РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

Физический институт имени П.Н.Лебедева

ФИАН

ПРЕПРИНТ

1

С.Д. ЗАХАРОВ, А.В. ИВАНОВ

СВЕТОКИСЛОРОДНЫЙ ЭФФЕКТ – ФИЗИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ АКТИВАЦИИ БИОСИСТЕМ КВАЗИМОНОХРОМАТИЧЕСКИМ ИЗЛУЧЕНИЕМ

МОСКВА 2006

Аннотация

Для выяснения объективной значимости терапевтических применений лазеров малой мощности выполнены экспериментальные исследования первичных механизмов рецепции видимого и ближнего инфракрасного излучения *in vitro* и *in vivo*. Спектр действия для красных клеток крови получен в пределах желтой, красной и двух инфракрасных абсорбционных полос кислорода с максимумами соответственно 587, 639, 762 и 1264 нм. Для первых двух полос спектр действия измерен при лечении кардиологических больных в условиях клиники. Зарегистрированные спектры действия идентичны спектру поглощения свободного кислорода, т.е. фоторецептором является молекулярный кислород, растворенный в водной фазе внеклеточной среды. При непрерывном облучении суспензии эритроцитов за активацией клеток следуют нарушения в системе трансмембранного электронного транспорта, затем повышение проницаемости мембраны для ионов, заканчивающееся осмотическим набуханием и гемолизом. Полученные результаты могут быть применены к разработке методов использования света как лекарственного средства.

Resume

Experimental investigations of primary mechanisms of a visible and near IR light reception were carried out with the object of elucidating truth of a low-level laser therapeutic action. Action spectra were recorded at red blood cells *in vitro* within yellow, red and two infrared oxygen absorption bands with maximums of 587, 639, 762 and 1264 nm correspondently, from which for two first ones the action spectrum was measured at the treatment of cardiologic patients in clinical conditions. It was found that the action spectra are identified to the absorption spectrum of the free oxygen and a photoreceptor is the molecular oxygen dissolved in a water phase of intercellular medium. During continuous irradiation of an erythrocyte suspension the cell activation is followed by disturbances in a transmembrane electron-transport system, then by a rise of an ion membrane-permeability and is ended by an osmotic swelling with resulting hemolysis. Results obtained can be used for the development of light therapy techniques.

Содержание

Введение 4

1. Состояние предшествующих исследований 5

2. Спектр действия 8

3. Материалы и методы 11

3.1. Источники облучения 11

3.2. Приготовление образцов 12

3.3. Экспериментальные методы 12

3.4. Методика клинической верификации. 18

4. Экспериментальные результаты 19

4.1. Апробация эридифрактометра 19

4.2. Изменение деформируемости эритроцитов, облучаемых гелий-неоновым лазером 20

4.3. Спектры действия 22

4.4. Сопряженность изменений в клетках и внеклеточной водной среде 26

4.5. Термоактивация эритроцитов 29

4.6. Клиническая верификация 30

5. Обсуждение результатов 33

5.1. Фазы светокислородного эффекта 33

5.2. Независимые подтверждения 36

5.3. Механизм активации на организменном уровне 37

Заключение 39

Литература 44

Введение

В последние десятилетия опубликовано много работ, посвященных различным аспектам биологического действия неионизирующего электромагнитного излучения в различных диапазонах – от инфранизких частот до видимого света, а также переменных и постоянных магнитных полей. Среди них имеются обстоятельные и глубокие исследования, содержащих важные факты. Для их обобщения недостает единственного звена – знания рецепторов излучения, т.е. молекул, которые, поглощая кванты поля, обеспечивают старт биологического отклика. Без выявления рецептора суждения о последующих молекулярных событиях остаются чисто гипотетическими.

Предметом настоящего обзора являются первичные механизмы биологического действия красного света, а также ряда других участков оптического диапазона. Терапевтические эффекты световых источников естественного (Солнце, Луна) и искусственного происхождения известны давно [1]. Еще в 1903 году Нобелевской премией были отмечены работы датского врача Нильса Финзена, посвященные медицинским применениям красного света и ультрафиолета, в частности, для лечения оспы и волчанки [2]. Затем о красных лучах на долгое время забыли. Очередной всплеск интереса к светолечению пришелся на тридцатые годы, однако и он продлился недолго.

Настоящий подъем, привлекший большую группу исследователей, наступил после создания лазеров, оказавшихся удобными источниками монохроматического излучения. На этой основе получил широкое распространение метод лечения различных заболеваний гелий-неоновым лазером (красный свет 632,8 нм), а затем и другими лазерами (“низкоинтенсивная лазерная терапия”) (см., напр., [3-7]).

Количество публикаций по лазерно-терапевтической тематике во всем мире давно перевалило за 10 тысяч. Первое официальное разрешение на применение лазера в клинической практике (He-Ne лазер) было получено в 1974 году И.М. Корочкиным и сотрудниками, удостоенными впоследствии (1984 г.) Государственной премии СССР за

разработку лазерного метода лечения ишемической болезни сердца [8]. Сейчас метод применяют в кардиологии, пульмонологии, гастроэнтерологии и других областях медицины и, к сожалению, уже не всегда безупречно [9-12]. В отсутствии специализированной контрольно-диагностической аппаратуры врачи нередко допускают субъективизм при определении безопасных пределов облучения, переоценивают эффективность собственных методик. Плохую услугу оказало своим подчиненным Министерство здравоохранения России, включив метод в группу физиотерапевтических приемов и фактически уклонившись от обязанности организовать его систематическое научное исследование. В результате лазерная терапия практикуется почти исключительно на коммерческих началах на базе частных кабинетов поликлиник и ведомственных медицинских учреждений.

Чрезвычайно полезным свойством лазерного метода, отличающим его от медикаментозной терапии, является отсутствие эффекта привыкания у пациентов. Еще более важное качество, не получавшее до последнего времени разумного объяснения – высокая эффективность по отношению к широкому спектру заболеваний, лечение которых, в противном случае, потребовало бы приема различных наборов лекарственных препаратов. В медицинских кругах эту уникальную особенность принято называть “неспецифичностью” терапевтического действия лазера.

Задачами проведенных исследований были: определение молекулы-фоторецептора биологически активного красного света *in vitro*, проверка активирующего действия фоторецептора на организменном уровне и выяснение направлений дальнейшего изучения молекулярно-квантовых механизмов активации.

1. Состояние предшествующих исследований

В сорокалетнем опыте лазерной терапии аккумулировано такое большое количество данных, что в них трудно разобраться, тем более, привести в какую-то стройную систему, поскольку врачи используют различные длины волн, режимы, условия

облучения, по-разному контролируют реакцию организма и оценивают эффективность лечения. Однако было бы неверно и вовсе отрицать накопленный опыт. Целесообразно опираться на самые общие и твердо установленные факты и, используя их как путеводную нить, максимально сузить круг молекул, претендующих на роль первичного акцептора фотонов.

Один из таких надежных фактов – отсутствие избирательности или специфичности по отношению к виду заболевания, упомянут во Введении. Следовательно, рецептором фотонов, скорее всего, является одна и та же молекула, притом чрезвычайно распространенная в организме. Столь же важно учесть, что при наиболее корректном способе воздействия посредством ввода излучения в вену через световод [8], оптимальная световая доза одна и та же, независимо от возраста, веса, объема циркулирующей крови и других индивидуальных особенностей пациента. Это свидетельствует о беспрецедентной универсальности первичных процессов скорее физической, нежели химической природы. Согласно простой оценке, в течение лазерной процедуры облучается малая часть крови (порядка 1% по объему для He-Ne лазера), тогда как физиологическая реакция пациента (потоотделение, изменение пульса) зачастую проявляется сразу, в ходе облучения, лечебный же эффект сохраняется в течение полугода. Значит, разыскиваемая молекула присутствует в объеме крови, и существуют механизмы быстрой генерализации первичного возбуждения через кровь и долговременной памяти, с которыми биология и медицина, по-видимому, пока не знакома.

Во многих сообщениях отмечалось, что превышение экспозиции по отношению к некоторому оптимальному значению приводит к обострению заболеваний - отсюда термин “лазерная передозировка”. Следовательно, к диагностике *in vitro* необходимо предъявлять особые требования. В качестве облучаемого объекта желательно использовать компоненту крови, уметь контролировать ее реакцию по ходу облучения, а

критерием адекватности измерений должно стать возникновение экстремума на временной зависимости такой реакции.

Методами биохимического анализа установлено, что у пролеченных лазером больных (сердечно-сосудистая патология) повышается активность многих ферментов, участвующих в осуществлении важных клеточных функций. Это наводит на мысль, что фоторецептор вряд ли является ферментом, т.к. энзимологи давно склоняются к мнению о равной значимости всех ферментов [13]. Давно выяснилось, что в терапевтических целях можно применять монохроматическое излучение не только в красном, но и в ближнем ИК диапазоне. По-видимому, таинственный фоторецептор имеет не одну, а несколько полос поглощения, что также не характерно для ферментов. Наконец, врачи на опыте убедились, что изменение диаметра световода при условии сохранения прежней величины дозы, не сказывается на успешности лечебной процедуры. Такая инвариантность имеет для исследователя методическую ценность, указывая на определяющую роль поглощенной световой энергии (дозы), а не плотности потока (интенсивности) облучения.

Удивительные особенности терапевтического действия лазера стимулировали развертывание исследований по поиску первичного акцептора фотонов [14-19]. В крови имеется большое число макромолекул, обладающих значительным сечением поглощения в видимом диапазоне, в частности, на длине волны He-Ne лазера. К ним относятся все эндогенные порфирины, гемоглобин, каротин, металлосодержащие ферменты, циклические нуклеотиды, ферменты и коферменты окислительно-восстановительных реакций. Эти молекулы предполагались в качестве возможных фоторецепторов [20-25], но ни одна из гипотез не получила надежного подтверждения.

Ситуация еще более запуталась после обнаружения фотобиологической активности в клеточных культурах разных типов, например, в дрожжах, и примерно в тех же участках видимого и ближнего ИК диапазона [26-29]. Вероятно, реакцией на многолетние неудачи стали выдвигаемые в последнее время безосновательные

утверждения о равноправном участии в запуске активации любых макромолекул с подходящими хромофорными группами в результате локального перегрева [12].

Большое впечатление на терапевтов произвела идея увязать свойство неспецифичности лазерного действия с характерным для большинства заболеваний снижением производства внутриклеточной энергии [30]. Однако ее авторы *a priori* приняли точку зрения, что причиной энергетического дефицита является уменьшение активности ферментов в митохондриях - внутриклеточных органеллах, ответственных за наработку молекул АТФ. По их мнению, полезная часть фотонного потока поглощается инактивированными ферментами энергетического комплекса, и в результате происходящей реактивации энергетика клеток нормализуется. Авторы выполнили большую серию работ по лазерному воздействию на клеточные культуры и, по-видимому, обнаружили повышение активности митохондрий [31], однако найти надежные доказательства пусковой роли постулированных ими фотоакцепторов так и не удалось.

Безусловной заслугой авторов митохондриальной гипотезы, является привлечение внимания к классическому методу спектра действия (action spectroscopy), который позволяет однозначно решить вопрос о рецепторе фотонов [32]. К сожалению, при реализации метода они применили недостаточно интенсивные (не лазерные) источники зондирующего света и, возможно, неудачно выбрали способ контроля фотоотклика. Это помешало им достичь необходимого спектрального разрешения и пропорционального отображения спектральной зависимости, из-за чего правильный ответ не был найден [33]. Рис.1 демонстрирует характерные спектры действия, полученные в результате подобных исследований.

2. Спектр действия

В любой клетке порядка тысячи различных видов молекул, каждая из которых имеет отличный от других спектр поглощения в оптическом диапазоне. Поэтому задача

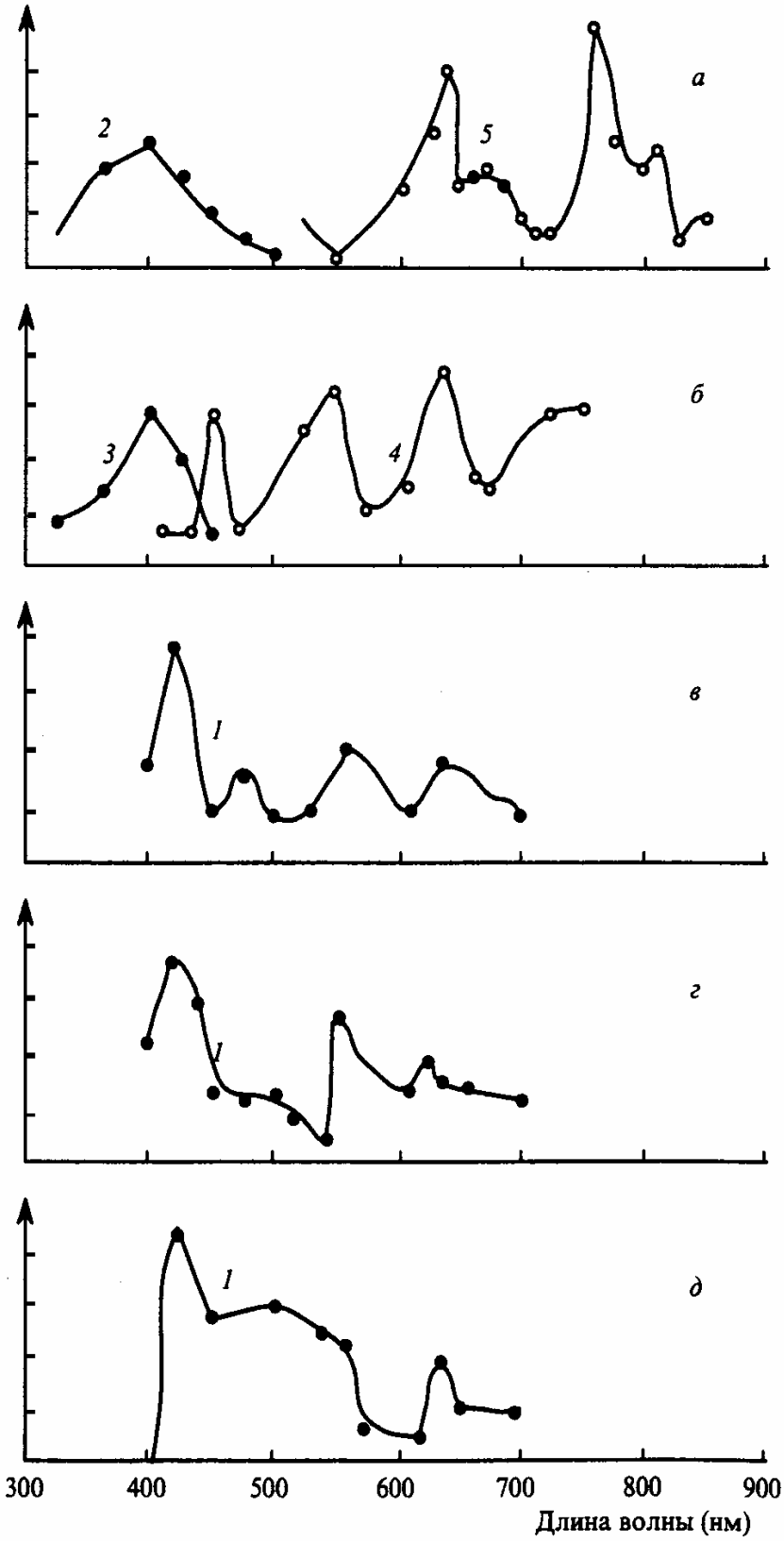


Рис. 1. Спектры действия, полученные после однократного облучения клеточных культур широкополосным источником света: синтез ДНК (*а*)[33], рост E.coli (*б* [34]), образование розеток лимфоцитов (*в*, [20]) деление клеток культуры L (*г*, [20]), выделение лимфоцитами ДНК-фактора (*д* [20]).
Плотность дозы облучения $5 \cdot 10^{-4}$ (1), $1 \cdot 10^{-3}$ (2), $1{,}3 \cdot 10^{-3}$ (3), $1 \cdot 10^{-2}$ (4), 0,4 (5) Дж/см^2.

