

Структурные перестройки в водной фазе клеточных суспензий и белковых растворов при светокислородном эффекте

С.Д.Захаров¹, А.В.Иванов², Е.Б.Вольф³, В.П.Данилов⁴, Т.М.Мурина⁴, К.Т.Нгуен¹,
Е.Г.Новиков⁴, Н.А.Панасенко¹, С.Н.Перов¹, С.А.Скопинов³, Ю.П.Тимофеев¹

Изучены температурно-зависимые и иницируемые прямой фотогенерацией синглетного кислорода переходные процессы в суспензиях эритроцитов человека и растворах сывороточного альбумина. Переходы проявляются в виде аномальных скачков на температурных зависимостях коэффициента деформируемости эритроцитов и показателя преломления внеклеточной среды и белкового раствора. При сдвиге температуры в зону аномалий клетки и белки переходят в метастабильное состояние пониженной активности, но их можно изотермически фотореактивировать. Одновременно у поверхности клеток и белков происходит обратимая перестройка водной фазы с образованием протяженной короны (гидрогеля). Переходные процессы интерпретированы как фазовые переходы в мембране эритроцитов и конформационные переходы в белках. Обнаружено взаимное влияние эритроцитов и альбумина через гидрогель (гидроконформационное взаимодействие). Предлагается качественная физическая модель ранних стадий светокислородного эффекта, в которой ведущую роль играют коллективные магнитные взаимодействия между электронными спинами молекул кислорода и ядерными магнитными моментами протонов молекул H₂O.

Ключевые слова: эритроциты, альбумин, светокислородный эффект, спектры действия, гидрогель, фотостимуляция, фотореактивация.

1. Введение

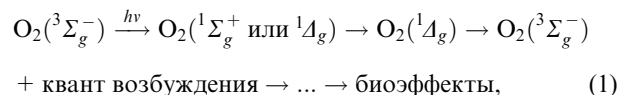
подавляющее большинство явлений в живой природе определяется взаимодействием трех основных факторов – света, воды и кислорода [1]. С появлением лазеров в науках о жизни началась подлинная «техническая революция». К достижениям последних десятилетий можно отнести обнаружение терапевтических эффектов излучения He–Ne-лазера ($\lambda = 632.8$ нм) [2, 3], а также лазерной стимуляции нефтосинтезирующих клеток [4, 5]. Литература по этим вопросам насчитывает к настоящему времени более 10^4 публикаций. Наиболее острой темой дискуссий неизменно остаются первичные механизмы наблюдаемых феноменов [6].

Н.Г.Басов был одним из первых выдающихся физиков современности, оценивших перспективность медико-биологических применений лазеров [7]. В 1982 г. по его инициативе в ФИАНе была создана лаборатория лазерной хирургии, в которой началось изучение механизмов спектрально-селективного действия низкоинтенсивного излучения на кровь. Значительная часть исследований выполнялась в сотрудничестве с ИОФАНом, где были разработаны компактные лазеры с плавно перестраиваемой длиной волны. Исследования завершились открыти-

ем неизвестного фотоакцептора – молекулярного кислорода, растворенного в водной фазе биологической системы [8–10] (см. также обзор [11]).

Этот результат оказался совершенно неожиданным. Как известно, эритроциты содержат большое количество гемоглобина, обладающего сильным поглощением в видимом и ближнем ИК диапазонах [12–14]. Напротив, в молекуле кислорода такие переходы маловероятны из-за квантовомеханических правил отбора по четности и спину. С другой стороны, возбужденный «фоторецептор», по-видимому, воздействовал на клетки, не входя с ними в непосредственный контакт [15]. Полученные данные подтверждали значимость для биологии слабых в энергетическом смысле взаимодействий [16].

Механизм обнаруженного явления, которое впоследствии было предложено называть светокислородным эффектом (СКЭ) [11], схематически может быть представлен в следующем виде:



где $^3\Sigma_g^-$ – основное триплетное состояние молекулы; $^1\Sigma_g^+$ и $^1\Delta_g$ – два низколежащих электронных уровня с главными максимумами поглощения в газовой фазе на $\lambda = 762$ и 1268 нм (и возможным сдвигом в растворах на несколько нанометров в ту или иную сторону) [17]. Состояние $^1\Sigma_g^+$ быстро дезактивируется в растворах ($\sim 10^{-11}$ с) в результате столкновений с молекулами растворителя с последующим заселением уровня $^1\Delta_g$, вследствие чего химическая активность $^1\Sigma_g^+$ не успевает проявиться [18]. Поэтому можно полагать, что биологические эффекты, наблюдаемые при фотовозбуждении $^3\text{O}_2$, обусловлены состоянием $^1\Delta_g$ или просто синглетным кислородом (СК).

¹Физический институт им. П.Н.Лебедева РАН, Россия, 119991 Москва, Ленинский просп., 53

²Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина РАМН, Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

³Уральский государственный технический университет (УПИ), Россия, 620002 Екатеринбург, Втузгородок, ул. Мира, 19

⁴Институт общей физики им. А.М.Прохорова РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 38

Постулатом фотобиологии, заимствованным из фотохимии СК [19], является действие последнего через реакции окисления биомолекул [20]. Обращает на себя внимание тот факт, что доминирование химических каналов дезактивации СК установлено в условиях высокой удельной скорости его генерации [21, 22]. Согласно полученным нами данным для суспензии эритроцитов, светокислородная биостимуляция развивается по каналу физического тушения СК (см. (1)), что, конечно, не означает полного отсутствия химического взаимодействия [11].

Анализируя природу тушителя, мы пришли к выводу о существенной роли водной фазы биосистем в переносе возбуждения от СК на клетки [15, 23]. Важным доводом в пользу этой гипотезы послужил анализ изменений показателя преломления в прозрачном растворе этанол–вода–перекись водорода, облученном He–Ne-лазером [24]. Характер наблюдаемых эффектов свидетельствовал об их светокислородном генезисе.

В настоящей статье представлены результаты проверки «водной» гипотезы. Как и ранее, в экспериментах использован принцип непрерывной регистрации (через небольшие интервалы времени) изменений, происходящих в системе по мере ее облучения. «Контролем» при этом служат значения измеряемого параметра в том же образце перед его облучением. В результате понижается порог обнаружения возможных эффектов, которые при обычных фотобиологических измерениях могли бы затеряться во флуктуационном разбросе. Основное внимание уделено взаимосвязи структурных изменений водной среды за пределами клеток и белков с внутриклеточными и внутрибелковыми процессами. Решению такой задачи помогает открытие новых возможностей оптической рефрактометрии – апробированного метода изучения систем с водородной связью [25]. Метод был применен ранее в известных исследованиях ударно-сжатой воды при моделировании эффектов атомного взрыва [26].

2. Материалы и методы

2.1. Экспериментальные методы

Для контроля коэффициента сдвиговой деформируемости эритроцитов использовался лазерный цитодифрактометр [11]. Он представляет собой гидродинамическую петлю с циркулирующей суспензией эритроцитов, в которую встроена оптическая кювета с узким зазором (плоский капилляр). Течение в кювете отрегулировано таким образом, чтобы сориентировать эритроцитарные диски параллельно стенкам кюветы и одновременно сгруппировать клетки в два симметрично расположенных движущихся монослоя. В этом случае на них действует одно и то же сдвиговое напряжение, в результате чего все они растягиваются одинаковым образом. Степень растяжения, отражающая способность эритроцитов к обратимым деформациям, регистрируется оптическим методом. Кювета просвечивается коллимированным лазерным пучком малой мощности, а рассеянное клетками излучение собирается линзой. В фокальной плоскости линзы наблюдается дифракционная картина Фраунгофера в форме овала. Чем выше степень деформируемости, тем сильнее вытянут овал. Картина устойчива и повторяет форму среднего эритроцита, развернутого на 90° относительно направления потока. В первом дифракционном минимуме измеряются длины большой и малой осей овала. С их помощью безразмерный коэффи-

циент деформируемости эритроцитов ε определяется как отношение разности длин этих осей к их сумме. Под влиянием облучения, производимого в открытом расширенном участке петли, ε изменяется, и динамическая реакция клеток фиксируется в форме кривой $\varepsilon(t)$.

Анализатор антиоксидантной активности клеток позволял невозмущающим способом регистрировать скорость переноса электронов из клеток на Pt-электрод. Принцип работы анализатора рассмотрен в [27].

Показатель преломления, связанный с оптической поляризуемостью известной формулой Лоренц – Лоренца, измерялся с использованием принципа полного внутреннего отражения (ПВО) методами Пульфриха (рефрактометр ИРФ-23) и Аббе (ИРФ-454БМ) (рис.1) [28]. В рефрактометре Аббе (рис.1,б) капля исследуемой жидкости (30–50 мкл) наносится на гипотенузную грань измерительной призмы, а осветительная призма прижимает каплю так, что между гранями призм остается слой жидкости толщиной $h \approx 0.1$ мм. Световой луч (D -линия Na, $\lambda = 589$ нм) направляется в слой жидкости и, дважды преломляясь на границах измерительной призмы, попадает в зрительную трубу. При этом луч скользит, хотя и не строго, вдоль грани измерительной призмы, соответствующая в пределах точности предельному лучу ПВО.

Для динамического контроля структурных изменений дисперсионной среды в клеточных суспензиях был разработан метод седиментационной рефрактометрии. Слой жидкости, в котором измеряется показатель преломления, в соответствии с принципом ПВО прилегает к измерительной призме (рис.1,б) и имеет толщину порядка $\lambda \ll h$. В момент ввода образца суспензии в рефрактометр клетки равномерно распределены в зазоре между гранями, причем основной объем зондируемого слоя занимает межклеточный раствор (например, 99.7% в 0.3%-ной суспензии). Начиная с этого момента и до тех пор, пока заметная часть седиментирующих клеток не осядет на поверхность измерительной призмы, показания прибора будут соответствовать усредненному показателю преломления внеклеточной среды.

Разрешенное время измерения Δt_{\max} можно оценить, воспользовавшись формулой Стокса: $6\pi r_c \eta v = m_c g$, где r_c и m_c – средний радиус и масса клетки; v – скорость оседания клетки; η – вязкость воды; g – ускорение свободного падения. Приняв объем клетки $V_c = 94$ мкм³, площадь поверхности $S_c = 145$ мкм² и удельный вес 1.035

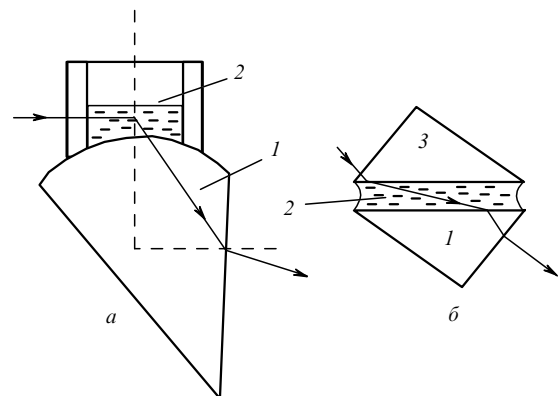


Рис.1. Ход лучей в рефрактометрах ПВО Пульфриха (а) и Аббе (масштаб сильно искажен) (б):

1 – измерительная призма; 2 – исследуемая жидкость; 3 – осветительная призма.

