

# Универсальный клеточный механизм лазерной биостимуляции: фотоактивация фермента дыхательной цепи цитохром-с-оксидазы

Т.И.Кару

---

На основе анализа различных спектров действия (зависимости биологических откликов клеток от длины волны) и спектров поглощения делается вывод, что эффекты лазерной биостимуляции являются следствием электронного возбуждения хромофоров  $Cu_A$  и  $Cu_B$  в молекуле терминального фермента дыхательной цепи цитохром-с-оксидазы. На основе результатов экспериментов многоканальной регистрации спектров поглощения живого клеточного монослоя в видимом-ближнем ИК диапазонах, в качестве основного механизма биостимуляции рассматривается изменение степени окисленности цитохром-с-оксидазы и ускоренная передача электронов в каталитический центр фермента. Обсуждаются также другие возможные первичные механизмы с участием ферментов дыхательной цепи и последующие каскады реакций передачи и усиления фотосигнала в клетке. На основе предлагаемого механизма редокс регуляции метаболической активности клетки объясняются основные противоречия клеточных эффектов низкоинтенсивной лазерной терапии.

---

## 1. Введение

Настоящий обзор посвящен проблеме воздействия низкоинтенсивного (до 100 мВт) излучения видимого и ближнего ИК диапазона на клетки. Необходимость проведения систематических исследований действия излучения этого диапазона на клетку появилась в связи с развитием низкоинтенсивной лазерной терапии (в современной терминологии — фотобиомодуляции), осуществляемой изначально при помощи He-Ne лазеров, а в настоящее время преимущественно полупроводниковыми лазерами и светодиодами, излучающими в диапазоне 650 - 900 нм.

Использованный в заглавии термин “лазерная биостимуляция” носит исторический характер, именно так называли в 60-х и 70-х годах метод лечения He-Ne лазером язв и ран различной этиологии. Уместно напомнить, что метод лазерной биостимуляции, который ныне используется в различных областях медицины во всем мире [1], зародился в СССР в середине 60-х годов.

Когерентные свойства лазерного излучения не проявляются на молекулярном уровне при взаимодействии луча с биотканью [2]. При облучении клеточных монослоев, тонких слоев клеточных

суспензий и тонких слоев тканевой поверхностей когерентный и некогерентный свет одинаковой длины волны и дозы вызывают одинаковый биологический отклик, что хорошо документировано в экспериментах с различными биообъектами [3]. Дополнительное (к основному механизму, связанному с поглощением света соответствующими хромофорами) терапевтическое действие излучения именно от лазерного источника может случиться только в более глубоких слоях биоткани из-за случайной интерференции световых волн. Этот вопрос обсуждается более подробно в работе [3].

В настоящем обзоре рассматривается в историческом аспекте путь длиной около 20 лет, пройденный нами от удивления и некоторого скептицизма по поводу ярко выраженных, но биологически непонятных эффектов лазерной биостимуляции, до сегодняшнего понимания клеточных механизмов низкоинтенсивной лазерной терапии.

## 2. Вопрос о первичном фотоакцепторе в клетке. Спектры действия и спектры поглощения.

Для разрешения вопроса о возможном акцепторе для видимого и ближнего ИК лазерного излучения исходной точкой нами были выбраны спектры

действия различных клеточных откликов, связанных с пролиферацией эукариотических клеток. Как известно, спектр действия (зависимость любого биологического отклика клетки на облучение от длины волны или волнового числа) отражает с некоторыми ограничениями спектр поглощения первичного фотоакцептора [4].

Первые спектры действия, связанные со светостимуляцией, относятся к возбудимым клеткам. В 1947 г. Арванитакис и Калазонитис [5] облучали миокард виноградной улитки различными длинами волн в синей, зеленой и красной областях спектра и пришли к выводу, что цитохромы и флавопротеины ответственны за наблюдаемые электро-физиологические сдвиги. В литературе также был описан спектр действия светозависимого фосфорилирования в изолированных митохондриях в фиолетово-синей области (с максимумом 405-436 нм [6]), спектры действия стимуляции синтеза нуклеиновых кислот и изменения проницаемости клеточной мембраны [7,8], стимуляции роста *Escherichia coli* и синтеза белка дрожжами [9-11], фотостимуляции образования Е-розеток лимфоцитами крови человека, митозов в клетках L и экскреции ДНК-фактора лимфоцитами [12], а также спектр действия люминол-зависимой хемилюминесценции спленоцитов [13]. Все указанные выше спектры захватывали только ограниченные части видимого-ближнего ИК диапазона и поэтому не дали возможности для определения первичного фотоакцептора.

Более полные спектры действия как по диапазону длин волн (от 313 до 860 нм), так и по количеству отдельных длин волн, использованных для облучения, были получены для стимуляции синтеза ДНК и РНК в пролиферирующих [14], и в покоящихся клетках HeLa [15], а также для увеличения адгезивных свойств клеточной мембраны HeLa [16]. Спектры действия видимого-ближнего ИК излучения обобщены в нескольких работах [2,17-20]. В обзорах [17,18,20] также приведены зависимости откликов клеток от дозы и интенсивности для различных длин волн, спектры действия дихромного облучения и результаты модификации эффектов облучения различными химикатами. Эти данные дали основание полагать, что в случае ускорения пролиферации клеток, культивируемых *in vitro*, первичные фотоакцепторы находятся в митохондриях и стимулирующие эффекты света связаны с интенсификацией окислительного метаболизма [19,17].

Остановимся более подробно на трех спектрах действия из работ [14-16], два из которых относятся к процессам в клеточном ядре (синтез ДНК и РНК), а один – к процессам в клеточной мембране (адгезия

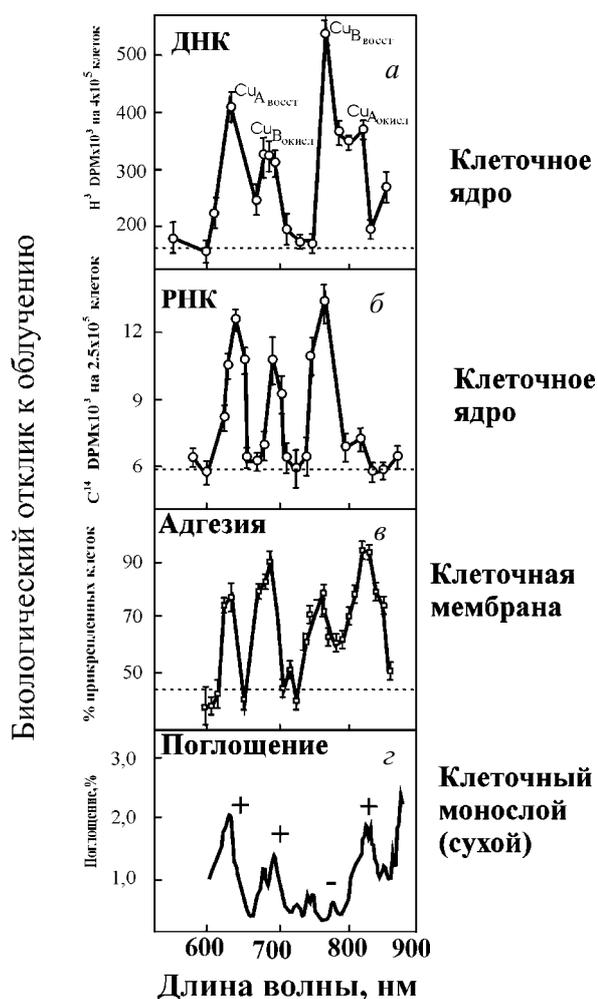


Рис. 1. Красная-ближняя ИК область спектров действия монохроматического излучения (полная ширина по полувысоте 4-14 нм) на скорость синтеза ДНК (а) и РНК (б) [14,15], измеренные в монослое клеток HeLa как описано в [14,15], и на адгезию клеток к субстрату (в), измеренный в тонком слое суспензии клеток HeLa как описано в [16]. Спектр поглощения сушеного на воздухе монослоя клеток HeLa (Г) измеряли, как описано [27]. На рис. а. указана предполагаемая принадлежность полос поглощающим хромофорам цитохром-с-оксидазы [22]. Знаками + и – обозначены совпадения максимумов в этом спектре и в спектрах действия (рис.а-в).

