

## Применение диодных лазеров в светокислородной терапии рака

© С.Д. Захаров<sup>†</sup>, И.М. Корочкин\*, А.С. Юсупов\*, В.В. Безотосный, Е.А. Чешев, F. Frantzen<sup>‡</sup>

Физический институт им. П.Н. Лебедева Российской академии наук,  
119991 Москва, Россия

\* Российский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова,  
Москва, Россия

• Клиника „Лазер и здоровье“,  
Уфа, Россия

‡ Retail Design Group,  
Vesterooy, Norway

(Получена 1 июня 2013 г. Принята к печати 16 июня 2013 г.)

Синглетный кислород — самое низкоэнергетическое электронно-возбужденное состояние молекулы кислорода обладает способностью повреждать живые клетки, и это свойство давно используется для сенсбилизированного разрушения опухолей при фотодинамической терапии рака. Здесь продемонстрировано, что аналогичные результаты могут быть достигнуты без фотосенсибилизаторов, если использовать светокислородный эффект. Для светокислородной терапии рака наилучшим образом подходят мощные непрерывные диодные лазеры, излучающие в пределах полос поглощения растворенного молекулярного кислорода.

### 1. Введение

Применение диодных лазеров в медицине включает хирургию, диагностику, терапию и продолжает интенсивно расширяться. Наиболее многообещающим представляется терапевтическое направление, так как оно основано на избирательном возбуждении энергетических уровней молекул, возможно предвещающая в будущем замену многих химических средств лечения средствами физическими. Интерес к светотерапии возник более века назад и был инициирован двумя, на первый взгляд, несвязанными событиями. В 1898 г. О. Рааб, студент из Мюнхена, выполнявший под руководством проф. Г. фон Таппайнера поиск потенциальных антималярийных агентов, обнаружил, что клетки, прокрашенные нетоксичным красителем (акридин), теряют подвижность и погибают при интенсивном освещении [1]. Вскоре было показано, что подобная светоиндуцированная токсичность проявляется только в том случае, когда в клеточной суспензии присутствует растворенный кислород.

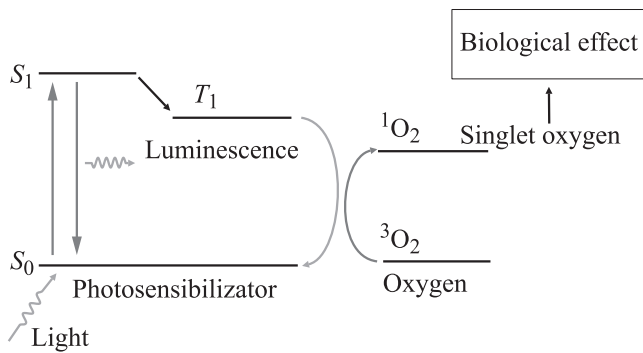
Это явление, названное фотодинамическим эффектом (ФДЭ), оказалось присутствием рядом других флуоресцирующих красителей (фотосенсибилизаторов). Задолго до объяснения лежащего в его основе механизма было осознано, что ФДЭ можно использовать в медицине для фотосенсибилизированного уничтожения раковых клеток. Первое клиническое применение фотодинамической терапии (ФДТ) с использованием люминофора эозина было выполнено в 1903 г. при лечении злокачественных поражений кожи [2], однако активное развитие метода началось многими десятилетиями позже [3–5]. В настоящее время ФДТ рака является признанной медицинской технологией, хотя и далекой от „идеальности“ ввиду

необходимости ввода в организм экзогенных фотосенсибилизаторов.

Другое знаковое событие произошло почти одновременно. В 1903 г. Нобелевская премия по физиологии и медицине была вручена датскому врачу-исследователю Нильсу Финзену за разработку эффективных методов светолечения, в частности, оспы красным светом и туберкулеза ультрафиолетом [6]. Финзен обнаружил, что различные спектральные интервалы солнечного света различаются по их лечебной эффективности, и он подобрал подходящие светофильтры и затем перешел к использованию искусственных световых источников (лампа Финзена). Он считал важнейшей задачей раскрытие механизма светотерапии и предположил, исходя из наблюдений, что свет действует на организм через кровь.