г·см⁻³ [29], получим $v = 0.7 - 0.9$ мкм/с для значений r_c , рассчитанных по V_c или S_c . Доля осевших на поверхность клеток $\xi = \pi r_d^2 \Delta t_{\max} Q$, где r_d – радиус диска эритроцита; $Q = v c_c$; c_c – концентрация клеток в исходной суспензии. Поскольку $\xi^{-1} \equiv K_r$ – рефрактометрический контраст, необходимый для измерения с заданной точностью, окончательно получим $\Delta t_{\max} = (K_r \pi r_d^2 v c_c)^{-1}$. Для $K_r = 10$, $c_c = 10^8$ см⁻³ (1%-ная суспензия) имеем $\Delta t_{\max} \approx 30 - 40$ с при погрешности измерений 0.5×10^{-4} .

Причинная связь наблюдаемых структурных эффектов со светокислородным механизмом во всех случаях проверялась регистрацией детального спектра действия с применением перестраиваемых лазеров [30].

2.2. Источники облучения

При изучении кинетических характеристик использовался преимущественно He–Ne-лазер ЛГ-38 ($\lambda = 632.8$ нм, мощность до 50 мВт), излучение которого инициирует СКЭ [31]. Спектральные характеристики изучались с помощью разработанного в ИОФАНе лазера на александрите, легированном ионом хрома (Ст: AlBe₂O₄). В этом лазере осуществлялась плавная перестройка длины волны в пределах 700–800 нм с помощью поворота внутрирезонаторной призмы и 100%-ного зеркала. В одиночном импульсе длительностью 0.2 мс лазер излучал энергию до 0.9 Дж. В большинстве экспериментов лазер работал с частотой 2–20 Гц и средней мощностью до 100 мВт [32].

2.3. Приготовление образцов

Для получения суспензии эритроцитов использовалась свежеполученная кровь практически здоровых доноров из диагностической лаборатории больницы г. Троицка (Моск. обл). Кровь дважды центрифугировали в забуференном изотоническом растворе (150 мМ NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH = 7.4) в течение 10 мин при ускорении 2000g. Полученная эритромаасса суспендировалась до необходимой концентрации клеток в среде состава NaCl: KCl: CaCl₂: MgCl: Na₂HPO₄: трис-HCl = 100: 3: 2: 1: 1.2: 50 мМ либо в фосфатном буфере NaCl: Na₂HPO₄: KCl = 147: 10: 5 мМ; pH = 7.4. Все неорганические соли были марок Sigma, Serva и ХЧ Реахим.

Объемная доля эритроцитов в суспензиях обычно составляла 0.3%–1%, что соответствовало среднему межклеточному расстоянию 30–40 мкм. Цикл работы с одним образцом крови обычно составлял не более 8–10 ч с момента получения. За исключением особо оговоренных случаев суспензия эритроцитов была полностью оксигенирована.

Фосфатный буфер того же состава использовался для получения раствора белков: бычьего сывороточного альбумина (BSA) и сывороточного альбумина человека (HSA). Кристаллические порошки BSA фирмы Koch-Light Lab. и HSA фирмы Sigma растворялись до полученной весовой концентрации 10% в течение 30 мин при перемешивании магнитной мешалкой. Пробы с меньшей весовой концентрацией (чаще всего 0.3%) получали при смешивании стокового раствора с необходимым количеством буфера. В ряде экспериментов применялись растворы белка в 0.9%-ном NaCl и дистилляте. Использовались только свежеприготовленные растворы, причем время работы с ними не могло быть больше одного часа. Температура раствора стабилизировалась с точностью 0.5 К.

3. Экспериментальные результаты

3.1. Эритроцитарные суспензии

Эритроциты человека – стандартный биологический объект, на котором с помощью лазерной цитодифрактометрии впервые был верифицирован СКЭ [11]. В последующих экспериментах метод использовался в качестве эталонного для расшифровки результатов седиментационной рефрактометрии.

3.1.1. Температурная селективность и ее связь с фотооткликом. Вначале суспензия облучалась He–Ne-лазером, инициирующим стимуляцию эритроцитов по светокислородному механизму [11, 31]. На рис.2 кривой 1 представлена одна из временных зависимостей показателя преломления внеклеточной среды $n(t)$, полученная при температуре $T = 26$ °С и интенсивности облучения 16 мВт/см². Облучение суспензии начиналось в момент $t = 0$ и продолжалось в течение всего времени регистрации. Форма кривой $n(t)$ аналогична временной зависимости коэффициента деформируемости эритроцитов $\varepsilon(t)$, известной из более ранних измерений [11]. После некоторого латентного периода, зависящего от интенсивности облучения, n возрастает, достигает максимума (этот момент времени здесь и далее обозначен как t_m) и вновь падает. Однако при некоторых температурах эффект исчезает (кривая 2): регистрируются лишь характерные для суспензии «темновые» флуктуации.

Термическая селективность биоэффектов наглядно видна на рис.3, где показаны температурные зависимости коэффициента деформируемости эритроцитов, показателя преломления внеклеточного раствора и скорости переноса электронов v_e сквозь эритроцитарную мембрану на платиновый электрод. Кривые $\varepsilon(T)$ и $n(T)$ снимались одновременно в общей системе термостабилизации, а $v_e(T)$ – с тем же образцом крови, но в отдельном эксперименте. Температурные участки, соответствующие повышенным значениям параметров, согласованно сменяются интервалами, в которых эти значения минимальны.

Было отмечено, что пределы изменений ε на кривой $\varepsilon(T)$ за вычетом монотонного температурного хода соответствуют амплитуде клеточной стимуляции $\varepsilon(t_m)$ на временных зависимостях $\varepsilon(t)$ [11]. Аналогичное соответствие имеет место также для $n(T)$ и $n(t)$. Отсюда следует, что температурные участки, в которых значения ε и n

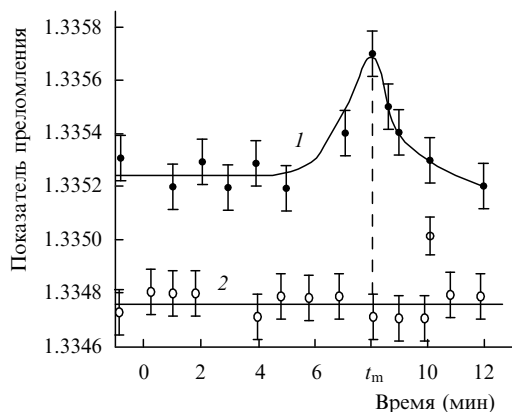


Рис.2. Фотоотклик показателя преломления внеклеточной среды суспензии эритроцитов, облучаемой He–Ne-лазером с момента $t = 0$, при мощности $P = 50$ мВт, объеме суспензии $V_s = 5$ мл, $T = 26$ °С (1) и $P = 20$ мВт, $V_s = 2$ мл, $T = 30$ °С (2); объемная доля клеток 0.3 %.

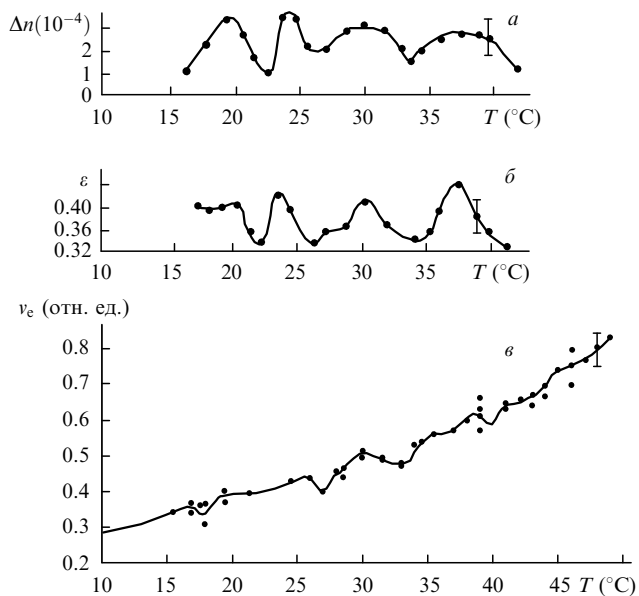


Рис.3. Температурные зависимости показателя преломления внеклеточной среды (за вычетом монотонной температурной зависимости) (а) [32], коэффициента деформируемости эритроцитов (б) и скорости трансмембранного переноса электронов (в) при объемной доле клеток 1 % (а, б) и 10 % (в); скорость повышения температуры 1 К/с.

максимальны, отвечают полностью активированному состоянию клеток (без облучения), поэтому внутри этих участков стимуляция какими-либо внешними факторами невозможна. Напротив, зоны спадов ε и n являются температурно-разрешенными интервалами $\Delta T_s^{(i)}$ для биостимуляции. Из рис.3 видно, что для суспензии эритроцитов эти интервалы таковы: $\Delta T_s^{(1)} = 39 - 42^\circ\text{C}$, $\Delta T_s^{(2)} = 31.5 - 36^\circ\text{C}$, $\Delta T_s^{(3)} = 25 - 28^\circ\text{C}$, $\Delta T_s^{(4)} = 20 - 23^\circ\text{C}$. Нарушения монотонного хода кривой $v_e(T)$ отчетливо регистрируются лишь во втором и третьем из указанных интервалов.

3.1.2. Сопряженность клеточных и внеклеточных эффектов. Одним из критических способов проверки сопряжения клеточных и водных фотоиндуцированных эффектов является изучение их временных корреляций в совместном эксперименте [33]. Суспензия эритроцитов с объемной долей клеток (гематокритом) $\rho = 0.3\%$ и общим объемом 8 мл облучалась внутри лазерного цитодифрактометра He-Ne-лазером со средней интенсивностью $13 \text{ мВт}\cdot\text{см}^{-2}$. Температура в измерительных кюветках рефрактометра Аббе и цитодифрактометра составляла 31.5°C . Пробы суспензии объемом 50 мкл переносились в рефрактометр, отсчеты $\varepsilon(t)$ и $n(t)$ осуществлялись одновременно.

Типичный пример одной из серий эксперимента, состоящей из 13 опытов, показан на рис.4,а. Эта серия интересна тем, что проводилась на нестабильных по деформируемости клетках, о чем свидетельствует темновой дрейф ε (сдвиговая деградация эритроцитов [34]). Видно, что дрейф не препятствует надежной регистрации фотоиндуцированных изменений $\varepsilon(t)$. В то же время на зависимость $n(t)$ он не оказывает никакого влияния. Как нетрудно заметить, динамика фотоотклика обоих параметров взаимно согласована, а времена появления максимумов совпадают. На рис.4,б показана реакция системы на облучение после удаления из нее кислорода посредством барботирования суспензии газообразным азотом. Фотоотклик в обоих случаях отсутствует. На

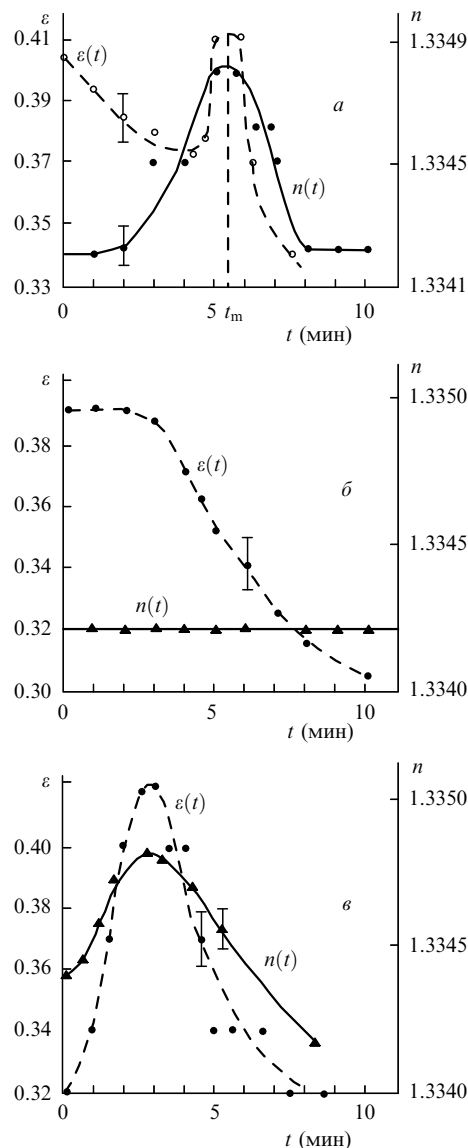


Рис.4. Одновременность реакции клеток и внеклеточной среды в суспензии эритроцитов на облучение He-Ne-лазером; суспензия оксигенирована (а), барботирована азотом в течение 10 мин (б) и инкубирована с фотосенсибилизатором (диацетат гематопорфирина, 2×10^6 молекул на клетку) (в) при интенсивности облучения 13 (а, б) и $2.2 \text{ мВт}\cdot\text{см}^{-2}$ (в).

