

## ЛАЗЕРОИНДУЦИРОВАННЫЙ СВЕТОКИСЛОРОДНЫЙ ЭФФЕКТ В ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

А.С. Юсупов, С.Д. Захаров

ГОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет,  
кафедра хирургии и онкологии с курсами онкологии и патологической анатомии ИПО  
Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Москва

Юсупов Азат Салихович,  
главный врач клиники «Лазер и здоровье», канд.мед.наук, доцент,  
450074, Россия, Республика Башкортостан,  
г. Уфа, пр. Октября, 73/1,  
тел. 8 (347) 232-50-93,  
email: lazer88@yandex.ru

*Представлены собственные экспериментальные и клинические данные по применению лазероиндуцированного светокислородного эффекта в онкологической практике. Описаны первичные механизмы фотодинамической терапии и лазероиндуцированного светокислородного эффекта. В работе подтверждаются обнаруженные режимы биостимуляции при фотосенсибилизированном воздействии и клеточной деструкции при светокислородной терапии, что позволяет сделать вывод об общей природе этих двух методов лечения и перспективности применения светокислородной терапии в онкологии.*

**Ключевые слова:** светокислородная терапия, фотодинамическая терапия, онкология.

## THE LASER-INDUCED LIGHT-OXYGEN EFFECT IN ONCOLOGICAL PRACTICE

A.S. Yusupov, S.D. Zakharov

Bashkir State Medical University,  
Surgery and Oncology Chair with courses of oncology and pathological anatomy  
Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow

*Own experimental and clinical data on application of the laser-induced light-oxygen effect in oncological practice are presented. Primary mechanisms of photodynamic therapy and the light-oxygen effect are described. The results obtained confirm existence of a biostimulation mode at the photodynamic therapy and a cellular destruction mode at the light-oxygen therapy that allows to draw a conclusion on the general nature of these two treatment techniques and considerable promise for application of the light-oxygen therapy in oncology.*

**The key words:** light-oxygen therapy, photodynamic therapy, oncology.

### Введение

Известно, что воздействие света на биологические системы проявляется двояким образом, например, солнечный свет умеренной интенсивности повышает защитные и регуляторные функции организма, в то время как длительное или интенсивное его воздействие может вызвать внутриклеточные нарушения [1,2,19,21]. Оба этих варианта воздействия находят отражение в лазерных медицинских технологиях: светотерапии, часто называемой низкоинтенсивной лазерной терапией (НИЛТ), или биостимуляцией [12,21], и фотодинамической терапией (ФДТ) злокачественных заболеваний [18,22,25]. Ши-

роко распространенным вариантом светотерапии в клинической практике является внутривенная обработка крови, в том числе и лазерная (ВЛОК) [10,12]. Технически метод прост в исполнении, но требует точного согласования длины волны и поглощенной световой дозы. Непосредственным результатом курса лечения является повышение функциональной активности сердечно-сосудистой системы и общего иммунного статуса. Несмотря на выраженный положительный эффект при многих заболеваниях, метод ВЛОК мало пропагандируется, т.к. принцип его действия основан на еще мало изученных магнитно-спиновых явлениях, влияющих на структуру воды в ор-

ганизме [9]. Напротив, ФДТ опухолей применяется редко, хотя для ее механизма действия давно найдено простое объяснение [25]. На самом деле, биофизические основы этих медицинских технологий тесно связаны между собой.

ФДТ злокачественных опухолей (а в последние годы и других заболеваний) реализуется посредством облучения опухолевой ткани, предварительно sensibilizированной специально подобранным красителем (фотосенсибилизатором). Любой фотосенсибилизатор (ФС) в той или иной степени токсичен. Он вводится в организм различными способами, чаще всего внутривенно, разносится кровью по всем органам, на какое-то время в них задерживается и затем выводится из организма естественным путем. Молекулы ФС встречают меньший энергетический барьер при адсорбции на патологически измененные ткани и десорбируются из них медленнее, поэтому имеется временной период, когда разность (контраст) между концентрациями ФС в опухолевых клетках и клетках окружающей здоровой ткани оказывается наибольшей. На этом этапе пораженную (и частично здоровую) ткань экспонируют к свету с длиной волны в пределах спектральной полосы поглощения ФС. Опухолевые клетки при этом повреждаются, а здоровые клетки остаются живыми.

В основе физического механизма клеточных повреждений лежит фотодинамический эффект, открытый более века назад (Raab O., von Tarpeiner H. - 1900). Процесс начинается с фотовозбуждения молекул ФС. Поглотив фотон, молекула переходит на один из электронных (синглетных) термов, откуда, в принципе, может возвратиться в исходное положение, испустив фотон. Однако фактически значительная часть возбужденных молекул испытывает т.н. интерконверсию: они оказываются на метастабильном (триплетном) уровне и освобождаются от избыточной энергии, как правило, за счет безизлучательного переноса энергии на ближайшую молекулу растворенного кислорода. При этом нет необходимости заботиться о наличии кислорода, так как он непрерывно доставляется ко всем тканям эритроцитами. В результате молекула кислорода переводится в электронно-возбужденное состояние  $O_2(^1\Delta g)$ , называемое синглетным кислородом, а молекула ФС возвращается в исходное состояние и вновь готова действовать. Синглетный кислород  $^1O_2$  токсичен; он относится к активным формам кислорода, и именно он инициирует цитотоксический эффект. ФС также обладает собственной токсичностью, проявляющейся с первых минут введения его в организм.

