

УДК 535.339.047

Влияние облучения в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах спектра на двигательную активность инфузорий

© 2020 г. Н. Н. ПЕТРИЦЕВ*, **, ДОКТОР МЕД. НАУК; Л. В. ЧИСТЯКОВА***, КАНД. БИОЛ. НАУК;
А. В. СТРУЙ*; Д. Р. ФАЙЗУЛЛИНА*; Г. В. ПАПАЯН*, **, КАНД. ТЕХН. НАУК

*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург

**Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург

***Зоологический институт Российской Академии наук, Санкт-Петербург

E-mail: lasmed@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.06.2020

DOI:10.17586/1023-5086-2020-87-11-41-52

Исследования действия низкоинтенсивного света на биологические объекты проводились путем оценки изменения подвижности инфузорий *Paramecium caudatum* Erhenberg, 1838. На установке, позволяющей измерять движение парameций после облучения лазерными диодами (длины волн излучений 445, 662, 808 нм) и светодиодом (518 нм), сразу же после окончания облучения наблюдались изменения скорости, имеющие четко выраженную колебательную составляющую, которая, предположительно, объясняется действием механизмов саморегуляции. На следующие сутки после воздействия излучения с плотностью энергии 1 Дж/см² в сине-зеленой области скорость движения инфузорий по сравнению с контрольным опытом (без облучения) возрастает примерно в 1,3 раза. По мере увеличения плотности энергии облучения подвижность постепенно снижается, падая при 15 Дж/см² в 1,26 раза (445 нм) и в 1,19 раз (518 нм). Аналогичное влияние оказывает излучение с длиной волны 662 нм с той разницей, что стимулирующий эффект проявляет себя заметно сильнее (в 1,64 раза при 1 Дж/см²), с сохранением эффекта подавления — при 15 Дж/см², в 1,23 раза. Что касается ближней инфракрасной области (808 нм), то эффект стимуляции присутствует при всех дозах, демонстрируя наибольший прирост в 1,68 раза при плотности энергии 15 Дж/см².

Ключевые слова: фотобиомодуляция, низкоинтенсивная лазерная терапия, инфузории.

Коды OCIS: 170.4470, 170.5180, 340.7460

ВВЕДЕНИЕ

Низкоинтенсивное световое воздействие на живые объекты (в современной терминологии — фотобиомодуляция (ФБМ), известная также как низкоинтенсивная лазерная терапия) все шире используется в биомедицине для решения прикладных и фундаментальных задач. Основоположителем ФБМ считается Эндре Местер (Венгрия), который в 1967 г., проверяя на мышцах канцерогенные свойства рубинового лазера (длина волны $\lambda = 694$ нм), обнару-

жил, что после облучения их кожи наблюдается усиленный рост волос [1]. Сразу же после появления лазеров исследования по их воздействию на живые организмы проводились и в СССР [2, 3]. По размаху работ в области ФБМ Россия в настоящее время занимает одно из лидирующих мест в мире. Данный вид терапии получил распространение при лечении хронических воспалительных процессов, болевых синдромов, для стимуляции регенерации тканей [4–6].

Несмотря на более чем 50-летнюю историю с безусловными своими достижениями, в ФБМ остается много нерешенных проблем, мешающих более широкому ее внедрению в клиническую практику. Среди них в первую очередь следует назвать не вполне ясный до сих пор механизм фотовоздействия, а также трудности сопоставления результатов, полученных в различных условиях [7]. Экспериментальные исследования проводятся на разнообразных модельных организмах (бактерии, мухи, улитки, парамеции, дафнии, рыбы, земноводные и др.), но в основном они сосредоточены на клеточных культурах или взвесах митохондрий млекопитающих, а также на цельных животных, чаще всего мелких грызунах [7, 8]. Для того чтобы низкоинтенсивный свет оказывал влияние на живую биологическую систему, энергия фотона должна соответствовать полосам поглощения, принадлежащим какому-либо молекулярному хромофору или фотоакцептору [9]. При этом для идентификации этого хромофора строится спектр действия, представляющий собой биологический фотоответ (например, изменение скорости роста клеток) как функцию длины волны, который должен напоминать спектр поглощения соответствующего фотоакцептора. Энергия, накопленная в этой молекуле, может вызывать фотохимическую реакцию в клетке, изменяющую ее состояние [10, 11]. Одна из особенностей ФБМ, отличающая ее от обычной фотохимической реакции, заключается в бифазной зависимости ответа от дозы облучения, которая известна как закон Арндта–Шульца [12]. В соответствии с ним существуют пороговая и оптимальная дозы, причем превышение последней приводит к ослаблению терапевтического результата, а продолжение воздействия может привести даже к отрицательному эффекту. Другим важным критерием ФБМ является исключение термических эффектов из определения данного физиологического процесса [13].

В фундаментальных работах Т.Й. Кару на основе регистрации спектров поглощения живого клеточного монослоя в видимом и ближнем инфракрасном (БИК) диапазонах показано, что эффекты лазерной фототерапии являются следствием электронного возбуждения хромофоров митохондриального фермента цитохром с-оксидазы (ЦО), которая

катализирует заключительный этап работы дыхательной цепи митохондрий. Активность ЦО ингибируется оксидом азота (NO), который конкурирует с молекулярным кислородом за передачу электронов. Лазерное облучение приводит к диссоциации NO от ЦО, в результате этого уменьшается влияние оксида азота на ЦО, увеличивается скорость дыхания («гипотеза NO»), что, в свою очередь, приводит к выработке дополнительной энергии. На основе анализа зависимости биологических откликов от длины волны излучения выявлен спектр действия, включающий четыре полосы в красном и БИК диапазонах спектра: 613,5–623,5, 667,5–683,7, 750,7–772,3, 812,5–846,0 нм [14, 15]. Другая гипотеза, связанная с регуляцией NO, заключается в том, что ЦО может действовать как нитрит редуктаза особенно при снижении парциального давления кислорода [16].

Эффекты ФБМ наблюдаются также и на больших длинах волн БИК диапазона. W. Katagiri с соавторами показали, что воздействие на Т-клетки комбинации излучений на двух длинах волн 1064 и 1270 нм (плотности мощности 20–400 и 55–65 мВт/см² соответственно) модулирует ретроградную передачу митохондриальных сигналов, включая внутриклеточный кальций и активные формы кислорода (АФК), что также может быть связано с высвобождением NO [11].

