

ЗАВИСИМОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ОТ ЧАСТОТЫ ЕГО МОДУЛЯЦИИ

© 2008 г. В. Ю. Плавский*; Н. В. Барулин**

* Институт физики НАН Белоруссии, Минск, Белоруссия

** Белорусская государственная сельскохозяйственная академия, г. Горки, Могилевская обл., Белоруссия

E-mail: plavskii@dragon.bas-net.by

В работе представлены экспериментальные данные, свидетельствующие о выраженной зависимости биологического действия низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) с длиной волны 808 нм (плотность мощности $P = 2,9$ мВт/см²) от режима облучения (непрерывный или модулированный) и частоты модуляции в диапазоне $F = 1-50$ Гц. Показано, что удобным объектом для оценки биологической активности излучения являются эмбрионы осетровых рыб, а тестами, подтверждающими наличие фотобиологического эффекта, – размерно-весовые показатели стандартной молоди рыб и ее устойчивость к действию экстремальных температур (терморезистентность). Дозовая зависимость стимулирующего эффекта для каждого режима облучения характеризуется кривой с выраженной точкой экстремума, величина и энергетическое положение которого определяется частотой модуляции. Максимальное стимулирующее действие, проявляющееся в двукратном по сравнению с контрольной группой увеличении массы тела особей и их терморезистентности, наблюдается при $F = 50$ Гц (доза $E = 0,17$ Дж/см²). Обсуждаются перспективы использования излучения, модулированного по интенсивности, в медицинских технологиях, основанных на воздействии НИЛИ.

Коды OCIS: 170.0170, 350.5130, 140.5960.

Поступила в редакцию 17.03.2008.

Введение

Выраженная биологическая активность и высокая терапевтическая эффективность низкоинтенсивного лазерного излучения видимой и ближней инфракрасной областей спектра в настоящее время практически не ставятся под сомнение как отечественными специалистами, так и исследователями ведущих стран Западной Европы, США и Японии [1–7]. При этом наиболее широкое распространение в современной клинической практике нашли методы лазерной терапии, основанные на воздействии оптическим излучением непрерывного и импульсного (наносекундного) режимов генерации [7]. Что касается режима модуляции, то его наличие хотя и предусмотрено в выпускаемых терапевтических аппаратах на основе полупроводниковых лазеров [7], но является скорее данью моде и элементом саморекламы производителей лазерной медицинской техники, чем научно-обоснованным подходом. Имеющиеся в литературе экспериментальные сведения [8–17] о зависимости биологического действия лазерного излучения от частоты модуляции столь противоречивы, что не позволяют обосновать критерии ее выбора для повышения терапевтической эффективности метода.

Анализ вышеуказанных литературных данных позволяет заключить, что одной из причин их про-

тиворечивости является проведение сравнительных исследований при каком-либо одном фиксированном значении дозовой нагрузки [8–12, 17]. Кроме того, в некоторых из выше цитированных источников средняя плотность мощности модулированного излучения не соответствовала таковой для непрерывного, что, согласно [18–20], может сказываться на величине стимулирующего эффекта. Все это не позволяет выявить общие закономерности биологического и терапевтического действия непрерывного и модулированного по интенсивности излучения и, соответственно, разработать рекомендации по практическому применению модулированного излучения в клинической практике.

Цель настоящей работы – сравнение биологической активности непрерывного и модулированного лазерного излучения ближней инфракрасной области спектра в широком диапазоне дозовых нагрузок в условиях одинаковой средней плотности мощности воздействующего излучения, а также исследование зависимости эффекта от частоты модуляции излучения. В качестве объекта для оценки биологической активности указанного физического фактора использовались эмбрионы осетровых рыб, которые [18] чувствительны к действию лазерного излучения и являются удобной моделью для исследования механизмов действия факторов физической природы. Тестами, подтверждающими наличие фо-

тобиологического эффекта при воздействии излучения на эмбрионы, были выбраны размерно-весовые показатели и устойчивость к действию экстремальных температур (терморезистентность) стандартной молоди осетровых рыб, полученной из оплодотворенной икры, подвергавшейся (или не подвергавшейся) кратковременному воздействию лазерного излучения.

Материалы и методы исследований

Увлажненная оплодотворенная икра возвратного гибрида бестера на этапе органогенеза помещалась в чашку Петри в виде монослоя. Воздействие поляризованным лазерным излучением инфракрасной области спектра $\lambda = 808$ нм осуществлялось с помощью лазерного терапевтического аппарата “Сенс 815”, созданного в Институте физики имени Б.И. Степанова НАН Белоруссии на базе полупроводникового лазера [7]. Выбор длины волны лазерного излучения определяется высокой биологической активностью излучения данной области спектра и ее соответствием так называемому “окну прозрачности биологических тканей”, чем обеспечивается максимальная глубина проникновения оптического излучения в ткань. Как показано нами ранее [18], черная окраска икры осетровых рыб, обусловленная присутствием меланинового пигмента, не является препятствием для излучения указанной области спектра. Технические характеристики аппарата “Сенс 815” обеспечивали возможность воздействия лазерного излучения в непрерывном и модулированном режимах при частоте модуляции $F = 1, 2, 5, 10, 50$ Гц. Глубина модуляции составляла не менее 95%, а скважность $Q = T/\tau = 2$, где T – период, τ – длительность импульса [18]. Во всех вариантах облучения средняя мощность излучения составляла $W = 250 \pm 5$ мВт. Выравнивание средней мощности излучения для непрерывного и модулированного режимов воздействия осуществлялось путем регулирования тока, протекающего через полупроводниковый лазер, и контролировалось измерителем средней мощности и энергии лазерного излучения ИМО-3С. Важно отметить, что изменение тока накачки лазера при переходе от непрерывного излучения к модулированному практически не приводит к пространственному перераспределению интенсивности излучения. Поддержание мощности излучения на заданном уровне независимо от условий эксплуатации и температурного режима обеспечивалось обратной связью между выходной мощностью и током разряда лазера, предусмотренной в аппарате “Сенс 815” [7]. Излучение лазера расфокусировалось линзой таким образом, чтобы размер светового пятна соот-