Механизм светотерапии, в частности, ВЛОК также связан с генерацией синглетного кислорода, но это достигается прямым фотовозбуждением растворенного кислорода [6,20]. Поэтому для СКТ требуются лазеры с иной длиной волны, чем для ФДТ. СКТ имеет более длительную историю. Первые попытки научного обоснования светотерапии связаны с именем датского врача-исследователя Нильса Финзена (1860-1904). Финзен показал, что различные участки видимого спектра имеют разную

лечебную эффективность. Он эмпирически выделил подходящий спектральный участок, успешно лечил оспу и туберкулез и за разработку этих методов получил в 1903 г. Нобелевскую премию по физиологии и медицине [10].

Активные поиски механизма светотерапии начались спустя шесть десятилетий в научных центрах СССР, Европы, США, Японии после появления лазеров. В качестве объектов исследования обычно использовались клеточные культуры. Был предложен ряд гипотез, включая фотореактивацию мембранных ферментов, поглощение фотонов во внутриклеточной дыхательной цепи, фотодинамический эффект на эндогенных фотосенсибилизаторах (протопорфирин), и даже такие экзотические, как оптический эффект Фредерикса [14]. Ни одна из этих гипотез не выдержала экспериментальной проверки, и к началу 80-х годов энтузиазм заметно ослаб. Систематические исследования механизмов продолжились, главным образом, в СССР - в Институте физики им. Б.М. Степанова (Минск), Центре технологических лазеров (Шатура, М.О.), Физическом институте им. П.Н. Лебедева (ФИАН, Москва). В методическом отношении основное внимание уделялось попыткам зарегистрировать спектр действия.

Измерение спектра действия - классический способ проверки фотобиологической гипотезы [11]. Так называют спектральную зависимость фотоиндуцированного эффекта на клеточных культурах или организмах. Чтобы убедиться в корректности метода, необходимо удостовериться в соблюдении фотобиологического принципа взаимности, а именно зависимости регистрируемого параметра должна быть пропорциональна световой дозе в достаточно широких пределах изменения дозы. Только в этом случае можно быть уверенным, что спектр действия подобен спектру поглощения неизвестного фоторецептора, даже если он содержится в клетках в ничтожной концентрации. Напротив, при сильной нелинейности полученный спектр окажется искаженной копией спектральной чувствительности фоторецептора; в этом случае его идентификация вряд ли будет успешной. Трудность заключается в том, что связь между событиями на микроуровне (изменение биохимической активности возбужденной молекулы-фоторецептора) и клеточными изменениями, измеряемыми на макроуровне, не обязана быть линейной. Между первичными актами поглощения фотонов и терминальными следствиями обычно происходит многозвенная цепь биохимических реакций и структурных трансформаций, и каждое звено может вносить свой нелинейный вклад. Предвидеть их влияние на современном этапе знаний невозможно. Поэтому выбор типа клеток исследователи производят одновременно с выбором диагностической методики, и оба имеют решающее значение. Конечный успех в значительной степени зависит от удачи, так как очевидно, что проверка на линейность может быть произведена только после окончательной разработки метода измерений.

По указанным причинам в течение четырех десятилетий было зарегистрировано не более десятка

спектров действия в низкоинтенсивном оптическом диапазоне. Большинство исследователей исходило из традиционного предположения, что биологическое действие света имеет фотохимическую природу, подобно известным фотобиологическим явлениям, таким как фотосинтез, зрительное восприятие, фоторегуляция роста растения. Другими словами, ожидалось, что лазерное излучение непосредственно воздействует на фоторецепторную биомолекулу, вызывая в ней конформационный переход, приводящий к активирующему эффекту. Поскольку биомолекулы имеют широкие полосы поглощения, для выделения спектральных участков падающего света из ламповых источников считалось достаточным использовать светофильтры или монохроматоры. Последнее обстоятельство особенно затруднило поиск, так как позднее выяснилось, что фотоотклик имеет место внутри относительно узких полос. По этой, а также по ряду других объективных и субъективных причин измеренные «спектры действия» фактически таковыми не были, т.к. отличались у разных авторов и не поддавались однозначной интерпретации. Лишь в конце 80-х годов детальный спектр действия был измерен в ФИАНе на красных клетках крови в инфракрасной области спектра [6]. Максимум биологического действия на длине волны (1264 нм), узкая ( $\approx 18$  нм) спектральная полоса и исчезновение всяких эффектов при удалении из суспензии кислорода однозначно свидетельствовали, что фоторецепторами являются молекулы растворенного кислорода, превращающиеся после поглощения фотонов в синглетный кислород. Позже аналогичный механизм был верифицирован в других полосах поглощения растворенного кислорода, как *in vitro* [3, 4, 8, 9, 13, 16, 17], так и на пациентах во время курса НИЛТ [10,17], а само явление получило название светокислородного эффекта (СКЭ).