идентификации фоторецептора сводится к возможно более точному определению его абсорбционного спектра. К сожалению, спектры многих молекул взаимно перекрываются,

а разделение нескольких заранее неизвестных функций невозможно. В частности, в каждой клетке найдется не менее десятка молекул, которые имеют заметное сечение поглощения в красной области; некоторые из них были перечислены выше.

Эффектный способ обойти эти трудности - измерить “спектр действия”, т.е. зависимость относительной эффективности изучаемого явления, в данном случае активации клеток, от длины волны возбуждающего света. Работает метод следующим образом. Идентичные образцы изучаемой биологической системы облучают квазимонохроматическим излучением в различных участках предполагаемого спектра поглощения фоторецептора. В тех участках, где поглощение фотонов рецептором отсутствует, эффект не наблюдается, а там, где максимум – развивается наиболее интенсивно. Если зондирующий луч попал в нужную спектральную область, фоторецепторы проявят себя, сколько бы их ни было - клетки сами усилят слабый сигнал. Это своеобразный фотобиологический Фурье-анализ. Идентификацию фоторецептора проводят, сравнивая спектр действия со спектрами поглощения известных молекул.

Как объективный метод исследования спектр действия был предложен К.А. Тимирязевым, доказавшим с его помощью, что хлорофилл является фоторецептором в фотосинтезе [35]. Тимирязев использовал в качестве источника света солнечный луч, разлагая его по спектру с помощью призмы. Под цветными лучиками он расставлял колбы с растениями и по объему выделяющегося кислорода измерял эффективность фотобиологической реакции.

Для успешного применения метода необходимо убедиться в существовании линейной связи между поглощенной фоторецептором световой энергией (вместо нее, конечно, измеряют полную поглощенную энергию) и величиной параметра, отражающего эффективность воздействия. Это самое жесткое условие, потому что проверить его можно лишь после выполнения основного объема работ - отработки методики регистрации. В отсутствии достаточной линейности измеренный спектр будет искаженной копией

спектра поглощения, что затруднит идентификацию либо вовсе сделает ее невозможной. Данный метод применялся нами на всех решающих этапах исследования.

3. Материалы и методы

При выборе объекта исследований мы руководствовались двумя основными соображениями: приблизиться к условиям медицинских применений лазеров и иметь возможность проверить будущие результаты в клинике. Как подчеркивалось во Введении, надежные лазерно-терапевтические методики были разработаны И.М. Корочкиным с сотрудниками, использовавшими облучение крови внутривенно [8]. Половину объема крови человека занимают эритроциты (примерно 95% всех клеток), к тому же, они являются стандартным биологическим объектом, и в них отсутствуют митохондрии. Это предопределило выбор основного объекта исследований: большая часть наших опытов выполнялась на красных клетках крови, и под них были ориентированы все разработки методов диагностики.

Клиническая верификация механизма лазерной активации проводилась в отделении терапии больницы №13, которое являлось базовым для кафедры внутренних болезней Московского медицинского университета (заведующий кафедрой проф. И.М. Корочкин).

3.1. Источники облучения

При отработке методики приготовления образцов клеток, изучении характерных особенностей фотобиологических реакций, сравнении с фотодинамическим эффектом использовался преимущественно типовой He-Ne лазер ЛГ-38 с длиной волны излучения 632,8 нм и мощностью до 50 мВт. Для получения детальных спектров действия применялись лазеры с плавно перестраиваемой длиной волны, разработанные в Институте Общей физики РАН (Москва), НПО “Исток” (Фрязино) и Томском государственном университете. Список использованных лазеров приведен в таблице 1.

Таблица 1. Сводка лазеров, использованных в работе

Тип лазеров	Диапазон перестройки Δλ, нм	Ширина линии излучения Δλ, нм	P_{max} мВт	Режим работы лазера
InGaAsP/InP	1220-1290	0,5	6,0	непрерывный
Nd:YAG	1064	0,1	1200	непрерывный
$Ti^{3+}:Al_2O_3$	700-900	1,0	200	10Гц, 100мкс
$Cr^{3+}:BeAl_2O_4$	720-790	1,2	900	10Гц, 200мкс
He-Ne (ЛГ-38)	632,8	$<10^{-2}$	50	непрерывный
He-Ne (АЛОК-1)	632,8	$<10^{-2}$	2	непрерывный
«Яхрома 1» (Cu→R 6G)	626-646	0,2	500	10кГц, 30нс
«Малахит» (Cu→R 6G)	627-660	1,5	200	15кГц, 15нс

3.2. Приготовление образцов

Для получения суспензии эритроцитов использовались свежие образцы крови от практически здоровых доноров с гепарином в качестве антикоагулянта, которые нам регулярно предоставляла диагностическая лаборатория больницы г. Троицка Московской обл. Кровь дважды центрифугировали в забуференном изотоническом растворе (150 мМ NaCl, 10 мМ трис-HCl, *pH*=7,4) в течение 10 мин при 2000g. Эритромасса суспендировалась до необходимой концентрации клеток в среде без глюкозы состава: 100 мМ NaCl, 3 мМ KCl, 2 мМ $CaCl_2$, 1 мМ Mg Cl_2, 1,2 мМ Na_2HPO_4, 50 мМ трис- HCl, *pH* = 7,4, либо в фосфатном буфере 147 мМ NaCl, 10 мМ Na_2HPO_4, 5 мМ KCl, *pH* = 7,4. Все неорганические соли были марки ХЧ Реахим.

Объемная доля эритроцитов в суспензиях обычно составляла 0,3 – 1%, что соответствовало среднему межклеточному расстоянию 30-40 мкм. Образец крови был пригоден для исследований в течение 10-12 часов с момента получения от донора. Суспензия эритроцитов во всех экспериментах была полностью оксигенирована.

3.3. Экспериментальные методы

В целях лучшего понимания междисциплинарной по своему характеру проблемы необходимо дать некоторые разъяснения. Эритроцит в покое – это двояковогнутый диск диаметром около 8 микрон, толщиной в центре примерно 1 мкм, а по ободку около 2 мкм. В нем отсутствуют ядро и обычные внутриклеточные структуры, а

в цитоплазме преобладает белок гемоглобин, обеспечивающий транспорт кислорода в ткани и обратный перенос углекислого газа. Мембрана практически нерастяжима, но сама клетка может удивительно сильно и многократно деформироваться при проходе сквозь капиллярную сеть (при ряде патологий эритроциты становятся хрупкими быстрее, чем по истечении времени жизни 120 дней – развивается гемолиз) [36].

Выход из эритроцитов кислорода для питания клеток ткани происходит в артериальных капиллярах диаметром 3 – 7 микрон. Именно поэтому природа снабдила эритроциты уникальной способностью к значительным обратимым деформациям. В лабораторных экспериментах их удавалось растягивать до 300% без заметных повреждений. Эта способность быстро и в широких пределах варьирует под влиянием различных факторов. Например, при простуде эритроциты становятся жесткими (первое наблюдение – Антони ван Левенгук, 1678 г.), из-за чего они плохо проходят в мельчайшие капилляры и ограничивают приток кислорода в ткани. Уменьшение концентрации АТФ в тканевых клетках замедляет размножение вируса. У больного пропадает аппетит, следовательно, снижается поступление углеводов и жиров. В противном случае, продукты неполного сгорания органического вещества накапливалось бы в клетках, вызывая отравление. Так, через изменение эластичности переносчиков кислорода организм гибко регулирует свою потребность в энергии.

На большую диагностическую значимость контроля степени эластичности красных клеток указывалось давно [36-38], и были предложены различные способы измерения этого параметра: микроскопия закрепленных эритроцитов, деформируемых сдвиговым потоком [39], всасывание одиночных клеток в микропипетку [40, 41], реоскопия [42,43], продавливание эритромассы сквозь микропористый фильтр [44], использование центрифугирования [45], эктацитометрия [46]. Однако разработать удобный метод, с которым можно было бы работать и в лаборатории, и в клинике, долгое время не удавалось. Анализ литературы по реологии крови, молекулярной структуре,

динамике и биохимии эритроцита, а также опыт совместных работ с научными сотрудниками ведущих медицинских институтов, привели нас к выводу: над разработкой такого метода стоит работать. Если даже с его помощью не удастся измерить спектр действия, например, из-за того, что свет просто не влияет на эритроциты, то, рано или поздно, он будет востребован медициной. Таковы предпосылки создания эридифрактометра [47], ставшего основным исследовательским инструментом для изучения механизмов действия оптического излучения.

Эридифрактометр предназначен для динамического контроля сдвиговой упругости живых эритроцитов (достаточно стандартной пробы крови из пальца) в гидродинамическом контуре, который моделирует круг кровообращения (рис. 2). Суспензию с концентрацией эритроцитов заливают в широкую буферную часть с открытой поверхностью. Через нее же можно вводить свет, добавлять и откачивать кислород, а также применять иные воздействия, например, тестировать реакцию на лекарственный препарат.

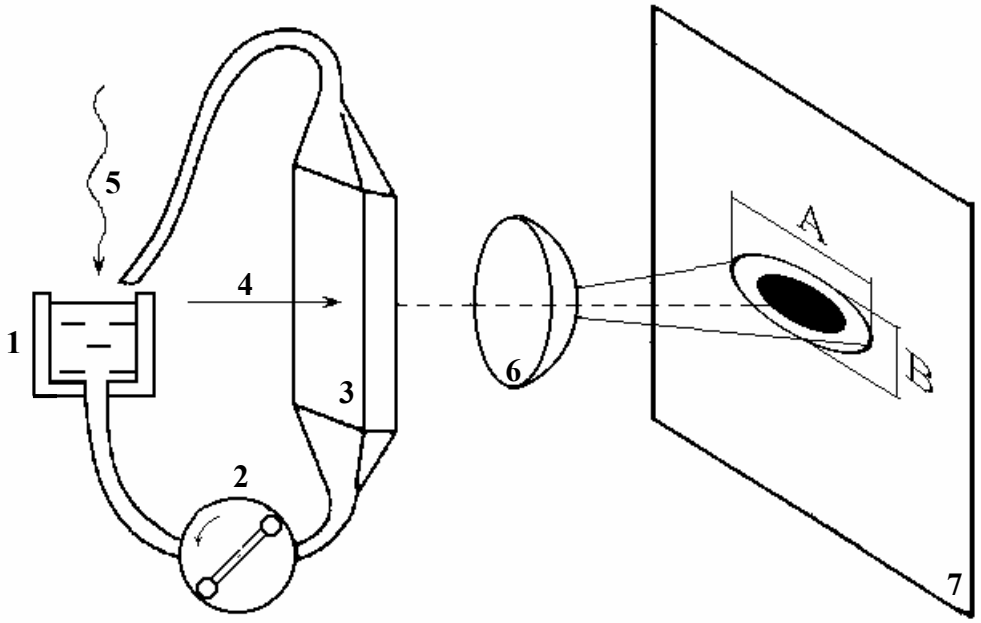


Рис. 2. Принципиальная схема эридифрактометра. 1.– буферный участок, 2.- перистальтический насос, 3.- оптическая кювета, 4.- зондирующий луч, 5.- активный агент (излучение, препарат), 6.- объектив, 7.- экран. Величины “А” и “В” измеряются по первому дифракционному минимуму.

Измерения проводятся в другой части контура, где луч зондирующего и весьма маломощного (менее 1 мВт) лазера пересекает тонкую оптическую кювету - плоский капилляр. Используется основное свойство дифракции Фраунгофера (в параллельных лучах). Световой пучок, пересекающий плоскость с N случайно расположенными малыми дисками одинакового диаметра, дает такую же систему концентрических колец, как и одиночный диск, только яркость изображения в N раз больше. По нему сразу можно определить диаметр диска. Если диаметры дисков немного различаются (что характерно для эритроцитов!), то кольца немного размываются, и с помощью фотометрирования можно определить распределение по размерам. Когда диски овальные, но в плоскости ориентированы одинаково, дифракционная картина состоит из системы овальных колец, развернутых на 90 градусов.

Гидродинамический режим потока в контуре подобран так, что эритроциты во время протекания сквозь узкую щель оптической кюветы, превращаются в одинаково ориентированные в плоскости кюветы двояковогнутые эллипсоиды (аналог овальных дисков). Одновременно они группируются в два одинаковых слоя, симметричных относительно плоскости симметрии кюветы, благодаря чему подвергаются одному и тому же сдвиговому напряжению и растягиваются одинаковым образом. Поэтому дифракционная картина протекающих эритроцитов состоит из системы неподвижных овальных колец (от одного до трех) и отображает форму и внутреннюю структуру среднего по ансамблю эритроцита. Степень растянутости изображения есть мера способности эритроцитов деформироваться в сдвиговом потоке.

