

ФГБОУ ВО «ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ  
ЦКП «ИНСТИТУТ МИКРО- И НАНОТЕХНОЛОГИЙ ОГУ»

---

*На правах рукописи*

ИШЕМГУЛОВ Азамат Талгатович

ДЛИТЕЛЬНАЯ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ МОЛЕКУЛ  
СЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В ТКАНЯХ  
ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ

Специальность: 01.04.05 – оптика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени  
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:  
доктор физико-математических наук,  
профессор Сергей Николаевич Летута

---

Москва – 2018

## Оглавление

Введение.....	4
1 Замедленная люминесценция зондов в биологических образцах.....	14
1.1 Физические основы замедленной люминесценции.....	14
1.2 Флуоресцентная диагностика.....	20
1.3 Фотодинамическая терапия и диагностика.....	26
1.4 Генерация синглетного кислорода в биологических тканях.....	32
1.5 Физическое и химическое тушение синглетного кислорода .....	36
1.6 Время жизни синглетного кислорода в живых системах .....	39
1.7 Оптическая регистрация синглетного кислорода .....	43
2 Методы и материалы изучения замедленной люминесценции зондов в биологических образцах .....	49
2.1 Экспериментальная установка .....	49
2.2 Экспериментальная методика регистрации стационарных спектров ..	52
2.3 Экспериментальные методики регистрации кинетических кривых ....	55
2.4 Измерение спектров длительной люминесценции образцов .....	58
2.5 Некоторые особенности опухолевых тканей.....	59
2.6 Материалы и объекты исследований.....	64
3 Влияние кислорода на замедленную люминесценцию.....	72
ксантеновых зондов в тканях.....	72
3.1 Тушение собственной люминесценции триплет-возбуждённого зонда кислородом .....	72
3.2 Особенности замедленной флуоресценции, вызываемой синглет-триплетной аннигиляцией.....	75
3.3 Скорость затухания кинетики замедленной люминесценции зондов..	79

3.4 Замедленная люминесценция фотосенсибилизаторов в тканях со сниженным содержанием кислорода .....	82
3.5 Определение вклада различных механизмов в замедленную флуоресценцию .....	87
3.6 Взаимодействие молекул-зондов с субстратом.....	91
4 Длительная люминесценция зондов в тканях при фотодинамическом действии .....	96
4.1 Световое тушение замедленной флуоресценции .....	96
4.2 Роль фотохимических реакций окисления в тушении замедленной флуоресценции .....	102
4.3 Флуоресцентная дозиметрия в фотодинамической терапии.....	108
4.4 Диффузионно-кинетическая модель светового тушения замедленной флуоресценции .....	111
4.5 Фосфоресценция при фотодинамической дезоксигенации.....	119
4.7 Визуализация оксигенации тканей <i>in vitro</i> .....	121
4.8 Непрерывный контроль кислорода в тканях <i>in vivo</i> .....	124
Заключение .....	130
Список сокращений и условных обозначений.....	132
Публикации автора по теме диссертации.....	133
Список использованных источников .....	137
Благодарности .....	149

## Введение

Исследование люминесценции молекулярных зондов, локализованных в тканях, имеет выраженное прикладное значение для разработки оптических неинвазивных систем терапии и диагностики. Потенциал флуоресцентных свойств эндогенных и экзогенных зондов может быть использован для решения широкого спектра не только прикладных биомедицинских, но и фундаментальных научных задач. В перечне таких задач дистанционное распознавание скрытых патологических процессов в тканях, оценка характеристик ткани (вязкость, рН, содержание кислорода), определение активности различных тканевых и клеточных компонент и другие.

Отдельное направление в люминесцентной диагностике - использование свечения, обусловленного относительно долговременной релаксацией триплет-возбужденных состояний молекул фотосенсибилизаторов (ФС). Метастабильные триплетные состояния ФС эффективно тушатся молекулярным кислородом, в результате чего образуется синглетный кислород (СК). СК является одним из основных агентов фотодинамической терапии (ФДТ). Поэтому сведения о специфике длительной люминесценции флуоресцентных зондов в различных тканях востребованы в ФТД для повышения эффективности лечения и расширения области ее применения.

Для повышения точности прогноза при оптической диагностике и эффективности ФДТ требуется оперативный контроль содержания кислорода в ткани. Перспективным для решения такой задачи выглядит использование длительной люминесцентных зондов. Возбуждённые триплетные зонды в тканях служат и фотосенсибилизаторами СК, и люминесцирующими агентами, несущими «диагностическую» информацию. Люминесцентные зонды являются индикаторами состояния тканей, поскольку при развитии патологии механизмы накопления и расходования кислорода в них могут существенно меняться. Последнее крайне важно

для ранней диагностики патологий, так как первичные биохимические изменения в тканях трудно распознать с использованием традиционных (нелюминесцентных) способов.

Релаксация возбужденных триплетных состояний ФС в тканях может быть излучательной или безызлучательной. В присутствии достаточного количества кислорода в среде основной канал релаксации ФС – безызлучательный и свечение с участием триплетных возбуждений заметно подавляется. Тушение фосфоресценции зондов нашло практическое применение для оценки количества образующегося СК в системе. Подобный подход часто применяют для неживых систем. Однако в биологических средах длительное послесвечение ФС сильно зависит от состояния окружения, без учета которого простое перенесение результатов модельных экспериментов на живые системы некорректно.

Излучение с участием триплетных состояний наблюдается в виде замедленной флуоресценции (ЗФ) или фосфоресценции (ФФ). Существуют несколько разновидностей ЗФ. Если разность энергий первого возбужденного синглетного и триплетного состояний в молекуле ФС невелика, то в результате термической активации обратной интеркомбинационной конверсии из триплетного состояния в синглетное, возникает термоактивированная замедленная флуоресценция (ТЗФ).

В средах с подвижными молекулами возможна триплет-триплетная аннигиляция (ТТА) двух молекул ФС в триплетном состоянии. Существует конечная вероятность того, что триплет-триплетная пара распадается с образованием возбужденного синглетного состояния с последующей замедленной флуоресценцией, которую в дальнейшем будем называть ТТ-ЗФ.

Подвижные молекулы ФС в триплетном состоянии и СК также могут аннигилировать. В результате синглет-триплетной аннигиляции (СТА) кислород возвращается в основное невозбужденное триплетное состояние, а ФС переходит в первое возбужденное синглетное состояние. Так как в настоящей работе в основном пойдёт речь именно об этом типе свечения, будет для краткости обозначать

его как АЗФ. АЗФ одновременно несет информацию и о свойствах ФС, и о свойствах СК. Вероятность перехода ФС в синглетное состояние при СТА существенно выше, чем при ТТА, поэтому интенсивность АЗФ в тканях существенно выше интенсивности их собственной ЗФ или фосфоресценции СК. Эти преимущества обеспечивают АЗФ широкие перспективы для использования при неинвазивном мониторинге состояния тканей и дозиметрии в режиме реального времени.

Процессы, связанные с АЗФ, хорошо изучены для модельных объектов, таких как растворы, суспензии, полимерные плёнки или мицеллы. Однако особенности данного вида ЗФ пока мало изучены для зондов, находящихся в биологических тканях, что в совокупности с практической востребованностью такой информации для нужд оптической диагностики и терапии, послужило обоснованием проведения настоящего диссертационного исследования.

**Цель работы.** Цель настоящей работы – определение эффективности конкурирующих каналов релаксации триплетных состояний молекул фотосенсибилизаторов в тканях здоровых и сапсер-больных животных и разработка на этой основе оптического метода мониторинга содержания кислорода в тканях.

**Задачи работы.** Для достижения цели поставлены следующие задачи.

1. Исследовать особенности затухания различных видов длительной люминесценции ФС в биологических тканях, оценить вклад каждого из них в интегральный сигнал люминесценции и разработать способ выделения ЗФ, обусловленной СТА.

2. Изучить особенности АЗФ в тканях при изменении концентрации кислорода в них, а также исследовать свечение конкурирующих каналов релаксации триплетных возбуждений: ТТА, ТЗФ и ФФ.

3. Исследовать чувствительность АЗФ к фотодинамическому расходу кислорода в здоровых и поражённых патологией тканях, выявить возможные различия. Разработать метод оценки эффективности фотодинамического действия с помощью регистрации АЗФ.

4. Разработать метод мониторинга содержания кислорода в тканях по измерению АЗФ, сравнить эффективность данного метода с другими оптическими методами, основанными на регистрации ТЗФ или ФФ.

5. Построить математическую модель кинетики затухания ЗФ и ФФ зондов в здоровых тканях и тканях с патологией.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Люминесцирующие экзогенные ксантоновые фотосенсибилизаторы в живых тканях находятся преимущественно в связанном (иммобилизованном) состоянии. Ввиду малой подвижности фотосенсибилизаторов и низкой вероятности их взаимодействия, вклад свечения, обусловленного однородной триплет-триплетной аннигиляцией  $T_1 + T_1$  молекул, предполагающей диффузию реагентов, в общем сигнале замедленной флуоресценции пренебрежимо мал.

2. Замедленная флуоресценция ксантоновых фотосенсибилизаторов в живых тканях формируется как суперпозиция термоактивированной ЗФ и АЗФ. При нормальных условиях в живых тканях в интервале времени 0 – 10 мкс основной вклад в ЗФ вносит АЗФ. Кинетическая кривая в этом интервале немонотонна, содержит участки нарастания и спада. Вклад АЗФ в интегральную ЗФ уменьшается при снижении содержания кислорода в тканях и плотности фотосенсибилизаторов в триплетном состоянии.

3. При импульсно-периодическом возбуждении фотосенсибилизаторов серией лазерных импульсов наносекундной длительности в живых тканях при нормальных условиях имеет место тушение АЗФ с одновременным увеличением интенсивностей и длительностей термоактивированной ЗФ и фосфоресценции. Тушение АЗФ усиливается с ростом энергии и частоты следования возбуждающих импульсов. Интенсивность и форма кривой АЗФ восстанавливаются через 3 – 5 секунд после окончания возбуждения. Тушение АЗФ обусловлено тем, что убыль синглетного кислорода в тканях в ходе фотодинамических реакций превышает приток кислорода в ткань из кровотока или внешней среды.

