

УДК 539.14.082.5:58

## ОБ ОДНОМ МЕХАНИЗМЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ ОБЪЕКТАМИ

© 2019 г. В. А. Семибратова<sup>1, \*</sup>, А. В. Егранов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
“Иркутский государственный университет”, Иркутск, Россия

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт геохимии им. А.П. Виноградова  
Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

\*E-mail: valesa@rambler.ru

Поступила в редакцию 03.09.2018 г.

После доработки 10.09.2018 г.

Принята к публикации 22.10.2018 г.

В ходе проведенного исследования показана биологическая активность лазерного излучения (с длиной волны 632.8 нм) при действии его на сывороточный альбумин человека. Наиболее заметный эффект воздействия лазерного излучения наблюдали при плотности энергии 28.8 Дж · см<sup>-2</sup>. Предполагается, что основным механизмом биологической стимуляции является трехфотонное поглощение.

DOI: 10.1134/S0367676519030207

### ВВЕДЕНИЕ

Терапевтический эффект от воздействия лазерного излучения на организм человека известен уже более 40 лет. Это привело к большому ряду исследований на различных биологических объектах в системах *in vitro* и *in vivo*, в результате чего были обнаружены явления по стимуляции и угнетению жизненных функций. В экспериментах наблюдались и различные генетические эффекты: структурные нарушения хромосом, генные мутации, геномные нарушения, затрагивающие число хромосом, сшивки ДНК [1]. Однако до сих пор остается открытым вопрос о физическом механизме воздействия лазерного излучения на биологические объекты. Одним из возможных подходов, направленных на решение этой проблемы, может быть изучение люминесценции биологических молекул. Интенсивность люминесценции – удобный и доступный количественный критерий для выяснения биологической активности лазерного излучения.

Данная работа посвящена изучению механизма воздействия лазерного излучения на сывороточный альбумин человека. В качестве характеристики биологического эффекта была выбрана интенсивность люминесценции альбумина, максимум возбуждения которой приходится на длину волны 295 нм [2]. Сывороточный альбумин человека является простым белком крови, одной из важных функций которого является транспортная. Альбумин участвует в переносе желчных

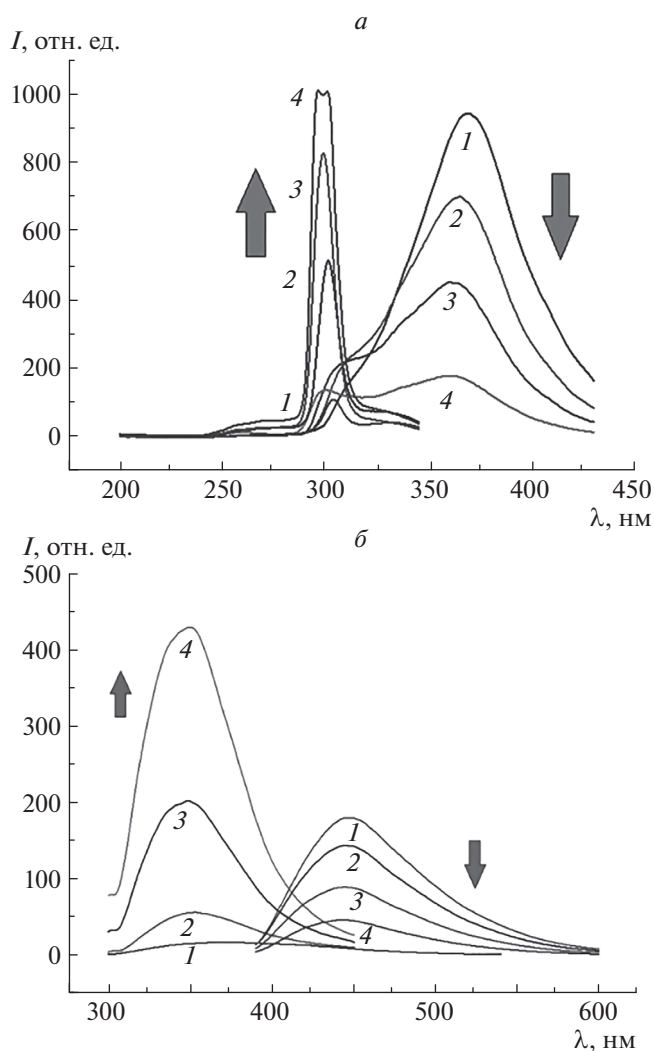
кислот, билирубина, витаминов, гормонов и лекарственных веществ. Под действием лазерного излучения возможна стимуляция биологической активности белка и более эффективная реализация его транспортной функции.

### МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

На первом этапе работы проведены калибровочные измерения возбуждения и люминесценции водных растворов альбумина с концентрацией от 0.1 до 0.0125 мг · мл<sup>-1</sup>. Измерения выполнены на спектрометре Perkin-ElmerLS-55 с целью оптимизации условий эксперимента. По результатам анализа спектральных данных выявлена оптимальная концентрация альбумина в водном растворе, равная 0.0125 мг · мл<sup>-1</sup>. На следующем этапе работы проведено облучение водных растворов альбумина объемом  $V = 3$  мл и концентрацией 0.0125 мг · мл<sup>-1</sup> He–Ne-лазером ЛГН-208Б ( $\lambda = 632.8$  нм,  $P = 1$  мВт) при разных временах облучения от 0 до 39600 с. Сразу после окончания облучения растворы подвергнуты спектральным измерениям на спектрометре Perkin-ElmerLS-55.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для флуоресцентного анализа сывороточного альбумина человека были приготовлены водные растворы альбумина путем разведения его в концентрации от 0.1 мг · мл<sup>-1</sup> (10%) до 0.0125 мг · мл<sup>-1</sup>



**Рис. 1.** *a* – Спектры возбуждения раствора альбумина при концентрации  $C = 0.1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$  (1),  $0.05 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$  (2),  $0.025 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$  (3),  $0.0125 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$  (4). *б* – спектры люминесценции раствора альбумина при концентрации  $C = 0.1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$  (1),  $0.05 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$  (2),  $0.025 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$  (3),  $0.0125 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$  (4).

(1.25%). При проведении спектральных измерений возбуждения и люминесценции растворов белка выявлено изменение интенсивности как возбуждения (рис. 1*a*), так и люминесценции (рис. 1*б*) в зависимости от концентрации раствора.

С уменьшением концентрации наблюдается увеличение интенсивности возбуждения пика 295 нм, уменьшение интенсивности возбуждения пика 365 нм, увеличение интенсивности люминесценции пика 350 нм, увеличение интенсивности люминесценции пика 450 нм. При увеличении концентрации люминесцирующего вещества происходит сближение его молекул, приводящее к развитию слабого межмолекулярного взаимодей-

ствия. Этот процесс часто сопровождается образованием ассоциирующих групп молекул различной сложности. В результате в растворе наряду с мономерными молекулами образуются новые излучающие и поглощающие центры. Наиболее благоприятной средой для образования ассоциирующих молекул является вода, поскольку объединение молекул часто происходит за счет водородных связей.

В этом случае происходит изменение формы спектра люминесценции исследуемого раствора, который одновременно смещается в сторону длинных волн. Это связано с тем, что ассоциаты таких веществ обладают собственной длинноволновой полосой люминесценции. Следовательно, возникновение в растворе подобных ассоциатов приводит к концентрационному тушению собственной люминесценции вещества. Вместе с тем процесс ассоциации является полностью обратимым. Все концентрационные эффекты полностью исчезают, а первоначальные оптические свойства раствора, содержащего лишь мономерные молекулы исследуемого вещества, полностью восстанавливаются при обратном разведении концентрированного раствора. Это указывает на малую прочность образующихся комплексов, объединение молекул в которые происходит без образования сильных химических связей между ними.

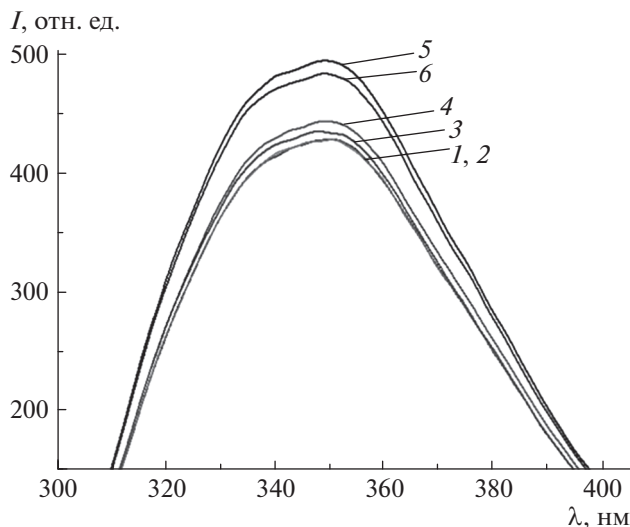
По результатам анализа спектральных данных выявлена оптимальная концентрация альбумина в водном растворе, равная  $0.0125 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ , что соответствует теоретическим представлениям о люминесценции белков [2].