Слежение в опытах по ФБМ за АФК, ионами кальция, NO объясняется тем, что все они служат средством передачи управляющих сигналов для изменения клеточного метаболизма и индукции факторов транскрипции, в частности ядерного фактора κВ [17, 18]. Далее синтез белков активирует сигнальные пути, которые могут привести к усилению клеточной пролиферации, миграции клеток, модуляции уровней цитокинов, факторов роста, медиаторов воспаления и антиоксидантов, что на тканевом уровне способствует оксигенации [19, 20].

Что касается коротковолновой части видимого диапазона, то в качестве фотоакцепторов называются различные хромофоры: цитохромы (за счет порфиринов), семейства опсинов и флавопротеинов [21], которые, в частности, содержат белки криптохром/фотолиазы, широко представленные у эукариотов [22]. Данное семейство участвует в реакциях, связанных

с регуляцией циркадных ритмов, ультрафиолет-индуцированной репарацией дезоксирибонуклеиновой кислоты [23]. В результате воздействия синего света происходит увеличение образования АФК, изменяется митохондриальная активность [24, 12].

Относительно механизмов ФБМ имеются и иные точки зрения. По одной из теорий в качестве хромофора в БИК области может выступать вода, присутствующая в биологических мембранах в некоторых наноструктурированных формах, что отличает ее от объемной воды и обеспечивает ей возможность биологического воздействия без значительного нагрева ткани [25, 12]. По другой теории в основе эффектов ФБМ лежит нагрев лазерным светом локального участка макромолекулы, вызывающий изменения, достаточные для запуска дальнейшего физиологического отклика. Утверждается, что в этом случае эффективным может быть только лазерное воздействие, а существующее в фотобиологии понятие спектра действия лишается смысла [26].

В недавнем исследовании, проведенном на культуре стволовых клеток жировой ткани, показано, что интенсивность их размножения при одной и той же плотности энергии («дозе») облучения (3 Дж/см^2) существенно зависит от используемой длины волны. Вместо умеренного роста, происходящего в темноте, размножение клеток заметно усиливается при красном ($\lambda = 660 \text{ нм}$) и БИК ($\lambda = 810 \text{ нм}$) освещении, а при синем ($\lambda = 415 \text{ нм}$) и зеленом ($\lambda = 540 \text{ нм}$), наоборот, подавляется. Авторы полагают, что наиболее вероятным объяснением этих явлений является то, что они реализуются как минимум двумя механизмами, основанными на разных хромофорах. Эффекты красного и БИК света связываются с поглощением фотонов ЦО, а эффекты синего и зеленого — с опсинами, наиболее известными представителями которых являются зрительные пигменты колбочек и палочек сетчатки глаза [27].

Для изучения явлений ФБМ используют также фоточувствительные свойства простейших — инфузорий [28–30]. В отличие от исследований на моделях млекопитающих при этом можно избежать этических проблем и получить ряд практических преимуществ: снизить стоимость и длительность проводимого эксперимента, увеличить число вариантов внешних воздействий, благодаря большому

количеству объектов получить статистически значимые результаты даже при минимальных эффектах. Инфузории по сравнению с клеточными культурами являются существенно более сложными организмами, что позволяет оценивать их общий энергетический статус путем измерения скорости движения (ИСД). Использование инфузорий по сравнению с другими эукариотическими модельными объектами делает возможным быстро получить достаточное количество генетически однородного материала для исследований.

Важным является выбор сроков наблюдения за биологическими объектами: многие исследования акцентированы на ранних сроках после воздействия (минуты, 1–3 час), что не позволяет обнаружить долговременные эффекты. В то же время, при оценке экспрессии генов после облучения низкоинтенсивным синим светом ($\lambda = 453 \text{ нм}$, плотность энергии — $41,4 \text{ Дж/см}^2$) клеточной культуры кератиноцитов максимальное количество deregulated генов обнаруживали только через 24 час после воздействия [31]. Методом ИСД нами было показано, что при лазерном освещении в красной ($\lambda = 662 \text{ нм}$) и БИК ($\lambda = 808 \text{ нм}$) областях спектра поведение инфузорий в зависимости от полученного количества световой энергии и времени наблюдения может демонстрировать как эффект стимуляции, так и подавления [30].

Цель данной работы состоит в отработке методики ИСД инфузорий, способной выявить закономерности их поведения при низкоинтенсивном световом воздействии излучений видимого и БИК диапазонов, генерируемые излучениями лазерных диодов с длинами волн 445, 662 и 808 нм и $518 \pm 22 \text{ нм}$ светодиода при кратковременном (в пределах 1 час) и длительном (24 час) сроках наблюдения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1838 (Ya/33 31–01) была предоставлена ресурсным центром «Культивирование микроорганизмов» Научного парка СПбГУ. Стандартизованная клеточная культура выращивалась в стеклянных пробирках объемом 20 мл в термостабилизированных условиях при температуре 22°C и $\text{pH} \approx 7$.

Питательная среда содержала бактерии *Enterobacter aerogenes*, служившие для инфузорий пищей. При подготовке к измерениям 2 мл питательной среды с инфузориями переносились в стеклянную чашку Петри, а затем в течение 30 мин препарат находился в полной темноте. После этого чашка сразу же устанавливалась на предметный стол микроскопа Wild M420 Makroskop (Wild Heerebrug Ltd., Швейцария) для проведения измерений (контроль) или после облучения (опыт). Формирование изображений в микроскопе осуществляется объективом с переменным фокусным расстоянием Macrozoom 1:5, обеспечивающим при рабочем расстоянии 102 мм возможность бинокулярного наблюдения микрообъектов с увеличениями от 6,3 до 32[×]. Для получения их изображения микроскоп оснащен цифровой видеокамерой BR-1340 LM-UF (1/2" КМОП, 1280×1024, 25 к/с, ЕС Экспертс, Россия), которая при увеличении объектива 6,3[×] обеспечивает поле зрения 8,0×6,4 мм. Освещение в микроскопе осуществляется косыми лучами, позволяющими наблюдение объектов методом темного поля. Источником света при этом служит светодиодная лампа со встроенным интерференционным фильтром (645 ± 15 нм), обеспечивающим плотность мощности в плоскости объекта менее 0,5 мВт/см². Исследования проводились в затемненном помещении при освещенности не более 0,2 лк. В промежутке между сеансами измерений препарат предохранялся от попадания внешнего света непрозрачным экраном. После цикла измерений, проходившего в общей сложности в течение 1 час, препарат переносился в термостат, где выдерживался 24 час без внесения дополнительного питания, после чего проводилось последнее по времени измерение.