ветствовал площади ($S = 85$ см²) монослоя облучаемой икры. Плотность мощности воздействующего излучения составляла $P = 2,9 \pm 0,2$ мВт/см², что, согласно [18], является оптимальным значением для повышения жизнестойкости молоди осетровых рыб. Для исключения возможных артефактов, вызванных неоднородным пространственным распределением воздействующего излучения, положение чашки Петри относительно светового пятна изменяли каждые 15–20 с без изменения расстояния до источника излучения. Облучение икры проводили в течение 30, 60, 90, 180, 300, 600 с при температуре 16 ± 1 °С. Контрольные (интактные) образцы икры также помещались в чашку Петри и находились в тех же условиях, за исключением облучения, что и опытные образцы.

После облучения икру помещали для дальнейшего инкубирования в уменьшенные образцы аппаратов Вейса, где, достигнув завершения эмбрионального развития, происходил выклев предличинки. Опытные и контрольные группы содержали в отдельных аппаратах, в которых обеспечивалось постоянство гидрохимических условий. Выключившихся предличинок переносили в отдельные садки для каждой исследуемой группы. Плотность посадки составляла 5000 особей/м². Переход на активное питание происходил через 10 ± 1 суток. При этом плотность посадки личинок сокращали в 2 раза и она составляла 2500 особей/м². Первые 10 дней после перехода на активное питание кормление осуществлялось каждые 2 ч науплиями артемии и стартовыми комбикормами в соотношении 60:40%, в последующем – 100% сухими комбикормами. В перерывах между кормлениями осуществлялась чистка садков, удаление остатков корма, погибших личинок. В период выращивания температура воды поддерживалась на уровне 20 ± 2 °С.

Контроль над размерно-весовыми показателями и тесты на жизнестойкость к действию экстремальных температур проводили с молодью, достигшей 50-дневного возраста. В качестве параметров, характеризующих влияние излучения на размерно-весовые показатели рыб, использовали величины: $\gamma_m = (M_o/M_k)100\%$ и $\gamma_l = (L_o/L_k)100\%$, где M_k и L_k – масса и длина особей, полученных из икры, не подвергавшейся действию лазерного излучения (контрольная группа), M_o и L_o – масса и длина особей, полученных из икры, облученной лазером (опытная группа). Длину каждой особи измеряли линейкой с ценой деления 1 мм. Взвешивание молоди производили индивидуально на весах модели ВЛР-200, цена деления шкалы 1 мг, допускаемая погрешность $\pm 0,25$ мг. Каждая контрольная и опытная группа при проведении измерений размерно-весовых показателей включала по 140 особей.

Тестом, свидетельствующим об изменении жизнестойкости молоди, эмбрионы которой на стадии органогенеза подвергались лазерному облучению, была выбрана величина $\delta = (t_o/t_k)100\%$, где t_k , t_o – временной интервал от начала инкубации молоди при экстремальной температуре 32 °С до наступления летального исхода у особей контрольной и опытной групп соответственно. Указанные опыты проводили в 80-литровом автоматическом термостате с микропроцессором, обеспечивающим возможность перемешивания и принудительной аэрации воды, а также ее нагревание с заданной скоростью или поддержание температуры на требуемом значении. В термостате фиксировался садочек из латунной сетки, в который помещали подопытную молодь осетровых рыб. Молодь выдерживали в садочке в течение 24 ч без пищи при температуре $20 \pm 0,2$ °С. Затем включали нагреватель и в течение 40 мин воду подогревали до температуры 31 °С. Через 2 мин температуру воды форсированно поднимали до $32 \pm 0,2$ °С и с этого момента секундомером фиксировали время, через которое наблюдается гибель каждой особи в контрольной и опытной группах. Критерием летального исхода являлась остановка движения жаберных крышек. Каждая контрольная и опытная группа при проведении тестов на терморезистентность включала по 30 особей.

Статистическую обработку полученных данных проводили по стандартной методике с использованием пакета Microsoft Excel. Достоверность полученных данных оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты исследований

Проведенные исследования показали, что кратковременное воздействие на эмбрионы осетровых рыб на стадии органогенеза поляризованным лазер-

ным излучением ближней инфракрасной области спектра с длиной волны $\lambda = 808$ нм в определенном интервале интенсивностей и доз (времен облучения) приводит к достоверному увеличению размерно-весовых показателей 50-дневной молоди. Параметры лазерного излучения, оказывающего при различных режимах воздействия (непрерывный или модулированный с частотой 1, 2, 5, 10, 50 Гц) максимальное стимулирующее действие на длину и массу молоди рыб, приведены в табл. 1. Как видно из таблицы, если в контрольной группе, особи которой получены из необлученной икры, средняя масса 50-дневной молоди составила $M = 566,3 \pm 9,5$ мг, а средняя длина $L = 47,0 \pm 0,5$ мм, то для группы рыб, эмбрионы которой подвергались воздействию непрерывного лазерного излучения с длиной волны $\lambda = 808$ нм, плотностью мощности $P = 2,9 \pm 0,2$ мВт/см² в течение $t = 60$ с, $M = 881,1 \pm 13,6$ мг и $L = 58,8 \pm 0,5$ мм. То есть при указанном варианте облучения отмечается достоверный ($p < 0,001$) эффект стимуляции (превышение над контролем) размерно-весовых показателей: по критерию массы $\gamma_m = 155,6\%$; по критерию длины – $\gamma_l = 125,1\%$.

