

ЭНДОГЕННЫЕ ФОТОАКЦЕПТОРЫ, СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИЕ ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ

В. Ю. Плавский*, Л. Г. Плавская, О. Н. Дудинова, А. И. Третьякова, А. В. Микулич,
А. Н. Собчук, Р. К. Нагорный, Т. С. Ананич, А. Д. Свечко, С. В. Якимчук, И. А. Леусенко

УДК 535.37:(547.979.733+667.211.43)

<https://doi.org/10.47612/0514-7506-2023-90-2-239-252>

Институт физики НАН Беларуси, Минск, Беларусь; e-mail: v.plavskii@ifanbel.bas-net.by

(Поступила 15 февраля 2023)

Выполнены сравнительные исследования влияния излучения лазерных и светодиодных источников с длиной волны $\lambda = 405$ и 445 нм на метаболическую активность культивируемых соматических клеток. Более выраженный ингибирующий эффект наблюдается при воздействии света с $\lambda = 405$ нм. Отмечается отсутствие принципиальных различий в действии монохроматического и квазимонохроматического света. Показано, что фотобиологический эффект обусловлен фотохимическими процессами с участием различных активных форм кислорода, вклад которых в эффекты инактивации клеток зависит от времени после прекращения облучения. В спектрах флуоресценции суспензии живых клеток наряду с флавиновой составляющей впервые зарегистрированы порфириновые компоненты. На основании сопоставления абсорбционных характеристик флавиновых и порфириновых сенситизаторов, а также данных хемилюминесцентного анализа и биологического действия излучения с $\lambda = 405$ и 445 нм сделан вывод, что определяющий вклад в образование синглетного кислорода в клетках при воздействии излучения с $\lambda = 405$ нм вносят эндогенные порфирины, характеризующиеся наиболее интенсивным поглощением в данной области. Вклад флавинов более выражен при действии излучения с $\lambda = 445$ нм, соответствующего максимуму в их спектре поглощения и минимальному поглощению эндогенных порфиринов.

Ключевые слова: эндогенный фотоакцептор, порфирин, флавин, соматическая клетка, фотосенсибилизатор, лазер, светодиод, флуоресценция, хемилюминесценция.

Comparative studies of the effect of radiation from laser and LED sources with the wavelength of $\lambda = 405$ and 445 nm on the metabolic activity of cultured somatic cells were performed. A more pronounced inhibitory effect is observed when exposed to light with $\lambda = 405$ nm. The absence of fundamental differences in the action of monochromatic and quasi-monochromatic light is noted. It is shown that the photobiological effect is due to photochemical processes involving various reactive oxygen species, whose contribution to the effects of cell inactivation depends on the time after the termination of irradiation. Porphyrin components were registered for the first time in the fluorescence spectra of the suspension of living cells along with the flavin component. Based on a comparison of the absorption characteristics of flavin and porphyrin sensitizers, as well as data from chemiluminescence analysis and the biological effects of radiation with $\lambda = 405$ and 445 nm, it is concluded that the determining contribution to the formation of singlet oxygen in cells when exposed to radiation with $\lambda = 405$ nm is made by endogenous porphyrins, characterized by the most intense absorption in this area. The contribution of flavins is more pronounced under the action of radiation with $\lambda = 445$ nm, corresponding to the maximum in their absorption spectrum and the minimum absorption of endogenous porphyrins.

Keywords: endogenous photoacceptor, porphyrin, flavin, somatic cell, photosensitizer, laser, LED, fluorescence, chemiluminescence.

ENDOGENOUS PHOTOACCEPTORS SENSITIZING PHOTOBIOLOGICAL REACTIONS IN SOMATIC CELLS

V. Y. Plavskii*, L. G. Plavskaya, O. N. Dudinova, A. I. Tretyakova, A. V. Mikulich, A. N. Sobchuk, R. K. Nahorny, T. S. Ananich, A. D. Svechko, S. V. Yakimchuk, I. A. Leusenko (B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus; e-mail: v.plavskii@ifanbel.bas-net.by)

Введение. Несмотря на широкое использование оптических технологий в медицине [1—4] и расширяющееся применение света в биотехнологиях [5—9], фотофизические и фотохимические механизмы, лежащие в основе его биологической активности, по-прежнему остаются предметом острых дискуссий [10—14]. Одна из доминирующих гипотез о механизме фотофизических процессов, определяющих регуляторное действие света на клетки различных типов, основана на его способности изменять функциональную активность фермента цепи переноса электронов цитохром с оксидазы (ССО) [11, 15, 16], характеризующегося наличием выраженных полос поглощения в видимой и ближней инфракрасной (ИК) областях спектра. В пользу возможной роли ССО в реализации эффектов фотобиомодуляции свидетельствуют данные [11, 15], указывающие на схожесть ее спектра поглощения и спектра биологического действия света на клетки различных типов. Однако в последние годы появились работы [14, 17, 18], ставящие под сомнение определяющую роль ССО как молекулы-акцептора, ответственного за регуляторное действие света. Один из главных тезисов состоит в том, что воздействие лазерного излучения на клеточные линии, в которых полностью отсутствует ССО, оказывает выраженный стимулирующий эффект на их пролиферацию [17]. Кроме того, воздействие лазерного излучения видимой и ближней ИК-областей спектра на водные растворы очищенных препаратов указанного фермента не привело к изменению его функциональных характеристик [18]. Наконец, по мнению авторов [14], спектр биологического действия света [15] очень слабо соответствует профилю поглощения ССО (прежде всего, соотношению интенсивностей поглощения в синей и ближней ИК-области спектра). Приведенные результаты стимулировали поиск альтернативных, исключающих “цитохромную” гипотезу механизмов для объяснения эффектов фотобиомодуляции [12—14].

Другая широко распространенная гипотеза основана на участии активных форм кислорода (АФК), образующихся в клетке под действием излучения, в изменении ее редокс-состояния, влияющего на метаболическую активность, пролиферацию и гомеостаз [11, 16, 19—23]. При этом один из самых дискутируемых вопросов состоит в выяснении типа эндогенных молекул-акцепторов, ответственных за сенсibilизированное образование АФК. Фактически имеются лишь некоторые подтверждения участия флавиновых сенсibilизаторов в светоиндуцированной генерации АФК в сперматозоидах и культивируемых клетках сердца [19]. Однако спектр действия оптического излучения на культивируемые клетки, построенный в [24], не соответствует спектру поглощения флавинов, что свидетельствует о том, что в эффектах сенсibilизации наряду с флавинами важную роль играют другие эндогенные соединения. В работах [22, 23], выполненных при воздействии лазерного излучения на сперматозоиды осетровых рыб, получены результаты, указывающие, что в эффектах сенсibilизации важную роль могут играть не только флавины, но и эндогенные безметалльные порфирины. Показано, что в зависимости от энергетической дозы (плотности мощности и времени воздействия), а следовательно, от уровня АФК, образующихся в спермиях, световое воздействие может как стимулировать, так и ингибировать функциональные характеристики сперматозоидов за счет изменения их окислительно-восстановительного статуса [22, 23].

В настоящее время наиболее изученными акцепторами оптического излучения являются фотосенсibilизаторы, локализованные в микроорганизмах [25—27]. Интерес к данному типу клеток обусловлен прежде всего выявленной способностью синего света в отсутствие внешних фотосенсibilизаторов инактивировать вегетативные бактерии, бактериальные эндоспores, грибы, дрожжи, а при определенных условиях воздействия — вирусы. Деструктивное действие света в отношении указанных микроорганизмов обусловлено эндогенными флавинами (флавиномононуклеотидом, ФМН; флавинадениндинуклеотидом, ФАД), безметалльными порфиринами, а также цинковым комплексом протопорфирина IX [25—27]. Ввиду очень низкой концентрации эндогенных порфиринов в микробных клетках, как правило, их изучение и спектрально-флуоресцентная идентификация осуществлялись с использованием экстрагирования растворителями.

Представленный обзор работ по изучению типов эндогенных соединений, выступающих в качестве акцепторов оптического излучения и определяющих результат действия света на функциональные характеристики животных и микробных клеток, показывает, что данная проблема далека от своего решения, причем наименее изученными оказались фотоакцепторы, локализованные в соматических клетках, т. е. в клетках, составляющих тело (сому) многоклеточных организмов.