рис.4,в представлена типичная запись изменений ε и n при фотодинамическом воздействии, для чего в суспензию добавлен фотосенсибилизатор (диацетат гематопорфирина). Результаты подтверждают сделанный ранее вывод о том, что фотодинамический эффект является аналогом СКЭ [11].

Из рис.5 следует, что «детальная обратимость» биоэффектов, обнаруженная ранее при регистрации деформируемости эритроцитов при остановке облучения и подробно рассмотренная в [11], столь же отчетливо проявляется и в изменениях показателя преломления внеклеточной среды.

3.1.3. Спектр действия излучения на внеклеточную среду. К настоящему времени участие молекулярного кислорода в качестве первичного фотоакцептора биостимуляции подтверждено в четырех абсорбционных полосах O_2 с помощью регистрации спектра действия излучения на клеточную составляющую эритроцитарной сус-

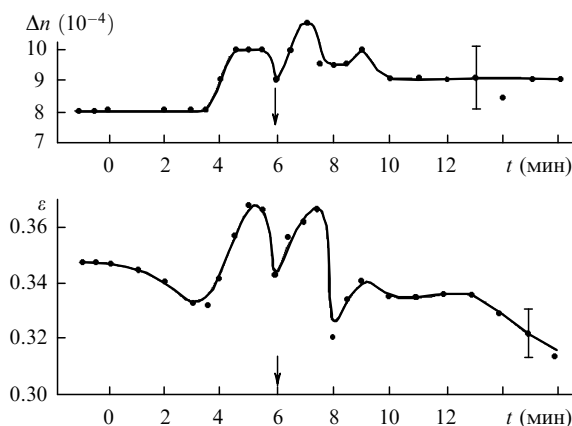


Рис.5. Обратимость фотоотклика суспензии эритроцитов после внезапного (указано стрелкой) прекращения облучения He-Ne-лазером с интенсивностью 13 мВт/см².

пензии [11]. Поэтому для идентификации того же эффекта по параметру, характеризующему состояние внеклеточной среды, можно ограничиться получением спектра действия в одной из ранее проверенных полос, например в полосе $^1\Sigma_g^+ \leftarrow ^3\Sigma_g^-$ (0-0 переход). В качестве источника излучения был использован лазер на александрите. Средняя интенсивность на поверхности суспензии поддерживалась постоянной и составляла около 40 мВт/см², объемная доля клеток ρ равнялась 0.5%, температура T была равна 26 °С. Другие условия экспериментов были сходны с описанными выше. Измерения выполнялись в течение одного дня на эритроцитах, приготовленных из крови одного донора.

На рис.6 показаны примеры реакции суспензии на облучение внутри спектрального интервала, в котором ожидается проявление биостимуляции. Видно, что во всех случаях временные зависимости имеют знакомую колоколообразную форму. Время выхода $n(t)$ на максимум зависит от длины волны и минимально для $\lambda = 762$ нм. Отметим, что если продолжать облучение, то на временной зависимости показателя преломления иногда наблюдаются повторные максимумы, тогда как де-

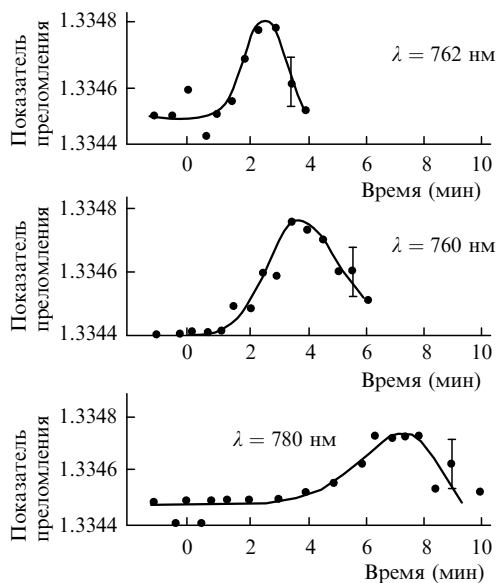


Рис.6. Изменение оптических свойств внеклеточной среды в суспензии эритроцитов, облучаемой лазером на александрите с момента $t = 0$ при интенсивности 40 мВт/см² на разных длинах волн.

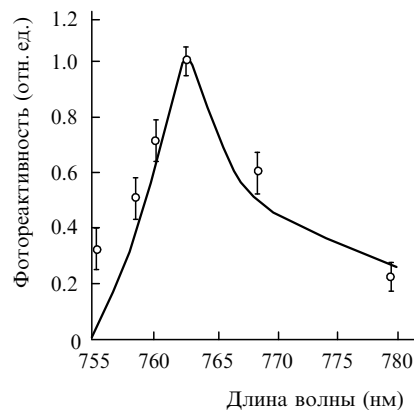


Рис.7. Спектр действия в окрестности полосы поглощения молекулярного кислорода $^1\Sigma_g^+ \leftarrow ^3\Sigma_g^-$, переход 0-0, измеренный с помощью контроля фотоотклика суспензии эритроцитов по показателю преломления внеклеточной среды (экспериментальные точки [32]). Для сравнения приведен аналогичный спектр действия из [35] (сплошная кривая), измеренный по фотоотклику деформируемости эритроцитов. Обе зависимости нормированы на одну ту же высоту в максимуме.

формируемость эритроцитов становится столь низкой, что перестает регистрироваться цитодифрактометром (движение эритроцитов переходит в режим «кувыркания» [29]). При количественной обработке зависимостей $n(t)$ учитывался первый из максимумов: определенная по нему скорость фотоотклика оказалась линейно связанной с интенсивностью q в выбранном диапазоне лазерной мощности.

Спектр действия в полосе 755–780 нм, построенный по данным, аналогичным приведенным на рис.6, представлен на рис.7 (экспериментальные точки). В качестве меры биологической эффективности облучения на каждой длине волны, как и в [11], принят параметр фотореактивности $\Omega_q \propto t_m^{-1}(\lambda)$, приведенный к одному значению интенсивности облучения q . На рис.7 для сравнения сплошной кривой показан спектр действия, полученный ранее с помощью измерений фотоотклика по деформируемости эритроцитов [35]. Идентичность хода обеих зависимостей свидетельствует о единстве механизмов, запускающих фотоиндуцированные эффекты в клетках и во внеклеточной среде, т. е. об их соответствии СКЭ.

3.1.4. Пространственная локализация оптических возмущений внеклеточной среды. Поскольку, согласно проведенной нами проверке, облучение исходного физраствора не вызывает в нем заметных изменений показателя преломления, то именно наличие клеток в растворе приводит к наблюдаемым оптическим возмущениям. На рис.8 представлена зависимость изменения показателя преломления от концентрации эритроцитов в суспензии,

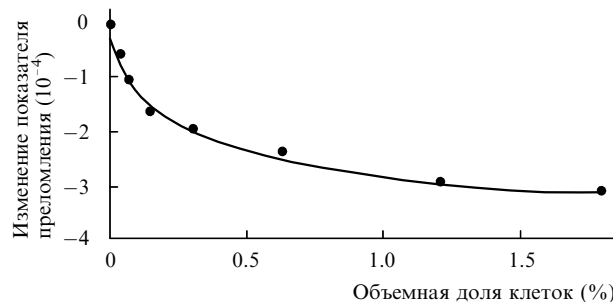


Рис.8. Концентрационная зависимость изменения показателя преломления Δn внеклеточной среды в суспензии эритроцитов.

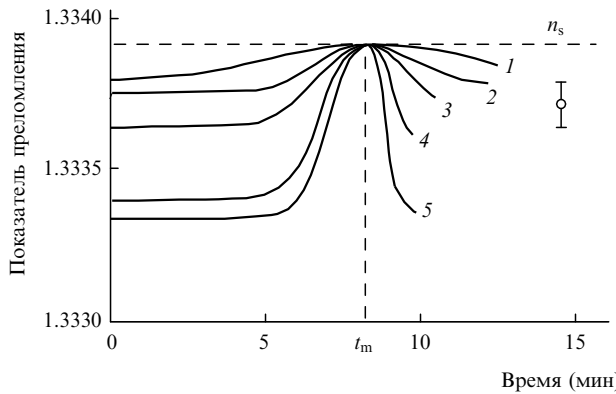


Рис.9. Независимость фотоотклика от концентрации эритроцитов в суспензии [65] при облучении He–Ne-лазером с интенсивностью 13.8 мВт/см², $T = 34.5^\circ\text{C}$ ($t = 0$ – начало облучения). Объемная доля эритроцитов составляет 0.075 % (кривая 1), 0.15 % (2), 0.3 % (3), 1 % (4), 1.5 % (5) (n_s – показатель преломления растворителя – буферного раствора).

выраженной в объемных долях ρ . По мере увеличения концентрации значения n уменьшаются, хотя показатель преломления самих эритроцитов (1.40 для $\lambda = 589$ нм [29]) заметно превышает $n = 1.33 - 1.34$ исходного раствора.

О том, насколько изменения концентрации клеток сказываются на проявлении пика стимуляции, можно судить по рис.9. В доступном для использованных методик диапазоне ρ и при одинаковых условиях облучения биостимуляция, регистрируемая по показателю преломления, возникает в один и тот же момент времени. Из данных рис.9 вытекает удивительный факт: в максимуме биостимуляции все кривые $n(t)$ одновременно достигают значения n_s , соответствующего исходному, т.е. свободному от клеток раствору. В момент $t = t_m$ оптические возмущения исчезают и клетки становятся как бы невидимыми для зондирующего луча рефрактометра.

Возникает вопрос: примыкает ли пространственная область оптических возмущений непосредственно к клеткам или изменения распределены равномерно по внеклеточной среде? Для ответа на этот вопрос был разработан и осуществлен прямой экспериментальный тест. Капля эритроцитарной суспензии ($\rho = 1\%$) помещалась в рабочий зазор рефрактометра Аббе. Прибор переворачивали, и эритроциты опускались в виде монослоя на верхнюю грань осветительной призмы, занявшую теперь нижнее положение. Затем быстро, но плавно рефрактометр возвращали в исходное положение ($t = 0$) и немедленно начинали отсчет его показаний (рис.10).

Первые значения n соответствовали показателю преломления физраствора: клетки находились еще далеко от зондирующего луча. В придонном слое их влияние проявлялось лишь спустя 10 с. Через 25 с значение n переставало меняться. Еще через 7–8 с начиналось массовое «приземление» клеток на грань измерительной призмы, что легко было заметить по развитию быстрых колебаний границы света и тени в зрительной трубе рефрактометра. Таким образом, слой с измененными оптическими свойствами прилегает к клеткам, распространяясь от них на ограниченное, хотя и значительное расстояние.

