭ при 2-минутном облучении ложа удаленного желчного пузыря во время операции.

Ключевые слова: фототерапия, фотодинамическая терапия, световое повреждение мембран, потенциал матрикса, клеточные защитные механизмы, синтез АТФ, тканевый адаптационный синдром

### Введение

Со времени первых публикаций о терапевтическом применении лазеров [1] обнаружено множество лечебных эффектов [2]. При этом многие медики скептически относятся к терапии низкоинтенсивным лазерным излучением (НИЛИ) [3]. Одна из главных причин этого состоит в недостаточном понимании механизмов стимулирующего действия НИЛИ [4]. В то же время за всю историю терапии с применением НИЛИ испробованы всевозможные комбинации значений параметров стимулирующего светового воздействия и накоплено достаточное количество данных для выбора этих значений с целью достижения требуемых терапевтических эффектов.

Диапазон длин волн используемого излучения, как правило, ограничен интервалом 600–1300 нм, где поглощение тканями происходит в меньшей степени. Установлено, что поглощение фотонов эндогенными порфиринами приводит к генерации активных форм кислорода (АФК) [5]. Продемонстрирована биологическая эффективность излучения непосредственно на линиях возбуждения молекулярного кислорода [6]. В биологическом отклике обнаружена важная роль цитохромоксидазы [7], также генерирующей АФК после поглощения ею фотона.

В практической фототерапии (ФТ) происходит переход от использования лазеров к менее успешному применению некогерентных и неполяризованных светодиодных источни-

ков [8]. Известно, что поляризация существенно снижается при рассеянии света уже в роговом слое эпидермиса. В тонких препаратах живых клеток, где поляризация почти полностью сохраняется, ее влияние также не обнаружено [9].

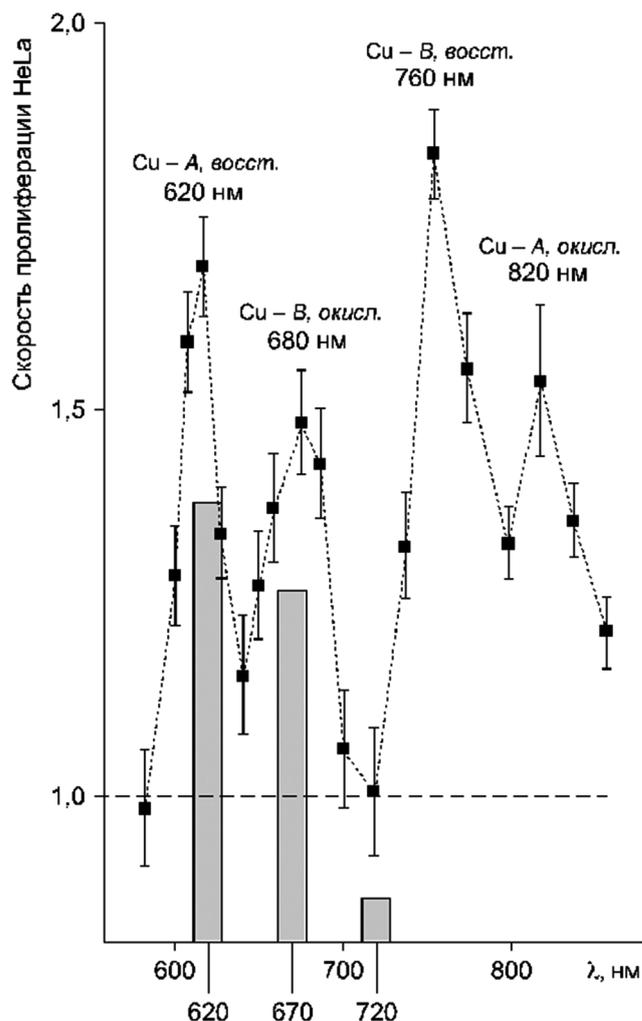
Как правило, используются плотности мощности излучения  $I \approx 1-100$  мВт/см<sup>2</sup>. При этом клиническая практика свидетельствует о колоколообразной зависимости терапевтического эффекта от  $I$ : стимулирующий эффект, вначале нарастающий с увеличением  $I$ , при дальнейшем увеличении сменяется угнетением [10]. Подобная зависимость терапевтического эффекта наблюдается и от удельной дозы светового облучения, оптимальные величины которой составляют обычно  $D \approx 0,5-5$  Дж/см<sup>2</sup>.