Цель настоящей работы — сравнительное изучение эффективности влияния излучения лазерных и светодиодных источников близких длин волн синей области спектра на метаболическую активность культивируемых соматических клеток; выяснение роли АФК и эндогенных фотосенсibilизаторов порфириновой и флавиновой природы в реализации регуляторного действия оптического излу-

чения на клетки опухолевой и неопухолевой природы; выяснение степени общности полученных выводов в отношении других типов клеток (сперматозоидов животных различного видового происхождения, эритроцитов крови, микробных клеток).

Материалы и методы. *Культура клеток.* В качестве объектов исследования выбраны клетки эпителиоидной карциномы шейки матки HeLa, а также нетрансформированные (неопухолевые) клетки почки зеленой африканской марышки BGM. Клетки получены в Республиканском научно-практическом центре эпидемиологии и микробиологии Министерства здравоохранения Республики Беларусь (г. Минск) в виде суспензии в питательной среде Игла Дульбекко DMEM с 5 % эмбриональной сыворотки. Монослои клеток выращивали в одноразовых чашках Петри диаметром 35 мм на этой же питательной среде при 37 °C и 5 %-ным содержанием CO₂ в инкубаторе. В каждую чашку вносили по 3 мл ростовой среды с клетками. Посевная концентрация клеток 130000 мл⁻¹. Через 48 ч после посева монослои клеток подвергали воздействию синего света.

Воздействие оптическим излучением на клеточные культуры. Воздействие светом синей области спектра на клетки в культуре осуществляли, используя светодиодные источники с длиной волны в максимуме полосы испускания $\lambda_{\text{max}} = 405$ нм (ширина спектра на уровне половинной амплитуды FWHM = 17 нм) и $\lambda_{\text{max}} = 445$ нм (FWHM = 18 нм), а также полупроводниковые GaN-лазеры с теми же длинами волн. При этом спектр генерации полупроводниковых лазеров сформирован узкими линиями с общей шириной спектра ~1.5 нм [28]. Все источники работали в непрерывном режиме. Нормированные спектры испускания светодиодов представлены на рис. 1.

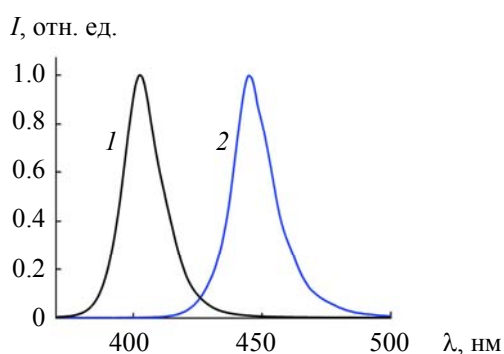


Рис. 1. Нормированные спектры испускания светодиодов, используемых для воздействия на клетки в культуре с $\lambda_{\text{max}} = 405$ (1) и 445 нм (2)

Для получения более однородного по интенсивности светового пятна на поверхности монослоев клеток излучение лазеров вводилось в моноволоконный световод с диаметром светопроводящей сердцевины 125 мкм. Облучение клеток проводили снизу, через дно чашек Петри светом, расфокусированным на всю поверхность дна. При этом излучение светодиодного и лазерного источников было неполяризованным. Плотность мощности оптического излучения на уровне поверхности дна чашки Петри могла изменяться в диапазоне $I = 5\text{—}100$ мВт/см² и контролировалась с помощью измерителя PM100D с фотодиодным датчиком S121C (Thorlabs GmbH, Германия). Время облучения клеток изменяли в диапазоне 1—10 мин. После облучения клетки помещали на 24 ч в CO₂-инкубатор, в котором обеспечивалось поддержание температуры 37 °C и 5 %-ное содержание CO₂. Аналогичные манипуляции (за исключением облучения) выполняли с контрольными монослоями клеток.

Влияние света на метаболическую активность клеток. Оценку биологического действия оптического излучения проводили фотокolorиметрически с помощью МТТ-теста. Данный тест основан на способности дегидрогеназ живых метаболически активных клеток превращать бледно-желтый водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ, Applichem, Германия) в голубые кристаллы формазана, не растворимые в воде [29]. Нежизнеспособные мертвые клетки такой способностью не обладают. Раствор МТТ готовили по стандартной методике: 5 мг МТТ растворяли в 1 мл H₂O (концентрированный раствор). Спустя 21 ч инкубации клеток после облучения ростовую среду сливали и заливали новую без сыворотки, содержащую 50 мкл концентрированного МТТ на 1 мл среды. С новой средой клетки инкубировали в течение 3 ч при 37 °C и 5 %-ном содержании CO₂ в инкубаторе. После 3 ч инкубации удаляли супернатант и оставляли монослой клеток в чашках Петри на ночь для высыхания. Затем в каждую чашку Петри добавляли 1 мл диметилсуль-

фоксида (ДМСО, Sigma-Aldrich) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. При анализе метаболической активности клеток контролировали оптическую плотность экстракта на $\lambda = 570$ нм. Количественной мерой метаболической активности клеток после воздействия света по сравнению с контрольными образцами служит величина $\gamma = (D_{it}/D_c) \cdot 100\%$, где D_{it} и D_c — оптическая плотность раствора формазана из опытных (облученных) и контрольных чашек Петри.

Участие АФК в фотохимических процессах, определяющих метаболическую активность клеток при воздействии синего света. Для выяснения возможного участия АФК в регуляторном действии оптического излучения за 10 мин до облучения в культуру клеток вносили 10 мМ азида натрия (тушителя синглетного кислорода) производства Sigma-Aldrich (США) или 10 мМ пирувата натрия (тушителя пероксида водорода) того же производителя. Соответствующие добавки также вносили в контрольные (необлученные) клеточные культуры. Сравнение величин фотобиологических эффектов в отсутствие и при наличии тушителей АФК проводили при постоянной энергетической дозе ($D = 15$ Дж/см², плотность мощности $I = 50$ мВт/см², время воздействия $t = 5$ мин) излучения светодиодных источников с $\lambda_{\text{max}} = 405$ и 445 нм.

Хемилюминесцентный метод контроля образования АФК при воздействии оптического излучения. Для выяснения вклада АФК в фотобиологические эффекты, инициируемые воздействием на клетки и на питательную среду синего света, использованы хемилюминесцентные методы. Как известно [30], метод хемилюминесценции (ХЛ) является достаточно чувствительным, поскольку позволяет одновременно (суммарно) регистрировать различные АФК (включая супероксид-анионрадикал $O_2^{\cdot-}$, перекись водорода H_2O_2 и гидроксильный радикал OH^{\cdot}), локализованные как во внутриклеточном, так и во внеклеточном пространстве. Измерения параметров свечения клеток осуществляли на хемилюминометре Lum 5773 (ДИСофт, Россия), работающем в режиме счета фотонов; спектральная чувствительность 300—650 нм. Регистрацию и обработку сигналов ХЛ проводили с помощью специализированного программного обеспечения PowerGraph 3.x Professional.

Для исследования влияния излучения на ХЛ клеток использовали их суспензию концентрацией $(2.5\text{—}8.0) \cdot 10^6$ мл⁻¹. Облучению подвергалось 200 мкл суспензии в стеклянных цилиндрических кюветах внутренним диаметром 10 мм с плоским дном. Облучение суспензии проводили через дно кюветы излучением с $\lambda = 405$ или 445 нм. Время воздействия 5 мин, плотность мощности излучения на уровне поверхности дна кюветы $I = 50$ или 100 мВт/см². После прекращения облучения суспензию немедленно переносили в кювету хемилюминометра. Время от прекращения облучения суспензии до начала регистрации сигнала ХЛ строго контролировалось и составляло 24 с. Аналогичные манипуляции (за исключением облучения) проводили и с контрольными образцами суспензии. Измерения ХЛ контрольных (необлученных) и опытных образцов суспензий клеток чередовались в произвольном порядке. ХЛ (в отн. ед.) измеряли люминиметром при 22 °С в течение 5 мин после начала регистрации.