3.2. Растворы альбумина

Сывороточный альбумин – основной белковый компонент плазмы крови (его весовое содержание составляет

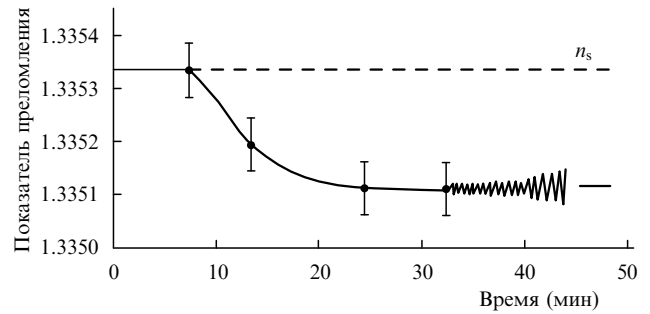


Рис.10. Кинетика седиментации монослоя эритроцитов в рабочем объеме рефрактометра Аббе. В момент $t = 0$ монослой находится в верхней части вблизи осветительной призмы. Быстропеременные изменения n (показаны условно) соответствуют оседанию эритроцитов на поверхность измерительной призмы рефрактометра.

4 %). Это трехдоменный глобулярный белок массой 65 кДа, по форме напоминающий вытянутый эллипсоид с размерами 3.4×17 нм. Пространственная структура BSA, полученная методом рентгеноструктурного анализа с разрешением около 0.6 нм, приведена в [36]. В плазме крови альбумин выполняет важные транспортные функции, переносит ионы кальция, триптофан, билирубин, аспирин и т. д. [37].

3.2.1. Эффекты тушителей синглетного кислорода. В первых экспериментах облучение белкового раствора выполнялось с помощью He–Ne-лазера. При интенсивности от 10 до 100 мВт/см² в растворе BSA регистрировался переходной процесс, подобный фотоотклику эритроцитов (рис.11,а). Аналогичная реакция на облучение наблюдалась и для раствора HSA. Фотоотклики BSA и HSA наблюдались как в солевом растворе, так и в дистилляте, причем времена их наибольшего проявления (t_m) при прочих равных условиях были примерно равны. Продолжая облучение, можно было добиться появления повторных максимумов. Было отмечено, что, как и в суспензии эритроцитов, в некоторых интервалах температур фотоиндуцированный эффект отсутствует (рис. 11,б).

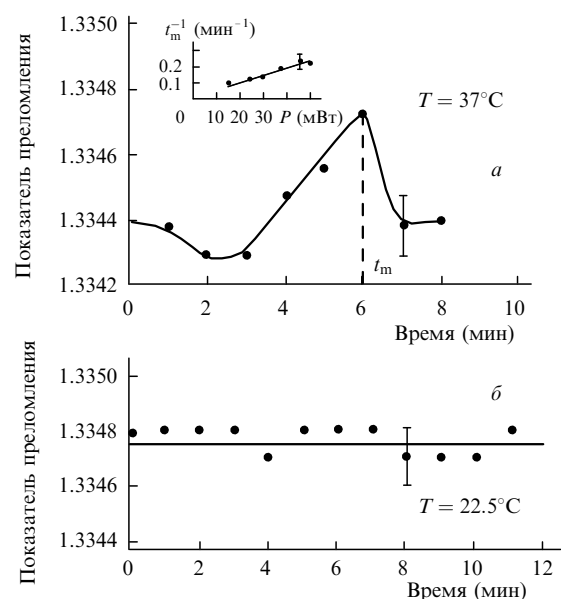


Рис.11. Фотоотклик раствора BSA, облучаемого с момента $t = 0$ He–Ne-лазером с интенсивностью 35 мВт/см², при весовой концентрации альбумина 0.3 % и различных температурах. На врезке – линейная характеристика биоэффекта.

Внесение в раствор белка перед облучением азидом натрия, который, как известно, является активным тушителем СК [38], замедляло проявление фотоиндуцированного эффекта, причем тем сильнее, чем выше была концентрация NaN_3 (рис.12).

3.2.2. Температурные аномалии. Зависимость показателя преломления раствора BSA в фосфатном буфере по мере повышения температуры от 8 до 50 °С со скоростью 1 К/мин показана на рис.13. По сравнению с монотонным спадом кривой для «чистого растворителя» монотонный ход зависимости $n(T)$ белкового раствора по крайней мере в двух температурных интервалах ($\Delta T_s = 26 - 30$ °С и $37 - 42$ °С) нарушается и происходит характерные аномальные сдвиги. На характер зависимости $n(T)$ влияет скорость нагрева dT/dt . При увеличении темпа подъема температуры в три раза аномальные сдвиги релаксируют быстро (1–3 мин), так что детали кривой $n(T)$ не удается надежно зарегистрировать.

Проверка показала, что фотоотклик раствора можно инициировать только внутри интервалов ΔT_s и только в течение времени существования аномалии на температурной зависимости. Пределы изменений показателя преломления на временных зависимостях фотоотклика (см. рис.11,а) соответствуют смещениям кривой $n(T)$ в зоне аномалий. Подобная особенность поведения параметров в суспензии эритроцитов описана выше (п.3.1.1). Внутри интервалов ΔT_s температурная зависимость показателя преломления раствора за время порядка нескольких десятков минут постепенно сглаживается до плавно спадающей кривой. Установлено, что фотоотклик $n(t)$ коррелирует с транспортной активностью альбумина. Константа связывания альбумина с простагландином Е увеличивается по мере приближения к максимуму

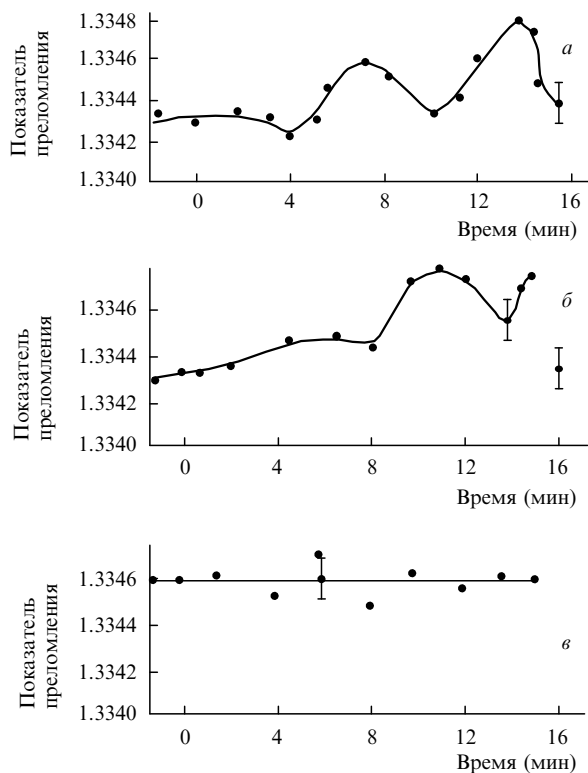


Рис.12. Замедление фотоиндуцированного эффекта в 0.3 %-ном растворе BSA азидом натрия: без тушителя (а) и с добавлением 1 мМ NaN_3 (б), 5 мМ NaN_3 (в) при $\lambda = 760$ нм, средней мощности 70 мВт, площади облучаемой поверхности 3 см² и $T = 37$ °С.

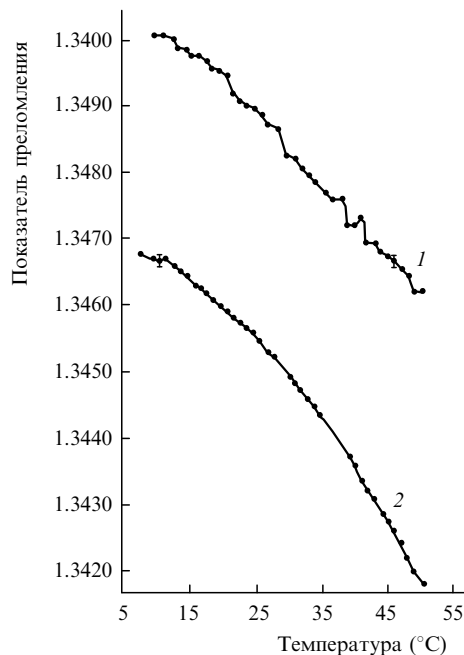


Рис.13. Температурная зависимость показателя преломления 2 %-ного раствора BSA в фосфатном буфере (1) и «чистого» буферного раствора (2) при скорости подъема температуры 1 К/мин.

фото-стимуляции и после перехода через пиковое значение вновь падает [39].

3.2.3. Спектр действия. При измерениях спектра действия вблизи той же полосы $^1\Sigma_g^+ \leftarrow ^3\Sigma_g^-$ молекулярного кислорода использовался лазер на александрите со средней мощностью $P = 80$ мВт, плавно перестраиваемый по длине волны в пределах 755–780 нм. В процессе облучения исследуемый раствор BSA объемом 6 мл перемешивался в стеклянной колбе диаметром 1 см с помощью магнитной мешалки. Температура раствора в колбе и в рефрактометре Аббе поддерживалась около 26 °С, отбор проб для измерений объемом 30 мкл производился через 0.5–1 мин. Внутри спектрального интервала 755–780 нм для облучения были выбрано шесть длин волн, для каждой из которых строилась зависимость показаний рефрактометра от времени, начиная с момента включения лазера $t = 0$ (рис.14). На ней определялись положение максимума и соответствующий ему момент t_m . Обратная величина ($t_m^{-1} \propto \Omega$) использовалась как мера относительной спектральной эффективности облучения. Линейность связи между Ω и мощностью излучения проверялась на $\lambda = 760$ нм.

Полученный в этих экспериментах спектр действия представлен на рис.15. Экспериментальные точки выявляют спектральную полосу фоточувствительности, форма контура которой, ширина и положение максимума соответствуют ранее полученным спектрам действия для эритроцитов (см. рис.7) Тем самым светокислородный механизм структурных изменений раствора альбумина, происходящих под влиянием облучения в данной полосе поглощения кислорода, можно считать установленным.

3.2.4. Влияние измерительных устройств и нестационарные эффекты. Известно немало сообщений, отрицающих эффекты биостимуляции. В ряде случаев это может быть обусловлено неадекватностью экспериментальной методики. Об этом свидетельствуют результаты контроля фотоотклика $n(t)$ с помощью двух типов рефрактометров [39]. Облучение раствора BSA производилось

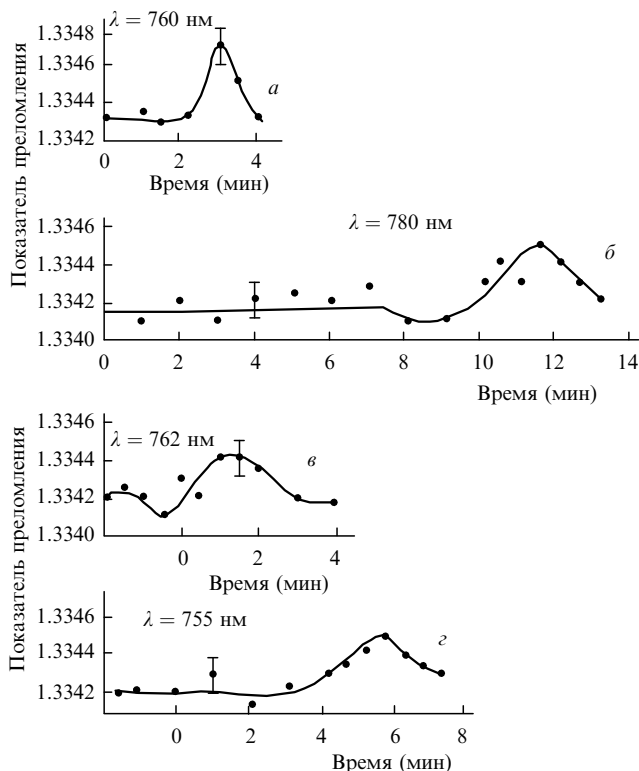


Рис.14. Фотоотклик 0.3%-ного раствора BSA, облучаемого на разных длинах волн лазером на александрите; средняя мощность 80 мВт, площадь облучаемой поверхности 3 см², $T = 37^\circ\text{C}$, начало облучения при $t = 0$.