4. Эффект тушения АЗФ фотосенсибилизаторов при импульсно-периодическом возбуждении значительно сильнее выражен в злокачественных опухолях, чем в здоровых тканях. Это обусловлено повышенным накоплением фотосенсибилизаторов в новообразованиях и высокой чувствительностью опухолей к окислительному действию синглетного кислорода.

5. В живых тканях содержатся фотосенсибилизаторы, недоступные для кислорода. Кинетика длительной люминесценции таких молекул не зависит от концентрации кислорода в ткани. Термоактивированная ЗФ и фосфоресценция фотосенсибилизаторов складываются из свечений доступных и недоступных для кислорода молекул.

#### **Научная новизна работы.**

1. Исследована длительная люминесценция экзогенных ФС в живых тканях. Показано, что при нормальных условиях в тканях доминирующим процессом, определяющим характер длительной люминесценции ксантовых ФС, является тушение их триплетных состояний молекулярным кислородом с образованием синглетного кислорода  $^1\text{O}_2$  и последующей синглет-триплетной  $T_1 + ^1\text{O}_2$  аннигиляцией. Возникающая при этом АЗФ на временах 0 - 10 мкс дает основной вклад в длительную люминесценцию ФС. При уменьшении концентрации кислорода или плотности триплетных возбуждений ФС вклад конкурирующих каналов излучательной релаксации триплетных возбуждений возрастает.

2. Обнаружен эффект тушения АЗФ фотосенсибилизаторов в биологических тканях при импульсно-периодическом возбуждении молекул. Показано, что такое тушение связано с уменьшением концентрации СК в тканях в результате фотодинамических реакций. Установлена зависимость эффективности тушения от частоты периодического возбуждения.

3. Показано, что эффект тушения АЗФ наблюдается преимущественно в тканях со злокачественной патологией и почти не проявляется в здоровых тканях.

На этом основании предложен способ оптической диагностики злокачественных новообразований.

4. Показано, что АЗФ можно выделить из общего сигнала ЗФ и использовать в качестве индикатора уровня подвижного кислорода в ткани. Предложен способ мониторинга содержания кислорода в тканях в режиме реального времени.

5. Предложен способ и экспериментально определено *in vitro* и *in vivo* время восстановления в тканях исходной концентрации кислорода, израсходованного при фотодинамических процессах. Показано, что время восстановления исходного содержания кислорода в тканях *in vivo* из кровотока короче, чем в тканях *in vitro* за счет диффузии из атмосферы.

6. Установлено, что в тканях часть люминесцирующих ФС экранируются субстратом и не взаимодействуют с кислородом. Поэтому методика оценки содержания кислорода в ткани, основанная на регистрации АЗФ более информативна и точна по сравнению с измерениями ФФ или ТЗФ.

#### **Научно-практическая значимость.**

1. Выявленные закономерности затухания длительной люминесценции ФС в биологических тканях позволяют установить механизмы их взаимодействия с микроокружением и оценить активность СК в ткани.

2. Возможность выделения АЗФ из общего сигнала ЗФ в сочетании с более высокой чувствительностью АЗФ к изменению содержания тканевого кислорода по сравнению с ТЗФ или ФФ, позволяет оценивать уровень оксигенации биологических тканей в режиме реального времени.

3. По изменению интенсивности АЗФ в тканях при различных режимах облучения ФС можно получать информацию об эффективности фотодинамических реакций с участием СК и процессах оксигенации тканей после лазерного облучения.

4. Возможность отслеживания динамики изменения содержания подвижного кислорода в тканях является важным приложением в ФДТ для мониторинга

количества образуемого и поглощаемого тканью СК, т.е. оперативного контроля «эффективной дозы» облучения при ФДТ.

5. Обнаруженные различия в характере тушения АЗФ при строб-возбуждении в злокачественных опухолях и здоровых тканях могут найти применение в оптической диагностике.

**Достоверность полученных результатов.** Достоверность полученных результатов обеспечена применением современных приборов и оборудования, методов исследования и обработки экспериментальных данных и их хорошей воспроизводимостью. Полученные результаты и выводы основаны на значительном количестве исследованных объектов (лабораторных мышей – 64). В ходе исследования использовано современное программное обеспечение. Защищаемые положения не противоречат общепринятым представлениям.

**Участие в научных проектах.** Результаты данной работы получены в ходе выполнения научных проектов (государственное задание на проведение научно-исследовательских работ) №450, № 3.6358.2017/БЧ, а также проекта РФФИ № 17-32-50051.

**Апробация работы.** Изложенные в диссертации результаты и выводы докладывались, обсуждались и дискутировались в рамках различных конференций (симпозиумов), в том числе: Russian-Japanese Conference “Chemical Physics of Molecules and Polyfunctional Materials” (OSU, Orenburg, 2014; HU, Hiroshima, 2016); V Съезд биофизиков России (ЮФУ, Ростов-на-Дону, 2015); Международная конференция молодых учёных «Экспериментальная и теоретическая биофизика '15» (ИТЭБ РАН, Пущино, 2015); Международная молодёжная научная школа-конференция «Современные проблемы физики и технологий» (МИФИ, Москва, 2016-2018); Международная научно-техническая конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии» (СГУ, Севастополь, 2016-2017); 4-th International Symposium “Molecular Photonics” dedicated to academician A.N. Terenin (St. Petersburg, 2016); International symposium “Fundamentals of Laser

Assisted Micro- and Nanotechnologies” (ИТМО, Санкт-Петербург, 2016); 2nd International Symposium on “Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine” (Moscow, 2017); Симпозиум «Современная химическая физика» (Туапсе, 2016-2018); VI Symposium on Optics & Biophotonics “Saratov Fall Meeting” (SGU, Saratov, 2018).

**Публикации.** Основные результаты диссертации опубликованы в 25 работах, в том числе в 3 статьях в рецензируемых научных журналах, удовлетворяющих Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, и 1 статье из списка ВАК РФ. Список публикаций приведён в конце диссертации.

**Личный вклад автора.** Автор настоящей работы непосредственно принимал участие в организации, подготовке и проведении экспериментов, обработке, анализе и обобщении данных, построении и расчётах математической модели, формулировании результатов и выводов.

**Содержание диссертационной работы.** Во введении обоснована актуальность темы исследования, отражена новизна и практическая значимость работы, сформулированы цели и задачи исследования, определены защищаемые положения, расписано краткое содержание по главам.

В первой главе представлен литературный обзор по теме исследования. Кратко описаны физические основы замедленной люминесценции красителей. Рассмотрены основные вопросы фотодинамической терапии и оптической диагностики тканей. Основное внимание в литературном обзоре уделяется особенностям образования, миграции и тушения синглетного кислорода в биологических объектах, а также методикам наблюдения данных процессов. Завершен обзор постановкой задач диссертационного исследования.

Во второй главе описаны объекты исследования, материалы и методы изучения длительной люминесценции молекул зондов в биологических тканях, использованные в диссертации.

Третья глава диссертации посвящена выявлению особенностей затухания ЗФ различных типов и ФФ экзогенных ФС в живых тканях *in vitro*. Исследовано послесвечение ФС в обычных условиях и при деоксигенации окрашенных тканей путем их инкубации в проточном газообразном азоте. Показано, что при нормальных условиях ЗФ ксантоновых ФС в тканях формируется как суперпозиция термоактивированной ЗФ и АЗФ. В частности, показывается, что влиянием взаимной триплет-триплетной аннигиляции зондов можно пренебречь для образцов, находящихся на атмосферном воздухе и имеющих доступ к кислороду. Описано, как влияние окружения на люминесценцию молекул ФС отражается на спектральных характеристиках излучения. Продемонстрировано, что чувствительность АЗФ к изменению концентрации кислорода в тканях выше, чем ТЗФ или ФФ, что делает целесообразным использование именно АЗФ для мониторинга оксигенации тканей, показанное в следующей главе.

В четвертой главе представлены результаты исследований особенностей длительной люминесценции ФС при изменении содержания кислорода в тканях *in vitro* и *in vivo* в ходе фотодинамических реакций. При импульсно-периодическом возбуждении ФС в тканях обнаружен эффект светового тушения замедленной флуоресценции (СТЗФ). Показано, что АЗФ можно выделить из общего сигнала ЗФ и использовать в качестве индикатора уровня подвижного кислорода в ткани. Для описания СТЗФ предложена кинетическая модель процессов фотосенсибилизации и химического расходования СК, включающая диффузионные операторы для учёта миграции кислорода к неподвижным триплетным центрам. Установлено, что в тканях часть люминесцирующих ФС экранируются субстратом и не взаимодействуют с кислородом. Предложен способ мониторинга содержания кислорода в тканях в режиме реального времени. Предложен способ и экспериментально определено *in vitro* и *in vivo* время восстановления в тканях исходной концентрации кислорода, израсходованного при фотодинамических процессах. Показано, что время восстановления исходного содержания кислорода в тканях *in vivo* из

кровотока короче, чем в тканях *in vitro* за счет диффузии из атмосферы. По изменению интенсивности АЗФ предложено оценивать эффективность фотодинамического действия во время ФДТ.

Результаты и выводы диссертационной работы кратко сформулированы в заключении.

# **1 Замедленная люминесценция зондов в биологических образцах**

## **1.1 Физические основы замедленной люминесценции**

Люминесценцией называют избыток над температурным излучением тела в том случае, если это избыточное излучение обладает конечной длительностью примерно  $10^{-10}$  секунд и больше. Это классическое определение С.И. Вавилова, данное им в 1948 году, содержит две важнейшие отличительные особенности люминесценции. Во-первых, люминесценция не обусловлена тепловой энергией. Во-вторых, люминесценция отличается от других видов нетеплового излучения (например, рассеяния и отражения света, комбинационного рассеяния, излучения Черенкова) по критерию длительности [1–4].