клетки к стеклу). На рис. 1. показана для наглядности только та часть спектрального диапазона (600-830 нм), которая является важной для низкоинтенсивной лазерной терапии. Индивидуальные спектры в полном диапазоне можно найти в [14-16,20,21].

На основе спектров действия можно было сделать четыре вывода. Во-первых, хорошо структурированные спектры указывали на наличие молекулы-фотоакцептора. Во-вторых, для лазерной

биостимуляции оптимальными являются несколько длин волн: 620, 680, 760 и 820 нм. Отметим, что длина волны испускания He-Ne лазера 632,8 нм находится недалеко от максимума при 620 нм. В-третьих, схожесть по местонахождению пиков для столь разных фотооткликов как скорость синтеза ДНК (рис. 1а) и РНК (рис. 1б), а также изменение адгезивных свойств клеточной мембраны (рис. 1в), указывала на то, что фотоакцептор, скорее всего, является одним и тем же. В-четвертых, наличие схожих спектров действия для биохимических процессов в различных клеточных органеллах указывало на то, что в клетке с большой вероятностью существуют каскады реакций клеточной сигнализации (цепь передачи и усиления фотосигнала), т.е. биохимические реакции, не требующие новой фотоактивации.

Следующим этапом наших исследований стала идентификация молекулы фотоакцептора на основе полученных спектров действия. Напомним, что полные спектры действия состояли из одной полосы в области 400-500 нм и двух серий дублетных полос в областях 600-680 и 750-830 нм с отчетливыми максимумами в области длин волн 404, 620, 680, 760 и 820 нм [14,15]. Эти спектры в области 600-860 нм представлены на рис. 1а-в.

Поскольку спектр действия совпадает по форме со спектром поглощения фотоакцептора [4], отнесение полос в спектрах действия было сделано по аналогии со спектрами поглощения металл-лиганд, характерными для данной спектральной области [22]. Приведенный в работе [22] анализ позволил сделать вывод, что все полосы в этих спектрах действия можно отнести к спектру цитохром-с-оксидазы — терминального фермента дыхательной цепи. Полоса 820 нм предположительно принадлежит к хромофору  $Cu_A$  в окисленном состоянии, полоса 760 нм —  $Cu_B$  в восстановленном виде, полоса 680 нм —  $Cu_B$  в окисленном виде и полоса 620 нм —  $Cu_A$  в восстановленном виде (рис. 1а). Эти хромофоры вносят основной вклад в поглощение на данной длине волн, что не исключает доленое участие поглощения других хромофоров цитохром-с-оксидазы. Схему с указанием редокс чувствительных хромофоров  $Cu_A$ ,  $Cu_B$  и гемовых Fe в структуре молекулы цитохром-с-оксидазы можно найти в обзорах [20,21]. Полоса 400-450 нм, скорее всего, является огибающей нескольких полос поглощения в области 350-450 нм (т.е. имеет место суперпозиция нескольких полос). Так, полосу с максимумом вблизи 404-420 нм можно отнести к гему в окисленной форме фермента, а более длинноволновый край огибающей полосы при 450 нм (с учетом асимметрии ее контура) следует, по-видимому, приписать  $Cu_B$  в восстановленной

форме. Участие гема в спектрах действия подтверждается соотношением оптимальных доз для сине-фиолетовой и зелено-красных областей спектра (10 и 100 Дж/м<sup>2</sup> [7]). Полоса в области 400-420 нм, известная как полоса Соре гемовых соединений, на порядок интенсивнее, чем полосы поглощения этих соединений в видимой области (ссылки, относящиеся к анализу спектров, можно найти в [20-22]).

Из анализа формы полос в спектрах действия и соотношений интенсивностей линий можно сделать вывод, что в качестве первичного фотоакцептора выступает молекула цитохром-с-оксидазы не в полностью окисленном или восстановленном состоянии, а в одной из промежуточных форм [22]. Сложный, многоступенчатый (и не до конца выясненный) механизм передачи электронов между различными центрами в молекуле фермента предполагает существование целого ряда промежуточных форм, отличающихся друг от друга уровнем окисленности [23, 24].

Для идентификации фотоакцепторной молекулы необходимо сравнение спектров действия и поглощения. Анализируемые спектры действия были получены при облучении монослоя клеток HeLa [14, 15] или клеток тонкого слоя суспензии HeLa [16]. Запись спектра поглощения отдельного монослоя или отдельной клетки (и тем более фиксация изменений в поглощении) представляет собой нелегкую задачу из-за очень слабого поглощения хромофоров. Спектры поглощения отдельных клеток до 650 нм были записаны много лет назад с целью определения компонентов дыхательной цепи (обзор [25]). Спектр поглощения 8 параллельных стекол с монослоями фибробластов до 1000 нм был записан с использованием коммерческого двухлучевого спектрофотометра [26]. Воздействие облучения в этих работах не изучалось.

С целью изучения вызванных облучением изменений в поглощении клеточных хромофоров был разработан метод быстрой многоканальной записи поглощения монослоя клеток [27,28]. Результаты этих опытов обсуждаются более подробно в разделе 3. На рис. 1г приведен рядом со спектрами действия спектр поглощения сухого монослоя клеток HeLa. При сравнении спектров на рис. 1а-г, в красной-дальней красной и ближней ИК областях отчетливо видно совпадение трех максимумов вблизи 620, 680 и 820 нм, исключение составляет максимум при 760 нм. Отсутствие этого максимума в спектре поглощения высушенного на воздухе монослоя можно объяснить тем, что в таких условиях цитохром-с-оксидаза полностью окислена, и естественно, дыхательная цепь не функционирует в сухих клетках,

а полоса при 760 нм предположительно относится к хромофору  $Cu_B$  в восстановленном виде [22].

Таким образом, сравнительный анализ спектров действия и поглощения свидетельствует о том, что фотоакцептором для излучения видимого и ближнего ИК диапазонов может быть цитохром-с-оксидаза (наряду с другим ферментом дыхательной цепи НАДН-дегидрогеназой, рассматриваемую в качестве фотоакцептора преимущественно для сине-фиолетовой области) [17,22].

Надо сказать, вывод о цитохром-с-оксидазе как фотоакцепторе подтверждается экспериментальными данными о том, что выделенные митохондрии эукариотических клеток (а цитохром-с-оксидаза является компонентом дыхательной цепи, локализованной в митохондриях) чувствительны к облучению монохроматическим светом видимого и ближнего ИК диапазонов. Обзор этих работ можно найти в [20,21]. Также надо подчеркнуть два обстоятельства. Во-первых, при облучении прокариотических клеток (например, бактерий *Escherichia coli*), фотоакцепторами являются терминальные ферменты дыхательных цепей [29-32], а в качестве механизма рассматривается изменение скорости потока электронов внутри оксидазных комплексов, что приводит к значительным изменениям в параметрах клеточной мембраны и функционировании ряда генов [30]. Во-вторых, компоненты дыхательной цепи также являются фотоакцепторами при облучении возбудимых клеток (нервные клетки, кардиомиоциты, нейроны беспозвоночных). Предполагается, что монохроматический свет, абсорбированный хромофорами в дыхательной цепи, усиливает дыхательный метаболизм возбудимой клетки и воздействует на электрогенные свойства ее мембраны [5,33-38].

Таким образом, вышеизложенное позволит нам высказать предположение, что стимуляторное действие монохроматического излучения определенных длин волн (“лазерная биостимуляция”) через дыхательные цепи является весьма широко распространенным механизмом среди как эукариотических, так и прокариотических клеток. Этим обстоятельством можно объяснить одну из главных причин скептицизма к эффектам лазерной биостимуляции, а именно их универсальность (“от бактерии до человека” или “панацея от всех болезней”). Дыхательные цепи являются одинаковыми у всех эукариотических клеток. Они могут быть весьма различные (другие цитохромы и разветвленность цепи в терминальных участках) в прокариотических клетках, но принцип их функционирования является сходным.

