

СТИМУЛЯЦИЯ РАЗВИТИЯ РАННИХ ЭМБРИОНОВ МЫШЕЙ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ИСКУССТВЕННОГО СОЛНЕЧНОГО СВЕТА С ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ ОРАНЖЕВО-КРАСНОЙ КОМПОНЕНТОЙ

*Чернов А.С.^{1,2}, Решетников Д.А.², Фахранурова Л.И.¹, Манохин А.А.³,
Давыдова Г.А.^{1,2}, Селезнева И.И.^{1,2}, Храмов Р.Н.¹*

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, 142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, д.3.

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пущинский государственный естественно-научный институт», 142290, Московская обл., г. Пущино, пр. Науки, д.3.

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук, 142290, Московская обл, г.Пущино, ул. Институтская 3

E-mail: c.h.e.r.n.o.v@rambler.ru

Резюме:

Проведено исследование воздействия света ксеноновой лампы, преобразованного экранами, содержащими слой оксисульфида иттрия активированного европием (искусственного солнечного света), на развитие доимплантационных эмбрионов мыши *in vitro*. Показано, что облучение преобразованным светом (ПСС) с дополнительной люминесцентной компонентой ($\lambda_{\max} = 626\text{nm}$) значительно снижает процент аномально развитых и нежизнеспособных эмбрионов. Максимальное положительное воздействие ПСС реализуется при дозе облучения 20Дж/см^2 с энергией люминесцентной оранжево-красной компоненты $0,8\text{ Дж/см}^2$.

Ключевые слова:

доимплантационные эмбрионы, бластоцисты, преобразованный солнечный свет, фотостимуляция раннего развития

**STIMULATION OF DEVELOPMENT OF EARLY MICE EMBRYOS BY THE
ARTIFICIAL SUNLIGHT SUPPLEMENTED WITH FLUORESCENT ORANGE-RED
COMPONENT**

*Chernov A.S.^{1,2}, Reshetnikov D.A.¹, Fakhranyrova L.I.¹, Manokhin A.A.³, Davydova G.A.^{1,2},
Selezneva I.I.^{1,2}, Khramov R.N.¹*

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics
Pushchino State Science and Research Institute
Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences

Sammury:

Influence of the light xenon lamp, transformed by the screens with a layer of the europium-doped yttrium oxysulfide (artificial sunlight), on the preimplantation mouse embryos development in vitro was investigated. It was shown that the irradiation by the transformed light (TAS) with additional fluorescent components ($\lambda_{\max} = 626\text{nm}$) significantly reduces the the percentage of abnormally developed and non-viable embryos. It was shown that the maximum positive effect of the TAS occurred at a $20\text{J}/\text{cm}^2$ dose of irradiation with the energy of fluorescent orange-red component of $0.8\text{ J}/\text{cm}^2$

Key words:

preimplantation embryos, blastocysts, transformed sunlight, photostimulation of early development

Введение.

В настоящее время, в условиях резкого изменения климата и ухудшения экологической обстановки крайне важной является проблема сохранения репродуктивной способности человека. Согласно данным [Всемирной Организации Здравоохранения](#) «... около 8% супружеских пар сталкиваются с проблемой бесплодия...». Для решения этой проблемы применяются современные репродуктивные технологии экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ), эффективность которых в настоящее время довольно низкая. Так, беременность после

ЭКО, по данным мировой статистики, наступает в 10-30% случаев. Прежде всего, низкая вероятность имплантации эмбрионов связана с их качеством, определяемым различием условий развития эмбрионов в условиях *in vivo* и *in vitro*. Поэтому чрезвычайно актуальной является разработка технологий культивирования и поиск биофизических (негормональных, нехимических) способов повышения качества эмбрионов.

В раннем эмбриогенезе млекопитающих крайне важен момент перехода от предимплантационного развития к постимплантационному, связанный с выходом бластоцист из оболочки оплодотворения. Экспериментальные данные, накопленные к настоящему времени показывают, что процент выхода бластоцист из оболочки оплодотворения, наблюдаемый в условиях *in vitro*, гораздо ниже, чем в условиях *in vivo* [1]. Особенно критично количество выходов после различных манипуляций с эмбрионами [2, 3], поскольку на состоянии эмбрионов в культуре отрицательно сказывается освещение видимым светом (стандартное лабораторное освещение и освещение стереомикроскопов) [4, 5, 6]. Было обнаружено, что облучение может инициировать увеличение ДНК-повреждений в одноклеточных зародышах [7, 9, 10], уменьшать степень развития эмбрионов до морул и бластоцист у хомяков и кроликов [8, 11]. Длительная восьмичасовая световая экспозиция приводит к изменениям в морфологии ядра, к увеличению плотности цитоплазмы, и в конечном итоге, к значительной дегенерации бластомеров при 20-ти часовой экспозиции [4]. Наиболее повреждающее действие видимый свет оказывает в синей части спектра (445-500 нм), приводя, в частности, к синтезу белков теплового шока, а также к увеличению количества апоптотических клеток в эмбрионах на стадии бластоцисты [9].