Относительно невелика доля работ, посвященных исследованиям модуляции интенсивности светового потока, притом, что импульсный режим  $I$  дает результаты, как минимум, отличающиеся от результатов воздействия с постоянной  $I$ . Модулируют излучение частотами  $f$  от долей и единиц Гц (согласование с дыхательным ритмом, ЧСС и вазомоциями) [11] до десятков кГц. Чаще всего при подборе  $f$  наилучшие терапевтические эффекты обнаруживают при  $f \approx 80$  Гц [12].

### Световая блокировка выработки АТФ

Помимо ФТ, используется НИЛИ и в фотодинамической терапии (ФДТ), механизмы которой относительно хорошо изучены. Основным фактором поражающего действия света при ФДТ является перекисное окисление фосфолипидов мембран. Причем наибольшей чувствительностью к ФДТ обладают мембраны митохондрий, эффект на которых усиливается за счет вторичной генерации митохондриальных АФК [13]. Используемые в ФДТ искусственные фотосенсибилизаторы при ФТ не применяются, однако генерация АФК при ФТ рассматривается практически всеми авторами, предлагающими различные механизмы фотостимуляции. Основной предмет дискуссий состоит в том, какой из нативных хромофоров играет ведущую роль.

Во время предварительных клинических исследований нами была проанализирована относительная эффективность терапии генерализованного гингивита при использовании не-



**Рис. 1.** Сравнение спектральных зависимостей оценки эффективности лечения генерализованного гингивита (гистограмма с относительной нормировкой) и относительной скорости пролиферации тонкого слоя клеток HeLa после облучения лазером [7] (темные квадратики)

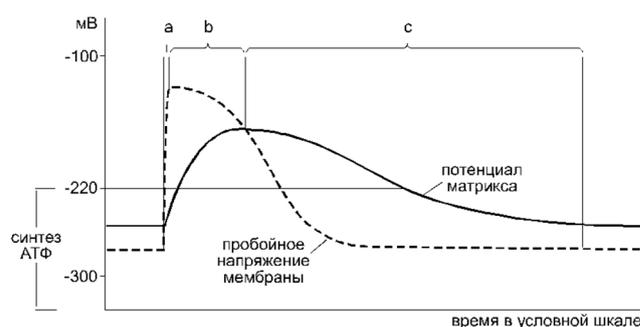
прерывного светодиодного излучения с плотностью мощности  $\approx 15$  мВт/см<sup>2</sup> для трех источников с длинами волн максимума излучения  $\lambda_m$ : 620, 670 и 720 нм, шириной спектров на полувысоте  $\approx 17$  нм (рис. 1). Полученная зависимость в оценках спектральной эффективности оказалась хорошо соответствующей найденной *in vitro* спектральной зависимости в скорость пролиферации клеток HeLa [7]. В работе [7] показано, что первичным хромофором биостимулирующего эффекта в клетках HeLa является цитохромоксидаза — терминальный комплекс дыхательной цепи и

основной элемент протонного насоса митохондрий. Однако нельзя утверждать, что цитохромоксидаза является единственным нативным хромофором при фотостимуляции *in vivo*. Так, авторы [6] обнаружили эффект, названный ими светокислородным, вызывающий стимуляцию эритроцитов, у которых дыхательная цепь отсутствует. Также в качестве хромофоров рассматриваются гематопорфирины [5], накапливающиеся на внутренних мембранах митохондрий при воспалительных процессах. Митохондриальная реакция может играть ведущую роль в ФТ, что подтверждается увеличением синтеза АТФ, наблюдаемым при фотостимуляции [14].