### 3. Первичные механизмы в молекуле (с участием молекулы) фотоакцептора

Уже в конце 80-х, когда стала ясно, что эффекты лазерной биостимуляции в своих начальных стадиях как в эукариотических, так и в прокариотических клетках связаны с воздействием света на редокс цепи, и в первую очередь на дыхательные цепи [19,39], была высказана гипотеза, что облучение приводит к **ускорению переноса электронов в дыхательной цепи благодаря изменению в редокс свойствах ее компонентов при фотовозбуждении их электронных состояний** [39,18]. Хорошо известно, что электронное возбуждение изменяет редокс свойства поглощающих молекул [40]. Позже предполагалось, что также ускоряется перенос электронов внутри молекулы цитохром-с-оксидазы, терминального фермента дыхательных цепей эукариотических клеток [22,28] и цитохромного комплекса bd, терминального фермента дыхательной цепи *E. coli* [32].

Проверить предположение об ускорении переноса электронов можно при помощи измерения изменений поглощения клетки *in situ*. Как уже упоминалось в разделе 2, к середине 90-х был разработан чувствительный метод быстрой многоканальной записи для регистрации изменений в поглощении клеточного монослоя вследствие облучения [27,28]. При помощи этой аппаратуры были проведены две серии экспериментов, отличающихся условиями кислородной обеспеченности облучаемых клеток.

В первой серии опытов облучали клеточные монослои в открытых флаконах, т.е. в условиях кислородной достаточности, используя полупроводниковый лазер с длиной волны испускания 670 или 820 нм [27]. Эти длины волны были выбраны в соответствии с максимумами в спектрах действия (рис.1а-в). При облучении монослоя клеток HeLa светом с длиной волны 670 нм в дозе  $6,3 \cdot 10^3$  Дж/м<sup>2</sup> в течение 10 с один, два или три раза были зарегистрированы изменения поглощения в полосах около 670, 750 и 774 нм, без изменений осталась полоса поглощения при 718 нм (рис.2а). В спектрах действия полоса 670-680 нм предположительно принадлежит хромофору  $Cu_B$  в окисленном состоянии, а полоса 760-770 нм — хромофору  $Cu_B$  в восстановленном состоянии [22], а полоса при 718 нм отсутствует (см. также рис.1а). Если имеется соответствие между полосами в спектрах действия (рис.1а-в) и в спектрах поглощения (рис.2а), то результат из работы [27] является весьма закономерным: при увеличении поглощения в полосе при 670 нм и, соответственно, концентрации хромофора в окисленном состоянии,

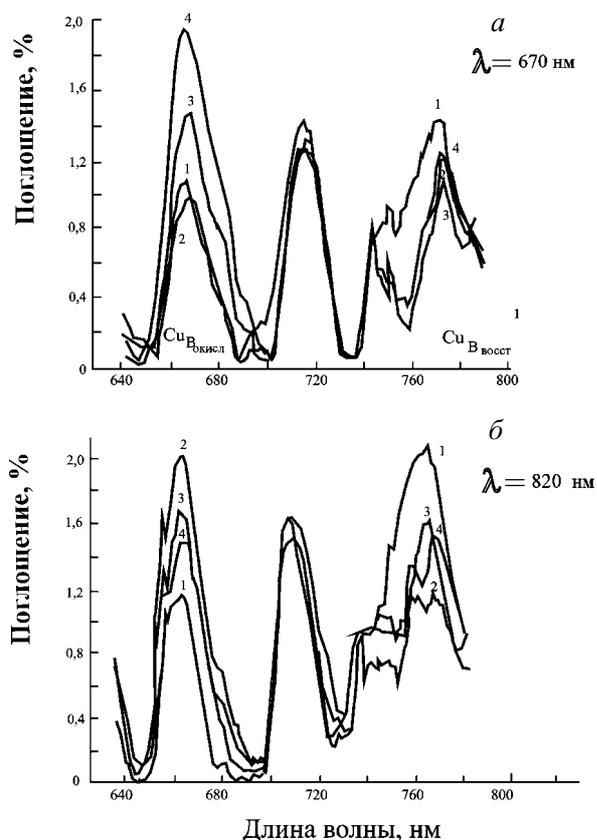


Рис.2. Спектры поглощения монослоя клеток HeLa непосредственно после удаления питательной среды (1) и после первого (2), второго (3) и третьего (4) облучения полупроводниковым лазером с  $\lambda=670$  нм (а) или  $\lambda=820$  нм (б); каждое облучение 10 с в дозе  $6 \cdot 10^3$  Дж/м<sup>2</sup>, как описано в [27].

уменьшается поглощение полосы при 750-770 нм (и концентрация восстановленного хромофора).

При облучении монослоя клеток HeLa излучением с  $\lambda=820$  нм также были зарегистрированы изменения в полосах поглощения около 670 и 775 нм (рис.2б). Излучение с  $\lambda=820$  нм использовалось в связи с тем, что спектры действия имели полосу около 820 нм, которая была предположительно связана с хромофором  $Cu_A$  в окисленном состоянии [21] (рис.1а). Как и в предыдущем случае (облучение с  $\lambda=670$  нм), облучение вызывало увеличение поглощения предположительно окисленного хромофора  $Cu_B$ , поглощающего при 680 нм (рис.2б). Поглощение в полосе при  $\lambda=718$  нм осталось без изменения как и в предыдущем опыте (рис.2а), в спектрах действия эта полоса отсутствовала (рис.1а-в).

Во второй серии экспериментов облучались клетки HeLa, выращенные в закрытых флаконах и следовательно, при относительной кислородной недостаточности [28]. В таких клетках дыхательные

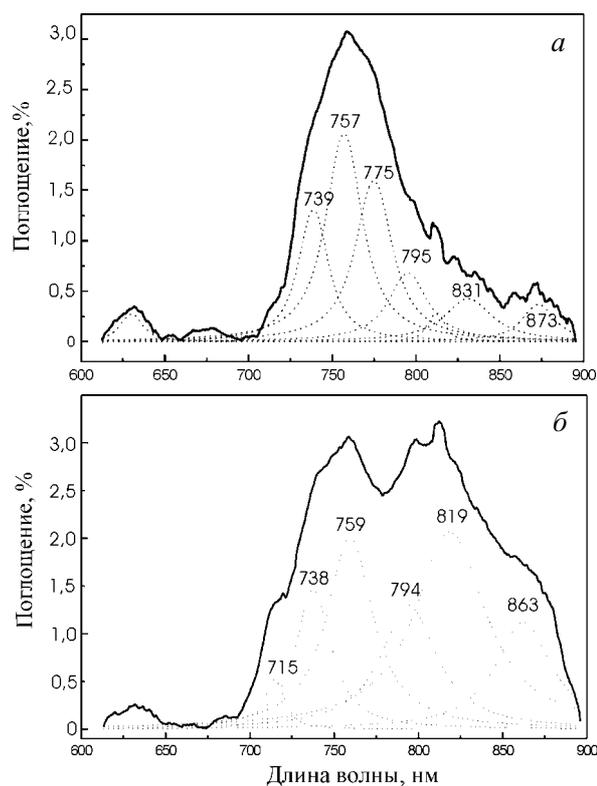


Рис.3. Спектры поглощения монослоя клеток HeLa (выращенного 72 ч в специальных закрытых кюветках) до начала эксперимента (а) и (б) после последнего облучения ( $\lambda=820, 670, 632,8$  нм, как описано в [28]). Пунктиром обозначены линии аппроксимации Лоренцовским контуром.

цепи находятся в более восстановленном состоянии по сравнению с дыхательными цепями в клетках, облученных в первой серии опытов [27]. Результат одного из таких экспериментов представлены на рис.3а,б. В этом опыте для облучения использовали несколько длин волн и спектры записывали после каждого облучения. На рис.3 для наглядности приведены спектры только до начала эксперимента (а) и после последнего облучения (б). Также не приведены данные об изменениях в зелено-желтой области спектра. Полностью эти результаты можно найти в [28]. Анализ полученных данных позволил делать вывод [28], что вследствие облучения цитохром-с-оксидаза стала более окисленной, что как *in vivo*, так и в цельных клетках свидетельствует об активизации окислительного метаболизма [41,42].

Были зарегистрированы изменения в спектре поглощения прокариотических клеток *Escherichia coli* под воздействием излучения He-Ne лазера, вызванные, по мнению авторов, изменениями в

дыхательной цепи [43]. Было обнаружено частичное окисление терминального цитохромного комплекса bd, в то время как флавопротеины оказались частично восстановленными. Напомним, что комплекс bd рассматривался ранее как фотоакцептор для *E. coli* [30,32].