Деформируемость (перевод английского термина “deformability”) – системное свойство эритроцитов, отсутствующее у других клеток. В основе его физического механизма лежит принцип “энтропийной пружины” [48]. Эридифрактометр позволяет контролировать показатель деформируемости

$$\varepsilon = (A-B)/(A+B).$$

Данный параметр пропорционален реальному растяжению клеток, причем длины осей дифракционных колец “А” и “В” измеряются по первому дифракционному минимуму (см. рис.3). В его изменениях интегрально отражаются нюансы структурных и биохимических процессов в интактных клетках, прежде всего, в их мембране, с временным разрешением порядка секунды. Всякие неблагоприятные воздействия уменьшают ε. По направленности этих изменений можно судить о вреде или пользе того или иного действующего фактора (см. ниже, п. 4.1). Поэтому ожидалось, что по времени перехода облучаемых клеток в состояние максимальной деформируемости можно судить об эффективности той или иной длины волны светового облучения и зарегистрировать искомый спектр действия.

Седиментационная рефрактометрия. Измерение показателя преломления внеклеточной среды в эритроцитарных суспензиях производилось на стандартном рефрактометре, работающем по принципу полного внутреннего отражения в модификации Аббе (рис. 3). Такой рефрактометр можно применять как для однородных жидкостей, так и для суспензий. Капля исследуемой пробы (30-50 мкл) наносится на

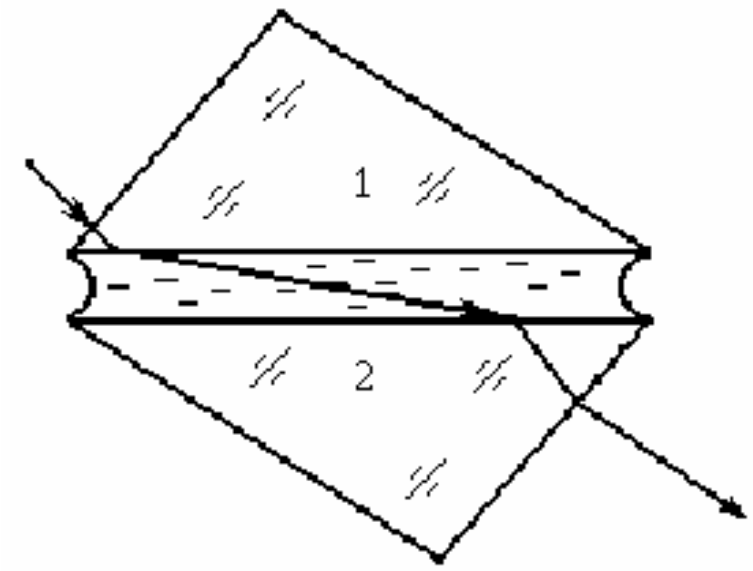


Рис. 3. Ход лучей в рефрактометре Аббе (масштаб сильно искажен). 1 – осветительная призма; 2 – измерительная призма.

гипотенузную грань измерительной призмы, а накрывающая сверху осветительная призма раздавливает каплю в слой до толщины $h \cong 0{,}1$ мм. Световой луч (D-линия Na, λ=589 нм) скользит вдоль слоя и через измерительную призму выходит в зрительную трубу, с помощью которой измеряется предельный угол отражения.

В методе седиментационной рефрактометрии [49] используется известное свойство полного внутреннего отражения: зондируемый светом слой жидкости, в котором измеряется показатель преломления, прилегает к измерительной призме и имеет малую толщину не более $\lambda << h$. В момент ввода образца разреженной (0,3%) эритроцитарной суспензии в рефрактометр клетки равномерно взвешены в измерительном зазоре, причем основной объем (99,7%) занимает внеклеточный водный раствор. Поэтому до того, пока заметная часть седиментирующих клеток не осядет на поверхность измерительной призмы, с помощью прибора можно измерять показатель преломления внеклеточной среды, пренебрегая вкладом клеток.

Разрешенное время измерения $\Delta t_{\max}$ можно оценить, воспользовавшись формулой Стокса $6\pi r_c \eta v = m_c g$,где r_c и m_c – средний радиус и масса клетки, v- скорость оседания клетки, η- вязкость воды, g-ускорение свободного падения. Принимая объем клетки V_c = 94 мкм^3, площадь поверхности S_c = 145 мкм^2, удельный вес 1,035 г×см$^{-3}$ [50], получим v = 0,7 – 0,9 мкм/с, для r_c, рассчитанного по V_c или S_c. Поверхностная доля осевших клеток $\xi = \pi r_d^2 \Delta t_{max} Q$, где r_d – радиус диска эритроцита, $Q = vc_c$, c_c- концентрация клеток в исходной суспензии. Поскольку $\xi^{-1} \equiv K_в$ – оптический контраст, необходимый для измерения с заданной точностью, окончательно получим $\Delta t_{max} = (K_в \pi r_d^2 v c_c)^{-1}$. Для $K_в$ = 10, $c_c = 1\times10^8$ см$^{-3}$ (1%-ная суспензия) имеем $\Delta t_{max} \cong 30\div40$ с. Отметим, что погрешность измерений в наших экспериментах не превышала $0{,}5\times10^{-4}$.

Список других устройств, использованных в работе, представлен в Таблице 2.

Таблица 2. Сводка основных экспериментальных методик.

Устройство	Назначение
Оксигемометр ОДЭР альфа	Измерение степени насыщения крови кислородом
Эридифрактометр	Измерение степени деформируемости эритроцитов
Гемолизометр	Контроль степени гемолиза
Вольюметр	Контроль изменения объема эритроцитов
Оксидоредуктометр	Измерение оксидоредуктазной активности клеток
Цитометр “Диск”	Измерение распределения клеток по размерам
Седиментационный рефрактометр	Измерение показателя преломления внеклеточной среды

3.4. Методика клинической верификации.

Экспериментально-клинические исследования проводились на группе кардиологических больных, имевших показания к лазерной терапии, по стандартной методике, утвержденной Минздравом СССР [51]. Кубитальную вену пациента пунктировали стандартной полой иглой с введенным в нее стерилизованным кварцевым световодом, через который направлялся лазерный луч. Каждому пациенту давалось облучение на определенной длине волны, для чего использовался плавно перестраиваемый лазер на красителях с накачкой от лазера на парах меди и, как клинический эталон, гелий-неоновый лазер. Продолжительность процедуры у разных пациентов не была одинаковой: она зависела от длины волны и рассчитывалась накануне по данным in vitro и предварительных тестов в клинике (с He-Ne лазером).

Облучение прерывалось через определенные интервалы времени на 1-2 секунды для отбора нескольких капель крови гепаринизированной микропипеткой с целью последующего анализа. Пробы крови разбавлялись физиологическим раствором в пробирках до 0,3% по объему. Образцы сохранялись при комнатной температуре до

окончания лазерных процедур, назначенных на данный день (исследования продолжались два дня), и затем последовательно вводились в эридифрактометр. Отсчет установившегося значения показателя деформируемости производился примерно через 20 мин после ввода суспензии в прибор. В результате получался временной график, показывающий, как меняется эластичность эритроцитов того или иного пациента во время лазерной процедуры. По нему определялась оптимальная энергетическая доза облучения, что давало одну экспериментальную точку на спектре действия.

4. Экспериментальные результаты

4.1. Апробация эридифрактометра

Перед началом ответственных измерений спектров действия было проведено тестирование эридифрактометра на чувствительность к имеющимся лекарственным соединениям реологического профиля. Вместо света в качестве активных агентов использовались гормоны простагландины, а также трентал и неотон. Результаты тестов, часть из которых представлена на рис. 4, свидетельствуют о высокой чувствительности

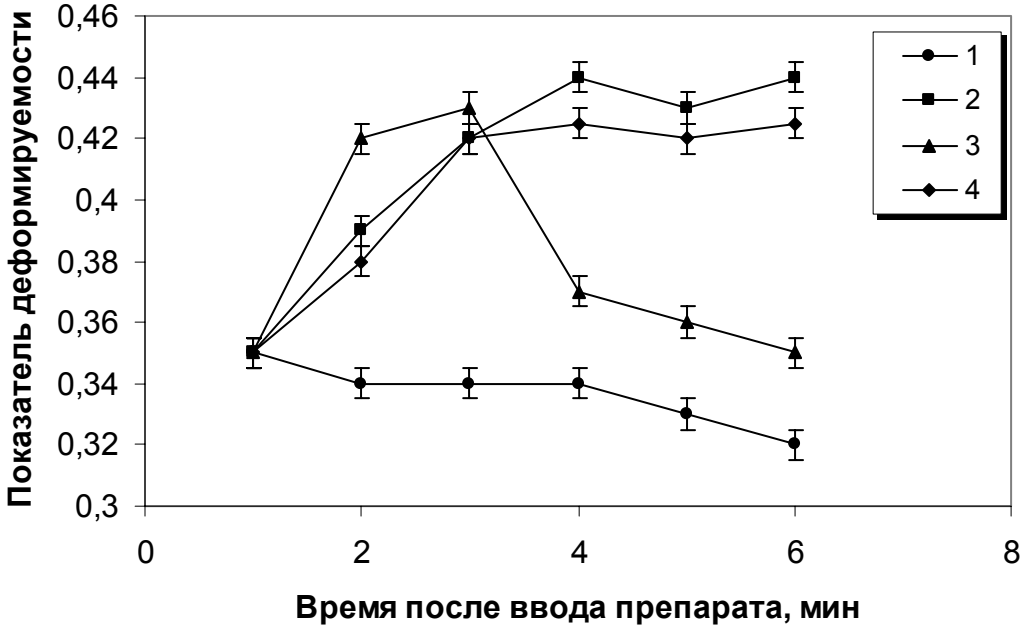


Рис. 4. Определение индивидуальной чувствительности к реологически активным лекарственным препаратам Изменение показателя деформируемости эритроцитов, циркулирующих в эридифрактометре; пациент с диагнозом “стенокардия напряжения I функционального класса”: 1 – в отсутствии препарата; 2 – при добавлении простагландина PGI_2, 50 нг/мл; 3 - при добавлении простагландина PGE_2, 30 нг/мл; 4 – при добавлении трентала [52].

эридифрактометра: согласно оценкам, до одной молекулы биологически активного вещества на клетку. Полезным качеством прибора оказалась также возможность точного подбора индивидуальной дозировки препаратов - результаты получаются в течение нескольких минут.

Проверка полезности этой функции производилась в клинике при оперативном контроле состояния эритроцитов у больных, только что перенесших острый инфаркт миокарда [52]. Исследованию подверглись клетки крови трех пациентов (мужчин) на следующие сутки после возникновения инфаркта (рис. 5). При сопоставлении объективных данных прибора со сравнительным прогнозом, сделанным ведущим врачом, было констатировано полное согласие.

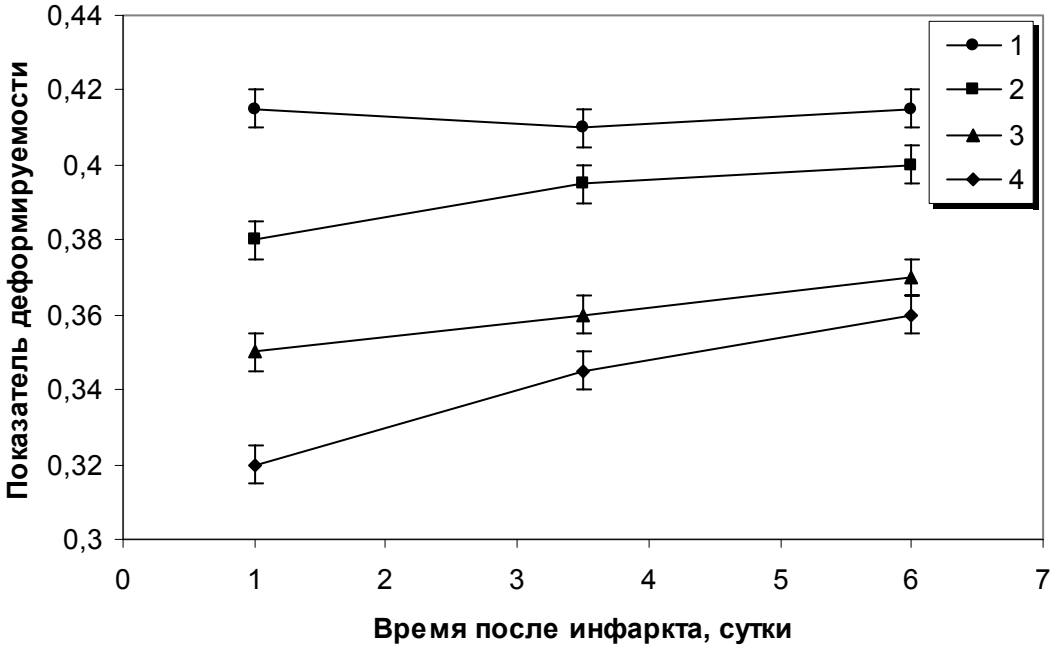


Рис. 5. Мониторинг больных с острым инфарктом миокарда спустя сутки после заболевания (больным проводился предписанный курс лечения).

Изменение показателя деформируемости эритроцитов. 1 – контроль (практически здоровый донор в те же дни); 2 – пациент с неосложненным трансмуральным инфарктом передней стенки; 3 – пациент с многоочаговым инфарктом задней стенки; 4 – пациент с обширным инфарктом миокарда [52].

4.2. Изменение деформируемости эритроцитов, облучаемых гелий-неоновым лазером

Вначале на дифракционном изображении облучаемых клеток, как правило, не заметно каких-либо изменений за исключением флуктуаций, наблюдаемых и в отсутствии

облучения. Это латентная фаза эффекта, тем более продолжительная, чем меньше световая мощность. Затем начинается подъем деформируемости, не всегда гладкий. В момент максимума дифракционные кольца становятся более четкими, что свидетельствует об уменьшении разброса эритроцитов в плоском капилляре по величине деформаций (эффект фотогармонизации [53]). Типичная форма развития светоиндуцированного эффекта показана на рис. 6.

