

УДК 621.375.826.532.74.621.375.86

В. М. Чудновский, В. И. Юсупов

НЕКОТОРЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ И ФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФОТОМЕДИЦИНЫ

ИМФ им. У.Х. Копвиллема ТО РАТН, ТОИ им. В.И. Ильичева ДВО РАН

РЕЗЮМЕ

В работе представлены биологические модели и физические механизмы воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) на человеческий организм. В качестве биологических моделей использовались: гаметы морских беспозвоночных, икра и личинки рыб, сальмонеллы, экзотоксин синегнойной палочки. Рассмотрен механизм неспецифического биостимулирующего действия НИЛИ. Экспериментально обнаружено новое явление - фотоиндуцированная ферментативная эпимеризация глюкозы.

SUMMARY

V.M. Chudnovsky, V.I. Yusupov

BIOLOGICAL MODELS AND PHYSICAL MECHANISMS OF PHOTOMEDICINE

The biological models and physical mechanisms of low level laser light (LLLL) on a human body are submitted. As biological models were used: the sperm of sea urchins, sea cucumber and surf clam, caviar and larva of fishes, salmonellas, the blue pus bacilli toxin. The mechanism of nonspecific biostimulation LLLL action is considered. The new phenomenon - photoinduced enzyme glucose photoepimerisation is experimentally revealed.

Методы использования электромагнитного излучения (ЭМИ) для диагностики и лечения человеческого организма широко представлены в современной медицине. Это рентгеновское обследование, гамма-радио-изотопные методы диагностики, электронный парамагнитный резонанс (ЭПР), ядерная магнитно-резонансная томография (ЯМРТ), СВЧ и УВЧ-физиотерапия, магнитотерапия, светотерапии, лазерная медицина. Последний термин традиционно разделяют на лазерную терапию (Low Level Laser Therapy – LLLT) и лазерную хирургию (Laser surgery).

Цель настоящей работы – представить некоторые биологические модели, иллюстрирующие действие

низкоинтенсивного (неразрушающего) лазерного излучения (НИЛИ) красной области спектра на био-объект и физические механизмы лазерной терапии.

Влияние лазерного облучения на патогенные микроорганизмы

Исследования проводили на примере сальмонелл – наиболее распространенных представителей бактерий кишечной группы, занимающих ведущее место в инфекционной патологии людей и животных во всем мире. В работе использовали 2 штамма Senteritides № 39 и № 153, выделенных от больных и типичных по культурально-морфологическим свойствам.

Облучение проводили гелий-неоновым лазером (ГНЛ) мощностью 15 мВт в течение 1 мин с интенсивностью 50 мВт/см².

Действие лазера на биологические свойства бактерий изучали на основе изменения следующих показателей:

- 1) активность сахаролитических ферментов, которую определяли на средах Гисса, дополненных кислотой, арабинозой, дульцитом, сорбитом [35];
- 2) чувствительность к действию антибиотиков – определялась общепринятым методом диффузии в агар с применением дисков [35];
- 3) устойчивость к бактериостатическому действию нормальной сыворотки – определялась методом высева на чашки после инкубирования 0.5 мл сыворотки и 100000 бактериальных клеток;
- 4) адгезия к эпителию слизистой оболочки тонкого кишечника;
- 5) вирулентность в биопробах на неинbredных белых мышцах при пероральном заражении (10^9 , 10^7 , 10^5 , 10^3 , 10 микробных тел).

Возможность использования ГНЛ в эпидемиологических исследованиях индикации бактерий во внешней среде определяли в модельных опытах на сальмонеллах при заражении рыбного фарша и почвы.

Эффективность применения ГНЛ в бактериологической диагностике инфекций у больных оценивали по результатам выявления патогенных бактерий в инфицированных фекалиях по общепринятым методам [35].

Результаты и обсуждение

При испытании действия низкоэнергетического облучения на ферментативные системы сальмонелл было установлено, что в течение 30 дней цвет сред Гисса как в опыте, так и в контроле был одинаков. Это свидетельствует о том, что облучение бактерий НИЛИ мощностью 15 мВт не влияет на активность сахаролитических ферментов. Таким образом, пути поступления питательных субстратов в бактериальную клетку и синтез индуктивных сахаролитических ферментов не подавляются. Рациональная антибиотикотерапия инфекционных болезней основывается на результатах бактериологической диагностики заболевания, при этом очень важно располагать данными о чувствительности возбудителя болезни к антибактериальному препарату. Чувствительность бактерий к антибиотикам определяли методом диффузии в агар с применением дисков. О чувствительности штампов к исследуемым антибиотикам судили по зоне задержки микробного роста вокруг дисков. В работе использовали 14 антибиотиков (левомецетин, полимиксин, бензилпенициллин, рифампицин, гентамицин, стрептомицин, ампициллин, канамицин, эритромицин, доксициклин, неомицин, пентамицин, тетрациклин), действующих на различные системы бактериальной клетки. В этой серии опытов статистически достоверных различий в антибиотикочувствительности контрольных и опытных бактерий не выявлено. Отсюда следует, что функциональные биомолекулы бактериальной клетки, которые взаимодействуют с антибиотиками, при облучении лазером низкой мощности не изменяются.

Бактерии, проникая в кровь, подвергаются воздействию антибактериальных факторов внутренней среды организма. В связи с этим, устойчивость сальмонелл к бактерицидному действию сыворотки крови человека определяли в динамике. В данной серии опытов время воздействия на клетки было различно: от 30 мин до 3 ч при мощности 15 мВт. Результаты исследований свидетельствуют об отсутствии статистически достоверных различий в контроле и опыте, т.е. длительная обработка НИЛИ не изменяет бактериальные рецепторы, ответственные за бактерицидную активность сыворотки крови.

Одним из факторов, способствующих реализации микробами их патогенности, является адгезивность, позволяющая им попасть в оптимальные условия среды обитания. Таким образом, еще одна группа поверхностных рецепторов бактерий, ответственных за адгезию, не изменяется под влиянием НИЛИ.

В исследованиях по определению вирулентности (ЛД₅₀) облученных (опытных) и необлученных (контрольных) сальмонелл наблюдения за животными проводили в течение 28 дней. В этих опытах установлено, что показатели ЛД₅₀ для опытной группы были в 10 – 30 раз ниже, чем для контрольной (рис. 1), что говорит о повышении вирулентности сальмонелл после их обработки лазером. Однако поведение в данном объеме исследования не позволяют судить о том, за счет каких факторов это происходит.