Вместе с тем в ряде работ показано, что видимый свет в красной части спектра (620-750 нм) наоборот, способен оказывать положительное воздействие на развитие клеток и состояние организма в целом [12,13]. Монохроматический красный свет от наиболее распространенного источника в медицине гелий-неонового лазера ($\lambda_{\max}=632,8$ нм) с успехом используют для лечения ран и язв [14], дерматологических заболеваний [15], ишемической болезни сердца [16, 17], гипертонии [18] и других заболеваниях. Выявлено стимулирующее воздействие света красного и инфракрасного диапазонов на лимфоциты [19]; фибробласты [20, 21, 22]; кератиноциты [23]; остеобласты и остеобластоподобные клетки [24, 25]; стволовые клетки мезенхимы [13]; эндотелиальные клетки вен [26] и артерий [27]. Кроме того, установлено, что видимый свет в красной части спектра (620-

750 нм) оказывает положительное действие на развитие доимплантационных эмбрионов хомяков [8].

Несмотря на существование большого количества экспериментальных работ, посвященных применению красного света, механизм его биологического действия во многом остается неизвестным. Известно, что дыхательные цепи как эукариотических, так и прокариотических клеток обладают светочувствительностью [28, 29]. Так, облучение светом с длинами волн 602 нм, 632,8 нм, 650 нм и 725 нм увеличивает синтез АТФ в выделенных митохондриях [30]. Освещение светом с длиной волны 633 нм увеличивает мембранный потенциал митохондрий и протонный градиент, вызывает изменения в оптических свойствах митохондрий, увеличивает скорость обмена АДФ/АТФ, повышает продукцию АФК, а также инициирует работу внутриклеточных сигнальных каскадов, ответственных за клеточную пролиферацию и цитопротекцию [31, 32, 33].

Таким образом, облучение светом оранжево-красного диапазона является перспективным способом нормализации процессов развития ранних эмбрионов млекопитающих в условиях *in vitro*. Основной проблемой при реализации данного подхода в репродуктивных технологиях является отсутствие данных о механизмах воздействия света на половые клетки и эмбрионы млекопитающих, а также отсутствие четких критериев выбора источников облучения и режимов фотостимуляции.

Биофизика взаимодействия облучения с биологическими тканями определяется параметрами облучения (длина волны, интенсивность подачи энергии, режим облучения и т.п.). Альтернативой использованию лазера в репродуктивных технологиях является использование светодиодных матриц с максимумом в оранжево-красной области [15, 35] или источников белого света, излучение которых модулируется с помощью специальных светофильтров [36, 37].

Предлагаемый нами подход, заключается в использовании светопреобразующих фильтров, которые позволяют использовать эволюционно привычное для теплокровных организмов солнечное излучение, при этом ультрафиолетовая компонента преобразуется в дополнительную к исходному солнечному излучению оранжево-красную компоненту (преобразованный солнечный свет - ПСС). Такой подход в биотехнологии, именуемый авторами «стратегией полезное солнце», был впервые применен в работе [38] при изучении развития новорожденных мышат и при развитии ранних эмбрионов *in vitro* для мышей линии F1(CBA*C57BL/6) [34].

Целью данной работы было исследование воздействия искусственного солнечного света с дополнительной люминесцентной оранжево-красной компонентой на развитие

доимплантационных эмбрионов мыши стока SHK в условиях *in vitro* и выявление оптимальных режимов, обеспечивающих повышение качества эмбрионов.

Материалы и методы.

В качестве источника света использовали лабораторную осветительную систему ЛОС-1 (СКБ БП, Россия) с ксеноновой лампой XBO-150 W/4 (OSRAM, Германия) мощностью 150 Вт, свет от которой проходит через специально приготовленный светопреобразующий экран. Экран представляет собой квадратную пластину размером $5 \times 5 \text{ см}^2$ и толщиной 1 мм из поликарбонатного пластика содержащего УФ – адсорбер, не пропускающим ультрафиолетовый свет. С одной стороны на экран нанесён слой силикона с люминофором оксисульфид иттрия, активированного европием ($\text{Y}_{1,9}\text{Eu}_{0,1}\text{O}_2\text{S}$), в концентрации 20 мг/см². Спектр возбуждения этого люминофора находится в УФ-диапазоне 200–370 нм, с основным эмиссионным излучением в области оранжево-красного диапазона с максимумом люминесценции в 626 нм. Освещение экрана со стороны нанесенного слоя фотолюминофора создает поток света, содержащего дополнительную люминесцентную компоненту (ПСС), в то время как освещение экрана с противоположной стороны позволяет создать контрольный (без люминесцентной компоненты) поток света (СС-УФ), идентичный ПСС по остальным спектральным характеристикам (Рис.1).