Обращает на себя внимание, что стимулирующий эффект зависит от времени воздействия, а также от режима облучения. Например, при той же экспозиции ($t = 60$ с) и интенсивности воздействующего излучения ($P = 2,9 \pm 0,2$ мВт/см²) переход к модулированному режиму с $F = 50$ Гц сопровождается значительным увеличением размерно-весовых показателей: $\gamma_m = 195,7\%$ ($M = 1108,3 \pm 18,1$ мг); $\gamma_l = 130,9\%$ ($L = 61,5 \pm 1,0$ мм). То есть воздействие на эмбрионы излучением, модулированным по интенсивности с частотой 50 Гц, приводит практически к двукратному увеличению массы молоди по сравнению с особями, полученными из необлученной икры, и в 1,3 раза к более высокому эффекту

Таблица 1. Параметры низкоинтенсивного поляризованного лазерного излучения инфракрасной области спектра ($\lambda = 808$ нм, $P = 2,9 \pm 0,2$ мВт/см²), оказывающего максимальный стимулирующий эффект на размерно-весовые показатели стандартной 50-дневной молоди гибрида бестера при облучении эмбрионов на стадии органогенеза

Режим облучения. Частота модуляции F	Время облучения, с	Средняя масса M		Средняя длина L	
		$M \pm m$, мг	γ_m , %	$M \pm m$, мм	γ_l , %
Контроль	0	$566,3 \pm 9,5$	100	$47,0 \pm 0,5$	100
Непрерывный	60	$881,1 \pm 13,6$	$155,6 \pm 2,4^*$	$58,8 \pm 0,5$	$125,1 \pm 1,0^*$
1 Гц	180	$638,5 \pm 11,1$	$112,7 \pm 2,0^*$	$52,0 \pm 0,3$	$110,7 \pm 0,6^*$
2 Гц	300	$699,8 \pm 17,1$	$123,6 \pm 3,0^*$	$56,7 \pm 0,3$	$120,7 \pm 0,7^*$
5 Гц	300	$662,7 \pm 13,1$	$117,0 \pm 2,3^*$	$53,5 \pm 0,4$	$113,9 \pm 1,0^*$
10 Гц	300	$651,6 \pm 13,9$	$115,1 \pm 2,5^*$	$52,9 \pm 0,3$	$112,5 \pm 0,6^*$
50 Гц	60	$1108,3 \pm 18,1$	$195,7 \pm 3,2^*$	$61,5 \pm 1,0$	$130,9 \pm 2,0^*$

* Достоверность отличия от контроля: $p < 0,001$.

стимуляции по сравнению с немодулированным излучением. Достоверность отличий между контролем и каждым вариантом облучения, а также между указанными вариантами непрерывного и модулированного облучения $p < 0,001$. Отметим, что в отличие от массы, длина особей не столь существенно, хотя и достоверно, отличается в вышеуказанных вариантах облучения.

Как следует из табл. 1, время воздействия (доза) также существенным образом сказывается на величине стимулирующего действия лазерного излучения в отношении размерно-весовых показателей 50-дневной молоди. Поэтому представляло интерес изучить взаимосвязь между эффектом стимуляции и дозой воздействующего излучения. Зависимости массы молоди осетровых рыб в процентах к контролю от времени воздействия ($\gamma_m = f(t)$) на эмбрионы непрерывного излучения (кривая 1) и излучения, модулированного по интенсивности с $F = 1$ (кривая 2), 2 (кривая 3), 5 (кривая 4), 10 (кривая 5) и 50 Гц (кривая 6), представлена на рис. 1 (для всех вариантов облучения $P = 2,9 \pm 0,2$ мВт/см²). Из рисунка видно, что для каждой дозовой кривой наблюдается оптимум, соответствующий максимальному увеличению массы по сравнению с контролем, в зависимости $\gamma_m = f(t)$. Для непрерывного излучения и излучения, модулированного с частотой 50 Гц, максимальное стимулирующее действие наблюдается для $t = 60$ с (энергетическая экспозиция $E_{\max} = 174$ мДж/см²). Как увеличение, так и уменьшение энергетической нагрузки приводит к снижению стимулирующего действия. Обращает на себя внимание, что время, соответствующее максимуму стимуляции для различных режимов облучения, зависит от частоты модуляции. Так, при $F = 1$ Гц (кривая 2) оптимальное время облучения составляет 180 с ($E_{\max} = 522$ мДж/см²), а при $F = 2$ (кривая 3), 5 (кривая 4) и 10 Гц (кривая 5) – $t = 300$ с ($E_{\max} = 870$ мДж/см²). При этом величина максимального эффекта индивидуальна для каждой дозовой кривой.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют, что кратковременное воздействие поляризованным лазерным излучением с $\lambda = 808$ нм, $P = 2,9 \pm 0,2$ мВт/см² как в непрерывном, так и модулированном режимах на эмбрионы на стадии органогенеза обеспечивает в определенном энергетическом диапазоне повышение по сравнению с контролем массы 50-дневной молоди возвратного гибрида бестера. Оптимальным по критерию увеличения размерно-весовых показателей молоди является использование модулированного с $F = 50$ Гц излучения при $t = 60$ с. Напротив, при воздействии излучения с $F = 1$ Гц, стимулирующее действие наи-

