

## НЕЛИНЕЙНЫЙ ЭФФЕКТ КОМБИНИРОВАННОГО ВЛИЯНИЯ КРАСНОГО И СИНЕГО СВЕТА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ БАКТЕРИЙ *Escherichia coli*

© 2016 г. П.А. Лукьянович, Б.А. Зон, М.Ю. Грабович, Е.В. Щелухина,  
Ю.И. Данилова, М.В. Орлова, Ю.О. Сапельцева, Д.И. Синюгина

Воронежский государственный университет, 394006, Воронеж, Университетская пл., 1

E-mail: lukyanovich@phys.vsu.ru

Поступила в редакцию 19.08.15 г.

После последней доработки 31.10.15 г.

Обнаружена нелинейная зависимость уменьшения количества жизнеспособных клеток *E. coli* при облучении светом одновременно синей и красной областей спектра с интенсивностью  $\approx 100$  мВт/см<sup>2</sup>. Найденная зависимость объясняется предположением о каскадном двухфотонном поглощении света молекулами ДНК с промежуточным резонансом на клеточных хромофорах, вызывающем возбуждение и последующее повреждение ДНК, аналогичное повреждению при воздействии УФ-квантов.

*Ключевые слова:* двухфотонное поглощение, повреждение ДНК.

Прямое визуальное наблюдение лазерного ИК-излучения [1] было одним из первых нелинейных оптических процессов в биологии, зарегистрированных *in vivo*. В работе [2] была обнаружена квадратичная зависимость уровня электрического отклика нейронов сетчатки от интенсивности падающего ИК-излучения. Феномен связывался с генерацией в биологических тканях второй гармоники лазерного ИК-излучения, попадающей в видимый диапазон [3–5]. В недавней работе [6] было продемонстрировано, что этот нелинейный эффект вызван двухфотонным возбуждением молекул родопсина. Двухфотонная природа эффекта подтверждена не только близкой к квадратичной зависимостью порога восприятия, но также и некоторым смещением в сторону длинных волн наблюдаемого цвета по сравнению с цветом излучения, соответствующего удвоенной энергии ИК-квантов. Следует отметить, что в недавней статье [7] была показана потенциальная опасность видимого светодиодного излучения с интенсивностью  $I \geq 5$  мВт/см<sup>2</sup>, приводящего при длительном воздействии к повреждению ДНК клеток пигментного эпителия сетчатки человека и последующему апоптозу.

Как правило, двухфотонные процессы исследуются в нелинейной оптике, когда прямое (нерезонансное) многофотонное возбуждение наблюдается при интенсивностях от единиц кВт/см<sup>2</sup> до десятков ГВт/см<sup>2</sup> [8]. Поэтому даже интенсивности в сотни мВт/см<sup>2</sup>, значительно

превышающие естественное солнечное излучение, все еще малы для наблюдения эффекта прямого двухфотонного поглощения. Однако нелинейные эффекты могут многократно усиливаться, например, в жидких кристаллах [9] или некоторых биологических объектах. Визуальное обнаружение ИК-излучения, как света с частотой, близкой к удвоенной по отношению к падающей, было зарегистрировано уже при интенсивностях  $I \geq 25$  мВт/см<sup>2</sup> [3].

Резкое снижение интенсивности, при которой проявляются наблюдаемые двухфотонные процессы, можно объяснить заменой прямого двухфотонного поглощения на каскадный (резонансный) переход через промежуточное возбужденное долгоживущее состояние [10]. Такое состояние возникает после поглощения молекулой *A* первого фотона в результате быстрых переходов (внутренней конверсии) в триплетное состояние, энергия которого несколько ниже (красное смещение) по сравнению с энергией фотона [11]. Тогда при поглощении второго фотона молекулой *B* его энергия может суммироваться с энергией резонанса близко расположенной молекулы *A*. Очевидно, что значение каскадной нелинейности должно существенно зависеть от длины волны излучения  $\lambda$ . Действительно, в исследовании [5] было обнаружено десятикратное снижение порога чувствительности визуального наблюдения ИК-излучения при уменьшении  $\lambda$  от 1500 нм до 1000 нм.