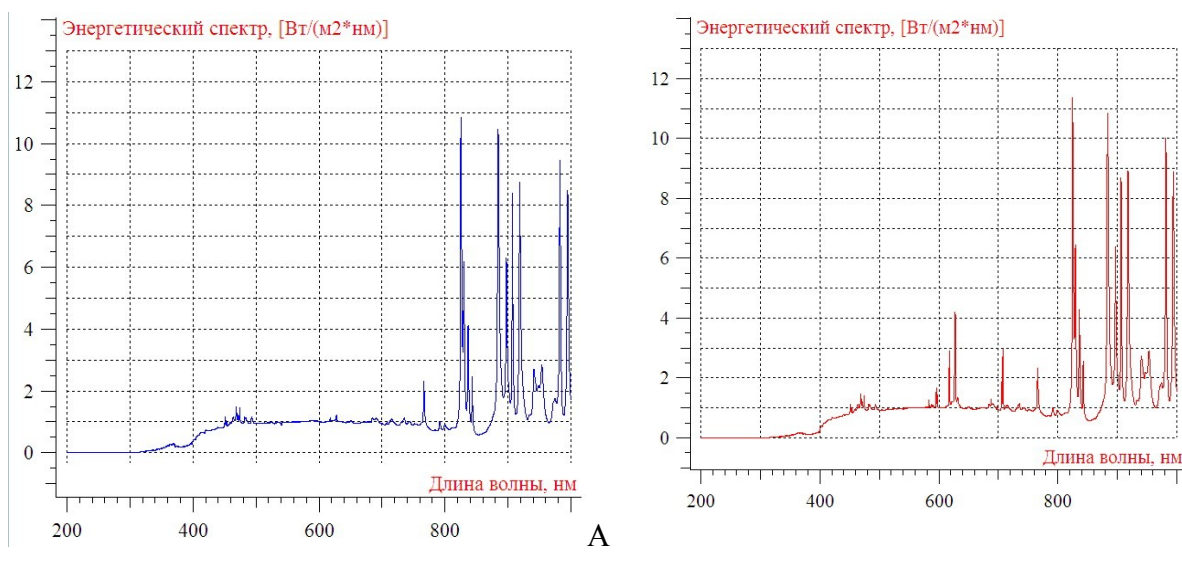


Рисунок 1. Энергетический спектр светового потока от осветителя ЛОС-1 прошедшего через люминесцентный экран с люминофором $\text{Y}_{1,9}\text{Eu}_{0,1}\text{O}_2\text{S}$ в концентрации 20 мг/см²:

А – без люминесценции (СС-УФ). **Б** - с люминесценцией (ПСС), $\lambda_{\text{max}}=626\text{nm}$.

Для снятия спектральных характеристик света в диапазоне от 200 нм до 1000 нм использовался компьютеризированный комплекс спектральной аппаратуры на базе монохроматора МДР-41 (ЗАО «ОКБ СПЕКТР», Россия). Снятые на монохроматоре МДР-

41 спектры получаются в относительных единицах, поэтому для получения энергетических спектров световых потоков воздействующих на мышинные эмбрионы применяется процедура калибровки спектров по измерениям энергетической освещённости в условиях эксперимента с помощью пиранометра СМР-3 (Kipp & Zonen, Нидерланды), обладающего постоянной спектральной чувствительностью в диапазоне от 310 нм до 2800 нм.

Исследование биологического воздействия света проводили на зиготах, полученных от самок мышей стока SHK. На первый день беременности мышей забивали цервикальной дислокацией и зиготы вымывали из яйцеводов [39]. Для манипуляций с эмбрионами использовали среду M2 (Sigma). Культивирование эмбрионов проводили в CO₂-инкубаторе в среде M16 (Sigma) с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки. Перед облучением каждую группу зигот помещали в индивидуальную лунку 4-луночного планшета, содержащую среду M2. Облучение эмбрионов преобразованным солнечным светом проводили однократно в течение 7,5 мин., 15 мин. или 30 мин. Эмбрионы контрольной группы не подвергались облучению.

Состояние развивающихся эмбрионов оценивали в течение пяти суток (120 часов) до достижения контрольными эмбрионами стадии бластоцисты. Состояние эмбрионов на стадии бластоцисты оценивали по форме, размерам и расположению клеток трофобласта и внутренней клеточной массы (ВКМ) (рис.2).