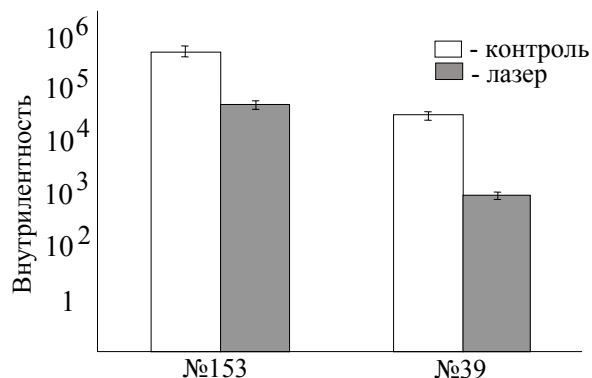


Рис. 1. Показатели вирулентности облученных и необлученных сальмонелл для мышей.

В настоящее время при решении вопросов экологии и эпидемиологии большое внимание уделяется вопросам санитарно-гигиенического контроля окружающей среды, направленного на оперативное выявление патогенных бактерий и механизмов заражения людей. Существующие на сегодняшний день методы бактериологической индикации бактерий длительны и малоэффективны. В этой связи была изучена возможность использования ГНЛ. Объектом исследования служила почва, т.к. известно, что она является важнейшим объектом окружающей среды, выполняющим резервную роль для патогенных бактерий. Проведено сравнительное исследование эффективности трех известных методов и метода с использованием лазера.

Сальмонеллы вносили в почву в количестве 10000 микробных клеток в 1 г и хранили в условиях комнатной температуры (25° С). В результате установлено, что использование методов серийных разведений и метода встряхивания [35] позволяет выявлять сальмонеллы в течение 15 суток, метода поэтапного центрифугирования – в течение 20 суток, в то время как предварительная обработка почвы НИЛИ позволила увеличить этот период до 40 суток, когда количество сальмонелл в почве уменьшилось уже до единичных особей.

Оптимальное время обработки исследуемого объекта НИЛИ определяли на примере рыбного фарша, поскольку он имеет существенное значение как фактор передачи при сальмонеллезе. Время обработки лазером варьировалось в пределах от 10 с до 2 мин. Расстояние от источника до объекта составляло 50 см, мощность ГНЛ - 18 мВт.

Как видно из приведенных данных (рис. 2), оптимальные результаты получены при использовании временного фактора в пределах 30 – 60 с. Обработка рыбного фарша лазером в течение данного времени способствовала увеличению количества выделенных сальмонелл по сравнению с контролем в 7 – 10 раз.

Положительные результаты, полученные при исследовании объектов внешней среды, позволили перейти к изучению эффективности применения лазера для выявления сальмонелл в инфицированных фекалиях с целью диагностики инфекции у больных. Для этого разработали 5 вариантов обработки фекалий лазером (заражающая доза во всех случаях составляла 1000 клеток в 1 мл):

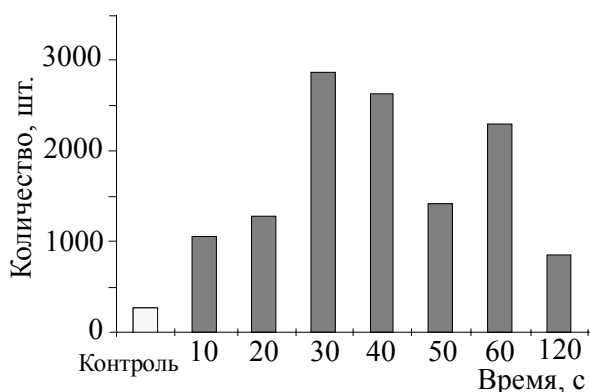


Рис. 2. Эффективность индикации сальмонелл в рыбном фарше в зависимости от времени обработки лазером.

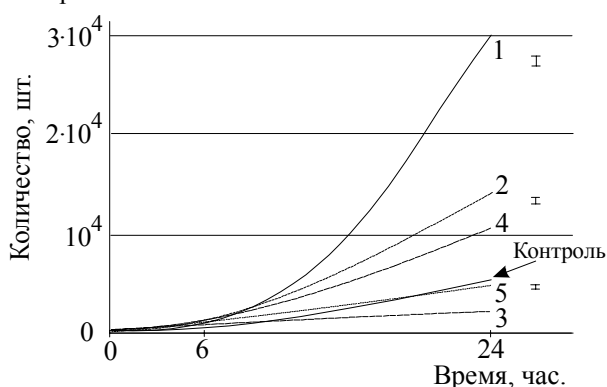


Рис. 3. Эффективность выделения сальмонелл из инфицированных фекалий. Цифры у кривых соответствуют номерам вариантов обработки фекалий лазером.

1. Инфицированные сальмонеллами фекалии в магниевой среде накопления (в соотношении 1:4) обрабатывали лазером 1 мин до культивирования в термостате. Затем помещали их в термостат при 37 С и определяли количество сальмонелл через 6 и 24 ч культивирования.
2. Условия опыта в п. 1, но обработку фекалий лазером проводили через 6 ч культивирования.
3. Условия опыта как в п. 1, но обработку фекалий лазером проводили через 24 ч культивирования.
4. Условия опыта как в п. 1, но обработку фекалий лазером проводили 2 раза через 6 и 24 ч культивирования.
5. Условия опыта как в п. 1, но обработку фекалий лазером проводили 3 раза до внесения в термостат, а затем через 6 и 24 ч культивирования.

Контролем служил материал, который исследовали по классической схеме выделения сальмонелл, т.е. материал вообще не подвергался обработке лазером.

Полученные результаты (рис. 3) свидетельствуют о том, что все способы обработки материала приводят к определенному повышению выделяемости количества сальмонелл. Наиболее четко разница в результатах видна при бактериологическом исследовании фекалий после

культивирования в термостате в течение 24 ч. При этом наилучший результат достигается при однократной обработке фекалий лазером в течение 1 мин до начала термостатирования (вариант 1). Этот способ позволил через 24 ч после культивирования материала увеличить количество выделенных сальмонелл по сравнению с контролем в 6 раз.

Выводы

1. Под действием НИЛИ ГНЛ (50 мВт/см², 1 мин) у сальмонелл не изменяется активность сахаролитических ферментов, чувствительность к действию антибиотиков, устойчивость к бактериостатическому действию сыворотки крови, способность адгезировать к эпителию слизистой оболочки кишечника, что указывает на стабильность некоторых клеточных рецепторов. В то же время у этих бактерий в 10 – 30 раз повышается вирулентность.
2. Применение лазерной обработки инфицированных сальмонеллами объектов внешней среды (почва, рыбный фарш) позволяет повысить эффективность бактериологических исследований как за счет увеличения возможных сроков индикации возбудителя, так и за счет увеличения числа выделенных бактерий.
3. Лазерное облучение контаминированных фекалий способствует резкому повышению эффективности бактериологической диагностики сальмонеллеза у больных.

Влияние излучения гелий-неонового лазера на бактериальные токсические белки

Моделью для исследований послужил экзотоксин синегнойной палочки штаммов РА-103 и РА-59. В качестве экзотоксина использованы два вещества:

- 1) фракция, осажденная сернокислым аммонием (60% насыщения) из четырехсуточной культуральной жидкости (температура культивирования штаммов 12 С) [34];
- 2) капсульная субстанция (КАП) этих же культур, полученная механической дезинтеграцией общепринятым способом.