Результатом работы протонного насоса митохондрий является поддержание отрицательного потенциала матрикса, необходимого для функционирования АТФ-синтазы при осуществлении ею реакции  $\text{АДФ} + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{АТФ} + \text{H}_2\text{O}$ , что возможно при трансмембранной разности потенциалов  $U_M > 220$  мВ [15]. Комплексы дыхательной цепи расположены главным образом в кристах митохондрий. Поэтому после поглощения хромофором фотона высвобожденная молекула АФК оказывается вблизи внутренней мембраны, что, как и при ФДТ, с высокой вероятностью приводит к процессу перекисного окисления ее фосфолипидов. Окисление фосфолипидов ведет к понижению пробойного напряжения внутренней мембраны [16] (рис. 2, стадия “а”). Это вызывает трансмембранные ионные токи (стадия “b”) и падение потенциала. Последнее косвенно подтверждается повышением концентрации в цитоплазме ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , накапливаемых в матриксе в форме фосфатов [17]. Репарация поврежденного участка мембраны завершает стадию “b”, после чего начинается относительно медленная стадия “с” – восстановление трансмембранного потенциала длительностью  $\tau_{\text{rec}}$ . На стадии “с” эффективность протонного насоса должна быть повышена по сравнению с нормальным состоянием, поскольку снижение электрохимического градиента на внутренней мембране автоматически увеличивает редокс потенциал дыхательной цепи.

Завершается стадия “с” после достижения  $U_M = 220$  мВ и возобновления синтеза АТФ.

Таким образом, с момента перекисного окисления фосфолипидов, вызванного фотостимулированной генерацией АФК в митохонд-



**Рис. 2.** Поведение потенциала матрикса митохондрии после перекисного окисления липидного бислоя внутренней мембраны: а – перекисное окисление фосфолипидов, b – трансмембранные ионные токи, с – восстановление потенциала матрикса

рии, и до завершения восстановления потенциала матрикса синтез АТФ должен быть заблокирован.

### Стимуляция при тканевом стрессе

Вывод о световой блокировке синтеза АТФ, на первый взгляд, входит в противоречие с наблюдаемым увеличением синтеза АТФ при фотостимуляции.

Гомеостаз клеток и тканей поддерживается внутренними сигнальными системами, направленными на компенсацию внешних воздействий, в том числе повреждающего характера. В процессе отклика на повреждение – тканевом адаптационном синдроме (ТАС) – патогенные раздражители выступают в качестве стимуляторов реакций защитного и приспособительного характера [18]. ТАС характеризуется неспецифической реакцией и в зависимости от концентрации и длительности действия раздражителя проявляется в одной из двух фаз: стимуляции метаболизма и его торможения. Обе фазы сопровождаются повреждением мембран митохондрий и повышением концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме. Повреждение мембран митохондрий и падение мембранного потенциала на первой фазе ТАС вызывает не прекращение синтеза АТФ, а, наоборот, приводит к его стимуляции и повышению метаболизма [15]. Вторая фаза ТАС характеризуется нарастанием апоптоза и угнетением метаболизма.

Из изложенного видно, что синдромы ТАС в двух его фазах подобны реакциям на фотовоздействие в зависимости от дозы и от интенсивности облучения. Синдромы первой фазы ТАС

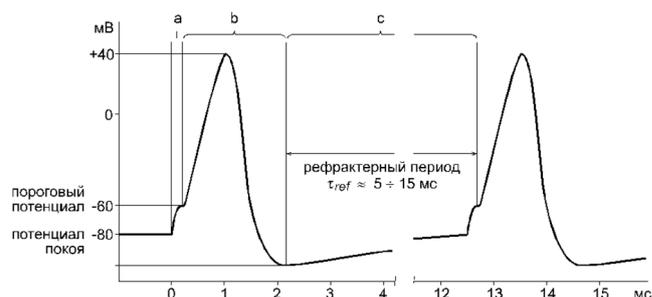
соответствуют реакциям стимуляции при ФТ: увеличению выработки АТФ и возрастанию метаболизма. Синдромы второй фазы ТАС аналогичны эффектам необратимого повреждения при ФДТ. Это обстоятельство позволило рассматривать световой стимулирующий эффект как стрессовую реакцию [26].