Люминесценция связана с излучательным (радиационным) переходом атомов или молекул из возбуждённых энергетических состояний в основное. Источником энергии при этом могут быть химические реакции, внешнее излучение, тепловое возбуждение и т.д. В настоящей работе будет рассматриваться свечение молекул под действием внешнего светового источника (фотолюминесценция).

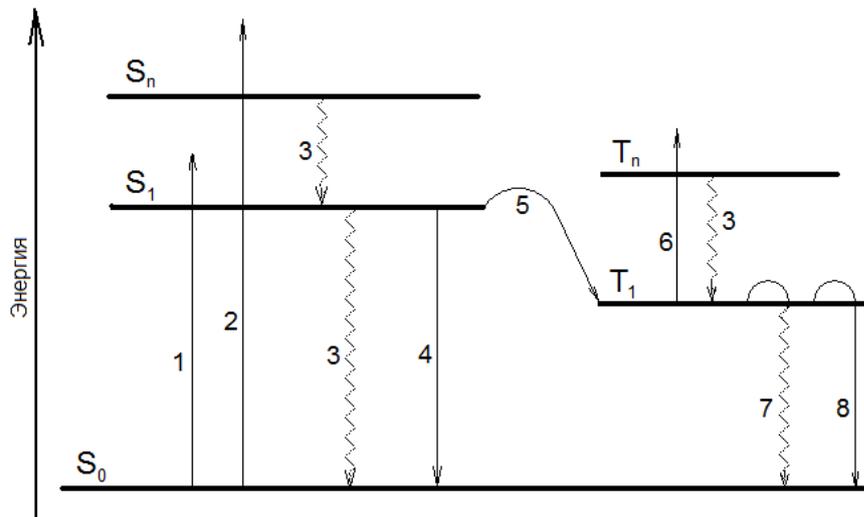
По продолжительности все виды люминесценции исторически разделяли на два больших класса под названиями флуоресценции и фосфоресценции. Флуоресценцией называли свечение, практически мгновенно затухающее после прекращения возбуждения (за время порядка  $10^{-9}$  с). Более длительное свечение (от  $10^{-6}$  с до нескольких минут или даже часов) называли фосфоресценцией (ФФ). В дальнейшем появилось понятие замедленной (длительной) флуоресценции (delayed fluorescence) – свечения, обладающего спектром обычной (быстрой) флуоресценции (prompt fluorescence) и длительностью ФФ. В случае органических молекул как ФФ, так и замедленная флуоресценция (ЗФ) связаны с переходом этих молекул в метастабильные возбуждённые состояния, долгое время жизни которых

обусловлено тем, что переход в основное состояние запрещён квантовомеханическими правилами отбора.

В настоящей работе речь пойдёт в основном о кинетике замедленной люминесценции. Для изучения кинетики длительного послесвечения в качестве возбуждающего источника обычно используют либо короткие импульсы света, либо модулированный свет, поэтому методы регистрации кинетики можно разделить на импульсные и фазово-модуляционные. Первые состоят в простом возбуждении люминесценции коротким импульсом света с последующей записью сигнала через фиксированные промежутки времени. Это требует наличия, по крайней мере, наносекундных источников света и высокочувствительных систем регистрации. Вторые предусматривают использование непрерывных источников света, интенсивность которых промодулирована с некоторой частотой. При этом регистрируются фаза и (или) глубина модуляции испускаемого излучения [4–5]. В настоящей работе реализован первый способ.

Поглощение молекулами квантов света сопровождается переходом молекул в возбуждённые электронные состояния. Состояние молекулы в квантовой механике традиционно может описываться волновой функцией. В приближении Борна-Оппенгеймера полную волновую функцию можно выразить через произведение её пространственной, колебательной и спиновой составляющих. Различные электронные состояния молекулы можно классифицировать, рассматривая симметрию пространственных и спиновых волновых функций (более подробно [3–4]). Так, электронные спиновые волновые функции молекул представляются в виде произведения спиновых волновых функций неспаренных электронов. Суммарный спин  $S$  молекулы с чётным числом электронов должен равняться целому числу. Величину  $(2S+1)$  называют мультиплетностью и при обозначении состояний обычно указывают верхним индексом слева. Состояния, имеющие суммарный электронный спин, равный нулю, называют синглетными ( $S$ -состояния), равный единице – триплетными ( $T$ -состояния), двум – квинтетными и т.д. В основном со-

стоянии у большинства молекул с чётным числом электронов все электроны спарены и суммарный спин равен нулю (т.е. основное состояние большинства молекул синглетное  $S_0$ ). В одноэлектронных возбуждённых состояниях молекул с чётным числом электронов, по крайней мере, два электрона занимают различные орбитали и могут иметь как одинаковые, так и разные спины. Поэтому такие молекулы имеют два набора электронных состояний: синглетные и триплетные. Наглядно представить процессы переходов между различными состояниями возбуждённых молекул можно с помощью диаграммы Яблонского, упрощённый вариант которой представлен на рисунке 1.1.



1, 2 – поглощение; 3 – внутренняя конверсия; 4 – флуоресценция; 5 – интеркомбинационная конверсия; 6 – триплет-триплетное поглощение; 7 – безызлучательная дезактивация; 8 – фосфоресценция.

Рисунок 1.1 – Упрощённая диаграмма Яблонского

Переходы между электронными состояниями регулируются спиновым правилом отбора, согласно которому переход с синглетного на триплетный уровень (и обратно) запрещён. Поэтому при поглощении кванта света у молекул заселяются состояния той же мультиплетности, что и исходное. Как правило, это первый синглетный возбуждённый уровень  $S_1$ . Затем за очень короткий промежуток вре-

мени ( $10^{-12} \div 10^{-10}$  с) молекула переходит в низшее возбуждённое состояние за счёт ряда безызлучательных переходов (внутренней конверсии). Однако если безызлучательный переход сопровождается изменением спина (с участием спин-орбитального взаимодействия), то может заселяться и низший возбуждённый триплетный уровень (переход  $S_1 \rightarrow T_1$ ) – происходит интеркомбинационная конверсия. Вероятность такого события зависит от строения молекулы, например, она увеличивается при наличии тяжёлых атомов. Поскольку переход  $T_1 \rightarrow S_0$  запрещён, триплетные возбуждённые состояния (далее для краткости «триплетные возбуждения») оказываются долгоживущими. Поэтому излучение, возникающее при таких запрещённых переходах (ФФ или ЗФ), обычно имеет небольшой выход и значительное время жизни (вплоть до нескольких секунд). Так как обычно состояние  $T_1$  лежит ниже по энергии, чем  $S_1$ -состояние, полоса ФФ сдвинута относительно флуоресценции в длинноволновую область. Хотя иногда наблюдается частичное перекрывание полос флуоресценции и ФФ, обычно в спектрах эти виды люминесценции хорошо разрешаются [6].

Обычно ФФ молекул изучают в твёрдой фазе, так как константы скорости этого процесса очень малы, и различные примеси и компоненты в жидких или газообразных средах практически полностью тушат ФФ. Показано, что в твёрдой фазе при отсутствии добавок затухание ФФ обычно идёт экспоненциально [5]:

$$I_{phos} = I_{phos}^0 \exp\left[-\frac{t}{\tau_T}\right] \quad (1.1)$$

где  $\tau_T$  – время жизни триплетного возбуждённого состояния. В присутствии значительного количества тушителей (например, кислорода) наблюдается статическое тушение, при котором уменьшается только квантовый выход ФФ, а продолжительность остаётся прежней. Таким образом, по ФФ можно оценить кинетические характеристики собственно  $T$ -возбуждённых состояний [3, 4].

Продолжительность затухания ЗФ сопоставима со временами затухания ФФ, отсюда полагают, что ЗФ также генерируется через  $T$ -возбуждённые состоя-

ния. Чтобы «светить» в полосе флуоресценции, молекуле необходимо вернуться в  $S_1$ -состояние, т.е. должна быть осуществлена обратная интеркомбинационная конверсия. В соответствии со способом перехода  $T_1 \rightarrow S_1$  выделяют несколько видов ЗФ.

В твердых телах можно наблюдать **рекомбинационную** ЗФ, когда в результате фотоионизации образуются электроны, захватываемые ловушками. В результате диффузии электроны могут рекомбинировать с ионами, давая синглетные возбуждённые состояния [5]. В данной работе такой вид ЗФ рассматриваться не будет, так как данный вид ЗФ не наблюдался для зондов в биологических тканях.

Если энергетическая щель между уровнями  $T_1$  и  $S_1$  невелика, то разница может быть скомпенсирована за счёт теплового возбуждения. При случайном приобретении дополнительной энергии молекула переходит на более высокие колебательные состояния  $T_1$ -уровня, с которых может произойти обратная интеркомбинационная конверсия в синглетное состояние. Такую разновидность ЗФ называют **термоактивационной** (термоактивированной, ЗФ типа Е (эозиновая) по Паркеру [127]). Интенсивность термоактивационной замедленной люминесценции (ТЗФ) увеличивается, очевидно, с ростом температуры, и прямо пропорциональна концентрации триплет-возбуждённых состояний, поэтому кинетика ТЗФ в общем случае аналогична кинетике ФФ [128].

ЗФ может образоваться и в случае контактов между возбуждёнными молекулами, когда образуются временные комплексы и происходит перераспределение энергии возбуждения. Такую ЗФ называют **аннигиляционной**. Взаимодействие двух  $T$ -возбуждённых молекул называют триплет-триплетной аннигиляцией (ТТА). В ходе триплет-триплетного переноса энергии между возбуждёнными молекулами, который осуществляется по обменно-резонансному механизму, одна из молекул оказывается в возбужденном синглетном состоянии:



Такую разновидность ЗФ исторически называют «замедленной люминесценцией Р-типа» (пиреновая). Кривая затухания такого свечения также монотонна, однако его продолжительность вдвое короче, чем у ТЗФ.