В качестве источников света для облучений использовались светодиодный аппарат «ВЕГА» с длиной волны излучения 518 ± 22 нм (АЛКОМ медика, Россия) и полупроводниковые лазерные аппараты АЛПХ-01 «ДИОЛАН» с $\lambda = 445$ и 808 нм (НПП ВОЛО, Россия) и АЛОД-01 с $\lambda = 662$ нм (АЛКОМ медика, Россия). Для доставки лазерного излучения к объекту применялся световодный инструмент с линзой для наружного облучения (Полироник, Россия). Таким образом обеспечивалась равномерное одновременное освещение всей площади чашки Петри диаметром 6 см.

Оценка облученности проводилась с помощью Optical power meter QB230 (ADVANTEST Corp, Япония). Плотности мощности излучений с длинами волн 445 и 518 нм составляли 12 мВт/см², 662 нм — 52 мВт/см², 808 нм — 106 мВт/см². Плотности энергии 1, 5, 10 и 15 Дж/см² реализовывались за счет соответствующей вариации времени облучения.

Для анализа движения инфузорий использовалась модифицированная программа «ММС сперм», предназначенная для автоматизированного анализа качества спермы. Она позволяет на основе записанного с помощью цифровой камеры видеоролика проводить оценку параметров движения находящихся в поле зрения микрообъектов. При этом в каждом кадре осуществляется сегментация объектов по яркости, поиск их центров тяжести и идентификация. По этим данным строится траектория движения объекта в течение всего времени записи, что позволяет рассчитать параметры, характеризующие особенности его перемещения (рис. 1).

Предварительные исследования показали, что наиболее информативным параметром для оценки жизнеспособности инфузорий является линейная скорость $VCL = \Delta l / \Delta t$, где Δl — длина отрезка между начальной и конечной точками траектории, Δt — время, за которое проводится видеорегистрация траектории движения

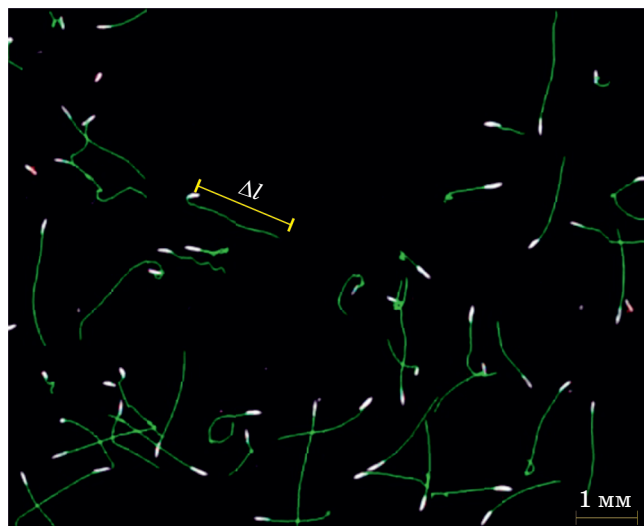


Рис. 1. Микрофотография препарата инфузорий. Изображение получено в состоянии интенсивного движения инфузорий методом темнопольной микроскопии. Зеленым цветом обозначены траектории перемещения объектов за 2 с.

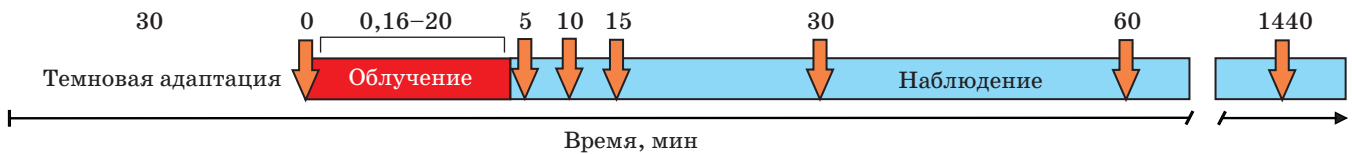


Рис. 2. Временная диаграмма протокола эксперимента.

(в нашем случае 2 с), по которому определяется траектория движения. Скорость, вычисленная по реальной траектории, дает неверное представление о жизнеспособности организма, поскольку перед своей гибелью инфузория совершает интенсивные кругообразные движения. Число измеренных объектов в одной временной точке составляет не менее 100 шт, а необходимое для этого суммарное время наблюдения не превышает двух минут. Временная диаграмма проведения экспериментов приведена на рис. 2.

Статистическая обработка проводилась с помощью стандартного пакета программ (Microsoft Office Excel 2010, SigmaPlot 12.5). Данные на нормальность проверялись с использованием методики Шапиро–Уилка. Для оценки различий между группами исследуемых объектов использовалась проверка статистических гипотез с помощью критерия Манна–Уитни. Данные представлены как среднее арифметическое \pm ошибка среднего ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Контроль (без облучения)

Общее количество объектов в группах контроля в каждой точке измерений составляло 404 ± 3 шт. Измерения начинались сразу же после переноса препарата из темного бокса на столик микроскопа (0 мин), затем в еще пяти временных точках — 5, 10, 30, 60 мин, а также через 24 часа (1440 мин). Линейная скорость при первом измерении (0 мин) составляла 606 ± 17 мкм/с (рис. 3). Относительно нее проводилась нормировка скорости при измерениях в более поздние моменты времени (рис. 4 и 5).

Через 5 мин после первого измерения в группе контроля наблюдался резкий спад скорости на 17%. Затем скорость в течение одного часа практически не менялась и только через сутки дополнительно снизилась, достигнув 64% от начальной.

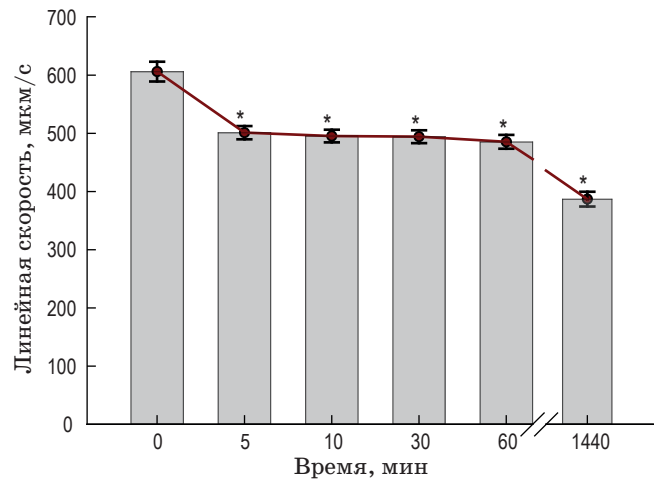


Рис. 3. Изменения линейной скорости перемещения инфузорий в течение 24 час наблюдений в группе контроля ($M \pm m$), число объектов (n) — 395–409. * — значимые различия в сравнении с исходной скоростью ($p < 0,001$).