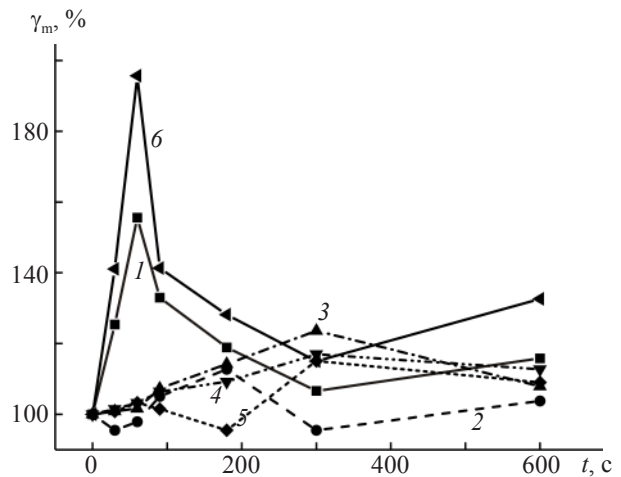


Рис. 1. Влияние времени облучения ($\lambda = 808$ нм, $P = 2,9$ мВт/см²) оплодотворенной икры на массу 50-дневной молоди осетровых рыб (в процентах к контролю) в зависимости от режимов воздействия лазерным излучением и частоты его модуляции: 1 – непрерывный режим, 2–6 – излучение модулировано с $F = 1, 2, 5, 10, 50$ Гц.

менее выражено: в оптимуме ($t = 180$ с) величина эффекта не превышает $\gamma_m = 110,7\%$, а при $t = 30, 60$ и 300 с фотобиологическое действие практически отсутствует.

Как уже отмечалось, другим критерием, подтверждающим выраженную зависимость биологической активности лазерного излучения на эмбриональном уровне от частоты модуляции лазерного излучения, является устойчивость к действию экстремальных температур (терморезистентность) стандартной молоди осетровых рыб, полученной из оплодотворенной икры, подвергавшейся или неподвергавшейся кратковременному воздействию лазерного излучения.

Проведенные исследования показали, что летальный исход у 50-дневной молоди, полученной из икры, облученной в непрерывном или модулированном режимах, наблюдается при более продолжительном воздействии на молодь экстремальной температуры (32 °С), чем у необлученных особей. Параметры лазерного излучения, обеспечивающие максимальные значения эффекта стимуляции для различных режимов облучения эмбрионов осетровых рыб, представлены в табл. 2. Как следует из таблицы, если в контрольной (необлученной) группе средняя продолжительность выживания 50-дневной молоди осетровых рыб при действии экстремальной температуры составила $t_k = 145,3 \pm 1,1$ мин, то в группе рыб, эмбрионы которой подвергались воз-

Таблица 2. Параметры низкоинтенсивного поляризованного лазерного излучения инфракрасной области спектра ($\lambda = 808$ нм, $P = 2,9 \pm 0,2$ мВт/см²), оказывающего максимальный стимулирующий эффект на устойчивость к действию экстремальной температуры стандартной 50-дневной молодежи гибрида бестера при облучении эмбрионов на стадии органогенеза

Режим облучения. Частота модуляции F	Время облучения, с	Время до наступления летального исхода t , мин	Величина стимулирующего действия δ , %	Достоверность отличий от контроля
Контроль	0	145,3 ± 1,1	100	—
непрерывный	60	220,0 ± 1,6	151,4 ± 0,6	$p < 0,001$
1 Гц	180	196,5 ± 2,9	135,3 ± 2,0	$p < 0,001$
2 Гц	300	178,2 ± 4,1	122,4 ± 2,3	$p < 0,001$
5 Гц	600	167,8 ± 2,3	115,5 ± 1,5	$p < 0,001$
10 Гц	300	192,7 ± 2,0	132,6 ± 4,0	$p < 0,001$
50 Гц	60	307,0 ± 3,5	211,3 ± 2,4	$p < 0,001$

действию непрерывного лазерного излучения $\lambda = 808$ нм, $P = 2,9 \pm 0,2$ мВт/см² в течение 60 с – $t_0 = 220,0 \pm 1,6$ мин. То есть стимулирующий эффект, оцениваемый по критерию жизнестойкости $\delta = (t_0/t_k)100\%$, составляет $\delta = 151,4\%$ (достоверность отличия от контроля $p < 0,001$). Переход в режим модуляции с частотой 50 Гц, $P = 2,9 \pm 0,2$ мВт/см², $t = 60$ с сопровождается еще более выраженной величиной стимуляции: $t_0 = 307,0 \pm 3,5$ мин, то есть $\delta = 211,3\%$. Отметим, что при данной частоте модуляции наблюдается достоверное отличие ($p < 0,001$) от величины стимулирующего действия, вызываемого непрерывным излучением.

Детальная зависимость параметра терморезистентности ($\delta = (t_0/t_k)100\%$) от времени воздействия ($\delta = f(t)$) на эмбрионы непрерывного излучения (кривая 1) и излучения, модулированного по интенсивности при $F = 1$ (кривая 2), 2 (кривая 3), 5 (кривая 4), 10 (кривая 5), 50 Гц (кривая 6), представлена на рис. 2 (для всех вариантов облучения $P = 2,9 \pm 0,2$ мВт/см²). Как следует из рисунка, использование других частот модуляции излучения ($F = 1, 2, 5, 10$ Гц) и варьирование времени облучения в диапазоне $t = 30–600$ с не приводит к повышению эффекта стимуляции по сравнению с действием излучения, модулированного с частотой 50 Гц. То есть значение $F = 50$ Гц является оптимальным для повышения терморезистентности молодежи. Обращает на себя внимание, что оптимальное время воздействия для стимуляции жизнестойкости молодежи зависит от частоты модуляции. Так, если для непрерывного излучения и излучения, модулированного с частотой 50 Гц, максимальный эффект наблюдается для времени облучения $t = 60$ с, то при $F = 1$ Гц – для $t = 180$ с, при $F = 2$ и 10 Гц – для $t = 300$ с, а при $F = 5$ Гц – для $t = 600$ с.