Хорошим тушителем возбуждённых триплетных состояний является молекулярный кислород, т.к. основное состояние молекулы кислорода является триплетным:



В ходе этой реакции образуется синглетный кислород (СК), который, диффундируя в среде, может вступить в реакцию с молекулой в триплет-возбуждённом состоянии. Эта реакция с очень большой вероятностью даёт  $S_1$ -состояния:

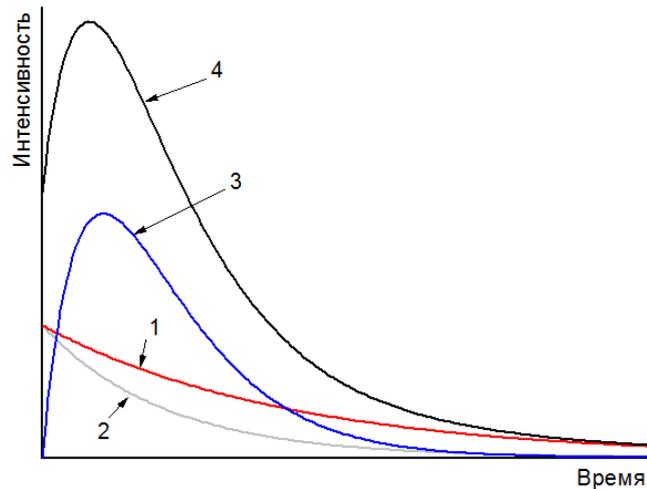


В результате этого процесса наблюдается ЗФ, кинетика затухания которого имеет выражено немонотонный характер [5, 7–9]. Процесс (4) называют синглет-триплетной аннигиляцией (СТА). Форма кинетической кривой и интенсивность свечения АЗФ сильно зависят от количества кислорода, способного реагировать с люминофором. Свечение АЗФ также иногда называют замедленной люминесценцией Каутского-Мюллера [152].

Отдельные типы ЗФ наблюдались для эритрозина в биологических тканях [10–12, 130]. Типичные формы кривых затухания ТЗФ, ТТ-ЗФ и АЗФ показаны на рисунке 1.2. Экспериментально наблюдаемая ЗФ является суммой соответственно трёх типов ЗФ: ТЗФ, ТТА- и АЗФ [12]:

$$I_{3\phi}(t) = A_1 n_T(t) n_\Delta(t) + A_2 n_T^2(t) + A_3 n_T(t) \quad (1.5)$$

где  $I_{3\phi}(t)$  – интенсивность наблюдаемого сигнала ЗФ, пропорциональная концентрации возбуждённых молекул;  $N_T(t)$  – концентрация красителя в триплетном состоянии;  $N_\Delta(t)$  – концентрация синглетного кислорода;  $A_1, A_2, A_3$  – неотрицательные коэффициенты.



Кинетика затухания ТЗФ (1), ТТ-ЗФ (2), АЗФ (3) и их суммы (4) при импульсном возбуждении

Рисунок 1.2 – Схематический вид кинетики затухания основных типов ЗФ эритрозина в биологических тканях

Однако в [10–12] показано, что как в суспензиях белков с красителем, так и в биологических тканях, ТТ-ЗФ даёт пренебрежимо малый вклад в наблюдаемую интенсивность ЗФ, и в большинстве случаев вторым слагаемым в (5) можно пренебречь.

## 1.2 Флуоресцентная диагностика

Оптическая медицинская диагностика связана с применением видимого (включая ближние инфракрасный и ультрафиолетовый диапазоны) излучения для прижизненного зондирования тканей с целью получения диагностической информации о состоянии, биохимическом составе, морфологическом строении обследуемого участка. Существенными преимуществами таких методов являются: неионизирующий характер излучения, неинвазивность, получение информации в режиме реального времени. В основе этих методов лежит факт, что все основные биохимические и клеточные компоненты тканей обладают характерными спектрами поглощения, отражения, рассеяния и люминесценции, которые меняются

при патологических состояниях [13]. Клинические преимущества оптической флуоресцентной диагностики могут помочь в изучении фармакокинетики лекарственных средств, более эффективный поиск сайтов для биопсии, оказывает помощь в определении хирургического поля при операции. Изменения в спектрах и кинетике флуоресценции соответствуют биохимическим изменениям в тканях, которые предшествуют морфологическим изменениям. Как правило, неблагоприятные биохимические изменения являются первичными и не могут диагностироваться *in vivo* иными методами [14].

Широкое применение среди различных методов оптической диагностики получили люминесцентные методы. Они основаны на анализе характеристик наведенной люминесценции в биологических тканях при освещении низкоинтенсивным лазерным источником. Основной областью применения таких методов обычно считают онкологию, дерматологию и офтальмологию, однако многие воспалительные процессы в тканях, а также изменения, связанные с нарушением обмена веществ, кислородного дыхания и гемодинамики, также сопровождаются изменением характеристик свечения флуорофоров в тканях.

Обширный обзор [15] посвящен различным методам оптической диагностики, а также проблемам взаимодействия низкоинтенсивного светового излучения с биологическими тканями. Приведены физические основы методов и области их применения. Большое внимание уделено использованию флуоресцентных красителей в медицинской диагностике, приведена классификация используемых флуорофоров, произведен обзор современных методов диагностики.

С развитием современных оптических методов, основанных на применении лазеров, появилась возможность визуализировать и изучать люминесценцию одиночных молекул-флуорофоров, что открыло новые возможности для медицины и биологии. В работе [16] описаны методы, применимые в визуализации одиночных молекул в живых клетках: лазерная эпифлуоресцентная, конфокальная, двухфотонная микроскопия, а также микроскопия ближнего поля и полного внутреннего

отражения. Обзор [17] уделяет основное внимание флуоресцентным методам визуализации, в частности и микроскопии, с особым акцентом на диагностику онкологических заболеваний.

Работа [18] охватывает широкий спектр люминесцентных агентов для медицинской визуализации, включая подробную информацию об оптических и физических свойствах, которые могут повлиять на функцию зондов. Особое внимание уделяется меткам, позволяющим производить исследования биохимических процессов на молекулярном уровне в живых клетках.

В статье [19] предлагается использовать меченные флуорофором белки-антитела, чтобы визуализировать злокачественные первичные и вторичные опухоли поджелудочной железы. Авторы проводили исследования на мышах, флуоресценция меток наблюдалась вплоть до 3 недель после введения меченых антител. Таким образом, флуоресценция меток позволила опознать те опухоли, которые невидимы для других методов визуализации и диагностировались только гистологическими методами.

Среди огромного разнообразия различных флуоресцентных методов традиционно выделяют два больших направления исследований. Одно из них связано с использованием в качестве флуорофоров *экзогенных* зондов. В большинстве случаев такие методы основаны на повышенном накоплении красителей в опухолях, по сравнению со здоровыми тканями. Флуоресценция зондов в таком случае позволяет создать контрастное изображение региона опухоли. Вторая группа методов предполагает регистрацию флуоресценции *эндогенных* флуорофоров для исследования накопления в тканях природных хромофоров – никотинамидадениндинуклеотида (НАД), флавиновых ферментов, порфирина и т.п.

Изучение собственной люминесценции биологических тканей представляет большой интерес для биомедицинской диагностики, т.к. не требует производить каких-либо манипуляций с введением сенсбилизатора в ткань. В работе [20] исследованы спектры собственной флуоресценции нормальных и злокачественных

клеток легких при возбуждении в ближнем ультрафиолете, что соответствует максимумам поглощения тирозина, триптофана, коллагена, эластина, НАД и флавинадениндинуклеотида (ФАД). Установлено, что среднее значение интенсивности свечения выше в злокачественных клетках. Это свидетельствует о повышенной концентрации флуорофоров в раковых тканях по сравнению с аналогичными здоровыми тканями: триптофана в 1,5 раза, НАД в 3 раза и флавина в 4 раза.

Большое количество разнообразных хромофоров в ткани приводит к широкому и сложному спектру собственного свечения. Выделение и характеристика отдельных его компонентов представляют собой нетривиальную задачу [21].

Использование экзогенных флуорофоров, в отличие от эндогенных, позволяет в первую очередь получить более яркую люминесценцию, что способствует улучшению информативности сигнала. В качестве таких зондов широко используются органические красители. В качестве примера на рисунке 1.3 приведены структурные формулы некоторых красителей.

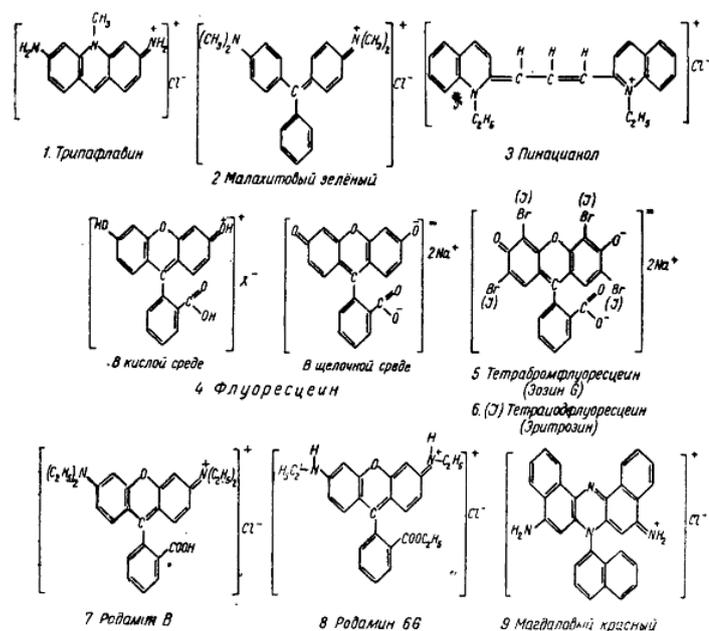


Рисунок 1.3 – Структурные формулы некоторых часто используемых в спектроскопии красителей [1]

Это классические объекты люминесцентных исследований, отличительным признаком которых является высокая поглощательная способность в видимой части спектра. Скелет молекул красителей строится из сочетаний шестичленных бензольных ( $C_6H_6$ ), пиридиновых ( $C_5H_5N$ ), азиновых ( $C_4H_5N_2$ ) и других колец, а также пятичленных пирольных колец ( $C_4H_5N$ ). Эти кольца соединяются между собой или непосредственно, или через центральный атом [1, 3, 146]. В растворах большинство этих красителей являются ионами. Поэтому у структурных формул справа от скобки указаны величины и знак их заряда. Такое описание было введено вследствие того, что заряд иона не связан с какими-нибудь определёнными атомами или группой иона, но относится ко всему иону в целом, распределяясь между отдельными его группами. В зависимости от кислотности или основности раствора ион красителя может оказаться или анионом, или катионом. Различным сенсбилизаторам, широко использующимся в биологии и медицине, посвящены обзоры [22–29].