Для выяснения типа АФК, участвующих в фотохимических процессах в клетках, инициированных воздействием излучения синей области спектра, к суспензии клеток за 10 мин до их облучения вносили 10 мкл одного из специфических тушителей АФК: азида натрия (тушителя синглетного кислорода) или пирувата натрия (тушителя перекиси водорода). Конечная концентрация в суспензии клеток азида и пирувата 10 мМ. Для учета разбавления от добавок тушителей в образцы суспензий клеток, не содержащих тушителей АФК, вносили по 10 мкл физраствора.

Измерения спектрально-флуоресцентных характеристик клеток и их экстрактов. Как известно [22, 23, 26], основная масса эндогенных фотосенсибилизаторов, способных генерировать АФК, являются флуоресцирующими соединениями. По этой причине исследование спектров флуоресценции и возбуждения флуоресценции может дать определенную информацию о типе и абсорбционных характеристиках возможных молекул-акцепторов, определяющих эффекты фотобиомодуляции. Для выяснения типа эндогенных флуорофоров, вносящих вклад в сенсibilизированное образование АФК в клетках, исследовались спектры аутофлуоресценции и возбуждения флуоресценции как живых клеток, так и их экстрактов. Необходимость экстрагирования из клеток молекул-акцепторов оптического излучения обусловлена очень слабой флуоресценцией культивируемых клеток при возбуждении в синей области спектра.

Для концентрирования молекул-фотоакцепторов, локализованных в клетках, в качестве экстрагентов использован ацетон (Sigma Aldrich). Процедуру осуществляли следующим образом: 5 мл суспензии клеток в питательной среде концентрацией $1 \cdot 10^6$ мл⁻¹ центрифугировали в течение 5 мин при 2500 об./мин. После удаления супернатанта в пробирку вносили 5 мл физраствора и центрифугировали содержимое 5 мин при 2500 об./мин. После удаления надосадочной жидкости процедуру от-

мывки клеток физраствором повторяли еще два раза, каждый раз удаляя супернатант. Затем в пробирку добавляли 3 мл ацетона. Пробирку центрифугировали в течение 30 мин при 6000 об./мин. После этого супернатант использовался для исследования спектрально-флуоресцентных характеристик.

Идентификация флуорофоров, экстрагированных из клеток, проведена сравнением их спектрально-флуоресцентных характеристик с соответствующими спектрами химически чистых препаратов (флавиномононуклеотида, FMN, Sigma-Aldrich, Inc., уропорфирина III дигидрохлорида, протопорфирина IX динатриевой соли, копропорфирина III дигидрохлорида, Frontier Scientific).

Спектры поглощения зарегистрированы на спектрофотометре Cary-500 Scan UV-Vis-NIR (Varian, США, Австралия), спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции — на спектрофлуориметре Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon, Inc., Франция), использовались стандартные кварцевые кюветы размером 10×10×40 мм, а также специальные кюветы с длиной оптического пути 4×4 мм. Ширина щелей монохроматоров 5 нм.

Статистический анализ проведен с использованием программного обеспечения Statistical Analysis System (SAS Enterprise Guide, версия 7.1, SAS Inst. Inc.). Данные экспериментального исследования проверены на нормальное распределение (критерий Шапиро-Уилка) с последующим попарным сравнением с использованием *t*-критерия Стьюдента. Все данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Значение $p < 0.05$ выбрано для обозначения статистической значимости. Результаты получены из трех экспериментов.

Результаты и их обсуждение. Влияние лазерных и светодиодных источников синей области спектра на метаболическую активность клеток. Воздействие на монослой соматических клеток BGM как монохроматического лазерного излучения, так и квазимонохроматического излучения светодиодных источников синей области спектра с $\lambda = 405$ или 445 нм приводит к изменению их метаболической активности. Зависимости метаболической активности клеток от времени воздействия (энергетической дозы) при плотности мощности светового потока $I = 10$ мВт/см² представлены на рис. 2. Видно, что при действии излучения с $\lambda = 445$ нм (рис. 2, б) по мере увеличения энергетической дозы метаболическая активность снижается по сравнению с контрольными необлученными клетками. Другая закономерность прослеживается при действии света с $\lambda = 405$ нм (рис. 2, а). В области низких энергетических доз регистрируется выраженное стимулирующее дозозависимое действие света на метаболическую активность. Максимальный стимулирующий эффект $\gamma = 117 \pm 4.4\%$ (превышение над контролем $17 \pm 4.4\%$) наблюдается при дозе лазерного излучения $D = 0.45$ Дж/см². Несколько ниже оказался стимулирующий эффект, инициируемый излучением светодиодного источника той же длины волны: при $D = 0.45$ Дж/см² превышение над контролем $10 \pm 4.2\%$. По мере увеличения дозы стимулирующее действие света с $\lambda = 405$ нм снижается, и при $D > 0.9$ Дж/см² проявляется ингибирующее действие света. При дозе $D = 6.0$ Дж/см² излучения с $\lambda = 405$ нм фотобиологический эффект составляет $\gamma = 62 \pm 4.0\%$ при воздействии лазерного излучения и $\gamma = 63 \pm 4.1\%$ при воздействии светодиодного источника. Для сравнения отметим, что при облучении клеток светом с $\lambda = 445$ нм при энергетической дозе $D = 6.0$ Дж/см² фотобиологический эффект $\gamma = 85 \pm 3.8\%$ при воздействии лазерного излучения и $\gamma = 82 \pm 4.0\%$ при воздействии светодиодного источника.

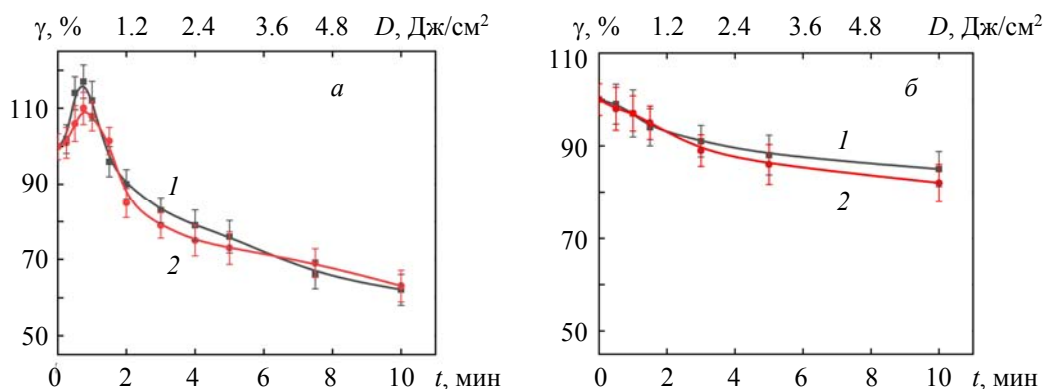


Рис. 2. Изменение метаболической активности γ клеток BGM при воздействии излучения лазерных (1) и светодиодных (2) источников с $\lambda = 405$ (а) и 445 нм (б) плотностью мощности $I = 10$ мВт/см²

Из представленных данных следует два вывода: изменения метаболической активности клеток вызывает как низкоинтенсивное монохроматическое излучение лазерного источника, так и квазимонохроматическое излучение светодиода и принципиальных отличий в их биологическом действии не наблюдается; излучение с $\lambda = 405$ нм оказывает более выраженное ингибирующее действие, чем излучение с $\lambda = 445$ нм при энергетических дозах $D > 1.2$ Дж/см².

С учетом данных [31, 32] о том, что реакция нормальных (нетрансформированных) и опухолевых клеток на воздействие излучения может существенно различаться, исследовано влияние синего света на опухолевые клетки. Дозовые зависимости сравнительного действия лазерного излучения с $\lambda = 405$ и 445 нм плотностью мощности $I = 25$ мВт/см² на метаболическую активность клеток эпителиоидной карциномы шейки матки HeLa представлены на рис. 3. Видно, что метаболическая активность клеток снижается по мере увеличения энергетической дозы воздействующего излучения. Однако, как и при действии излучения на клетки неопухолевой природы BGM, скорость фотоинактивации клеток HeLa излучением с $\lambda = 405$ нм (кривая 1) достоверно выше, чем при воздействии излучения с $\lambda = 445$ нм (кривая 2).