Таким образом, максимальное стимулирующее действие как по критерию терморезистентности, так

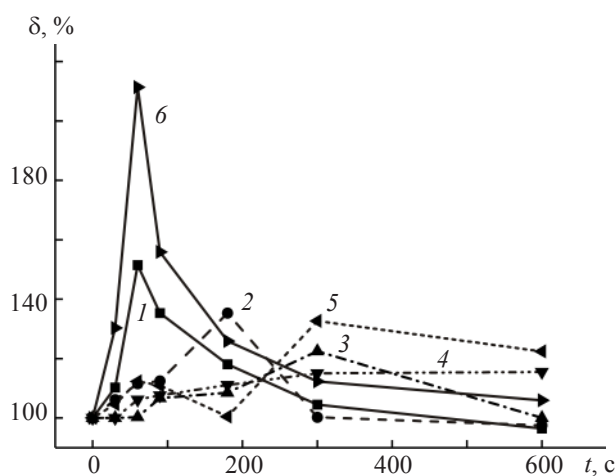


Рис. 2. Влияние времени облучения ($\lambda = 808$ нм, $P = 2,9$ мВт/см²) оплодотворенной икры на устойчивость стандартной 50-дневной молодежи осетровых рыб к действию экстремальной температуры (в процентах к контролю) в зависимости от режимов воздействия лазерным излучением и частоты его модуляции: 1 – непрерывный режим, 2–6 – излучение модулировано с $F = 1, 2, 5, 10, 50$ Гц.

и по критерию увеличения размерно-весовых показателей молодежи осетровых рыб наблюдается при облучении оплодотворенной икры на стадии органогенеза поляризованным лазерным излучением в инфракрасной области спектра при $\lambda = 80$ нм, $P = 2,9 \pm 0,2$ мВт/см², модулированным по интенсивности с частотой 50 Гц ($t = 60$ с).

Обсуждение результатов

Полученные результаты свидетельствуют о выраженной биологической активности низкоинтенсивного поляризованного лазерного излучения ближней инфракрасной области спектра. Экспериментально это выражается в способности указан-

ного физического фактора влиять на жизнестойкость стандартной молодежи осетровых рыб и ее размерно-весовые показатели при кратковременном облучении эмбрионов на стадии органогенеза. Эффекты, индуцируемые лазерным излучением, характеризуются высоким уровнем достоверности: $p < 0,001$. Согласно вышеприведенным экспериментальным данным, воздействие лазерным излучением в непрерывном режиме ($\lambda = 808$ нм, $P = 2,9$ мВт/см², $t = 60$ с) на эмбрионы ускоряет по сравнению с особями, полученными из необлученной икры, развитие размерно-весовых показателей молодежи осетров по критерию массы более чем в 1,5 раза, а по критерию длины тела в 1,25 раза. Молодь, полученная из облученной икры, характеризуется также более высокой устойчивостью к воздействию экстремальной температуры 32 °С: параметры терморезистентности $\delta = t_o/t_k$ повышаются в результате кратковременного воздействия ($t = 60$ с) непрерывного лазерного излучения более чем в 1,5 раза. Поскольку устойчивость живых организмов к разнообразным факторам внешней среды является интегральным показателем, то это свидетельствует о более высокой степени физиологической сформированности организма в целом [21].

Отличительной особенностью каждой дозовой кривой (диапазон изменения энергетической нагрузки $E = 87\text{--}1740$ мДж/см²), полученной путем варьирования времени воздействия (30–600 с), является наличие выраженной точки экстремума, соответствующей оптимальному времени облучения оплодотворенной икры. В этой связи следует отметить, что такой вид дозовой зависимости характерен для регуляторного действия лазерного излучения [1, 14, 15, 18–20]. В частности, куполообразная кривая наблюдается для зависимости скорости синтеза ДНК или пролиферативной активности клеток животных в культуре от времени воздействия лазерного излучения.

Отдельного обсуждения заслуживает выявленная в настоящей работе зависимость биологического действия лазерного излучения от частоты модуляции. Следует особо подчеркнуть, что средняя плотность мощности излучения для непрерывного и модулированного режимов воздействия поддерживалась на одинаковом уровне при всех вариантах облучения. То есть наблюдаемые отличия в действии непрерывного и модулированного излучения не обусловлены дозовым фактором.

Как следует из данных, представленных в табл. 1 и 2 и на рис. 1 и 2, при времени воздействия 60 с, оптимальном для непрерывного облучения, во всех исследованных группах модулированного воздействия с частотой $F = 1, 2, 5, 10$ Гц стимулирующий

эффект значительно ниже, чем при облучении эмбрионов в непрерывном режиме. Однако при переходе к частоте модуляции 50 Гц наблюдается достоверное ($p < 0,001$) повышение стимулирующего действия излучения по сравнению с непрерывным или другими вариантами модулированного облучения при $t = 60$ с. При этом как показатели массы особей, полученных из облученной икры, так и параметры их терморезистентности увеличиваются в 2 раза по сравнению с молодежью контрольных групп. То есть использование модулированного воздействия с частотой модуляции 50 Гц позволяет значительно повысить биологическую активность лазерного излучения.

Как показано нами ранее [18], критическим параметром, определяющим зависимость фотобиологического эффекта от частоты модуляции, является длительность темного периода (паузы) между импульсами. При низкой частоте следования импульсов ($F = 1\text{--}2$ Гц), когда длительность паузы (τ_n) между ними составляет значительный временной интервал ($\tau_n = 250\text{--}500$ мс), структурные перестройки, инициируемые в клетках эмбриона предшествующим импульсом, к моменту воздействия следующего импульса релаксируют в состояние, близкое к исходному. В этом случае величина фотобиологического эффекта незначительна и практически не зависит от длительности паузы (рис. 1 и рис. 2). По мере сокращения временного интервала между импульсами структурные перестройки, инициируемые предшествующим импульсом, не успевая релаксировать в исходное состояние, усиливаются воздействием следующего светового импульса, что находит свое выражение в более высоком фотобиологическом эффекте при $\tau_n = 50$ мс, $F = 10$ Гц (рис. 2). При дальнейшем увеличении частоты ($F = 50$ Гц, $\tau_n = 10$ мс) следования импульсов (то есть сокращении длительности паузы между ними) величина фотобиологического эффекта превышает таковой для непрерывного воздействия. Среди возможных причин повышенной биологической активности лазерного излучения, модулированного с частотой $F = 50$ Гц, может быть неспособность живых систем адаптироваться к быстро меняющемуся внешнему физическому фактору, что приводит к более высокому фотобиологическому действию по сравнению с непрерывным режимом.