Примечательная разновидность ФС – *галогензамещённые анионозные ксантеновые красители*, хорошо растворимые в воде. Значения квантового выхода синглетного кислорода в воде для эозина, эритрозина и бенгальского розового соответственно 0.52, 0.63 и 0.75. Поглощение у этих красителей находится в зеленой области спектра (480–550 нм). Катионные красители с поглощением на 500–600 нм – родамины. У родамина высокий квантовый выход флуоресценции (выше 0,9), однако низкий выход в триплетное состояние (менее 0,1). Бромирование родамина увеличивает квантовый выход СК от 0,02 до 0,4. [22].

Излучательные характеристики флуорофоров меняются при переходе от водных растворов к более сложно устроенным системам. В работе [29] методами абсорбционной и люминесцентной спектроскопии исследованы процессы взаимодействия полярного и неполярного люминесцентных зондов с альбуминами сыворотки крови человека. Установлено, что зонды полярный эозин и неполярный антрацен эффективно связываются с белками. Определены радиусы сферы тушения

триплетных состояний донора энергии эозина при добавлении акцептора антрацена, в процессе триплет-триплетного переноса энергии электронного возбуждения в белках для однородного и неоднородного распределения молекул акцептора по объему раствора. Показано, что уменьшение радиуса сферы тушения при добавлении поверхностно-активного вещества додецилсульфата натрия обусловлено структурными изменениями белка. В статье [23] рассмотрены флуоресцентные свойства красителя родамина в живых клетках, в том числе и в так называемых «жестких» условиях (низкий pH среды, изменение конформации белков). Проведены опыты по измерению интенсивности флуоресценции четырех общих родаминов на основе флуоресцентных красителей. Измерения производились как *in vitro*, так и на живых тканях (мышцы с метастатическим раком яичников).

Широко применяемые ФС при ФДТ – порфирины, как правило, имеющие красные полосы поглощения. Одна из особенностей порфиринов – низкий коэффициент экстинции в видимой области [157-8]. Например, одно из производных гематопорфирина – Фотогем – является препаратом для ФДТ, активно применяемым в России. Хорошим генератором СК являются хлорины и их производные. В насыщенном кислородом растворе квантовый выход СК для хлорина еб равен 0,64 [34].

Одним из ведущих направлений медицинской диагностики является совмещение флуоресцентной диагностики с традиционными методами скрининга. Один из таких подходов [24] предполагает совместное использование радионуклидных сцинтиграфических изображений с картинками, полученными с помощью флуоресцентной спектроскопии в ближнем инфракрасном диапазоне. Радионуклидное исследование позволяет быстро определить местоположение злокачественных очагов, а с помощью флуоресцентных методов можно в режиме реального времени точно определять контуры и размеры очага.

Ряд авторов [25–27] предлагают использовать для биомедицинской диагностики кинетическую спектроскопию в дополнение к традиционной флуоромет-

рии. Методы флуоресцентной диагностики, широко разрабатываемые в настоящее время, в большинстве основаны на анализе интенсивности свечения зондов. Однако использование в качестве основного диагностического параметра времени жизни возбуждённых состояний ФС, определяемое по времени их свечения, является более целесообразным. Особенности кинетики затухания послесвечения позволяют получить массу информации о температуре, полярности и вязкости среды, наличию тушителей. Кинетические параметры люминесценции, в отличие от флуорометрических, не зависят от интенсивности и длительности возбуждения, колебаний интенсивности источника, изменения концентрации и фотообесцвечивания (photobleaching) ФС. Время жизни является неким «собственным» результатом взаимодействия флуорофора и среды [26], так как не зависит ни от способа измерения, ни от начальных условий возбуждения. Высокая чувствительность в сочетании с параметрической независимостью делает время жизни флуоресценции достаточно мощным диагностическим инструментом.

### **1.3 Фотодинамическая терапия и диагностика**

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – метод лечения широкого спектра заболеваний, предполагающий системное или местное применение фотосенсибилизаторов (ФС), которые поглощаются тканью-мишенью и затем активизируются световым облучением. Молекулы ФС представляют собой люминофоры, поглощающие преимущественно в красной области (терапевтическое окно). Как правило, возбуждение ФС передаётся другим биологическим молекулам, вызывая каскад химических реакций, конечной целью которых является стимуляция биологического ответа – апоптоза и некроза клеток облучаемой ткани. Фундаментальным проблемам ФДТ посвящены обширные обзоры [30–33]. В настоящее время метод ФДТ одобрен для лечения многих доброкачественных и злокачественных заболеваний, а в последнее время также рассматривается в качестве средства для пре-

одоления лекарственной устойчивости грибов, вирусов, бактерий (т.е. как метод лечения микробных инфекций, см. также [A25]). Наиболее результативным считается использование ФДТ на начальных стадиях рака, либо в случае предраковых состояний; на поздних стадиях заболевания ФДТ оказывает лишь паллиативный эффект [152-6].

Процесс ФДТ можно разделить условно на следующие этапы: введение ФС в организм, преимущественное накопление ФС в области опухоли, возбуждение ФС в области интереса с формированием активных продуктов, гибель клеток и деструкция ткани, выведение ФС, заживление раны [33, 133].

К ФС, используемым в ФДТ, предъявляется ряд требований, среди которых ключевыми являются: отсутствие темновой токсичности и мутагенности; хорошая тропность к опухолевым тканям и низкая – к коже и слизистым; высокий квантовый выход в триплетное возбуждённое состояние – выше 0,4; высокий квантовый выход синглетного кислорода – выше 0,3 (или других активных продуктов в зависимости от типа фотореакций); стабильность в организме, устойчивость к фотообесцвечиванию; быстрое выведение из организма.

Кроме того, гомогенные (однородные) ФС должны обладать высокой растворимостью в воде, т.к. их доставка в ткань-мишень сопряжена с пребыванием в водной среде (кровь и межклеточная среда). Хорошая растворимость в воде необходима для инъекций и ввода в кровоток. Гидрофильные ФС менее склонны к самоагрегации в плазме, чем гидрофобные, что, как показано выше, влияет на образование активных радикалов. С другой стороны, тот же препарат должен проходить через липидные мембраны. Поэтому в состав ФС желательно включать как гидрофильные, так и гидрофобные участки, таким образом обеспечить амфифильность препарата. Как правило, скелеты ФС являются гидрофобными. Для того, чтобы они были растворимы в воде, необходимо наличие полярных заместителей. Водорастворимые ароматические углеводороды (нафталины, антрацены, бифенилы, хиноны) имеют достаточно низкое поглощение в видимом свете. Ка-

тионные красители считаются одними из перспективных ФДТ-агентов, т.к. они накапливаются в митохондриях за счет трансмембранного потенциала действия на внутренней митохондриальной мембране [22].

Локализация ФС в клетке зависит от характеристик клеточного поглощения и внутриклеточных условий. Также важную роль играет вид красителя. При введении ФС в кровь большинство из них образуют комплексы с белками крови [30]. Если ФС представляет собой длинную цепочку либо большой агрегированный комплекс, то он будет захватываться с помощью эндоцитоза и располагаться в лизосомах. Мелкие цепочки ФС могут проникать в клетку поодиночке и либо диффузно распределяться по цитоплазме, либо накапливаться в определённых органеллах (перинуклеарных пузырьках, аппарате Гольджи, митохондриях). Например, исследования внутриклеточной локализации фотофрина и N-моноаспартилхлорина еб показали, что фотофрин проникает в клетку путем диффузии и локализуется преимущественно в митохондриях, в то время как хлорин захватывается клетками в ходе эндоцитоза, перемещаясь таким образом в лизосомы [31, 33]. Фотохимические реакции могут спровоцировать перекисное окисление липидов, в результате чего целостность мембран нарушается, что может вызвать высвобождение ФС из первичного очага накопления с последующим перераспределением. Таким образом мигрируют красители, накапливающиеся в лизосомах и пероксисомах [22].

Радиус действия ФС в клетке не превышает несколько десятков нанометров, в то время как характерные размеры клетки составляют единицы – десятки микрометров [35]. Для повышения вероятности гибели клетки при ФДТ необходимо, чтобы ФС накапливался вблизи жизненно важных объектов в клетке (например, в ядре). Однако распределение наиболее распространенных ФС в клетке происходит, как правило, случайным образом. Поэтому, если даже такой распространённый препарат для ФДТ, как фотофрин, накапливается в опухолевых клетках в 13

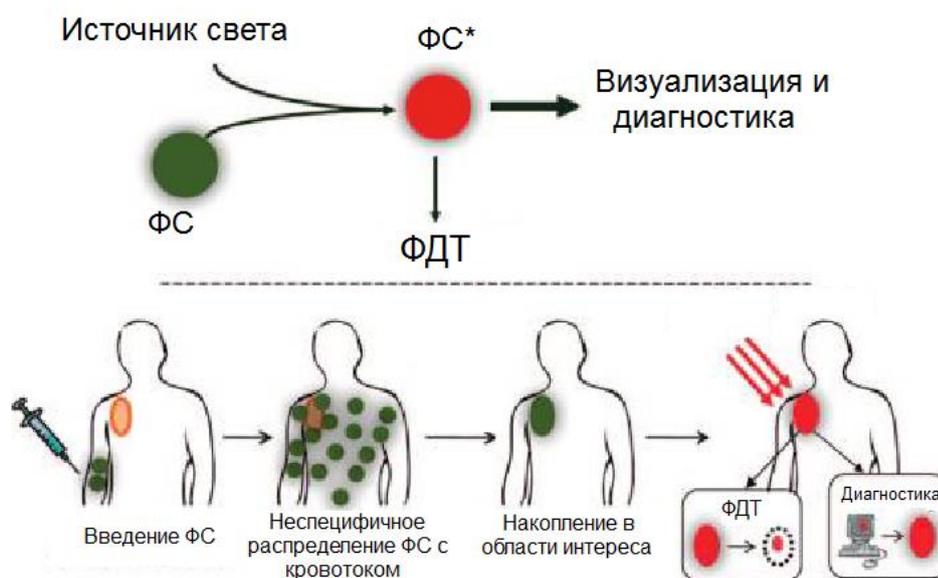
раз интенсивнее, чем в нормальных, это не дает ожидаемой эффективности лечения [40].