Облучение излучениями с длинами волн 445, 518, 662 и 808 нм

Динамика изменения скорости движения инфузорий после однократного облучения светом различных длин волн и плотностей энергии представлена на рис. 4. С целью нивелирования различий между состояниями организмов в отдельных группах кривые нормированы относительно исходной скорости, измеренной в каждой серии экспериментов до светового воздействия.

Из кривых на рис. 4а видно, что при освещении лазерным излучением с длиной волны 445 нм наблюдаются волнообразные изменения скорости движения парameций относительно начальной скорости в зависимости от временного интервала от момента окончания облучения до момента измерения. Наиболее сильно во всех временных точках колебания проявляются при дозе 15 Дж/см^2 ($p < 0,05$ в сравнении с исходными данными), при этом скорость на 10-ой минуте падает более чем в 1,5 раза, демонстрируя глубокий минимум.

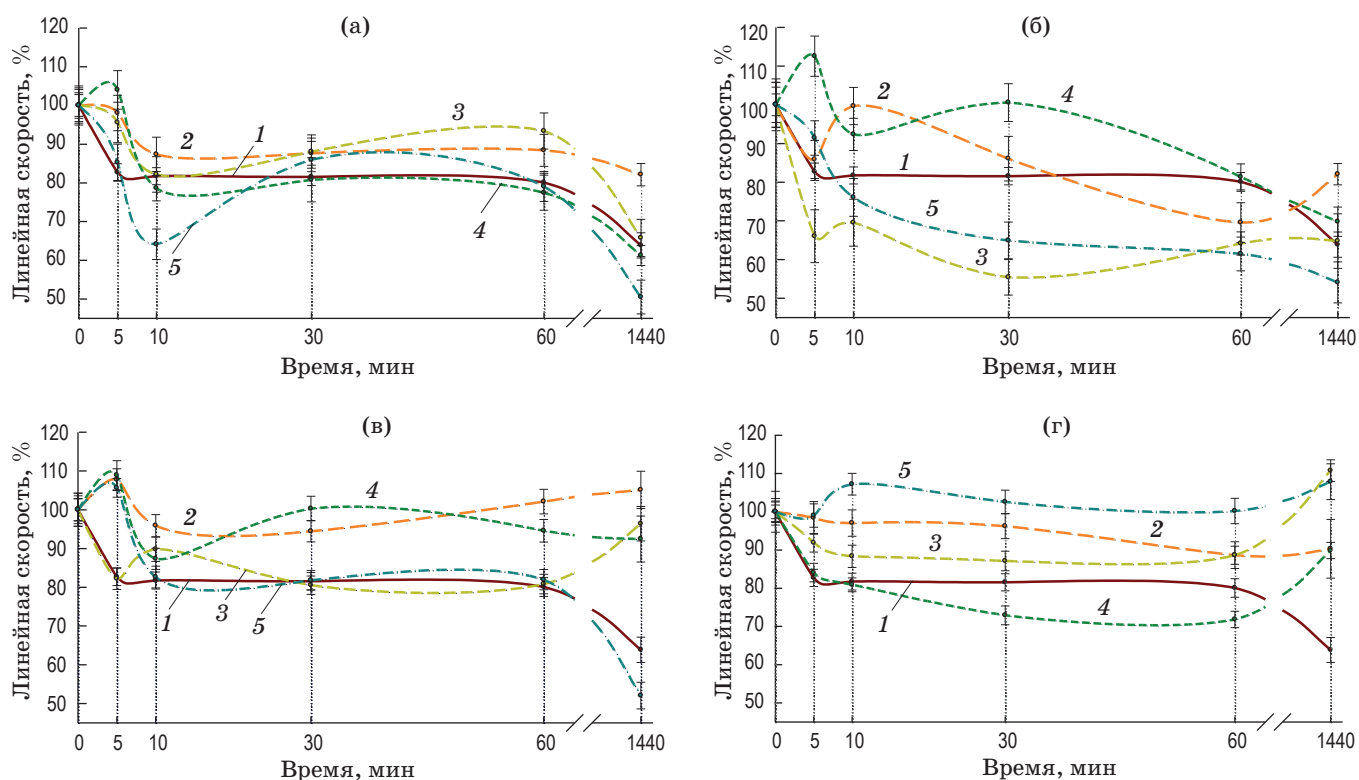


Рис. 4. Изменения нормированной линейной скорости инфузорий в течение 24 час наблюдений после облучения светом на длинах волн 445 (а), 518 (б), 662 (в), 808 нм (г) и с плотностями энергии 0 — контрольная группа (1), 1 (2), 5 (3), 10 (4) и 15 (5) Дж/см². Данные представлены в процентах к соответствующему исходному значению скорости каждой группы, принятому за 100% ($M \pm m$, $n = 102-409$).

Затем в интервале 30–60 мин она стабилизируется, однако остается ниже начальной. На следующие сутки скорость составляет уже половину от первоначальной. При плотностях энергии 5 и 10 Дж/см² тенденция сохраняется, однако амплитуда вариации скорости снижается, а при 1 Дж/см² глубина модуляции минимальна, причем кривая по форме напоминает контрольную. При освещении светодиодом ($\lambda = 518$ нм) волнообразный ход кривой сохраняется, однако зависимости ее формы и скорости от полученной световой энергии усложняются (рис. 4б). Так, наименьшая скорость наблюдается теперь уже при плотности энергии 5 Дж/см², причем с минимумом на 30-ой минуте, а при 15 Дж/см² — плавное во времени падение данного параметра вплоть до следующего дня. Экстремумы на $\lambda = 518$ нм наблюдаются у кривых при всех дозах кроме 15 Дж/см², причем при 1 Дж/см² минимум на 5-ой минуте быстро сменяется максимумом (10-ая минута), а при 5 и 10 Дж/см² ход кривых идет в противофазе друг к другу:

там, где при 5 Дж/см² имеются минимумы (5-я и 30-я минута), при 10 Дж/см² — максимумы. Чуть меньшие осцилляции по сравнению со светодиодным облучением ($\lambda = 518$ нм) наблюдаются при использовании излучения лазера с $\lambda = 662$ нм (рис. 4в) и практически отсутствуют при лазерном облучении на длине волны 808 нм (рис. 4г).