Следует однако отметить, что подобная закономерность в действии непрерывного и модулированного лазерного излучения наблюдается при энергетической нагрузке 174 мДж/см² ($t = 60$ с), оптимальной для непрерывного режима. При переходе к другому временному интервалу, например $t = 300$ с ($E = 870$ мДж/см²), оптимальным для стимуляции

параметров терморезистентности молоди рыб (рис. 2) является облучение эмбрионов с частотой модуляции 10 Гц, в то время как облучение при $F = 50$ Гц или в непрерывном режиме является менее эффективным. Как показывает анализ данных, представленных на рис. 1 и рис. 2, причина вышеуказанной закономерности состоит в том, что оптимальное время воздействия для стимуляции жизнестойкости молоди или ее размерно-весовых показателей зависит от режима облучения и частоты модуляции. К примеру, при $F = 10$ Гц оптимум в дозовой кривой по критерию параметров терморезистентности (рис. 2) как раз и соответствует $t = 300$ с ($E = 870$ мДж/см²) и составляет $\delta = 133\%$.

Вышесказанное находит свое подтверждение и в работах других авторов [13, 15]. Так, исследуя влияние непрерывного лазерного излучения ($\lambda = 810$ нм, $P = 15$ мВт/см²) и излучения, модулированного по интенсивности с частотой 26, 292, 1000 и 3800 Гц, на рост различных бактерий, авторы [13] обнаружили, что непрерывное излучение ускоряет их рост при $E = 1$ Дж/см², а для излучения с $F = 1000$ или 3800 Гц максимальное стимулирующее действие наблюдается при $E = 2$ Дж/см²; при $F = 26$ или 292 Гц действие было слабо выраженным. В работе [15] показано, что если оптимум в дозовой кривой, отражающей влияние на скорость формирования костной ткани в условиях *in vitro* непрерывного лазерного излучения ($\lambda = 830$ нм), или излучения, модулированного при $F = 8$ Гц, находится при $E = 3,84$ Дж/см², то при частоте модуляции $F = 1$ и 2 Гц положение оптимума приходится на $E = 0,96$ – $1,92$ Дж/см² и $E = 0,48$ Дж/см² соответственно.

По всей видимости, неучет того обстоятельства, что оптимум в дозовой кривой стимулирующего действия излучения может существенным образом зависеть от режима облучения, и является одной из причин противоречивости литературных данных [8–17] о влиянии модуляции излучения на фотобиологические эффекты. Как правило, вследствие сложности проведения множественных экспериментов на лабораторных животных или культуре клеток исследователю приходится ограничиваться какой-либо одной дозой воздействующего излучения, вызывающей изменение контролируемого биологического показателя. При этом, как следует из данных, приведенных на рис. 1 и рис. 2, среди совокупности дозовых кривых, полученных с использованием непрерывного и модулированного с $F = 1, 2, 5, 10, 50$ Гц излучения, всегда можно найти энергетический диапазон, в котором фотобиологические эффекты при различных режимах воздействия практически не отличаются или находятся в преде-

лах ошибки эксперимента. Так, по данным рис. 2 вне зависимости от режима воздействующего излучения (непрерывный или модулированный с $F = 1, 2, 5, 10, 50$ Гц) величина стимулирующего действия по критерию терморезистентности при $t = 245$ с ($E = 710$ мДж/см²) находится на уровне $\delta = 110 \pm 5\%$. То есть, используя для сравнительных экспериментов дозовую нагрузку $E = 710$ мДж/см², не удалось бы найти выраженной зависимости биологического действия лазерного излучения от режима облучения и частоты модуляции.

Указанная причина может быть возможным объяснением результатов, полученных в [12]. Авторы, изучавшие влияние непрерывного и модулированного ($F = 2,5, 20, 292, 20000$ Гц) излучения ($\lambda = 820$ нм, $P = 800$ мВт/см², $t = 27$ с, $E = 21,6$ Дж/см²) на скорость дегрануляции тучных клеток в искусственно вызванных ранах кожи экспериментальных животных (крысы), не обнаружили зависимости регистрируемого эффекта от частоты модуляции. Однако по данным [17] все виды модулированного воздействия лазерным излучением с $F = 100, 200, 300, 400, 500$ Гц ($\lambda = 635$ нм, $P = 0,89$ мВт/см², $t = 1120$ с, $E = 1$ Дж/см²) оказывали более низкое стимулирующее влияние на скорость заживления таких ран по сравнению с непрерывным облучением.