Тогда можно сформулировать гипотезу о кратковременной блокировке синтеза АТФ, которая является стимулирующим фактором, вызывающим последующую активацию синтеза АТФ, и, тем самым, снять отмеченное выше противоречие. Если гипотеза верна, то для достижения стимулирующего эффекта в сочетании с минимизацией повреждающего фактора нет необходимости продолжать световое воздействие во время фазы "с", когда синтез АТФ уже приостановлен. Облучение следует проводить относительно короткими импульсами с периодом между ними  $T > \tau_{\text{rec}}$ . Тогда увеличивая уровень стимуляции, можно одновременно уменьшить средний по времени поток фотонов и тем самым уменьшить повреждающий эффект светового воздействия.

### Оценка времени восстановления потенциала матрикса

Чтобы оценить время  $\tau_{\text{rec}}$  и найти требуемый период следования импульсов  $T$ , обратим внимание на то, что период частоты 80 Гц (12,5 мс), о которой упоминалось во введении, близок суммарному времени деполяризации, реполяризации и рефрактерного периода при возбуждении потенциала действия (ПД) нейронов (рис. 3).

В ПД, как и в поведении потенциала матрикса после повреждения мембраны, можно выделить три стадии. Стадия "а" соответствует времени нарастания стимула, вызывающего ПД, и обычно составляет доли миллисекунды. Аналогичная стадия для митохондрии определяется скоростью процесса перекисного окисления и длится, как следует из [19], не дольше нескольких микросекунд. Стадия "b" в ПД включает процессы деполяризации и реполяризации плазматической мембраны аксона и характеризуется трансмембранными токами через ионные каналы. Длительность  $\tau_{\text{rec}}$  наиболее продолжительной стадии ПД "с" – рефрактерного периода определяется эффективностью работы ионного насоса.



**Рис. 3.** Потенциал действия нейрона: а – надпороговый стимул, b – ионные токи (деполяризация и реполяризация мембраны), с – восстановление ионного баланса и потенциала покоя (рефрактерный период)

Такая аналогия свидетельствует о сходстве динамики процессов, определяющих и ПД нейрона, и поведение потенциала матрикса после фотостимулированного окисления фосфолипидов. Длительности стадий "с" обоих процессов зависят от эффективности работы насосов: ионного – для нейронов и протонного – для митохондрий, и, прежде всего, от времени изменения конформации основных перекачивающих комплексов:

Na/K-АТФазы и цитохромоксидазы. Оба комплекса являются трансмембранными и имеют близкие массы:  $\approx 150$  кДа у Na/K-АТФазы и  $\approx 240$  кДа у цитохромоксидазы. Создаваемое ионными токами при деполяризации и реполяризации нейрона изменение аксонного потенциала  $\approx 125$  мВ также близко величине снижения потенциала матрикса митохондрии после пробы  $\approx 100$  мВ, как следует из [17]. Поэтому время  $\tau_{\text{rec}}$  должно слишком отличаться от  $\tau_{\text{ref}} = 5-20$ . Тогда период следования импульсов  $T$  оптимального стимулирующего излучения должен находиться в диапазоне 7–20 мс.

### Результаты в стоматологии

На основе сделанных выше оценок были проведены клинические исследования импульсного режима в стоматологии [20, 21]. В каждой серии исследований использовались 6 приборов с идентичными спектральными характеристиками и одинаковой средней по времени мощностью излучения. Применялся "слепой" и "двойной слепой" контроль, всегда два прибора (контрольная пара) имели одинаковые параметры импульсного режима, в итоге эффективность их применения отличалась незначитель-

но. Проведено 5 серий исследований, обработаны данные около 800 пациентов.

Исследования эффективности различных импульсных режимов излучения проводились с использованием статистического анализа экспертных оценок [22], выполненных по относительной 10-балльной шкале. С учетом имеющегося опыта был сделан акцент на терапию генерализованного гингивита, что позволило собрать требуемый объем данных, результаты обработки которых представлены в табл. 1.

Были найдены следующие оптимизированные параметры импульсного режима: период следования световых импульсов  $T \approx 13$  мс ( $f \approx 76$  Гц), длительность импульса  $t \approx 3$  мс ( $Q \approx 4,3$ ), при средней плотности мощности  $D \approx 30$  мВт/см<sup>2</sup> (в импульсе  $\approx 130$  мВт/см<sup>2</sup>), максимуме спектра излучения  $\lambda_m = 625 \pm 5$  нм и ширине на полувысоте  $\approx 17$  нм.