Дальнейшую очистку токсина не проводили, оставив его естественные биохимические спутники, полагая согласно [1], что поведение белков, выведенных из клеток, тщательно очищенных и помещенных в искусственно составленные среды, отличается от поведения в живой функционирующей клетке.

Облучение токсина проводили гелий-неоновым лазером с мощностью 20 мВт в следующих режимах: 3 и 5 мин – нерасфокусированным лучом с мл. интенсивностью 100 мВт/см²; 8 и 10 мин – рассеянным лучом с интенсивностью 5 мВт/см². Облучали пенициллиновые флаконы объемом 10 мл, помещая в них по 4 мл исследуемого образца.

Биопробы проводили на беспородных белых мышках весом 12 - 14 г при внутрибрюшинном введении исследуемых доз токсина. Гибель животных учитывали в течение 5 суток (общепринятое время).

Статистическую обработку биопроб проводили по методу Кербера [2]. Изменение токсичности облучённых белков также измеряли на биохемилюминиметре (Красноярский институт биофизики).

Белковый спектр токсинов до и после облучения исследовали методом дискэлектрофореза в ПААГ (рН=8,3) общепринятым способом [16]. Белок в пробах определяли по методу Лоури [4]. Фоновая люминесценция раствора представлена на рис. 4.

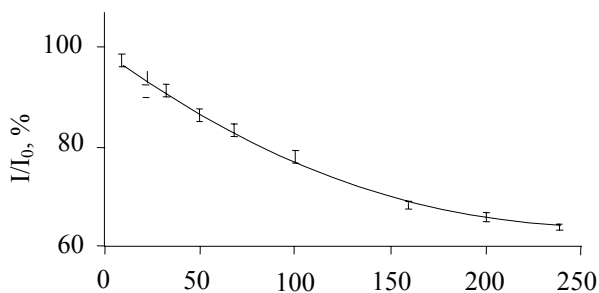


Рис. 4. Фон люминесценции физраствора, применявшегося в опытах. По оси абсцисс – количество физраствора (мкл), равное объему вводимого в реакцию токсина. По оси ординат – гашение люминесценции в процентах. Раствор токсичен, если гашение люминесценции ниже 50%.

Обсуждение результатов

Экстрацеллюлярный белковый продукт синегнойной палочки (ЭЦ) обладает высокой токсичностью для теплокровных, т.к. в основе патологического процесса лежат глубокие нарушения клеточного метаболизма. Выделенные нативные токсины, условно обозначаемые нами ЭЦ и КАП, несколько различались по токсичности действия на белых мышей и составляли 70 и 20 мкг

соответственно.

Облучённые лазером препараты обычно вводили мышам не ранее 1 - 2 часов после облучения. За это время в растворах белков уже возникали изменения, поскольку токсичность препаратов в биопробах на животных изменялась.

Под действием НИЛИ при большой концентрации токсина происходило усиление его токсичности (рис. 5).

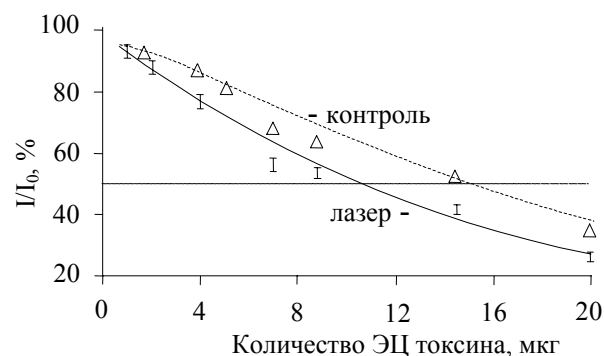


Рис. 5. Усиление токсичности ЭЦ токсина (серия 2) под действием излучения ГНЛ. По оси ординат – гашение люминесценции, выраженное в процентах. Концентрация облученного токсина – 4 мг/мл. Раствор токсичен, если гашение люминесценции ниже 50%.

В таблице 1 представлены результаты воздействия лазерного света на токсины, исходная концентрация которых не превышала по белку 1000 мкг/ Из полученных результатов следует, что интенсивное излучение (100 мВт/см²) при меньшей экспозиции (3 минуты) детоксицирует препараты сильнее, чем расфокусированное (5 мВт/см²).

Иные результаты получаются в случае, когда концентрация белка в исследуемом растворе была более 1 мг/мл (табл. 2).

Таблица 1

Сравнительное исследование действия облучённого токсина синегнойной палочки на белых мышей

Вещество	ЛД ₅₀ нативного токсина в 1 мкг белка	Время облучения. Параметры излучения	ЛД ₅₀ облучённого токсина в 1 мкг белка
ЭЦ	75 мкг	3 мин. Интенсивное излучение	Более 200 мкг. Мыши не гибнут.
		5 мин. Интенсивное излучение	Более 200 мкг. Мыши не гибнут.
		8 мин. Расфокусированное излучение.	100 мкг
		10 мин. Расфокусированное излучение.	130 мкг
КАП	25 мкг	5 мин. Интенсивное излучение.	Более 200 мкг. Мыши не гибнут.
		10 мин. Расфокусированное излучение.	200 мкг

Таблица 2

Сравнительное исследование токсичности облучённого (интенсивное излучение) и необлучённого капсульного токсина

Вещество	ЛД ₅₀ нативного токсина в 1 мкг белка	Время облучения	ЛД ₅₀ облучённого токсина в 1 мкг белка
КАП Серия 1	35 мкг	3 мин.	35 мкг
КАП Серия 2	21 мкг	3 мин.	20 мкг
КАП Серия 3	25 мкг	3 мин.	25 мкг. Гибель животных наступила раньше на 1 сутки

Таблица 3

Изменение белкового спектра синегнойного токсина после облучения ГНЛ

Вещество	Отношение к облучению	Отношение расстояния, пройденного индивидуальным белком, к фронту электродного буфера				
		0,052	0,102	0,121	0,172	0,276
ЭЦ Сер. 2	Нативное	0,052	0,102	0,121	0,172	0,276
	Облучение 15 минут	0,052	0,103	Размытый след	-	-
	Через 10 дней после облучения	0,052	0,103	0,121	0,172	0,276
ЭЦ Сер. 5	Нативное	0,017	0,056	0,121	0,158	0,276
	Облучение 15 минут	0,024	0,086	0,103	0,121	-
	Через 10 дней после облучения	0,017	0,056	0,121	0,158	0,276

При концентрации капсульного токсина 2 мг/мл НИЛИ практически не оказывало влияния на его токсичность.

Из сравнения полученных данных следует, что изменения, влияющие на активность белка зависят от его исходной концентрации. Если исходная концентрация белка большая (более 1 мг/мл), то токсичность может остаться в исходных пределах или даже усилиться. Далее мы изменили условия опыта: облучили ЭЦ токсин дважды с интервалом через день. В результате токсичность ЭЦ токсина резко снизилась (рис. 7).