В связи с обсуждаемой проблемой взаимосвязи биологической активности лазерного излучения и частотой ее модуляции следует отметить, что в современной физиотерапии доминирующей является точка зрения, что максимальные различия в действии непрерывного и импульсного излучения наблюдаются при низкой частоте модуляции [22, 23]. Авторы этих работ считают, что при значении $F > 500$ – 1000 Гц физиотерапевтический эффект практически не отличается от действия непрерывного источника. Действительно, согласно [14, 15], при облучении остеобластов в условиях *in vitro* ($\lambda = 830$ нм, $E = 0,48$ – $3,84$ Дж/см²) максимальные различия в действии непрерывного и модулированного лазерного излучения наблюдались при $F = 1$ и 2 Гц. При переходе к частоте модуляции 8 Гц эффекты модулированного и непрерывного излучения были близки. Похожей точки зрения придерживаются и авторы [9], исследовавшие влияние непрерывного и модулированного излучения гелий-неонового лазера ($\lambda = 632,8$ нм, $t = 15$ мин, $E = 67,5$ Дж/см²) на активность ферментов обмена глутаминовой кислоты в тканях крыс при их облучении в условиях *in vivo*. Показано [9], что при $F = 1$ Гц характер изменений ферментативной активности значительно отличается от такового, полученного для непрерывного воздействия. Для некоторых ферментов свет, модули-

рованный с частотой 1 Гц, не вызывал изменения их активности. С увеличением частоты модуляции до 10 или 50 Гц скорость ферментативных процессов в тканях приближалась к уровню, характерному для непрерывного лазерного воздействия [9], а при $F = 100$ Гц наблюдалось снижение фотобиологического эффекта.

Результаты работ [10, 11] также свидетельствуют, что эффект подавления светом окислительного метаболизма суспензии клеток селезенки (спленоцитов), оцениваемый по хемилюминесцентному тесту, различен для непрерывного и модулированного излучения ($\lambda = 632,8$ нм) при одинаковой дозе ($E = 0,5$ Дж/см²). При этом максимальные различия в чувствительности клеток к непрерывному и импульсному излучению наблюдаются при частоте модуляции 1 Гц [10, 11], с увеличением частоты до 50 Гц различия в действии непрерывного и модулированного излучения становятся слабовыраженными.

Таким образом, наши результаты, полученные с использованием излучения инфракрасной области спектра при воздействии на эмбрионы осетровых рыб ($\lambda = 808$ нм, $E = 174$ мДж/см²), находятся в хорошем соответствии с некоторыми данными по влиянию лазерного излучения на активность ферментов в тканях животных ($\lambda = 632,8$ нм, $E = 67,5$ Дж/см²) [9], метаболизм суспензии клеток селезенки ($\lambda = 632,8$ нм, $E = 500$ мДж/см²) [10, 11], рост в условиях *in vitro* различных бактерий ($\lambda = 810$ нм, $E = 1,0$ Дж/см²) [13] и молодых клеток костной ткани (остеобластов) ($\lambda = 830$ нм, $E = 3,84$ Дж/см²) [14, 15]. Близость указанных результатов, несмотря на различие в длинах волн воздействующих излучений, дозовые нагрузки, отличающиеся более чем на два порядка, и разные объекты исследования, свидетельствует об общебиологическом характере полученных закономерностей. С другой стороны, это указывает на возможность использования эмбрионов рыб в качестве удобной и чувствительной модели для исследования механизмов биологической активности низкоинтенсивного лазерного излучения.

По всей видимости, пролонгированное действие лазерного облучения, проявляющееся через 50 суток после процедуры воздействия на эмбрионы, обусловлено его влиянием на метаболические процессы в организмах. На способность лазерного излучения вызывать коррекцию эмбрионального развития осетровых рыб указывает, в частности, значительное сокращение в опытной группе по сравнению с контрольной числа особей с аномальными морфологическими признаками: искривления скелета, изменения строения пищеварительных ор-

ганов и органов выделения, уродств головы и т. п. [18]. Похожие эффекты регистрировались также и в [23] при воздействии на эмбрионы осетровых рыб излучения гелий-неонового лазера красной области спектра. Однако, согласно данным [23], воздействию излучения с $\lambda = 632,8$ нм на икру осетра оказывает в зависимости от дозовой нагрузки и стадии эмбрионального развития либо слабо выраженное стимулирующее влияние на выживаемость мальков и их размерно-весовые показатели, либо действие на эмбриогенез рыб имеет негативный характер. Одна из возможных причин этого – сильно выраженное экранирующее действие меланина для излучения красной области спектра [18]. При этом для излучения ближнего инфракрасного диапазона с $\lambda = 808$ нм экранирующее действие меланина является минимальным [18].

Таким образом, модуляция оптического излучения при воздействии на оплодотворенную икру может существенным образом изменять его биологическую активность (устойчивость 50-дневной молодежи осетровых рыб к действию экстремальных температур и размерно-весовые показатели особей). В этой связи можно ожидать, что использование излучения, модулированного с частотой 50 Гц, перспективно и для повышения терапевтического действия низкоинтенсивного лазерного излучения. Причем такая технология может быть реализована с использованием серийно выпускаемой в настоящее время лазерной терапевтической аппаратуры, предусматривающей соответствующие опции для реализации модуляции излучения по интенсивности в указанном диапазоне частот [7].

Следует отметить, что перечисленные результаты влияния модуляции оптического излучения на его биологическую активность не распространяются на зависимость биологического и терапевтического эффекта от частоты следования импульсов наносекундного диапазона. Для лазерных терапевтических аппаратов импульсного режима генерации (длительность импульса $\tau = 100 \pm 50$ нс) увеличение частоты следования импульсов сопровождается ростом средней плотности мощности воздействующего излучения, что и является определяющей причиной изменения биологического и терапевтического эффектов [7].