Поскольку в механизмах ФДЭ и СКЭ имеется общее звено – генерация синглетного кислорода, естественно было предположить, что оба явления имеют потенциально одинаковые применения, т.е. первое из них может использоваться для биостимуляции (например, заживление ран), а второе – для деструкции злокачественных клеток. Эти предположения были подтверждены в конце 90-х годов на клеточном уровне [11]. Недавно удалось разработать лазеры с необходимыми параметрами и показать реальную клиническую перспективность применения СКТ без фотосенсибилизаторов в онкологии [15,23].

### **Цель исследования**

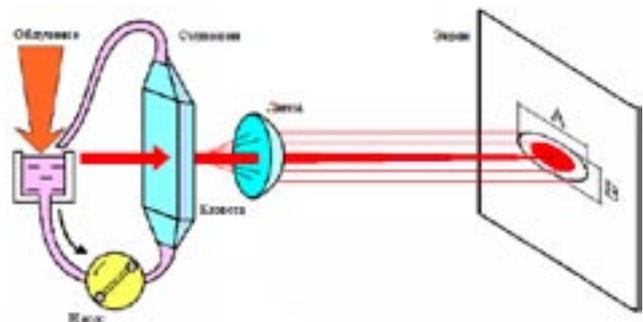
Изучить возможность применения лазероиндуцированной светокислородной терапии как альтернативу фотодинамической терапии при лечении злокачественных опухолей.

### **Материалы и методы**

В качестве модельного объекта исследования нами были выбраны эритроциты по следующим соображениям. Эритроциты являются самыми распространенными клетками крови, занимая 40-

45% ее объема, обладают огромной поверхностью ( $0,5 \text{ м}^2$  на мл крови) и, вероятно, участвуют в биостимулирующем эффекте светового облучения организма (Н.Финзен). Далее, благодаря отсутствию ядра, эритроциты имеют высоко синхронизованные клеточные циклы, что находит отражение в их почти одинаковых размерах и форме. Это позволяет использовать чрезвычайно информативные невозмущающие методы непрерывной диагностики состояния клеток (светорассеяние, оптическая дифракция). Наконец, эритроциты являются стандартной биологической моделью, они легко доступны, с ними просто работать.

В качестве диагностического параметра была выбрана деформируемость эритроцитов [9]. Для ее измерения в режиме *on-line* нами было разработано оригинальное устройство (эридифрактометр), моделирующее круг кровообращения [23] (рис. 1).



**Рис. 1. Схема эридифрактометра**

Клеточная суспензия эритроцитов заливалась через горловину буферной части, открытой на атмосферу (аналог малого круга кровообращения). Прочка суспензии по гибким трубкам (аналог крупных кровеносных сосудов) осуществлялась перистальтическим насосом (аналог сердца), а измерения производились в плоской оптической кювете с узким зазором (аналог капиллярной сети). Течение суспензии в кювете было ламинарным, благодаря чему диски эритроцитов ориентировались параллельно боковым стенкам и одновременно группировались в два симметричных, относительно средней плоскости кюветы слоя, где подвергались одинаковому сдвиговому напряжению. Одинаковые силы вызывали одинаковое растяжение эритроцитов. Изменения эластичности эритроцитов отражались в изменении растяжения. Для регистрации этих изменений нами применялся простой оптический метод дифракции в параллельных лучах. Технически исследования проводились следующим образом: луч маломощного лазера пересекал кювету перпендикулярно ее стенкам и однократно рассеивался на эритроцитах (предполагалось, что  $\sim 10^3$  эритроцита присутствуют в сечении пучка в любой момент). В фокальной плоскости на экране наблюдалась слегка мерцающая дифракционная картина чередующихся светлых и темных овалов (обычно два), повернутых на  $\pi/2$  относительно направления клеточного растяжения. Важным достоинством это-

го метода является то, что дифракционная картина неподвижна, хотя клетки непрерывно двигались. Предполагалось, что чем сильнее вытянуты овалы, тем выше деформируемость эритроцитов. Нами проводились измерения индекса деформируемости ( $\varepsilon$ ) посредством двух независимых измерений длин большой (A) и малой (B) осей овала, соответствующего первому дифракционному минимуму (эти длины изменяются непропорционально друг другу ввиду сложной объемной формы эритроцита). Текущее значение индекса деформируемости рассчитывалось как безразмерная величина, равная отношению разности длин овала к их сумме:

$$\varepsilon(t) = \frac{A(t) - B(t)}{A(t) + B(t)}.$$

При этом использование при обработке данных условия непрерывности параметра  $\varepsilon(t)$  из-за невозможности мгновенных скачков его величины позволяло увеличить точность измерения индекса деформируемости эритроцитов до 1-2%, несмотря на более высокую погрешность определения длины большой оси A.