Затем проведено облучение водных растворов альбумина объемом  $V = 3 \text{ мл}$  и концентрацией  $0.0125 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$  He-Ne-лазером ЛГН-208Б ( $\lambda = 632.8 \text{ нм}$ ,  $P = 1 \text{ мВт}$ ) при разных временах облучения от 0 до 39600 с. Сразу после окончания облучения растворы подвергнуты спектральным измерениям на спектрометре Perkin-ElmerLS-55.

На рис. 2 приведены спектры люминесценции водного раствора альбумина для разных времен облучения. Анализ биологического эффекта действия лазерного излучения проведен для интенсивности люминесценции на длине волны  $\lambda_{max} = 355 \pm 5 \text{ нм}$ .

На рис. 3 приведен график изменения максимальной интенсивности люминесценции в зависимости от логарифма плотности энергии облучения при постоянной мощности. На нем просматривается линейная (т.е. логарифмическая) зависимость вида  $I \sim \ln \omega(t)$ .

Результаты исследования интенсивности люминесценции при лазерном облучении водных растворов альбумина в зависимости от плотности энергии облучения при постоянной мощности приведены в табл. 1.



**Рис. 2.** Спектры люминесценции водного раствора альбумина при концентрации  $0.0125 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ . Время облучения: 1 – 0, 2 – 180, 3 – 1800, 4 – 3600, 5 – 28800, 6 – 39600 с.

Наиболее выраженный эффект лазерной стимуляции альбумина соответствует времени 28800 с. Для этого времени определена плотность энергии лазерного воздействия.

По формуле

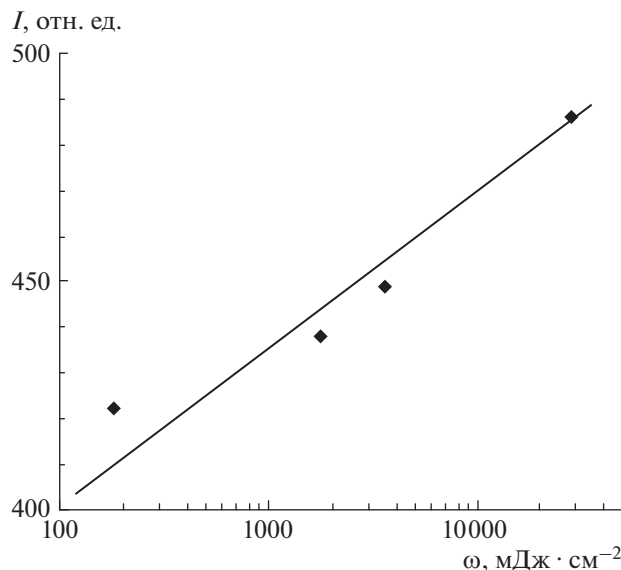
$$E = Pt, \tag{1}$$

где  $P = 1 \text{ мВт}$ ,  $t = 28800 \text{ с}$  значение  $E = 28.8 \text{ Дж}$ . Это соответствует плотности энергии  $\omega = 28.8 \text{ Дж} \cdot \text{см}^{-2}$ , вычисленной по формуле

$$\omega = E/S. \tag{2}$$

Здесь  $S = 1 \text{ см}^2$  – площадь сечения пучка, равная площади кюветы, в которую помещали водный раствор альбумина при облучении. Соответствия добивались с помощью собирающей линзы ( $F = 15 \text{ см}$ ).