Рис. 6. Токсичность капсульного токсина (серия 2) после воздействия излучения ГНЛ (без изменения активности). Концентрация облучённого капсульного токсина- 2 мг/мл белка.

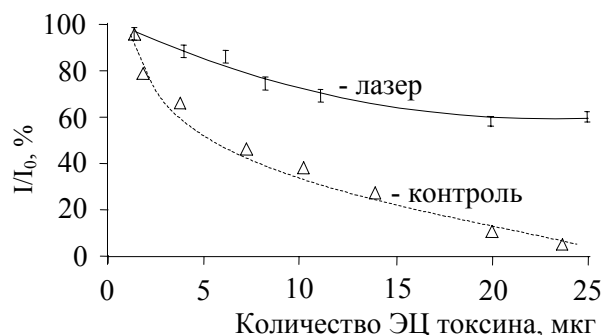


Рис. 7. Резкое снижение ЭЦ токсина (серия 3) после двукратного облучения ГНЛ. Обозначения те же, что и на рис. 5. Концентрация облучённого белка 4,5 мг/мл.

С помощью метода электрофореза в НААГ было установлено, что через 2 - 3 часа после облучения синегнойного токсина, количество минорных белковых зон в геле уменьшается по сравнению с нативным препаратом. Следует уточнить, что эти данные получены на белках, концентрация которых не превышала 1 мг/мл.

Эти процессы обратимы. Через 5 - 10 дней количество белковых зон при электрофорезе восстанавливалось до исходного (табл. 3).

Результаты фореза токсина серии 5, при котором появляются дополнительные белковые зоны, приводит к мысли, что излучение ГНЛ может действовать как детергент, т.е. отделять индивидуальные полипептидные цепи.

В заключение мы хотим обратить внимание на следующие обстоятельства:

1. Изменение токсичности белка под действием НИЛИ зависит от его исходной концентрации, т. е. при концентрации токсина превышающей определенное значение, лазерный свет либо не влияет на токсичность белка, либо увеличивает её.

2. Двукратное облучение белка светом ГНЛ проводимое через день приводит к резкому уменьшению токсичности ЭЦ токсина.

3. Лазерный свет является своего рода детергентом, приводя к отделению индивидуальных полипептидных цепей.

Последнее означает, что вызванное излучением ГНЛ уменьшение токсичности белка происходит вследствие перевода токсина в функционально неактивное конформационное состояние (денатурированный переход [32]), который, однако, обратим. Способность НИЛИ вызывать конформационные переходы в белках будет обсуждаться ниже, а здесь мы отметим, что зависимость эффекта от концентрации токсина в растворе указывает на важную роль самого раствора, вернее, степени его «дисперсности» в осуществлении конформационного перехода в токсине.

Практикующие врачи давно обратили внимание на то, что прежде чем проводить лазерную обработку гнойника, необходимо его вскрыть и санировать, т.е. максимально уменьшить концентрацию токсина в ране, поскольку в противном случае лечебный эффект либо отсутствует, либо НИЛИ приводит к обострению процесса [15].

Результаты эксперимента показывают, что двукратное облучение белка через день приводит к резкому детоксирующему действию излучения ГНЛ. Это означает, что облучённый белок становится очень чувствительным к внешним воздействиям, а клеточные органеллы, которые его содержат, также должны остро реагировать на свет.

Чтобы проверить это предположение, мы апробировали действие излучения ГНЛ на живую культуру бактерий псевдотуберкулёза. В опыте была взята культура микроорганизмов, поделённая на две части. Одну часть обрабатывали ферментами, действующими на цитоплазматическую мембрану, а другую – лучом лазера в течение 2 мин, а затем уже ферментами. При электронно-микроскопическом просмотре препаратов наблюдали следующую картину: если обработка велась только ферментами, в препаратах были структурные фрагменты бактериальных клеток и небольшое количество неповреждённых бактерий. В случае сочетанного применения лазерного облучения и ферментного воздействия, все поля зрения были заполнены бесструктурной массой. Таким образом, излучение ГНЛ повышает чувствительность клеток к внешнему воздействию.

В работе [14] показано, что облучение ГНЛ стафилококкового токсина *in vitro* после его взаимодействия с элементами сосудистой стенки модифицирует эффекты яда, оказываемые на лимфатические микрососуды. Действие лазерного света на сосуд во время аппликации токсина тормозит развитие вазоспазма, а предварительное облучение токсина изменяет его способность влиять на частоту фазовых сокращений.

Физические механизмы фотомедицины

В настоящее время в литературе активно обсуждается вопрос о связи низкочастотных флуктуаций структуры белка (внутримолекулярная динамика) с его функциональной активностью. Экспериментально [25] и теоретически [18] показана функциональная значимость равновесных низкочастотных движений элементов структуры макромолекул в осуществлении ферментативного катализа в биологических системах.

Белковые макромолекулы способны претерпевать структурные перестройки под действием различных физических полей и химических агентов. Возможны два типа таких перестроек: переход белка из нативного в денатурированное, функционально неактивное конформационное состояние (денатурированный переход) и переход между двумя функционально активными формами, названный функциональным переходом [24]. Такого типа переходы возможны под действием внешнего электромагнитного излучения.

В случае, когда ЭМИ попадает в полосу сильного поглощения молекул человеческого организма и поглощение это значительное, оно может вызвать "денатурированный переход", поэтому гамма, рентген, УФ - терапии, СВЧ - физиотерапия и лечение синим светом весьма критично к дозе и может вызвать нежелательную деструкцию тканей, например, ожог.

Напротив, низкоинтенсивное излучение, попадающее и полосу слабого поглощения молекул, не может привести к деструкции, перегреву, разрушению биообъекта, но, в то же время, вызывает функциональные переходы, которые очень сильно влияют на деятельность живой клетки. В таком диапазоне работают низкоинтенсивные источники ЭМИ, используемые в "лазерной терапии".

Ниже мы покажем, как один и тот же источник низкоинтенсивного света - гелий-неоновый лазер (ГНЛ), может вызвать биологически значимые изменения как в присутствии сильно поглощающего фотоакцептора, введённого извне, так и при наличии чрезвычайно слабого поглощения излучения с длиной волны 633 нм молекулярным кислородом.

Фотоиндуцированная ферментативная эпимеризация глюкозы

Вопросы динамических процессов в биологических молекулах ещё очень далеки от завершения, тем не менее использование методов "физики мягкого тела", как это образно обозначил В.А. Коварский, позволило построить физическую модель ферментативного катализа, объясняющую многие явления, в частности, высокую скорость некоторых ферментативных реакций [25].