Ранняя смерть (1904 г.) помешала Финзену обобщить накопленный опыт, и ценные находки были утеряны. Исследования возобновились после открытия лазеров, когда стали доступными первые He–Ne-лазерные аппараты (632.8 нм), излучающие, возможно, в том же „финзеновском“ (красном) интервале длин волн (В.М. Инюшин, Endre Mester, Е.Н. Мешалкин, В.С. Сергиевский, В.А. Мостовников, Н.Ф. Гамалея, Т. Кару, С.А. Скопинов, В.М. Чудновский и др.). В 1989 г. группа врачей и инженеров под руководством И.М. Корочкина была удостоена Государственной премии СССР за разработку метода лечения ишемической болезни сердца с помощью внутривенного лазерного облучения крови (ВЛОК) [7]. В результате этой деятельности сложилась своеобразная медицинская технология, получившая техническое название „низкоинтенсивная лазерная терапия“ (НИЛТ). Следует отметить, что в течение многих лет противопоказанием к применению НИЛТ считалось наличие у пациента онкологических заболеваний, хотя какие-либо свидетельства в пользу такого утверждения отсутствовали.

<sup>†</sup> E-mail: stzakhar@sci.lebedev.ru



**Рис. 1.** Упрощенная диаграмма, демонстрирующая начальную стадию фотодинамического эффекта.

Применение любого лекарственного средства основано на знании его механизма действия. Фотофизический механизм ФДЭ хорошо изучен (рис. 1) [8]. Молекула красителя в основном состоянии поглощает фотон и в результате внутримолекулярной перестройки переходит на возбужденный метастабильный уровень. Затем энергия возбуждения передается ближайшей молекуле растворенного кислорода; при этом молекула кислорода переходит в электронно-возбужденное состояние  $O_2(a^1\Delta_g)$ , называемое синглетным кислородом ( $^1O_2$ ), а молекула красителя возвращается на основной уровень и вновь готова повторить цикл. Синглетный кислород обладает высокой химической активностью, поэтому легко окисляет биомолекулы, благодаря чему функционирование ДНК и ферментов нарушается, и опухолевые клетки выходят из строя. Именно синглетный кислород является общепризнанным цитотоксическим агентом ФДТ.

Что касается первичного фотоакцептора для НИЛТ, то его открытие затянулось: в течение двух десятилетий эта роль безуспешно приписывалась ряду внутриклеточных биомолекул. Решающие эксперименты были выполнены в Физическом институте им. П.Н. Лебедева в 1989 г., когда удалось разработать метод, позволяющий наблюдать в реальном времени, как возникает и развивается светоиндуцированная стимуляция клеток. Тогда удалось показать, что спектр действия имеет характерную полосу, отвечающую переходу молекулы кислорода из основного состояния  $O_2(X^3\Sigma_g^-)$  в синглетный кислород [9]. Это позволило заключить, что фотоакцептором является растворенный кислород. Позднее аналогичные измерения спектра действия были выполнены в ряде других кислородных полос, включая красную полосу с максимумом  $\sim 639$  нм. (Отметим, что изучение механизма переноса возбуждения от возбужденного кислорода на клетки продолжается [10–12]). Таким образом, были получены однозначные свидетельства, что в основе как ФДЭ, так и НИЛТ лежит один и тот же фотофизический акт генерации синглетного кислорода.

Сразу выяснился неожиданный факт: по мере повышения дозы облучения стимуляционный характер фото-

отклика клеток, характерный для НИЛТ, сменяется на противоположный режим угнетения и гибели клеток, типичный для ФДЭ [13–15]. Удивление было велико, так как электронные переходы молекулы  $O_2$  относятся в оптике к классу запрещенных в электродипольном приближении. Даже с учетом некоторого снятия запрета в конденсированной среде благодаря столкновениям, потребовались бы световые потоки на много порядков более интенсивные, чтобы обеспечить одинаковые с ФДЭ количества синглетного кислорода, следовательно, одинаковый биологический эффект. При таких потоках клетки должны были быстро испариться и превратиться в плазму. На самом деле тепловой эффект был незначителен, но клетки по какой-то причине приобретали сверхчувствительность к синглетному кислороду.