Влияние однократного светового воздействия проявляется наиболее четко при сравнении с контролем на следующие сутки после облучения, когда переходные процессы уже закончены (рис. 5). В синей области спектра ($\lambda = 445$ нм, рис. 5а) через 24 час после облучения при 1 Дж/см² скорость относительно контрольной группы статистически значимо повышается — на 28% ($p < 0,01$). Однако по мере увеличения дозы происходит плавное снижение скорости, которое при 15 Дж/см² составляет 79% от контрольных значений ($p < 0,05$). Близкие значения модуляции скорости движения инфузорий имеют место и в зеленой области спектра ($\lambda = 518$ нм, рис. 5б): при 1 Дж/

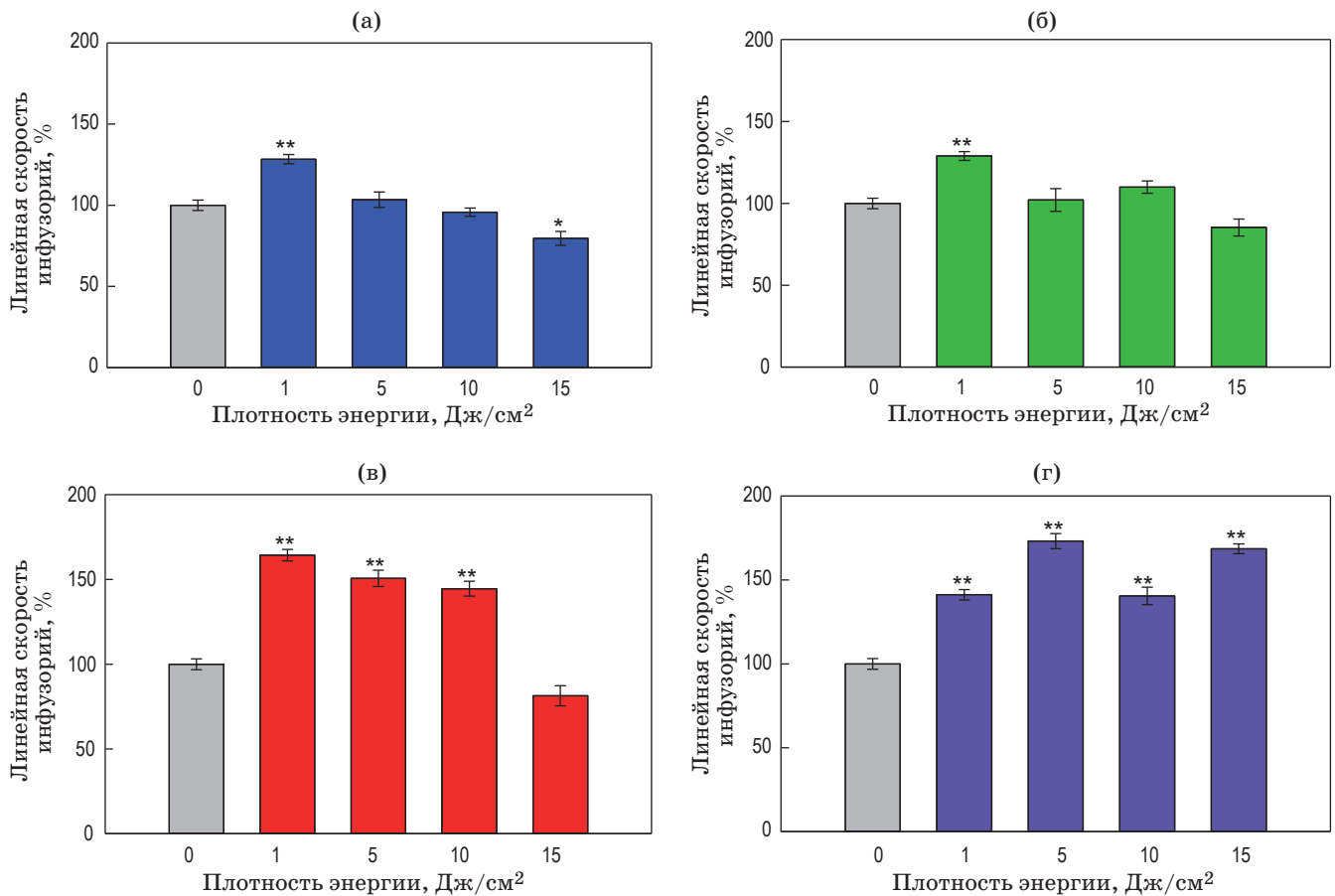


Рис. 5. Зависимости линейной скорости движения инфузорий через 24 час от плотности энергии облучения светом с длинами волн 445 (а), 518 (б), 662 (в) и 808 (г) нм. Данные представлены в процентах как отношение к соответствующему исходному значению скорости каждой группы и как отношение скорости в каждой группе к скорости движения в контрольной группе через 24 час, принятой за 100% ($M \pm m$). Значимые различия в сравнении с контролем через 24 час обозначены: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$.

см² подвижность была на 27% выше контрольного показателя, а при 15 Дж/см² — 84% от контроля (однако при 10 Дж/см на $\lambda = 518$ нм зарегистрировано небольшое повышение — на 9%, в то время как при облучении на $\lambda = 445$ нм наблюдается падение на 5%). Общий ход кривой отсроченного влияния красного света (рис. 5в) на подвижность инфузорий в зависимости от плотности энергии облучения соответствует ходу таковой в сине-зеленой области с той разницей, что при умеренных дозах (1–10 Дж/см²) стимулирующий эффект проявляется существенно более заметно (144–164%), а при 15 Дж/см² воздействие, как и на $\lambda = 445$ и 518 нм, становится подавляющим (81%). Что касается БИК области ($\lambda = 808$ нм, рис. 5г), то повышение линейной скорости имеет место при всех дозах — 1, 5, 10 и 15 Дж/см² (141, 173, 140 и 169% соответ-

ственно), причем можно предположить, что ее максимум может существенно превышать значение скорости при 15 Дж/см², демонстрируя и в этом случае куполообразную зависимость скорости от дозы, наблюдаемой при более коротковолновых излучениях.

ОБСУЖДЕНИЕ

Природа наблюдаемого в контрольной группе отрицательного скачка скорости после первого измерения неясна. Падение могло бы объясняться световым стрессом испытуемого объекта в связи с его переходом из полной темноты к вынужденному световому облучению в момент проведения измерения ($\lambda = 645 \pm 15$ нм, плотность мощности менее 0,5 мВт/см², время менее 2 мин). При этом инфузория суммарно получает хотя и небольшую (0,06 Дж/см²), но,

возможно, заметную для организма, адаптированного к темноте, порцию облучения. Однако, судя по ходу кривой с близкими параметрами ($\lambda = 662$ нм, 1 Дж/см^2), вместо наблюдаемого в контроле значимого по сравнению с исходным значением снижения скорости ($p < 0,001$) должно было бы происходить ее увеличение (рис. 4в, $p = 0,01$). Другое объяснение спада состоит в том, что он является результатом механического воздействия на препарат, возникающего при его переносе из темнового бокса в зону измерений. Снижение скорости на следующий день ($p < 0,001$), вероятно, связано с нехваткой продуктов питания. В любом случае результаты фотовоздействия на инфузории в опытных группах должны сравниваться с поведением контрольной группы.