Можно предположить, что обнаруженное в работе [7] повреждение ДНК также связано с каскадным двухфотонным поглощением квантов видимого света, как и то, что двухфотонные процессы могут быть типичны для биологических объектов. Актуальность обнаруженного эффекта связана с широким распространением в последнее время источников искусственного света, использующих интенсивные излучающие элементы с относительно узкополосными спектральными характеристиками (светодиодные осветительные приборы, мониторы компьютеров). Спектральная интенсивность излучения таких источников иногда превосходит интенсивность естественного солнечного света.

Авторам не удалось обнаружить работы, посвященные двухфотонным эффектам, связанным с действием непрерывного видимого света относительно низкой интенсивности, не вызывающем при длительном воздействии нагрева и сопутствующих морфологических изменений в клетках. В перечисленных работах [1–6] было исследовано влияние ближнего ИК-излучения на зрительные клетки, генетически приспособленные к восприятию света. Поэтому представляется важным изучение двухфотонных процессов на клетках, не относящихся к специфическому зрительному ряду. Целью настоящей работы явился поиск эффекта возможного двухфотонного поглощения ДНК бактерий *E. coli* при относительно низкой интенсивности видимого света. Исследовали количество  $L$  жизнеспособных клеток после облучения *E. coli* светом из двух областей видимого спектра: красной и синей, в том числе комбинированным, при разной интенсивности и одинаковых дозах. В результате исследований была найдена нелинейная зависимость  $L$  от интенсивности облучения при суммарной энергии пар фотонов красного и синего света, соответствующей максимуму пика в спектре поглощения ДНК, что подтверждает гипотезу о важности двухфотонных процессов для биологии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

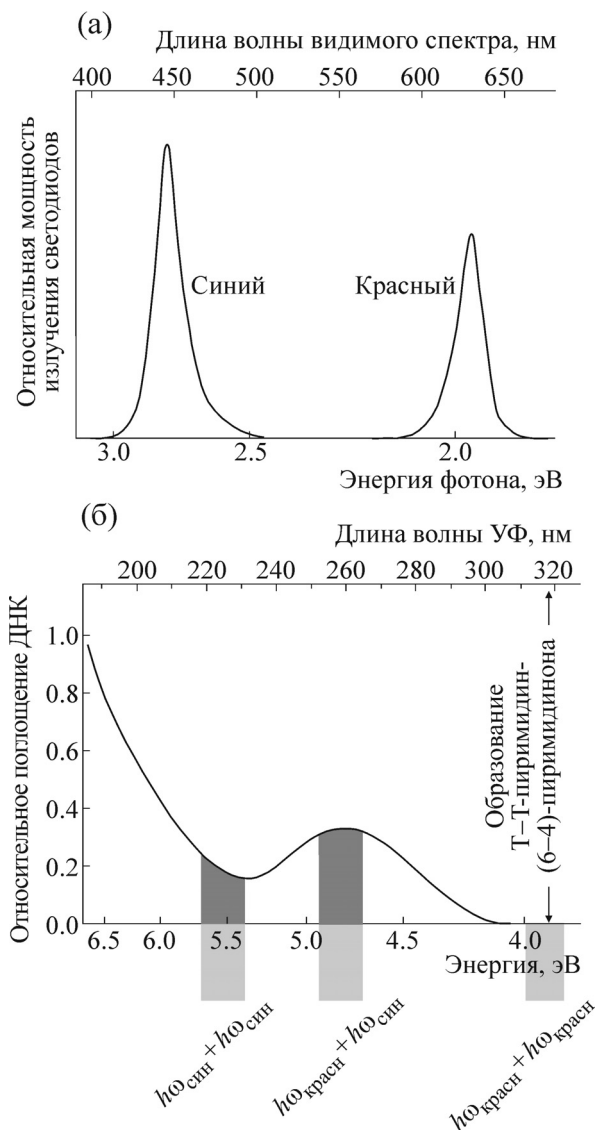
**Обоснование методики эксперимента.** Диаметр клеток *E. coli*  $\approx 500$  нм, они содержат и ДНК, и хромофоры. Энергия возбуждения может быть передана ДНК одним УФ-фотоном или двумя фотонами видимого спектра при двухфотонном поглощении. При однофотонном поглощении и относительно малой интенсивности  $I$  последующий эффект определяется удельной дозой облучения  $D$  и не зависит от  $I$ . При двухфотонном поглощении эффект будет зависеть одновременно и от удельной дозы  $D$ ,

и от интенсивности  $I$ , возрастая вместе с увеличением  $I$ .