Речь идёт о физических моделях, опирающихся на представления о ферментативной реакции, как о неадиабатическом электронно-ядерном процессе, для описания которого учитывается вклад низкочастотных (конформационных) степеней свободы [10]. Микроскопическая теория ферментативного катализа, учитывающая низкочастотные колебания белка, позволяет рассмотреть форму потенциального барьера ферментативной реакции, высота и ширина которого явным образом зависят от конформационных степеней свободы, которые возбуждаются связанными с ними высокочастотными колебаниями в реакционном центре фермента - коферменте [11], либо при непосредственной передаче колебательной энергии от внешнего агента на белок.

В свою очередь, высокочастотную моду в реакционном или активном центре фермента (АЦФ) можно возбудить внешним электромагнитным полем [3]. Например, высокочастотные колебания (акцепторные моды) АЦФ появятся вследствие безизлучательной релаксации металла, принадлежащего коферменту, либо металла-лиганда, который предварительно был возбуждён и поглотил внешнее электромагнитное излучение [26].

Таким образом, теория предлагает возможность управлять высотой и шириной потенциального барьера ферментативной реакции, а, следовательно, и самой ферментативной реакцией посредством внешнего электромагнитного излучения.

В нашей работе мы, как нам представляется, продемонстрировали такую возможность, когда в системе - водный раствор белка конканавалина А (КонА), глюкозы и хлорида эрбия, экспериментально под действием излучения гелий-неонового лазера с длиной волны 633 нм были получены эпимеры глюкозы - аллоза, манноза и галактоза. Важной особенностью этого эксперимента является то обстоятельство, что в данной ситуации КонА проявил энзиматическую активность. Такое поведение конканавалина А наблюдается впервые.

Конканавалин А относится к лектинам - белкам, обладающим свойством специфично и обратимо

связывать углеводы или их остатки в биополимерах [19, 20]. Молекула КонА может быть построена из двух или четырёх одинаковых полипептидных цепей с молекулярной массой около 26 кДа. В каждой цепи находится по одному иону Ca^{2+} и Mn^{2+} и один центр связывания углевода. При pH выше 7 КонА находится в растворе преимущественно в тетрамерной форме, а ниже 6 - димерной. Предположительно основная физиологическая функция КонА - транспорт, накопление и иммобилизация углеводов.

Трихлорид эрбия выбран из тех соображений, что одна из полос поглощения аквакомплекса $[Er(H_2O)_6]^{3+}$ соответствует длине волны ГНЛ - 633 нм [21].

Энзиматическая активность КонА никогда ранее не наблюдалась и вопрос этот не рассматривался. Фотоэпимеризация глюкозы, наблюдаемая нами, - это фотоиндуцированная ферментативная реакция, в которой под действием электромагнитного излучения и при наличии фотосенсибилизатора, белок, никогда ранее не проявлявший энзиматической активности, эффективно переводит связанную с ним глюкозу в эпимеры. Фотоэпимеразная активность КонА установлена впервые.

Материалы и методы эксперимента

Цилиндрическую кювету (200 мкл) от Спекола-10 (Carl Zeiss Jena, DDR) заполняли раствором, содержащим 1 ммоль КонА, 1 мкмоль глюкозы Glc и 1 мкмоль $ErCl_3$ в 0.01 М ацетатном буфере, pH 5.0 и облучали светом гелий-неонового лазера ЛГН-111 с длиной волны 633 нм через окно в кювете в течение 6 минут с мощностью на входе в кювету 20 мВт. В эксперименте и контроле реакционная смесь изолировалась от внешнего фонового излучения. Лазерный свет подавался к окну кюветы через полый зеркальный световод. Эксперименты проводились в совершенно одинаковых условиях при 20 С. Всего было проведено 14 экспериментов и во всех случаях в эксперименте наблюдали выпадение осадка. Далее все образцы (экспериментальный и контрольный) центрифугировали при 12 тыс. g в течение 10 минут. Реакционную смесь обрабатывали ионообменными смолами КУ-2 (H^+ форма) и АВ-17 (OH^- форма), фильтровали через стекловату и упаривали на ротонном испарителе в вакууме при 40 С. Содержание углеводов определяли методом ГЖХ (газожидкостной хроматографии) в виде ацетатов полиолов на хроматографе «Цвет 110» со стеклянной колонкой (0,3x90 см), заполненной 3% QF-1 носителем Gasa Chrom Q (100-120 меш), или «Pye Uni-cam 104» со стеклянной колонкой (0,4x120 см) с этой же фазой при возрастании температуры от 152 до 213 С со скоростью 5 С/мин. Дополнительно состав реакционной смеси подтверждали нисходящей бумажной хроматографией на бумаге Filtrak FN 15 в системе BuOH: Pyg: H_2O (6:4:3). В качестве стандартов использовали образцы глюкозы (Glc), галактозы (Gal) и маннозы (Man) (Реахим, СССР). Образец аллозы (All) был синтезирован как описано в [22]. Эксперименты проводились при комнатной температуре 20 С в совершенно одинаковых условиях. Данные ГЖХ представлены на рис. 8.

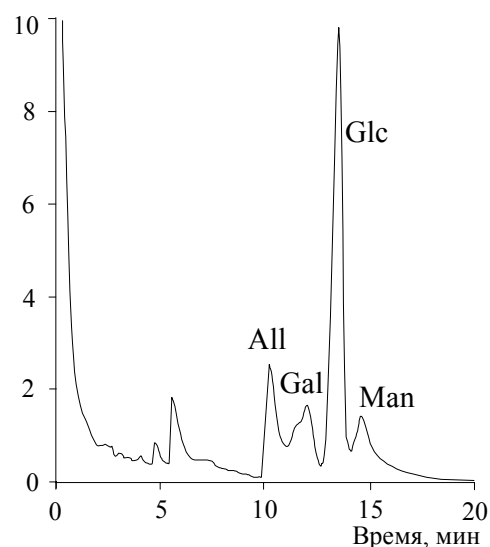


Рис. 8. Данные ГЖХ реакционной смеси в относительных единицах.

Обсуждение результатов

В эксперименте под действием света с длиной волны 633 нм происходит образование эпимеров глюкозы. Выход эпимеров составлял 37 – 40% и варьировался от эксперимента к эксперименту в этих пределах. Соотношение эпимеров между собой в среднем было следующее - Аллоза (C_3 -эпимер) - 60%, Галактоза (C_4 - эпимер) - 30%, Манноза (C_2 - эпимер) - 10%.

В контроле, т.е. в отсутствие лазерного света, эпимеризация не происходила. Реакция фотоэпимеризации не происходила как в отсутствие КонА, так и в отсутствие $ErCl_3$, а также в отсутствие обоих этих компонент.