Измерение оптической активности клеток HeLa методом кругового дихроизма до и после облучения ( $\lambda=820$  нм) показывало, что изменение поглощения вследствие облучения сопровождается изменением оптической активности или другими словами, изменение в степени окисленности поглощающих хромофоров сопровождается конформационными изменениями в их окружности [44,45]. Предположительно, конформационные изменения связаны с хромофором  $Cu_B$  цитохром-с-оксидазы [45].

Есть все основания полагать, что вызванные коротковременным облучением изменения в степени окисленности компонентов дыхательной цепи соизмеримы временем облучения и являются обратимыми. Генерированный таким образом фотосигнал “запоминается клеткой” в ходе каскада биохимических реакций, связанных с изменениями параметров гомеостаза (раздел 4). С другой стороны, известно, что в дрожжевых клетках, предшественники которых 6-7 поколений назад были облучены He-Ne лазером, сохраняется повышенная активность дыхательных ферментов (обзор [31]) и изменена ультраструктура митохондрий [46,47]. Это обстоятельство позволяет допустить, что в этом случае излучение воздействует и через синтез митохондриальных ферментов, который регулируется на генетическом уровне (некоторые компоненты дыхательной цепи кодируются митохондриальной ДНК).

На рис.4 представлены обсуждаемые в этом разделе данного обзора первичные клеточные механизмы лазерной биостимуляции. Выше обсуждался первый из них, т.е. механизм изменения редокс состояния молекулы цитохром-с-оксидазы, которое определяется соотношением концентраций окисленного и восстановленного хромофора в редокс парах. Идея об изменениях редокс баланса в компонентах дыхательной цепи была высказана еще в 1988 г., когда молекула фотоакцептора не была известна [39].

В связи с изменениями в редокс состояниях хромофора  $Cu_B$ , являющегося частью каталитического центра цитохром-с-оксидазы, можно также предполагать, что вследствие облучения **уменьшается количество связанного в каталитическом центре NO**. В физиологических условиях NO служит модулятором (ингибитором) активности цитохром-

с-оксидазы и связывается именно с хромофором  $Cu_B$  [48]. В условиях патологии увеличивается выделение NO макрофагами [49] и, соответственно, вероятность ингибирования цитохром-с-оксидазы повышается. В таких условиях увеличение дыхательной активности клетки вследствие облучения может играть важную роль с точки зрения ожидаемых положительных результатов низкоинтенсивной лазерной терапии [50]. Этот механизм указан рис. 4 под названием “освобождение NO из каталитического центра цитохром-с-оксидазы”.

Во время возбуждения электронных состояний заметная часть энергии возбуждения неизбежно превращается в тепло, что вызывает локальное и преходящее увеличение температуры абсорбирующих хромофоров [51]. Любое значительное распределенное во времени и пространстве нагревание образцов может быть предотвращено с помощью соответствующего контроля интенсивности, дозы и облучения. Тем не менее существует возможность **локализованного преходящего нагрева поглощающих хромофоров** (рис.4). Локальное кратковременное повышение температуры поглощающих биомолекул может вызывать структурные (например, конформационные) изменения и приводить в действие биохимические процессы (вторичные темновые реакции), такие, как активация или ингибирование ферментов. Эксперименты с клетками *E. coli* [52] и HeLa [53] показали, что под воздействием ультракоротких (фемтосекундных) импульсов такой нагрев действительно может влиять на биологический отклик клеток.

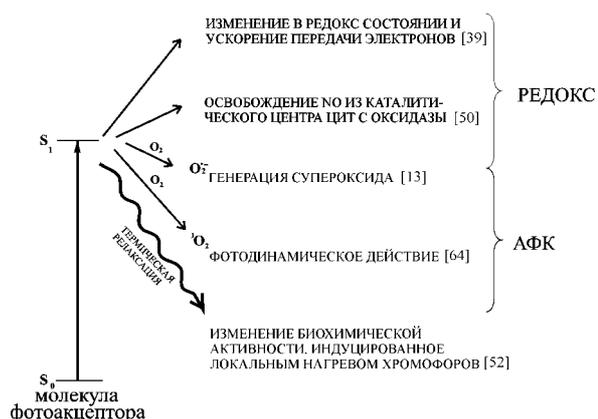


Рис.4. Обсуждаемые первичные механизмы воздействия монохроматического излучения в молекулах (или с участием молекул), являющихся компонентами дыхательной цепи (цитохром-с-оксидаза, а также НАДН-дегидрогеназа для сине-фиолетовой области). Обозначения: АФК — активные формы кислорода, РЕДОКС — реакции, основанные на изменениях редокс статуса поглощающих хромофоров.

Минимальный размер микроучастков, которые подвергались кратковременному нагреванию фемтосекундными лазерными импульсами с  $\lambda=620$  нм, составил приблизительно  $10^{-3}$  мкм, что соответствует размеру хромофоров предполагаемых фотоакцепторов — компонентов дыхательной цепи [52,53]. Небольшой локальный нагрев и значительный градиент температуры вызываются как непрерывным излучением, так и фемтосекундными импульсами. Различие состоит в том, что плотность локальных нагреваемых зон в случае непрерывного облучения по сравнению с ультракороткими импульсами чрезвычайно мала вследствие низкой интенсивности излучения. Плотность числа хромофоров ниже плотности абсорбирующих хромофоров приблизительно в  $10^7$ - $10^{10}$  раз в зависимости от времени затухания возбуждения хромофоров [52].

Необходимо заметить, что упомянутые выше соображения касаются отдельных клеток. Проблема локального нагрева поглощающих хромофоров приобретает совершенно другую значимость (из-за неомогенного распределения этих хромофоров) при облучении тканей. Этим может, например, объясняться “эффект лазерных пятен”, описанный в клинических применениях низко-интенсивных лазеров [1]. Более подробно проблемы, связанные с неомогенностью поглощающих тканей, обсуждаются в работах [51,54,3].

Другие предполагаемые первичные механизмы включают участие молекулы кислорода, и скорее всего, включают другие компоненты дыхательной цепи (рис. 4). В процессе дыхания в норме 1-2% кислорода не восстанавливается полностью до  $H_2O$ , а только до супероксидного аниона,  $O_2^-$  [55]. Известно, что интенсивность образования  $O_2^-$  зависит от метаболического состояния митохондрий; активация работы дыхательной цепи и окисление кофермента Q увеличивает количество образующегося  $O_2^-$  [56].

Хорошо известно, что даже незначительное повышение концентрации  $O_2^-$  (и следовательно, продукта его дисмутации —  $H_2O_2$ ; дисмутация — быстрая реакция образования  $H_2O_2$  и  $O_2$  из двух молекул  $O_2^-$ ), вызывает в клетке множество откликов, таких как, например, увеличение внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ), активацию мембранных ферментов  $Na^+/H^+$  антипорта и Са-АТФазы, освобождение арахидоновой кислоты и др. [57-59]. Перекись водорода участвует в сложном комплексе реакций регулирования клеточного метаболизма [55]. Также известно, что незначительное увеличение концентраций  $O_2^-$  и  $H_2O_2$  может стимулировать пролиферацию и другие клеточные функции (обзор [60]).

Измерения люминол-зависимой хемилюминесценции суспензии клеток селезенки после воздействия на них излучением красной-ближней ИК-области спектра [13] не исключают возможности увеличения концентрации  $O_2^-$  через активацию митохондрий (наряду с активацией НАДФН-оксидазы, поскольку облучаемая суспензия содержала и фагоцитирующие клетки). Сравнение спектра действия люминол-зависимой хемилюминесценции и спектра поглощения цитохром-с-оксидазы показало некоторое сходство между ними (максимум вблизи 830 нм). На основе этих данных была высказана гипотеза о том, что одним из первичных клеточных механизмов низкоинтенсивной лазерной терапии может быть **увеличение концентраций  $O_2^-$  (и  $H_2O_2$ ) вследствие активации дыхательной цепи** [13] (рис.4). Некоторые исследования последних лет указывают на справедливость гипотезы [13] об увеличенной генерации  $O_2^-$  (и  $H_2O_2$ ) вследствие облучения [61,62].