В видимом и инфракрасном диапазонах находятся резонансы триплетных состояний в спектрах поглощения и люминесценции цитохромов, а *E. coli* обладает фосфоресценцией в красной и инфракрасной областях с задержкой до двух секунд [13,14], что непосредственно указывает на существование метастабильных резонансов. Тогда следует ожидать, что возможное снижение количества жизнеспособных клеток бактерий будет зависеть от энергий поглощаемых фотонов, если облучение проводить двумя источниками видимого света с разными длинами волн  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$ . Принимая во внимание нерегулярность УФ-спектра поглощения ДНК, результат двухфотонного возбуждения должен быть разным в зависимости от комбинации двух поглощаемых фотонов: « $\lambda_1 + \lambda_1$ », « $\lambda_2 + \lambda_2$ » или « $\lambda_1 + \lambda_2$ ».

**Экспериментальная установка.** Объект облучения был представлен 1 мл водной суспензии *E. coli* на дне стеклянной пробирки, размещенной в камере с четырьмя светодиодами (источниками красного и синего света) и с рассеивающими матовыми алюминиевыми стенками. Спектральные характеристики использованных в экспериментах светодиодов показаны на рис. 1а. Основным аргументом выбора светодиодов с такими характеристиками было то, что даже с учетом энергии красного смещения ( $\approx 0,1$ – $0,2$  эВ для большинства белков [11]) суммарная энергия двух фотонов красного и синего светодиодов совпадает с энергией 4,8 эВ в максимуме пика УФ-спектра поглощения ДНК (рис. 1б), а суммарная энергия двух фотонов синего светодиода близка к локальному минимуму того же спектра с энергией 5,4 эВ. Отметим, что в бактериях, включая *E. coli*, присутствуют хромофоры с сильными пиками поглощения при энергиях, близких к медианам спектров излучения светодиодов [15], например цитохромоксидаза и цитохром P450 [16,17].

**Условия эксперимента.** Эксперименты проводили при непрерывном световом потоке постоянной интенсивности. Объект одновременно облучали двумя светодиодами в одном из трех режимов: СС – два синих, КК – два красных, КС – один красный и один синий. Мощность излучения синих светодиодов превышала мощность красных в 1,4 раза. Это было сделано для обеспечения приблизительно одинаковых потоков фотонов (количества излучаемых фотонов в единицу времени) от разных светодиодов. В режиме КС пары фотонов могут образовывать три сочетания: «синий + синий», «красный + красный» и «красный + синий».



**Рис. 1.** (а) – Спектры излучения светодиодов. (б) – УФ-спектр относительного поглощения ДНК *E. coli* [12]. Выделенные серым области соответствуют суммарной энергии 95% сочетаний пар синих и красных фотонов с наибольшей спектральной плотностью. Стрелками отмечена область спектра (315–320 нм) с относительно высоким квантовым выходом мутагенных пиримидиновых фотопродуктов [20], на порядок меньшим выхода фотодимеризации и фотогидратации, происходящих при  $\lambda \leq 300$  нм.

Тогда при равных потоках излучения светодиодов результат воздействия в режиме КС представляет собой суперпозицию трех составляющих со следующими весами: 1/4 аналогична воздействию в режиме СС, 1/4 аналогична воздействию в режиме КК и 1/2 всей суперпозиции обеспечивается парами фотонов «красный + синий».