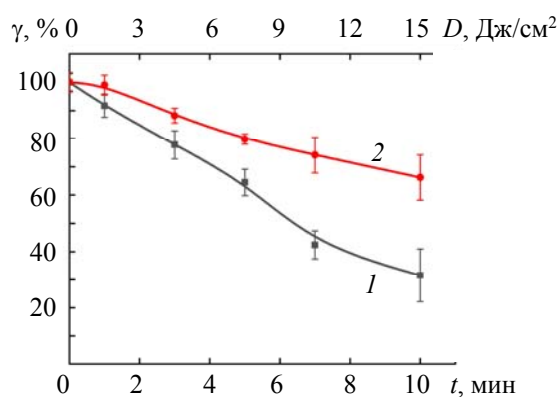


Рис. 3. Изменение метаболической активности клеток HeLa при воздействии лазерным излучением с $\lambda = 405$ (1) и 445 нм (2), плотностью мощности $I = 25$ мВт/см²

Участие АФК в фотохимических процессах, определяющих изменение метаболической активности клеток при действии синего света. Важная информация о механизме светоиндуцированных изменений метаболической активности клеток может быть получена из данных о возможном участии АФК в данном процессе. Для выяснения участия синглетного кислорода и перекиси водорода в процессах, определяющих изменение метаболической активности клеток BGM под действием излучения светодиодных источников с $\lambda_{\max} = 405$ и 445 нм, исследовано влияние добавок специфических тушителей указанных АФК на величину фотобиологического эффекта. Согласно рис. 4, если воздействие на клетки BGM излучения светодиодного источника с $\lambda_{\max} = 405$ нм плотностью мощности $I = 50$ мВт/см² и временем облучения $t = 5$ мин ($D = 15$ Дж/см²) приводит к снижению метаболической активности по сравнению с контролем (гистограмма 1) до $\gamma = 58.5 \pm 3.6$ % (гистограмма 3), то облучение клеток после предварительного внесения в питательную среду тушителя синглетного кислорода азиды натрия сопровождается снижением фотобиологического эффекта до $\gamma = 89.7 \pm 2.9$ % (гистограмма 5). Более существенное влияние на фотобиологический эффект, инициируемый воздействием света с $\lambda_{\max} = 405$ нм, оказывает тушитель перекиси водорода пируват натрия (гистограмма 7). Как видно, в его присутствии протекание фотобиологической реакции практически блокируется: $\gamma = 102.0 \pm 2.5$ %. Аналогичная ситуация реализуется при воздействии излучения с $\lambda_{\max} = 445$ нм тех же энергетических параметров. Если в отсутствие добавок $\gamma = 80.0 \pm 3.4$ % (гистограмма 4), то в присутствии азиды натрия $\gamma = 93.1 \pm 3.2$ % (гистограмма 6), а пирувата натрия — $\gamma = 103.9 \pm 3.2$ % (гистограмма 8).

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что изменение метаболической активности клеток, индуцируемое воздействием на монослой излучения синей области спектра, обусловлено участием таких АФК, как синглетный кислород и перекись водорода.

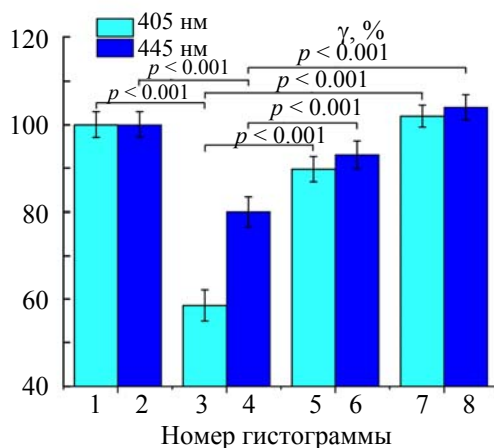


Рис. 4. Влияние тушителей активных форм кислорода на изменение метаболической активности клеток BGM под действием излучения светодиодных источников с $\lambda_{\text{max}} = 405$ (3, 5, 7) и 445 нм (4, 6, 8) плотностью мощности $I = 50$ мВт/см², $t = 5$ мин, энергетическая доза $D = 15$ Дж/см²: 1, 2 — контрольные необлученные клетки; 3, 4 — клетки, облученные в отсутствие внешних добавок; 5, 6 — клетки, облученные в присутствии 10 мМ азиды натрия; 7, 8 — клетки, облученные в присутствии 10 мМ пирувата натрия

Исследование механизма фотобиологических процессов в клетках методом ХЛ-анализа. Как показано нами ранее [22, 23], важная информация о фотохимических процессах, протекающих в клетках, может быть получена с использованием метода ХЛ-анализа, позволяющего суммарно регистрировать различные АФК (включая супероксиданионрадикал $\text{O}_2^{\cdot-}$, перекись водорода H_2O_2 и гидроксильный радикал OH^{\cdot}), локализованные как во внутриклеточном, так и во внеклеточном пространстве. При этом считается, что синглетный кислород участия в формировании ХЛ-сигнала не принимает, поскольку регистрация ХЛ начинается, как правило, через несколько секунд или десятков секунд после прекращения облучения биообъекта, а время жизни синглетного кислорода в водной среде не более 3.2 мкс.

На рис. 5 представлены кинетические кривые, отражающие изменение во времени ХЛ-сигнала суспензии необлученных клеток HeLa (концентрации $8 \cdot 10^6$ мл⁻¹); после воздействия лазерного излучения с $\lambda = 445$ нм плотностью мощности $I = 100$ мВт/см² в течение $t = 5$ мин в отсутствие внешних добавок и после облучения в присутствии предварительно внесенного азиды натрия. Видны существенные различия кинетических кривых ХЛ облученных и необлученных суспензий клеток, которые проявляются прежде всего в том, что кинетические кривые изменения интенсивности ХЛ для облученных суспензий клеток (рис. 5, б и в) представляют собой ниспадающие кривые, тогда как средняя интенсивность ХЛ для контрольных (интактных) суспензий клеток (рис. 5, а) практически не изменяется на протяжении всего времени регистрации сигнала. Кроме того, амплитуда колебаний сигнала относительно усредненной кривой, аппроксимирующей кинетику изменения сигнала, значительно выше для облученных клеток. Из представленных данных следует, что внесение в суспензию тушителя синглетного кислорода 10 мМ азиды натрия приводит к достоверному снижению интегральной интенсивности ХЛ. При этом внесение азиды натрия практически не отражается на ХЛ необлученных суспензий клеток.

Как показывают оценки, интегральная интенсивность ХЛ (за вычетом интегральной интенсивности сигнала контрольных образцов) в 1.6 раза превышает соответствующий сигнал для образцов, облученных в присутствии азиды натрия. Следовательно, фотоповреждение клеток, регистрируемое непосредственно после прекращения воздействия синего света, протекает с участием синглетного кислорода. При этом кинетические кривые ХЛ образцов, облученных в присутствии пирувата натрия, практически не отличаются от варианта облучения суспензии клеток в отсутствие внешних добавок (рис. 5, б и г), т. е. перекись водорода не вносит вклада в фотоповреждение клеток, регистрируемое непосредственно после прекращения облучения.

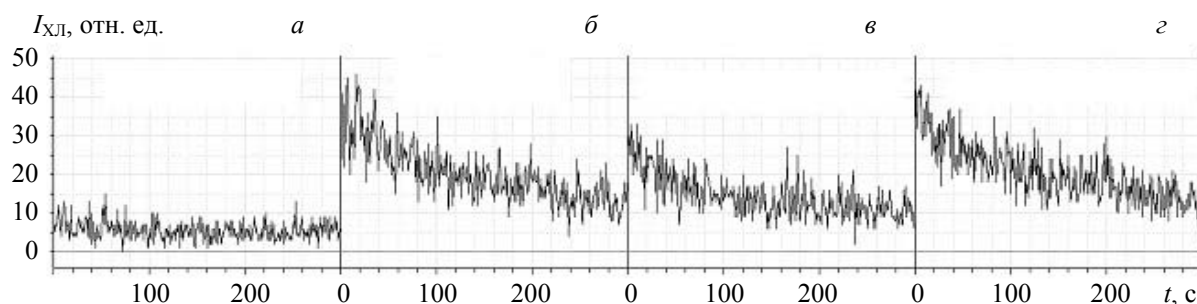


Рис. 5. Влияние тушителей АФК на хемилюминесценцию суспензии клеток HeLa (концентрация клеток $8 \cdot 10^6$ мл $^{-1}$): а — клетки до облучения; б — клетки после воздействия в течение $t = 5$ мин лазерным излучением с $\lambda = 445$ нм, плотностью мощности $I = 100$ мВт/см 2 ; в — клетки после воздействия в течение $t = 5$ мин в присутствии 10 мМ азиды натрия лазерным излучением с $\lambda = 445$ нм, плотностью мощности $I = 100$ мВт/см 2 ; г — клетки после воздействия в течение $t = 5$ мин в присутствии 10 мМ пирувата натрия лазерным излучением с $\lambda = 445$ нм, плотностью мощности $I = 100$ мВт/см 2