Для разрешения этого парадокса потребовалось провести сравнительные исследования ФДЭ, и они преподнесли еще одну неожиданность: по мере снижения фотодинамической нагрузки на клетки, т.е. уменьшения концентрации фотосенсибилизатора и (или) дозы облучения, характерный для ФДЭ режим клеточной деструкции переходит в стимуляционный режим, типичный для НИЛТ.

В настоящем сообщении мы покажем, как разрешается важнейшая для применений проблема „сверхчувствительности“. Затем будут кратко описаны особенности фотобиологического эксперимента, учет которых позволил выполнить корректные измерения спектра действия и определить природу первичного фотоакцептора нового явления, названного светоокислородным эффектом (СКЭ). В заключение будет продемонстрировано, что НИЛТ, теперь уже под конкретным названием светоокислородной терапии (СКТ), действительно имеет перспективы использования в онкологии, и диодные лазеры наилучшим образом подходят для этой цели.

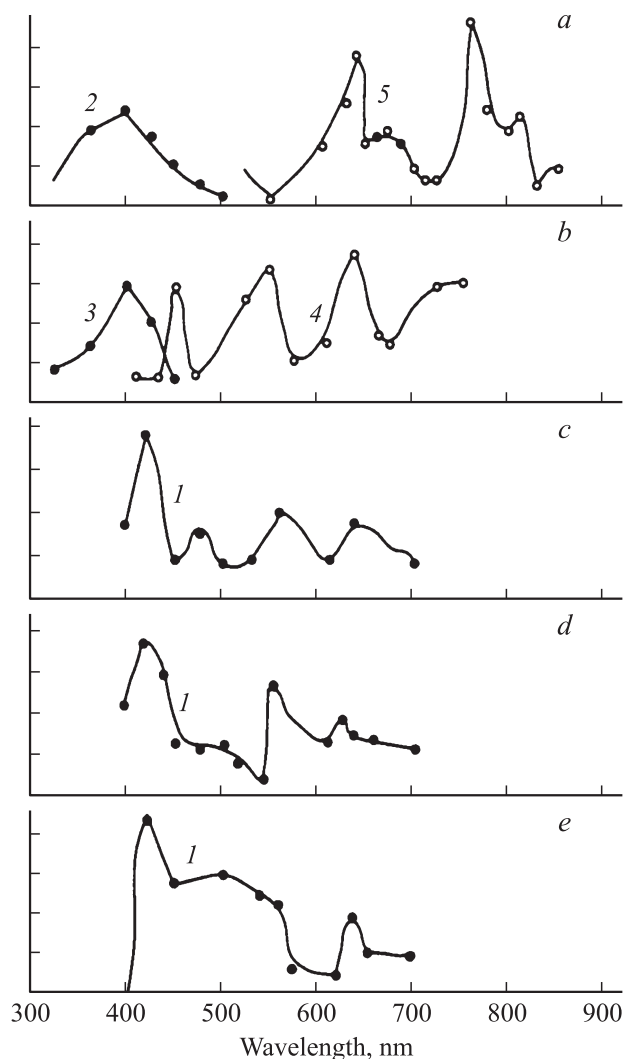
## 2. Природа „сверхчувствительности“ к синглетному кислороду

Характерной особенностью биологических систем является нелинейный ответ на действующий стимул, например на внесение микроэлемента [16]. Если его концентрация мала, то поведение системы не меняется. После преодоления концентрационного порога начинается нормальная зона чувствительности, регистрируемая в виде широкой колоколообразной кривой отклика. Вблизи максимума кривой включаются компенсаторные механизмы, и отклик падает практически до исчезновения. Это так называемая „зона бездействия“, внутри которой система не проявляет заметной реакции, несмотря на повышение концентрации вводимого вещества. Наконец отклик появляется вновь, но уже на фоне тотальной мобилизации внутренних ресурсов; затем, после достижения предельного напряжения, в системе происходит срыв, угнетение жизненных функций и гибель.