Облучение проводили при двух различных потоках: максимальном  $F_1$  и сниженном в  $e$  раз

$F_{0,37}$ . При облучении объекта в потоке  $F_1$  двумя светодиодами интенсивность излучения  $I$  была близкой к  $100 \text{ мВт/см}^2$ :  $\approx 55 \text{ мВт/см}^2$  от одного синего светодиода и  $\approx 40 \text{ мВт/см}^2$  от одного красного светодиода. Экспозиция для потока  $F_1$  составляла 150 с. Для потока  $F_{0,37}$  экспозиция была увеличена до 400 с – приблизительно в  $e$  раз. Таким образом, при облучении двумя разными потоками в одном и том же режиме удельная доза светового излучения была одинаковой. Неравномерность и уровень анизотропии излучения внутри камеры не превышали 10%. Облучение проводили при температуре 20–22°C, температуру объекта удерживали в этом же интервале.

**Клеточная культура и подсчет КОЕ.** Использовали штамм К-12 MKD910 бактерий *E. coli*. Бактерии культивировали в соответствии с ГОСТ ISO 11133-1-2011 в питательной среде следующего состава (на 1 л воды): 5 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 1 г сукцината натрия и 1 г гептагидрата сульфата магния. В экспериментах использовали культуру бактерий на экспоненциальной фазе роста. Оптическую плотность раствора определяли нефелометрически на спектрофотометре СФ-56. Концентрацию клеток в объекте доводили до  $\approx 2 \cdot 10^5 \text{ КОЕ/см}^3$  путем разведения в стерильной водопроводной воде. Такая плотность бактерий была необходима для обеспечения прозрачности раствора при облучении. Для приготовления твердых питательных сред на 1 л добавляли 20 г бактериологического агара. Подсчет КОЕ выполняли методом 10-кратных предельных разведений в трех биологических повторностях. В соответствии с результатами работы [15] и требованиями ASTM D5465-93(2012) (ГОСТ 26670-91) принимали в расчет чашки Петри с количеством КОЕ от 30 до 300.

**Статистическая обработка результатов.** Начальные концентрации бактерий в разных экспериментах несколько отличались. Поэтому для расчета относительного количества *L* жизнеспособных бактерий проводили приведение полученных КОЕ к среднему значению контрольных образцов каждого эксперимента. Относительное значение среднего контрольных образцов принимали равным единице. В этом случае распределение Пуассона уже неприменимо, и статистическую обработку экспериментальных данных проводили для логнормального распределения, давшего наилучшее соответствие критерию Колмогорова. Эксперименты продолжали до достижения значимого отличия ( $P < 0,05$  по  $t$ -критерию Стьюдента) между выборками *L* после режимов КС<sub>1</sub> (поток  $F_1$ ) и КС<sub>0,37</sub> (поток  $F_{0,37}$ ).

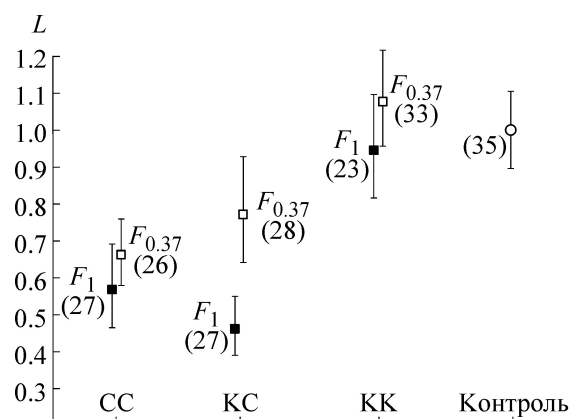
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты статистической обработки экспериментальных данных представлены в таблице и на рис. 2. Как видно из рис. 2, поведение  $L$  после облучения с потоками  $F_1$ , если его наложить на шкалу суммарной энергии двух фотонов, хорошо соответствует поведению УФ-спектра поглощения ДНК (рис. 1б).

Среднее  $L$  после облучения в режиме  $КС_1$  достоверно меньше, чем после облучения в режиме  $КС_{0,37}$ . Обнаруженное отличие  $L$  после режимов облучения  $КС_1$  и  $КС_{0,37}$  для одинаковых доз облучения позволяет считать установленной нелинейную зависимость  $L$  от  $I$  при комбинированном воздействии синим и красным светом, которую можно связать с двухфотонным возбуждением ДНК.