По видимому, ситуация развивается следующим образом: вследствие физической дезактивации иона эрбия, на белок КонА передается колебательное возбуждение ≈ 2 эВ (соответствует длине волны 633 нм), которая приводит к «денатурированному» либо к «функциональному» переходу в белке. В свою очередь, низкочастотные «конформационные» колебания изменяют параметры активационного барьера эпимеризации глюкозы, связанной с КонА в реакционном центре, что обеспечивает проведение реакции. О конформационных переходах в боковой цепи холестерина, вызванных излучением ГНЛ, впервые сообщается в работе [23], что имеет ключевое значение в терапии заболеваний, связанных с нарушением холестеринового обмена.

Механизм неспецифического биостимулирующего действия низкоинтенсивного лазерного излучения

Понятие неспецифичности относительно взаимодействия ЭМИ с человеческим организмом возникло в среде медиков и биологов, стремящихся подчеркнуть поразительную эффективность низкоинтенсив-

ного лазерного света при лечении самых различных заболеваний, причём эффект достигался при интенсивностях света, составляющих единицы мВт/см², исключая какие-либо тепловые эффекты. Впоследствии этот термин приобрёл физический смысл, когда специфическим стали называть взаимодействие света и биообъекта, связанное с интенсивным молекулярным поглощением, т.е. для которого установлены «специфические» фотоакцепторы, осуществляющие акт интенсивного первичного фотопоглощения. Взаимодействие считается неспецифическим, если биологический отклик велик, а поглощение света настолько мало, что выявить первичный фотоакцептор проблематично и это становится темой острых дискуссий. Поскольку никто не сомневается в том, что биологический отклик должен предваряться актом первичного фотопоглощения, «неспецифичность» в указанном выше смысле говорит о существовании физического механизма, позволяющего усилить, «генерализовать», распространить эффект слабого локального молекулярного поглощения ЭМИ до параметров терапевтического эффекта. В этом смысле принимается термин «биостимуляция», который имеет более широкую трактовку и объединяет сходные эффекты от воздействия различных низкоинтенсивных (нетепловых) физических полей: электромагнитных, акустических, гравитационных.

В работе [31] было предложено, что общим звеном, позволяющим биосистеме одинаково реагировать на разнородные сигналы, являются биологические жидкости, как структурные матрицы, в которых протекают важнейшие метаболические процессы. В основе подхода лежит представление о структурной альтерации биоидкостей – переходе между структурно неэквивалентными метастабильными состояниями с различающимися физико-химическими свойствами.

Традиционно считается, что жидкости, в отличие от кристаллов не обладают свойством полиморфизма, т.е. способностью существовать в различных структурных формах при одинаковом химическом составе и внешних условиях, однако в сложных многокомпонентных растворах, к которым относятся биологические жидкости, структурные эффекты играют важнейшую роль. Такие явления, как фазовое расслоение на макро и микро – масштабах, поверхностные эффекты на границе раздела фаз, конкуренция гидрофильных и гидрофобных взаимодействий приводит к исключительному многообразию структурных форм растворов [8]. Среди них особое место занимают лиотропные жидкокристаллические системы (ЛЖК), по степени упорядоченности и структурной сложности приближающиеся к биологическим гуморальным средам. Известно, что жидкие кристаллы, в частности, ЛЖК, обладают уникальной чувствительностью к слабым внешним возмущениям различной физической природы [6], исключительно развитым структурным полиморфизмом, склонностью к формированию метастабильных состояний, динамической и структурной неустойчивостью. На этой струк-

турной основе возможна реализация многообразных механизмов приёма, усиления и трансформации слабых внешних сигналов, хранения информации, управления биологическими процессами. Поэтому физико-химические аналоги ЛЖК на базе биоидкостей представляют собой перспективные системы для моделирования процессов взаимодействия НИЛИ с биологическими системами.

Следующий шаг для построения модели неспецифического структурного усиления слабого локального возмущения биоидкости под действием НИЛИ, состоит в нахождении первичного фотоакцептора излучения ГНЛ с длиной волны 633 нм. Как показано С.Д.Захаровым [12], одним из таких фотоакцепторов является молекулярный кислород – O₂, присутствующий в растворённом виде в клеточной суспензии. Молекула O₂ при поглощении кванта света с длиной волны 633 нм переходит в возбуждённое синглетное состояние. Несмотря на то, что для O₂ электронный переход из основного триплетного состояния на синглетный уровень запрещён квантовыми правилами отбора и поэтому под действием излучения происходит чрезвычайно редко, каждая молекула синглетного кислорода благодаря значительному времени жизни (порядка 10⁻⁶ с) и высокой химической активности способна создать в неравновесной биоидкости локальное возмущение, которое может быть усилено.

Тушение синглетного кислорода в конденсированной среде может происходить двумя путями: химическим и физическим. Химические механизмы дезактивации ¹O₂ хорошо исследованы [19]. Физический механизм тушения состоит в переносе возбуждения с молекулы ¹O₂ на колебательные подуровни окружающих молекул среды. При физической дезактивации молекул ¹O₂ на колебательные подуровни окружающих молекул передается энергия ≈ 1 эВ. Нетрудно оценить в соответствие с моделью температурного клина [35], что при выделении энергии ≈ 1 эВ область с диаметром 10 Å за время ≤ 10⁻¹¹ с будет разогрета до температур T≈100 С. Вследствие того, что на малых расстояниях предположение о непрерывности среды заведомо неприменимо, получаем нижнюю оценку пространственно-временного масштаба релаксационного процесса как своеобразного микрогидравлического удара.

Известно, что в некоторых твердых растворах кавитационное микроударное нагружение вызывает локальный кооперативный сдвиг (мартенситный фазовый переход), при котором энергия микроударного взаимодействия расходуется на образование зародыша новой метастабильной фазы, а не на деформацию исходной структуры [5]. В водных растворах отсутствует истинный кристаллический порядок, и понятие фазового перехода к перестройке их структуры в обычном значении вряд ли применимо. Однако вблизи поверхности, особенно в высокодисперсных системах, каковой, например, является кровь, вода и водные растворы в высокой степени «структурированы» [9]. Кроме этого, учитывая развитый полимор-

физм воды в твердой фазе, проявление которого следует ожидать в ближнем порядке жидкости, можно предположить, что микроудар при дезактивации $^1\text{O}_2$ так же, как и в твердых растворах [5], вызывает локальную перестройку структуры в прилегающей области, аналогичной мартенситному переходу (переходу типа смещений). В пользу этого предположения говорит то, что за время $\approx 10^{-11}$ с диффузия молекул практически отсутствует. Возможно, подобно твердым растворам, этот переход происходит путем генерации акустических колебаний при локальном возмущении электронной подсистемы [17], возникающем при дезактивации $^1\text{O}_2$. Аналогия между водными растворами и твердыми растворами углерода в металлах является сугубо качественной, однако, она имеет смысл в дисперсных системах вблизи поверхностей. Кроме этого следует учесть, что структурная перестройка типа мартенситного перехода наблюдается в молекулярных кристаллах [40], фосфолипидах [37], реальных биологических системах [39] и имеет, по-видимому, универсальный характер во всех случаях, когда перестройка решетки происходит в отсутствие диффузии. Добавим, что возможность локальных структурных перестроек в биомолекулярных жидкостях подтверждается наличием в них линейных дефектов типа дислокаций и дисклинаций [28, 29], а также непосредственно экспериментами по аннигиляции позитронов [30].