He–Ne-лазером в кювете рефрактометра Пульфриха, откуда периодически производился отбор образцов жидкости для контроля на рефрактометре Аббе. В последнем случае регистрировалась обычная куполообразная зависимость $n(t)$ с максимальной амплитудой Δn_m , тогда как в первом наблюдался разброс (широкая полоса) значений Δn ($\Delta n \approx \Delta n_m$), на который не оказывали заметного влияния ни облучение, ни перемешивание (кроме пропускания через микропипетку). Полоса постепенно стягивалась со стороны нижней границы с характерным временем τ_s , зависящим не только от стабилизируемой температуры T_s , но и от скорости нагрева, предшествующего приходу в «точку» T_s . Значение τ_s было наибольшим (до 30–60 мин) в интервалах температурных скачков ΔT_s (см. п.3.2.2) и малым (менее 3 мин) вне ΔT_s , где фотоотклик раствора вовсе не фиксировался.

3.2.5. Взаимодействие белок–клетка. Эксперименты, изложенные выше, проводились с эритроцитарными суспензиями и растворами альбумина. Оба этих объекта являются идеализированными моделями, поскольку не существуют в организме по отдельности. Желательно было проверить, изменятся ли оптические свойства среды при объединении эритроцитов и альбумина, имеющих разную степень активности, в единую систему.

В отдельные кюветы одновременно были отобраны две одинаковые порции 0.3 %-ного раствора BSA. В первую кювету сразу были добавлены необлученные эритроциты, но показания рефрактометра Аббе практически не изменились (рис.16). Раствор BSA во второй кювете в тот же момент времени начали облучать He–Ne-лазером. В предварительных опытах было установлено, что пик фотостимуляции раствора BSA в этих условиях воз-

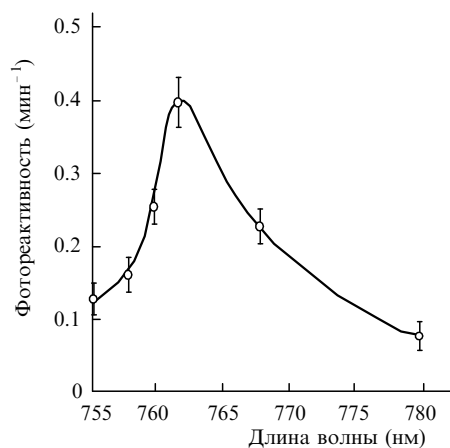


Рис.15. Спектр действия излучения на раствор BSA. Используются данные, аналогичные приведенным на рис.14.

никает на 11-й минуте от начала облучения. Именно в этот момент лазер был выключен, и в раствор BSA добавили необлученные эритроциты. При этом был зарегистрирован сложный процесс релаксационного типа, причем конечное значение показателя преломления установилось на уровне, не присущем ни белку, ни эритроцитам. Очевидно, между альбумином и эритроцитами существует взаимодействие с достаточно быстрым временем обмена (порядка 1 мин).

4. Обсуждение

4.1. Методические замечания

4.1.1. При интерпретации результатов особое внимание необходимо уделить вопросу, насколько корректно измерения показателя преломления в эритроцитарных суспензиях отражают изменения оптических свойств внеклеточной среды. Предположим, что прибор настроен таким образом, что угол падения луча φ_{in} , направляемого из прозрачной жидкости (физраствора) в кювете на верхнюю грань измерительной призмы, меньше $\pi/2$, т. е. скольжение луча вдоль грани отсутствует. Тогда вполне допустимо, что после ввода суспензии в рефрактометр некоторые лучи, рассеянные на клетках, окажутся скользящими ($\varphi'_{in} = \pi/2$). Это вызовет небольшое увеличение наблюдаемого предельного угла преломления ($\delta' \varphi_r > 0$)

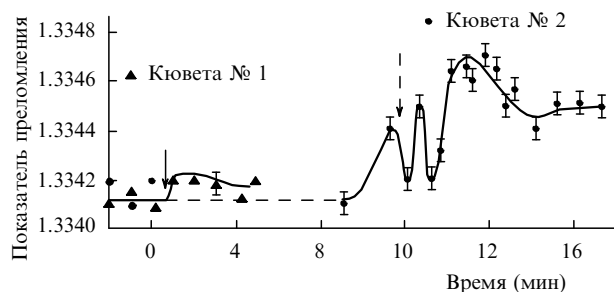


Рис.16. Влияние облученного He–Ne-лазером раствора альбумина на оптические свойства объединенной системы после внесения в раствор эритроцитов. Одинаковые порции исходного раствора BSA помещены в кюветы, одна из которых (№ 2) облучается с момента $t = 0$. Клетки добавлены в кювету № 1 с необлученным раствором (сплошная стрелка) и в кювету № 2 с облученным раствором после достижения максимума фотоотклика BSA (штриховая стрелка); весовая концентрация BSA равна 0.3 %, объемная концентрация эритроцитов – 0.3 %, $T = 27^\circ\text{C}$.

и соответственно приведет к появлению систематической ошибки. Легко видеть, что в нашем случае предельный угол преломления в результате ввода клеток в растворитель изменяется в противоположную сторону. Действительно, из рис.9 следует, что при $t = 0$ показатель преломления меньше соответствующего значения для исходного физраствора, что влечет за собой уменьшение наблюдаемого предельного угла преломления ($\delta\varphi_r < 0$). Таким образом, данный фактор не может внести ошибку в результаты измерений. Аналогичный вывод справедлив и для других вариантов изменения хода лучей в суспензии, например вследствие световодного эффекта, возникающего из-за разности показателей преломления клеток и измерительной призмы.

Предположим далее, что клетки из-за особых адгезивных свойств сразу при вводе в рефрактометр прилипают к его поверхности, но затем в результате лазерного облучения теряют эти свойства, благодаря чему вблизи $t = t_m$ (см. рис.2,а) регистрируется показатель преломления чистого физраствора. Однако показатель преломления клеток больше, чем n физраствора (1.40 и 1.33 соответственно). В случае прилипания при $t = 0$ должно регистрироваться увеличение показателя преломления, тогда как он, напротив, уменьшается (см. рис.9).

4.1.2. Соотнесение степени деформируемости эритроцитов с уровнем их активации/инактивации основано на том, что повышенная жесткость эритроцитов наблюдается только в неблагоприятных условиях, например при интоксикации. Она не позволяет им проникать сквозь кровеносные капилляры с диаметром, меньшим диаметра эритроцитарного диска, что затрудняет доставку кислорода к тканевым клеткам организма.

4.1.3. При фотостимуляции эритроцитов были приняты меры для обеспечения практически полного поглощения света в образце суспензии. Согласованное изменение коэффициента деформируемости клеток в условиях неравномерного облучения свидетельствует о кооперативном характере переноса возбуждения в умеренно разбавленных суспензиях [11]. В экспериментах с белковыми растворами спектр действия измерялся при одинаковых условиях облучения так, чтобы поглощалась одна и та же часть падающего потока.

4.1.4. Молекулярный кислород поглощает свет на 5–6 порядков слабее гемоглобина (Hb). Возникает вопрос: не подвергается ли гемоглобин в процессе СКЭ фотохимическим превращениям? Проверка была выполнена двумя методами: путем сравнения дифракционной картины для седиментированных клеток в цитодифрактометре до облучения и в максимуме фотостимуляции, а также спектрометрическим способом, при контроле в эритроцитах изменения кинетики обратимого связывания $Hb-O_2$ при фотолизе оксигемоглобина в процессе СКЭ [6]. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии достоверных фотоиндуцированных изменений в оксигемоглобине.

4.1.5. Рассмотрим подробнее вероятную причину, по которой на канал физического тушения СК до сих пор не обращалось внимания. В подавляющем большинстве случаев о биологическом действии СК судили по результатам экспериментов с применением фотосенсибилизаторов. Сечение поглощения фотосенсибилизаторов ($\sim 10^{-16} - 10^{-17} \text{ см}^2$) на много порядков выше сечения поглощения молекулярного кислорода в воде ($\sim 10^{-22} \text{ см}^2$ или даже меньше) при квантовом выходе СК не менее

0.1 [22] и сравнимых значениях концентраций. С учетом разницы в интенсивностях облучения (1–2 порядка) можно ожидать, что в экспериментах по фотодинамическому воздействию скорость генерации СК на 5–6 порядков выше, чем при светокислородной стимуляции. Неудивительно, что при столь высокой наработке СК в биосистемах преобладают фотохимические реакции окисления. Недаром практически во всех работах по фотодинамическому воздействию упор делается на фотодеструкцию клеток, фототоксичность, ингибирование ферментов и т.п. [40]. Это замечание представляется справедливым и при регистрации люминесценции СК, когда обычно используются фотосенсибилизаторы [22].

4.2. Переходы в эритроцитах: аналогичность действия тепла и света

При постепенном изменении температуры в физиологической области (см. рис.3) одно состояние эритроцитов с повышенной деформируемостью (ϵ_a) сменяется другим аналогичным состоянием, проходя всякий раз через зону ΔT_s увеличенной жесткости клеток (см. п.3.1.1). Переход из одного состояния в другое обратим надлежащим сдвигом температуры. Таким образом, фото- и термоактивация эритроцитов являются одинаково эффективными. Это наводит на мысль, что в их основе лежат структурные перестройки, связанные, возможно, с конформационными переходами в белках – интегральных ферментах, инкорпорированных в мембрану эритроцитов.

С тем же успехом светокислородную стимуляцию можно наблюдать и по изменениям показателя преломления внеклеточной среды до максимально возможного значения, соответствующего показателю преломления растворителя (буфера) (рис.9). Изменения оптических свойств среды происходят одновременно с изменениями коэффициента деформируемости эритроцитов с точностью до временного разрешения экспериментальных методик ($\sim 10 \text{ с}$) (рис.4,а), причем столь же четко наблюдается феномен детальной обратимости (рис.5). Приближаясь к пику фотостимуляции, эритроциты освобождаются от сцепленной с ними структурированной воды (рис.9). Отметим, что температура 36.6°C соответствует активному состоянию эритроцитов (рис.3).

Тепловые эффекты в эритроцитах и их компонентах изучались и ранее. Измерения деформируемости «теней» (эритроцитов без гемоглобина) методом эктацитометрии [41] не выявили каких-либо особенностей в диапазоне $5-50^\circ\text{C}$ за исключением прогрессирующего увеличения жесткости мембран при температуре выше 40°C [42]. Измерения начальной скорости «продавливания» эритромаcсы сквозь фильтр показали, что в процессе нагрева при температуре около 18°C происходит увеличение деформируемости клеток, а при $49-50^\circ\text{C}$ – ее уменьшение [43], обусловленное, вероятно, денатурацией спектрина [44] – основного белка подмембранной сети эритроцита. Естественные и искусственные мембраны также проявляют аномалии температурной зависимости различных параметров при $15-20^\circ\text{C}$, что объясняется фазовыми переходами в липидной фазе мембраны [45].