Дальнейшим этапом исследования являлось выяснение наличия нелинейно-оптических процессов при взаимодействии лазерного излучения с биологическими объектами. Исходные позиции были следующими. Если взаимодействие лазерного излучения с биоорганическим веществом линейное (т.е. одно- или двухфотонное), то величина максимума интенсивности люминесценции альбумина, при постоянной плотности энергии облучения, не изменяется от вариации плотности мощности. При нелинейном процессе взаимодействия она изменяется по квадратичному (трехфотонный) или кубическому (четырёхфотонный) закону в зависимости от плотности мощности, а скорость нарастания интенсивности люминесценции (при  $\omega = \text{const}$ ) будет происходить, соответствен-



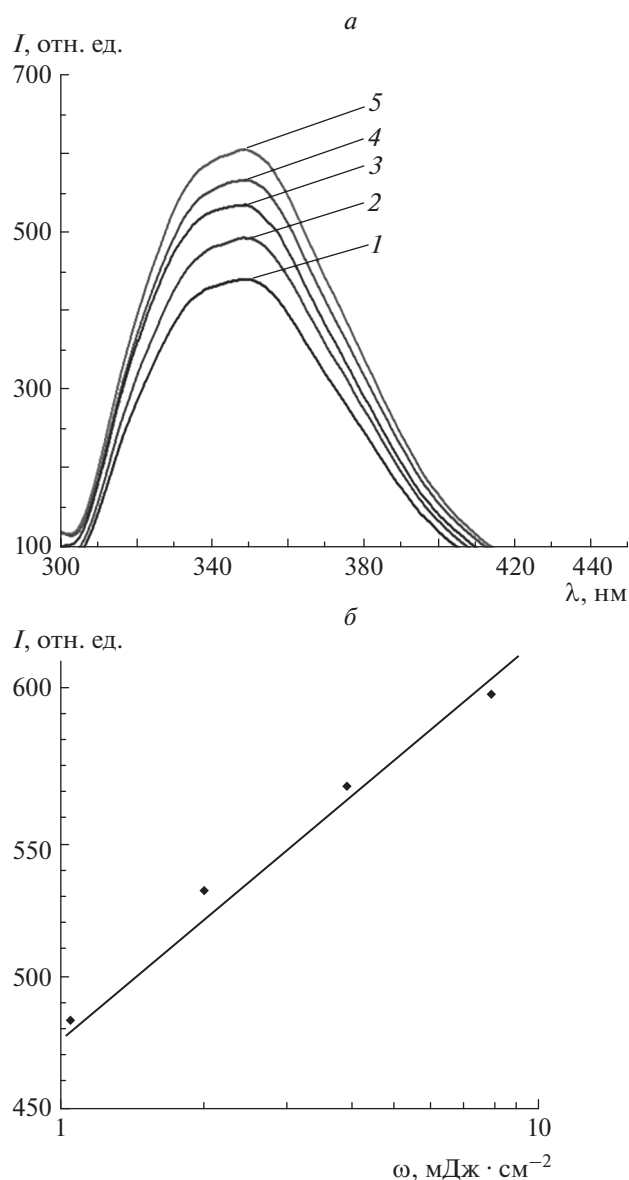
**Рис. 3.** Зависимость интенсивности люминесценции альбумина от плотности энергии облучения при постоянной плотности мощности.

но, по линейной ( $\sim \rho$ ) или квадратичной ( $\sim \rho^2$ ) зависимостям [3].

В качестве объекта облучения также использовали водные растворы альбумина с концентрацией  $0.0125 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ . В экспериментальных исследованиях варьировалась плотность мощности облучения альбумина  $\rho = 1-8 \text{ мВт} \cdot \text{см}^{-2}$  при постоянной плотности энергии облучения  $\omega = 28.8 \text{ Дж} \cdot \text{см}^{-2}$ , на которой лазерная стимуляция альбумина является достаточно выраженной. Этому соответствовало разное время облучения от 1 до 8 ч.

**Таблица 1.** Интенсивность люминесценции при лазерном облучении водных растворов альбумина в зависимости от плотности энергии облучения при постоянной мощности

Время облучения, $\cdot 10^3 \text{ с}$	Плотность энергии облучения, $\text{мДж} \cdot \text{см}^{-2}$	Интенсивность люминесценции, отн. ед.
0	0	419
0.18	180	422
1.8	1800	438
3.6	3600	449
28.8	28800	486
39.6	39600	475



**Рис. 4.** *a* – Спектры люминесценции водного раствора альбумина при концентрации  $0.0125 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ ; плотность мощности: 1 – без облучения, 2 –  $1 \text{ мВт} \cdot \text{см}^{-2}$ , 3 –  $2 \text{ мВт} \cdot \text{см}^{-2}$ , 4 –  $4 \text{ мВт} \cdot \text{см}^{-2}$ , 5 –  $8 \text{ мВт} \cdot \text{см}^{-2}$ . *б* – зависимость интенсивности люминесценции альбумина от плотности мощности облучения при постоянной плотности энергии.