В экспериментах на следующие сутки после облучения минимальной дозой (1 Дж/см^2) на всех длинах волн наблюдался достоверный стимулирующий эффект. По мере увеличения дозы в зависимости от длины волны излучения он мог либо плавно нарастать ($\lambda = 808$ нм), либо в более коротковолновом диапазоне плавно снижаться в соответствии с действием закона Арндта-Шульца. Наиболее четко эту зависимость демонстрирует облучение светом с длинами волн 445, 662 и, отчасти, 518 нм, на которых глобальная тенденция заключается в снижении скорости инфузорий с увеличением дозы облучения сверх 1 Дж/см^2 (рис. 5).

Стимулирующее влияние излучения диодного лазера ($\lambda = 808$ нм) наблюдалось и в опытах на *Paramecium primaurelia* [29]: через 2 мин после 50 с облучения (64 Дж/см^2) скорость их плавания в 2 раза превысила скорость контрольной группы, а через 30 мин она вернулась к норме. Кроме того, после облучения было зарегистрировано нарастание уровня эндогенного аденозинтрифосфата (АТФ) и увеличение количества пищевых вакуолей в клетках инфузорий. В другой работе, в которой изучалось влияние света на пролиферацию стволовых клеток, Y. Wang с соавторами обнаружили, что облучение в красной и БИК областях ($\lambda = 660$ и $\lambda = 810$ нм, 3 Дж/см^2) приводило к увеличению скорости деления, в то время как облучение с той же плотностью энергии в сине-зеленой области ($\lambda = 415$ и $\lambda = 540$ нм) — к подавлению [27].

Следует отметить, что сопоставлять данные разных авторов затруднительно в связи с раз-

личиями в объектах и в условиях постановки экспериментов. Так, например, в упомянутых опытах на *P. primaurelia* [29] было использовано облучение с плотностью мощности 1280 мВт/см^2 ($\lambda = 808$ нм), что в 12 раз превышает наши условия облучения инфузорий. Тем не менее, обобщая имеющуюся литературную информацию и собственные данные, можно заключить, что при уменьшении длины волны излучения возрастает его ингибирующее воздействие на метаболизм клеток и, напротив, использование света с большей длиной волны вплоть до инфракрасной области активизирует метаболизм (возрастают скорость пролиферации и двигательная активность). Фотостимуляция действует только в определенных рамках доз облучения, которые, впрочем, расширяются по мере увеличения длины волны излучения. Эти наблюдения соответствуют известному двухфазному характеру действия ФБМ [21]. Вместе с тем, поскольку эффекты ФБМ наиболее заметны при первоначально низком уровне окислительно-восстановительного состояния клеток [7], то они в нашем случае благодаря темновой адаптации инфузорий должны были быть максимальными. Следовательно, в естественных световых условиях можно ожидать, что отклик на дополнительное низкоуровневое световое воздействие скорее всего будет более слабым или отсутствовать вовсе.

Что касается обнаруженного колебательного характера изменения скорости, то при всей внешней хаотичности процесса в нем проявляются определенные закономерности. Во-первых, он напоминает поведение системы автоматического регулирования, которая при наличии запаздывающей обратной связи переходит в устойчивое состояние после ряда затухающих колебаний. Во-вторых, степень осцилляции нарастает по мере уменьшения длины волны излучения (в сине-зеленой выше, чем в красной-инфракрасной).

Биологические системы обладают разнообразными механизмами саморегуляции, в кинетике которых имеют место периодические, в том числе затухающие, колебания [32]. Подобные колебания наблюдались нами, в частности, при регистрации флуоресценции восстановленного никотинамидадениндинуклеотида и окисленного флавопротеина во время выведения миокарда из состояния

ишемии [33]. Классическими примерами колебательной биохимической реакции является гликолиз, а также изменение внутриклеточной концентрации кальция, период колебания которого может варьироваться от 0,5 до 10 мин. [32]. Колебания содержания кальция были зарегистрированы и в опытах по ФБМ. В исследовании, выполненном на изолированных гепатоцитах, после воздействия излучения гелий-неонового лазера ($\lambda = 632,8$ нм, 12 мВт/см², $0,24$ Дж/см²) наблюдались осцилляция концентрации цитозольного свободного кальция и связанного с ним потенциала клеточной мембраны с периодом около 10 мин [34]. В другой работе на одиночном человеческом фибробласте показано, что после 15 с воздействия лазерного облучения ($\lambda = 647$ нм) произошло увеличение концентрации кальция с максимальным значением через 60 с, которое вскоре сменилось возвратом к своим базовым значениям с тем, чтобы через 240 с без какой-либо дополнительной стимуляции сформировался второй глобальный максимум. Колебательный процесс завершился через 320, когда уровень кальция в клетке возвратился к тому значению, который наблюдался в состоянии покоя [35].

Судить по приведенным на рис. 4 кривым о периоде колебаний в нашем случае затруднительно из-за недостаточной частоты измерений. Вместе с тем наблюдаемые в начале многих измерений отчетливые экстремальные значения активности на 5-й и 10-й минутах позволяют предположить, что такой же порядок величины может иметь и период колебаний.

О времени адаптации инфузорий, необходимо, чтобы после облучения они перешли в стационарный режим, однозначно говорить сложно, поскольку зависимости скорости от плотности энергии излучения на всех длинах волн через 1 и 24 часа не совпадают. Отсюда следует, что выводы о результатах фотовоздействия на динамику инфузорий целесообразно делать не сразу, а только после того, как их организм пришел в равновесие. Поэтому отсроченные результаты, полученные на следующие сутки после облучения, когда адаптационный период закончен, можно считать более надежными, причем сравнение следует проводить с контрольной группой через 24 час, у которой все воздействующие на нее факторы (например, дефицит питательных веществ),

кроме полученной световой дозы, идентичны опытным группам (рис. 5).

Что касается отличий лазерного воздействия от светодиодного, то они в данных опытах не проявились. Особенности изменений скорости инфузорий при облучении на $\lambda = 518$ нм свойственны им как на $\lambda = 445$ нм, так и на $\lambda = 662$ нм.