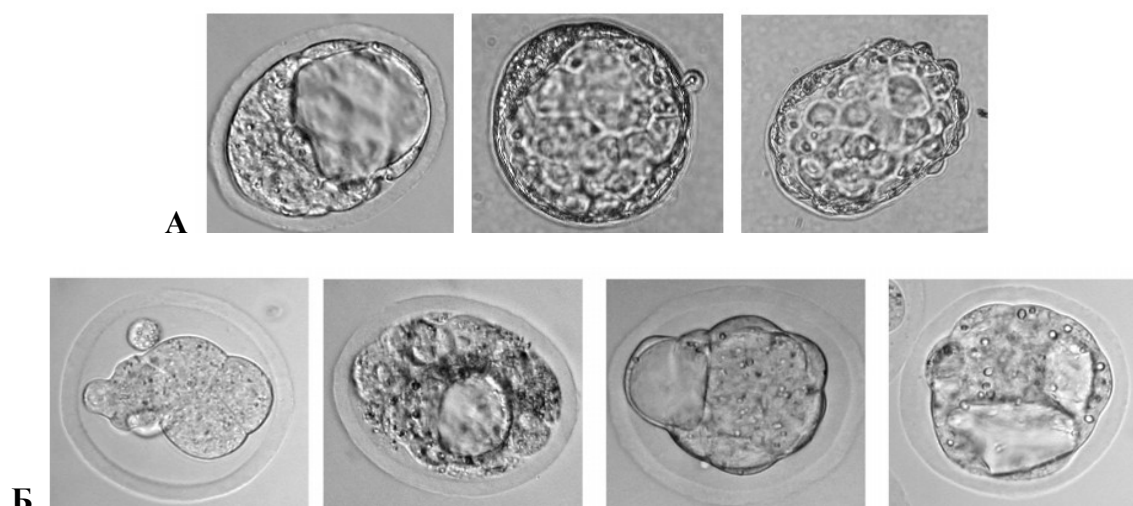


Рисунок 2. Морфология эмбрионов мыши на стадии бластоцисты.

А – нормальные бластоцисты (средняя, поздняя, выклюнувшаяся).

Б – аномальные бластоцисты (нарушение компактизации и кавитации, деградация клеток ВКМ, двойная область закладки бластоцеля).

Определяли общее количество жизнеспособных эмбрионов, число эмбрионов, сформировавших бластоцисту, количество бластоцист, вышедших из блестящей оболочки, и количество бластоцист с нарушением морфологии. К последним относили бластоцисты с зачатком полости, с аномально крупными клетками ВКМ и трофобласта, а также трофобластические пузырьки, характеризующиеся отсутствием ВКМ. Полученные результаты обрабатывали с помощью программы Origin Pro. Статистическую обработку результатов проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение.

Было проведено исследование воздействия различных режимов облучения преобразованным солнечным светом на развитие доимплантационных эмбрионов мыши в условиях культивирования *in vitro*.

Показано, что при отсутствии направленного облучения эмбрионов (в контрольной группе) до стадии бластоцисты доходит 64% эмбрионов, при этом только в 21% происходит выход зрелых бластоцист из блестящей оболочки. Количество аномально развитых бластоцист составляет 29%.(табл. 1).

Облучение эмбрионов в течение 7,5 минут не оказывает влияния на общее количество сформировавшихся бластоцист, их выход из оболочки оплодотворения и количество аномально развившихся бластоцист (отсутствуют достоверные различия с контролем).

Облучение зигот ПСС в течение 15 минут приводило к заметному улучшению эмбрионального развития по сравнению с контролем. После облучения большинство эмбрионов достигало стадии бластоцисты (81%), из которых большая часть (72%) полностью прошла доимплантационное развитие вплоть до выхода из блестящей оболочки. Кроме того, после 15 минут облучения ПСС количество аномально сформировавшихся бластоцист было более чем в 4 раза меньше, чем в контроле.

Облучение зигот мышей ПСС в течение 30 минут показало негативное влияние на процесс формирования поздних бластоцист и их выход из блестящей оболочки. Общее число эмбрионов, достигших стадии бластоцисты, было выше контрольных значений, 81 и 64% соответственно (табл. 1). Однако увеличение числа сформировавшихся бластоцист происходило за счет формирования аномально развитых бластоцист (65%). Количество бластоцист, вышедших из блестящей оболочки, в облученной группе ПСС было на уровне 3%, что было в 6 раз ниже, по сравнению с контрольной (необлученной) группой.

Таблица 1. Анализ бластоцист, сформировавшихся при различных временах облучения ПСС зигот мыши (результаты получены после 120 ч культивирования в условиях *in vitro*).

Группа	Всего эмбрионов	Общее кол-во сформировавшихся бластоцист	Поздние бластоцисты, от общего кол-ва	Бластоцисты, вышедшие из оболочки оплодотворения, от общего кол-ва	Аномально развитые бластоцисты, от общего кол-ва
		Кол-во (%)	Кол-во (%)	Кол-во (%)	Кол-во (%)
Без облучения					
Контроль	98	63 (64)	13 (14)	21 (21)	29 (29)
время облучения 7,5 мин					
ПСС	34	27 (79)	4 (12)	11 (32)	12 (35)
время облучения 15 мин					

ПСС	33	28 (84*) * p=0,031	2 (6)	24 (72*) * p=0,0285	2 (6*) * p=0,0402
время облучения 30 мин					
ПСС	31	25 (81)	4(13)	1 (3*) * p=0,0196	20 (65*) * p=0,03

* - достоверное отличие по отношению к контролю, $p < 0,05$.