Реакция клеток на ввод красителя подчиняется тем же закономерностям. Условия, типичные для применения в ФДТ рака, были воспроизведены *in vitro* на суспензии красных клеток крови (эритроцитов) [13,15]. Оказалось, что ввод фотосенсибилизатора (как гидрофобного, так и гидрофильного типа) приводит к снижению деформируемости эритроцитов, и на их поверхности появляются характерные выступы, свидетельствующие о возникновении так называемого темнового стресса. Сенсибилизированные клетки реагируют на свет при том же уровне световой интенсивности, как и в отсутствие фотосенсибилизатора, когда последние облучаются на той же длине волны в красной полосе поглощения  $O_2$ . Согласно оценкам, скорость генерации синглетного кислорода в обоих случаях различается на 5–6 порядков. Мы заключаем, что клеточная чувствительность при ФДЭ снижается примерно во столько же раз [10].

Таким образом, парадоксальное повышение чувствительности клеток к синглетному кислороду в отсутствие фотосенсибилизатора является лишь кажущимся, так как неявно предполагалось, что эталоном является чувствительность сенсибилизированных клеток. На самом деле все обстоит как раз наоборот. Именно невозмущенные клетки имеют предельно высокую чувствительность к меняющимся в обычных пределах внешним факторам, что позволяет им гибко адаптироваться к изменениям окружающей среды. Однако при контакте с экстремальными концентрациями чужеродных агентов, типичными для фотосенсибилизации, клетки вынуждены включать активный барьерный механизм, и этот сложный каскад неспецифической защиты помогает им отразить последующие атаки со стороны всевозможных вредных факторов, включая, конечно, синглетный кислород.

Итак, врач, готовящийся выполнить процедуру ФДТ, производит массивный вброс фотосенсибилизатора в опухоль, чтобы при умеренном облучении обеспечить достаточную для клеточной деструкции скорость генерации синглетного кислорода, а в ответ клетки автоматически ставят заслон против предстоящего вторжения агентов химической или физической природы. Чтобы пробить этот „щит“, приходится вводить значительные количества препарата, усиливая нагрузку на уже ослабленный организм пациента. Прямое фотовозбуждение кислорода, напротив, имеет дело с максимально обезоруженными клетками, благодаря чему проигрыш в квантовом выходе синглетного кислорода может быть (почти) скомпенсирован повышенной чувствительностью к этому агенту [10,11]. Для онкологических применений очень благоприятен тот факт, что сильные абсорбционные полосы  $O_2$  имеются в ближнем инфракрасном диапазоне, где глубина проникновения света в ткани максимальна, а также то, что к настоящему времени в данном спектральном диапазоне разработаны достаточно мощные, надежные и относительно недорогие полупроводниковые лазеры.



**Рис. 2.** Спектральные зависимости светоиндуцированной стимуляции клеточных культур, полученные с помощью различных тестов. *a* — скорость синтеза ДНК [18], *b* — рост *E.coli* [19], *c* — образование розеток лимфоцитов [20], *d* — деление клеток культуры *L* [20], *e* — выделение лимфоцитами ДНК-фактора [20]. Дозы облучения, Дж/см<sup>2</sup>:  $5 \cdot 10^{-4}$  (1),  $1 \cdot 10^{-3}$  (2),  $1.3 \cdot 10^{-3}$  (3),  $1 \cdot 10^{-2}$  (4), 0.4 (5).

### 3. Особенности регистрации спектра действия

Определение природы неизвестного фоторецептора является основной задачей фотобиологии, а измерение спектра действия — классический метод ее решения [17]. Спектром действия принято называть зависимость эффективности стимулирующего действия света на изучаемый процесс от длины волны или частоты. Ее следует сравнивать со спектрами поглощения известных молекул, и если удастся достичь совпадения со одним из них, то можно считать, что ключ к решению задачи найден.