Для обоснования возможности физической реализации рассматриваемой модели необходимо оценить размер зародыша новой структуры, который может образоваться в результате дезактивации $^1\text{O}_2$. Поскольку диссипация энергии протекает в объеме, то уже в четвертой координатной сфере (для воды) энергия 1 эВ равномерно распределяется между 100 молекулами. На больших расстояниях добавка к энергии отдельных молекул пренебрежима в сравнении с КТ (≤ 0.01 эВ). Расстояние между молекулами H_2O в кристалле составляет порядка 2.7 \AA и, следовательно, радиус сферы возмущения r_0 составляет $\sim 10 \text{ \AA}$, что качественно совпадает с приведенной выше оценкой. Эта сфера включает ~ 150 частиц, а отношение ее поверхности (шаровой слой с размером $\sim 10 \text{ \AA}$) к объему составляет ~ 0.3 , что позволяет с учетом снижения поверхностного натяжения по мере уменьшения r_0 , рассматривать ее как зародыш новой фазы, отличной от исходной.

В термодинамически устойчивом состоянии единичное возмущение структуры раствора на расстояниях $\sim 10 \text{ \AA}$ не играет заметной роли и легко разрушается тепловыми флуктуациями. Однако биологические жидкости и структуры нельзя рассматривать как термодинамически стабильные. Прежде всего, в реальных условиях — это высокодисперсные системы. Для них характерно наличие микронеоднородностей состава и градиентов концентрации, например, между вне- и внутриклеточной средой. Следовательно, для моделирования процессов, происходящих в биологических жидкостях, следует использовать метастабильное состояние растворов биомолекул, возни-

кающее в начальных фазах процесса растворения. Особенностью таких метастабильных состояний являются их высокая чувствительность к локальным возмущениям, когда флуктуационное или вынужденное образование зародыша фазовой структуры вызывает ее формирование в макрообъеме без дополнительных затрат энергии.

Важную роль в стабилизации метастабильного состояния биораствора играет его взаимодействие с поверхностями раздела фаз (биоподложками). Фиксация определенного типа структуры раствора на границе с биоподложками (мембраны клеток, стенки сосудов и др.) препятствует ее флуктуационному разрушению. В работе [31] на примере метастабильного раствора спирт – вода – перекись водорода установлено, что взаимодействие с твердой поверхностью подавляет развитие крупномасштабных пространственных флуктуаций показателя преломления (формирование областей с различной структурой сетки водородных связей на масштабах, сравнимых с длиной волны видимого света $\approx 0.5 \text{ мкм}$) на расстояниях порядка радиуса действия капиллярных сил ($\approx 1 \text{ мм}$). Поэтому процессы структурной альтерации $^1\text{O}_2$ следует рассматривать в сочетании с процессами флуктуационного зарождения и разрушения областей с различной структурой и стабилизацией таких структур поверхностным взаимодействием.

Структурные эффекты излучения ГНЛ, которые наблюдаются в различных модельных растворах, являются качественно сходными, что указывает на определенную независимость этих эффектов от конкретного типа раствора. Предлагаемая модель структурного усиления локальных возмущений может быть применима к системам различной природы, удовлетворяющим требованию наличия у них нескольких метастабильных состояний с близкой энергией. Согласно [13] в различных метастабильных состояниях биораствора заметно различаются такие важные параметры, как кинетика обмена протонов, участвующих в водородной связи, форма и размеры упорядоченных агрегатов молекул, образующихся при кристаллизации. Все это указывает на существенное изменение межмолекулярного взаимодействия при переходе раствора в новое состояние. Учитывая, что энергетика и кинетика биохимических реакций изменяются на порядки величин в средах с различной структурой [37] и регулируются фазовыми переходами в этих средах [21], можно заключить, что известное неспецифическое влияние излучения ГНЛ на активность различных биохимических процессов обусловлено воздействием на них через изменения структуры водной матрицы биожидкости (метастабильного раствора биомолекул). Вероятно, что именно структурные изменения в биожидкостях обеспечивают известный эффект генерализации воздействия НИЛИ из зоны облучения на удаленные органы и ткани. Сказанное выше получило прямое экспериментальное подтверждение в работе [13].

Изменение физической структуры биожидкости, её плотности, непосредственно влияет на внутримо-

лекулярную низкочастотную динамику находящихся в ней белков, как это имеет место при разогреве, либо охлаждении белковых растворов [25], что, в свою очередь, приводит к изменению параметров активационных барьеров ферментативных реакций, их скорости, изменению эластичности, проницаемости мембран и, посредством триггерных механизмов усиления, физиологическому отклику [23].