Совокупность этих данных наводит на мысль, что обсуждаемые переходные процессы являются фазовыми переходами в эритроцитарной мембране. Они, по-видимому, обусловлены различной тепловой чувствительностью мембранных компонентов: переход $\Delta T_s^{(4)}$ связан,

вероятно, со структурной перестройкой липидов в билосе, а $\Delta T_s^{(1)}$ – с изменениями в структуре спектриновой сети.

4.3. Фотореактивация белков

Результаты эксперимента с добавлением азидата натрия в раствор альбумина (п.3.3.1), как и следовало ожидать, соответствуют выводу о прямой фотогенерации СК. С помощью данных рис.12 можно оценить степень замедления СКЭ тушителем и сравнить его с расчетной величиной χ_t вероятности выживания молекулы СК в результате взаимодействия с тушителем*.

Рассмотрим теперь тепловые эффекты. В растворах альбумина, как и в суспензии эритроцитов (п.3.1.1), СКЭ проявляется в определенных температурных зонах ($T_s = 26 - 30^\circ\text{C}$, $37 - 42^\circ\text{C}$, см. рис.13), причем в этих интервалах амплитуда фотоотклика соответствует амплитуде сдвигов Δl .

Скачкообразные изменения плавного хода температурных зависимостей параметров в белковых растворах наблюдались ранее различными методами – с помощью люминесцентных зондов, спиновых меток, изотопного обмена. В работе [49] было доказано, что такие аномальные участки соответствуют обратимым конформационным переходам в белковых молекулах. С целью анализа динамических изменений всей сетки водородных связей в макромолекулах авторы [49] разработали способ обработки данных ИК спектроскопии полосы поглощения, соответствующей валентным колебаниям группы C=O в полипептидной цепи белковой молекулы. Согласно их результатам, в BSA, растворенном в D₂O, по мере приближения к областям конформационных переходов (21 – 25°, 40 – 43°C) водородные связи внутри белка и между белком и водой постепенно ослабевают. В критической зоне вся сетка водородных связей перестраивается, восстанавливая прежнюю прочность. Изменения в других растворимых белках были идентичными. Авторы пришли к выводу, что переходы данного типа являются «уникальным свойством белков, обусловленным их генетически запрограммированной конструкцией» [49].

С учетом этого вывода и наблюдаемых в данной работе аналогий в поведении альбумина и эритроцитов естественно предположить, что в обнаруженных нами интервалах температурных аномалий ΔT_s происходят конформационные переходы белковых молекул, причем в интервале 37 – 42°C, вероятно, имеет место не один, а три близкорасположенных перехода. Белок как фермент при температурах внутри ΔT_s может находиться в состоянии термической инактивации. При этом из-за различия во временах релаксации подсистем «белок» и «вода» (быстрые флуктуации в макромолекуле не успевают отслеживаться структурой воды) водородные связи белка с водой в переходной области сильно напряжены.

Энергия, выделяющаяся при дезактивации СК в облучаемом растворе, способствует перестройке водородных связей на границе раздела подсистем и переходу белка в активное состояние.

Установлено, что фотостимуляция термически инактивированного альбумина приводит к повышению его способности переносить простагландин E, т. е. к увеличению его транспортной активности (п.3.2.2). Это дополнительно подтверждает то, что СКЭ инициирует в белковом растворе процесс, аналогичный фотореактивации [50].

В структурном отношении альбумин является типичным представителем глобулярных белков. Кроме того, полоса $^1\Sigma_g^+ \leftarrow ^3\Sigma_g^-$ не выделена из других абсорбционных полос молекулярного кислорода в отношении биологической активности. Поэтому следует ожидать, что развитие СКЭ будет происходить подобным образом в растворах других белков плазмы крови, способных к конформационным термопереходам, и во всех спектральных полосах поглощения O₂, соответствующих синглетным уровням возбуждения.

Светоокислородная фотореактивация ферментов и клеток, по-видимому, имеет прямое отношение к процессам *in vivo*. Связь между потерей активности ферментами и многими заболеваниями не вызывает сомнений. Патологические состояния, характеризующиеся отсутствием или снижением активности определенных ферментов (энзимопатии), могут быть обусловлены не только генетическими, но и посттрансляционными (возрастными) процессами, нарушениями способностей ферментов образовывать мультиферментные комплексы [51], а также иными причинами. Адекватной моделью светоокислородного действия является, по нашему мнению, фотореактивация супероксиддисмутазы, предварительно инактивированной сдвигом pH [52].

Другая значительная группа патологий имеет причинную связь с инактивацией тех или иных видов клеток. Можно ожидать, что светоокислородная терапия окажется эффективным методом лечения в случае, когда лежащие в основе патологических изменений структурные трансформации макромолекул принципиально обратимы. Мы полагаем, что именно такой механизм обеспечивает эффективность и неспецифичность внутривенного облучения крови He-Ne-лазерами.

4.4. Перестройки водной фазы и образование гидрогеля

Уменьшение показателя преломления внеклеточной среды при внесении в исходный буферный раствор инактивированных клеток наводит на мысль, что в водной среде устанавливается определенный структурный порядок. К такому заключению можно прийти, если учесть уникальное свойство воды – понижать показатель преломления при кристаллизации. В состоянии жидкости часть водородных связей разорвана и молекулы теснее примыкают друг к другу. При кристаллизации молекулы воды взаимно ориентируются и каждая из них связывается с четырьмя соседними, так что среднее число водородных связей на молекулу достигает предельного значения. В результате падает как плотность (0.92 против 0.999 г/см³), так и показатель преломления (1.309 у льда против 1.333). Когда в водной среде в изотермических условиях интегральное значение показателя преломления уменьшается, можно ожидать появления в системе

* В соответствии с формулой Штерна – Фальмера [46] $\chi = (1 + w\tau)^{-1}$, где $w = K_a C_a$ – вероятность тушения; $K_a = (5 \pm 0.4) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ – константа скорости тушения [47]; C_a – концентрация NaN₃; $\tau = 3.42 \times 10^{-6} \text{ c}$ – время жизни СК в отсутствие тушителя, определенное по затуханию люминесценции СК [48]. При $C_a = 1 \text{ mM}$ $\chi_t = 0.40$, тогда как по данным эксперимента $\chi_e = 0.7 \pm 0.2$. Соответствие можно считать удовлетворительным, если учесть, что значение τ было измерено в системе вода + фотосенсибилизатор. В результате дополнительного вклада в тушение СК белковых молекул значение τ может быть меньше и соответственно расчетная величина χ_t возрастает.

льдоподобных структур. По уменьшению Δl можно, в свою очередь, оценить объемную долю модифицированной воды.

Как следует из результатов эксперимента по влиянию фронта седиментирующих эритроцитов на показатель преломления (см. рис.10), область дополнительного структурирования не размазана по внеклеточной среде, а примыкает к клеткам. Размеры этой области нетрудно оценить. Нижняя граница скорости фронта седиментации определяется из формулы Стокса для одиночных эритроцитов, аппроксимированных эквивалентной сферой, и составляет 0.7×10^{-4} см/с. Верхняя граница скорости (3×10^{-4} см/с) оценивается с учетом взаимного влияния клеток во фронте седиментации и его неоднородности. Отсюда следует, что слой структурированной водной среды, примыкающий снаружи к поверхности инактивированного эритроцита, имеет толщину r_h не менее 5–10 мкм, что удовлетворительно согласуется с данными рис.8. В пике стимуляции структурирование в этом слое полностью исчезает (рис.9).

Использованные методики не позволяют выяснить тонкие детали структуры, однако наиболее общие особенности можно установить. Внешняя поверхность эритроцитарной мембраны имеет неоднородную микроструктуру, поэтому прилегающий к ней структурно модифицированный слой не может быть однородным. Сцепление слоя с клеткой происходит, по-видимому, в дискретных мембранных зонах (локусах) со специфической поверхностной архитектурой водородных связей. Белковые молекулы (ферменты) как нельзя лучше подходят для инициирования и сброса элементов гидроструктуры. Идею организации сцепления подсказывает конфигурация антифризных белков, защищающих насекомых от повреждающего действия низких температур [53, 54]. Положение атомов и ориентация водородных связей на уплощенной части (3.2×0.8 нм) поверхности этих белков, согласно данным рентгеноструктурного анализа [53] и анализа, проведенного с помощью ЯМР [54], с высокой точностью имитируют структуру грани кристаллической решетки гексагонального льда I_h .

В эритроцитарной мембране, вероятно, имеются белки, конфигурация поверхности которых способна имитировать фрагмент грани кристаллической льдоподобной решетки (но не I_h !). В таком случае на них, как на зародышах соответствующей фазы, могут наращиваться, а затем, возможно, объединяться в сеть динамические структуры из молекул H_2O . Их аналогом могут служить, например, волокна фуллеренов [55].

Количество подобных белковых молекул в расчете на одну клетку можно оценить, исходя из экспериментальных данных о показателе преломления n и протяженности слоя r_h и задав значения показателя преломления n_1 и диаметра d гидрволокон. Положим n_1 равным показателю преломления льда, а d – размеру имитирующих лед площадок антифризных белков. Воспользуемся формулой Лоренц–Лоренца для молекулярной рефракции $R = M(n^2 - 1)/\rho(n^2 + 2)$, а также правилом аддитивности рефракции для смеси двух веществ $R = (R_1N_1 + R_2N_2)/(N_1 + N_2)$ [56]. Здесь M – молекулярный вес воды; $\rho = \rho_1V_1 + \rho_2V_2$; R_1 , N_1 , ρ_1 , V_1 и R_2 , N_2 , ρ_2 , V_2 – рефракция, число молекул, плотность и относительный объем гидрволокон и структурно неизменной воды в слое соответственно, причем $V_1 + V_2 = 1$. Отсюда для относительного объема, занимаемого гидрволоконками в

слое, получим $V_1 = [M(n^2 - 1)/(n^2 + 2) - R_2\rho_2]/(R_1\rho_1 - R_2\rho_2)$. Подставляя $n = 1.3333$, $R_1 = 3.69$ см³, $R_2 = 3.71$ см³ [25], имеем $V_1 = 2.2 \times 10^{-2}$, т. е. гидрволоконка занимает около 2 % объема слоя. Оценим число гидрволокон в расчете на клетку: $N_0 = 4V_1V_2/(\pi d^2 r_h) = 16V_1[(r_c + r_h)^3 - r_c^3]/(3d^2 \times r_h) = 4.2 \times 10^6$ при среднем радиусе эритроцита $r_c = 2.8$ мкм, $r_h = 7.5$ мкм, $d = 1$ нм. Хотя точность данной оценки трудно определить, т. к. в числителе вычитаются почти равные величины, значение N_0 примерно соответствует числу гликопротеинов – основных интегральных ферментов эритроцитарной мембраны [57].

Таким образом, мы приходим к следующей картине. Прилегающая к мембране эритроцита область протяженностью 5–10 мкм представляет собой водный раствор, пронизанный пространственной сеткой льдоподобных волокон-наноструктур (гидрогель). Отдельные волокна гидрогеля, вероятно, являются не жестко фиксированными, а флуктуирующими образованиями, т. е. даже в равновесных условиях, исчезая в одном месте, они возникают в другом. Гидрогель образуется в инактивированных клетках (переходная зона ΔT_s) и распадается при сдвиге температуры на 3–4 °С или под влиянием генерируемого в суспензии СК (см. рис.9). Этот процесс, по-видимому, сопряжен с конформационными переходами «несущего» (сцепленного с гидрволоконками) мембранного фермента: в одной из конформаций белок имеет сродство к гидрогелю, в другой – нет. Переходы (мембрана плюс гидрогель – мембрана минус гидрогель) не могут не отражаться на вязкоупругих свойствах мембраны эритроцитов (рис.9). Синхронность временных и температурных изменений ε и n во всех опытах с клеточными суспензиями, по-видимому, объясняется тем, что соответствующие методики контролируют разные аспекты одного и того же процесса.