Однако не всякая такая зависимость пригодна для идентификации фоторецептора. В этом можно убедиться, сопоставляя данные разных авторов в их попытках расшифровать первичный механизм НИЛТ. На рис. 2 представлена подборка спектральных зависимостей, отражающих различные аспекты лазерной биостимуляции клеточных культур. Как видно, ни одна из зависимостей не идентична другой, так что создается впечатление, что инициирование исследуемых процессов обеспечивается разными фотоакцепторами. На самом деле во всех случаях действует один и тот же фотоакцептор  $O_2$ , спектры поглощения которого в газе высокого давления и в виде раствора во фреонах показаны на рис. 3. Они дают общее представление о спектре поглощения  $O_2$  в воде, который до сих пор никому не удалось измерить; согласно измеренным нами спектрам действия, полосы  $O_2/H_2O$  лишь немного деформируются и сдвигаются, подтверждая известную слабую реактивность молекулы кислорода в основном (триплетном) состоянии [22].

Трудности спектральных измерений на клеточной культуре связаны, с одной стороны, с необходимостью соблюдения одинаковых начальных условий, хотя состояние клеток циклически меняется. Еще труднее подобрать диагностический тест, обеспечивающий приемлемую точность линейной связи со спектром поглощения первичного акцептора фотонов. Нелинейности „смазывают“ реальную зависимость квантового выхода эффекта, и вместо истинного спектра действия получаются спек-

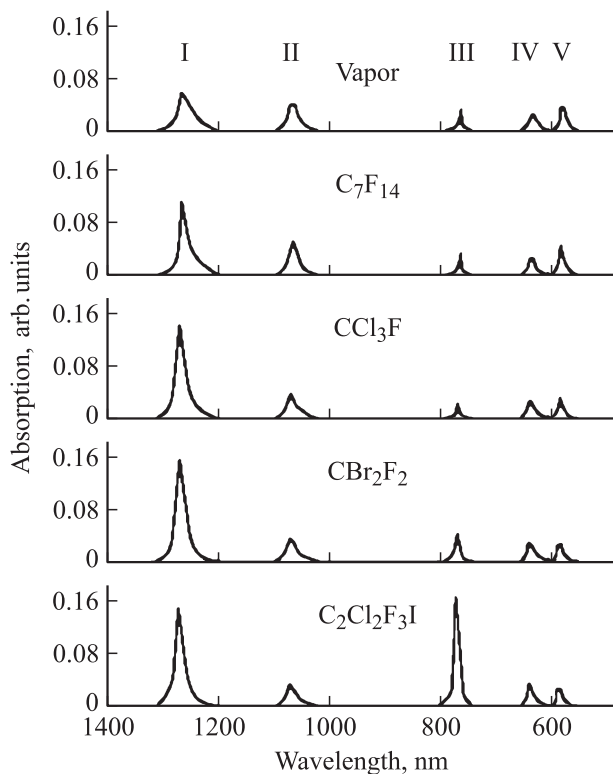


Рис. 3. Спектры поглощения кислорода в газовой фазе и в растворах различных фреонов при высоком давлении [21].