Легко понять, что в случае, если бы разные клетки обладали различной эластичностью, светлые и темные кольца их дифракционных овалов оказались бы перекрытыми. При этом вся картина приобрела бы размытый вид, и измерения были бы невозможны.

Влияние введенного ФС на клетки в отсутствие светового облучения изучалось нами также в суспензиях эритроцитов. Образцы крови отбирались от здоровых волонтеров посредством укола пальца или пунктированием кубитальной вены. Методы приготовления образцов, инкубации клеток в растворе ФС (диацетат гематопорфирина, производное гематопорфирина синтезировано А. Мироновым) и условия измерений описаны в литературе [6]. Концентрации ФС варьировались и включали значения, обозначенные производителем и применяемые в клинической практике. Объем суспензии в петле циркуляции составлял 9 мл, тогда как концентрация эритроцитов типично была  $3 \times 10^7$  клеток/мл. В качестве источника излучения использовались лазеры с перестраиваемой длиной волны различных типов, а также He-Ne лазер, так как его длина волны  $\lambda = 632,8$  нм попадает как в полосу поглощения растворенного кислорода, так и в полосу поглощения ФС. Для исследования светокислородной терапии без введения ФС использовался ВКР лазер с длиной волны 1264 нм.

## Результаты и обсуждение

**Влияние фотосенсибилизаторов на эритроциты.** Ввод ФС воспринимается эритроцитами в частности как действие неблагоприятного фактора. Было установлено, что более 95% молекул красителя связываются с клетками менее, чем за 1 мин. с момента его ввода. Во внеклеточной среде начинает определяться гемоглобин, что свидетель-

ствует о деструкции (гемоллизе) нескольких процентов эритроцитов. Чтобы выявить изменения в остальных клетках, мы использовали несколько оптических методов, учитывающих особенности рассеяния и поглощения света в эритроцитах. В проточной оптической кювете проводились on-line измерения интенсивности рассеянного света на разных длинах волн и под разными углами. Благодаря этому можно было непрерывно контролировать оксигенацию, гемолиз, агрегацию и осмотическое набухание эритроцитов. В процессе облучения измерялся индекс деформируемости эритроцитов с помощью разработанного нами метода эридифрактометрии. Также производилась визуальная оценка изменений внешнего вида клеток с помощью оптической микроскопии. Из анализа полученных результатов было установлено, что в присутствии ФС в эритроцитарной суспензии происходят следующие изменения:

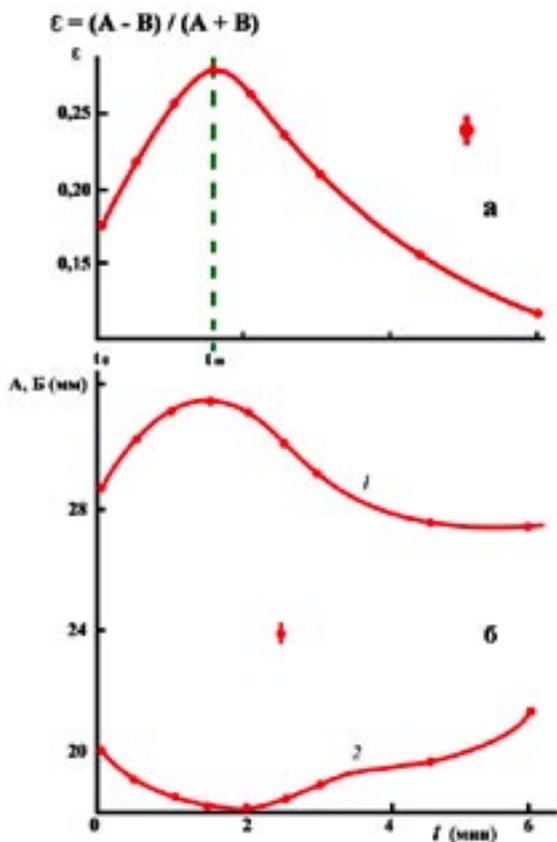
- степень клеточного агрегирования снижается, что свидетельствует о структурных перестройках в мембранах эритроцитов;
- степень вогнутости эритроцитов уменьшается без изменения объема клеток, следовательно, изменения в мембране не затрагивают систему активного ионного транспорта;
- происходит трансформация эритроцитов в эхиноциты, что является признаком неблагоприятных условий в окружающей среде;
- происходит скачкообразное уменьшение степени деформируемости эритроцитов тем значительнее, чем выше концентрация ФС.