Отсутствие отклонений  $L$  после режимов  $КК_1$  и  $КК_{0,37}$  от контрольных образцов легко объяснить, учитывая незначительность поглощения ДНК УФ-фотонов с энергией  $\approx 4$  эВ. При этом было бы неверным вовсе исключать мутагенное влияние двухфотонного поглощения красного света, способного вызвать образование пиримидиновых фотопродуктов ДНК с относительно большим квантовым выходом [20].

Величины  $L$  после облучения в режимах  $СС_1$  и  $СС_{0,37}$  имеют близкие значения и достоверно меньше контрольных. Последнее может быть следствием специфического действия синего света, влияющего на подвижность клеток *E. coli* и способного вызвать ускоренный расход АТФ [21]. Это действие достигает максимума при  $\lambda = 440$  нм [22]. Вне питательной среды в условиях проведенных экспериментов возможности восполнения АТФ отсутствовали. Это обстоятельство могло стимулировать апоптоз, величина которого имеет линейную зависимость от дозы облучения синим светом. Последнее подтверждается приблизительно дву-



**Рис. 2.** Режимы облучения и потоки фотонов.  $L$  – средние значения и стандартные ошибки приведенных концентраций КОЕ *E. coli* для разных режимов облучения: СС – двумя синими светодиодами, КС – одним красным и одним синим, КК – двумя красными светодиодами. Поток излучения  $F_1$  соответствует  $\approx 10^{17}$  фотонам в секунду (суммарная  $I \approx 100$  мВт/см<sup>2</sup>), поток  $F_{0,37}$  уменьшен в  $e$  раз по сравнению с  $F_1$ . Во всех режимах поток поровну распределен между двумя светодиодами. В скобках указаны количества независимых испытаний для каждого из вариантов облучения и контрольных образцов.

кратным относительным уменьшением  $L$  после облучения бактерий в режиме  $СС_{0,37}$ , когда доза синего света также двукратно превышает дозу в режиме  $КС_{0,37}$ . При этом вклад нелинейного двухфотонного эффекта в  $e^2$  ( $\approx 7,4$ ) раз уменьшен по сравнению с облучением в потоках  $F_1$  и, учитывая статистический разброс, незаметен. Отсутствие наблюдаемых отличий  $L$  после режимов  $СС_1$  и  $СС_{0,37}$  также может свидетельствовать об относительно меньшем времени жизни резонансов биомолекул бактерий *E. coli* после поглощения фотонов синего света, что приводит к незначительности двухфотонного эффекта в данном случае.

Вероятности совпадения  $P$  по  $t$ -критерию Стьюдента между выборками  $L$  при различных режимах облучения и контрольной выборкой

	СС <sub>1</sub>	СС <sub>0,37</sub>	КС <sub>1</sub>	КС <sub>0,37</sub>	КК <sub>1</sub>	КК <sub>0,37</sub>	Контроль
СС <sub>1</sub>	1	0,55	0,22	0,28	0,040	0,011	0,0028
СС <sub>0,37</sub>	0,55	1	0,030	0,51	0,076	0,010	0,024
КС <sub>1</sub>	0,22	0,030	1	0,015	3·10 <sup>-4</sup>	2·10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
КС <sub>0,37</sub>	0,28	0,51	0,015	1	0,36	0,15	0,22
КК <sub>1</sub>	0,040	0,076	3·10 <sup>-4</sup>	0,36	1	0,56	0,70
КК <sub>0,37</sub>	0,011	0,010	2·10 <sup>-5</sup>	0,15	0,56	1	0,66
Контроль	0,0028	0,024	10 <sup>-6</sup>	0,22	0,70	0,66	1

Примечание. Курсивом выделены значения с  $P < 0,05$ .