В то же время наблюдаемые общие закономерности соответствуют современным представлениям о регуляторных механизмах ФБМ, согласно которым в регуляции физиологических функций критически важную роль играет внутриклеточная передача сигналов с помощью кальция и АФК, причем передозировка при фотооблучении способна подавить пути передачи сигналов. Действие красного и БИК излучений может быть связано с поглощением длинноволновых фотонов ЦО, что вызывает выработку дополнительного АТФ, способного повлиять на изменение концентрации внутриклеточного кальция и повышение энергетического обмена. Поглощение коротковолновых фотонов может быть ассоциировано с рядом других митохондриальных хромофоров, что приводит к избыточной выработке АФК, вызывающей ингибирующее и повреждающее действия [7, 37]. Здесь уместно отметить, что в плазматической мембране инфузорий *Paramecium bursaria*, в том числе на ресничках, был обнаружен родопсин-подобный белок, активация которого под действием света ведет к изменению плавательного поведения и секреции парамеций [38]. Поскольку цепные метаболические реакции живых организмов регулируются обратными связями с некоторой временной задержкой, то при этом возможно возникновение затухающих колебаний двигательной активности инфузорий в процессе перехода в новое стационарное состояние после кратковременного воздействия на них света.

В качестве фотоакцептора в коротковолновой области может выступать и ЦО. В поддержку такой точки зрения можно привести недавние исследования Донцова и др. [39], показавших на митохондриях возможность активации ЦО не только красным ($\lambda = 630$ нм), но и синим ($\lambda = 450$ нм) светом с максимумом стимуляции окисления при плотности энергии $1,8$ Дж/см², а при дозах выше 5 Дж/см² — ее ингибирование. Авторы делают вывод о том,

что облучение синим светом со сравнительно невысокой плотностью энергии может иметь сходное с красным светом терапевтическое действие на биологические ткани.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на многообразие проявлений, вызванных воздействием света на живые организмы, в основе многих из них лежат общие механизмы, которые удобно изучать на таких объектах как инфузории, используя в качестве интегрального параметра их подвижность, характеризующую метаболическое состояние организма. Это позволяет пополнить арсенал средств, используемых в экспериментальной биологии для изучения явлений фотобиомодуляции. Для проведения таких исследований создана установка, позволяющая осуществлять измерения линейной скорости перемещения простейших после облучения светом различной длины волны. Метод является удобным и высокочувствительным инструментом для выявления благоприятных и неблагоприятных условий существования живых эукариотных микроорганизмов и служит мостиком для перехода от исследований на субклеточных и клеточных объектах к моделям с более высокой степенью организации.

На *P. caudatum*, использованных в качестве экспериментальных объектов, получено, что после однократного светового облучения наблюдается изменение скорости их перемещения, имеющей четко выраженную колебательную составляющую. Эти колебания могут объясняться запаздывающим действием механизмов адаптации, приводящим систему автоматического регулирования в режим ча-

стичного «самовозбуждения». Время окончания переходного процесса зависит от условий облучения и может занимать более 1 часа.

На следующие сутки после облучения синезеленым светом с минимальной плотностью энергии (1 Дж/см²) происходило увеличение скорости примерно на 30% по сравнению с контролем, а с использованием более высоких плотностей энергии наблюдалось постепенное снижение подвижности, которое при 15 Дж/см² достигало 79 и 84% от контроля соответственно на $\lambda = 445$ нм и $\lambda = 518$ нм. Примерно такое же влияние оказывал красный свет ($\lambda = 662$ нм) с той разницей, что стимулирующий эффект проявляет себя заметно сильнее (повышение скорости на 64% по сравнению с контролем при 1 Дж/см²). Тем не менее, на этой длине волны при 15 Дж/см² фотоэффект становится подавляющим (81% от контроля). Что касается БИК области ($\lambda = 808$ нм), то нарастание скорости присутствует при всех плотностях энергии излучения, демонстрируя максимальный прирост скорости при 5 Дж/см² на 73% относительно контроля. Различий между лазерным и светодиодным воздействиями не обнаружено.

Метод ИСД может использоваться для выбора оптимальных условий низкоинтенсивной фототерпии в доклинических исследованиях, в частности, при выборе наиболее эффективной частоты излучения источников света, работающих в импульсно-периодическом режиме.

Авторы выражают признательность Ресурсному центру «Культивирование микроорганизмов» Научного парка СПбГУ (Санкт-Петербург) за предоставление культуры простейших и помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mester E., Szende B., Gärtner P. Die Wirkung der Lasstrahlen auf den Haarwuchs der Maus (The effect of laser beams on the growth of hair in mice) // Radiobiol Radiother (Berl). 1968. Bd. 9. № 5. S. 621–626.
2. Инюшин В.М. Лазерный свет и живой организм. Алма-Ата: Каз. гос. ун-т им. С.М. Кирова, 1970. 46 с.
3. Гамалея Н.Ф. Лазеры в эксперименте и клинике. М.: Медицина, 1972. 232 с.
4. Гейниц А.В., Москвин С.В. Лазерная терапия в косметологии и дерматологии. М.–Тверь: изд. «Триада», 2010. 400 с.
5. Применение низкоинтенсивных лазеров в клинической практике / под ред. Скобелкина О.К. М.: Лазерная академия наук, 1997. 302 с.
6. Laser therapies: Types, uses and safety / ed. by Rai V. NY: Nova Science Pub., 2020. 292 p.
7. Hamblin M.R., Demidova T.N. Mechanisms of low level light therapy // Proc. SPIE. 2006. V. 6140. P. 614001-1–12.