Сразу после окончания облучения проведены спектральные измерения люминесценции альбумина на спектрометре Perkin-ElmerLS-55. На рис. 4*a* приведены спектры люминесценции водного раствора альбумина.

Данные о влиянии лазерного облучения с постоянным значением плотности энергии, но с разной плотностью мощности, на интенсивность

люминесценции альбумина показывают, что при всех значениях плотности мощности облучения лазерное излучение приводит к увеличению интенсивности люминесценции альбумина по сравнению с контрольной.

Результаты исследования интенсивности люминесценции при лазерном облучении водных растворов альбумина в зависимости от плотности мощности приведены в табл. 2.

Результаты измерений в полулогарифмических координатах приведены на рис. 4*б*. В них зависимость является приблизительно линейной и с тем же углом наклона, что и у графика, приведенного на рис. 3, т.е. интенсивность люминесценции альбумина при постоянной плотности энергии облучения растет как логарифм от плотности мощности с тем же коэффициентом. Это позволяет сделать следующий вывод: поскольку графики нарастания интенсивности люминесценции в обоих экспериментах имеют одинаковый вид, то и физические зависимости биологического действия одинаковы, т.е. в первом случае  $\sim \omega$ , во втором  $\sim \rho$ . Последняя зависимость указывает на трехфотонный процесс. Им может быть трехфотонное поглощение, либо гиперкомбинационное рассеяние (поглощается два фотона и один излучается). По литературным данным для ДНК и других белков при энергиях возбуждения более 3.86 эВ появляется не только люминесценция, но также электропроводность и фотохимические реакции [4]. Гиперкомбинационное рассеяние в этом случае происходить не может, так как виртуальный энергетический уровень имеет 3.91 эВ (для He-Ne-лазера), и энергии на квант рассеяния не остается. Энергии при трехфотонном поглощении больше чем достаточно для возбуждения фотохимических реакций как ДНК, так и большинства биомолекул, в том числе для альбумина.

**Таблица 2.** Интенсивность люминесценции при лазерном облучении водных растворов альбумина в зависимости от плотности мощности

Время облучения, $\cdot 10^3 \text{ с}$	Плотность мощности облучения, $\text{мВт} \cdot \text{см}^{-2}$	Интенсивность люминесценции, отн. ед.
0	0	437
28.8	1	483
14.4	2	532
7.2	4	572
3.6	8	607

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследований наблюдались заметные изменения спектров люминесценции водных растворов сывороточного альбумина человека в зависимости от плотности энергии и плотности мощности лазерного излучения. Наиболее заметный эффект воздействия лазерного излучения наблюдался при плотности энергии  $\omega = 28.8 \text{ Дж} \cdot \text{см}^{-2}$ . Выявлена нелинейная зависимость биологического эффекта лазерного излучения при воздействии на сывороточный альбумин от дозы облучения. На основании проведенных исследований предполагается многофотонный, в частности трехфотонный, механизм взаимодействия лазерного излучения с биологическими объектами. Однако точность данных, на которых строятся выводы о трехфотонном механизме под действием облучения He–Ne-лазера, является достаточной только для начального этапа изучения, что требует дальнейших исследований.

В заключение следует отметить, что знание механизмов действия позволит более эффективно использовать лазерное излучение для решения медико-биологических задач. Например, заменять лекарственные препараты или оптимизировать лечебные дозы излучения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Брилль Г.Е., Панина Н.П.* Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на генетический аппарат клетки. Саратов: Изд-во Саратовского мед. ун-та, 2000. 34 с.
2. *Пермяков Е.А.* Метод собственной люминесценции белка. М.: Наука, 2003. 43 с.
3. *Делоне Н.Б.* Взаимодействие лазерного излучения с веществом. М.: Наука, 1989. 32 с.
4. *Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я.* Физико-химические основы фотобиологических процессов. М.: Дрофа, 2006. 64 с.