Известны эффекты снижения скорости синтеза ДНК в клетках и подавления метаболизма тканей, связанные с увеличением интенсивности лазерного излучения выше некоторой величины. Так, снижение скорости синтеза ДНК в лимфоцитах и клетках HeLa при облучении *in vitro* происходит при  $I > 10$  Вт/см<sup>2</sup> [23,24]. В терапии с использованием низкоинтенсивного лазерного излучения пороговое значение интенсивности чрескожного воздействия красного света, превышение которого вызывает подавление метаболизма в тканях, как правило, находится в интервале от 50 до 100 Вт/см<sup>2</sup> (см., например, [25,26]). Обнаруженный нелинейный эффект снижения количества жизнеспособных клеток *E. coli* при  $I \approx 100$  Вт/см<sup>2</sup> и предположение о двухфотонном поглощении позволяют в принципе объяснить наблюдаемые эффекты, связав их с нарастанием повреждений ДНК при увеличении интенсивности светового воздействия.

Возбуждение ДНК происходит при энергиях  $> 4$  эВ (рис. 1б, [12]). Относительное количество  $L$  погибших после УФ-облучения клеток определяется выражением  $L = e^{-p(\lambda)D}$ , где  $p(\lambda)$  – параметр бактерицидной эффективности,  $D$  – удельная доза облучения. Для *E. coli*:  $p(\lambda = 265 \text{ нм}) \geq 1,2 \text{ см}^2/\text{мДж}$  [27]; для HeLa:  $p(\lambda = 254 \text{ нм}) \geq 1,3 \text{ см}^2/\text{мДж}$  [28]. Следовательно, гибель 50% обоих видов этих клеток вызывает эффективная удельная доза УФ-излучения с  $\lambda \approx 260$  нм:  $D_{1/2}^{UV} \approx 0,6 \text{ мДж}/\text{см}^2$ . Суммарная интенсивность видимой составляющей солнечного излучения в тропических широтах на уровне моря в ясную погоду  $\approx 36 \text{ мВт}/\text{см}^2$  [29], а в спектральных диапазонах, соответствующих 95% излучения красного и синего светодиодов,  $\approx 5,7 \text{ мВт}/\text{см}^2$ . То есть использованная в экспериментах с потоком  $F_1$  спектральная интенсивность в 17 раз превышала типичный максимальный естественный уровень. В этих условиях удельная доза бактерицидной эффективности комбинированного красного и синего света для *E. coli* составила  $D_{1/2}^{RB} \approx 15 \text{ Дж}/\text{см}^2$  или, по сравнению с УФ-излучением,  $D_{1/2}^{RB} \approx 2,4 \cdot 10^4 \cdot D_{1/2}^{UV}$ . Это позволяет объяснить обнаруженную в [7] потенциальную опасность ярких источников искусственного света, связав ее с двухфотонным повреждением ДНК.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В экспериментах по комбинированному воздействию синим и красным светом на *E. coli* обнаружена нелинейная зависимость снижения

количества жизнеспособных клеток бактерий от интенсивности излучения. Анализ полученных результатов, проведенный с учетом спектров поглощения ДНК и данных о нелинейном поглощении оптического излучения биообъектами, позволяет прийти к выводу, что причиной наблюдаемого эффекта может быть двухфотонное поглощение света молекулами ДНК.

За оказанную помощь в проведении исследований авторы выражают благодарность В.М. Вахтелю, А.Т. Епринцеву и А.В. Белецкому.

Краткое изложение представленных результатов дано в сообщении [30].