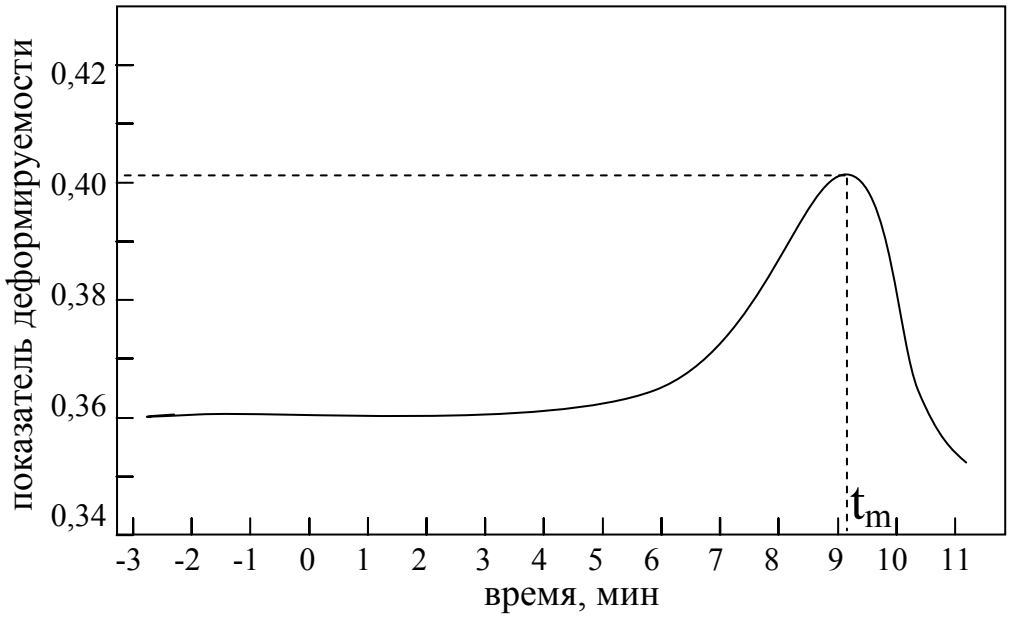


Рис. 6. Типичные изменения деформируемости эритроцитов в суспензии под влиянием облучения. Лазер включен в момент t = 0.

В ходе дальнейшего облучения деформируемость уменьшается, обычно более круто, и если не выключать лазер, то ниже исходного уровня. Снижение наблюдается до тех пор, пока клетки из-за потери эластичности не выходят из режима ориентации в кювете и начинают неравномерно вращаться (режим “кувыркания”); вместо дифракционных овалов на экране возникает размытый круг, и измерения на эридифрактометре становятся невозможными. При этом контроль состояния эритроцитов не прекращался, т.к. сразу после достижения максимума начинались изменения трансмембранного электронного тока, регистрируемые с помощью введенного в буферный участок эридифрактометра Pt электрода методом оксидоредуктометрии [53, 54].

Величина максимума деформируемости для клеток, взятых из крови одного индивидуума, практически постоянна. Время же выхода на максимум, отсчитываемое от начала облучения, тем меньше, чем больше мощность облучения (для мощности He-Ne лазера 30 мВт оно составляет примерно 5 мин). Это наводит на мысль, что скорость перехода системы эритроцитов в состояние предельной эластичности является подходящим параметром для оценки биологической эффективности различных участков оптического спектра. Кроме того, поскольку в эритроцитах отсутствуют митохондрии, а, значит, и нет ферментов, подозреваемых в качестве мишени для фотонов митохондриальной гипотезой [31], то, по-видимому, существует иной первичный фоторецептор биологического действия света.

4.3. Спектры действия

При изучении влияния на фотоактивацию различных факторов выяснилось, что эффект исчезает, если из системы удалить кислород [54]. Напротив, повышение концентрации кислорода в суспензии эритроцитов ускоряет переход клеток в состояние максимальной эластичности (Табл.3).

Таблица 3. Результаты измерений скорости активации суспензии эритроцитов, облучаемой He-Ne лазером, от концентрации кислорода.

Парциальное давление кислорода, мм рт.ст.	Способ поддержания режима	Время активации, с
менее 10	продувка аргоном	более 1200
150	равновесие с атмосферой	330 ± 30
700 ± 50	продувка кислородом	22 ± 5

Анализ этих данных позволяет предположить, что фоторецептором является молекулярный кислород. Более того, это кислород, не связанный с гемоглобином, а растворенный в суспензии: при продувке чистым кислородом активация ускоряется на порядок по сравнению со случаем равновесия с атмосферным воздухом, тогда как 100%-ная насыщенность эритроцитов кислородом уже не меняется.

На первый взгляд, такое предположение кажется невероятным, однако оно не лишено смысла. Молекула кислорода имеет в оптическом диапазоне несколько полос поглощения, правда очень слабых (оптически запрещенные переходы), и одна из них включает длину волны He-Ne лазера. Еще важнее другое: если акт поглощения фотона совершился, то, согласно данным молекулярной спектроскопии, должен образоваться синглетный молекулярный кислород (СМК). Эта частица хорошо известна своей высокой биологической активностью [55, 56].

Полосы поглощения кислорода довольно узкие, порядка 20 нм, и чтобы их разрешить, необходимы плавно перестраиваемые лазеры, как правило, для каждой из полос свои особые. Трудности создает отсутствие сведений о точном положении, форме и относительной интенсивности полос поглощения кислорода, растворенного в воде или водных растворах: малая сила осциллятора на фоне сильного поглощения воды в ближней ИК области создают для подобных измерений до сих пор непреодолимые препятствия. В литературе имеются только абсорбционные спектры в газе под большим давлением, в сжиженном состоянии, в тяжелой воде и в ряде фреонов, где под большим давлением можно получить большую концентрацию его молекул (рис. 7) [57]. Из этих данных можно заключить, что характеристики полос варьируют с изменением растворителя, хотя и не сильно. Наконец, всякий раз нужно проверять, соблюдается ли условие линейной связи между энергетической дозой облучения, соответствующей максимальной активации, и скоростью (обратным временем) ее достижения. Иначе, как отмечалось выше, спектр поглощения будет передан с искажениями.

Технические трудности оказались преодолимыми, и когда с помощью эридифрактометра были получены детальные спектры действия (активации) в ряде полос [58-61], предположение о кислороде как фоторецепторе нашло полное подтверждение (рис. 8). Наиболее интенсивной является полоса 1 (нумерацию полос см. на рис. 7) с максимумом 1264 ± 2 нм [58].

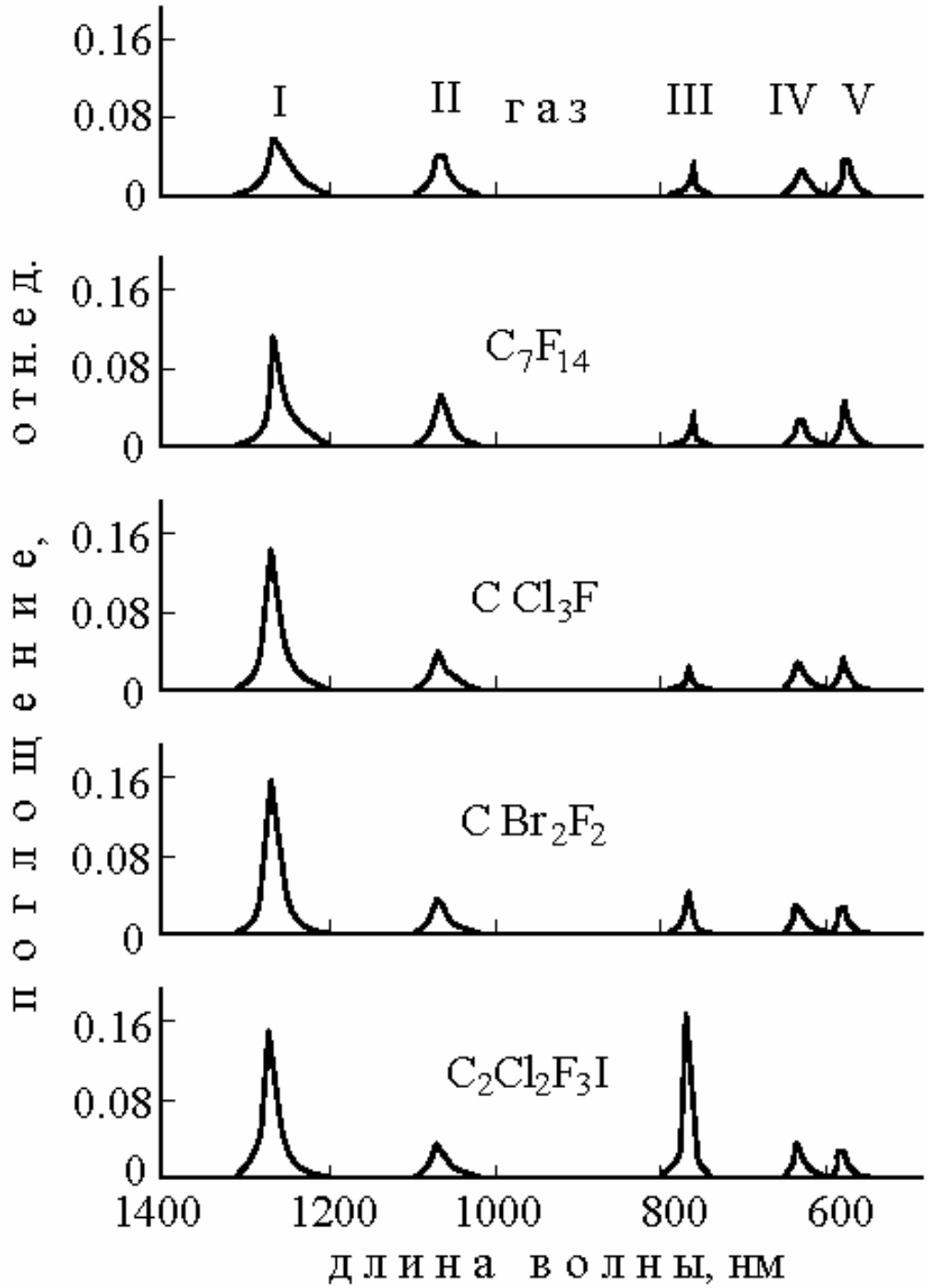


Рис. 7. Спектры поглощения кислорода в газовой фазе (130 атм) и при растворении в различных фреонах [57].

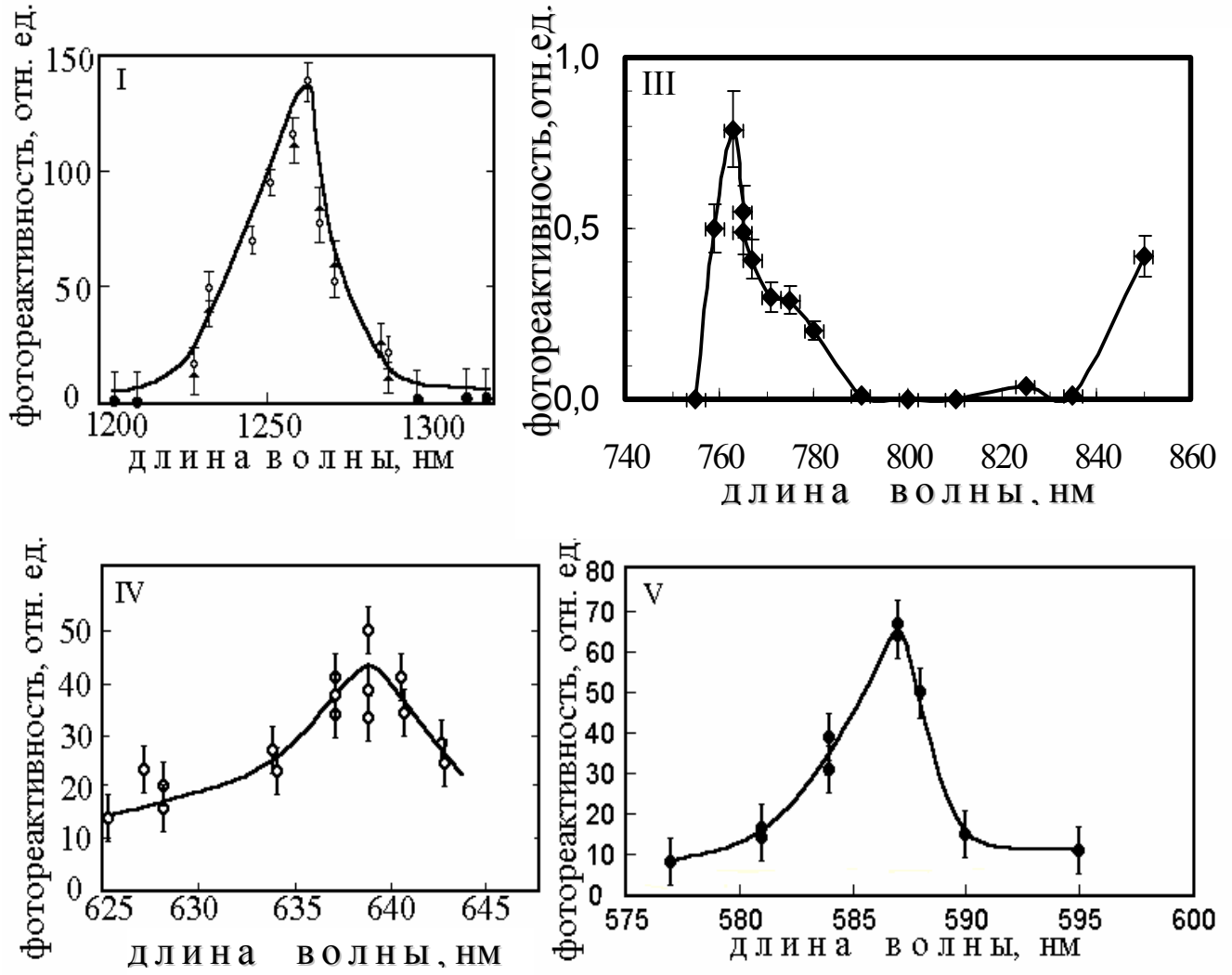


Рис. 8. Спектры действия *in vitro* в полосах I [58], III [59], IV [60], V [61].

Отметим, что спектр активирующего действия должен быть, очевидно, идентичен спектру ингибирующего действия света, измеренному по началу нарушений в системе трансмембранного электронного транспорта, т.к. эти нарушения следуют сразу за максимумом.

Активацию клеток через фотовозбуждение растворенного молекулярного кислорода, сопровождаемое прямой генерацией синглетного кислорода, предложено называть светокислородным эффектом. Кислород в природе присутствует всюду – от простейших организмов до клеток человеческого тела, поэтому как первичный акцептор

фотонов он, очевидно, удовлетворяет эмпирическому условию неспецифичности, на котором настаивают врачи.