Механизм конформационных переходов альбумина при изменении температуры аналогичен механизму перестроек мембранных ферментов, формирующих гидрогель. Это вывод дополнительно подкреплен независимостью фотостимуляционных эффектов BSA и HAS от присутствия в растворе ионов солей при замене буфера на NaCl и дистиллят (п.3.3.1). Отсюда следует, что кулоновские взаимодействия в механизме фотостимуляции играют незначительную роль, и это, в свою очередь, согласуется с концепцией скоординированных структурных перестроек в белковой глобуле и в системе водородных связей ее ближайшего водного окружения.

Напрашивается вывод: инактивированный альбумин также способен образовывать гидрогель, чувствительный к фотоактивации. Длина волокон в таком гипотетическом образовании, вероятно, на несколько порядков меньше и соответствует размерам макромолекул и межмолекулярным расстояниям (~10 нм для альбумина в плазме крови). Вероятно, и другие белковые компоненты плазмы крови обладают аналогичными свойствами. Косвенным подтверждением образования гидрогелей в плазме крови в случае ряда патологий служат результаты работы [58], в которой методом корреляционной спектроскопии зарегистрировано сильное замедление диффузионного движения молекулярных компонентов плазмы при злокачественных новообразованиях.

4.5. Гидроструктурные взаимодействия

Большой интерес представляет динамическое поведение системы альбумин и эритроциты (п.3.2.4). Клеточная

суспензия и белковый раствор приготавливались по отдельности в состоянии, соответствующем инактивации. Их объединение не приводило к заметным структурным изменениям водной фазы (см. рис.16,*a*). Когда же эритроциты вводились в раствор белка, переведенный в фотостимулированное состояние, наблюдался сложный процесс релаксационного типа (рис.16,*b*). Установившееся значение показателя преломления в общей системе оказалось выше, чем у активированного белка. Разница, очевидно, возникла в результате перевода эритроцитов в более активное состояние.

В связи с этим мы приходим к заключению, что фотоактивированный альбумин индуцирует активацию эритроцитов. Это свидетельствует о возможности существования в биологических системах взаимодействий, связанных с перестройкой водных структур и сопряженных с изменениями конфигураций белковых молекул (гидроконформационные взаимодействия). Этот тип взаимодействий отвечает, по нашему мнению, за коллективизацию биоэффектов («генерализацию») лазерной терапии [3].

Необходимо учесть, что экспериментальные данные о динамике показателя преломления получены в условиях узкого слоя, прилегающего к поверхности измерительной призмы рефрактометра. Близость чужеродной поверхности может существенно изменить структуру воды [59] и исказить показания прибора. На эту мысль наводят данные п. 3.2.4. Применение слегка различающихся оптических схем, основанных на одном и том же принципе измерений – использовании ПВО (см. рис.1,*a, б*), демонстрирует очевидные различия результатов. Временная зависимость $n(t)$ фотостимуляции раствора альбумина в рефрактометре Аббе имеет обычный вид (латентный период, «разгорание», спад), тогда как в рефрактометре Пульфриха наблюдается широкая полоса значений Δn между устойчивой верхней границей и неустойчивой нижней.

Эти различия можно объяснить, если принять во внимание разную геометрию оптического зондирования. В первом случае (рефрактометр Аббе) луч скользит в кювете вдоль поверхности плоской призмы, а во втором – касается поверхности в узкой зоне на вершине сферической призмы, проходя основную часть пути по объему белкового раствора. Полоса Δn свидетельствует о существовании в объеме раствора оптических неоднородностей, размер которых, согласно теории [60], превышает длину волны света (589 нм). Другими словами, раствор состоит из макроскопических и, вероятно, взаимодействующих доменов, распределенных по возможным структурным состояниям – от термически дезактивированного до предельно активированного (см. п.4.3), или включает их в себя. Фотостимуляция объема не отражается заметным образом на характере распределения. Однако достаточно пропустить раствор через микропипетку, тем самым осуществив его кратковременное сближение с поверхностью, чтобы однозначно выявить фазу фотостимуляции $n(t)$ (п.3.2.4).

Отсюда следует, что исходная информация о поглощенной дозе СК в объеме раствора (память раствора) заключена не столько в структуре водородных связей, сколько в какой-то иной динамической системе более глубокого уровня, не проявляющейся в изменениях показателя преломления. Сближение с поверхностью инициирует переход накопленной информации и энергии в

энергию структурных перестроек макромолекул и гидрогеля и снимает структурное вырождение раствора. Отметим, что поверхность при этом не обязательно должна быть чужеродной: в суспензии эритроцитов эту роль, по-видимому, выполняют биомембраны.

4.6. О механизме ранних стадий биостимуляции

Приходится констатировать, что «водная гипотеза» [15, 23], выдвинутая для объяснения механизма активации клеток при СКЭ, нуждается в существенной корректировке. Не выявлено изменений, которые свидетельствовали бы о структурной модификации водной «матрицы» в целом. Напротив, области перестройки воды локализованы у поверхности клеток и белков, образуя гидрогель. Эти структуры метастабильны, они могут существовать несколько часов у эритроцитов и десятки минут у альбуминов и только в определенных температурных интервалах. Соответствующие им переходные состояния клеток и ферментов сопряжены с фазовыми переходами в биомембранах и с конформационными переходами в белках. В таких состояниях и клетки и белки обладают пониженной функциональной активностью.

Облучение в полосах поглощения кислорода вызывает их фотореактивацию. При этом в системе развивается коллективный процесс, характерной особенностью которого является первоначальное накопление скрытых изменений. Эритроциты и альбумин в разных стадиях активации взаимодействуют между собой посредством механизма гидроструктурного типа, действующего, по-видимому, на очень больших расстояниях.

Недостаток данных препятствует пока формулировке количественной модели начальных стадий СКЭ, поэтому приведем здесь некоторые предварительные соображения. Рассмотрим влияние молекулярного кислорода на динамическую микроструктуру водной среды. Известно, что даже под давлением кислород растворяется в воде до определенного предела ($c_{\text{ок}} \sim 10^{18} \text{ см}^{-3}$). Этот факт наводит на мысль, что вокруг молекул кислорода могут существовать водные кластеры размером порядка $c_{\text{ок}}^{-1/3} \sim 10 \text{ нм}$, содержащие примерно 10^5 молекул H_2O . Поскольку кулоновские взаимодействия между молекулами кислорода и воды отсутствуют, а дисперсионные силы спадают быстро ($\sim r^{-6}$), остается рассмотреть магнитное взаимодействие между парамагнетиком O_2 и ядерными моментами протонов воды. Хотя ядерный магнитный момент на три порядка меньше электронного, соотношение молекул $\text{O}_2 : \text{H}_2\text{O} = 1 : 10^5$ в кластерах допускает, в принципе, их существование при участии магнитных сил. К тому же дипольное (магнитное) взаимодействие убывает с расстоянием как r^{-3} , тогда как число молекул H_2O в сфере, окружающей выделенный центр, растет пропорционально r^3 .

Таким образом, магнитные силы неспаренных электронных спинов кислорода могли бы оказать ориентирующее влияние на спины протонов в кластере, однако этому препятствуют тепловые флуктуации. Другими словами, такое действие невозможно объяснить с позиций статического равновесия, т. к. в нормальных условиях $\mu_B B \sim 10^{-7} kT$ (индукция земного поля $B \approx 0.5 \text{ Гс}$, $T = 300 \text{ К}$). Поэтому приходится предположить наличие взаимной корреляции кластеров внутри более крупных ансамблей (доменов) в результате неравновесного процесса. Общие принципы структурообразования в подобных процессах разработаны И.Пригожиным и его шко-

лой. Ими же введено понятие диссипативных структур [61]. Упорядоченные структуры образуются в среде под действием потоков энергии и энтропии в самых разных физических, химических и биологических объектах [62].

Предполагается, что в биосистеме, содержащей растворенный кислород, существует перенос магнитного порядка (спиновых волн [63]) от молекул кислорода на белки и клетки. Система магнитных моментов электронных спинов в молекулах O_2 задает свой ритм магнитным моментам протонов. В простейшей модели электронные спины с почти равной вероятностью совершают перескоки вверх и вниз вдоль выделенного направления (магнитного поля Земли), и на них накладывается модуляция частоты с волновым вектором k .

Граничная частота таких волн может быть оценена из энергии спин-спинового взаимодействия редкоземельных ионов (например, Er^{3+}) в лазерных кристаллах как $\omega_{sp} \sim 10^{10} - 10^{11}$ Гц [64]. При законе дисперсии $\omega^2 = \omega_{sp}^2 (1 + a^2 k)$, где a – среднее расстояние между молекулами H_2O в воде, групповая скорость $d\omega/dk = \omega_{sp} a^2 k \sim 2 \times (10^2 - 10^3)$ см/с для $k = c_{ox}^{1/3}$. Интересно отметить, что частоты ω_{sp} попадают в область микроволн, а групповая скорость примерно соответствует скорости нервного импульса. Спиновые волны распространяются по водородным связям водной среды, в первую очередь через развитую поверхность гидрогеля. В результате спин-орбитальных взаимодействий ритм спиновых волн сопрягается с ритмом пульсаций электронной подсистемы биомолекул.

В качестве критерия динамической устойчивости образованного кластерами домена примем условие десятикратного превышения его магнитной энергии над тепловой: $\sum \mu B \geq 10 kT$, где μ – электронный магнитный момент молекулы кислорода, а суммирование производится по всему объему домена. Тогда минимальный объем, в котором перескоки спинов происходят коррелированно, определится из выражения $V_{min} = 10kT/(c_{ox}\mu_B B)$. Для $B = 0.5$ Гс и $T = 300$ К имеем $V_{min} = 10^{-10}$ см³, что соответствует линейному размеру $d_{min} \sim 5 \times 10^{-4}$ см. Полученное значение, в свою очередь, соответствует оптическим неоднородностям $\sim \lambda$ в объеме белкового раствора (п. 4.5). Отметим, что экранируя земное поле, скажем, в 10^3 раз (тогда $d_{min} \sim 50$ мкм), можно осуществить простую проверку данной модели: в подвешенной капле такого размера (в отсутствие стенок!) равновесная концентрация растворенного кислорода может превысить c_{ox} .

При дезактивации СК выделение энергии сопровождается возмущением магнитного порядка, т. к. на молекуле кислорода почти мгновенно ($\sim 10^{-14}$ с) возникает большой магнитный момент. Часть энергии переходит в подсистему спиновых волн, а другая часть релаксирует на элементах гидрогеля. По мере облучения в биосистеме происходит рассогласование модовой структуры спиновых волн и динамической структуры белков. При определенной дозе СК возникает неустойчивость и развивается процесс (фазовый переход) преобразования запасенной магнитной энергии в энергию перестройки структур клеток (белков).

Из модели следует, что тепловые флуктуации в биосистеме могут быть коррелированными. Этот вывод согласуется с современной теорией теплоты, поскольку предполагается, что время корреляции конечно и связано с частотой спиновых волн таким образом, чтобы имела место временная фрактальность.