Все эти процессы характеризуют так называемый темновой стресс. Возможно, они возникают в результате молекулярных перестроек (фазового перехода) в липидной фазе мембран, сопровождающихся одновременными конформационными переходами в мембранных ферментах. Поскольку клеточные мембраны созданы природой по единому принципу, на основании полученных данных можно ожидать, что воздействие красителей, используемых в качестве ФС, вызывает аналогичные неблагоприятные явления в других клетках.

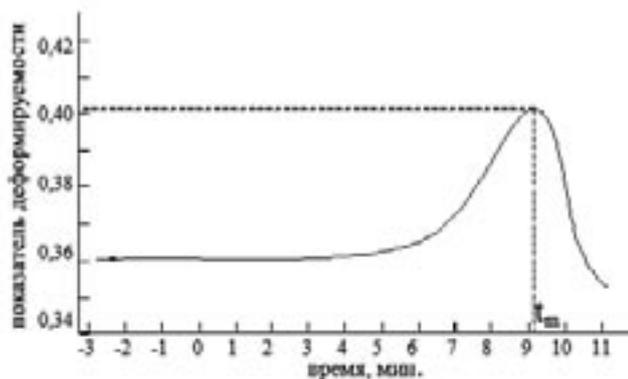
Согласно оценкам, количество молекул синглетного кислорода, требуемое для достижения одинакового биологического эффекта в случае ФДЭ, на 5-6 порядков больше, чем в случае СКЭ. Это различие, первоначально вызвавшее удивление, имеет простое объяснение, почерпнутое из физиологии. Ответной реакцией организма на введенное чужеродное вещество является срабатывание неспецифической защиты, и как результат - загромождение чувствительности к последующему действию любого из возможных неблагоприятных факторов, в том числе и синглетного кислорода. В случае светокислородного эффекта внутриклеточная защита оказывается неподготовленной, поэтому порог чувствительности будет предельно низок. На этом основании было сделано предположение, что светокислородная деструкция клеток возможна при световых интенсивностях, сравнимых с интенсивностями, применяемыми при ФДТ.

**Сравнительная кинетика ФДЭ и СКЭ in vitro.**

Для исследования ФДЭ и СКЭ в одних и тех же условиях одинаковые образцы оксигенированной суспензии эритроцитов, инкубированных с ФС и в отсутствие ФС были подвергнуты облучению He-Ne лазером с мощностью соответственно 5-10 мВт и 30-40 мВт. При этом временной ход фотоотклика в обоих случаях оказался аналогичным (рис. 2, 3).



**Рис. 2. Фотодинамический эффект. Лазер включен в момент  $t=0$ . Деформируемость эритроцитов (вверху) демонстрирует активацию клеток вплоть до момента  $t_m$ . Внизу зависимости A(1) и B(2) от времени, по которым рассчитывается  $\epsilon$**

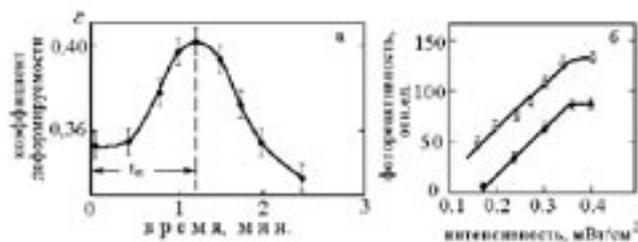


**Рис. 3. Типичный вид изменения деформируемости эритроцитов в суспензии под влиянием облучения He-Ne лазеров мощностью 30-40 мВт. Лазер включен в момент  $t = 0$**

Прежде всего было отмечено, что перед облучением все эритроциты имеют почти идентичную деформируемость, благодаря чему измерения возможны в большом клеточном ансамбле. Несмотря на заведомо неравномерное освещение эритроцитов, их фотоотклик также синхронен. Это свидетельствует о быстрой коллективизации клеточных состояний.

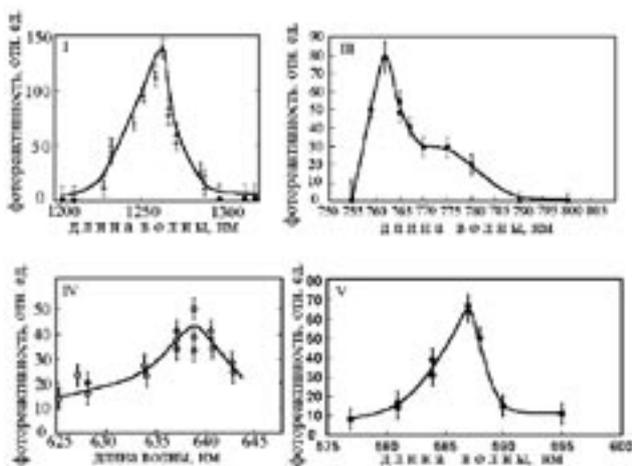
Вначале на дифракционном изображении каие-либо заметные изменения могут отсутствовать. Это латентная фаза отклика, и она тем продолжительнее, чем меньше мощность облучения. Фотоотклик начинается с повышения деформируемости, а не с его понижения, как можно было бы ожидать, зная о токсическом действии синглетного кислорода. (Если в отсутствие ФС эритроциты исходно уже находились в состоянии максимальной деформируемости, то они вообще не реагируют на свет). Отчетливо выраженный максимум деформируемости соответствует переходу эритроцитов в состояние наибольшей эластичности и, следовательно, максимальной физиологической активности. Экстраполируя эти данные на организм, можно говорить об активации микроциркуляции и биоэнергетических процессов, связанных с улучшением доставки кислорода в ткани, так как повышенная деформируемость позволяет красным клеткам крови проникать в мельчайшие капилляры и более эффективно выполнять основное функциональное назначение. После перехода через максимум начинается спад деформируемости, и если продолжать лазерное воздействие, то даже ниже исходного уровня. С этого этапа начинается повреждающее действие, а это уже область, интересная для онкологических применений.