Таким образом, облучение зигот мышей ПСС в течение 15 минут оказывает положительный эффект на процесс формирования нормальных бластоцист, их выход из оболочки оплодотворения и снижает количество аномально развитых бластоцист. При этом, как было установлено, дополнительная люминесцентная компонента при 15 мин. экспозиции составляет 0,8 Дж/см² (табл.2), что составляет около 3% от светового потока в диапазоне (400-800нм).

Таблица 2. Определение дозы облучения.

Группа	Продолжительность облучения, мин.	Доза облучения
СС-УФ	7,5	9,6 Дж/см ²
	15	19,2 Дж/см ²
	30	38,4 Дж/см ²
ПСС	7,5	10 Дж/см ²
	15	20 Дж/см ²
	30	40 Дж/см ²

Отсюда возникает вопрос: действительно ли увеличение дозы облучения всего на 3%, оказывает такое значительное влияние на количество нормально сформировавшихся бластоцист или это возможно происходит в результате фильтрации экраном УФ-компоненты исходного излучения ксеноновой лампы. Чтобы ответить на этот вопрос, было проведено исследование влияния на развитие ранних эмбрионов света, прошедшего через экран, но без люминесцентной компоненты (группа СС-УФ). Светообразующий

экран при этом был обращен слоем люминофора от источника света, и в таком положении УФ-свет поглощается поликарбонатом и люминофор не возбуждается. Результаты, полученные в ходе исследований, представлены на рис.3.

При сравнении способности эмбрионов формировать бластоцисты в группе ПСС и СС-УФ были обнаружены достоверные отличия. Действие ПСС на эмбрионы, по сравнению с СС-УФ, приводило почти к двукратному росту числа бластоцист, вышедших из оболочки оплодотворения (47% против 24%). Кроме того, в отсутствии дополнительной люминесцентной компоненты (группа СС-УФ), по сравнению с группой ПСС, наблюдалось пятикратное увеличение количества аномально развитых бластоцист.

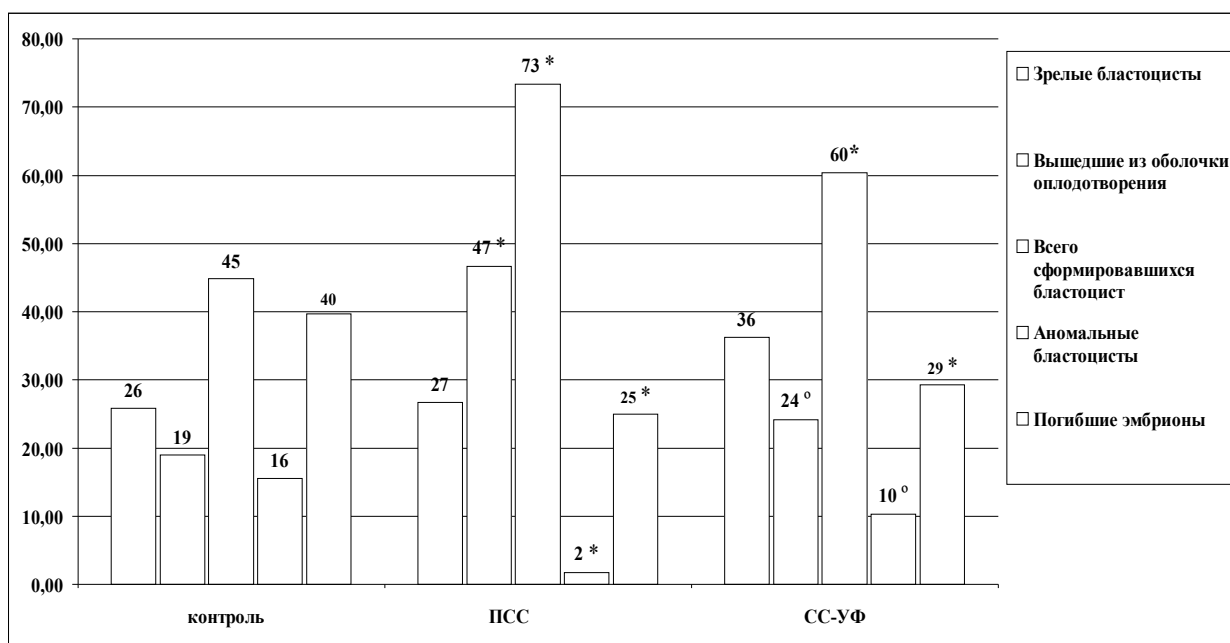


Рисунок 3. Сравнение влияния ПСС и СС-УФ на процесс формирования бластоцист из зигот мышей линии SHK. Время облучения 15 минут.

