

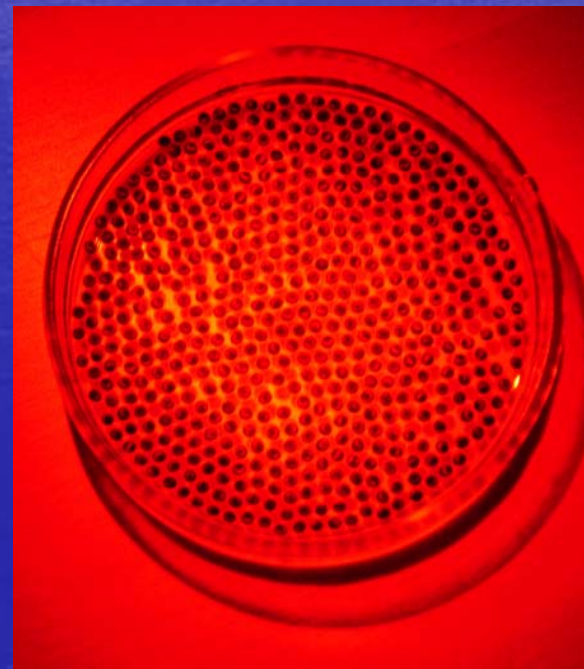


В.Ю. Плавский, Н.В. Барулин

**Нелинейные фотофизические
процессы, определяющие
биологическую активность
лазерного излучения низкой
интенсивности**

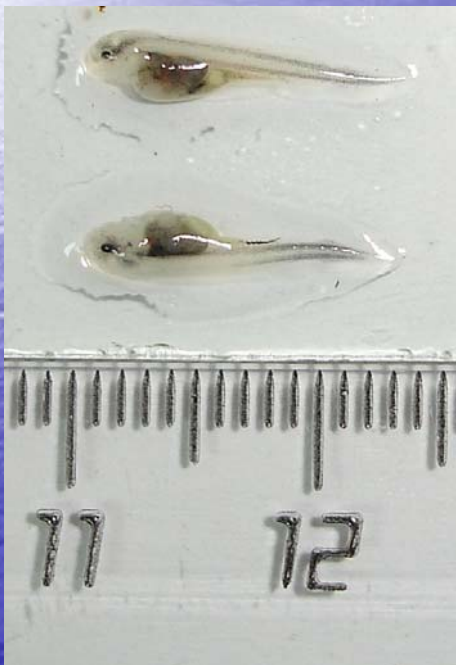
*Институт физики имени Б.И. Степанова
Национальной академии наук Беларуси,
Белорусская сельскохозяйственная академия
plavskii@dragon.bas-net.by*

Объекты воздействия: эмбрионы (оплодотворенная икра) осетровых рыб



Объекты исследования:

1-дневная личинка Личинка, перешедшая на активное питание



50-дневная молодь



Исследуемые параметры (тесты) 50–дневной молоди осетровых рыб :

- размерно–весовые показатели (масса и длина) молоди:
 $\gamma_m = (M_o/M_k) \cdot 100 \%$, и $\gamma_d = (L_o/L_k) \cdot 100 \%$, где M_k и L_k – масса и длина особей, полученных из икры, не подвергавшейся действию излучения (контрольная группа); M_o и L_o – масса и длина особей, полученных из облученной икры (опытная группа);
- устойчивость к дефициту кислорода в среде обитания:
 $\gamma_k = ([O_2]_o/[O_2]_k) \cdot 100 \%$, где $[O_2]_k$ и $[O_2]_o$ – концентрации растворенного в воде кислорода, вызывающие гибель молоди рыб, полученной из необлученных (контрольная группа) и облученных (опытная группа) эмбрионов, соответственно
- устойчивость к экстремальным температурам среды обитания (терморезистентность): $\delta = (t_o/t_k) \cdot 100 \%$, где t_k , t_o – время от начала инкубации молоди при температуре $32 \text{ }^\circ\text{C}$ до наступления летального исхода у особей контрольной и опытной групп, соответственно;
- устойчивость к наличию токсикантов в среде обитания (токсикоустойчивость): $\gamma_{\text{ток}} = ([n_{\text{жив}}] / [n]) \cdot 100 \%$, где $[n_{\text{жив}}]$ – число выживших экземпляров молоди после воздействия токсиканта (0,1 мг/л сульфата меди) в течение 7 суток; $[n]$ – число экземпляров молоди в начале воздействия токсиканта;

II. Воздействие на сперму рыб.

Параметр, характеризующий влияние излучения – время активности сперматозоидов (время поступательного движения после активации водой).

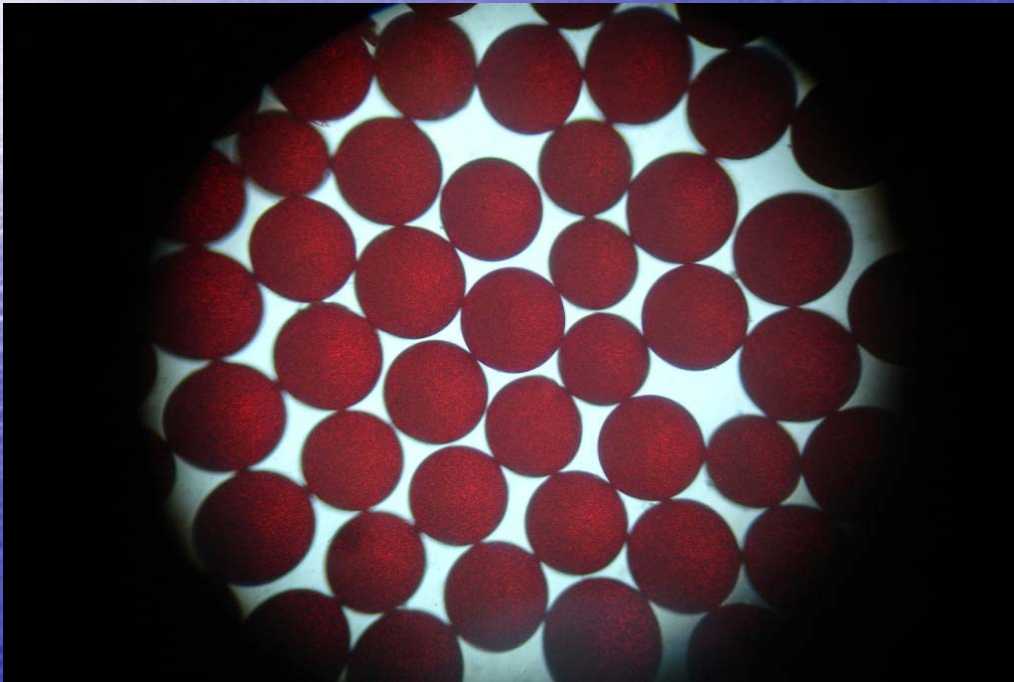


III. Воздействие на самок рыб.



IV. Воздействие на живой корм

Облучение цисты *Artemia salina*



Однодневные наупилии *Artemia salina*



Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности

Состояние вопроса: К моменту появления первых работ (В.М. Инюшин, СССР; E. Mester, Венгрия, 60-ые годы прошлого столетия), продемонстрировавших высокую биологическую активность и терапевтическое действие поляризованного лазерного излучения красной области спектра, фотобиологическая наука не располагала сведениями о способности некогерентного видимого света влиять на функциональную активность соматических неретинальных клеток человека и животных. По этой причине остро стал вопрос: являются ли наблюдаемые эффекты лазероспецифичными (то есть зависимыми от таких характеристик лазерного излучения как когерентность, монохроматичность, поляризация), или присущи любому нелазерному источнику света? Несмотря на публикацию за прошедшие 40 лет ряда работ, направленных на выяснение возможной роли указанных характеристик оптического излучения в механизме его биологического и терапевтического действия, рассматриваемая проблематика продолжает оставаться остро дискуссионной, а данные и выводы разных авторов – противоречивыми, а, иногда, – и взаимоисключающими. Пропагандировалось мнение об отсутствии каких-либо фотофизических оснований предполагать возможную роль когерентности и поляризации во взаимодействии оптического излучения низкой интенсивности с биологическими системами

Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности

По данным В.М. Инюшина (Лазерный свет и живой организм. Казахстан, 1970) при тотальном облучении белых крыс ($P = 2 \text{ мВт/см}^2$) резко увеличивается в крови количество молодых форм эритроцитов при использовании как поляризованного лазерного излучения, так и поляризованного широкополосного красного света. Однако лазерное излучение вызывало «более крутой подъем эритропоэтической продукции»

По данным E. Mester (Arch. Dermatol. Res. 1978 Vol. 263 №3 P. 241-245) некогерентное линейно-поляризованное излучение теплового источника с длиной волны $\lambda = 630 \text{ нм}$ оказывает почти такое же (80 %) иммуносупрессивное действие на лимфоциты, как и поляризованное излучение гелий-неонового лазера. Неполаризованное излучение того же теплового источника не обладало биологической активностью.

По данным В.А.Мостовникова, Г.Р. Мостовниковой, В.Ю. Плавского, Л.Г. Плавской (Proc. SPIE. Laser Applications in Life Sciences. 1994 Vol. 2370. P. 541-548; Proc. SPIE. Laser-Tissue Interaction 1995. Vol. 2391. P. 561-573) изменение митотической активности клеток в культуре вызывает лишь линейно поляризованное излучение; неполяризованное излучение в том же диапазоне доз не оказывает биологического действия

Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности

По данным венгерских авторов (Т.Кубасова. Photochem. Photobiol. 1988 Vol. 48 № 4 P. 505-509; Т.Кубасова. Immunol. Cell Biol. 1995 Vol. 73 № 3, P. 239-244; М.Фенё Cell Biol. Intern. 2002 Vol. 26 № 3; P. 265-269) изменение функциональной активности клеток крови и клеток в культуре (фибробластов) в условиях *in vitro* вызывает лишь линейно-поляризованный свет ($\lambda = 400-2000$ нм, $P = 40-150$ мВт/см²); неполяризованный свет не вызывает фотобиологического действия. В условиях *in vivo* эффекты наблюдались в обоих случаях, однако в случае использования поляризованного света действие было более пролонгированным

По данным К.А. Самойловой (Photochem. Photobiol. Sci. 2004 Vol. 3 №1 P. 96-101) при облучении лампой «Биоптрон» (полихроматический свет, $\lambda = 400-3400$ нм) небольшого участка тела добровольцев наблюдается выраженное иммуномодулирующее действие как в случае использования поляризованного ($P = 40$ мВт/см²), так и неполяризованного ($P = 38$ мВт/см²) света. Однако при сопоставимых воздействующих дозах ($E \sim 12$ Дж/см²) имеются определенные качественные и количественные различия в действии указанных источников света.

По данным Т.Й. Кару (Биофизика 1985, Т. 30 № 2 С. 366-371, Лазерная медицина, 2008, Т. 12, № 1 С. 4-8) влияние оптического излучения на синтез ДНК и адгезивные свойства клеток в культуре не зависит от его поляризации

Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности

По данным Ю.Д. Березина, Р.А. Прочуханова. ДАН СССР 1983 Т. 273 № 3 С. 734-736), если лазерное облучение ($\lambda = 632,8$ нм) синхронизирует метаболические процессы в переживающих тканях сердца человека, то полихроматическое ($\lambda = 630$ нм, $\Delta\lambda = 150$ нм) – инициирует их разнонаправленную динамику.

По данным В.А.Мостовникова, Г.Р. Мостовниковой, В.Ю. Плавского, Л.Г. Плавской и др. Матер. междунар. конф. «Лазерная физика и применения лазеров» Минск, 2003, С. 287-288), фотобиологические эффекты, оцениваемые по изменению скорости клеточной пролиферации в условиях *in vitro*, практически не отличаются при использовании поляризованного излучения светодиодного и лазерного источников близких длин волн

По данным Г.И. Клебанова и Ю.А. Владимирова (Биофизика, 2005 Т. 50 № 6 С. 1137-1144; 2006 Т. 51 №1 С. 116-122; 2006 Т. 51 № 2 С. 332-339), изучавших влияние на показатели раневого процесса излучения лазерного ($\lambda = 632,8$ нм) и светодиодного ($\lambda = 630$ нм) источников, когерентность не имеет значения в реализации терапевтического действия

По данным А.В. Будаговского (Квант. электроника, 2005 Т. 35 № 4, С. 369-374), существенное повышение функциональной активности регистрируется только у тех клеток, которые полностью помещаются в объеме когерентности поля. Причем указанное условие выполняется для многих типов клеток при условии, что $\Delta\lambda = 10-15$ нм

По данным Т. Qadri. (Lasers Med. Sci. 2007 Vol. 22 №4 P. 245-251), из двух типов лазеров (гелий-неоновый, $\lambda = 632,8$ и полупроводниковый, $\lambda = 650$ нм) наиболее выраженным терапевтическим эффектом обладает излучение, характеризующееся большей длиной когерентности (HeNe).

Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности

Воздействующие физические факторы:

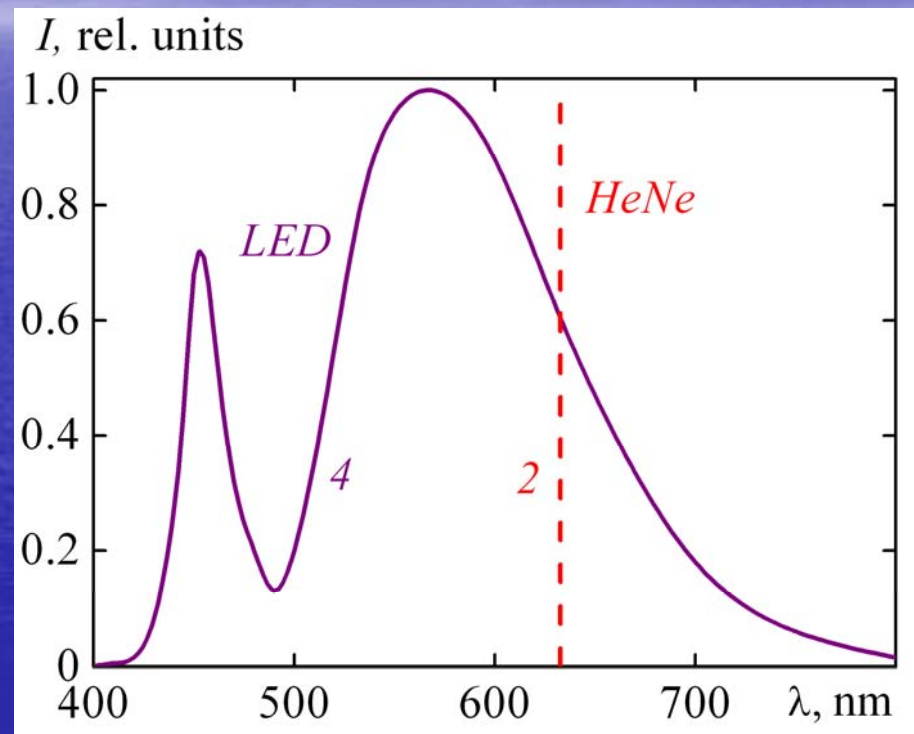
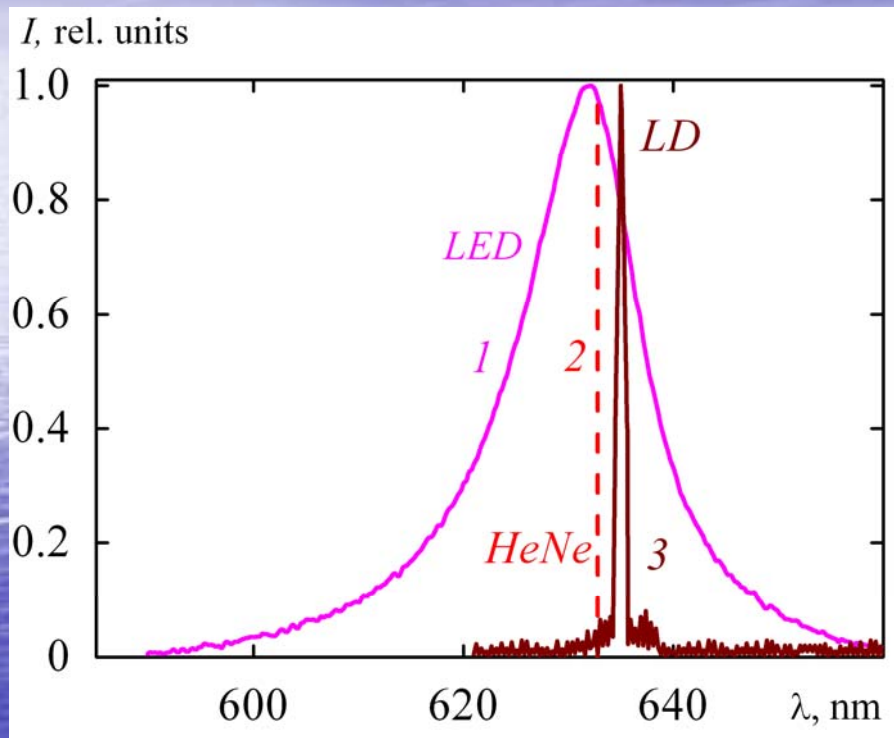
- гелий-неоновый лазер ($\lambda = 632,8$ нм; $\Delta\lambda = 0,02$ нм) непрерывного режима работы;
- полупроводниковый лазер ($\lambda = 635$ нм; $\Delta\lambda = 2$ нм) непрерывного режима работы;
- полупроводниковый лазер ($\lambda = 670$ нм; $\Delta\lambda = 2$ нм) непрерывного режима работы;
- полупроводниковый лазер ($\lambda = 808$ нм, $\Delta\lambda = 2,5$ нм) непрерывного, модулированного и импульсного (наносекундного) режимов работы;
- сверхъяркий светодиод ($\lambda = 630$ нм, $\Delta\lambda = 15$ нм);
- сверхъяркий светодиод ($\lambda = 420-800$ нм, $\lambda_{\max} = 453$ и 567 нм; $\Delta\lambda = 130$ нм);
- постоянное магнитное поле ($B = 40-50$ мТл)

Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности

Исследуемые параметры (тесты) 50-дневной молоди осетровых рыб :

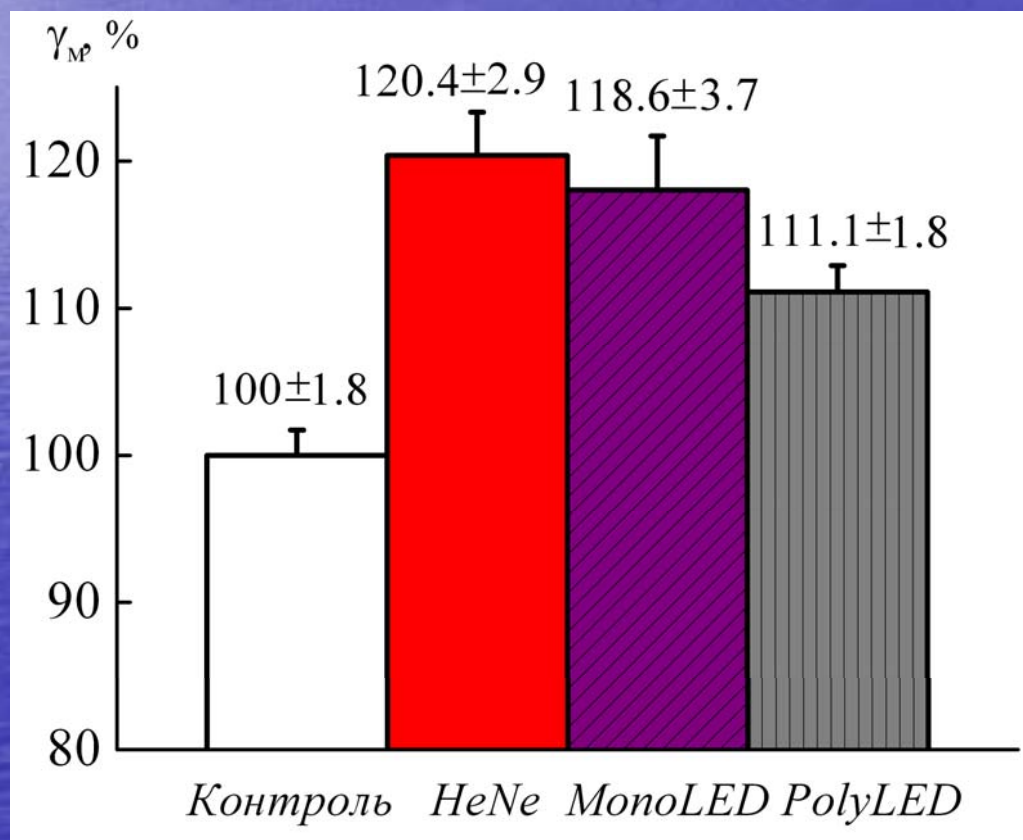
- размерно-весовые показатели (масса и длина) молоди:
 $\gamma_m = (M_o/M_k) \cdot 100 \%$, и $\gamma_d = (L_o/L_k) \cdot 100 \%$, где M_k и L_k – масса и длина особей, полученных из икры, не подвергавшейся действию излучения (контрольная группа); M_o и L_o – масса и длина особей, полученных из облученной икры (опытная группа);
- устойчивость к дефициту кислорода в среде обитания:
 $\gamma_k = ([O_2]_o/[O_2]_k) \cdot 100 \%$, где $[O_2]_k$ и $[O_2]_o$ – концентрации растворенного в воде кислорода, вызывающие гибель молоди рыб, полученной из необлученных (контрольная группа) и облученных (опытная группа) эмбрионов, соответственно
- устойчивость к экстремальным температурам среды обитания (терморезистентность): $\delta = (t_o/t_k) \cdot 100 \%$, где t_k , t_o – время от начала инкубации молоди при температуре 32 °С до наступления летального исхода у особей контрольной и опытной групп, соответственно;
- устойчивость к наличию токсикантов в среде обитания (токсикоустойчивость): $\gamma_{\text{ток}} = ([n_{\text{жив}}] / [n]) \cdot 100 \%$, где $[n_{\text{жив}}]$ – число выживших экземпляров молоди после воздействия токсиканта (0,1 мг/л сульфата меди) в течение 7 суток; $[n]$ – число экземпляров молоди в начале воздействия токсиканта;

Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности



Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности

Зависимость стимулирующего действия поляризованного оптического излучения ($P = 2,9 \text{ мВт/см}^2$, $t = 60 \text{ с}$) на массу 50-дневной молоди рыб (в % к контролю) от типа источника, использующегося для облучения эмбрионов

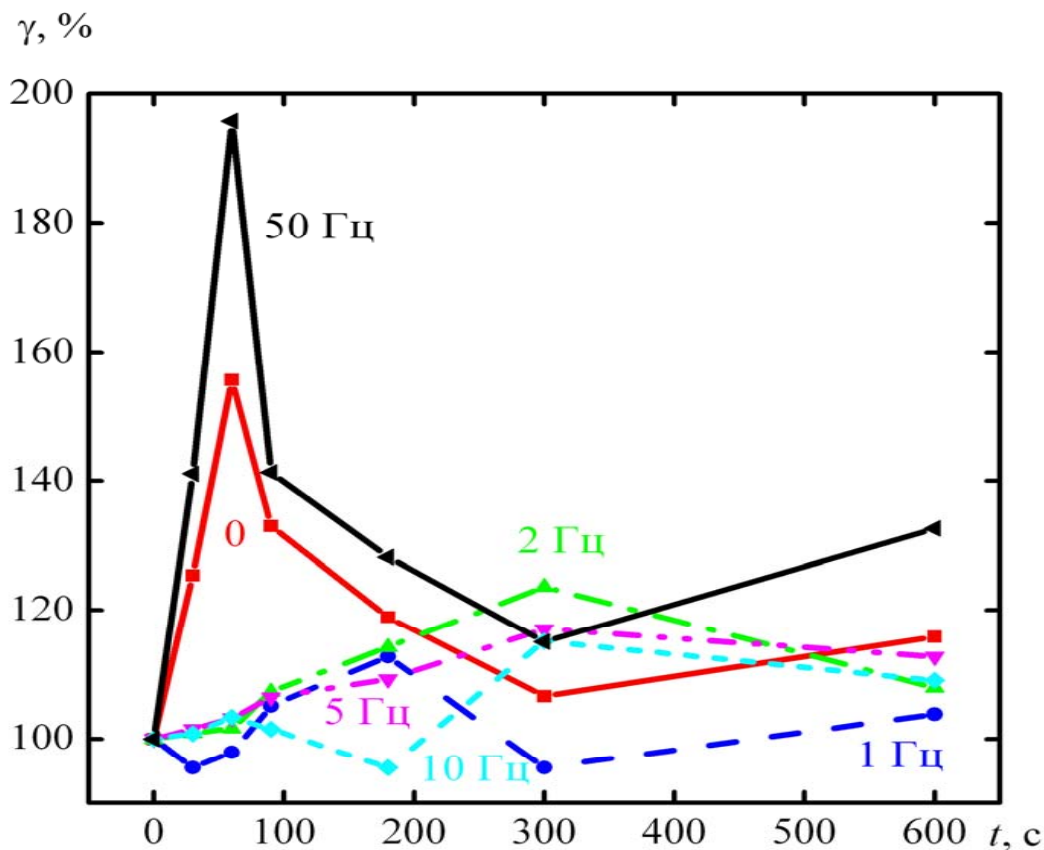


Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности

Таблица 1 – ВЛИЯНИЕ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ($\lambda = 808$ нм, $P = 2,9$ мВт/см²) НА УСТОЙЧИВОСТЬ МОЛОДИ РЫБ К ДЕФИЦИТУ КИСЛОРОДА

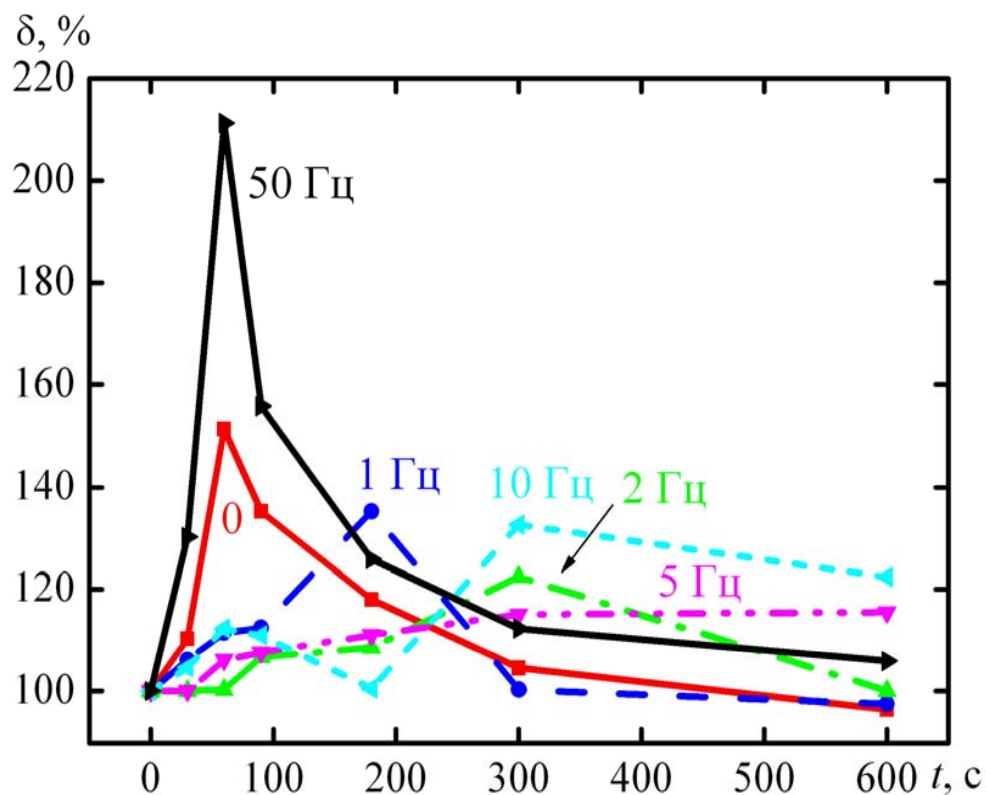
Режим воздействия, частота модуляции, F	Плотность мощности излучения P, мВт/см ²	Время облучения, с	Пороговая концентрация кислорода, мг/л	Величина фотобиологического эффекта γ , %	Достоверность отличий от контроля
Контроль	0	0	2,13±0,02	100	-
непрерывный	2,9	30	1,64±0,02	77,0±1,8	P< 0,001
непрерывный	2,9	60	1,40±0,01	65,7±0,5	P< 0,001
непрерывный	0,58	300	1,58±0,03	74,2±2,2	P< 0,001
непрерывный	2,9	90	1,68±0,03	78,9±1,7	P< 0,001
непрерывный	2,9	180	1,77±0,02	83,1±1,2	P< 0,001
F = 1 Гц	2,9	180	1,80±0,02	84,5±0,9	P< 0,001
F = 2 Гц	2,9	300	1,72±0,04	80,8±1,6	P< 0,001
F = 5 Гц	2,9	300	1,63±0,04	76,5±1,4	P< 0,001
F = 10 Гц	2,9	60	1,78±0,02	83,6±1,1	P< 0,001

Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности



Зависимость массы рыб (в процентах к контролю) от времени воздействия на эмбрионы непрерывного и модулированного излучения $\lambda = 808$ нм, $P = 2,9$ мВт/см²

Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности



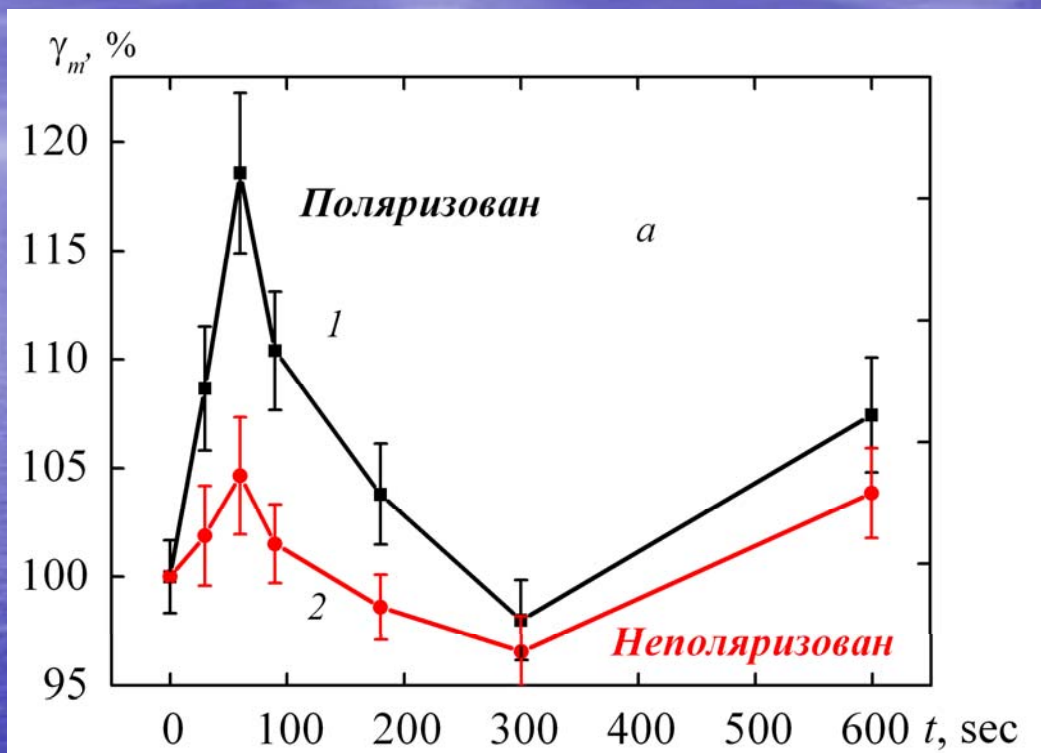
Зависимость термоустойчивости рыб (в процентах к контролю) от времени воздействия на эмбрионы непрерывного и модулированного излучения $\lambda = 808 \text{ нм}$, $P = 2,9 \text{ мВт/см}^2$

Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности

Факторы, определяющие зависимость стимулирующего действия от частоты модуляции при постоянной средней мощности излучения

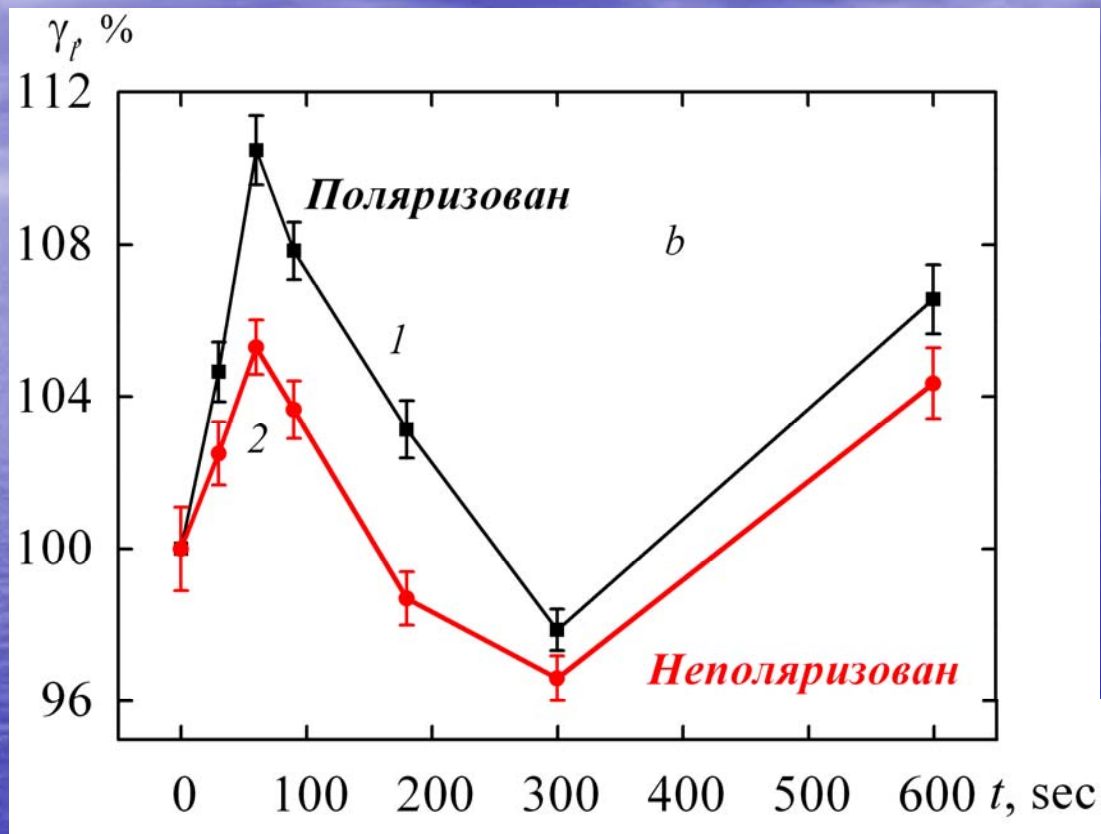
Критическим параметром, определяющим зависимость фотобиологического эффекта от частоты модуляции, является длительность темнового периода (паузы) между импульсами. При низкой частоте следования импульсов ($F = 1-2$ Гц), структурные перестройки, индуцируемые в клетках эмбриона предшествующим импульсом, к моменту воздействия следующего импульса релаксируют в состояние, близкое к исходному. В этом случае величина фотобиологического эффекта незначительна и практически не зависит от длительности паузы. По мере сокращения временного интервала между импульсами, структурные перестройки, индуцируемые предшествующим импульсом, не успевая релаксировать в исходное состояние, усиливаются воздействием следующего светового импульса, что находит свое выражение в более высоком фотобиологическом эффекте

Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности



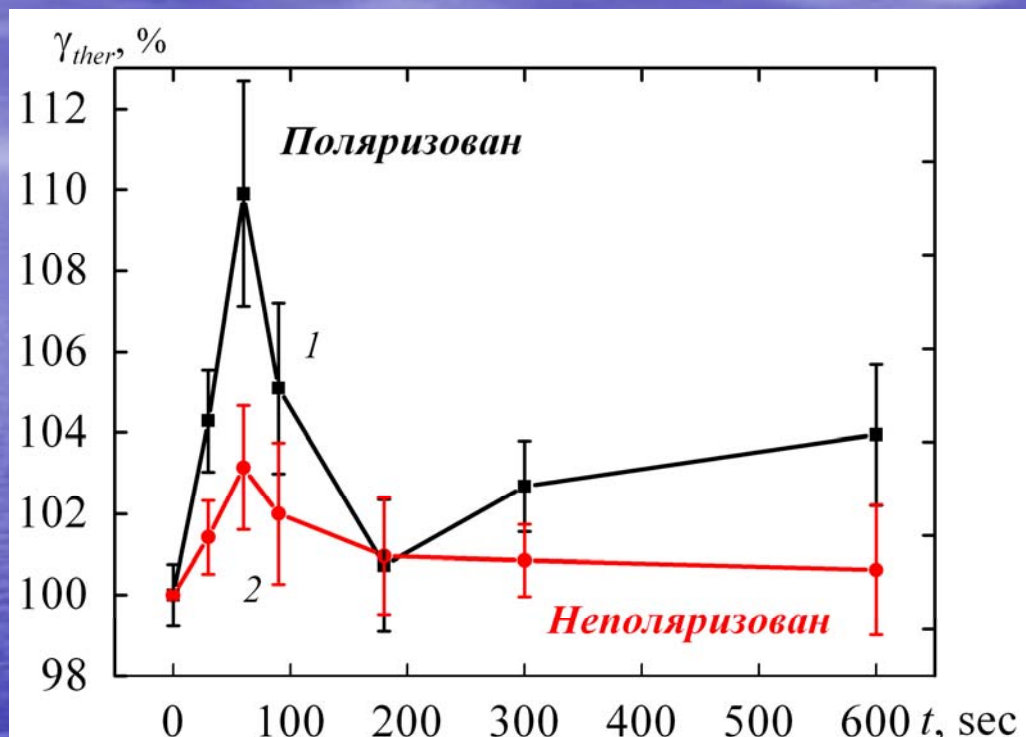
Зависимость массы рыб (в процентах к контролю) от времени воздействия на эмбрионы поляризованного и неполяризованного излучения красного светодиода

Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности



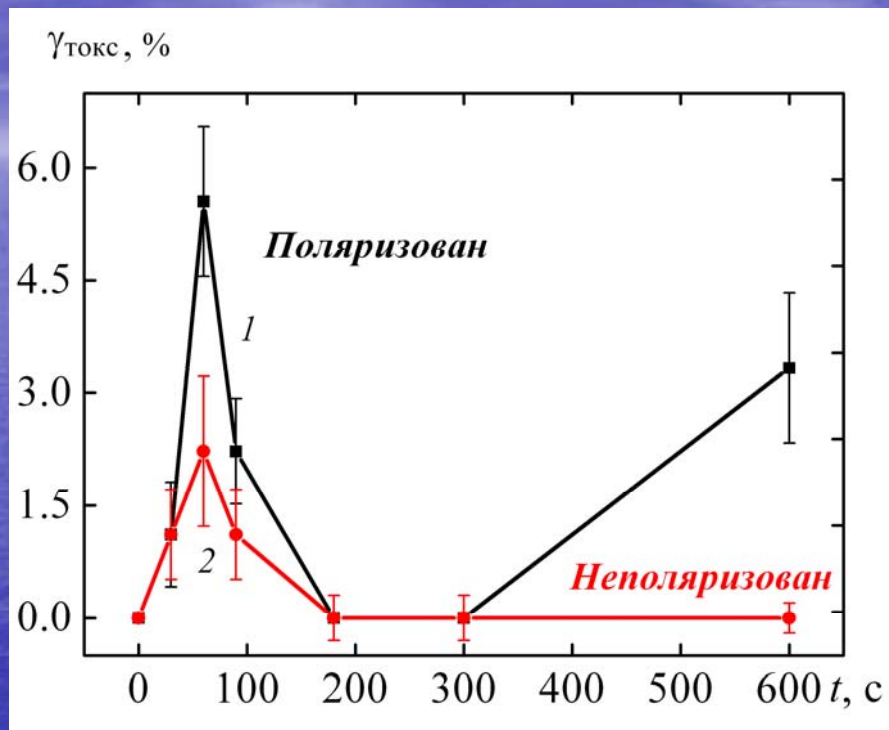
Зависимость длины рыб (в процентах к контролю) от времени воздействия на эмбрионы поляризованного и неполяризованного излучения красного светодиода

Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности



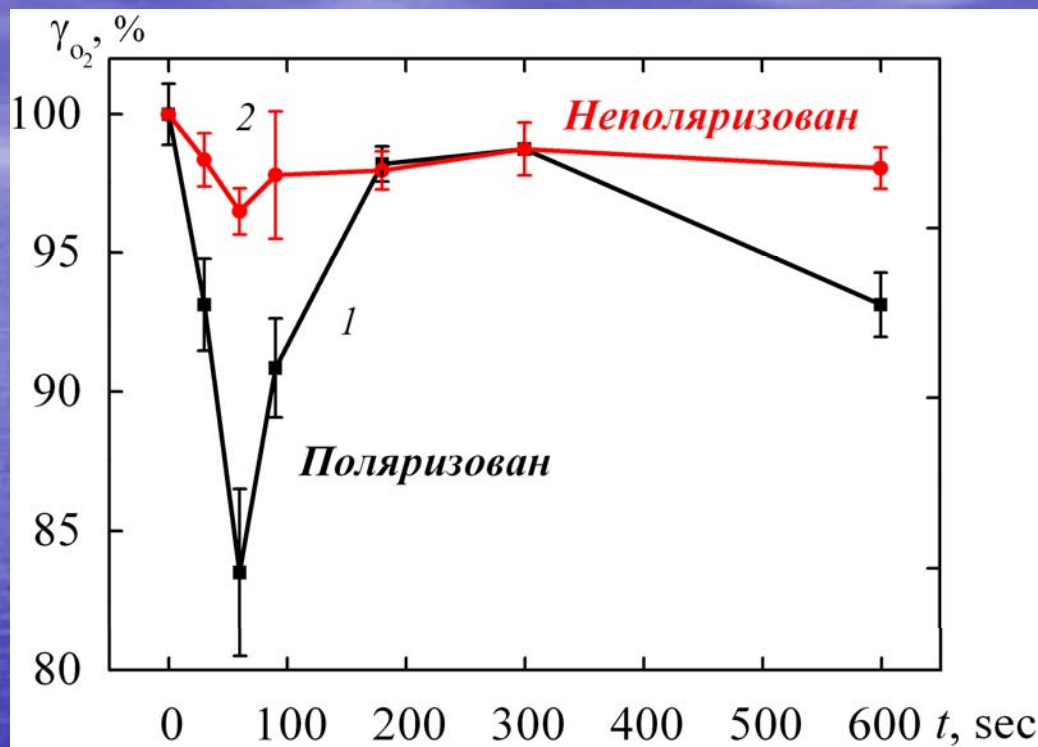
Зависимость терморезистентности рыб (в процентах к контролю) от времени воздействия на эмбрионы поляризованного и неполяризованного излучения красного светодиода

Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности



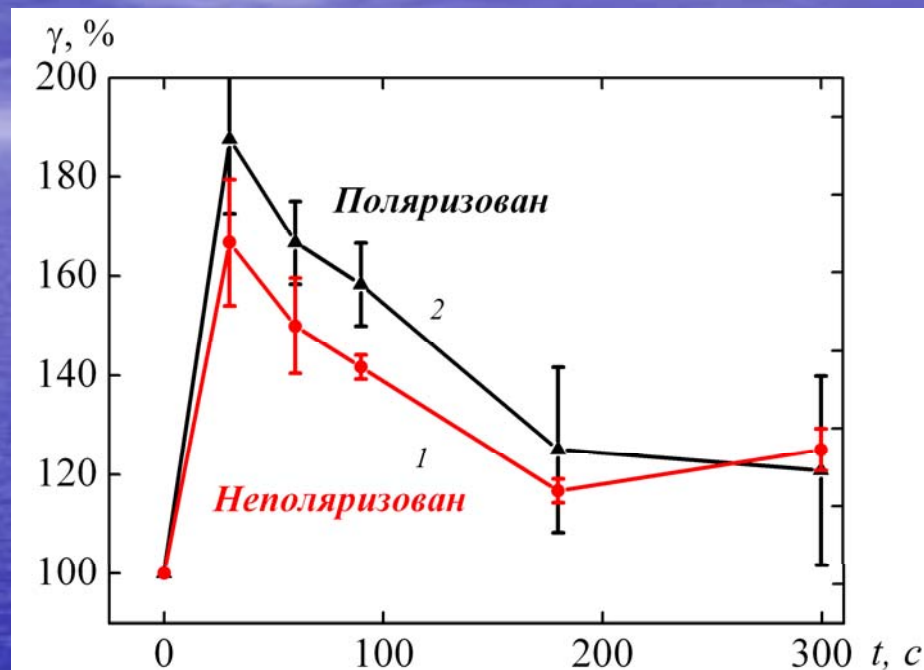
Зависимость токсикостойчивости рыб (в процентах к контролю) от времени воздействия на эмбрионы поляризованного и неполяризованного излучения красного светодиода

Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности



Зависимость устойчивости рыб к дефициту кислорода (в процентах к контролю) от времени воздействия на эмбрионы поляризованного и неполяризованного излучения красного светодиода

Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности



Зависимость стимулирующего действия оптического излучения на сперму рыб от времени воздействия поляризованного и неполяризованного излучения белого светодиода

Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности

Фотофизические механизмы, определяющие зависимость фотобиологического эффекта от поляризации излучения:

А) резонансные процессы

- **Оптотермический эффект.** Поляризация света может играть существенную роль в уровне повышения температуры в окрестности молекулы хромофора, поглотившей фотон. **Наиболее высокий оптотермический эффект достигается для хромофоров стационарной ориентации при облучении линейно-поляризованным светом.** Для хромофоров со стохастической ориентацией между актами поглощения света величина оптотермического эффекта не зависит от поляризации и в 3 раза ниже, чем в случае стационарной ориентации. В анизотропных средах наибольший прирост температуры ожидается для хромофоров с дипольным моментом абсорбционного перехода, параллельным вектору поляризации линейно-поляризованного света. Различие в величине оптотермического эффекта для поляризованного и неполяризованного излучения и может быть причиной различного биологического отклика клеток на указанные виды воздействий.
- **В.А. Толкачев. Роль поляризации света в оптотермическом эффекте. ЖПС 2004 Т. 71, №1 С. 125-127**

Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности

Фотофизические механизмы, определяющие зависимость фотобиологического эффекта от поляризации излучения:

Б) нерезонансные процессы

- Влияние градиентных сил на биологические органеллы, клетки и другие образования микронных размеров вследствие формирования лазерным излучением **спекл-структуры** за счет интерференции падающего луча с отраженными и рассеянными (на неоднородностях ткани) лучами. В результате нерезонансного дипольного взаимодействия электрической компоненты света со светоиндуцированным дипольным моментом биологических микрочастиц возникают градиентные силы, способные оказывать биологическое действие. Градиентные силы действуют и при облучении ткани неполяризованным когерентным излучением, однако в этом случае **контраст в спекл-структурах значительно ниже, чем для поляризованного излучения.**

А.Н. Рубинов, А.А. Афанасьев. Нерезонансные механизмы биологического действия когерентного и некогерентного света. Опт. и спектр. 2005 Т. 98 №6 С.1027-1032

Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности

Фотофизические механизмы, определяющие зависимость фотобиологического эффекта от поляризации излучения:

Б) нерезонансные процессы

- Диполь–дипольное взаимодействие (биологических частиц), индуцированное световой волной.

Указанный нерезонансный механизм реализуется при воздействии на биологический объект как когерентного, так и некогерентного излучения. Однако, данный механизм может быть реализован только при использовании линейно– или эллиптически–поляризованного излучения; неполяризованный или циркулярно-поляризованный свет не вызывает диполь–дипольного взаимодействия, и биологически неактивен.

П.А. Головинский. Конформационные переходы в макромолекулах, индуцированные полем лазерного излучения. ЖТФ, 1994, Т. 64, № 9, С. 186-188

А.Н. Рубинов, А.А. Афанасьев. Нерезонансные механизмы биологического действия когерентного и некогерентного света. Опт. и спектр. 2005 Т. 98 №6 С.1027-1032

Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности

Фотофизические механизмы, определяющие зависимость фотобиологического эффекта от поляризации излучения:

Б) нерезонансные процессы

- Ориентационное действие излучения, заключающееся в изменении пространственной структуры компонентов клетки с жидкокристаллическим характером упорядочения, ответственных за регуляцию метаболических процессов (макромолекул ферментов, мембран). Фотофизический механизм этих изменений заключается в переориентации отдельных высокоупорядоченных анизотропных участков (доменов) указанных компонентов в результате взаимодействия электрического поля световой волны с индуцированным (этой волной) интегральным электрическим диполем домена. Указанный механизм представляет собой оптический эффект Керра и должен наблюдаться для молекул, характеризующихся анизотропией поляризуемости.
- Mostovnikov V.A., Mostovnikova G.R., Plavski V.Y., Plavskaja L.G. Primary photophysical processes which define the biological and therapeutic effect of low-intensity laser radiation. Proc. SPIE. Laser Applications in Life Sciences/ 1994. Vol. 2370 P. 541-548

Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности

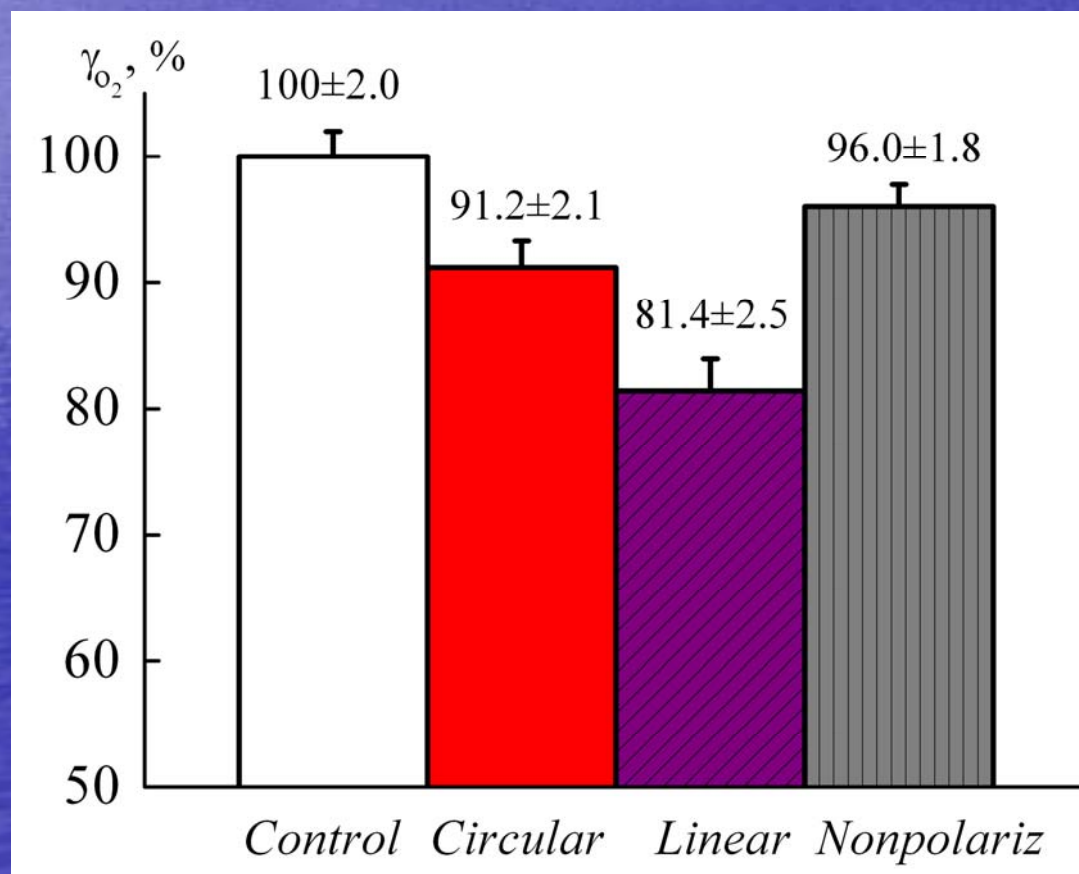
Фотофизические механизмы, определяющие зависимость фотобиологического эффекта от поляризации излучения:

Б) нерезонансные и резонансные процессы

- **Ориентационное действие излучения** хорошо изучено на примере классических жидких кристаллов (ЖК) нематического типа (светоиндуцированный аналог эффекта Фредерикса) и индуцируется как **линейно-поляризованным излучением**, так и излучением, **поляризованным по эллипсу или кругу**, хотя в последнем случае наведенные изменения восприимчивости среды ниже по сравнению с соответствующим значением для линейно-поляризованного излучения. Причем, указанный эффект может проявляться как в условиях **отсутствия резонансного поглощения** (оптический эффект Керра или применительно к ЖК – светоиндуцированный аналог эффекта Фредерикса), так и для **слабо поглощающих ЖК** (эффект Jánosy). Причем в случае слабо примесного или собственного поглощения ориентационная нелинейность увеличивается на 2 порядка, и средняя мощность излучения, необходимая для эффективной переориентации, не превышает 1 мВт, что делает наиболее вероятным последний из названных механизмов.
- Janossy I. Molecular interpretation of the absorption-induced optical reorientation of nematic liquid crystals// Phys. Rev. E.–1994.–Vol. 49.–№4.– P. 2957-2963

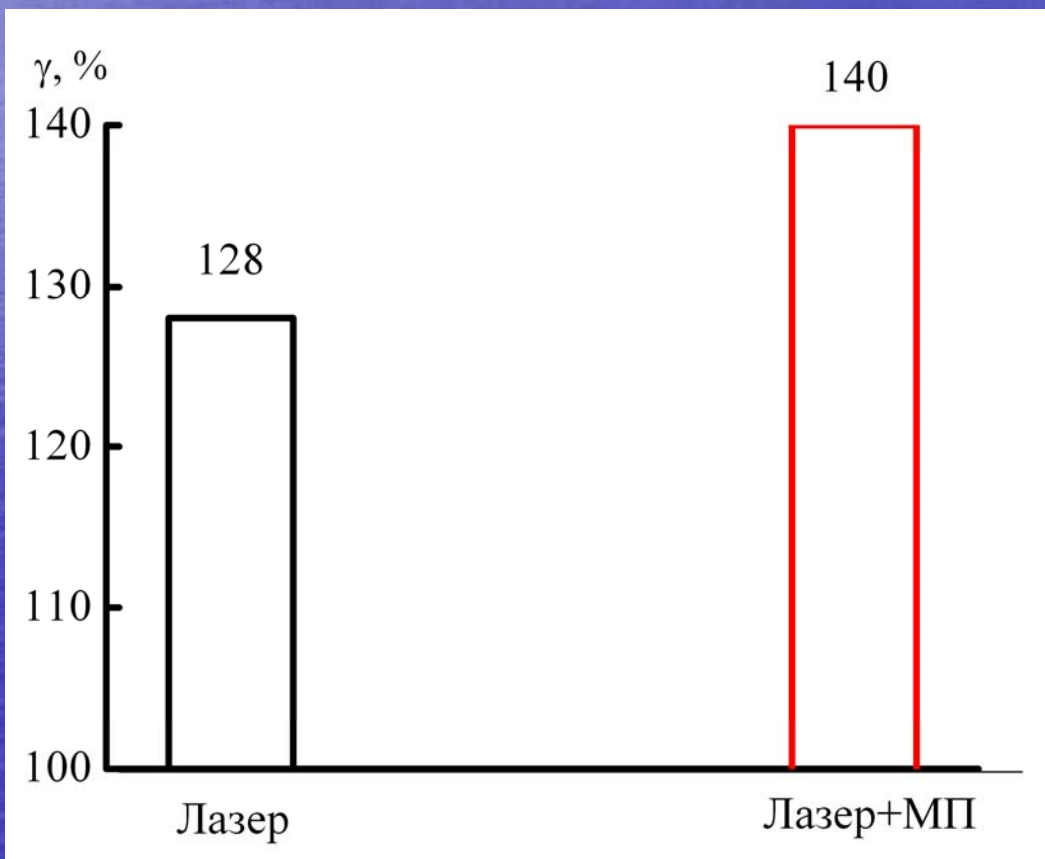
Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности

Влияние оптического излучения ($P = 2,9 \text{ мВт/см}^2$, $t = 60 \text{ с}$) на устойчивость 50-дневной молоди рыб к дефициту кислорода (в % к контролю) от типа поляризация излучения, используемого для облучения эмбрионов



Зависимость биологического действия излучения от поляризации и когерентности

Масса 50-дневной молоди рыб (в % к контролю), полученной из эмбрионов, подвергнутых действию линейно-поляризованного излучения ($P = 2,9 \text{ мВт/см}^2$, $t = 60 \text{ с}$), а также его совместному действию с постоянным магнитным полем ($B = 40 \text{ мТл}$)



Фотофизические механизмы, определяющие биологическую активность лазерного излучения

1. Эффект действия оптического излучения на эмбрионы рыб зависит от типа его поляризации; максимальное стимулирующее действие наблюдается для линейно-поляризованного света.

2. Наличие эффекта при использовании циркулярно-поляризованного излучения свидетельствует, что механизм биологической активности указанного физического фактора не обусловлен диполь-дипольными взаимодействиями;

3. Близость фотобиологических эффектов для монохроматического и квазимонохроматического излучения исключает определяющую роль градиентных сил в регистрируемом изменении размерно-весовых характеристик и показателей жизнестойкости молоди рыб ;

4. Влияние постоянного магнитного поля на эффекты, индуцированные линейно-поляризованным светом, позволяет исключить определяющее значение термооптического механизма;

5. Совокупность вышеприведенных данных, а также

- наличие выраженных точек экстремумов в дозовых кривых;
- зависимость эффекта от амплитудного значения интенсивности излучения (при использовании импульсного излучения наносекундной длительности средняя плотность мощности ниже, по крайней мере на порядок, по сравнению с соответствующим значением для непрерывного излучения);

Фотофизические механизмы, определяющие биологическую активность лазерного излучения

нарушение правила Бунзена-Роско о взаимозаменяемости времени и плотности мощности,

позволяют заключить, что в основе фотофизического механизма, определяющего биологическое действие оптического излучения, лежит ориентационный эффект (нефотохимической природы).

б. Механизмы светоиндуцированной переориентации биологических сред с жидкокристаллическим характером упорядочения (прежде всего, доменов мембран) могут реализовываться как в условиях отсутствия резонансного поглощения (оптический эффект Керра или применительно к ЖК – светоиндуцированный аналог эффекта Фредерикса), так и для слабо поглощающих ЖК (эффект Jánossy). Поскольку в случае слабого примесного или собственного поглощения ориентационная нелинейность увеличивается на 2 порядка, и средняя мощность излучения, необходимая для эффективной переориентации, не превышает 1 мВт, делают наиболее вероятным последний из названных механизмов.

- СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!