Было установлено, что обратное время достижения максимума деформируемости, отсчитываемое от начала облучения, есть мера эффективности светового воздействия. Другими словами, это есть скорость достижения максимального клеточного тонуса, названная фотореактивностью. Зависимость фотореактивности от мощности облучения имеет линейный участок в пределах примерно одного порядка по мощности, что позволило рассчитывать на получение малоискаженного спектра действия (рис. 4).



**Рис. 4. Изменение деформируемости эритроцитов по мере облучения суспензии в эридифрактометре лазером с длиной волны 1264 нм, мощностью 0,85 мВт (а) и связь обратного времени проявления максимального эффекта с интенсивностью облучения для двух образцов крови от разных доноров (б)**

Когда в качестве световых источников нами были применены лазеры с плавной перестройкой по длине волны, были также достигнуты условия для достижения достаточного спектрального разрешения. В результате были получены спектры действия, идентичные спектрам поглощения свободного (растворенного) кислорода в нескольких участках оптического диапазона, в том числе в инфракрасном участке вблизи 1,26 мкм, где светотерапия ранее не применялась (рис. 5).



**Рис. 5. Спектры действия для фотоокислородного эффекта в различных полосах поглощения растворенного кислорода**

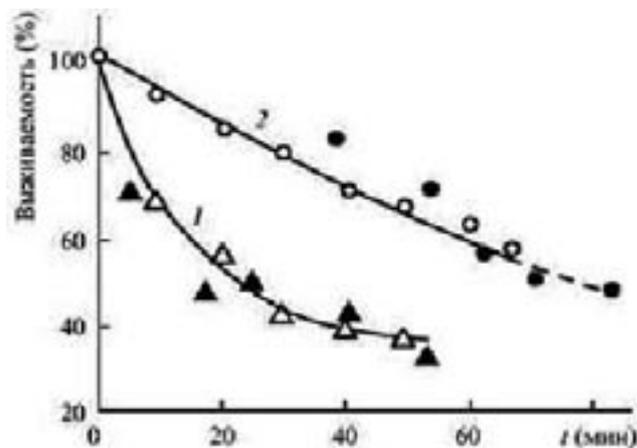
На том же рисунке приведены измеренные нами спектры действия в других спектральных полосах поглощения кислорода.

Таким образом, при светотерапии мишенью для действующих фотонов являются не биомолекулы, а растворенный кислород, имеющий более десятка полос поглощения в видимой и ближней инфракрасной области. Светоокислородный эффект есть аналог фотодинамического эффекта, так как общим действующим агентом в обоих случаях является синглетный кислород. При этом СКЭ имеет преимущество перед ФДЭ, так как не требует эндогенных ФС. Было предположено, что при большей скорости фотогенерации синглетного кислорода (для чего необходимы более мощные лазеры с наиболее эффективной длиной волны – около 1264 нм), клетки будут не стимулироваться, а разрушаться [8,26].

**Гибель опухолевых клеток при ФДЭ и СКЭ in vitro.** Были выполнены сравнительные эксперименты по иницированию гибели клеток в результате фотодинамического и фотоокислородного эффектов с применением He-Ne лазера. Использовалась суспензия клеток карциносаркомы Льюиса с концентрацией около  $10^7 \text{ см}^{-3}$  в забуференном изотоническом растворе NaCl, pH = 7,4. Были приготовлены два одинаковых образца клеточной суспензии объемом 0,8 мл, один из которых был предварительно фотосенсибилизирован путем инкубации в течение 3,5 часов в присутствии 40 мкМ диацетата гематопорфирина (HPDA) при комнатной температуре. Оба образца насыщались методом барбатирования кислородом

в термостатированных кюветках при 37°C и облучались в одинаковых условиях двумя He-Ne лазерами (632,8 нм) общей мощностью 80 мВт ( $40 \text{ мВт/см}^2$ ). Удобно, что эта длина волны одновременно попадает внутрь полос поглощения и кислорода, и ФС.