О причинах повышенного накопления ФС в опухолях до сих пор нет единого мнения. В литературе чаще всего ссылаются на повышенный кровоток в опухолях, большое количество межклеточного вещества, низкий рН (липофильность многих порфиринов повышается в кислой среде), высокую проницаемость мембран и сосудов, наличие большого количества макрофагов [30, 31, 33, 37].

Так называемое терапевтическое окно для экзогенных красителей в биотканях (ориентировочно 650 – 850 нм) определяется оптическими свойствами внутриканевых хромофоров: для большей эффективности фотодинамического эффекта длины волн возбуждения экзогенных красителей не должна совпадать с полосой поглощения эндогенных [32]. Самое большое значение, влияющее на распространение света в ткани, является его рассеяние. Глубина проникновения возбуждающего света 630 нм в ткань оценивается примерно в 3–5 мм. Наиболее важные хромофоры в ткани – вода, оксигемоглобин, дезоксигемоглобин, меланин и цитохромы. Суммарный их спектр определяет терапевтическое окно ФДТ в ткани. В опухолях соотношение вышеназванных компонентов может быть изменено, что необходимо учитывать при визуализации и терапии [32]. Полезный диапазон длин волн, используемый в ФДТ, при котором удаётся избежать значительного поглощения эндогенными флуорофорами, составляет 600–800 нм. Использовать более длинноволновый свет нецелесообразно по причине малой энергии квантов, недостаточной для возбуждения молекул ФС [30].

При поглощении в области 620–690 нм ФС переходит в возбужденное  $S_1$ -состояние с энергией 170–190 кДж/моль. После интеркомбинационной конверсии ФС может передать энергию молекулярному кислороду, в результате чего он переходит в синглетное возбужденное состояние с энергией около 95 кДж/моль, что соответствует 1270 нм [38, 39].

Важно отметить, что ФС могут также служить в качестве люминесцирующего агента, несущего информацию о происходящих процессах. Так как ФС преимущественно накапливаются в опухоли, это привело к созданию и развитию фотодинамической диагностики (ФДД). На рисунке 1.4 изображено схематическое представление ФДТ, где ФС является как генератором активных радикалов, так и люминесцирующим агентом, несущим диагностическую информацию.



Молекулы фотосенсибилизатора являются фотоактивируемыми мультифункциональными агентами, которые могут служить одновременно и визуализации, и терапии. Так, при фотодинамической процедуре пациенту с новообразованием вводят ФС обычно через кровь, и в течение некоторого времени ФС циркулирует в кровотоке (этот промежуток называют “drug–light интервалом”). В идеальном случае ФС полностью уходит из крови и концентрируется в области опухоли, эту область облучают светом с соответствующей длиной волны. Молекулы ФС аккумулируют энергию света, при этом они могут выступать как в качестве цитотоксических агентов, так и флуоресцентных маркеров опухоли. Изображение выполнено по [30]

Рисунок 1.4 – Вверху – схематическое представление использования молекул ФС для ФДТ и ФДД. Внизу – схема фотодинамической процедуры

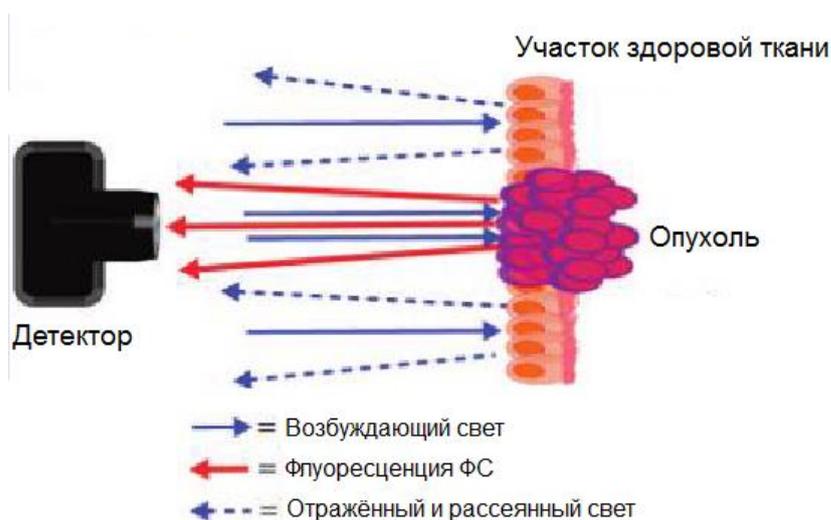
Накопление ФС на рисунке 1.4 показано в идеальном случае, когда весь введенный препарат концентрируется в интересующей области. Зондирующий

свет дает возможность как получать диагностическую информацию, так и оказывать цитотоксическое действие. Используемые в настоящее время ФС в ФДТ хоть и флуоресцируют в видимой области, но дают низкий квантовый выход. Например, в работе [41] исследовалась флуоресценция фотогема при различных концентрациях кислорода (от 9,4 до 625,0 мкМ) в водном растворе. Скорость распада красителя росла с увеличением концентрации кислорода, однако при низких концентрациях кислорода (меньше 25 мкМ) с уменьшением концентрации кислорода интенсивность немного подросла. Это может быть связано с агрегацией молекул ФС при отсутствии кислорода (это сопровождается красным смещением спектра). Коротковолновое излучение быстро поглощается в биоткани, и такая люминесценция имеет ограниченное применение [42]. ФДД вполне эффективна в отношении большого количества неглубоко расположенных опухолей, которые анатомически доступны для наблюдения (кожа, пищеварительная трубка, мочевого пузыря, половые пути, легкие). Хирургическое удаление опухоли часто сопровождается иссечением прилегающих тканей. Это является одним из основных условий для снижения вероятности рецидива или метастазирования. Возможности ФДД позволяют селективно определить ткани, предназначенные для удаления, и устранить необходимость производить тотальную резекцию окружающих тканей. В результате это приводит к улучшению качества жизни пациентов.

ФДД имеет определенные ограничения. Флуоресценция, как правило, регистрируется через линзу, а площадь покрытия линзы может захватывать разные типы тканей. Глубина проникновения видимого света в биологических тканях, достаточная для эффективной визуализации (несколько сотен микрометров), невелика. Поэтому диагностике доступны только «плоские» опухоли, в то время как глубоко расположенные поражения не распознаются. Даже высокое накопление сенсibilизатора в области опухоли не гарантирует качественную визуализацию, т.к. внутритканевая локализация сенсibilизатора и его окружение (например,

наличие тушителей) оказывают влияние на его флуоресцирующую способность и затрудняют распознавание [30].

Важным преимуществом ФДД является так называемый красный сдвиг свечения, позволяющий эффективно разрешать флуоресцентный сигнал и отраженный либо рассеянный свет. Флуоресцентное свечение отличается от отражённого или рассеянного тканью света длиной волны (рисунок 1.5). ФС накапливается преимущественно в опухолевой ткани (фиолетовые клетки), которые при возбуждении монохроматическим источником (синие стрелки) излучают флуоресценцию, длина волны которой отлична от источника (красные стрелки).



На фоне отраженного и рассеянного света, имеющего ту же длину волны, что и возбуждающий свет, флуоресценция ФС, который накапливается преимущественно в опухоли, имеет другую длину волны. Изображение выполнено по [30]

Рисунок 1.5 – Выделение флуоресценции маркера в опухоли

#### 1.4 Генерация синглетного кислорода в биологических тканях

В основном состоянии молекулярный кислород имеет два неспаренных электрона с параллельными спинами на двух вырожденных орбиталях; такая конфигурация даёт суммарный спин 3 (триплетное состояние). Когда молекулярный

кислород приобретает избыточную энергию, два неспаренных электрона на наружной орбите могут образовать пару. Существует две формы СК. Форма  $^1\Sigma_g^+(O_2)$  обладает очень коротким временем жизни и не может играть заметную роль в живых системах. Поэтому в фотосенсибилизированных реакциях участвует  $^1\Delta_g(O_2)$ -форма. СК не является свободным радикалом (все электроны спарены). Он электронофильный, т.е. легко взаимодействует с обогащёнными электронами молекулами. Имея спаренные электроны на одной орбитали и вакантную вторую орбиталь, СК обладает высокой реакционной способностью [43, 44, 126].

Прямое оптическое возбуждение кислорода крайне неэффективно из-за квантово-механического правила отбора по спину. Этот подход требует высоких температур и совершенно неприменим для биологических систем. Поэтому в медицинских приложениях наиболее распространённым способом генерации СК является перенос энергии с триплет-возбуждённых органических молекул на кислород согласно реакции (3) [44] (рисунок 1.6).