Следующий этап работы — сравнительное исследование интенсивности ХЛ суспензии клеток, инициированной воздействием на клетки в течение $t = 3$ мин излучения светодиодных источников с $\lambda_{\text{max}} = 405$ и 445 нм одинаковой интенсивности ($I = 50$ мВт/см 2). На рис. 6 видно, что интегральная интенсивность сигнала ХЛ, измеренная после воздействия излучения с $\lambda_{\text{max}} = 405$ нм (за вычетом интегральной интенсивности сигнала контрольных образцов), превышает соответствующий сигнал для образцов, облученных светом с $\lambda_{\text{max}} = 445$ нм, в 1.24 раза. Таким образом, по данным ХЛ-анализа при одинаковой энергетической нагрузке излучение с $\lambda_{\text{max}} = 405$ нм вызывает более существенные повреждения клеточных структур, чем излучение с $\lambda_{\text{max}} = 445$ нм.

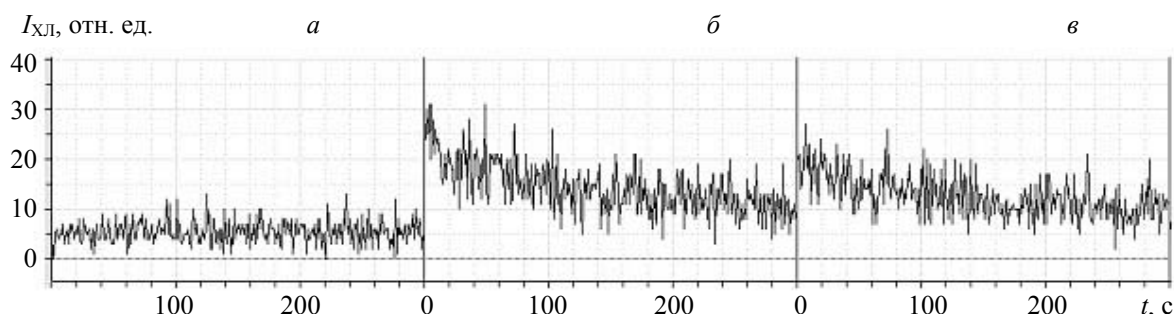


Рис. 6. Кинетические кривые изменения интенсивности хемилюминесценции суспензии клеток HeLa (концентрация клеток $2.5 \cdot 10^6$ мл $^{-1}$): а — клетки до облучения; б — клетки после воздействия в течение $t = 3$ мин излучением светодиодного источника с $\lambda_{\text{max}} = 405$ нм, плотностью мощности $I = 50$ мВт/см 2 ; в — клетки после воздействия в течение $t = 3$ мин излучением светодиодного источника с $\lambda_{\text{max}} = 445$ нм, плотностью мощности $I = 50$ мВт/см 2

Идентификация флуорофоров, ответственных за реализацию биологического действия лазерного излучения в соматических клетках. Идентификацию флуорофоров, локализованных в клетке и способных сенсibilизировать образование АФК при возбуждении светом видимой области спектра, проводили, регистрируя спектрально-флуоресцентные характеристики суспензии живых клеток (рис. 7), а также их ацетоновых экстрактов (рис. 8). Полученные спектры клеточных компонент сопоставляли со спектрами химически чистых тетрапирролов (рис. 8 и 9).

Как видно из рис. 7, для суспензии живых клеток при возбуждении $\lambda_{\text{ex}} = 405, 416$ и 445 нм четко регистрируется флуоресценция с максимумом при 534 нм, обусловленным испусканием флавиновой компоненты. Причем при возбуждении флуоресценции излучением $\lambda_{\text{ex}} = 445$ нм (кривая 3), соответствующим максимуму спектра поглощения флавинов (см. рис. 9), в регистрируемом спектре отсут-

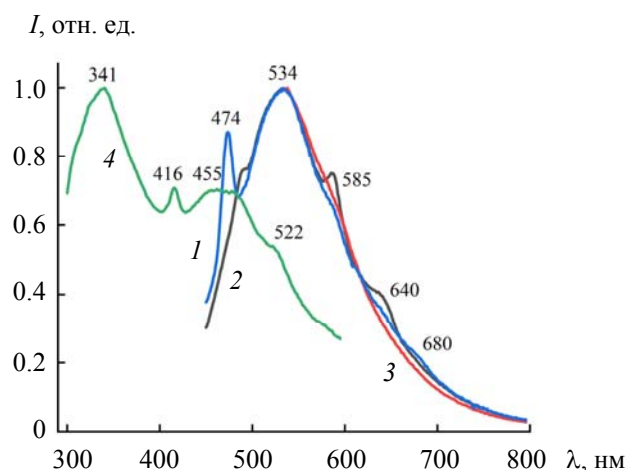


Рис. 7. Спектры флуоресценции (1—3) и возбуждения флуоресценции (4) суспензии живых клеток HeLa; $\lambda_{\text{ex}} = 405$ (1), 416 (2), 445 нм (3); $\lambda_{\text{em}} = 645$ нм (4)

вуют полосы, принадлежащие другим соединениям. Однако при возбуждении $\lambda_{\text{ex}} = 405$ нм (рис. 7, кривая 1) и особенно $\lambda_{\text{ex}} = 416$ нм (кривая 2) на длинноволновом склоне полосы флавиновой флуоресценции регистрируются три плеча вблизи 585, 640 и 680 нм. Отметим, что узкая полоса с максимумом при 474 нм на коротковолновом склоне флавиновой флуоресценции ($\lambda_{\text{ex}} = 405$ нм, кривая 1), а также плечо при 490 нм ($\lambda_{\text{ex}} = 416$ нм, кривая 2) обусловлены комбинационным рассеянием света молекулами воды. В спектре возбуждения флуоресценции ($\lambda_{\text{em}} = 645$ нм) суспензии клеток (кривая 4) широкая полоса с максимумом в области 455—477 нм, вероятнее всего, связана с флуоресценцией свободной и связанной с белком форм флавинов. Как известно [33], указанные формы флавиновых флуорофоров различаются как положениями спектров, так и квантовыми выходами флуоресценции. Происхождение самого коротковолнового максимума при 341 нм в спектре возбуждения (кривая 4) обусловлено присутствием в клетках кофермента никотинамидадениндинуклеотида восстановленного (NADH) и его фосфорилированной формы — никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADPH), максимумы спектров поглощения и флуоресценции которых в водных растворах расположены при 340 и 450 нм. Их положение сильно варьирует при образовании комплексов с белками [33]. Максимум при 416 нм в спектре возбуждения флуоресценции, наиболее вероятно, принадлежит порфириновым фотосенсибилизаторам, которые ответственны за формирование плеч 585, 640 и 680 нм на длинноволновом склоне полосы флавиновой флуоресценции (кривые 1 и 2). Отметим, что максимум полосы Core в ацетоне для Zn-протопорфирина IX находится при 417 нм, а максимумы флуоресценции — при 588 и 636 нм [34]. Для раствора Zn-протопорфирина IX в ДМСО максимум полосы Core расположен при 422 нм, а максимумы флуоресценции при 591 и 645 нм, т. е. абсорбционные и спектрально-флуоресцентные характеристики Zn-протопорфирина IX весьма чувствительны к микроокружению и могут также изменяться при встраивании указанного тетрапиррола в структуру макромолекул клеток. Это позволяет заключить, что Zn-протопорфирин IX является одним из соединений, присутствующих в составе клеток HeLa и ответственных за формирование плеч при 585 и 640 нм на длинноволновом склоне флавиновой флуоресценции суспензии живых клеток.