4.4. Сопряженность изменений в клетках и внеклеточной водной среде

При светокислородном эффекте фоторецепция осуществляется растворенным кислородом. На это однозначно указывает вид спектров действия: связанный кислород привел бы к сильнейшему уширению и деформации регистрируемых спектральных полос. Поскольку в наших образцах свободный кислород преимущественно локализован вне клеток, то именно там и генерируется подавляющее количество СМК. Среднее расстояние между клетками 30 – 40 мкм на два порядка превышает длину пробега молекулы синглетного кислорода. Следовательно, возбуждение от СМК, по-видимому, передается на клетки через водную среду. Это наводит на мысль, что во внеклеточной водной фазе могут происходить какие-то изменения, что было бы желательно проверить.

С этой целью был применен метод седиментационной рефрактометрии (см. раздел “Экспериментальные методы”). Суспензия эритроцитов облучалась He-Ne лазером в эридифрактометре, и в нем, как обычно, через определенные промежутки времени регистрировались изменения показателя деформируемости эритроцитов. В те же моменты из буферного объема прибора микропипеткой отбиралась капелька суспензии и переносилась в рефрактометр для измерения показателя преломления внеклеточной среды. Кюветные отделения обоих приборов поддерживались при одинаковой температуре общим протоком воды из термостата.

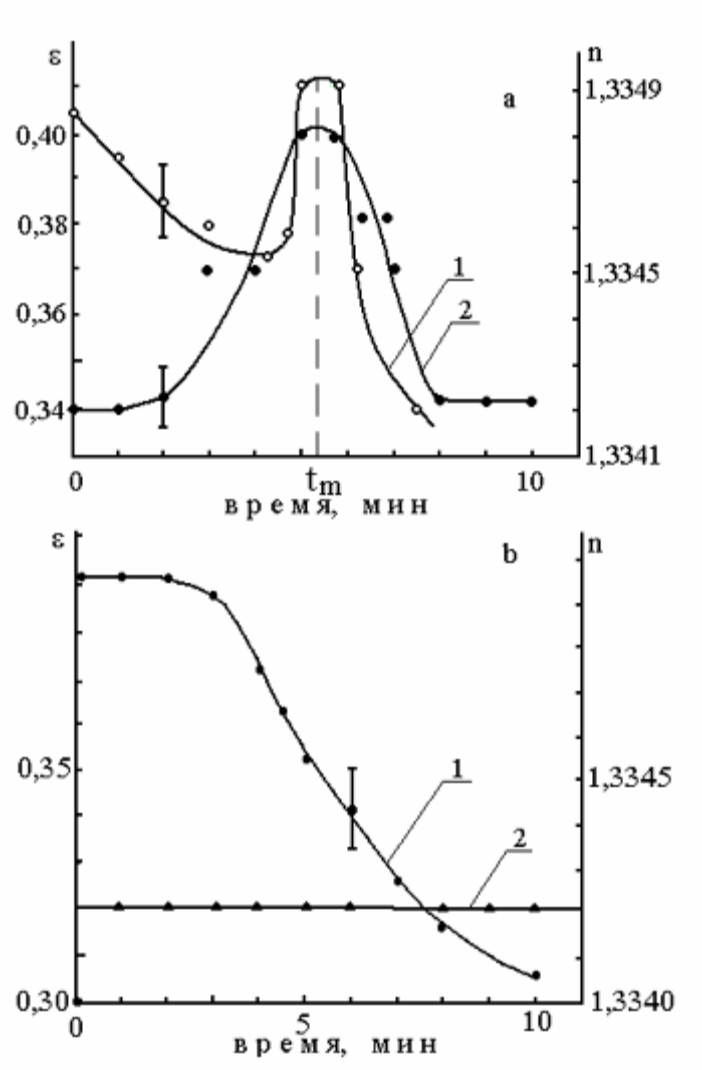


Рис. 9. Одновременность реакции клеток и внеклеточной среды в суспензии эритроцитов, облучаемой He-Ne-лазером. Интенсивность облучения 13 мВт/см^2, S = 3 см^2. Обычный режим, суспензия оксигенирована (*а*); кислород удален барботированием азотом в течение 10 мин (*б*).

Результаты некоторых типичных экспериментов показаны на рис. 9. Видно, что изменения деформируемости эритроцитов сопровождаются значительными изменениями показателя преломления окружающей клетки водной среды. Хотя форма обеих временных кривых не совпадает в деталях, чего и нельзя ожидать при контроле столь отличающихся параметров, общий характер зависимостей одинаков. Особенно важно, что максимум на кривых возникает в один и тот же момент времени.

Дополнительным свидетельством взаимосвязи реакции клеток и водной фазы является феномен детальной обратимости, наблюдаемый в обоих случаях (рис. 10). Если облучать суспензию и после перехода через максимум активации, а затем выключить лазер, то оба параметра не зафиксируются, а сразу двинутся с той же скоростью в обратном направлении и снова пройдут через максимум.

Наконец, можно сделать вывод методического значения: за динамикой активации с тем же успехом можно следить по показателю преломления внеклеточной среды. Иногда это удобно, так как метод допускает варьирование объемной концентрации

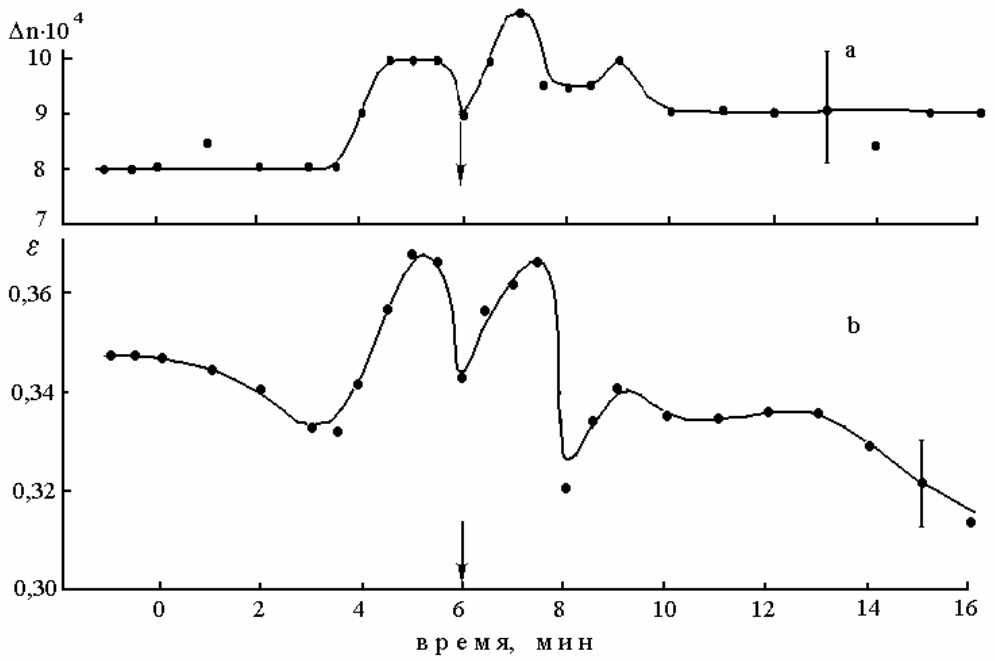


Рис. 10. Обратимость фотоотклика суспензии эритроцитов после внезапного (указано стрелкой) прекращения облучения. He-Ne лазер, 13 мВт/см^2, S = 3 см^2.

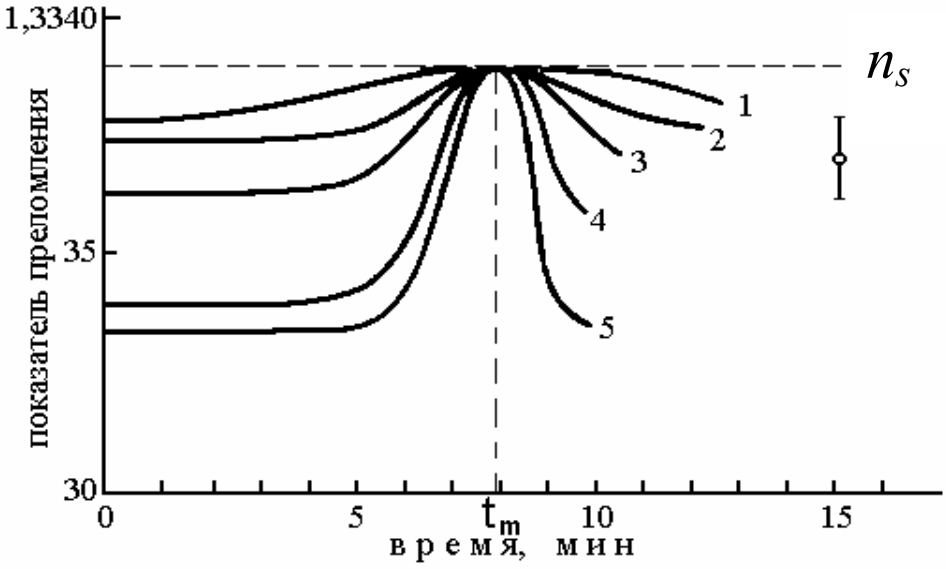


Рис. 11. Независимость фотоотклика от концентрации эритроцитов. He-Ne лазер, интенсивность облучения 13.8 мВт/см^2, S = 3 см^2, T = 34.5°C. Начало облучения в момент t = 0. Объемная доля эритроцитов 0.075 % (кривая 1); 0.15 % (2); 0.3 % (3); 1.0 % (4); 1.5 % (5); n_s – показатель преломления исходного буферного раствора.

клеток в более широком диапазоне, нежели в случае эридифрактометрии. Данная особенность была использована при изучении вопроса о влиянии на активацию величины

гематокрита. При одинаковых условиях облучения изменение концентрации клеток в пределах около полутора порядков никак не отражается на скорости активации (рис.11).

4.5. Термоактивация эритроцитов

В той же схеме эксперимента с одновременной регистрацией двумя приборами были получены температурные зависимости деформируемости и показателя преломления (в отсутствии облучения) (рис. 12). Между обеими кривыми имеется достаточно хорошая корреляция. Сравнение этих данных с температурными зависимостями для эритроцитов, полученными другими авторами и другими методами (люминесцентные зонды, спиновые метки, и т.п.) [62-64], позволяет сделать вывод об удовлетворительном количественном соответствии. Авторы достаточно аргументировано интерпретировали наблюдаемые ими температурные особенности как фазовые переходы в эритроцитарной мембране. Теперь их интерпретацию необходимо уточнить: фазовые переходы в клетке сопровождаются значительными изменениями внеклеточной среды, и пока затруднительно указать, что первично, а что вторично. По крайней мере, ясно, что клетки и окружающая их вода представляют собой единую систему, одновременно и слитно реагирующую как на

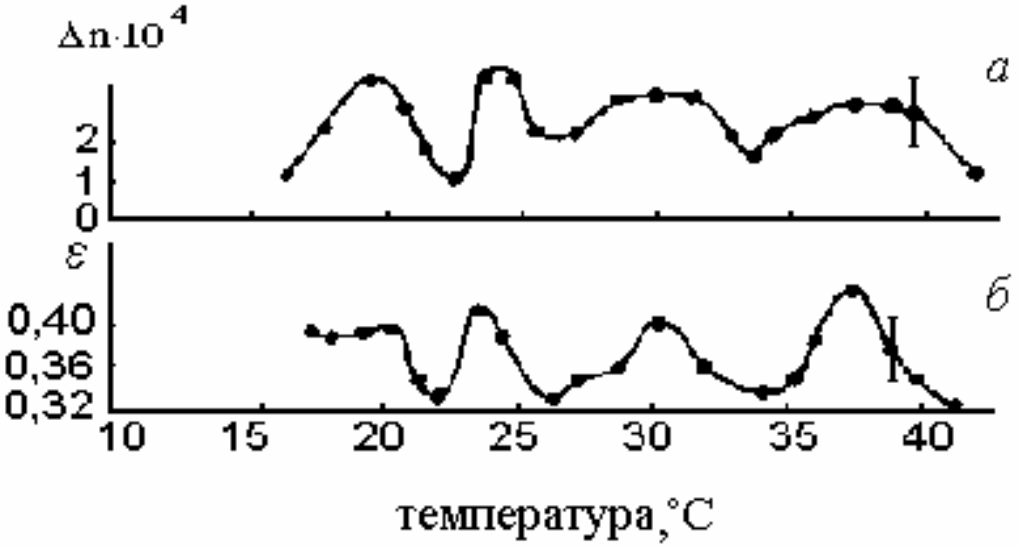


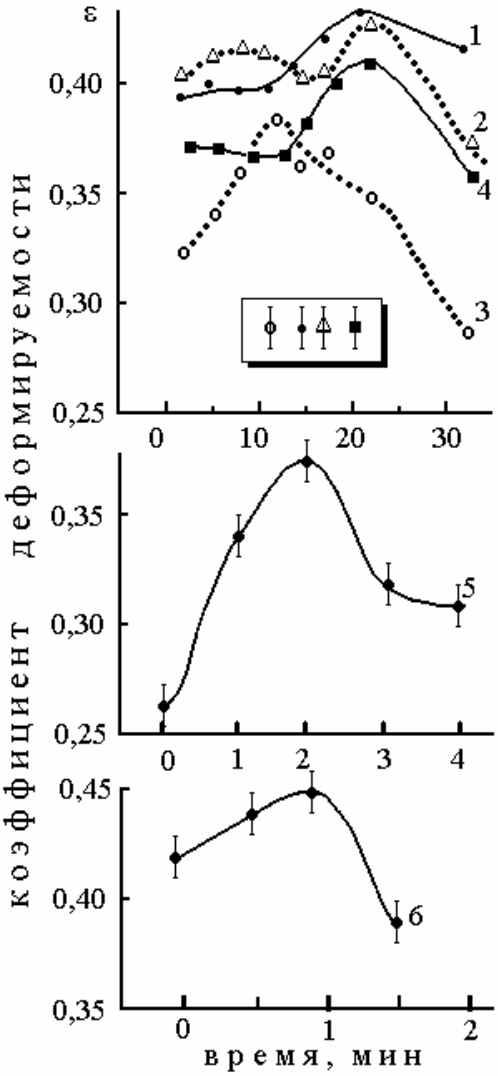
Рис. 12. Одновременность изменений показателя преломления внеклеточной среды (за вычетом монотонного температурного тренда) (*а*), и показателя деформируемости эритроцитов (*б*) по мере повышения температуры со скоростью 1 К/с.