Таблица 1

**Результаты клинических исследований эффективности модуляции стимулирующего излучения в стоматологии**

I–III серии. Генерализованный гингивит		
$f$ , Гц ( $\pm 1$ %)	$Q$ ( $\pm 3$ %)	Оценка эффективности
0	1	2–5
50	4	4–6
65	3,5	6–7
80	3	6–7
80	4	8–10
90	3,5	6–7
100	2	4–5
100	3,5	4–6
IV серия. Генерализованный гингивит		
$f$ , Гц ( $\pm 1$ %)	$Q$ ( $\pm 3$ %)	Оценка эффективности
69	4,7	7–8
76	4,3	10
82	5,7	6
85	4,0	7
91	5,5	7–8
98	5,1	5
V серия, $Q = 4,3$ ( $\pm 3$ %)		
$f$ , Гц ( $\pm 1$ %)	Оценка эффективности	
	Воспаление пародонта	Восстановление эмали
65	5–6	7
70	8	6
76	10	10
82	5–6	8
92	5	8

$Q$  – скважность (отношение периода следования импульсов к их длительности)

## Результаты при холецистэктомии

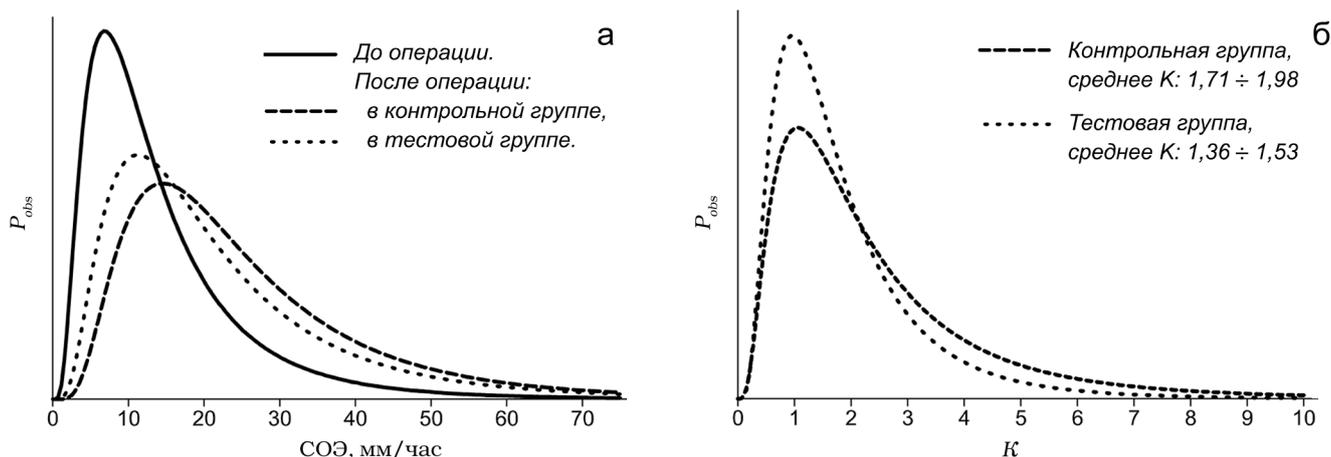
Представленные выше параметры стимулирующего излучения с оптимизированным импульсным режимом были применены в фототерапевтическом приборе “Светозар” [23], один из вариантов которого использовался при лапароскопической холецистэктомии ЭХВЧ (электрохирургия высокочастотными токами) [24]. Исследуемые пациенты были рандомизированы на две группы: тестовую – 106 человек, которым во время операции проводилось 2-минутное облучение ложа удаленного желчного пузыря, и контрольную – 104 человека, которым такое облучение не проводилось. В основном оперативное вмешательство в обеих группах было идентичным. Проведение операции под общим наркозом позволило исключить эффект плацебо.

Накопленные в историях болезни данные по 13 параметрам анализов крови были подвергнуты статистической обработке. С вероятностью ошибки  $p < 0,025$  обнаружено в среднем двукратное снижение роста СОЭ (скорости оседания эритроцитов) после ЭХВЧ-холецистэктомии в тестовой группе по сравнению с контрольной группой прооперированных пациентов (рис. 4). Полученный результат свидетельствует о меньшем послеоперационном воспалении [25] и ускорении восстановления микроциркуляции в зоне послеоперационного ожога на поверхности печени.