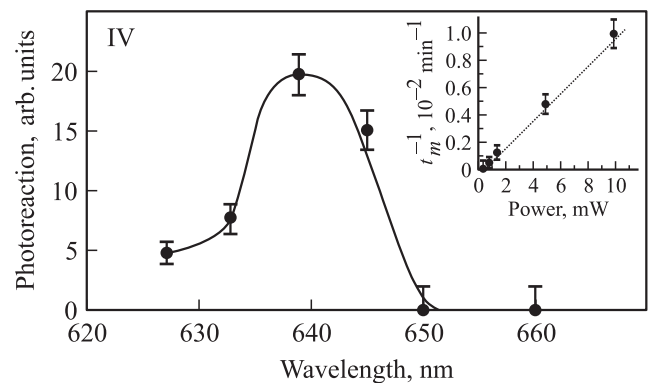
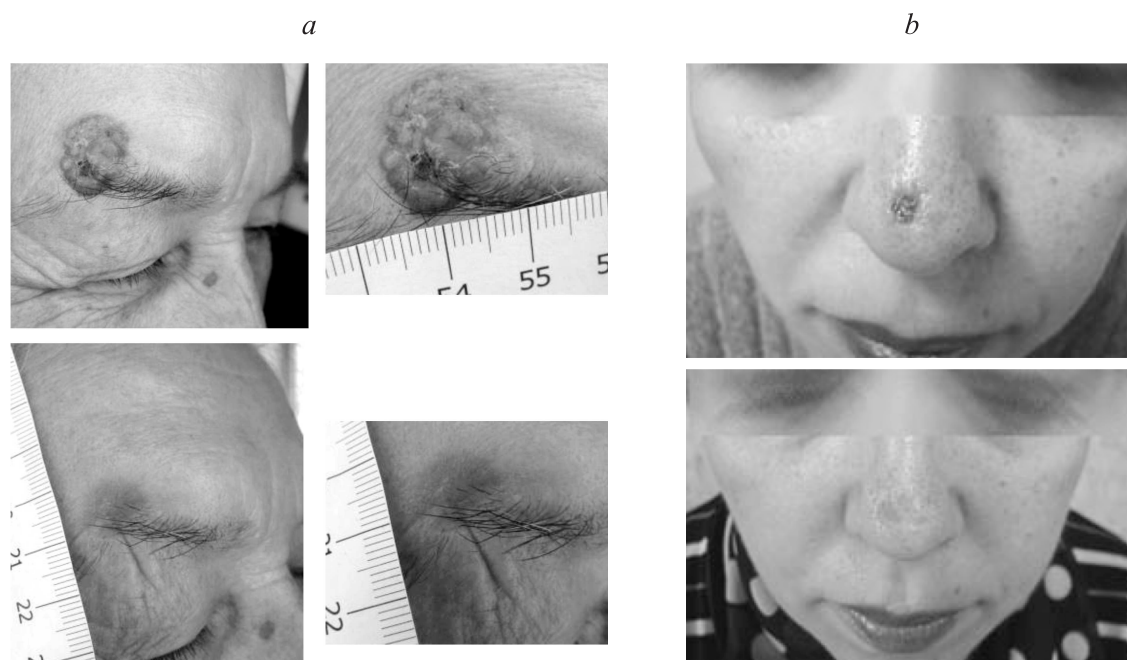


Рис. 4. Спектр действия *in vivo* в красной полосе поглощения кислорода. На вставке характеристика линейности фотоотклика. В качестве диагностического теста использовался индекс деформируемости эритроцитов.

тральные зависимости, варьируемые в разных опытах. Причины нелинейностей кроются в многостепенном характере ответа клетки на стимул. Внутриклеточное содержание фотоакцептора, за некоторым исключением (хлорофилл при фотосинтезе, меланин при загаре), чрезвычайно низкое, так как свет, как правило, действует как регулятор метаболизма и синхронизатор ритмов. Между начальным возбуждением фотоакцепторов и конечным откликом на макроуровне в клетке происходит ряд промежуточных процессов, вовлекающих возрастающее число молекул. В частности, максимум деформируемости достигается всего несколькими десятками пусковых актов образования синглетного кислорода в расчете на один эритроцит, тогда как количество вовлеченных в процесс белковых единиц в мембране составляет  $10^7-10^8$  [10].

Таким образом, надпороговый ответ клетки представляет собой каскад биохимических реакций. Априори понятно, что линейность отклика на каждой из ступеней каскада возможна лишь в ограниченной степени, и чем больше таких ступеней, тем заметнее отклонения от линейного сцепления. Клеточное ядро также может быть вовлечено в фотобиологический процесс [23], давая дополнительный вклад в нелинейность. Возможно, невоспроизводимый характер спектральных зависимостей, показанных на рис. 2, обусловлен данным фактором, так как все они были получены для ядерных клеток. (Отметим, что также не регистрировались так называемые характеристики линейности, позволяющие оценить возможные искажения спектров). Чтобы исключить это осложнение, в наших экспериментах использовались эритроциты, являющиеся безъядерными клетками с сильно упрощенным метаболизмом. В качестве типичного примера на рис. 4 показан спектр действия вблизи красной полосы поглощения кислорода, полученный во время процедуры НИЛТ в одной из московских клиник [24,25].