Определенные поглощающие видимый свет молекулы, такие, как порфирины и флавопротеины (некоторые компоненты дыхательной цепи принадлежат этим классам соединений) могут служить эндогенными фотосенсибилизаторами [63]. На основе данных о стимулирующем действии монохроматического излучения видимого диапазона на скорость синтеза РНК в клетках HeLa и спектроскопических данных для порфиринов и флавинов была выдвинута в 1981 г. гипотеза [64] о том, что поглощение квантов света этими молекулами вызывает **усиленную генерацию синглетного кислорода  $^1O_2$**  (фотодинамический эффект). Этот путь можно считать доминирующей реакцией при облучении клеток светом в больших дозах (фотодинамическое повреждение) [17]. Но результаты работы [65] указывают на то, что очень низкие концентрации  $^1O_2$  могут вызвать ускорение пролиферации клеток. Надо отметить, что гипотеза “синглетного кислорода” (рис.4) была исторически первой гипотезой, выдвинутой для объяснения клеточных эффектов лазерной биостимуляции [64].

Возможная роль синглетного кислорода при облучении низкоинтенсивным лазерным светом и его генерация как фотодинамическим путем, так и путем прямого возбуждения молекулы кислорода обсуждалась позже в нескольких работах (например [66-68]). Путь прямого возбуждения  $O_2$  [66] можно считать очень мало вероятностной из-за запрещенных квантовых интеркомбинационных переходов при возбуждении излучением с  $\lambda=760$  и 1270 нм. Фотодинамические реакции с участием компонентов дыхательной цепи (флавины, гемы и Fe-S центры) могут происходить только в присутствии кислорода,

т.е., в аэробных условиях. В специальных опытах, где дрожжевая культура *Saccharomyces ludwigii* была выращена в аэробных или анаэробных условиях и облучена He-Ne лазером, была зарегистрирована стимуляция синтеза белка в обоих экспериментах, но различие состояло в местонахождении максимума на дозовой кривой [69]. Это говорит о том, что, по крайней мере в данном конкретном случае, механизм, связанный с  $^1\text{O}_2$ , не принимает участия в фото-стимуляции синтеза белка в дрожжах.

Нет оснований полагать, что только одна из рассмотренных реакций (рис.4) имеет место при облучении клетки. Важнейшим является вопрос о том, какая из этих реакций ответственна за конкретный биологический отклик на лазерное облучение. Например, за стимуляцию роста *E. coli* ответственны два различных механизма: фотохимический — при низких дозах и термический — при более высоких [70].

Не исключено также, что результат всех изображенных реакций на рис.4 одинаков — изменяется редокс-статус дыхательной цепи в более окисленную сторону. В случае первого обсуждаемого механизма (рис.4) на это указывают результаты измерения поглощения клеточного монослоя (рис.2, 3). Это также не исключается в случае других обсуждаемых выше механизмов (рис.4). Как  $\text{O}_2^-$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , так и  $^1\text{O}_2$  считаются окислителями. Например, генерируемый вследствие облучения  $\text{O}_2^-$  может реабсорбироваться дыхательной цепью и быть использованным для синтеза АТФ из АДФ в физиологических условиях [71]. Таким образом, увеличение концентрации активных форм кислорода (АФК) вследствие активации митохондрий в свою очередь может модулировать редокс состояние митохондрии.

#### 4. Передача и усиление фотосигнала (каскады реакций клеточной сигнализации)

Итак, выше рассматривались фотоакцепторные молекулы (раздел 2) и возможные реакции, происходящие во время облучения (раздел 3). Но хорошо известно, что многие биохимические реакции в клетках имеют место в течение часов и даже дней после сеанса облучения (облучение, как правило, длится в пределах от нескольких секунд до нескольких минут). Например, спектры действия света на скорость синтеза ДНК и РНК (рис.1а,б) были измерены через 1,5 ч после облучения монохроматическим светом, продолжающегося 10 с [14,15].

Представляется важным выяснить, какие реакции должны проходить в клетке, чтобы передать фотосигнал от митохондрий (где расположены первичные

фотоакцепторы, раздел 2) до клеточного ядра, где синтезируются нуклеиновые кислоты. Цепь усиления и передачи фотосигнала (механизмы редокс регуляции клеточного метаболизма) была впервые предложена в 1988 г [39] и в дальнейшем дополнена новыми экспериментальными данными [20,21]. Последний вариант этой схемы, предложенный рис.5, основывается на том факте, что дыхательная цепь способна контролировать редокс-потенциал клетки и концентрацию АТФ. Как известно, активация дыхательной цепи вызывает окисление пула НАДН в митохондриях, что, в свою очередь ведет к изменениям в редокс-состоянии и митохондрий, и цитоплазмы [72,59].

На рис. 5 показаны два связанных друг с другом пути модуляции клеточного метаболизма с помощью облучения. Первый путь — это редокс-контроль. Второй путь — это контроль фотоакцептора над уровнем внутриклеточного АТФ. Как известно, даже небольшие изменения в уровне АТФ могут значительно изменять клеточный метаболизм [73].

Некоторые экспериментальные данные свидетельствуют о том, что регуляторная роль окислительно-восстановительного гомеостаза клетки является более важной по сравнению с контролем через АТФ [74,75]. Осуществление контроля над редокс-состоянием клетки предполагает существование связи между окислительно-восстановительными функциями активизированных светом митохондрий и изменениями в редокс состоянии цитоплазмы ( $E_h$ ). Изменение редокс-потенциала цитоплазмы ( $E_h$ , рис.5) вызывает каскад кратковременных изменений параметров клеточного гомеостаза, регуляторная роль которых в клеточной биологии хорошо известна (факторы транскрипции NF-KB, AP-1,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ,  $[\text{pH}]_i$ , электрический потенциал мембраны  $E_m$  и некоторые другие [76-80]). Регуляторная роль клеточного редокс-потенциала в функционировании факторов транскрипции получена в последние годы много доказательств [80-83]. Например, считается, что активные формы кислорода регулируют активность транскрипционных факторов именно через изменение клеточного редокс-потенциала [56,83]. На рис.5 изменение редокс-потенциала клетки указано через пару НАД/НАДН. На самом деле редокс-потенциал определяется балансом окислительно-восстановительных эквивалентов в динамическом равновесии, основную роль играют три пары: НАД/НАДН, НАДФ/НАДФН и GSH/GSSH (GSH-глутатион).

Многие из представленных на рис.5 вторичных реакций обнаружены и измерены в облученных клетках: увеличение внутриклеточной концентрации

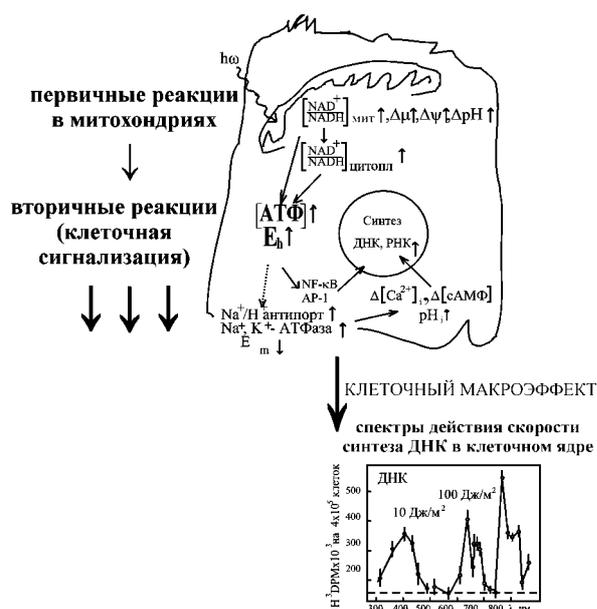


Рис. 5. Вторичные (темновые) механизмы после поглощения света в митохондриях (цепи передачи и усиления фотосигнала или каскады клеточной сигнализации).  $E_h$  — окислительно-восстановительный потенциал цитоплазмы;  $[\text{ATP}]$  — внутриклеточная концентрация АТФ; знак  $[\ ]$  обозначает концентрацию соответствующих соединений, стрелки  $\uparrow$  и  $\downarrow$  указывают на увеличение или уменьшение соответствующей величины; индекс  $i$  — внутриклеточный;  $E_m$  — электрический потенциал мембраны, NF- $\kappa$ B, AP-1-редокс — чувствительные факторы транскрипции.