Заключение

Результаты, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о выраженной биологической активности лазерного излучения в ближней инфракрасной области спектра ($\lambda = 808$ нм), соответствующей так называемому “окну прозрачности биоло-

гических тканей”. Основанием для вывода о зависимости стимулирующего действия света от режима облучения послужили дозовые кривые ($E = 0,09-1,74$ Дж/см²), полученные в непрерывном и модулированном с частотой 1, 2, 5, 10, 50 Гц вариантах облучения эмбрионов рыб при постоянной плотности мощности воздействующего излучения. Максимальный стимулирующий эффект наблюдается при частоте модуляции 50 Гц, $E = 174$ мДж/см², минимальный – при $F = 1$ Гц. Показано, что дозовые зависимости стимулирующего действия характеризуются кривыми с ярко выраженными точками экстремума, величина и энергетическое положение которых определяется частотой модуляции. Среди совокупности дозовых кривых, полученных с использованием непрерывного и модулированного излучения, можно найти энергетический диапазон, в котором фотобиологические эффекты при различных режимах воздействия практически не отличаются или находятся в пределах ошибки эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Крюк А.С., Мостовников В.А., Хохлов И.В., Сердюченко Н.С. Терапевтическая эффективность низкоинтенсивного лазерного излучения. Минск: Наука и техника, 1986. 328 с.
2. Лазеры в клинической медицине. Руководство для врачей / Под ред. Плетнева С.Д. М.: Медицина, 1996. 432 с.
3. Низкоинтенсивная лазерная терапия / Под ред. С.В. Москвина, В.А. Буйлина. М.: ИПЛЦ Техника, 2000. 724 с.
4. Ohshiro T., Calderhead R.G. Low Level Laser Therapy: A Practical Introduction. Chichester-New York-Brisbane-Toronto-Singapore: JohnWiley&Sons, 1988. 141 p.
5. Baxter G. D. Therapeutic Lasers: Theory & Practice. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994. 259 p.
6. Tunér J., Hode L. Laser Therapy. Clinical Practice and Scientific Background. Grängesberg: Prima Books, 2002. 570 p.
7. Плавский В.Ю., Мостовников В.А., Рябцев А.Б., Мостовникова Г.Р., Плавская Л.Г., Никеенко Н.К., Улащик В.С., Сердюченко Н.С., Русакевич П.С., Вологовская А.В., Рыбин И.А. Аппаратура для низкоинтенсивной лазерной терапии: современное состояние и тенденции развития // Оптический журнал. 2007. Т. 74. № 4. С. 27–40.
8. Булякова Н.В. Влияние гелий-неонового лазера в разных режимах облучения на клетки роговицы после действия ионизирующей радиации // Докл. АН СССР. 1984. Т. 279. № 2. С. 499–501.
9. ПикULEV А.Т., Зырянова Т.Н., Лаврова В.М., Мостовников В.А., Нечаев С.В., Лобазов А.Ф., Метельский Г.А. Влияние непрерывного и модулированного лазерного излучения на активность ферментов обмена глутаминовой кислоты в тканях крыс // Радиобиология. 1986. Т. 26. № 5. С. 712–714.
10. Кару Т.Й., Рябых Т.П., Антонов С.Н. Различные эффекты непрерывного и импульсного лазерного излучения ($\lambda = 632,8$ нм) на окислительный метаболизм спленоцитов // ДАН. 1995. Т. 345. № 3. С. 407–409.
11. Кару Т.Й., Рябых Т.П. Эффект подавления окислительного метаболизма клеток импульсным излучением He–Ne-лазера зависит от длительности темнового периода между импульсами // ДАН. 1997. Т. 353. № 5. С. 676–678.
12. El Sayed S.O., Dyson M. Effect of laser pulse repetition rate and pulse duration on mast cell number and degranulation // Lasers Surg. Med. 1996. V. 19. № 4. P. 433–437.
13. Nussbaum E.L., Lilge L., Mazzulli T. Effects of 810 nm laser irradiation on in vitro growth of bacteria: comparison of continuous wave and frequency modulated light // Lasers Surg. Med. 2002. V. 31. №5. P.343–351.
14. Ueda Y., Shimizu N. Pulse irradiation of low-power laser stimulates bone nodule formation // J. Oral. Sci. 2001. V. 43. №1. P. 55–60.
15. Ueda Y., Shimizu N. Effects of pulse frequency of low-level laser therapy (LLLТ) on bone nodule formation in rat calvarial cells // J. Clin. Laser Med. Surg. 2003. V. 21. № 5. P. 271–277.
16. Koutna M., Janisch R., Veselska R. Effects of low-power laser irradiation on cell proliferation // Scripta Medica. 2003. V. 76. № 3. P. 163–172.
17. Al-Watban F.A., Zhang X.Y. The comparison of effects between pulsed and CW lasers on wound healing // J. Clin. Laser Med. Surg. 2004. V. 22. № 1. P. 15–18.
18. Плавский В.Ю., Барулин Н.В. Влияние низкоинтенсивного лазерного облучения икры на жизнестойкость молоди осетровых рыб // Журн. прикл. спектр. 2008. Т. 75. № 2. С. 233–241.
19. Van Breugel H.H.F.I., Bär P.R.D. Power density and exposure time of He–Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro // Lasers Surg. Med. 1992. V. 12. № 5. P. 528–537.
20. Mostovnikov V.A., Mostovnikova G.R., Plavskii V.Y., Plavskaja L.G., Morosova R.P. Molecular mechanism of biological and therapeutically effect of low-intensity laser irradiation // Proc. SPIE. Laser-Tissue Interaction VI / Ed. Jacques S.L., Katzir A. 1995. V. 2391. P. 561–573.
21. Лукьяненко В.И., Касимов Р.Ю., Козола А.А. Возрастно-весовой стандарт заводской молоди каспийских осетровых (экспериментальное обоснование) // Волгоград: Ин-т биологии внутр. вод, 1984, 229 с.
22. Улащик В.С. О реальных и вероятных путях повышения эффективности лазерной терапии // Лазеры в биомедицине. Материалы междунар. конф. Минск: Институт физики НАН Беларуси. 2003. Т. 1. С. 9–17.
23. Илларионов В.Е. Техника и методики процедур лазерной терапии. Справочник. М.: Лазер маркет, 1994. 178 с.
24. Узденский А.Б., Воробьева О.Ю. Исследование влияния лазерного излучения на икру и личинок осетровых рыб // Журн. эволюц. биохим. физиол. 1992. Т. 28. № 3. С. 329–336.