**Рис. 5.** Примеры фотоокислородной терапии базальноклеточного рака; диодный лазер, длина волны 1264 нм. *a* — пациент А.: вверху — до лечения, внизу — спустя 2 месяца после лечения; *b* — пациентка Б.: вверху — до лечения, внизу — спустя 1 месяц после лечения.

#### 4. Онкологические применения

Закономерности СКЭ, т.е. клеточная стимуляция или угнетение в зависимости от интенсивности облучения (в пределах электронных переходов растворенного кислорода), носят общий характер, независимый от вида клеток. Поскольку жизнь основана на кислородной энергетике, эта молекула присутствует во всех тканях организма. Даже некоторая степень гипоксии, характерная для раковой опухоли, не может повлиять на эффективность СКТ: она легко компенсируется увеличением световой дозы. Технически удобно, что сильные полосы  $O_2$  имеются во всем оптическом диапазоне от УФ до ближнего ИК включительно, но обычно используется одна из полос, исходя из глубины проникновения света в ткани. Плотность потока излучения подбирается таким образом, чтобы реакция клеток соответствовала второй физиологической зоне чувствительности за ее максимумом. Конечный результат воздействия определяется дозой синглетного кислорода, поэтому для терапии рака наилучшим образом подходят диодные лазеры, излучающие в непрерывном режиме. В наших экспериментально-клинических исследованиях СКТ рака применяются лазеры мощностью до 5 Вт [26]. Излучение вводится в световод диаметром 300–400 мкм, и его выходной торец обычно удерживается на расстоянии 5–7 см от облучаемой зоны. Некоторые примеры СКТ рака показаны на рис. 5.

#### 5. Заключение

Давно известно, что молекула кислорода в метастабильном состоянии  $a^1\Delta_g$  на самом низком электронно-возбужденном (синглетном) уровне способна повреждать клетки. В медицине синглетный кислород получают с помощью фотосенсибилизаторов и используют в фотодинамической терапии рака. Нами показано, что, во-первых, реакция клеток зависит от дозы синглетного кислорода и скорости его образования и варьирует между стимуляцией и деструкцией, и, во-вторых, повреждение клеток может быть достигнуто без фотосенсибилизаторов при тех же значениях световых потоков, как и в случае фотодинамической терапии. Для этого необходимо использовать фотоокислородный эффект, т.е. отклик биологической системы на прямое возбуждение электронных переходов в растворенном молекулярном кислороде.

Молекула  $O_2$  имеет богатый полосовой электронный спектр поглощения в видимом и ближнем ИК диапазонах. Эта особенность обеспечивает большую гибкость при выборе излучателей, среди которых диодные лазеры, по-видимому, не имеют конкуренции. Продемонстрированы успешные примеры лечения онкологических больных новым методом. Фотоокислородная терапия является первым и пока единственным представителем перспективного класса медицинских технологий, основанных на избирательном возбуждении квантовых уровней молекулы, присутствующей в тканях организма.