АТФ [84-86], активация  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы [87,88], увеличение внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  [89,90] и  $\text{pH}$  ( $\text{pH}_i$ ) [91,92], изменение концентрации цАМФ [93], активация трансмембранных ионных токов [38], деполяризация клеточной мембраны [94]. Следует подчеркнуть, что изменение одного параметра клеточного гомеостаза вызывает сразу целый каскад других изменений. Поэтому приведенные выше примеры, естественно, не являются всеобъемлющими и можно измерять многие различные биологические отклики на облучение. Напомним, что именно многообразие различных биологических откликов на облучение He-Ne лазером всегда было одним из источников скептицизма к эффектам лазерной биостимуляции.

Непосредственное измерение трансмембранных ионных токов как возбудимых (кардиомиоцитов, нейронов), так и невозбудимых (глиальных) клеток с использованием метода локальной фиксации потенциала при облучении He-Ne лазером показало активизацию токов через АТФ-зависимые  $\text{K}^+$ -каналы или  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые  $\text{K}^+$ -каналы [38]. АТФ-зависимость

светочувствительных токов косвенно подтверждает рассматриваемую схему цепи передачи фотосигнала (рис.5). В этой же серии экспериментов светочувствительные ионные токи были зарегистрированы только в прилегающей к клетке конфигурации пипетки, т.е. в условиях целой клетки [38]. Действительно, каскад биохимических реакций (цепь передачи и усиления фотосигнала) зависит от клеточного гомеостаза и может происходить только при условии клеточной целостности.

Настоящие прямые экспериментальные доказательства правоты предложенных на рис. 4 и 5 схемах получены недавно в работах [95,96]. В работе [95] при помощи конфокальной микроскопии измеряли в шкале реального времени в единичных цельных клетках изменения митохондриального мембранного потенциала  $\Delta\psi$ , внутриклеточного  $\text{pH}$  ( $\text{pH}_i$ ), концентраций кальция и активных форм кислорода (АФК) после облучения лазерным светом 647 нм (те же параметры были указаны на рис. 5). Повышение  $\text{pH}_i$  достигало максимума ( $0,21 \pm 0,08$  ед.) через 6 мин после облучения, и вернулся к исходному значению через 15 мин. Облучение также вызывало осцилляцию внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (2 пика соответственно 100 и 240 с после облучения). Увеличение  $\Delta\psi$  достигало максимума (30% от исходного) через 2 мин. после облучения. Также было фиксировано увеличение концентрации АФК. Надо подчеркнуть два обстоятельства. Во-первых, в необлученных клетках не наблюдались никакие временные изменения этих параметров. Во-вторых, авторы наблюдали неравномерность откликов отдельных клеток (облучение проводилось в точно одинаковых условиях в одинаковой дозе и интенсивности), т.е. в популяции нашлись клетки, реагирующие на облучение меньшими амплитудами. Это экспериментальное наблюдение является подтверждением той схеме, что представлена на рис.6 и будет обсуждена ниже в п. 6. В работе [96] измерена активация 110 генов в фибробластах человека после облучения красным светом.

В последние годы был проведен цикл работ с целью модифицировать при помощи химикатов один из клеточных откликов на облучение, спектр действия которого был изображен на рис. 1В (увеличенная адгезия клеток к стеклу). Облученным клеткам добавляли химикаты [97-102], воздействующие на разных этапах предполагаемого каскада реакций клеточной сигнализации (рис.5). Среди этих химикатов были ингибиторы дыхательной цепи [97,101,102], доноры NO [99,102], ингибиторы ионных каналов в клеточной мембране [100-102], тиол-реактивные вещества [98], антиоксиданты [97], химикаты,

связанные с активацией фосфолипазы  $A_2$  [99]. Результаты этих экспериментов также подтверждают справедливость вывода о существовании каскада реакций передачи фотосигнала в клетке с такими этапами, указанными на рис.5. Надо подчеркнуть, что на самом деле эти каскады внутриклеточной сигнализации являются существенно более сложными.

Если фотоакцепторы и первичные реакции в дыхательной цепи являются одинаковыми (или схожими) (разделы 2,3), то возникает вопрос, как объясняется большое различие клеточных откликов. Объясняется это разнообразием путей клеточной сигнализации, в частности многообразными механизмами действия редокс чувствительных факторов транскрипции NF- $\kappa$ B и AP-1 [81,83]. Известно, что клеточный отклик определяется на уровне вторичных реакций (клеточная сигнализация), скорее всего на уровне транскрипции [82].

В тоже время в каскадах реакций клеточной сигнализации имеются реакции, свойственные всем путям передачи фотосигнала (например, изменение концентраций одно- и двухвалентных ионов (рис.5), среди которых особенно важную регулируемую роль играет  $Ca^{2+}$ ).

Надо отметить, что изучение механизмов клеточной сигнализации (было бы более правильно сказать внутриклеточной сигнализации) развивается в последние годы очень интенсивно, как и понимание о редокс-контроле клеточного метаболизма (например обзоры [80-83]). Можно надеяться, что эти знания помогут в будущем объяснить и пути редокс-регуляции клеточного метаболизма при помощи (лазерного) света, т.е. развивать идею, которая была предложена в далеком 1988 г. [39], когда про редокс регуляцию не говорили и редокс чувствительные факторы транскрипции не были известны.

## **5. Являются ли компоненты дыхательных цепей единственными фотоакцепторами в клетках?**

В данном обзоре клеточные механизмы низкоинтенсивной лазерной терапии рассматривались в основном на модели пролиферирующих клеток, культивируемых *in vitro*. В принципе, механизм редокс-регуляции работает и в случае других моделей. В разделе 2 уже упоминались возбудимые клетки, при облучении которых можно регистрировать ощутимый физиологический отклик [5,33-38]. Эти результаты имеют прямое отношение к механизмам низкоинтенсивной лазерной терапии, и не только на клеточном уровне. Также упоминалась стимуляция роста микроорганизмов, как про-

кариотических (*E. coli*), так и эукариотических (дрожжи) [10,11,29-32].

В каких-то случаях наряду с активизацией дыхательной цепи облучение может активизировать также и некоторые специализированные редокс цепи, способные контролировать параметры клеточного гомеостаза. К таким цепям относятся НАДФН-оксидаза в плазматической мембране фагоцитирующих клеток или NO-синтазы. Активация немитохондриального дыхательного взрыва в фагоцитирующих клетках лазерным излучением разных длин волн измерена для различных клеточных систем ([13], обзор [20]). Также появились данные об активации выделения NO в облученных макрофагах [94].

Иногда лазерное облучение способно вызывать только частичную активацию клеток, как это показано на модели бласттрансформации лимфоцитов ([обзор 20]). Полагают, что такая частичная активация лимфоцитов является их праймингом [103,68], а точнее редокс-праймингом [50].

При рассмотрении механизмов низкоинтенсивной лазерной терапии на уровне организма нельзя также забывать косвенную активацию клеток, т.е. активацию, не связанную с поглощением квантов в данной клетке, а воздействием на необлученные клетки вторичных мессенджеров (цитокинов, активных форм кислорода и азота и др.), выделенных облученными клетками.

За пределы тематики данного обзора выходит обсуждение механизмов такого распространенного метода лазерной биостимуляции как облучение крови. Хочется только отметить, что за последние годы получены данные о том, что механизм освобождения связанного NO может случиться не только в молекуле цитохром-с-оксидазы в митохондриях, как обсуждалось выше (рис.4), а также при облучении комплекса NO с хемоглобином [104-106].

## **6. Заключение**

Основные физические и/или химические изменения, вызванные светом в фотоакцепторных молекулах (например, в терминальных ферментах дыхательных цепей), сопровождаются каскадом биохимических реакций в клетке, которые не требуют дальнейшей активизации светом (цепи передачи и усиления фотосигнала или клеточная сигнализация). Эти реакции связаны с изменениями в параметрах клеточного гомеостаза. Ключевым среди них является изменение редокс-потенциала клетки: смещение в сторону более окисленного состояния связано со стимуляцией жизнедеятельности клетки, в сторону

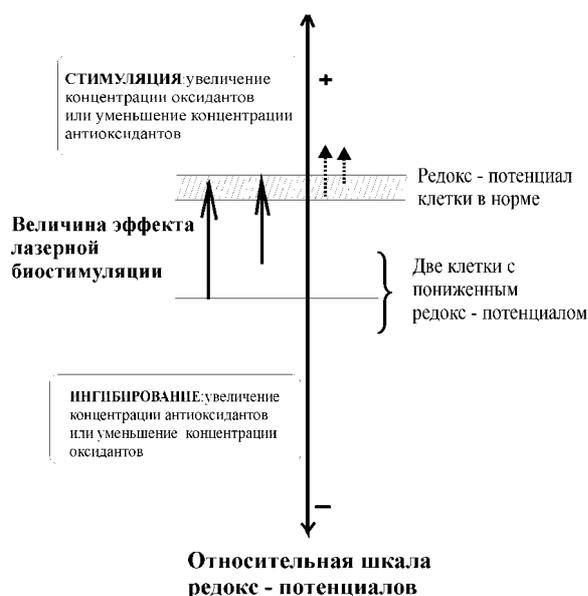


Рис. 6. Схема, объясняющая различную величину клеточных эффектов лазерной биостимуляции (или отсутствия таковых) в зависимости от редокс-потенциала клетки до облучения.