5. Заключение

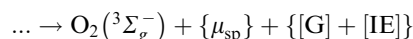
Применение новых экспериментальных методов позволяет обнаружить структурные образования воды в неравновесных биосистемах и изучить их динамические свойства, проявляющиеся под действием тепла и света. Будучи неотъемлемой частью биомолекул в процессе их адаптации к изменяющимся внешним факторам, эти структуры (гидрогель) выполняют разнообразные функции, в том числе поддержания целостности клеток и растворенных ферментов при фазовых и конформационных переходах и передачи информационных сигналов. Обнаруженные в данной работе гидроконформационные взаимодействия играют, вероятно, особенно важную роль, обеспечивая наряду с известными каналами информации коллективный характер реакции биологических систем на слабые и сверхслабые воздействия.

Светокислородный эффект является одним из примеров такого воздействия. Для его запуска растворенному в биосистеме молекулярному кислороду достаточно поглотить всего $\sim 10^{-7} - 10^{-8}$ Дж световой энергии. Несомненным преимуществом СКЭ является однозначно установленный первичный фотофизический акт. Светокислородное воздействие обладает высокой эффективностью фотореактивации клеток и белков.

Полученные результаты могут быть использованы для разработки научных основ так называемой низкоинтенсивной лазерной терапии и объяснения таких ее свойств как неспецифичность по отношению к лечению заболеваний разной этиологии и генерализация эффектов на весь организм. СКЭ может инициировать активацию любых обратимо поврежденных компонентов крови, не оказывая воздействия на клетки и белки, находящиеся в активном состоянии. В оказании воздействия на организм в целом важная роль должна быть отведена гидроконформационным связям.

В представленной концепции ранних стадий СКЭ на первое место выдвигаются взаимодействия между магнитными моментами электронов триплетных молекул растворенного кислорода и протонов в молекулах воды. Предполагается, что в кислородосодержащих биологических системах существуют потоки магнитной энергии (спиновые волны), распространяющиеся от триплетных молекул кислорода по водородным связям на электронную подсистему биомолекул. Под влиянием этих потоков в биосистемах индуцируются метастабильные гидро- и магнитоструктурные образования (домены из кластеров вокруг кислородных молекул, гидрогели), аналогичные диссипативным структурам И.Пригожина, но не сводимые к ним. Необходимая для этого энергия, возможно, черпается из теплового «резервуара».

К упрощенной схеме механизма светокислородного эффекта (1) предлагается добавить следующие стадии:



→ неустойчивость → РТ,

где $\{\mu_{sp}\}$ – изменения в пространственно-временной структуре гипотетических спиновых волн в биосистеме (магнитная энергия); $\{[G] + [IE]\}$ – изменения в структуре гидрогеля и конформации несущих гидрогель мембранных белков (электрическая энергия внутри- и межмолекулярных связей) соответственно; РТ – фазовый переход в биосистеме.

Аналогия между термоиндуцированными фазовыми переходами и светоокислородными перестройками, обнаруженная в белках и клетках, заставляет по-новому подойти к осмыслению физической природы светоокислородного эффекта. В высокоскоординированных процессах, какими являются обратимая реактивация ферментов и, тем более, плазматической мембраны, воздействие «стандартных» квантов возбужденного кислорода оказывается эквивалентным незначительному изменению энергии ($\Delta kT \sim 1\%$) тепловых флуктуаций. Выяснение причин такой эквивалентности будет, вероятно, труднейшей биофизической задачей и в случае ее решения может, по нашему мнению, изменить направление научных исследований. В связи с этим уместно привести слова Е.П.Блаватской: «Теплота есть остановленный свет» [66].

В заключение авторы хотели бы отдать дань благодарности своим научным руководителям Нобелевским лауреатам Н.Г.Басову и А.М.Прохорову, поддержавшим исследования на поворотных этапах, Э.В.Балашову, направлявшему процесс анализа данных и осмысления теоретической концепции, и Л.Р.Захаровой, которой принадлежит термин «светоокислородный эффект» и многие из идей, развиваемых в настоящей работе. Авторы признательны А.А.Красновскому за полезные критические замечания, В.Н.Якуниной и П.В.Казакевичу – за помощь в подготовке рукописи.

1. Тимирязев К.А. *Жизнь растения* (М.: изд-е А.Калужского, 1878).
2. Мешалкин Е.Н., Сергиевский В.С. *Применение прямого лазерного излучения в экспериментальной и клинической медицине* (Новосибирск: Наука, 1981).
3. Корочкин И.М., Бабенко Е.В. *Сов. медицина*, № 3, 38 (1990).
4. Конев С.В., Лыскова Т.И., Прокопова Ж.В. *Докл. АН УССР*, 6, 51 (1970).
5. Рубин Л.Б., Еремеева О.В., Фрайкин Г.Я., Швинка Ю.Э. *ДАН СССР*, 210, 971 (1973).
6. Чудновский В.М., Леонова Г.Н., Скопинов С.А. и др. *Биологические модели и физические механизмы лазерной терапии* (Владивосток: Дальнаука, 2002).
7. Басов Н.Г. *О квантовой электронике* (М.: Наука, 1987, с. 72).
8. Амбарцумян Р.В. *Устное сообщение* (1985).
9. Захаров С.Д., Еремеев Б.В., Перов С.Н. *Кр. сообщ. физ. ФИАН*, № 1, 15 (1989).
10. Захаров С.Д., Еремеев Б.В., Перов С.Н., Панасенко Н.А. В сб. *Методы лазерной биофизики и их применение в медицине* (Тарту: изд. ТГУ, 1989, с.23).
11. Захаров С.Д., Иванов А.В. *Квантовая электроника*, 29, 192 (1999).
12. Johnson C.C., Guy A.W. *Proc. IEEE Int. Soc. Opt. Eng.*, 60, 692 (1972).
13. Волькенштейн М.В. *Биофизика* (М.: Наука, 1981).
14. Еремеев Б.В. *Канд. дисс.* (М., ФИАН, 1990).
15. Захаров С.Д., Минц Р.И., Скопинов С.А., Чудновский В.М. В сб. *Действие электромагнитного излучения на биологические объекты и лазерная медицина* (Владивосток: изд. ДО АН СССР, 1989, с.41).
16. Бурлакова Е.Б. *Рос. хим. ж.*, 43, 3 (1999).
17. Long C., Kearns D.R. *J. Chem. Phys.*, 59, 5729 (1973).
18. Scurlock R.D., Wang V., Ogilby P.R. *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 388 (1986).
19. Шинкаренко Н.В., Алесковский В.Б. *Успехи химии*, 51, 713 (1982).
20. Krinsky N.I. In: *Singlet Oxygen* (New York: Acad. Press, 1979, p.587).
21. Foote C.C. In: *Singlet Oxygen* (New York: Acad. Press, 1979, p.139).
22. Красновский А.А. *Биологич. мембраны*, 15, 530 (1998).
23. Захаров С.Д., Скопинов С.А., Чудновский В.М. *Изв. АН СССР. Сер. физич.*, 54, 1629 (1990).
24. Минц Р.И., Скопинов С.А. и др. *Письма в ЖТФ*, 14, 1850 (1988).
25. Бапанов С.С. *Структурная рефрактометрия* (М.: Высшая школа, 1976).
26. Зельдович Б.Я., Райзер Ю.П. *Физика ударных волн и высокотемпературных гидродинамических явлений* (М.: Наука, 1966, с.608).
27. Захаров С.Д., Перов С.Н., Панасенко Н.А. *Кр. сообщ. физ. ФИАН*, № 1, 26 (1989).
28. Иоффе Б.В. *Рефрактометрические методы химии* (Л.: Химия, 1983).
29. Левтов В.А., Регирер С.А., Шадрин Н.Х. *Реология крови* (М.: Медицина, 1982).
30. Сетлоу Р., Поллард Э. *Молекулярная биофизика* (М.: Мир, 1964).
31. Немцев И.З., Захаров С.Д., Лапшин В.П. и др. *Авиакосмич. экологич. медицина*, № 2, 57 (1992).
32. Букин Г.В., Вольф Е.Б., Данилов В.П., Захаров С.Д., Иванов А.В. и др. *Кр. сообщ. физ. ФИАН*, № 1, 18 (1991).
33. Захаров С.Д., Скопинов С.А., Панасенко Н.А., Перов С.Н. и др. *Кр. сообщ. физ. ФИАН*, № 3, 12 (1990).
34. Захаров С.Д., Еремеев Б.В., Вийгима М.В., Тээсалу Р.В. *Мед. физика*, № 8, 48 (2000).
35. Данилов В.П., Захаров С.Д., Иванов А.В., Мурина Т.М. и др. *ДАН СССР*, 311, 1255 (1990).
36. Carter D.C., et al. *Science*, 244, 1195 (1989).
37. Грин Н., Стаут У., Тейлор Д. *Биология* (М.: Мир, 1990).
38. Valenzano D.P. *Photochem. Photobiol.*, 46, 147 (1987).
39. Вольф Е.Б. *Канд. дисс.* (Екатеринбург, УПИ, 1995).
40. Фут К. В сб. *Свободные радикалы в биологии* (М.: Мир, 1979, т.2, с.96).
41. Groner W., Mohandas N., Bessis M. *Clin. Chem.*, 26, 1435 (1980).
42. Brenda P.H., Mohandas N., Wyatt J.L., Shohet S.B. *Biochim. Biophys. Acta*, 591, 211 (1982).
43. Hanss M., Koutsouris D. *Biochim. Biophys. Acta*, 769, 461 (1984).
44. Yoshino H., Minari O. *Biochim. Biophys. Acta*, 905, 100 (1987).
45. Huang C., Mason J. *Biochim. Biophys. Acta*, 864, 423 (1986).
46. Гиллет Дж. *Фотофизика и фотохимия полимеров* (М.: Мир, 1988).
47. Haag W.R., Mill T. *Photochem. Photobiol.*, 45, 317 (1987).
48. Shimizu O., Watanabe J., Imakubo K. *J. Phys. Soc. Japan*, 66, 268 (1997).
49. Жуковский А.П., Халоимов А.И., Ровнов Н.В., Раев А.Н., Солонен И. В сб. *Состояние воды в различных физико-химических системах* (Л.: изд. ЛГУ, 1986, с.105).
50. Sutherland V.M. *Photochem. Photobiol.*, 25, 413 (1977).
51. Фридрих П. *Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы* (М.: Мир, 1986).
52. Горбатенкова Е.А. и др. *ДАН СССР*, 299, 995 (1988).
53. Liou Y.-C. et al. *Nature (London)*, 406, 322 (2000).
54. Graether S.P. et al. *Nature (London)*, 406, 325 (2000).
55. Соколов В.И., Станкевич И.В. *Успехи химии*, 62, 455 (1993).
56. Борн М., Вольф Э. *Основы оптики* (М.: Наука, 1970).
57. Хьюз Р. *Гликопротеины* (М.: Мир, 1985).
58. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М.: Алексеев С.В., Иванов А.В. *Вестник МГУ*, № 5, 49 (2002).
59. Фесенко Е.Е., Терпугов Е.Л. *Биофизика*, 44, 5, (1999).
60. Исмамару А. *Распространение и рассеяние волн в случайно-неоднородных средах* (М.: Мир, 1981).
61. Николс Г., Пригожин И. *Саморганизация в неравновесных структурах* (М.: Мир, 1979).
62. Хакен Г. *Синергетика* (М.: Мир, 1980).
63. Лахно В.Д. *Электронные механизмы усиления спиновых волн* (Пушино: НЦБИ, 1989).
64. Кулагин Н.А., Свиридов Д.Т. *Методы расчета электронных структур свободных и примесных ионов* (М.: Наука, 1986).
65. Захаров С.Д., Скопинов С.А. и др. *Изв. АН СССР. Сер. физич.*, 54, 1629 (1990).
66. Блаватская Е.П. *Тайная доктрина* (Смоленск: ред.-изд. центр «ТОК», 1993).