Оценка степени выживаемости клеток производилась двумя независимыми методами: стандартным с использованием прокрашивания трипановым синим (методика РОНЦ) и счетом выживших клеток в камере Горяева и непосредственно в кюветках по изменению скорости трансмембранного электронного транспорта [5]. Данные приведены на рис. 6.



**Рис. 6. Зависимость выживаемости опухолевых клеток в суспензии от времени облучения при СКЭ и ФДЭ в присутствии фотосенсибилизатора (1) и без него (2) (тёмные точки – визуальный счёт клеток, светлые – оценка посредством измерения скорости трансмембранного электронного транспорта)**

Несмотря на различие в форме кривых, тенденция к повреждению клеток в случаях фотодинамического и фотоокислородного эффектов одинакова, однако доза 50% повреждения клеток LD50 различается почти на порядок.

Аналогичные исследования, проведенные в РОНЦ (А.В. Иванов), показали, что доза 50%-ной гибели клеток LD50 при применении ИК излучения в наиболее сильной полосе поглощения кислорода  $\lambda=1264 \text{ нм}$  примерно в 20 раз эффективнее, чем в «красной» полосе, внутрь которой попадает излучение He-Ne лазера. Это соотношение согласуется с отношением интенсивности соответствующих полос в спектре действия и сравнимо со значением LD50 при фотодинамическом повреждении клеток (табл.1). При микроскопическом исследовании клеток во всех случаях разрушение выглядело одинаково и состояло в разрыве плазматической мембраны на несколько фрагментов, что согласуется с механизмом осмотического набухания.

**Таблица 1  
Сравнение доз 50% гибели клеток при СКЭ и ФДЭ**

$\lambda$ (нм)	1264	632.8	632.8+HPDA ( $4 \times 10^{-5} \text{ M}$ )
LD <sub>50</sub> (Дж/см <sup>2</sup> )	10.2	194	27

**Клинические исследования**

Клиническая фаза исследования включала в себя сравнение эффективности ФДТ и светокислородной терапии (СКТ) при лечении нахожной локализации опухолевого процесса. Было проведено лечение 20 пациентов с базальноклеточным раком (БКР) методом ФДТ (1-я группа) и 23 пациентов с аналогичной патологией методом СКТ (2-я группа). В обеих случаях использовался бесконтактный метод. В 1-й группе пациентов в качестве ФС применялся диацетат гематопорфирина (HPDA) - Фотогем® (А. Миронов). Перед введением ФС у всех пациентов этой группы проводилось исследование на скрытые порфирии. Через 24 часа экспозиции ФС в организме проводилось лечение лазером с длиной волны 632 нм при дозе 200 Дж/см<sup>2</sup>. Во второй группе пациентов ФС не вводился, поэтому лечение проводилось сразу же с применением ИК лазера с длиной волны 1264 нм при дозе 80 Дж/см<sup>2</sup>.

В обеих группах стадии клеточной деструкции и восстановления протекали в сравнительно одинаковых сроках. Образующийся после сеанса лечения струп отпадал на 12-20 сутки с образованием, как правило, нормотрофического рубца. Динамическое наблюдение за пациентами проводилось в течение 3-х лет. В 1-й группе в одном случае через 5 месяцев после сеанса ФДТ зарегистрирован рецидив БКР, после проведенного второго сеанса ФДТ безрецидивный период продолжается 2,5 года. Во 2-й группе рецидивов БКР не наблюдалось (рис. 7-12).

**Рис. 9. Пациентка М. до лечения****Рис. 10. Пациентка М. через 3 недели****Рис. 7. Пациентка Б. до лечения****Рис. 8. Пациентка Б. через 1 месяц****Рис. 11. Пациент Р. до лечения****Рис. 12. Пациент Р. через 4 месяца**

**Применение СКТ при плоскоклеточном раке.**

Пациент К., 73 лет. Обследовался по месту жительства у онколога по поводу заболевания левой ушной раковины. Морфологическое исследование показало наличие плоскоклеточного рака. Было предложено тотальное удаление левой ушной раковины с последующей пластикой. Пациент от оперативного лечения отказался и обратился в клинику «Лазер и Здоровье» (рис. 8). Учитывая отказ пациента от оперативного лечения, его возраст и наличие ишемической болезни сердца, ему было разъяснено и предложено лечение методом СКТ. Было получено письменное информированное согласие пациента на проведение лечения. Сеанс СКТ был проведен лазером 1264 нм бесконтактно, дозой 120 Дж/см<sup>2</sup> с широким захватом здоровых тканей. Восстановительный период протекал без особенностей, струп отторгнулся постепенно, участками в течение 25 дней. Безрецидивный период составил 3 года, продолжает находиться на динамическом наблюдении. (рис. 13-14).



**Рис. 13. Пациент К. до лечения**



**Рис. 14. Пациент К. через 3 года**

**Выводы**

1. Между двумя лазерными медицинскими методами – фотодинамической терапией и биостимуляцией – имеется внутренняя связь на уровне фото-молекулярных механизмов.