8. Hamblin M.R., Huang Y.Y., Heiskanen V. Non-mammalian hosts and photobiomodulation: Do all life-forms respond to light? // Photochem. Photobiol. Sci. 2018. V. 95. № 2. P. 126–139.
9. Sutherland J.C. Biological effects of polychromatic light // Photochem. Photobiol. Sci. 2002. V. 76. P. 164–170.
10. Amaroli A., Ferrando S., Benedicenti S. Photobiomodulation affects key cellular pathways of all life-forms: Considerations on old and new laser light targets and the calcium issue // Photochem. Photobiol. Sci. 2019. V. 95. № 1. P. 455–459.
11. Katagiri W., Lee G., Tanushi H.A., Tsukad K., et al. High-throughput single-cell live imaging of photobiomodulation with multispectral near-infrared lasers in cultured T cells // J. Biomed. Opt. 2020. V. 25. № 3. P. 036003-1–18.
12. Chung B., Dai T., Sharma S.K., Huang Y.Y., Carroll J.D., Hamblin M.R. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy // Ann. Biomed. Eng. 2011. № 2. P. 516–533.
13. Cronshaw M., Parker S., Arany P. Feeling the heat: Evolutionary and microbial basis for the analgesic mechanisms of photobiomodulation therapy // Photobiomodul. Photomed. Laser Surg. 2019. V. 37. № 9. P. 517–526.
14. Кару Т.И. Универсальный клеточный механизм лазерной биостимуляции: фотоактивация фермента дыхательной цепи цитохром-с-оксидазы // Современные лазерно-информационные и лазерные технологии. Сб. тр. ИПЛИТ РАН / под. ред. Панченко В.Я., Голубева В.С. М.: Итерконтакт Наука, 2005. С. 131–143.
15. Karu T.I. Cellular and molecular mechanisms of photobiomodulation (low-power laser therapy) // IEEE J. Selected Topics in Quantum Electron. 2014. V. 20. № 2. P. 7000306.
16. Ball K.A., Castello P.R., Poyton R.O. Low intensity light stimulates nitrite-dependent nitric oxide synthesis but not oxygen consumption by cytochrome c oxidase: Implications for phototherapy // Photochem. Photobiol. Sci. B. 2011. V. 102. № 3. P. 182–191.
17. Chen A.C., Arany P.R., Huang Y.Y., et al. Low-level laser therapy activates NF- κ B via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts // PLoS One. 2011. V. 6. № 7. P. 182–191.
18. Chen A.C., Huang Y.Y., Arany P.R., et al. Role of reactive oxygen species in low level light therapy // Proc. SPIE. 2009. V. 7165. P. 1–11.
19. Li Y., Lee M., Kim N., et al. Spatiotemporal control of TGF- β signaling with light // ACS Synth. Biol. 2018. V. 7. № 2. P. 443–451.
20. Trotter L.A., Patel D., Dubin S., et al. Violet/blue light activates Nrf2 signaling and modulates the inflammatory response of THP-1 monocytes // Photochem. Photobiol. Sci. 2017. V. 16. № 6. P. 883–889.
21. Hamblin M.R. Mechanisms and mitochondrial redox signaling in photobiomodulation // Photochem. Photobiol. Sci. 2018. V. 94. № 2. P. 199–212.
22. Sancar A. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors // Chem. 2003. V. 103. № 6. P. 2203–2237.
23. Haug M.F., Gesemann M., Lazović V., et al. Eumetazoan cryptochrome phylogeny and evolution // Genome Biol. Evol. 2015. V. 7. № 2. P. 601–619.
24. Serrage H., Heiskanen V., Palin W.M., et al. Under the spotlight: Mechanisms of photobiomodulation concentrating on blue and green light // Photochem. Photobiol. Sci. 2019. V. 18. № 8. P. 1877–1909.
25. Santana-Blank L., Rodriguez-Santana E., Santana-Rodriguez K. Theoretic, experimental, clinical bases of the water oscillator hypothesis in near-infrared photobiomodulation // Photomed. Laser Surg. 2010. V. 28. Suppl. 1 S41–52.
26. Москвин С.В. Основы лазерной терапии. Сер. «Эффективная лазерная терапия». Т. 1. М.–Тверь: изд. «Триада», 2016. 896 с.
27. Wang Y., Huang Y.Y., Wang Y., et al. Red (660 nm) or near-infrared (810 nm) photobiomodulation stimulates, while blue (415 nm), green (540 nm) light inhibits proliferation in human adipose-derived stem cells // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 77811-1–10.
28. Петрищев Н.Н., Янтарева Л.И., Фокин С.И. Зависимость фотоэффекта инфракрасного лазерного излучения от плотности потока мощности и функционального состояния биообъекта (инфузорий *Spirostomum ambiguum*) // Лазерная медицина. 2005. Т. 9. № 3. С. 43–48.
29. Amaroli A., Ravera S., Parker S., et al. Effect of 808 nm diode laser on swimming behavior, food vacuole formation and endogenous ATP production of *Paramecium primaurelia* (Protozoa) // Photochem. Photobiol. Sci. 2015. V. 91. № 5. P. 1150–1155.
30. Петрищев Н.Н., Папаян Г.В., Чистякова Л.В. и др. Влияние фотобиомодулирующего воздействия длинами волн 663 и 808 нм на подвижность *Paramecium caudatum* // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2018. Т. 54. № 6. С. 418–423.

31. Becker A., Klapczynski A., Kuch N., et al. Gene expression profiling reveals aryl hydrocarbon receptor as a possible target for photobiomodulation when using blue light // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 33847-1-11.
32. Рубин А.Б. Биофизика: в 2 т. Т. 1. М.: изд. МГУ, 2004. 440 с.
33. Papayan G.V., Petrishev N.N., Galagudza M.M. Autofluorescence spectroscopy for NADH and flavoproteins redox state monitoring in the isolated rat heart subjected to ischemia-reperfusion // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2014. V. 11. № 3. P. 400-408.
34. Vacca R.A., Moro L., Petragallo V.A., et al. The irradiation of hepatocytes with He-Ne laser causes an increase of cytosolic free calcium concentration and an increase of cell membrane potential, correlated with it, both increases taking place in an oscillatory manner // *Biochem. Mol. Biol.* 1997. V. 43. № 5. P. 1005-1014.
35. Alexandratou E., Yova D., Handris P., et al. Human fibroblast alterations induced by low power laser irradiation at the single cell level using confocal microscopy // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2002. V. 1. № 8. P. 547-552.
36. Владимиров Ю.А., Жидкова Т.В., Проскурнина Е.В. и др. Исследование биостимулирующего действия светодиодов и низкоинтенсивных лазеров на организм человека и животных методом активированной хемилюминесценции лейкоцитов крови // *Фотобиология и фотомедицина.* 2012. Т. 9. № 1. С. 42-48.
37. Passarella S., Karu T. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation // *Photochem. Photobiol. Sci. B: Biology.* 2014. V. 140. P. 344-358.
38. Shinozawa T., Hashimoto H., Fujita J., et al. Participation of GTP-binding protein in the photo-transduction of *Paramecium bursaria* // *Cell Struct. Funct.* 1996. V. 21. № 6. P. 469-474.
39. Донцов А.Е., Сережникова Н.Б., Погодина Л.С. и др. Фотоактивация цитохром с-оксидазной активности митохондрий печени японского перепела терапевтическими дозами синего и красного светодиодного облучения // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018. Т. 62. № 3. С. 25-30.