Дополнительная информация о фотосенсибилизаторах, локализованных в соматических клетках HeLa, получена из их ацетоновых экстрактов (рис. 8). Видно, что кроме флавиновой составляющей с максимумом при 537 нм при $\lambda_{\text{ex}} = 400$ нм (кривая 1) и $\lambda_{\text{ex}} = 408$ нм (кривая 2) в спектре флуоресценции экстракта регистрируется еще ряд максимумов, один из которых (при 557 нм) может принадлежать липофусцинподобным липопигментам [33], другой (600 нм) — цинковому комплексу протопорфирина IX. Как показывает сравнение полос флуоресценции, расположенных на длинноволновом склоне зарегистрированного спектра с максимумами при 634, 670 и 702 нм (кривые 1 и 2), со спектром флуоресценции химически чистого протопорфирина IX в ацетоне (кривая 3), характеризующимся максимумами при 635, 673 и 704 нм, указанные спектральные характеристики практически идентичны. Таким образом, схожесть зарегистрированных полос в спектрах флуоресценции ацетоновых экстрактов клеток и химически чистого протопорфирина IX не оставляют сомнения в его при-

сутствии в клетках HeLa. Сравнение интенсивности полосы флуоресценции с максимумом при 635 нм протопорфирина IX при его концентрации 0.5 нМ с соответствующей полосой в спектре экстракта позволяет оценить концентрацию указанного тетрапиррола в клетках на уровне 0.5 нМ.

Таким образом, выполненные спектрально-флуоресцентные исследования суспензии живых клеток, а также их ацетоновых экстрактов показывают, что в клетках HeLa наряду с флуоресценцией флавинов регистрируется флуоресценция порфириновых фотосенсибилизаторов (протопорфирина IX, а также его цинкового комплекса), которые при фотовозбуждении могут вносить вклад в сенсибилизированную генерацию синглетного кислорода.

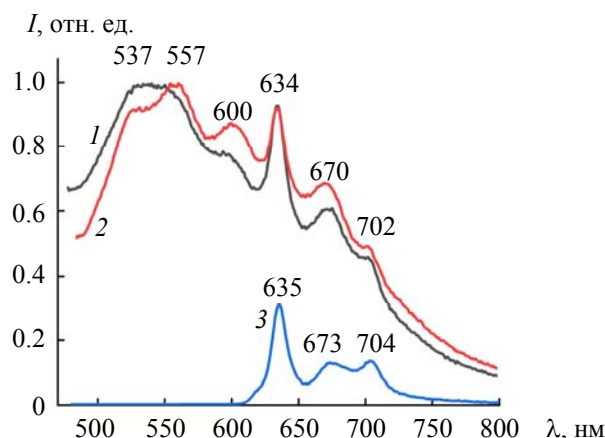


Рис. 8. Спектры флуоресценции ацетонового экстракта клеток HeLa (1, 2), протопорфирина IX в ацетоне при концентрации тетрапиррола 0.5 нМ (3); $\lambda_{\text{ex}} = 400$ (1) и 408 нм (2, 3)

Полученные результаты показывают способность оптического излучения синей области спектра лазерных и светодиодных источников с $\lambda = 405$ и 445 нм оказывать влияние на метаболические процессы в соматических клетках опухолевой и неопухолевой природы (рис. 2). В диапазоне низких энергетических доз ($D = 0.45$ Дж/см²) излучение с $\lambda = 405$ нм оказывает стимулирующее действие на метаболическую активность клеток. Однако дальнейшее повышение энергетической дозы приводит к ингибированию метаболической активности. При воздействии на клетки излучения с $\lambda = 445$ нм наблюдается дозозависимое снижение их функциональных свойств. Согласно [16, 35, 36], ингибирующее действие синего света — наиболее частый результат его воздействия на клетки. Вместе с тем при некоторых условиях культивирования соматических клеток излучение диапазона 400—470 нм способно оказывать стимулирующее влияние на метаболическую и митотическую активность, а также на синтез нуклеиновых кислот в клетках [24, 37—39]. Следовательно, обнаруженное стимулирующее действие света с $\lambda = 405$ нм не противоречит имеющимся данным.

Выполненные исследования показали отсутствие достоверных различий в результатах действия лазерных источников, генерирующих монохроматическое излучение, и действия квазимонохроматического излучения светодиодов с близкими длинами волн 405 и 445 нм (рис. 2). Установлено, что фотобиологический эффект обусловлен фотохимическими процессами с участием АФК (рис. 4 и 5), причем непосредственно после прекращения кратковременного воздействия света на клетки (длительность облучения 2—5 мин) определяющий вклад в фотоповреждение клеточных структур вносит синглетный кислород, что подтверждается данными ХЛ-анализа с использованием тушителей АФК. При этом перекись водорода не играет заметной роли в указанных деструктивных процессах (рис. 5, з). Однако при контроле фотоинактивации клеток через 1 сутки после воздействия света оказалось, что главным интермедиатом, определяющим светоиндуцированное снижение метаболической активности, является перекись водорода: внесение в питательную среду перед облучением клеток тушителя H_2O_2 пирувата натрия практически полностью блокировало фотобиологические реакции (рис. 4). Внесение в питательную среду тушителя синглетного кислорода азида натрия лишь частично снижало фотобиологический эффект.

Участие АФК в процессах, лежащих в основе инактивирующего действия синего света в отношении соматических клеток, отмечалось и ранее (см., например, [16, 35, 36, 39—41]). Среди указанных АФК, зарегистрированных различными методами в клетках при воздействии синего света, — синглетный кислород, супероксиданионрадикал, гидроксильный радикал, перекись водорода и др. Однако изменение вкладов различных типов АФК в фотобиологические процессы в клетках при их контроле через разные временные промежутки после прекращения облучения обнаружено нами впервые. По-видимому, такое изменение вклада различных видов АФК в фотобиологические эффекты с течением времени после прекращения облучения связано с тем, что во время облучения клеток основным цитотоксичным интермедиатом выступает синглетный кислород, образование которого сенсibiliзируют некоторые эндогенные пигменты, поглощающие воздействующее излучение. При этом квантовые выходы сенсibiliзированного эндогенными соединениями образования синглетного кислорода достаточно высоки: от $\phi_{\Delta} = 0.51$ для FMN и рибофлавина до 0.77 для мономерной формы протопорфирина IX [22]. Однако после прекращения светового воздействия сенсibiliзированное образование синглетного кислорода прекращается и через несколько микросекунд его уровень практически снижается до нуля в результате физического и химического тушения. В то же время, согласно [42—44], фотосенсибилизаторы с различными физико-химическими свойствами и внутриклеточной локализацией могут запускать в клетках волну массивированной вторичной продукции АФК, прежде всего перекиси водорода, которая регистрируется в клетках спустя несколько часов после завершения облучения, несмотря на то, что период ее полураспада ~ 1 мс. Предполагается, что между облучением и вторичной продукцией АФК может существовать лаг-период; чем ниже энергетическая доза, тем дольше лаг-период [42]. Несмотря на то что механизм формирования вторичной волны образования АФК в клетках еще далек от понимания, сам факт постепенного нарастания уровня перекиси водорода после фотодинамического воздействия не подлежит сомнению [42—44].