## Список литературы

- [1] C. Raab. *Z. Biol.*, **39**, 524 (1900).
- [2] H.A. von Tappeiner, A. Jensionek. *Munch. Med. Wochenschr.*, **47**, 2042 (1903).
- [3] T.J. Dougherty, J.E. Kaufman, A. Goldfarb, K.R. Weishaupt, D. Boyle, A. Mittleman. *Cancer Res.*, **38** (8), 2628 (1978).
- [4] M. Triesscheijn, P. Baas, J.H. Schellens, F.A. Stewart. *Oncologist*, **11** (9), 1034 (2006).
- [5] B.C. Wilson, M.S. Patterson. *Physics in Medicine and Biology*, **53** (9), R61 (2008).
- [6] *Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1901–1921* (Elsevier Publ., Amsterdam, 1967).
- [7] И.М. Корочкин. *Российский мед. журн.*, № 5, 4 (1997).
- [8] B.C. Wilson, S.G. Bown. In: *Handbook of laser technology and applications*, ed. by C.E. Webb, J.D.C. Jones (Bristol & Philadelphia, IoP Publ., 2004) p. 2019.
- [9] С.Д. Захаров, Б.В. Еремеев, С.Н. Перов. Кр. сообщ. по физике. *ФИАН*, № 1, 15 (1989).
- [10] С.Д. Захаров, А.В. Иванов, Е.Б. Вольф и др. *Квант. электрон.*, **33** (2), 1 (2003).
- [11] S.D. Zakharov, A.V. Ivanov. *Biophysics*, **50** (Suppl. 1), S64 (2005).
- [12] S.V. Gudkov, V.I. Bruskov, M.E. Astashev, A.V. Chernikov, L.S. Yaguzhinsky, S.D. Zakharov. *J. Phys. Chem. B*, **115**, 7693 (2011).
- [13] С.Д. Захаров, Б.В. Еремеев, С.Н. Перов, Н.А. Панасенко. В сб.: *Методы лазерной биофизики и их применение в медицине* (Тарту, ТГУ, 1989) с. 23.
- [14] С.Д. Захаров, С.Н. Перов, Н.А. Панасенко. В сб.: *Лазерная биология и лазерная медицина: практика* (Тарту, ТГУ, 1991) ч. 1, с. 16.
- [15] С.Д. Захаров, А.В. Иванов. *Квант. электроника*, **29** (3), 192 (1999).
- [16] Л.Д. Кисловский. В сб.: *Проблемы космической биологии* (М., Наука, 1982) т. 43, с. 148.
- [17] Ю.А. Владимиров, А.Я. Потапенко. *Физико-химические основы фотобиологических процессов* (М., Высш. шк., 1989).
- [18] Т.Й. Кару, Г.С. Календо, В.С. Летохов, В.В. Лобко. *Квант. электрон.*, **10**, 1771 (1983).
- [19] О.А. Тифлова, Т.Й. Кару. *Микробиология*, **56**, 626 (1987).
- [20] Н.Ф. Гамалея, Е.Д. Шишко, Ю.В. Яншин. *Изв. АН СССР, сер. физ.*, **50**, 1027 (1986).
- [21] C. Long, D.R. Kearns. *J. Chem. Phys.*, **59**, 5729 (1973).
- [22] Б.Ф. Минаев. *Укр. биохим. журн.*, **81** (3), 21 (2009).
- [23] I.A. Vorobjev, H. Liang, W.H. Wright, M.W. Berns. *Biophys. J.*, **64**, 533 (1993).
- [24] E.V. Babenko, V.V. Eremeev, G.M. Kapustina, I.M. Korochkin, A.N. Soldatov, A.S. Shumeiko, V.B. Sukhanov, S.D. Zakharov. *J. Russ. Laser Res.*, **16**, 181 (1995).
- [25] С.Д. Захаров, А.В. Иванов, И.М. Корочкин, В.П. Данилов. *Лазерная медицина*, **10**, 4 (2006).
- [26] А.С. Юсупов, С.Д. Захаров. *Креативная хирургия и онкология*, № 2, 24 (2011).

Редактор Т.А. Полянская

## Use of diode lasers for the light-oxygen therapy of cancer

S.D. Zakharov, I.M. Korochkin\*, A.S. Yusupov<sup>•</sup>, V.V. Bezotosny, E.A. Cheshev, F. Frantzen<sup>≠</sup>

Lebedev Physical Institute  
of Russian Academy of Sciences,  
119991 Moscow, Russia  
\* Russian State Medical University,  
Moscow, Russia  
• Laser & Health Hospital,  
Ufa, Russia  
≠ Retail Design Group,  
Vestroy, Norway

**Abstract** Singlet oxygen, the lowest electronically excited state of molecular oxygen, possesses ability to damage living cells and this feature is used for a long time for sensitized destruction of tumours by the photodynamic therapy. Here it is shown that similar results can be reached without photosensitizers if to use the light-oxygen effect. High-power cw diode lasers emitting within absorption bands of the dissolved oxygen are most acceptable for the light-oxygen therapy.