М.Т. Луценко [22] и Г.Е. Бриль [7] независимо показали экспериментально и теоретически, что НИ-ЛИ осуществляет стимуляцию стресс-реализующих систем на начальных этапах запуска общего адаптационного синдрома организма и защищает (осуществляет протекторное действие) организм от патологического стресса («дистресс» по Селье). Это же, по существу, мы видим и в наших биологических моделях. Физический механизм также направлен на реализацию этой идеи. И в этом нет ничего удивительного, поскольку лазерный свет – это продукт человеческой жизнедеятельности. В природе нативно не существует такого источника электромагнитного излучения. Ни одно космическое светило не обладает такой спектральной яркостью. Поэтому совершенно естественно, что соприкосновение биологического объекта с подобным источником света – явление эволюционно совершенно новое, требующее адаптации. Возможно, и интерес к лазерной медицине обусловлен этим обстоятельством и, когда-нибудь, человеческий организм, подобно тому, как он привыкает к антибиотикам, адаптируется к лазерному свету и «квантовое лекарство» потеряет свою силу, – возможно, но наступит это очевидно не скоро.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров В.Я. Реактивность клеток и белки.- М.: Наука, 1985.-177 с.
2. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы исследования в биологии и медицине.- М.: Медицина, 1962.-378 с.
3. Ферментативная реакция во внешнем электромагнитном поле/ А.В.Белоусов, В.А.Коварский, Е.Т.Мерлин, Б.С.Ястребов // Биофизика.- 1993.- Т.38., Вып.4.- С. 619-626.
4. Биохимические методы исследования в клинике/ Под ред. А.А.Покровского. - М.: Медицина, 1969.-415 с.
5. Богачев И.Н., Минц Р.И. Кавитационное разрушение железо-углеродистых сплавов.- М.:Метгиз.,1959.-244 с.
6. Браун Г., Уолкер Дж. Жидкие кристаллы и биологические структуры.- М.: Мир, 1982.- 198с.
7. Применение низкоинтенсивного лазерного излучения в качестве физического адаптогена при действии на организм стрессорных факторов /Г.Е. Бриль, Т.П.Романова, О.В.Прошина, Т.А.Беспалова.- Саратов: Изд-во СГМ, 1998.- 31с.
8. Веденов А.А. Физика растворов.- М.: Наука, 1984.- 107с.
9. Вода в дисперсных системах/ Дерягин Б.В., Чураев Н.В., Овчаренко Ф.Д. и др.- М.: Химия, 1989.- 288 с.
10. Волькенштейн М.В. Молекулярная биофизика.- М.: Наука, 1975.-416 с.
11. Волькенштейн М.В., Голованов И.Б., Соболев В.М. Молекулярные орбитали в энзимологии.- М.:Наука, 1982.- 240 с.
12. Методы лазерной биофизики и их применение в медицине/ С.Д.Захаров, Б.В.Еремеев, С.Н.Перов, Н.А.Панасенко.- Тарту: Изд-во Тартуского ун-та., 1989.- С. 23-60.
13. Захаров С.Д., Скопинов С.А., Чудновский В.М.и др. 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.
14. Захарова Е.И., Бриль Г.Е. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на свойства и эффекты стафилококкового токсина// Низкоинтенсивные лазеры в эксперименте и клинике. / Под ред. Г.Е.Бриля.- Саратов, 1992.- С. 32-36.
15. Илларионов В.Е. Техника и методика процедур лазерной терапии: Справочник.- М., 1994.- 189 с.
16. Иммунологические методы / Под ред. Х.Фримеля.- М.: Мир, 1979.-354 с.
17. Кащенко М.П., Минц Р.И. Механизм мартенситного превращения, обусловленный неравновесностью электрон-фотонной системы// Письма в ЖЭТФ.- 1976.- Т.26, №6.- С.433-435.
18. Коварский В.А. Квантовые процессы в биологических молекулах. Ферментативный катализ// Успехи физических наук.- 1999.- Т.169, № 8.- С. 889-908.
19. Красновский А.А. Механизм образования и роль синглетного кислорода в фотобиологических процессах//Молекулярные механизмы биологического действия оптического излучения.- М.: Наука, 1988.- С. 23-41.
20. Курика А.В., Чудновский В.М., Юсупов В.И. Новое явление: фотоиндуцированная ферментативная реакция// Материалы 8 международного конгресса (EMLA) LASER 2001.- Москва: РМЛА, 2001.-С. 52-55.
21. Левашев А.В., Клячко И.Л., Пшежецкий А.Б. и др. Суперактивность кислой фосфатазы в обращенных мицеллах поверхностно-активных веществ в органических растворителях// ДАН СССР.- 1986.- Т.286. №5.- С.1271-1273.
22. Луценко М.Т., Приходько В.Б., Луценко М.М. Применение низкоэнергетического лазерного излучения в пульмонологии// Новые медицинские технологии на Дальнем Востоке: Матер. II Дальневосточной Региональной конф. с всероссийским участием.- Владивосток: Дальнаука, 1998.- С. 88-104.
23. Луценко М.Т. Новые методы оценки холестерина обмена в плаценте при вирусно-бактериальном повреждении дыхательной системы беременной// Бюл. физиол. и патол. дыхания.- 1999.-

Вып. 3.- С. 52-60.

24. Мажуль В.М. Конформационные переходы в белках и их связь с параметрами флуоресценции: Дис. ... канд. биол. наук.- Минск, 1969.- 178 с.

25. Мажуль В.М., Зайцева Д.Г., Щербин Д.Г. Внутримолекулярная динамика и функциональная активность белков// Биофизика.- 2000.- Т.45, Вып.6.- С.965-989.

26. Медведев Э.С., Ошеров В.И. Теория безизлучательных переходов в многоатомных молекулах.- М.: Наука, 1983.- 280 с.

27. Методы получения моно- и полисахаридов и их производных. Моносахариды. -D-Аллоза// Методы исследования углеводов: Пер. с англ. В.А.Несмеянова / Под ред. А.Я. Хорлина.- М.: Мир, 1975.- С. 100-104.

28. Минц Р.И., Кононенко Е.В. Дефекты биологических жидких кристаллов// Природа.- 1984.- №6.- С. 56-63.

29. Минц Р.И., Кононенко Е.В. Надмолекулярные структуры биосистем// Биолог. журн. Армении.- 1985.- Т.37, №7.- С.559-569.

30. Минц Р.И., Кочерга Ю.П., Скопинов С.А. Температурная зависимость интенсивности узкой компоненты угловых корреляций позитронной аннигиляции в ацетилхолинхлориде// Биофизика.- 1986.- Т. 31, №3.-С.217-221.

31. Минц Р.И., Скопинов С.А. Структурная альтерация биологических жидкостей и их моделей при информационных воздействиях. Гелий неоновый лазер// Действие электромагнитного излучения на биологические объекты и лазерная медицина / Под ред. В.И.Ильичёва.- Владивосток: Изд-во ДВО АН СССР, 1989.- С. 6-41.

32. Спектрофотометрические и люминесцентные

методы определения лантаноидов / Н.С.Полуэктов, Л.И. Коненко, Н.П.Ефрюшина, С.В. Бельтюкова.- Киев: Наукова Думка, 1989.- 256 с.

33. Сидорова В.Е., Чудновский В.М. Влияние излучения гелий-неонового лазера на конформацию бактериальных токсических белков// Лазерная терапия на Дальнем востоке/ Под ред. Г.И.Сухановой, В.М. Чудновского.- Владивосток: Дальнаука, 1992.-С.10-18.

34. Скоуп Р. Методы очистки белков.- М.: Мир, 1985.-325 с.

35. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования//Под ред. М.О. Биргера.- М.: Мир, 1982.-435 с.

36. Чирков Ю.Т., Ростокин В.И., Пшеничников Л.Г. Образование в пересыщенных растворах равновесных подкритических газовых зародышей// Электрохимия.- 1989.- Т.23.- С. 237-241.

37. Энгельгарт В.А. Химия исследует живое.- М.: Знание, 1966.- 32 с.

38. Goldstein I.J., Haeyns C.E. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals// Adv. In Carbohydrate Chem.Biochem. (Eds. Tipson R.S.,Horton D.)- New York, San-Francisco, London.: Acad. Press.- 1978.- Vol.35.- P. 127-340.

39. Olson G.B., Hartman H. Martensite and life.: Displasive transformations as biological processes// J. Phys.- 1981.- Vol.43, №12.- P. 855-865.

40. Reynolds P.A. Martensitis phase transitions in molecular crystals-dichlorobenzene// Acta Cryst. A.- 1977.- Vol.. 33, №7.- P.185-191.

41. Van Driessche E. Structure and function of Leguminosae lectins // Adv. In Lectin Research / Ed. Franz H.- Berlin: VEB Verlag Volk und Gesundheit, 1988.- Vol.1.- P.73-134.