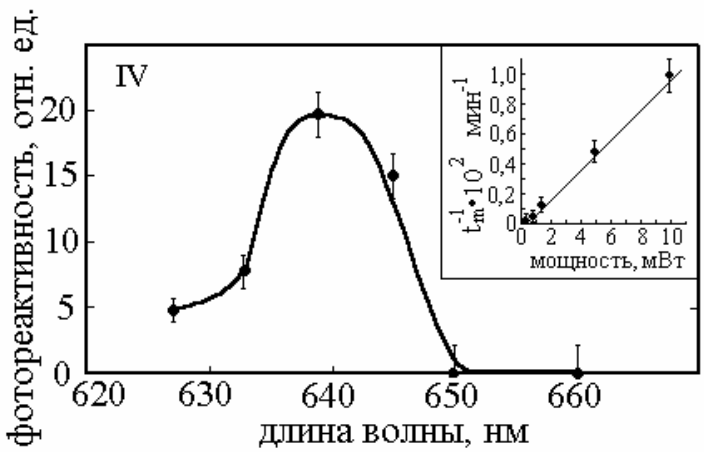
тепловое, так и на световое воздействие.

Оба параметра на рис.12 по мере изменения температуры испытывают немонотонные, но согласованные колебания между двумя предельными значениями. Если эти значения сопоставить с характерными изменениями тех же параметров при фотоактивации, то выясняются любопытные особенности. Минимумы на верхней кривой, представляющей деформируемость эритроцитов, соответствуют пониженной активности клеток, с которой начинается облучение, а максимумы отвечают предельной активности клеток в момент оптимальной фотоактивации. Разности между максимумом и минимумом на обеих кривых с хорошей точностью равны “амплитуде” фотоиндуцированных изменений соответственно коэффициента деформируемости клеток и показателя преломления внеклеточной среды. Действительно, если клетки находятся в состоянии предельной активности, не следует ожидать от облучения активирующего действия. На температурной шкале в физиологическом интервале участки активации и инактивации эритроцитов чередуются. Фотоактивация происходит только тогда, когда клетки находятся в зонах обратимой термически индуцированной инактивации.

4.6. Клиническая верификация

Экспериментально-клинические исследования проводились в отделении терапии больницы №13 УЗ г. Москвы. Пациенты – мужчины в возрасте от 47 до 65 лет с диагнозом “стенокардия напряжения 1 и II функционального класса” (всего 86 человек), имевшие назначение на лазерную терапию, были распределены по клиническим и возрастным показателям в более или менее однородные группы по 4-10 человек. Каждая группа предназначалась для определения реакции клеток крови в процессе внутривенного облучения монохроматическим светом в одном из выбранных участков спектра. Было учтено, что двухнедельный курс лазерной терапии (один раз в полгода) состоит из 5-6 процедур [51]. Поэтому пациенты, в целях исключения любых клинических осложнений из-за применения не имеющих официального разрешения Минздрава РФ лазерных





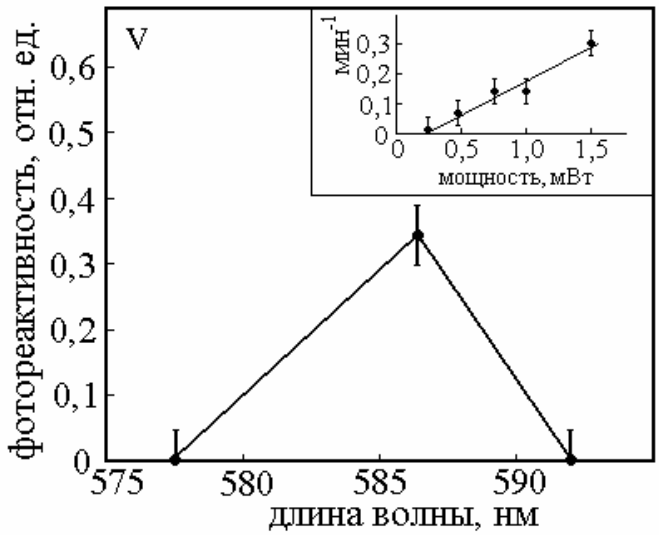


Рис. 13 Развитие фотоиндуцированной реакции в крови пациентов, страдающих ишемической болезнью сердца, в течение процедуры внутривенного облучения крови на длине волны 633 нм. (1, 2) – He-Ne лазер, 1 мВт; (3) – 1.5 мВт; (4–6) – лазер «Малахит» импульсно-периодический режим: (4) – 1 мВт, (5) – 5 мВт, (6) – 10 мВт (средняя мощность).

Рис. 14 Спектры действия *in vivo* в полосах IV и V, построенные по данным, аналогичным приведённым на рис. 16. На врезках – линейные характеристики активации.

аппаратов, подвергались экспериментальному облучению один раз за курс и только при первой процедуре.

К моменту измерений эритроциты были полностью оксигенированы. Временная зависимость *ε(t)* у большинства пациентов (более 90%) имела ту же колоколообразную форму, как и *in vitro*. Эритроциты остальных пациентов не выявили отчетливой реакции на процедуру. На рис.13 представлены примеры кривых *ε(t)* в наиболее широко

используемой в медицине спектральной “точке” 633 нм [65]. Как видно из этих данных, непрерывное излучение (He-Ne лазер) и импульсно-периодическое (лазер на красителях с накачкой от лазера на парах меди, 15 кГц, 15 нс) имеют одинаковую эффективность по влиянию на деформируемость эритроцитов, что согласуется с результатами *in vitro*.

На рис.14 показаны спектры действия *in vivo* в окрестности полос 1V и V [65]. Из сопоставления с рис.2 и 3 следует, что полученные спектры во всех основных чертах (особенности формы, ширина и положение максимумов спектральных полос) соответствуют спектру поглощения растворенного молекулярного кислорода. Подчеркнем еще раз, что кислород в суспензии эритроцитов поглощает свет на 5-6 порядков слабее оксигемоглобина, однако именно кислородные молекулы запускают фотоактивацию: гемоглобин выступает как пассивный поглотитель, трансформирующий энергию фотонов в теплоту. Это непосредственно следует из сравнения спектров действия со спектром поглощения гемоглобина.

Сводка данных по активации в измеренных полосах поглощения кислорода приведена в таблице 4.

Таблица 4. Спектральные и энергетические параметры лазерной активации *in vitro* и *in vivo* в полосах поглощения молекулярного кислорода.

Номер полосы поглощения O_2*	Длина волны, нм	Интенсивность облучения, мВт/см^2	Время проявления максимума активации, мин	Оптимальная доза, Дж	Примечания
I	1264	0,33	3,17 ± 0,30	0,10 ± 0,01	*in vitro*: суспензия эритроцитов, 0,3% об., 8 мл, облучаемая площадь ≈ 3 см^2
I I	1064	100	0,5 ± 0,1	9,0 ±1,0	*in vitro*
I I I	762	3,3	3,17 ± 0,45	1,0 ± 0,15	*in vitro*
IV	633 638 633 633 639	16,7 16,7 1,0** 1,0** 1,0**	6,0 ± 1,0 2,5 ± 0,8 20,0 ± 2,0 20,0 ± 2,0 5,0 ± 0,5	18,0 ±3,0 7,5 ± 2,4 1,2 ± 0,12 1,2 ± 0,12 0,3 ± 0,03	He-Ne лазер «Яхрома 1» *in vivo*, He-Ne лазер *in vivo*, имп. режим *in vivo*
V	587 587	100 1,0**	1,5 ± 0,1 6,0 ±2,0	27,0 ± 1,8 0,36 ± 0,12	*in vitro* *in vivo*
ФДЭ***	633	1,3	2,0 ± 0,2	0,48 ± 0,05	Диацетат гематопорфирина, 40 мкМ

Примечания: *- см. рис. 9.; **- мощность на выходе световода внутри вены; ***- фотодинамическое воздействие *in vitro*

5. Обсуждение результатов

5.1. Фазы светокислородного эффекта

Результаты динамического контроля с использованием различных экспериментальных методик, благодаря взаимной временной привязке, позволяют представить картину последовательных стадий реакции клеток на облучение. Фаза активации в однородной суспензии эритроцитов обратима хотя бы потому, что из нее можно выйти или в нее войти изменением температуры. Обратимость объясняется тем, что ведущим процессом ранней стадии фотоотклика являются структурные изменения во внеклеточной водной среде и на мембране. С физической точки зрения, это фазовый переход, разумеется, сопровождаемый биохимическими сдвигами, в физиологических терминах - стереотипная адаптивная реакция.

Не прекращая облучения после достижения максимума активации и используя метод оксидоредуктометрии [66], мы наблюдали уменьшение скорости выхода электронов из эритроцитов через мембрану, нарастающее по мере повышения интенсивности облучения. Чтобы скомпенсировать убыль отрицательного заряда, соответственно должен снижаться выход наружу протонов, что и замечено в клетках тканевой культуры, подвергаемой фотодинамическому воздействию, с помощью контроля внутриклеточного pH методом люминесцентного зонда флуоресцеина в работе [67]. Из литературы известно, что трансмембранный электрон-протонный транспорт связан с важнейшими событиями в жизни клеток [68]. Уменьшение его интенсивности может означать, что в эритроцитах усиливаются окислительные процессы, вынуждающие клетки развернуть часть потока восстановительных эквивалентов (e^- и H^+) на собственные нужды [53]. После прекращения облучения восстановление исходного состояния происходит медленно, а при значительных световых нагрузках лишь частично. Эту стадию можно назвать фазой оксидативного стресса.

Когда энергетическая доза облучения достигает примерно десятикратной величины по отношению к дозе оптимальной активации, эритроциты, судя по данным светорассеяния (вольюметр), теряют способность стабилизировать свой объем, начиная набухать. Поскольку мембрана практически нерастяжима, объем эритроцита может возрастать до полутора раз за счет исчезновения вогнутостей [69]. Процесс связан с нарушением осмотического равновесия, которое стабилизируется разнонаправленными трансмембранными потоками ионов натрия и калия. Прервав облучение, мы наблюдали постепенное изменение параметров светорассеяния на двух длинах волн в противоположную сторону, к исходным значениям. Это может означать, что система активного транспорта (Na^+-K^+ насос), действующая против трансмембранного градиента ионов, не повреждается, а механизм набухания обусловлен увеличением ионной проницаемости мембраны (возникновением дефектов в ионных каналах).

Набухание заканчивается разрывом мембраны и гибелью эритроцитов, причем, в отличие от ранней фазы, где клетки реагируют на свет синхронно, их деструкция происходит последовательно. Поскольку в эритроцитах нет генетического аппарата, это наводит на мысль, что и общее явление апоптоза скорее результат коллективного соглашения, нежели гибель клеток, запрограммированная в каждой из них. Приближенное

Рис. 15. Фазы светокислородного эффекта.

соотношение между энергетическими дозами поглощенного излучения, соответствующими проявлению изменений в структуре водной фазы (активация) и подсистемах электрон-протонного и ионного транспорта, составляет 1:10:100 (рис. 15).

Если частицы, ответственные за перенос энергии и энтропии в последних фазах светокислородного эффекта, физике давно известны, то с определением переносчика взаимодействия в структурной фазе возникают затруднения. Анализ наших и литературных данных [49] наводит на мысль, что решающую роль в структурных превращениях играют своеобразные волны возмущений магнитной природы, распространяющиеся по водородным связям, тогда как активными центрами, управляющими динамикой волновой картины, являются парамагнитные молекулы кислорода.

Когда в элементарном акте светокислородного эффекта молекула кислорода поглощает фотон, ее магнитный момент мгновенно (10^{-14} – 10^{-15} с) исчезает, так как кислород в синглетном состоянии имеет нулевой спин. Молекулы воды в ближайшем окружении испытывают при этом сильное магнитное возмущение: производная от магнитной индукции по времени на восемь порядков превышает технически достижимые значения в современных термоядерных установках. Распространясь, по-видимому, в виде волн вдоль водородных связей, возмущения достигают наружной поверхности клеточной мембраны и производят там, благодаря спин-орбитальным взаимодействиям, перестройки гидратной оболочки, структуры мембранных ферментов и липидной матрицы (бислоя).

Через некоторое время (10^{-7}-10^{-8} с) СМК дезактивируется в основное состояние триплетного кислорода, и вновь возникает магнитный микровзрыв (точнее, нановзрыв), уже с противоположным знаком. Однако некоторые перестройки успели произойти, поэтому изменения продолжают накапливаться, и клетки активируются совместно, будучи объединены единым волновым процессом. Фазовый переход происходит в самом пике активации, где эритроциты достигают наивысшей степени синхронизации.

Волны магнитных возмущений (если их существование удастся подтвердить) должны взаимодействовать с магнитным вектором электромагнитной волны и с внешним магнитным полем. Это вероятный кандидат на роль распределенного рецептора организма

для СВЧ излучений и слабых магнитных полей. Вследствие своей связи со структурой водной фазы на них могут влиять возмущающие эту структуру акустические поля. Именно они, по нашему мнению, являются тем глубинным звеном, благодаря которому в организме происходит интерференция разнообразных факторов физической и химической природы.

5.2. Независимые подтверждения

Данное исследование – первое обобщение физических и биологических данных по светокислородному воздействию, до сих пор мало доступных вследствие публикаций в узко специализированных изданиях. Сфера его действия, вероятно, весьма широка. В частности, с проявлениями эффекта столкнулся, хотя и не найдя правильного объяснения, ряд исследовательских групп из США и Германии, занимающихся применением оптических ловушек (твизеров) [70] для генетических манипуляций с одиночными клетками. В работе [71] клетки экзотического “крысиного кенгуру” (rat kangaroo), находящиеся в метафазе, удерживались от 0,3 с до 5 мин световым давлением, создаваемым сфокусированным плавно перестраиваемым по длине волны титан-сапфировым лазером в диапазоне 700 – 840 нм. Лазер излучал 130 мВт, создавая в фокальном пятне 0,5 мкм огромную плотность мощности. Термическое действие света контролировалось: повышение температуры было пренебрежимо мало – около 1,5 градуса. После экспозиции лазер выключался, и в клетках, с помощью видеосъемки под микроскопом, анализировалось число аномальных митозов в зависимости от длины волны. Выбранный спектральный диапазон включает полосу поглощения кислорода III, и в ней должен наблюдаться светокислородный эффект, но не активации, а повреждения (велика доза СМК). Сравнение со спектром действия в этой полосе (см. рис. 10) показывает, что так оно и есть. (Авторы отметили, что “природа поглощения и последующего действия на клетки неизвестна”).