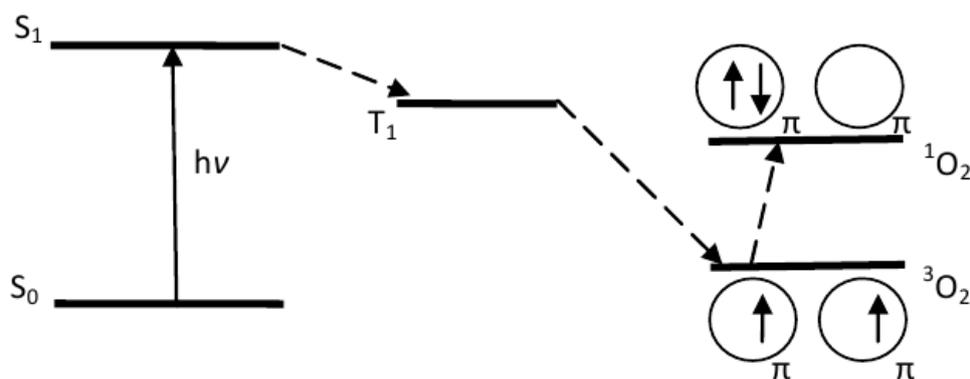


Рисунок 1.6 – Схема переноса энергии с возбуждённого триплетного состояния на кислород по [44]

СК обладает собственной фосфоресценцией [44]. Энергия синглетного возбуждённого состояния оценивается приблизительно 95 кДж/моль, это соответствует полосе люминесценции 1270 нм, т.е. фосфоресценция СК лежит в инфра-

красной области, что создаёт определённые технические сложности при её регистрации [32].

Существует множество факторов, влияющих на эффективность генерации СК, этой проблеме посвящены работы [45–47]. Так, на образование СК негативно влияет перенос заряда, конкурирующий с передачей энергии на кислород и имеющий место в полярных водных растворах. Также хорошо известно, что агрегация (образование комплексов) ФС уменьшает эффективность генерации СК. Образование димеров и агрегатов высших порядков хорошо заметно по уширению полос поглощения красителей [22].

В работе [34] изучались эффекты действия рН раствора и наличия поливинилпирролидона на динамику и эффективность образования СК в буферном растворе хлорина еб. Для хлорина еб, особенно в кислых средах, характерно образование в растворе устойчивых комплексов молекул. Показано, что квантовый выход образования СК уменьшается с уменьшением рН раствора из-за агрегации молекул. В клетках при встраивании молекул ФС в липосомы и белковые комплексы заметной агрегации сенсibilизатора не наблюдалось. Кроме того, необходимо учитывать, что молекулы ФС сами могут тушить возбуждённые синглетные состояния кислорода. Это было проверено увеличением концентрации ФС, и никаких эффектов изменения констант не было обнаружено. Поливинилпирролидон способствует дезагрегации молекул хлорина еб, что заметно увеличивает их фотоактивность. При отсутствии поливинилпирролидона в растворе с рН 6.3–8.5 время жизни СК составило приблизительно  $3,6 \pm 0,2$  мкс, а время жизни возбуждённого триплетного состояния хлорина еб ( $2,0 \pm 0,2$ ) мкс. В присутствии полимера время жизни триплетных состояний ФС увеличилось в 2,5 раза, при этом квантовый выход СК не зависит от рН.

В работе [48] изучались временные и спектральные характеристики фосфоресценции СК, сенсibilизированного с помощью мезо-тетрафенилпорфина в ацетоне. Были определены характерные времена жизни СК и в широком диапа-

зоне концентраций сенсibilизатора. Установлено, что продолжительность флуоресценции СК уменьшается с увеличением концентрации ФС. С одной стороны, это может свидетельствовать о тушении СК молекулами сенсibilизатора, с другой – может быть обусловлено низкой способностью агрегатов ФС передавать энергию возбуждения на кислород. Характерные времена образования СК –  $0.28 \pm 0.01$  мкс – немного короче времени жизни триплетного состояния ФС ( $0,32 \pm 0,01$  мкс). Тушение флуоресценции СК сопровождалось небольшим гипсохромным сдвигом максимума свечения.

Кулоновское взаимодействие между молекулами ФС, влияющее на их агрегацию, может как увеличить, так и уменьшить генерацию СК. Заряженные молекулы ФС проявляют лучшую растворимость в водной среде. Как правило, кулоновское взаимодействие молекул ФС уменьшается с диэлектрической постоянной растворителя, то есть становится более слабым в водном растворе, чем в неполярных органических растворителях. ФС, содержащие неионные водорастворимые заместители (гидроксо-, полиоксиэтилен-, карбогидрат-группы), как правило, хорошо агрегируются в воде за счет водородных связей, что также может ингибировать образование СК [34, 48].

Изменения pH среды также оказывают влияние на реакции с СК. Обычно протонирование тормозит генерацию СК за счет действия на интеркомбинационный переход красителя в триплетное состояние. Выраженную тенденцию к ассоциации в присутствии электролитов в растворе имеют ионные сенсibilизаторы, что приводит к снижению выхода СК [45].

Наконец, важную роль в генерации СК играет фотостабильность самого красителя, особенно если его применение сопряжено с большим количеством циклов фотореакций (например, при непрерывном или длительном стробозвуждении). При больших дозах облучения молекулы красителя могут изменить свою структуру, в результате чего ослабляется их способность к поглощению фотонов. Фотообесцвечивание красителя сопровождается изменением его

спектров поглощения и эмиссии, а зачастую и потерей его способности к свечению (люминесценции) и образованию СК. Также разрушение красителя может произойти в результате реакции с СК, например, кислород может окислять насыщенные двойные связи в составе ФС [22].

### **1.5 Физическое и химическое тушение синглетного кислорода**

Под тушением синглетного кислорода в литературе подразумевают либо снятие энергии возбуждения (с дальнейшим переходом кислорода в основное состояние), либо его химическое связывание с различными молекулами-мишенями в среде. Таким образом, тушение может быть либо физическим, либо химическим [126].

Физическое тушение подразумевает снятие энергии возбуждения, не сопровождаемое химическими превращениями. В таком случае кислород остаётся в системе в свободном состоянии, и его количество не изменяется. Хорошими физическими тушителями являются анионы азиды (например, азид натрия), 1,4-диазабциклооктан (DABCO), гистидин и различные каротиноиды, такие как бета-каротин, а также пространственно-затрудненные амины. В биологических системах общеизвестна роль каротиноидов в защите от фотоповреждения глаз, кожи, фотосинтетического аппарата и т.п. Главной проблемой при исследованиях является неспецифичность этих тушителей, т.к. они реагируют с широким спектром различных соединений помимо СК [46].

При химическом связывании СК с субстратом говорят о химическом тушении СК. В биологических тканях СК реагирует с различными внутриклеточными компонентами, поэтому важно учитывать их восприимчивость к окислительному стрессу [47, 49]. В мембранах (липидной фазе) время жизни СК несколько выше, чем в водной фазе. В воде время жизни СК примерно 3 мкс, в тяжёлой воде – около 70 мкс (в результате изотопного эффекта [43]), в органических растворителях

до 250 мкс [33]. В липидной фазе мембран время жизни СК составляет около 30 нс [46]. Окислительное действие СК на 2 порядка выше, чем обычного кислорода [43–45]. Основными мишенями для окисления в тканях будут липиды (главным образом ненасыщенные жирные кислоты), нуклеозиды (гуанозин и тиюридин), аминокислоты, особенно серосодержащие – триптофан, гистидин, цистеин, метионин, аланин и др. и ряд других соединений [39, 47].

Известно, что СК в клетке активно взаимодействует с белками [33, 46, 47]. Это подтверждается как чисто химическими исследованиями [46], так и спектральными [6]. Согласно исследованию [50], выполненному в клетках L-1210 лейкемии мышей, образцы были подвергнуты тушению СК, после чего были измерены концентрации основных компонентов клетки и отдельно константы скорости тушения СК этими компонентами. Суспензия клеток предварительно обрабатывалась детергентом (лаурилсульфатом натрия), затем инкубировалась с одним из сенсibilизаторов, в числе которых были эозин Y, бенгальский розовый и TPPS. Приблизительно 40 % изменённых молекул составили белки с большой молекулярной массой, т.е. белки являются одним из основных мишеней СК в клетках. В другой работе [6] описаны спектральные свойства флуоресцентных белков. Показано, что спектры изменённых в ходе тушения СК белков при тушении испытывают сдвиг относительно спектров нативных белков.

Авторы [51] изучали взаимодействие СК с иммуноглобулином G при возбуждении ультрафиолетом метиленового голубого. Модифицированный белок был исследован с помощью методов спектроскопии, электрофореза, а также было определено содержание карбонильных групп. Окисленный белок демонстрировал гиперхромный эффект (увеличение поглощения или оптической плотности) при 280 нм, что по мнению авторов свидетельствует о повреждении структуры белка. В изменённом белке определялось повышенное содержание карбониллов (один из распространенных маркеров окисления белков). Также температура денатурации у окисленного белка снизилась в среднем на 3 градуса (что, возможно, связано с

конформационными изменениями). Также такой белок хуже перемещался на полиакриламидном геле. СК, вызывая структурные изменения, оказывал влияние на оптическую плотность раствора: его поглощение увеличилось на 60%.

В работе [52] показано, как константа скорости тушения СК белками зависит от денатурации, полимеризации, макромолекулярной агрегации белка, а также от связывания с лигандом при наблюдении фосфоресценции СК. В экспериментах использовался бычий сывороточный R-лактальбумин, растворённый в тяжёлой воде D<sub>2</sub>O. В качестве сенсбилизатора использовалась феноленсульфоновая кислота, которая, по утверждению авторов, с белком не связывается (спектры люминесценции не зависят от концентрации белка). Обнаружено, что как в чистом растворе ФС в D<sub>2</sub>O, так и при добавлении белка, время жизни СК падает с ростом температуры от 20 до 80°C соответственно на 30 и 60 %. Скорость тушения СК белком возрастает линейно до 60 градусов, затем эта скорость возрастает быстрее. Таким образом, денатурированная (развёрнутая) форма белка гораздо эффективнее взаимодействует с СК (примерно в 5–10 раз). Уместно добавить, что денатурированные белки могут встречаться и в живых клетках [53].