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, грант 3.1306.2014/К.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Л. С. Василенко, В. П. Чеботаев и Ю. В. Троицкий, Журн. эксперим. и теорет. физики **48**, 777 (1965).
2. Б. М. Савин, Р. И. Ковач и Е. Е. Колчин, Докл. АН СССР. Физиология **221**, 255 (1975).
3. D. H. Sliney, R. T. Wangemann, and J. K. Franks. J. Opt. Soc. Am. **66**, 339 (1976).
4. В. Г. Дмитриев, В. Н. Емельянов, М. А. Кашинцев и др., Квантовая электроника **6**, 803 (1979).
5. В. Е. Прокопьев, Биофизика **25**, 305 (1980).
6. G. Palczewska, F. Vinberg, P. Stremplewski, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **111**, E5445 (2014).
7. E. Chamorro, C. Bonnin-Arias, M. J. Pérez-Carrasco, et al., Photochem. Photobiol. **89**, 468 (2013).
8. Н. Бломберген, *Нелинейная оптика* (Мир, М., 1966).
9. Б. Я. Зельдович, Н. Ф. Пилипецкий, А. В. Сухов и Н. В. Табириян, Письма ЖЭТФ **31**, 287 (1980).
10. В. Гайтлер, *Квантовая теория излучения* (ИИЛ, М., 1956).
11. J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3<sup>rd</sup> ed. (Springer, 2006).
12. D. Voet, W. B. Gratzer, R. A. Cox, and P. Doty, Biopolymers **1**, 193 (1963).
13. В. Г. Петухов, В. А. Шувалов и И. А. Шувалова, Биофизика **15** (3), 438 (1970).
14. Li Sun, E. R. Kantorowitz, and W. C. Galley, Eur. J. Biochem. **245**, 32 (1997).
15. Ю. А. Владимиров и А. Я. Потапенко. *Физико-химические основы фотобиологических процессов* (Выш. шк., М.: 1989).
16. S. Horie and M. Morrison, J. Biol. Chem. **238** (8), 2859 (1963).
17. T. Omura and R. Sato, J. Biol. Chem. **239** (7), 2379 (1964).
18. Р. Стейниер, Э. Эдельберг и Дж. Ингрэм, *Мир микробов* (Мир, М., 1989), т. 2.
19. G. H. Weenk, Int. J. Food Microbiol. **17**, 159 (1992).
20. P. E. M. Gibbs, A. Borden, and C. W. Lawrence, Nucl. Acids Res. **23**, 1919 (1995).

21. S. Khan and R. M. Macnab, *J. Mol. Biol.* **138**, 563 (1980).
22. S. Wright, B. Walia, J. S. Parkinson, and S. Khan, *J. Bacteriol.* **188** (11), 3962 (2006).
23. T. I. Karu, G. S. Kalendo, V. S. Letokhov, and V. V. Lobko, *Il Nuovo Cimento D* **3**, 309 (1984).
24. T. Karu, N. Smolyaninova, and A. Zelenin, *Lasers in the Life Sciences* **4**, 167 (1991).
25. P. A. Lukyanovich, B. A. Zon, A. A. Kunin, and S. N. Pankova, *Laser Phys.* **25**, 045602 (2015).
26. R. J. Lanzafame, I. Stadler, A. F. Kurtz, et al., *Lasers in Surgery and Medicine* **39**, 534 (2007).
27. N. Vermeulen, W. J. Keeler, K. Nandakumar, and K. T. Leung, *Biotechnol. Bioeng.* **99**, 550 (2008).
28. C. S. Downes, A. R. S. Collins, and R. T. Johnson, *Biophys. J.* **25**, 129 (1979).
29. R. M. Goody and Y. L. Yung, *Atmospheric Radiation* (Oxford University Press, New York, 1989).
30. P. A. Lukyanovich, B. A. Zon, M. Y. Grabovich, et al., *Laser Phys. Lett.* **13**, 015602 (2016).

## **The Nonlinear Effect of the Composite Influence of Red and Blue Light on Bacteria *Escherichia coli* Viability**

**P.A. Lukyanovich, B.A. Zon, M.Yu. Grabovich, E.V. Shchelukhina, Yu.I. Danilova,  
M.V. Orlova, Yu.O. Sapeltseva, and D.I. Sinugina**

*Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394006 Russia*

A non-linear dependence of the inhibition of *E. coli* cells is found when irradiated simultaneously with the blue and red regions of the spectrum at a power density of 100 mW/cm<sup>2</sup>. Such dependence is explained by the assumption of a cascade two-photon absorption of light by DNA molecules with an intermediate resonance at cellular chromophores, causing excitation and subsequent DNA damage similar to damage when exposed to UV radiation.

*Key words: two-photon absorption, DNA damage*