Аналогичные данные, включающие еще две полосы поглощения кислорода около 900 и 1064 нм, получены в работах [72-75]. При используемых в твизерах больших световых потоках нет ничего удивительного в том, что авторы наблюдали двухфотонную люминесценцию. Однако их вывод, что именно поглощение фотонов с удвоенной энергией хромосомами есть причина внутриклеточных нарушений, не выдерживает критики. Повреждающее действие видимого света в окрестности второй гармоники излучения 762 нм (381 нм) и, тем более, 1064 нм (532 нм) при заведомо ничтожных интенсивностях (регистрируемых лишь с помощью фотоумножителя) никем ранее не отмечалось и маловероятно. (В подсветке обычных световых микроскопов интенсивность излучения в данных спектральных интервалах намного выше).

Светокислородный эффект, инициируемый излучением 1264 нм в физико-химических системах (растворы химических ловушек синглетного кислорода - нафтацена и дифенилизобензофурана в четыреххлористом углероде, этаноле и тяжелой воде) вне собственных полос поглощения этих соединений, наблюдался в работе [76]. Поскольку эффект регистрировался по изменению спектра поглощения растворов спектрофотометром, использовались большие значения мощности и энергетической дозы лазерного излучения, приводящие к окислению указанных соединений.

5.3. Механизм активации на организменном уровне

Рассмотрим, как осуществляется активирующее действие света в варианте внутривенного облучения. Кровь в оптическом диапазоне практически непрозрачна, благодаря чему выходящее из торца световода излучение почти нацело поглощается внутри вены. Перемножив мощность на выходе световода и время экспозиции, получаем энергетическую дозу поглощенного излучения. Затем, зная длину волны, можно рассчитать и число N (относительное, т.к. пока неизвестен универсальный коэффициент пропорциональности, однако для практики это не существенно) активных молекулярных агентов (СМК), генерированных за процедуру.

Оптимальная активация происходит при одном и том же универсальном значении N_o, независимо от возраста, пола, веса и других особенностях человека. Это – основной закон лазерной (светокислородой) терапии. Отсюда можно заключить, что мы имеем здесь дело с высокой медицинской технологией, требующей строгого контроля и ответственного исполнения.

Из всей энергии света, поглощаемой кровью, на возбуждение молекул кислорода расходуется примерно 10^{-5} часть; остальные 99,999% трансформируются в теплоту, которая, ввиду малости, не оказывает на процесс заметного влияния. В каждом элементарном акте, т.е. генерации и активации одной молекулы синглетного кислорода, выделяется одно и то же количество электромагнитной энергии. Соответствующие кванты не остаются в месте образования, а распространяются по всей системе крови. Поэтому для диагностических целей можно брать пробы крови в любой части тела, например, из пальца.

Основой жидкой фазы крови является вода. Ее молекулярная структура универсальна, как и внутримолекулярная структура универсального фоторецептора кислорода. Поэтому универсален закон их совместного возбуждения (дисперсионной среды) и активации взвешенных в водной матрице частиц (дисперсной фазы), в частности, эритроцитов.

У здорового человека эритроциты активированы, и он вряд ли ощутит результат светового воздействия. Однако в организме больного активность красных клеток снижена, и фотоиндуцированный процесс получает сложное, во многих деталях неизвестное, продолжение. Проследим лишь один канал, связанный с эритроцитами.

Отправным пунктом является факт пониженной деформируемости клеток крови. Для клеток с повышенной жесткостью мельчайшие капилляры представляют трудно преодолимое препятствие, и клетки текут обходными путями сквозь более крупные шунты. Но значительная часть тканевых клеток получает кислород от тончайшей

капиллярной сети. Из-за кислородного голодания они вырабатывают меньше молекул АТФ. В режиме энергетического дефицита тканевые клетки снижают свою активность, в частности, скорость структурных и биохимических превращений. Если патологический процесс прогрессирует, то при некотором критическом режиме кислородного голодания организм жертвует наиболее слабым органом (не обязательно с наименьшей энергетикой), и тот начинает давать отказ. Возникает специфический симптом, который диагностируется и лечится как конкретное заболевание.

Ввод в суспензию эритроцитов или в кровь оптимальной дозы СМК, генерируемого благодаря резонансному поглощению фотонов молекулами кислорода, вызывает повышение эластичности красных клеток до предельного уровня. Другими словами, эритроциты максимально активируются. В организме это влечет за собой восстановление кислородного снабжения тканевых клеток, нормализацию их энергетики и постепенное улучшение состояния человека, независимо от того, каким был диагноз заболевания. Так объясняется основная особенность лазерной терапии - неспецифичность.

Заключение

Хотя ожидалось, что за универсальное биологическое действие света отвечает какая-то молекула неферментной природы, обнаружение в этом качестве растворенного во внеклеточной среде молекулярного кислорода, поразительно во многих отношениях. По-видимому, оно повлечет за собой пересмотр ряда незыблемых доктрин в науках о жизни, и труднее всего будет восприниматься биологами. В фотобиологических процессах, изученных до последнего времени, рецепторами выступают пигменты белковой природы, относящиеся к классу ферментов. К тому же, известные фоторецепторы нормально функционируют в структурной связи с мембранами. Выполненные нами разнообразные тесты свидетельствуют об активном действии в крови свободного, а не связанного с гемоглобином кислорода, хотя дыхательный пигмент там

преобладает, и его сечение поглощения в оптическом диапазоне на пять-шесть порядков больше.

Но как бы это не воспринималось, так устроена природа, и светокислородная рецепция позволяет объяснить непонятные, но многократно подтвержденные наблюдения клиницистов, в частности, отсутствие специфичности действия He-Ne лазера. Молекулы кислорода присутствуют в крови любого человека, имеют несколько полос поглощения, в том числе в красной области спектра. Если вспомнить о решающей роли кислорода и воды в глобальных явлениях жизни - фотосинтезе и клеточном дыхании, то можно, в самых общих чертах, понять и причину универсальности активирующей дозы СМК независимо от конкретного вида патологии и индивидуальных особенностей пациента. Она – в гармоничном сосуществовании этой молекулы на молекулярно-квантовом уровне с водным окружением и со всей погруженной в воду биологической субстанцией.

Согласно правилам отбора квантовой механики, переход молекулы кислорода в возбужденное состояние посредством поглощения оптических квантов запрещен по спину и орбитальному моменту, т.е. происходит с крайне малой вероятностью. Следовательно, молекулярный кислород может быть возбужден светом, но в очень малом количестве. Световая доза активации соответствует не более 10^{10}-10^{11} фотонов, поглощенных кислородом, что, в ряде опытов на два-три порядка меньше общего числа клеток, однако активация завершается полностью. Объяснить развитие активационного процесса так, как это принято в современном физическом исследовании, мы пока не умеем, однако учет экспериментальных фактов, не вошедших в данный обзор, количественные оценки и сравнения с данными других исследователей позволяют наметить хотя и фрагментарную, но непротиворечивую схему активации.

В основном состоянии молекула кислорода, триплет или бирадикал, обладает большим магнитным моментом, так как имеет на соседних атомах по одному неспаренному электрону. Молекулам воды, благодаря двум протонам, также присущ

магнетизм, и хотя протонные магнитные моменты на три порядка меньше, зато в ближайшем окружении кислородной молекулы их на три порядка больше. Магнитное взаимодействие создает вокруг каждой кислородной молекулы динамическую водную структуру, своеобразный магнитный кластер.

В результате резонансного поглощения фотона молекула кислорода переходит на один из уровней возбуждения электронной оболочки, являющихся синглетными. Это означает, что практически мгновенно в данной окрестности исчезает связанное с электронными спинами магнитное поле. Магнитное, точнее, магнитоэлектрическое, возмущение не может остаться на месте, оно распространяется по водородным связям водного кластера и в виде волны уходит в систему.

Тем временем, в возбужденной молекуле кислорода также происходит ряд событий. Если произошел переход на относительно высокий энергетический уровень, например, $^1\Sigma^+_g$, полоса III, 762 нм, то с него молекула быстро, в течение пикосекунд, “скатывается” по колебательно-вращательным подуровням в наиболее устойчивое состояние $^1\Delta_g$. Поэтому результат активации не зависит от того, в какой полосе поглощения кислорода производить облучение - это вопрос удобства. Имеет значение только общее количество синглетного кислорода, генерируемое за экспозицию, и оно сильно зависит от длины волны.

Время жизни СМК порядка десятков наносекунд, и соответствующая диффузионная длина не более сотни нанометров, что много меньше среднего расстояния между эритроцитами. Образуясь в водной фазе, СМК в ней и погибает, чтобы возродиться в исходной триплетной форме. Дезактивация столь же коротка, как и прямой переход, не более периода электромагнитной волны, и вновь сопровождается локальным магнитным ударом. Одновременно выделяется квант электромагнитной энергии 0,98 эв. Соответствующая волна также уходит в систему.

Два разделенных по времени и симметричных по электромагнитной структуре возмущения являются сопряженными элементарными актами активации. Волны возмущений циркулируют по объему системы, пока не перейдут на подходящую макромолекулу, например, на мембранный фермент. Тогда белковая молекула претерпит конфигурационные перестройки - это тоже волны, сигналы от которых в виде волны структурных изменений могут циркулировать уже по мембране как по возбудимой среде.

Но этим дело не ограничивается – поскольку каждый из липидных слоев мембраны граничит с водным раствором, прохождение мембранных волн сопровождается перестройками водородных связей на границах раздела фаз. Возникающие при этом структурные возмущения водной фазы распространяются по водородным связям в цитоплазму и внеклеточную среду. Внутри клетки они управляют подвижностью и активностью растворенных ферментов, определяя взаимосогласованный ход биохимических превращений. Вне клетки они переходят на мембраны других эритроцитов, а в цельной крови и на другие компоненты, индуцируя разветвленные цепи перестроек, аналогичные перестройкам водородных связей. Следовательно, они не могут ни возникать, ни исчезать, а генерация и дезактивация СМК только модулирует их. Это вечное движение змеи за собственным хвостом, существующее без нашего облучения, и причина, и цель которого – стремление к синхронизации. В таком случае, биосистема будет использовать любые подходящие внешние стимулы, чтобы синхронизовать свои компоненты, и становится понятным многообразие способов синхронизации клеточных культур.

Таким мы представляем себе механизм развития активации – в максимуме деформируемости эритроцитов это предельно возможная в заданных внутренних условиях синхронизация суспензии эритроцитов *in vitro* и кровеносной системы *in vivo*. В основных чертах, механизм может быть перенесен на иные виды воздействий, различие

будет лишь в начальном, пусковом звене. Например, в случае магнитных полей рецепция может осуществляться распределенной системой магнитных волн.

В терминах клеточной биологии и физиологии механизм активации представляется следующим образом. Эритроциты выполняют многообразные функции, но одна – транспорт кислорода в ткани и удаление углекислоты – присуща только им. После загрузки гемоглобина кислородом они выгружают его в кровеносных капиллярах, просвет которых меньше диаметра эритроцитарного диска. Для выполнения этой задачи эритроцит должен сжаться в поперечном направлении и удлиниться вдоль течения. (Вероятно, таким способом в мембране включается фазовый переход, ускоряющий выход кислорода). Такую возможность гарантирует двояковогнутая форма клетки и отсутствие цитоскелета, роль которого выполняет гибкая подмембранная сеть на основе длинных цепей белка спектрина. Тенденция к повышению энтропии является причиной свертывания спектриновых цепей в клубки, растягивающиеся при входе в капилляр под действием артериального давления. Способность сети к растяжению регулируется в широких пределах, в частности, сдвигом температуры от оптимального значения 36,6°С. Воздействие неблагоприятных факторов модифицирует динамическую структуру водной фазы, вызывая стабилизацию спектриновой сети и снижение деформируемости клеток. Прохождение эритроцитов сквозь капилляры затрудняется, и это сразу сказывается на энергетике тканевых клеток. Наступает кислородное голодание клеток, гипоксия – исходная причина многих патологий.

Инактивация эритроцитов, выражающаяся в уменьшении их деформируемости принципиально обратима. Поэтому можно эффективно воздействовать на многие патологические состояния, и удобнее всего использовать для этой цели свет. Так обеспечивается коррекция гемодинамики, в более широком смысле, улучшение микроциркуляции, а, следовательно, активация обменных и энергозависимых процессов в организме.

Однако на сегодня это потенциальная возможность, лишь частично используемая в клинике; чтобы реализовать ее в полном объеме, необходимы объективные критерии для определения показаний на световое лечение и контроль спектрального состава излучения, как ныне контролируется мощность. При соблюдении этих условий для облучения крови можно использовать сверхизлучающие светодиоды с $\Delta\lambda = 20$ нм, центрированные на максимум кислородной полосы. Таким образом, световое воздействие выступает в роли фотонного лекарства, являющееся весьма тонким, но отнюдь не безобидным инструментом управления физиологическими функциями. По наукоемкости и профессиональным требованиям к обслуживающему персоналу лазерная терапия как технология и как наука, сопоставима с медицинскими применениями ионизирующих излучений и радиобиологией.

Полезные человеку качества оптического излучения, вероятно, эволюционно обусловлены. В спектре дневного света интенсивность в абсорбционных полосах кислорода на порядок меньше необходимой для полной активации крови. Но позитивное действие все же существует. Через сосуды, выходящие к поверхности кожи, в кровь непрерывно вливаются потоки фотонов, генерируя синглетный кислород с его целительным и тонизирующим действием. Можно предположить, что именно это обстоятельство, через механизм естественного отбора стимулировало выход раннего человечества из пещер и подземных жилищ к свету.

Литература

1. *Гаусман В., Фолк Р.* Руководство по светолечению. М.-Л.: Госмедиздат, 1929. 394 p.
2. Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1901-1921. Amsterdam: Elsevier, 1967.
3. *Goldman L.* Biomedical aspects of the laser: the introduction of laser applications into biology and medicine. New York: Springer, 1967. 232 p.
4. *Gamaleya N.F.* // Laser biomedical researches in the USSR, in Laser applications in medicine and biology, V.3 / Ed. M.L. Wolbarsht. New York: Plenum, 1977. P. 1-175.