Таким образом, индуцированные синим светом химические реакции в соматических клетках продолжают после прекращения облучения, однако вклад различных АФК изменяется с течением времени. Согласно результатам наших исследований, если сразу после облучения основным цитотоксическим интермедиатом выступает синглетный кислород, то спустя сутки определяющая роль в эффектах инактивации клеток принадлежит перекиси водорода. Как показывает анализ работ [16, 21—23, 25—27, 35, 36] по изучению механизма действия синего света на различные типы клеток (соматические клетки, клетки крови, сперматозоиды, микробные клетки и др.), участие АФК в данных процессах подтверждается различными физико-химическими методами. Наименее изучен вопрос о типе эндогенных молекул, сенсibiliзирующих образование АФК, прежде всего синглетного кислорода. При этом в качестве эндогенных фотосенсибилизаторов неоднократно назывались флавины, порфирины (включая протопорфирин IX и порфиринсодержащие ферменты), цитохромы (включая ССО), меланин, β -каротин, липофусцин и другие пигменты, поглощающие излучение видимой области спектра. Однако доказательств участия вышеперечисленных соединений в эффектах сенсibiliзации, как правило, не приводилось. Кроме того, некоторые из вышеперечисленных пигментов не способны генерировать синглетный кислород при фотовозбуждении (например, цитохромы, β -каротин). Фактически имеются лишь определенные подтверждения участия флавинов в сенсibiliзации фотобиологических процессов в клетках [19]. Известно, что концентрация флавиновых молекул в клетках HeLa составляет несколько мкМ/л [45]. По этой причине их флуоресценция легко регистрируется как в суспензии живых клеток (рис. 7), так и в их экстрактах (рис. 8). Если исходить из предположения, что флавины (рибофлавин, FMN или флавинадениндинуклеотид, FAD) являются основными эндогенными фотосенсибилизаторами в синей области спектра, то максимум фотобиологического эффекта должен наблюдаться при 445 нм и соответствовать максимуму в спектре поглощения указанных соединений с близкими абсорбционными характеристиками (рис. 9). Излучение с $\lambda = 405$ нм должно быть менее эффективным в биологическом действии, поскольку оно соответствует локальному минимуму в спектре поглощения флавинов между коротковолновым и длинноволновым максимумами при 376 и 447 нм (рис. 9). Однако, как видно из рис. 3 и 4, воздействие излучения с $\lambda = 405$ нм оказывает более выраженное инактивирующее действие как на нетрансформированные клетки BGM, так и на раковые клетки HeLa. Согласно данным ХЛ-исследований (рис. 6), эффективность генерации АФК суспензией клеток также выше при воздействии излучения с $\lambda_{\max} = 405$ нм. Результаты такой же направленности получены и в [46, 47]. Согласно [46], где изучалось влияние излучения светодиодов с $\lambda_{\max} = 410, 420, 453$ и 480 нм на фибробласты, излучение с $\lambda_{\max} = 410$ и 420 нм оказывало наибольшее влияние на рост клеток и генерацию АФК. В исследовании цитотоксичности

синего света с $\lambda_{\max} = 412, 419, 426$ и 453 нм [47] наиболее эффективно излучение с $\lambda_{\max} = 412$ нм, наименее эффективно — с $\lambda_{\max} = 453$ нм.

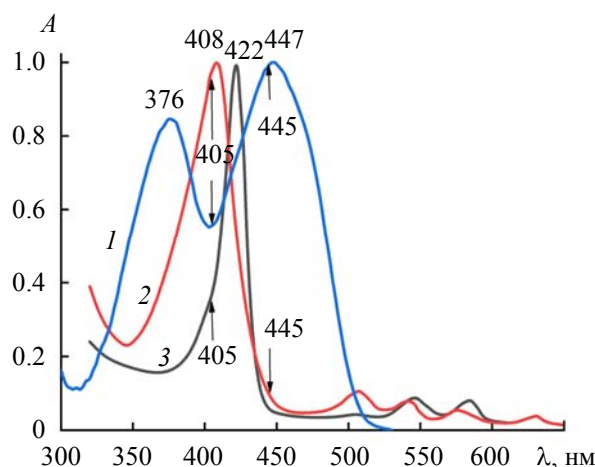


Рис. 9. Спектры поглощения мономерных форм эндогенных фотосенсибилизаторов FMN в буфере (1) и протопорфирина IX (2) и Zn-протопорфирина IX (3) в ДМСО; стрелками указаны длины волн излучения, воздействующего на клетки

Таким образом, результаты наших исследований и данные [46, 47] свидетельствуют о том, что кроме флавиновых соединений в эффекты сенсibilизированной генерации АФК в клетках, определяющих их функциональные свойства, вносят вклад и другие эндогенные соединения. Такими соединениями являются безметалльные порфирины (протопорфирин IX, копропорфирин III, уропорфирин III), а также цинковый комплекс протопорфирина IX, несмотря на их достаточно низкую концентрацию в клетках (~ 0.5 нМ). Указанные порфирины характеризуются высоким выходом образования синглетного кислорода и способны (хотя и с меньшей эффективностью) сенсibilизировать образование других АФК: супероксидных радикалов и перекиси водорода [22, 23, 26]. Участие эндогенных порфиринов в эффектах сенсibilизации подтверждается регистрацией их флуоресценции как в живых клетках, так и в экстрактах различных растворителей (рис. 7 и 8) [48]. Об участии порфириновых молекул в реализации биологического действия синего света также свидетельствуют более высокая эффективность образования АФК (рис. 6) и более высокая скорость инактивации клеток излучением $\lambda = 405$ нм в сравнении с действием света с $\lambda = 445$ нм (рис. 2 и 3). Это коррелирует с более интенсивным поглощением света порфиринами при 405 нм (полоса Соре), чем при 445 нм (рис. 9). Кроме того, как показали измерения интенсивности ХЛ, добавка к суспензии клеток наномолярных концентраций экзогенного протопорфирина IX и последующее воздействие света с $\lambda = 405$ нм заметно усиливают сигнал ХЛ по сравнению с суспензией, облученной без добавок тетрапиррола. Естественно, что вклад порфиринов в эффекты сенсibilизации наиболее выражен в области максимума их поглощения в полосе Соре (соответствующей локальному минимуму в спектре поглощения флавинов), тогда как вклад эндогенных флавинов в эффекты фотоинактивации клеток наиболее выражен в области 445 нм, характеризующейся максимумом в спектре поглощения флавинов и локальным минимумом в спектре поглощения безметалльных порфиринов. Традиционная точка зрения состоит в том, что синглетный кислород, образующийся в биологической системе, как правило, оказывает грубое деструктивное действие на ее компоненты, вызывая повреждение аминокислот, белков, ДНК, липидов. Указанные представления сложились в результате изучения фотодинамических процессов на молекулярном и клеточном уровнях в условиях использования высоких концентраций фотосенсибилизаторов. Однако исследования последних лет свидетельствуют о том, что низкие уровни АФК способны оказывать регуляторное действие на различные типы клеток, выступая в качестве сигнального фактора [11, 16, 20—23, 48]. Аналогичная ситуация наблюдается и при действии синего света на соматические клетки, поскольку дополнительные исследования с использованием метода проточной цитофлуориметрии показали, что снижение метаболической активности реализуется не за счет гибели клеток, а в результате удлинения стадий клеточного цикла.

Заключение. Эндогенными фотоакцепторами, сенсibiliзирующими протекание фотобиологических реакций в соматических клетках, как и клетках других типов (крови, сперматозоидах, микробных клетках), наряду с флавинами выступают порфириновые соединения, присутствующие в малых концентрациях (~0.5 нМ), но характеризующиеся высокой эффективностью генерации активных форм кислорода. В зависимости от параметров воздействующего излучения и функционального состояния клеток активные формы кислорода могут оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее действие на соматические клетки. Механизм светоиндуцированных реакций в клетках изменяется с течением времени после прекращения воздействия за счет волны вторичной продукции активных форм кислорода, прежде всего перекиси водорода.

Результаты исследований, представленные в настоящей работе, являются естественным продолжением инициатив наших уважаемых наставников [37] по изучению механизма биологической активности лазерного излучения, всецело поддержанных в свое время академиком Б. И. Степановым.