* - достоверное отличие по отношению к контролю, $p < 0,05$;

° - достоверное отличие группы ПСС по отношению к группе СС-УФ, $p < 0,05$.

Наблюдение за жизнеспособностью эмбрионов в контроле и облученных группах на протяжении всего периода культивирования (120 часов) представлено на рис.4. Достоверные отличия по сравнению с контролем были обнаружены только в группе ПСС.

Эффект действия преобразованного солнечного света с дополнительной люминисцентной компонентой на развитие зигот проявляется уже через 24 часа культивирования. В этой группе количество эмбрионов, успешно прошедших деления дробления и перешедших на следующую стадию развития, составило 91%, в то время как в контроле и в группе СС-УФ их оказалось 83 и 86% соответственно. Через 72 часа культивирования в контроле процент развивающихся эмбрионов составил 75%, в группе СС-УФ – 77%, а в группе ПСС – 84%. К концу срока культивирования эмбрионов (120 ч.) количество жизнеспособных эмбрионов в контроле и группе СС-УФ было на уровне 65 и 69% соответственно. А показатель жизнеспособности группы ПСС был на уровне 84%.

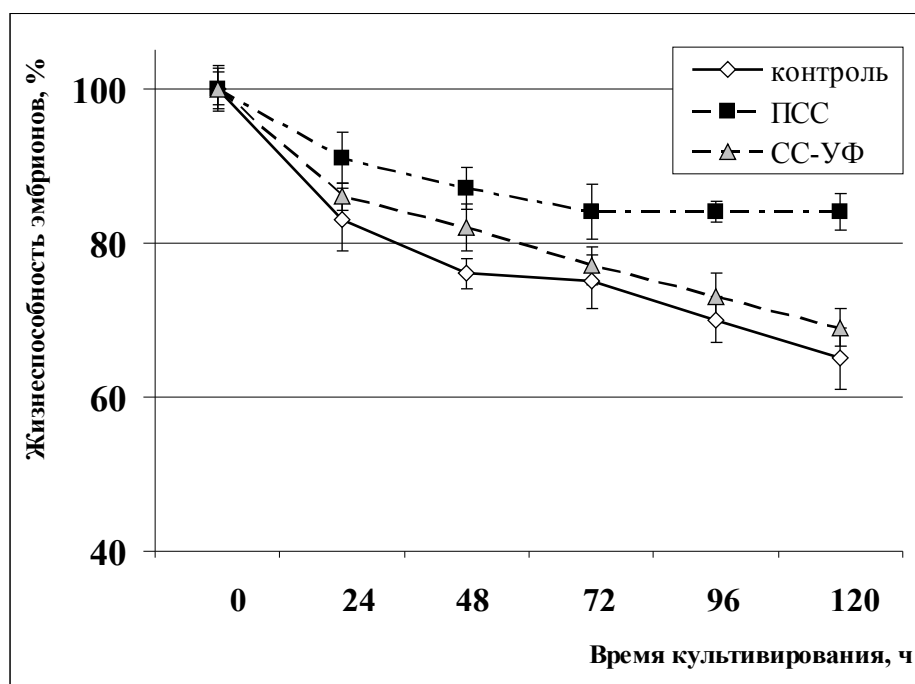


Рисунок 4. Изменение процента жизнеспособных эмбрионов в зависимости от сроков культивирования *in vitro* в контроле (без облучения), и после облучения преобразованным солнечным светом без люминесцентной компоненты (СС-УФ) и с дополнительной люминесцентной компонентой (ПСС). Показаны средние значения с указанием стандартного отклонения.

Из полученных данных, можно сделать вывод о том, что наблюдается стимулирующее действие преобразованного солнечного света на процесс развития ранних эмбрионов при оптимальной дозе облучения (20 Дж/см^2 , 15 мин), которое проявляется в ускоренном формировании из них бластоцист, с увеличением количества бластоцист вышедших из блестящей оболочки и способных продолжить последующее постимплантационное развитие. При этом также установлено, что такая стимуляция, происходит благодаря дополнительной люминесцентной оранжево-красной компоненте с максимумом излучения 626 нм, а не в результате фильтрации УФ-компоненты в исходном излучении.