5. *Мешалкин Е.Н., Сергиевский В.С.* Применение прямого лазерного излучения в экспериментальной и клинической медицине. Новосибирск: Наука, 1981. 172 с.
6. *Крюк А.С., Мостовников В.А., Хохлов И.В., Сердюченко Н.С.* Терапевтическая эффективность низкоинтенсивного лазерного излучения. Минск: Наука и техника, 1986. 231 с.
7. *Ohshiro T., Calderhead R.G.* Low level laser therapy: a practical introduction. Chichester; New York: John Wiley & Sons, 1988. 137 p.
8. *Корочкин И.М., Романова Т.М., Капустина Г.М.* // Применение гелий-неонового лазера в клинике внутренних болезней. Советская медицина. 1984. № 2. С. 6-10.
9. *Илларионов В.Е.* Основы лазерной терапии. М., «Респект», 1992. 122 с.
10. *Козлов В.И., Буйлин В.А., Самойлов Н.Г.*, *Марков И.И.* Основы лазерной физио- и рефлексотерапии. Самара-Киев, 1993. 216 с.
11. *Брилль Г.Е., Романова Т.П., Прошина О.В., Беспалова Т.А.* Применение низкоинтенсивного лазерного излучения в качестве физического адаптогена при действии на организм стрессорных факторов. Пособие для врачей и научных работников. Саратов: Изд. Саратовского мед. университета, 1998. 32 с.
12. *Москвин С.В.* Эффективность лазерной терапии. М.: Техника, 2003. 256 с.
13. *Фридрих П.* Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы. М.: Мир, 1986. 376 с.
14. *Амбарцумян Р.В., Елисеев П.Г., Еремеев Б.В., Захаров, С.Д., Максудов Б. М.* // Биологическое действие лазерного излучения на эритроциты в инфракрасной полосе поглощения молекулярного кислорода. Краткие сообщения по физике. 1987. № 10. С.35-37.
15. *Karu T.I.* // Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. IEEE J. Quant. Electronics. 1987. V. QE-23. P.1703-1717.
16. *Гамалея Н.Ф., Шишко Е.Д., Яниш Ю.В.* // Чувствительность неретинальных клеток животных и человека к видимому свету. В сб. «Молекулярные механизмы биологического действия оптического излучения» / Ред. А.Б. Рубин. М.: Наука, 1988. С. 189-198.
17. *Горбатенкова Л.М., Азизова О.А., Парамонов Н.В., Владимиров Ю.А.* // Механизм фотореактивации супероксиддисмутазы светом гелий-неонового лазера. Доклады АН СССР. 1988. Т. 299. С. 995-1000.
18. *Мостовников В.А., Мостовникова Г.Р., Плавский В.Ю., Третьяков С.А.* // О молекулярном механизме терапевтического действия низкоинтенсивного лазерного

излучения видимого спектрального диапазона. Известия АН СССР, серия физ. 1990. Т.54. С. 1636-1642.

19. *Lubart R., Friedmann H., Peled I., et al.* // Light effect on fibroblast proliferation. Laser Therapy. 1993. V. 5. P. 55-57.
20. *Гамалея Н.Ф., Шишко Е.Д., Яншин Ю.В.* // Механизм лазерной биостимуляции – факты и гипотезы. Известия АН СССР, серия физ. 1986. Т. 50. С.1027-1032.
21. *Девятков Н.Д., Зубкова С.М., Лапрун И.Б., Макеева Н.С.* // Физико-химические механизмы биологического действия лазерного излучения. Успехи современной биологии. 1987. Т. 103, С. 31-43.
22. *Karu T.I.* The science of low-power laser therapy. London: Gordon & Breach Sci., 1989. 320 p.
23. *Владимиров Ю.А.* // Три гипотезы о механизме действия красного (лазерного) света. В сб. «Эфферентная медицина» / Ред. С.Я Чикин. М.: НИИ физ.-хим. медицины, 1994. С. 23-35.
24. *Кару Т.И.* // Клеточные механизмы низкоинтенсивной лазерной терапии. Успехи современной биологии. 2001. Т.121. С. 110-116.
25. *Чудновский В.М., Леонова Г.Н., Скопинов С.А., Дроздов А.Л., Юсупов В.И.* Биологические модели и физические механизмы лазерной терапии. Владивосток: Дальнаука, 2002. 158 с.
26. *Конев С.В., Лыскова Т.И., Прокопова Ж.В.* // Стимулирующее действие видимого света на деление и дыхание дрожжевых клеток. Известия Укр. АН. 1970. Т. 6. С. 51-56.
27. *Чеботарев Л.Н., Землянухин А.А.* // О действии света на метаболизм дрожжей Torulopsis sphaerica. Научн. докл. высш. школы: биол. науки. 1970. № 7. С.37-39.
28. *Рубин Л.Б., Еремеева О.В., Фрайкин Г.Я., Швинка Ю.Э.* // О существовании у организмов фотохромной системы регуляции. Доклады АН СССР. 1973. Т. 210. С. 971-975.
29. *Karu T.I.* // Activation of metabolism of nonphotosynthesizing microorganisms with monochromatic visible (laser) light: a critical review. Lasers in Life Sciences. 1996. V. 7. P. 11-33.
30. *Кару Т.Й.* // О молекулярном механизме терапевтического действия излучения низкоинтенсивного лазерного света. Доклады АН СССР. 1986. Т. 291. С. 1245-1249..

31. *Мантейфель В.М., Бакеева Л.Е., Кару Т.Й.* // Облучение He-Ne лазером изменяет ультраструктуру митохондрий в последующих генерациях дрожжевых клеток. Доклады АН СССР. 1999. Т. 366. С. 702-704.
32. *Сетлоу Р., Поллард Э.* Молекулярная биофизика. М.: Мир, 1964. 437 с.
33. *Кару Т.Й., Календо Г.С., Летохов В.С., Лобко В.В.* // Зависимость биологического действия низкоинтенсивного видимого света на клетки *HeLa* от когерентности, дозы, длины волны и режима облучения. Квантовая электроника. 1983. Т. 10. С. 1771-1776.
34. *Тифлова О.А., Кару Т.Й.* // Действие монохроматического видимого света на рост E.coli. Микробиология. 1987. Т. 56. С. 626-630.
35. *Тимирязев К.А.* Жизнь растения, 5-е изд. М.: Изд. В. Маракуева, 1899. 334 с.
36. *Чижевский А.Л.* Структурный анализ движущийся крови. М.: Изд. АН СССР, 1959. 290 с.
37. *Evans E.A., Hochmuth R.M. // Membrane viscoelasticity.* Biophysical J.: 1976. V. 16. P. 1-13.
38. *Чернух А.М, Александров П.Н., Алексеев О.В.* Микроциркуляция. М.: Медицина, 1985. 432 с.
39. *Bessis M., Weed R.I., Leblond P.F.* Red cell shape. New York; London; Paris: Springer, 1973. 170 p.
40. *Skalak K., Tozeren A., Zarda R.P., Chien S.* // Strain energy function of red cell membrane. Biophysical J.: 1973. V. 13. P. 245-264.
41. *Ивенс И., Скейлак Р.* Механика и термодинамика биологических мембран. М.: Мир, 1982. 304 с..
42. *Schmid-Schnbein H., Wells R.* // Fluid drop-like transition of erythrocytes under shear. Science. 1969. V. 165. P. 288-291.
43. *Hochmuth R.M., Mohandas N.* // Unixial loading of the red cell membrane. J. Biomechanics. V. 5. P.501-509.
44. *Chien S.* // Principles and techniques for assessing erythrocyte deformability. Blood Cells. 1977. V. 3, P. 71-99.
45. *Corry W.D., Meiselman H.J.* // Deformation of human erythrocytes in a centrifugal field. Biophysical J. 1978. V. 21, 19-34.
46. *Groner W., Mohandas N., Bessis M.* // New optical technique for measuring erythrocyte deformability with the ectacytometer. Clinical Chemistry. 1985. V. 26. P.1435-1442.
47. *Zakharov S.D.* // Measurement of the erythrocyte response to low-level external action. Proc. SPIE. 1993. V.1884. P.181-188.

48. *Захаров С.Д.* // Энтропийный характер упругости живой клетки (эритроцита). Краткие сообщения по физике. 1986. №2. С. 3-5.
49. *Захаров С.Д., Иванов А.В., Вольф Е.Б., Данилов В.П., Нгуен К.Т., Новиков Е.Г., Панасенко Н.А., Перов С.Н., Скопинов С.А., Тимофеев Ю. П.* // Структурные перестройки в водной фазе клеточных суспензий и белковых растворов при светокислородном эффекте. Квантовая электроника. 2003. Т.33. С.149-162.
50. *Левтов В.А., Регирер С.А., Шадрина Н.Х.* Реология крови. М.: Медицина, 1982. 270 с.
51. Применение излучения гелий-неонового лазера для лечения ишемической болезни сердца (методические рекомендации). М.: Минздрав СССР, 1987. 21 с.
52. *Захаров С.Д., Еремеев Б.В., Тээсалу Р.В., Вийгимаа М.В.* // Деформируемость и сдвиговая деградация эритроцитов при остром инфаркте миокарда, определяемая лазерным дифракционным методом. Медицинская физика. 2000. №8. С. 48-53.
53. *Захаров С.Д., Иванов А.В.* // Светокислородный эффект в клетках и перспективы его применения в терапии опухолей. Квантовая электроника. 1999. Т. 29. С. 192-214.
54. *Захаров С.Д., Еремеев Б.В., Перов С.Н., Панасенко Н.А.* // Методы лазерной биофизики и их применение в медицине / Ред. Н.О. Пеэт. Тарту: Изд. Тартуского Госуниверситета, 1989. С. 23- 46.
55. *Шинкаренко Н.В., Алесковский В.Б.* // Химические свойства синглетного молекулярного кислорода и значение его в биологических системах. Успехи химии. 1982. Т. 51. С. 713-735.
56. *Красновский А.А. мл. //* Биологические мембаны. 1998. Т. 15. С. 530-548.
57. *Long C., Kearns D.R.* // Selection rules for the intermolecular enhancement of spin forbidden transitions in molecular oxygen. J. Chemical Phys. 1973. V. 59. P. 5729-5736.
58. *Захаров С.Д., Еремеев Б.В., Перов С.Н.* // Сравнение эффектов лазерного воздействия на длинах волн 1,26 и 0,63 мкм на эритроциты. Краткие сообщения по физике. 1989. № 1. С. 15-16.
59. *Данилов В.П., Захаров С.Д., Иванов А.В., Мурина Т.М., Еремеев Б.В., Лаптев В.П., Машалов А.А., Новиков Е.Г., Панасенко Н.А., Перов С.Н., Прохоров А.М.* // Спектрально-селективный фотодинамический эффект без экзогенных фотосенсибилизаторов и его возможные применения для фототерапии рака и биостимуляции. Изв. АН СССР, сер. физическая. 1990. №8. С. 1610-1620.

60. *Немцев И.З., Захаров С.Д., Лапшин В.П., Стажадзе И.Л., Менчуков У.Н., Перов С.Н., Иванов А.В., Панасенко Н.А., Армичев А.В.* // Обоснование применения гелий-неонового лазера в медицинской реабилитации больных с атрофиями. Авиокосм. и эколог. медицина. 1992. №2. С. 57-62.
61. *Armichev A.V., Ivanov A.V., Panasenko N.A., Perov S.N., Zakharov S.D.* // Spectral dependence of erythrocyte response of law-intensity irradiation at 570-590 nm. J. Russ. Laser Res. 1995. V.16. P.186-188.
62. *Noji S., Taniguchi S., Kon H.* // Spin label study of erythricyte deformability. Biophysical J. 1987. V. 52. P. 221-227.
63. *Wanghang R., Evans E.A.* // Thermoelasticity of red blood cell membrane. Biophysical J. 1979. V. 26. P. 115-132.
64. *Torger S.B., Arne M.* // Human erythrocyte spectrin dimers: intrinsic viscosity, temperature dependence and implications for molecular basis of the erythrocyte membrane free energy. Biochim. Biophys. Acta. 1985. V. 816. P. 102-110.
65. *Babenko E.V., Eremeev B.V., Kapustina G.M., Korochkin I.M., Soldatov A.N., Shumeiko A.S., Sukhanov V.B., Zakharov S.D. //* Copper-vapor laser application for the identification of primary photoreceptor by low level laser therapy of patients. J. Russian Laser Research. 1995. V.16. P. 181-18
66. *Захаров С.Д., Перов С.Н., Панасенко Н.А.* // Перенос электронов в системе «клетка – металлический электрод». Краткие сообщения по физике. 1989. № 1. С. 25-28.
67. *Хуршилова З.А.,Лейкина М.И. и др. //* Вестник Моск. Университета. Сер. 111. 1986. Т. 27. С. 79-88.
68. *Crane F.L., Sun T.L.* Biochim. Biophys. Acta. 1985. V. 811. P. 233-251.
69. *Атауллаханов Ф.И.* // Регулирование внутриклеточных процессов в эритроцитах. В сб. Физика живого / Ред. С.Д. Захаров. М.: Знание, 1986. С. 22-41.
70. *Ashkin A., Dziedzic J.M., Yamane T.* // Optical trapping and of single cells using infrared laser beams. Nature. 1987. V. 330. P. 769-771.
71. *Vorobjev I.A., Liang H., Wright W.H., Berns M.W.* // Optical trapping for chromosome manipulation: a wavelength dependence of induced chromosome bridges. Biophysical J. 1993. V. 64. P. 533-538.
72. *Konig K., Liang H., Berns M.W., Tromberg B.J.* // Nature. 1995. V.377. P. 20-21.

73. *Liang H., Vu K.T., Krishnan P., Trang T.C., Shin D., Kimel S., Berns M.W.* // Wavelength dependence of cell clonig efficiency after optical trapping. Biophysical J. 1996. V.70. P.1529-1533.
74. *Konig K., Liang H., Berns M.W., Tromberg B.J.* // Optics Letters. 1996. V. 21. P. 1090-1092.
75. *Schneckenburger H., Hendinger A., Sailer R., Gschwend M.H., Strauss W.S.L., Bauer M., Schutze K.* // Cell viability in optical tweezers: high power red laser diode versus Nd:YAG laser. J. Biomedical Optics. 2000. V. 5. P. 40-44.
76. *Красновский А.А, Дроздова Н.Н., Иванов А.В., Амбарцумян Р.В.* // Активация молекулярного кислорода инфракрасным излучением в аэробных системах, не содержащих пигментов. Биохимия. 2003. Т. 68. С. 1178-1182.