## Выводы

Результаты клинических исследований продемонстрировали максимальную эффективность импульсного режима стимулирующего излучения с оптимизированными частотой и скважностью. Это косвенно свидетельствует в пользу гипотезы о блокировке генерации АТФ как основном факторе стимулирующего тканевого стресса при фототерапии.

Найденные параметры оптимизированного импульсного режима было бы неверным считать универсальными. При некоторых видах терапии, например, внутривенном облучении крови, возможно доминирование немитохондриальных механизмов стимуляции, связанных с повреждением плазматических мембран эритроцитов. В этом случае оптимизированная частота импульсов может отличаться от найденной, но условие  $t \ll T$  должно остаться справедливым.



**Рис. 4.** Подгонка логнормальных распределений относительной плотности вероятности  $P_{obs}$  лабораторных данных анализов крови: а – СОЭ; б – индивидуального изменения СОЭ (коэффициент  $K$ ) после операции, числовые значения  $K$  показаны с учетом ошибки среднего

Рассмотренный механизм светового повреждения мембран и предложенная гипотеза позволяют объяснить феномен снижения эффективности стимуляции, связанный с увеличением дозы излучения. Чрезмерно длительная блокировка синтеза АТФ может остановить клеточные защитные механизмы и вызвать апоптоз.

### Список литературы

- Mester E., Szende B., Tota J.G. Effect of laser on hair growth of mice. // Kiserl Orvostud, 1967, **19**, P. 628–631.
- Low Level Laser Therapy. // Medical Coverage Policy, Cigna, No. 115, 2014, 9 p.
- Barrett S. A skeptical look at low level laser therapy. // Device Watch. – 2009 June 17 – (<http://www.devicewatch.org>).
- Клебанов Г.И. Мембранные механизмы фотобиологического действия низкоинтенсивного лазерного излучения. // В сб. “Мембраны. Критические технологии”. – М: ВНИИТИ, 2000, № 6, С. 26–44.
- Владимиров Ю.А., Клебанов Г.И., Борисенко Г.Г., Осипов А.Н. Молекулярно-клеточные механизмы действия низкоинтенсивного лазерного излучения. // Биофизика, 2004, **49**, № 2, С. 339–350.
- Захаров С.Д., Иванов А.В. Светокислородный эффект в клетках и перспективы его применения в терапии опухолей. // Квантовая электроника, 1999, **29**, № 3, С. 192–214.
- Karu T.I. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. // J. Photochem. and Photobiol. B: Biology, 1999, **49**, P. 1–17.
- Hode L., Tunir J. Low level laser therapy (LLLT) contra light emitting diode therapy (LEDT) – what is the difference? // In: A Window on the Laser Medicine World: Laser Florence ‘99 – SPIE: 2000, P. 90–97.
- Karu T.I., Pyatibrat L.V., Moskvina S.V. et al. Elementary processes in cells after light absorption do not depend on the degree of polarization: implications for the mechanisms of laser phototherapy. // Photomedicine and Laser Surgery, 2008, **26**, No. 2, P. 77–82.
- Владимиров Ю.А., Осипов А.Н., Клебанов Г.И. Фотобиологические основы терапевтического применения лазерного облучения. // Биохимия, 2004, **69**, № 1, С. 103–113.
- Загускин С.Л. Ритмы клетки и здоровье человека. – Ростов: Изд. ЮФУ, 2009, 316 с.
- Vasheghani M.M., Bayat V., Dadray M. Low-level laser therapy using 80-Hz pulsed infrared diode laser accelerates third-degree burn healing in rat. // Photomedicine and Laser Surgery, 2009, **27**, No. 6, P. 959–964.
- Skulachev V.P. Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. // Molecular Aspects of Medicine, 1999, **20**, P. 139–184.
- Passarella S., Ostuni A., Atlante A., Quagl E. Increase in the ADP/ATP exchange in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-