2. Режимы клеточной биостимуляции и фотодеструкции могут быть реализованы подбором условий светового воздействия на организм.

3. Приведенные результаты позволяют сделать вывод о существовании единого механизма стимулирующего и деструктивного действия оптического излучения посредством генерации молекулярного синглетного кислорода. Благодаря этому открываются перспективы разработки щадящего метода светокислородной терапии опухолевых образований без введения в организм чужеродных агентов в виде экзогенных фотосенсибилизаторов.

**Список литературы**

1. Владимиров Ю.А. Лазерная терапия: настоящее и будущее // Соросовский образовательный журнал. - 1999. - №12. - С. 2-8.
2. Гаусман В., Фолк Р. Руководство по светолечению. - М.-Л.: Госмедиздат, 1929. - 394 с.
3. 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. - Т.54. - №8. - С. 1610-1620.
4. Захаров С.Д., Еремеев Б.В., Перов С.Н., Панасенко Н.А. Методы изучения и механизмы действия лазерного излучения на эритроциты с участием молекулярного кислорода // Методы лазерной биофизики и их применение в медицине. - Тарту: ТГУ, 1989. - С. 23-60.
5. 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.
6. Захаров С.Д., Еремеев Б.В., Перов С.Н. Сравнение эффектов лазерного воздействия на длинах волн 1,26 и 0,63 мкм на эритроциты // Кр. сообщ. по физике ФИАН. - 1989. - №1. - С. 15.
7. 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.
8. Захаров С.Д., Скопинов С.А., Чудновский В.М., Еремеев Б.В., Перов С.Н., Панасенко Н.А. Первичные механизмы неспецифического воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения на эритроциты с участием молекулярного кислорода // Изв. АН СССР, сер. физ. - 1990. - Т. 54. - №8. - С. 1629-1635.
9. Захаров С.Д., Иванов А.В., Вольф Е.Б. и др. Структурные перестройки в водной фазе клеточных суспензий и белковых растворов при светокислородном эффекте // Квантовая электроника. - 2003. - Т. 33. - №2. - С. 149-162
10. Захаров С.Д., Иванов А.В., Корочкин И.М., Данилов В.П. // Прямое возбуждение фотонами эндогенного молекулярного кислорода - фотофизический акт терапевтического действия лазерного излучения // Лазерная медицина. - 2006.- Т. 10. - №1. - С. 4-9.

11. Захаров С.Д., Иванов А.В. Светоокислородный эффект в клетках и перспективы его применения в терапии опухолей // Квантовая электроника. - 1999. - Т. 29. - №3. - С. 192-214.
12. Мешалкин Е.Н., Сергиевский В.С. Применение прямого лазерного излучения в экспериментальной и клинической медицине. – Новосибирск: Наука, 1981. - 172 с.
13. 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.
14. 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.
15. Юсупов А.С. Гончаров С.Е. и др. Использование ВКР-лазера на 1264 нм для лечения базальноклеточного рака // III российский семинар по волоконным лазерам. – Уфа, 2009. - С. 13-14.
16. Armichev A.V., Ivanov A.V., Panasenko N.A., Perov S.N., Zakharov S.D. Spectral dependence of erythrocyte response of low-intensity irradiation at 570-590 nm // J. Russ. Laser Res. - 1995. - Vol.16. - P. 186-188.
17. Babenko E.V., Ereemeev 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. - Vol.16. - P. 181-185.
18. Dougherty T.J. Photodynamic therapy. Basic principles and clinical applications. - New-York-Basel-Hong-Kong, 1993. - P. 145-150.
19. Harber L.C, Bickers D.R. Photosensitivity Diseases: Principles of Diagnosis and Treatment // W.B. Saunders (ed.). - Philadelphia, 1981. - P. 189.
20. Nobel Lectures Physiology or Medicine 1901-1921. - Amsterdam: Elsevier, 1967.
21. Ohshiro T. and Calderhead R.G. Low-Level Laser Therapy A Practical Introduction. – John Wiley & Sons, Chichester & New York, 1988.
22. Photodynamic Therapy: Basic Principles and Clinical Applications / B.W. Henderson, T.J. Dougherty (eds.), Marcel Dekker. - New York, 1992. - P. 480.
23. Yusupov A.S., Goncharov S.E., Zalevskii I.D., Paramonov V.M., Kurkov A.S. Raman fiber laser for the drug-free photodynamic therapy // Laser Physics. - 2010. – Vol. 20. - №2. – P. 357–359.
24. Zakharov S.D. // Measurement of the erythrocyte response to low-level external action // Proc. SPIE. - 1993. - Vol. 1884. - P.181-188.
25. Wilson B.C., Bown S.G. Therapeutic applications: Photodynamic therapy. in: C. E. Webb and J. D. C. Jones (eds.) // Handbook of Laser Technology, Institute of Physics Publishers. - Bristol & Philadelphia, 2004. - Vol. 3. - P. 2019-2053.