Как известно, феномен фотобиомодуляции затрагивает разнообразные биологические процессы, включая клеточную пролиферацию, синтез ростовых факторов, увеличение клеточной подвижности, восстановительные процессы и многие другие [40, 41, 42]. Механизмы стимулирующего воздействия красного света в настоящее время еще недостаточно изучены, однако показано увеличение скорости обмена АДФ/АТФ,

повышение продукции АФК, инициация работы внутриклеточных сигнальных каскадов, стимулирующих клеточную пролиферацию и цитопротекцию под воздействием света оранжево-красного и ближнего инфракрасного диапазонов. В нашем случае, облучение эмбрионов трансформированным солнечным светом в дозе 20 Дж/см², возможно, запускает ряд внутриклеточных процессов в зиготе, что оказывает значительное влияние на процессы деления-дробления протекающие в раннем эмбрионе и при последующем развитии обеспечивают нормальное развитие зародыша. При этом оптимальная величина дополнительной оранжево-красной компоненты составляет 0,8 Дж/см², что очень близко к величине оптимальной дозы облучения гелий-неонового лазера для стимуляции пролиферации клеток фибробластов *in vitro*. При этом, мы наблюдали значительное уменьшение аномальных бластоцист и погибших эмбрионов. Таким образом, исследование воздействия искусственного солнечного света, преобразованного экранами (ПСС), содержащими слой оксисульфида иттрия активированного европием, на развитие доимплантационных эмбрионов мыши позволило выявить оптимальный по дозе биостимулирующий режим облучения. Показано, что наибольший биологический эффект обеспечивает однократное воздействие при дозе облучения 20 Дж/см² с энергией оранжево-красного компонента 0,8 Дж/см². Внедрение данного биофизического способа повышения качества эмбрионов в условиях культивирования *in vitro* позволит повысить эффективность лечения бесплодия у женщин, результативность экспериментальной эмбриологии и рентабельность животноводческих хозяйств.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы», гос.контракт № 14.В.37.21.1515.

Литература

1. Межевикина Л.М., Сахарова Н.Ю., Вепринцев Б.Н. В сб.: Проблемы сохранения и поддержания генетических коллекций лабораторных животных. Пущино, 1991, С. 102-112.
2. Roberts R.M. Embryo culture conditions: what embryos like best. *Endocrinology* 2005, May. 146(5): 2140-1.
3. Takenaka M., Horiuchi T., Yanagimachi R. Effects of light on development of mammalian zygotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 104(36): 14289-93.
4. Hegele-Hartung C., Schumacher A., Fisher B. Effects of visible light and room temperature on the ultrastructure of preimplantation rabbit embryos: a time course study. *Anat Embryol* 1991, 183: 559-571.
5. Oh S.J., Gong S.P., Lee, S.T. Light intensity and wavelength during embryo manipulation are important factors for maintaining viability of preimplantation embryos in vitro. *Fertil. Steril* 2007, 88 (4): 1150-1157.
6. Schumacher A., Fischer B. Influence of visible light and room temperature on cell proliferation in preimplantation rabbit embryos. *J. Reprod. Fertil* 1988, 4(1):197-204
7. Takahashi M., Saka N., Takahashi H., Kanai Y., Schultz R.M., Okano A. Assessment of DNA damage in individual hamster embryos by comet assay. *Mol. Reprod. Dev* 1999, 54(1): 1-7.
8. Oh S.J., Gong S.P., Lee, S.T. Light intensity and wavelength during embryo manipulation are important factors for maintaining viability of preimplantation embryos in vitro. *Fertil. Steril* 2007, 88(4): 1150-1157.
9. Umaoka Y., Noda Y., Nakayama T., Narimoto K., Mori T., Iritani A. Effect of visual light on in vitro embryonic development in the hamster. *Theriogenology* 1992, 38(6): 1043-1054.
10. Nakayama T., Noda Y., Goto Y., Mori T. Effects of visible light and other environmental factors on the production of oxygen radicals by hamster embryos. *Theriogenology* 1994, 41(2): 499-510.
11. Schumacher A., Fischer B. Influence of visible light and room temperature on cell proliferation in preimplantation rabbit embryos. *J. Reprod. Fertil* 1988, 4 (1): 197-204/
12. Fujihara NA, Hiraki KRN, Marques MM. Irradiation at 780 nm Increases Proliferation Rate of Osteoblasts Independently of Dexamethasone Presence. *Lasers Surg Med* 2006, 38: 332–336.

13. Tuby H, Maltz L, Oron U. Low-Level Laser Irradiation (LLLI) Promotes Proliferation of Mesenchymal and Cardiac Stem Cells in Culture. *Lasers Surg Med* 2007, 39: 373–378.
14. Erdle BJ, Brouxhon S, Kaplan M, Vanbuskirk J, Pentland AP. Effects of continuous-wave (670-nm) red light on wound healing. *Dermatol Surg* 2008, 34(3): 320-5.
15. Ablon G. Combination 830-nm and 633-nm light-emitting diode phototherapy shows promise in the treatment of recalcitrant psoriasis: preliminary findings. *Photomed Laser Surg* 2010, 28(1): 141-6.
16. Malinovskaya S.L., Drugova O.V., Monich V.A., Mukhina I.V. Effect of low-intensity luminescent radiation on recovery of heart function in postischemic period. *Bull Exp Biol Med* 1999, (9): 920-921.
17. Malinovskaya S.L., Monich V.A., Artifeksova A.A. Effect of low-intensity laser irradiation and wideband red light on experimentally ischemized myocardium. *Bull Exp Biol Med* 2008, 145(5): 573-5
18. Князева Т.А., Бадтиева В.А., Зубкова С.М. Лазеротерапия у больных гипертонической болезнью в сочетании с коронарной недостаточностью. Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры 1996, (2): 3-5.
19. Stadler I, Evans R, Kolb B, Naim JO, Narayan V, Buehner N, Lanzafame RJ. In vitro effects of low-level laser irradiation at 660 nm on peripheral blood lymphocytes. *Lasers Surg Med* 2000, (27): 255–261.
20. Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanæs HR, Mustafa K. Determining optimal dose of laser therapy for attachment and proliferation of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material. *J Biomed Mater Res* 2005, 73A: 55–62.
21. Pourzarandian A, Watanabe H, Ruwanpura S, Aoki A, Ishikawa I. Effect of low level Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2005, 76: 187–193.
22. Hawkins D, Abrahamse H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg* 2006, 24(6): 705–714.
23. Grossman N, Schneid N, Reuveni H, Halevy S, Lubart R. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. *Lasers Surg Med* 1998, 22: 212–218.

24. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg* 2005. 23(2): 161–166.
25. Fujihara NA, Hiraki KRN, Marques MM. Irradiation at 780 nm Increases Proliferation Rate of Osteoblasts Independently of Dexamethasone Presence. *Lasers Surg Med* 2006 (38): 332–336
26. Schindl A., Merwald H., Schindl L., Kaun C., Wojta J. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *Br J Dermatol* 2003, 148(2): 334–336.
27. Mirsky N, Krispel Y, Shoshany Y, Maltz L, Oron U. Promotion of angiogenesis by low energy laser irradiation. *Antioxid Redox Signal* 2002, 4(5): 785–790.
28. Векшин Н.А. Светозависимое фосфорилирование в митохондриях. *Мол.биол* 1991, 4: 54-59.
29. Tafur J., Mills P.J. Low-intensity therapy: exploring the role of redox mechanisms. *Photomedicine and Laser surgery* 2008, 26(4): 323-328.
30. Passarella S., Casamassima F., Molinari S. et al. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by He-Ne-laser. *FEBS Lett* 1994, 175: 95-99.
31. Passarella S., Perlino E., Quagliariello E. Evidence of changes induced by He-Ne-laser irradiation in the biochemical properties of rat liver mitochondria. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1993, 10: 185-198.
32. Karu TI. Mitochondrial Signaling in Mammalian Cells Activated by Red and Near-IR Radiation. *Photochem Photobiol* 2008, 84: 1091–1099.
33. Lavi R., Shainberg A., Friedmann H., Shneyvays V., Rickover O., Eichler M., Kaplan D., Lubart R. Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. *J Biol Chem* 2003, 278(42): 40917-40922.
34. Свиридова–Чайлахян Т.А., Фахранурова Л.И., Паскевич С., Храмов Р.Н., Манохин А.А., Симонова Н.Б., Чайлахян Л.М. Фотобиомодуляция люминесцентным излучением на развитии ранних эмбрионов мышей, Доклады АН, 417(5), 710-714 (2007).

35. Oliveira PC, Meireles GC, dos Santos NR, de Carvalho CM, de Souza AP, dos Santos JN, Pinheiro AL. The use of light photobiomodulation on the treatment of second-degree burns: a histological study of a rodent model. *Photomed Laser Surg* 2008, 26(4): 28.
36. Мониц В.А., Малиновская С.Л., Мониц Е.А. Монохроматизированный видимый свет, как фактор воздействия на биологические ткани. *Нижегородский мед. Журнал* 1992, (1): 104-107.
37. Saczko J., Kulbaska J., Chwilkowska A., Drag-Zalesiniska M., Wysocka T., Lugowski M., Banas T. The influence of photodynamic therapy on apoptosis in human melanoma cell line. *Folia Histochem Cytobiol* 2005, 43(3):129-32.
38. Khramov ,R.,N, Bratkova,L.,R., Gapeyev,A.,B., Chemeris,N.,K., Schelokov,R.,N.and Sukharev,S.,A. From "safe sun" strategy toward "useful sun" one. In: *Biological Effects of light 1995*(M.F.Holick and A.M.Kligman eds.) W. de Gruyter, Berlin, (1996)192-194.
39. Манк М. Биология развития млекопитающих. Методы. М.: Мир, 1990. 406 с.
40. Nakayama T., Noda Y., Goto Y., Mori T. Effects of visible light and other environmental factors on the production of oxygen radicals by hamster embryos. *Theriogenology* 1994, 41(2): 499-510.
41. Yu W, Naim JO, McGowan M, Ippolito K, Lanzafame RJ. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. *Photochem Photobiol* 1997, 66(6):866–871.
42. Schroeder P, Pohl C, Calles C, Marks C, Wild S, Krutmann J. Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signalling. *Free Radic Biol Med* 2007, 43: 128–135.