более восстановленного состояния — связано с ее подавлением (рис.6).

Рассмотренный механизм редокс-регуляции метаболизма клетки позволит объяснить некоторые противоречия эффектов низкоинтенсивной лазерной терапии. Это, во-первых, величина эффекта облучения. В литературе можно найти описание эффектов существенных и менее значимых, а также документировано полное их отсутствие на одной и той же модели исследования, при использовании одного и того же лазера. Сущность предлагаемого объяснения такого разнообразия состоит в том, что величина конечного эффекта зависит от изначального физиологического состояния облучаемого объекта, которое определяется его редокс-потенциалом (рис.6). Вследствие лазерного воздействия происходит нормализации редокс-потенциала клетки. Данная схема была предложена на основе экспериментов по модификации и модуляции световых эффектов, в которых редокс-потенциал клетки до облучения изменяли с помощью химических соединений или изменением концентрации кислорода (обзор [17]). Экспериментальные данные из работы [96], которые уже обсуждались выше при рассмотрении схемы на рис 5, подтверждают этот вывод. Хорошо известно, что клеточные популяции не являются гомогенными по параметрам клеточного гомеостаза (pH, редокс потенциал и др.)

Эффект облучения является тем более выраженным, чем больше редокс потенциал клетки

отодвинут в более восстановленную сторону. Этим может быть объяснен особый успех лазерного лечения патологий, характеризующихся низкими значениями pH, и редокс-потенциала клеток (например, долго не заживающие раны различной этиологии) [19]. Более детальное обсуждение этого вопроса можно найти в [21].

Предполагаемый механизм регуляции клеточного метаболизма через дыхательную цепь также объясняет универсальность наблюдаемых эффектов лазерной стимуляции (“от бактерий до человека”). Именно эта универсальность долгие годы вызывала недоверие к лечебному действию низкоинтенсивного лазерного облучения.

## Литературы

1. Tunér J., Hode L. *Laser Therapy* (Grängesberg, Sweden Prima Books AB, 2002).
2. Karu T. *IEEE J. Quantum Electron.*, QE-23, 1703 (1987).
3. Karu T. In: *Biomedical Photonics Handbook*, Tuan Vo-Dinh, Ed. (Boca Raton, CRC Press, Ch. 48, pp. 48-1–48-25, 2003).
4. Hartman K.M. In: *Biophysics*. Hoppe W., Lohmann W., Marke H. Ziegler H., Eds. (Heidelberg, Springer-Verlag, 115, 1983).
5. Arvanitaki A., Chalazonitis N. *Arch. Sci. Physiol.* 1, 385 (1947).
6. Векшин Н.А. *Молекулярная биология*, 25, 54 (1991).
7. Кару Т.И., Календо Г.С., Летохов В.С., Лобко В.В. *Квантовая электроника*, 9, 1761 (1982).
8. Кару Т.И., Календо Г.С., Летохов В.С., Лобко В.В. *Квантовая электроника*, 10, 1771 (1983).
9. Лобко В.В., Кару Т.И., Летохов В.С. *Биофизика*, 30, 366 (1985).
10. Федосеева Г.Е., Кару Т.И., Ляпунова Т.С. Помощникова М.Н., Мейсель М.Н. *Микробиология*, 56, 792 (1987).
11. Karu T.I., Tiphlova O.A., Letokhov V.S., Lobko V.V. *Il Nuovo Cimento D*, 2, 1138 (1983).
12. Гамалея Н.Ф., Шишко Е.Д., Янишь Г.Б. *Доклады АН СССР*, 273, 227 (1983).
13. Karu T., Andreichuk T., Ryabykh T. *Lasers Surg. Med.*, 13, 453 (1993).
14. Karu T.I., Kalendo G.S., Letokhov V.S., Lobko V.V. *Il Nuovo Cimento D*, 3, 309 (1984).
15. Karu T.I., Kalendo G.S., Letokhov V.S., Lobko V.V. *Il Nuovo Cimento D*, 3, 319 (1984).
16. Кару Т.И., Пятибрат Л.В., Есеналиев Р.О. *Бюлл. эксперим. биол. мед.*, 115, 622 (1993).
17. Karu T.I. *Photobiology of Low-Power Laser Therapy* (London, Harwood Acad. Publ., 1989).
18. Karu T.I. *Health Physics*, 56, 691 (1989).
19. Кару Т.И. *Доклады АН СССР*, 291, 1245 (1986).
20. Karu T. *The Science of Low Power Laser Therapy* (London: Gordon and Breach, 1998).
21. Karu T. I. *Photochem. Photobiol.: B. Biology*, 49, 1 (1999).