- neon laser. // *Biochem. Biophys. Research Commun.*, 1988, **156**, No. 2, P. 978–986.
15. Bernardi P., Scorrano L., Colonna R. et al. Mitochondria and cell death: Mechanistic aspects and methodological issues. // *Eur. J. Biochem.*, 1999, **264**, P. 687–701.
  16. Пучкова Т.В., Путвинский А.В., Владимиров Ю.А. Электрический пробой липидного бислоя диффузионным потенциалом. // Доклады АН СССР, 1979, **249**, № 5, С. 1241–1244.
  17. Lehninger A.L. Mitochondria and calcium ion transport. // *Biochem. J.*, 1970, **119**, P. 129–138.
  18. Elbakidze G.M. Comuton – the effector of liver tissue stress. // *Canad. Physiol. Pharmacol.*, 1994, **72**, No. 1, P. 610–612.
  19. Рубин А.Б. Биофизика. Т. 2. – М.-Ижевск: Изд. ИКИ, 2004, 464 с.
  20. Лукьянович П.А., Кунин А.А., Зон Б.А. и соавт. Механизм действия и терапевтические эффекты модулированного светового излучения. // *Ж. теор. и практ. медицины*, 2009, **7**, № 3, С. 284–288.
  21. Гяургиев Т.А., Строева Д.Е., Вахтель В.М. и соавт. Исследование импульсной модуляции света в фототерапии. // В сб. “Медицинская физика и инновации в медицине”. Материалы конференции “ТКМФ-6”. – М: 2014, С. 396–398.
  22. Орлов А.И. Экспертные оценки, – М: МГТУ, 2002, 31 с.
  23. Устройство локального облучения неполяризованным импульсным красным светом “Светозар”, Регистрационное удостоверение №РЗН 2014/1398.
  24. Редькин А.Н., Вдовин В.В., Сыроватская Я.П. и соавт. Влияние локального облучения ложа желчного пузыря некогерентным красным светом во время лапароскопической холецистэктомии на течение ближайшего послеоперационного периода. // В сб. “Физиология и медицина”. Материалы конференции “Физиомеди 4”. – СПб: 2013, С. 240–244.
  25. Воробьев А.И. Клинико-диагностическое значение лабораторных показателей в гематологии. – М: ГНЦ РАМН, 2001, 17 с.
  26. Santos J.N., Roos C., Barboza L.L. et al. Low intensity red laser action on *Escherichia coli* cultures submitted to stress conditions. // *Laser Physics*, 2014, **24**, 125603.

#### OPTIMIZATION OF THE PULSE-WIDTH MODE IN PHOTOTHERAPY

V.M. VakhTEL<sup>1</sup>, V.V. Vdovin<sup>2</sup>, B.A. Zon<sup>1</sup>, V.M. Danilov<sup>3</sup>, A.A. Kunits<sup>3</sup>,  
P.A. Lukyanovich<sup>4</sup>, S.N. Pankova<sup>3</sup>, A.N. Redkin<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Voronezh State University, Voronezh, Russia

<sup>2</sup> “Railway Clinical Hospital at Voronezh-1 Station “RZD”, OJSC, Voronezh, Russia

<sup>3</sup> N.N. Burdenko Voronezh State Medical Academy, Voronezh, Russia

<sup>4</sup> Rosprominform, LLC, Saint Petersburg, Russia

Based on analysis of the primary mechanisms of photo stimulation, the hypothesis of ATP synthesis blockage was examined as the main reason stimulus. The role of pulse-width mode of the light was substantiated and its parameters were estimated. The results of two clinical studies are presented as the selection of optimized pulse-width mode parameters of the stimulating radiation in dental treatment and the statistical data of blood analysis obtained during the operation of cholecystectomy using pulse-width radiation with the optimized parameters. Based on statistical data of the blood analysis twofold, on average, reduction of ESR growth was detected, comparing to control group, after 2-minute irradiation gallbladder bed what was removed during surgery.

Key words: *phototherapy, photodynamic therapy, photo damage of the membrane, matrix potential, cellular defence mechanisms, ATP synthesis, tissue adaptation syndrome*

E-mail: [lukyanovich.pavel@gmail.com](mailto:lukyanovich.pavel@gmail.com)