- [1] V. Yu. Plavskii, A. V. Mikulich, N. V. Barulin, L. G. Plavskaya, A. I. Tretyakova, I. A. Leusenka, T. S. Ananich, N. S. Serdyuchenko. *Laser Therapies: Types, Uses and Safety*, New York, Nova Science Publishers, ch. 1 (2020) 1—68
- [2] C. Dompe, L. Moncrieff, J. Matys, K. Grzech-Leśniak, I. Kocherova, A. Bryja, M. Bruska, M. Dominik, P. Mozdziak, T. H. I. Skiba, J. A. Shibli, A. Angelova Volponi, B. Kempisty, M. Dyszkiewicz-Konwińska. *J. Clin. Med.*, **9**, N 6 (2020) 1724
- [3] P. Rola, S. Włodarczak, M. Lesiak, A. Doroszko, A. Włodarczak. *Photonics*, **9**, N 7 (2022) 502
- [4] Ю. Е. Еременко, Е. Л. Малец, А. А. Куприянова, В. И. Журневич, В. Ю. Плавский. Докл. НАН Беларуси, **64**, № 1 (2020) 86—93
- [5] В. Ю. Плавский, Н. В. Барулин. Журн. прикл. спектр., **75**, № 2 (2008) 233—241 [V. Y. Plavskii, N. V. Barulin. *J. Appl. Spectr.*, **75** (2008) 241—250]
- [6] В. Ю. Плавский, Н. В. Барулин. Журн. прикл. спектр., **75**, № 6 (2008) 843—858 [V. Y. Plavskii, N. V. Barulin. *J. Appl. Spectr.*, **75** (2008) 843—856]
- [7] V. Y. Plavskii, N. V. Barulin. *J. Opt. Technol.*, **75**, N 9 (2008) 546—552
- [8] M. Yeste, M. Castillo-Martín, S. Bonet, J. E. Rodríguez-Gil. *Anim. Reprod. Sci.*, **194** (2018) 19—32
- [9] A. V. Budagovsky, M. V. Maslova, O. N. Budagovskaya, E. V. Grosheva. *BIO Web of Conf.*, **23** (2020) 02001
- [10] А. Н. Рубинов, А. А. Афанасьев. Опт. и спектр., **98**, № 6 (2005) 1027—1032
- [11] S. Passarella, T. Karu. *J. Photochem. Photobiol. B*, **140** (2014) 344—358
- [12] M. R. Hamblin, A. Liebert. *Photobiomodul. Photomed. Laser Surg.*, **40**, N 2 (2022) 75—77
- [13] A. Liebert, W. Capon, V. Pang, D. Vila, B. Bicknell, C. McLachlan, H. Kiat. *Biomedicines*, **11** (2023) 237
- [14] A. P. Sommer. *Photobiomodul. Photomed. Laser Surg.*, **37**, N 6 (2019) 336—341
- [15] T. I. Karu. *IUBMB Life*, **62** (2010) 607—610
- [16] H. Serrage, V. Heiskanen, W. M. Palin, P. R. Cooper, M. R. Milward, M. Hadis, M. R. Hamblin. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **18**, N 8 (2019) 1877—1909
- [17] P. L. V. Lima, C. V. Pereira, N. Nissanka, T. Arguello, G. Gavini, C. M. D. C. Maranduba, F. Diaz, C. T. Moraes. *J. Photochem. Photobiol. B*, **194** (2019) 71—75
- [18] B. Quirk, H. Whelan. *Photomed. Laser Surg.*, **34**, N 12 (2016) 631—637
- [19] M. Eichler, R. Lavi, A. Shainberg, R. Lubart. *Lasers Surg. Med.*, **37** (2005) 314—319
- [20] M. R. Hamblin. *Photochem. Photobiol.*, **94**, N 2 (2018) 199—212
- [21] С. Д. Захаров, А. В. Иванов. Квант. электрон., **29** (1999) 192—214
- [22] V. Y. Plavskii, N. V. Barulin, A. V. Mikulich, A. I. Tretyakova, T. S. Ananich, L. G. Plavskaya, I. A. Leusenka, A. N. Sobchuk, V. A. Sysov, O. N. Dudinova, A. I. Vodchits, I. A. Khodasevich, V. A. Orlovich. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **216** (2021) 112112
- [23] V. Plavskii, A. Mikulich, N. Barulin, T. Ananich, L. Plavskaya, A. Tretyakova, I. Leusenka. *Photochem. Photobiol.*, **96**, N 6 (2020) 1294—1313
- [24] T. J. Karu, G. S. Kalendo, V. S. Letokhov, V. V. Lobko. *Nuovo Cimento D*, **3** (1984) 309—318
- [25] K. Hoenes, U. Wenzel, B. Spellerberg, M. Hessling. *Photochem. Photobiol.*, **96** (2020) 156—169
- [26] V. Yu. Plavskii, A. V. Mikulich, A. I. Tretyakova, I. A. Leusenka, L. G. Plavskaya, O. A. Kazyuchits, I. I. Dobysh, T. P. Krasnenkova. *J. Photochem. Photobiol. B*, **183** (2018) 172—183

- [27] R. M. Tomb, T. A. White, J. E. Coia, J. G. Anderson, S. J. MacGregor, M. Maclean. *Photochem. Photobiol.*, **94** (2018) 445—458
- [28] S. I. Nagahama, T. Yanamoto, M. Sano, T. Mukai. *Jpn. J. Appl. Phys.* **40**(5R) (2001) 3075—3081
- [29] T. Mosmann. *J. Immun. Methods*, **65** (1983) 55—63
- [30] C. Lu, G. Song, J. M. Lin. *TrAC Trends Anal. Chem.*, **25** (2006) 985—995
- [31] D. B. Lockwood, J. C. Wataha, J. B. Lewis, W. Y. Tseng, R. L. Messer, S. D. Hsu. *Dent. Mater.*, **21** (2005) 683—688
- [32] M. Feith, T. Vičar, J. Gumulec, M. Raudenská, A. Gjörloff Wingren, M. Masařík, J. Balvan. *Appl. Sci.*, **10**, N 7 (2020) 2597
- [33] A. C. Croce, G. Bottirol. *Eur. J. Histochem.*, **58**, N 4 (2014) 2461
- [34] В. Ю. Плавский, Л. Г. Плавская, О. Н. Дудинова, А. Н. Собчук, Т. С. Ананич, А. В. Микulich, А. И. Третьякова, И. А. Леусенко. В сб. “Лазеры в науке, технике, медицине”, под ред. В. А. Петрова, Москва, МНТОРЭС им. А. С. Попова, **32** (2021) 118—122
- [35] Z. Chen, S. Huang, M. Liu. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **38**, N 1 (2022) 3—11
- [36] J. Yang, Q. Fu, H. Jiang, Y. Li, M. Liu. *Front. Oncol.*, **12** (2022) 1022973
- [37] Б. И. Степанов, В. А. Мостовников, А. Н. Рубинов, И. В. Хохлов. *Докл. АН СССР*, **236** (1977) 1007—1010
- [38] V. V. Bumah, D. S. Masson-Meyers, O. Awosika, S. Zacharias, C. S. Enwemeka. *Lasers Med. Sci.* **36** (2021) 1661—1670
- [39] C. Mignon, N. E. Uzunbajakava, B. Raafs, N. V. Botchkareva, D. J. Tobin. *Sci. Rep.*, **7**, N 1 (2017) 2797
- [40] L. Taflinski, E. Demir, J. Kauczok, P. C. Fuchs, M. Born, C. V. Suschek, C. Opländer. *Exp. Dermatol.*, **23**, N 4 (2014) 240—246
- [41] A. Yoshida, F. Yoshino, T. Makita, Y. Maehata, K. Higashi, C. Miyamoto, S. Wada-Takahashi, S. Takahashi, O. Takahashi, M. C. I. Lee. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **129** (2013) 1—5
- [42] N. Peskova, A. Brilkina, A. Gorokhova, N. Shilyagina, O. Kutova, A. Nerush, A. Orlova, L. Klapshina, V. Vodeneev, I. Balalaeva. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **219** (2021) 112208
- [43] L. M. Sencha, A. A. Gorokhova, N. N. Peskova, E. I. Cherkasova, I. V. Balalaeva. *J. Biomed. Photon. Eng.*, **8**, N 4 (2022) 040305
- [44] B. V. Chernyak, D. S. Izyumov, K. G. Lyamzaev, A. A. Pashkovskaya, O. Y. Pletjushkina, Y. N. Antonenko, D. V. Sakharov, K. W. A. Wirtz, V. P. Skulachev. *Biochim. Biophys. Acta*, **1757** (2006) 525—534
- [45] J. Hühner, Á. Ingles-Prieto, C. Neusüß, M. Lämmerhofer, H. Janovjak. *Electrophoresis*, **36** (2015) 518—525
- [46] C. Opländer, S. Hidding, F. B. Werners, M. Born, N. Pallua, C. V. Suschek. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **103**, N 2 (2011) 118—125
- [47] J. Liebmman, M. Born, V. Kolb-Bachofen. *J. Invest. Dermatol.*, **130**, N 1 (2010) 259—269
- [48] V. Yu. Plavskii, A. V. Mikulich, A. I. Tretyakova, L. G. Plavskaya, O. N. Dudinova, T. S. Ananich, A. N. Sobchuk, I. A. Leusenka, S. V. Yakimchuk, Le Hang Dang, Ngoc Quyen Tran. *Trends Photochem. Photobiol.*, **21** (2022) 14