22. Кару Т.Й., Афанасьева Н.И. *Доклады АН*, 342, 693 (1995).
23. Babcock G.T., Wikstrom M. *Nature*, 356, 302 (1992).
24. Verkhovsky M.I., Morgan J.E., Wikstrom M. *Proc. Acad. Sci. USA*, 93, 12235 (1996).
25. Nicholls P., Elliot W.B. In: *Iron Biochemistry and Medicine*. Jacobs A., Worwood M., Eds. (N.Y., Academic Press, 221, 1974).
26. van Breugel H.H.F.I., Dop Bar P.R. *Lasers Surg. Med.*, 12, 528 (1992).
27. Кару Т.Й., Афанасьева Н.И. Кольяков С.Ф., Пятибрат Л.В. *Доклады АН*, 360, 267 (1998).
28. Karu T. I., Afanasyeva N.I., Kolyakov S.F., Pyatibrat L.V., Welser L. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 7, 982 (2001).
29. Tiphlova O.A., Karu T.I. *Photochem. Photobiol.* 48, 467 (1988).
30. Tiphlova O.A., Karu T.I. *CRC Critical Rev. Biomed. Eng.* 18, 387 (1991).
31. Karu T. *Lasers Life Sci.* 7, 1 (1996).
32. Афанасьева Н.И., Кару Т.Й., Тифлова О.А. *Доклады АН*, 345, 404 (1995).
33. Berns M.W., Salet C. *Int. Rev. Cytol.* 33, 131 (1972).
34. Людговская Р.Г., Бурмистров Ю.М. *Доклады АН СССР*, 230, 1462 (1976).
35. Salet C. Moreno G., Vinzes F. *Exp. Cell Res.* 120, 25 (1979).
36. Узденский А.Б. *Цитология*. 24, 1119 (1982).
37. Balaban P., Esenaliev R., Karu T., Kutomkina E., Letokhov V., Orayevsky A., Ovcharenko N. *Lasers Surg. Med.* 12, 329 (1992).
38. Karu T., Kurchikov A., Letokhov V., Mokh V. *Lasers Life Sci.*, 7, 35 (1996).
39. Karu T. *Lasers Life Sci.* 2, 53 (1988).
40. Marcus R.A. Sutin N. *Biochem. Biophys. Acta*, 811, 265 (1985).
41. Jöbssis-vander Vliet F.F. *J. Biomed. Optics*, 4, 392 (1999).
42. Villani G. Attordi G. *Free Radic. Biol. Med.*, 29, 202 (2000).
43. Dube A., Gupta P.K., Bharti S. *Lasers Life Sci.*, 7, 173 (1997).
44. Кольяков С.Ф., Пятибрат Л.В., Михайлов Е.Л., Компанец О.Н., Кару Т.Й. *Доклады АН*, 377, 824 (2001).
45. Karu T.I., Kolyakov S.F., Pyatibrat L.V., Mikhailov E.L., Kompanets O.N. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 7, 976 (2001).
46. Мантейфель В.М., Бакеева Л.Е., Кару Т.Й. *Доклады АН*, 366, 702 (1999).
47. Бакеева Л.Е., Мантейфель В.М., Кару Т.Й. *Доклады АН*, 377, 260 (2001).
48. Brown G.C. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1411, 351 (1999).
49. Hothersall J.S., Cunha F.Q., Neild G.H., Norohna-Dutra A. *Biochem. J.*, 322, 477 (1997).
50. Karu T. In: *Lasers in Medicine and Dentistry*, Simunovic Z., Ed. (Rieka, Vitagraf, 97, 2000).
51. Letokhov V.S. *Il Nuovo Cimento D*, 13, 939 (1991).
52. Karu T. I., Tiphlova O. A., Matveyets Yu. A., Yartsev A.P., Letokhov V.S. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 10, 339 (1991).
53. Karu T. In: *Laser Applications in Medicine and Surgery*. Galletti G., Bolognani L., Ussia G., Eds. (Bologna, Monduzzi Editore, 253, 1992).
54. Letokhov V.S. In: *Biomedical Optical Instrumentation and Laser-Assisted Biochemistry*. Verga-Scheggi A.M., Martellucci S., Chester A.N., Pratesi R., Eds. (Dordrecht, Kluwer Acad. Publ, 3, 1996).
55. Forman H.J., Boveris A. In: *Free Radicals in Biology*. Pryor A., Ed. (N. Y., Acad. Press, v.5, 65, 1982).
56. Dalton T.P., Schertzer H.G., Puga A. *Annual Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36, 67 (1999).
57. Kaneko M., Singal P.K., Dhalla N.S. *Basic Res. Cardiol.* 85, 45 (1990).
58. Murphy J.G., Smith T.W., Marsh J.D. *Amer. J. Physiol.* 254, H1133 (1988).
59. Soboll S., Link T.A., von Jagow G. *pH Homeostasis. Mechanisms and Control*. Hdussinger D., Ed. (London, Acad.Press, 97, 1988).
60. Gamaley I.A., Klybin I.V. *Internat. Rev. Cytology*, 188, 203 (1999).
61. Callaghan A., Riordan C., Gilmore W.S., Meintrye I.A., Allen J.A., Hannigan B.H. *Lasers Surg. Med.* 19, 201 (1996).
62. Cohen N., Lubart R., Rubinstein S. Breitbart H. *Photochem. Photobiol.*, 68, 404 (1998).
63. Giese A.C. In: *Lasers in Biology and Medicine*. Hillenkamp F., Pratesi R., Sacchi C., Eds. (New York, Plenum Press, 299, 1980).
64. Karu T.I., Kalendo G.S., Letokhov V.S. *Lett. Il Nuovo Cimento*, 32, 55 (1981).
65. Murrell A.C., Francis M.J.O., Bromley L. *Biochem. J.* 265, 659 (1990).
66. Захаров С.Д., Иванов А.В. *Квантовая электроника*, 29, 192 (1999).
67. Friedman H., Lubart R., Laulich J. Rochkind S. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 11, 87 (1991).
68. Klebanov G.I., Strashkevich I.A., Chivchuk T.V., Vladimirov Yu.A. *Membr. Cell Biol.*, 12, 339 (1998).
69. Karu T.I., Kutomkina E.V., Lyapunova T.S., Pomoshnikova N.A. *Lasers Life Sci.*, 5, 259 (1993).
70. Karu T., Tiphlova O., Esenaliev R., Letokhov V.S. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.*, 24, 155 (1994).
71. Mailer K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170, 59 (1990).
72. Krebs H.K., Veech R.L. In: *Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases*. Sund H., Ed. (Berlin, Springer, 413 1970).
73. Brown G.C. *Biochem. J.* 284, 171 (1992).
74. Chance B. *Federat. Proc. Fed. Amer. Soc. Exptl. Biol.*, 16, 671 (1957).
75. Khan S., O'Brien P.J. *Biochem. Biophys. Acta*, 1269, 153 (1995).
76. Boynton H.L., Whitfield J.F. In: *Advances in Cyclic Nucleotide Research*. Greengard P., Robinson G.A., Eds. (New York, Raven Press, 195, 1983).
77. Cone C.D. *J. Theor. Biol.* 30, 151 (1971).
78. Hesketh T.R., Moore J.R., Morris J.D.H., Taylor M.V., Rogers J., Smith G.A., Metcalfe J.C. *Nature*. 313, 481 (1985).
79. Kaplan J.G. *Annual Rev. Physiol.*, 40, 19 (1978).

80. Sun Y., Oberley L.W. *Free Rad. Biol. Med.*, 21, 335 (1996).
81. Gius D., Boreto A., Shah S. Curry H.A. *Toxicol. Letters*, 106, 93(1999).
82. Kamata H., Manabe T., Kakuta J., Oka S., Hirata H. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 973, 419 (2002).
83. Wang T., Zhang X., Li J.J. *Int. Immunopharmacol.* 2, 1509 (2002).
84. Herbert K.E., Bhusate L.L., Scott D.L. Damantopoulos S.D., Perrett D. *Lasers Life Sci.* 3, 37 (1989).
85. Hilf R., Murant R.S., Narayanan U., Gibson S.L. *Cancer Res.*, 46, 211 (1986).
86. Karu T., Pyatibrat L., Kalendo G. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 27, 219 (1995).
87. Мороз А.М. *Укр. биохим. журн.*, 55, 647 (1983).
88. Kudoh Ch., Inomata K., Okajama K., Motegi M., Ohshiro T. *Laser Therapy*, 1, 63 (1989).
89. Karu T., Smolyaninova N., Zelenin A. *Lasers Life Sci.*, 4, 167 (1991).
90. Loevschall H., Scharft O.B., Foder B., Arenholdt-Bindslew D. *Laser Life Sci.*, 8, 127 (1998).
91. Chopp H., Chen Q., Dereski M.O., Hetzel F.W. *Photochem. Photobiol.* 52, 1033 (1990).
92. Quickenden T.R., Daniels L.L., Byrne L.T. In: *Proc. SPIE*, 2391, 535 (1995).
93. Кару Т.И., Лобко В.В., Лукпанова Г.Г., Пархоменко И.М., Чирков Ю.Ю. *Доклады АН СССР*, 281, 1242 (1985).
94. Naim J.O., Ippolito W., Yu K.M.L., Gowan M., Lanzafame R.J. *Lasers Surg. Med.*, Suppl. 8, 7 (1996).
95. Alexandratou E., Yova D., Handris P., Kletsas D., Loukas S., *Photochem. Photobiol. Sci.*, 1, 547 (2002).
96. Zhang Y., Song S., Fong C.C., Tsang C.H., Yang Z., Yang M. *J. Invest. Dermatol.*, 120, 849 (2003).
97. Karu T.I., Pyatibrat L.V., Kalendo G.S. *Lasers Surg. Med.*, 28, 227 (2001).
98. Karu T.I., Pyatibrat L.V., Kalendo G.S. *Laser Therapy*, 11, 177 (2001).
99. Karu T.I., Pyatibrat L.V., Kalendo G.S. *Toxicology Letters*, 121, 57 (2001).
100. Karu T.I., Pyatibrat L.V., Kalendo G.S. *Lasers Surg. Med.*, 29, 274 (2001).
101. Karu T.I., Pyatibrat L.V., Kalendo G.S. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 211 (2004).
102. Karu T.I., Pyatibrat L.V., Afanasyeva N.I. *Photochem. Photobiol.*, 80, 366 (2004).
103. Schepetkin I.A., Udut V.V., Karpov A.B. *J. de Physique IV*, с4, 219 (1994).
104. Борисенко Г.Г., Постнов С.С., Казаринов К.Д., Осипов А.Н., Владимиров Ю.А., *Биол. Мембр.*, 19, 378 (2002).
105. Kobayashi K., Kobayashi Y., Haseda-Okumura A., Iimori S., Nagai K., Nakashima H., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 279, H1141 (2000).
106. Joshi M.S., Ferguson T.B., Han T.H., Hyde D.R., Liao J.C., Rassaf T., Bryan N., Feelisch M., Lancaster J.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 10341 (2002).