Краудинг (агрегация) также может способствовать нарушению структуры белка. Наличие лигандов способствует формированию «закрытого» белка и препятствует его реакциям с СК. Таким образом, скорость тушения развернутого белка определяется доступностью для СК «критических» аминокислот (триптофан, гистидин и др.) [54]. Тушение СК происходит при его взаимодействии с определенными аминокислотами в полипептидной цепи и обусловлено большей доступностью аминокислот в денатурированном виде. При диффузионно-контролируемых реакциях константа скорости тушения СК белком уменьшается (время жизни СК увеличивается) с увеличением вязкости среды [52].

В исследовании [55] определены константы взаимодействия СК с аминокислотами, в том числе и зависимость от кислотности среды. Генерация СК осуществлялась с помощью бенгальского розового и эозина. Большое влияние на

окисление оказывает наличие различных заместителей в аминокислотах. Отдельно учитывались выходы реакций, приводящих к физическому (кислород выходит свободным, белок не окисляется) и химическому (кислород связывается, белок окисляется) тушению. Обе константы увеличиваются с полярностью растворителя. Тушение происходит по механизму с участием промежуточного комплекса, который сопровождается частичным переносом заряда. В кислом растворе преобладает физический механизм тушения. Химический (реактивное, или окислительное тушение) механизм наблюдается в присутствии производных фенола. Квантовый выход реакций окисления уменьшается пропорционально количеству окисленных аминокрупп.

### 1.6 Время жизни синглетного кислорода в живых системах

Одними из основных и важных количественных показателей СК в ткани являются его время жизни  $\tau_{\Delta}$  и средний пробег  $\delta_{\Delta}$ . Время жизни СК в чистой воде составляет 3-5 мкс. В цитоплазме клеток оно сокращается более чем на порядок, до 0,1 мкс. Коэффициент диффузии СК в клетках  $D$  оценивается величиной  $1,4 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2 \text{ с}^{-1}$  [56, 57], а пробег  $\delta_{\Delta}$  может быть рассчитан с помощью простого соотношения

$$\delta_{\Delta} = \sqrt{6D\tau_{\Delta}} \quad (1.6)$$

и составляет около 50 нм, чего недостаточно, чтобы находящийся в цитоплазме ФС вызывал повреждения ДНК, находящегося в ядре клеток. Авторами [46, 50] время жизни СК в липидной фазе мембран оценено десятками наносекунд. В работе [38] время жизни синглетного кислорода в живых клетках оценивается 100–200 нс, сходное значение – около 250 нс – представлено в работе [58].

В опухолях предельное расстояние миграции СК, определенное в [59] как расстояние между гипоксической тканью (областью с максимально низкой концентрацией кислорода) и ближайшим источником кислорода, оказалось около

100 мкм. В этой же работе упоминается, что измеренные коэффициенты диффузии кислорода в опухолях, соответствуют значениям коэффициентов диффузии в нормальной ткани с аналогичным содержанием воды. То есть условия для диффузии кислорода и там и там одинаковые, и гипоксия связана с кровотоком и недостаточным конвективным переносом массы кислорода [150]. Величина константы диффузии кислорода в ткани оценена как  $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2 \text{ с}^{-1}$ .

Столкновительное тушение оказывает ключевое влияние на пробег тушителя в растворе, где находится флуорофор. Для молекулы кислорода в воде при  $25^\circ\text{C}$  коэффициент диффузии равен  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2 \text{ с}^{-1}$  [6]. Средний пробег можно определить согласно выражению (1.6). Следовательно, тушение может охарактеризовать диффузию тушителя на умеренно больших расстояниях, сопоставимых с размерами белков и мембран. Между тем собственная релаксация флуорофора обусловлена в первую очередь параметрами его ближнего окружения.

В настоящее время достоверно установлено, что коэффициенты диффузии малых молекул внутри клетки могут быть значительно меньше, чем в водных или углеводородных растворах [60]. Отсюда значение коэффициента диффузии СК во внутриклеточной среде оценены примерно на порядок меньше, чем в воде при температуре  $25^\circ\text{C}$  [61]. В жидкой фазе цитоплазмы значение коэффициента диффузии  $D$  для макромолекул может быть в 5–50 раз меньше, чем в чистой воде. В клеточных везикулах локальная микровязкость может достигать  $140 \text{ мПа} \cdot \text{с}$ , в то время как в водной фазе цитоплазмы  $1\text{--}2 \text{ мПа} \cdot \text{с}$  (почти как в чистой воде) [62].

В статье [63] приведены результаты исследований флуоресценции порфириновых димеров, по которым были оценены изменения внутриклеточной вязкости в одиночных клетках линии HeLa. Авторы использовали флуоресцентные молекулы-ротаторы, излучательные характеристики которых могут меняться в зависимости от вязкости среды. Содержание кислорода в атмосфере вблизи образцов варьировалось от обычного воздуха (приблизительно 20 % по объёму) до 100 %. Один из используемых сенсбилизаторов, 5,10,15,20-tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)-

21Н,23Н-porphine (ТМРyP) концентрировался преимущественно в клеточных ядрах, хлорин – в цитоплазме. При фотоиндуцированной гибели клеток отмечалось резкое увеличение вязкости непосредственного окружения красителя. Этот эффект наблюдается в диффузионно-зависимой кинетике СК. За счет усиленного образования «более скрученного» конформера при увеличении вязкости растворителя наблюдалось изменение спектра поглощения ФС. При регистрации флуоресценции установлено, что вязкость областей, где накапливается ФС в клетках, имеет значение около 50 мПа·с.

В ходе исследования кинетики затухания СК в клетках при длительном облучении в D<sub>2</sub>O наблюдалось уменьшение скорости затухания сигнала от 16±2 до 28±3 мкс. Это трактуется авторами как следствие увеличения вязкости среды, в которой генерируется СК, в результате чего уменьшается скорость бимолекулярного тушения. При исследовании свойств другого ФС, ТМРyP, было установлено, что при облучении происходит трансформация кинетики затухания ФС. Время затухания меняется от 23 до 30 мкс, а время «разгорания» от менее 1 до 6 мкс. Эти изменения соответствуют увеличению вязкости, что влияет на образование СК и скорость его тушения внутриклеточными компонентами. По соотнесению с графиками затухания фосфоресценции СК авторами исключен вариант, что вблизи ФС при облучении происходит активное потребление кислорода. Увеличение интегральной интенсивности СК-фосфоресценции может быть связано с тем, что ФС накапливается в областях, богатых углеводородами, в которых кислород накапливается сильнее, чем в воде.

В работе [64] изучалась кинетика затухания синглетного кислорода от ФС фотофрина в воде (время жизни 3,5 мкс), чистом фосфатидилхолине (один из основных липидов мембран), фосфатидилхолине в воде (липидная суспензия) и водных суспензии живых клеток рака толстой кишки (линия HT29). В липидных суспензиях липофильный ФС накапливался в липидах, а в клетках – в мембранах, содержащих фосфатидилхолин. В суспензиях время жизни СК оказалось больше,

чем в воде и было сопоставимо со значениями в фосфатидилхолине. СК продуцировался в липидной фазе мембран и релаксировал самостоятельно, излучая фосфоресценцию. В липосомах фосфатидилхолина время жизни СК в  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{D}_2\text{O}$  оценивается соответственно в 5 и 71 мкс. Для плазмы человека это время экстраполировано с помощью моделирования до 1 мкс.

В работе [65] регистрировалась фосфоресценция СК в ядрах нервных клеток крыс Wistar. Показано, что молекулы СК могут быть в клетке достаточно долгоживущими, чтобы мигрировать через клеточную мембрану (при времени жизни порядка 3 мкс). Преобладающим механизмом дезактивации СК предложено взаимодействие с растворителем в клетке, а не с клеточным содержимым (например, белками). В инкубированных с  $\text{D}_2\text{O}$  клетках показывали время жизни СК порядка 30–40 мкс. При таком времени жизни длина пробега СК сравнивается с размерами крупных органелл клетки.

Авторы [66] установили, что константа скорости тушения СК в одиночных клетках нейронов, сенсibilизированного с помощью порфирина TMRyP в растворе  $\text{D}_2\text{O}$ , составила  $2,5 \cdot 10^4 \text{ c}^{-1}$ . Принимая значение времени жизни СК в обычной воде 3,5 мкс, можно установить время жизни СК в интактных нейронах как 3,2 мкс. Исходя из того, что коэффициент диффузии СК в воде  $2 \cdot 10^5 \text{ cm}^2 \text{ c}^{-1}$ , по формуле (1.6) пробег СК может составить порядка 270 нм. По мнению авторов, время жизни СК внутри изученных клеток определяется главным образом взаимодействием с растворителем (изотопным эффектом), нежели взаимодействием с содержимым клеток. В интактных клетках тушение СК было низкоэффективным. Авторы предположили, что белки в клетках имеют определенную конформацию, при которой серо- или азотсодержащие функциональные группы недоступны для СК. Денатурированные белки тушили СК с большей эффективностью, чем нативные. В частично лизированных с помощью детергентов клеток взаимодействие СК с белками усиливалось, соответственно квантовый выход фосфоресценции СК падал.

Таким образом, использование в качестве растворителя тяжёлой воды искажает результаты по изучению характеристик СК в живых клетках, т.к. характеристики свечения СК зависят не только от биогенных параметров, но и от изотопных эффектов.

### **1.7 Оптическая регистрация синглетного кислорода**

Оптические методы детектирования СК в живых системах разделяют на две группы – прямые и косвенные. Прямой способ обнаружения СК – регистрация его фосфоресценции на 1270 нм. Основная трудность, как было описано выше – крайне низкий квантовый выход люминесценции СК, поскольку такой переход запрещён квантовомеханически. Низкая интенсивность излучения ограничивает чувствительность метода [67–69]. Исследования фосфоресценции могут осуществляться с использованием либо кинетических, либо стационарных методов [46, 125, 148]. Многие авторы вынуждены прибегать к замене обычной воды  $H_2O$  на тяжёлую  $D_2O$ , т.к. в результате изотопного эффекта выход фосфоресценции СК в этом случае существенно увеличивается [43, 44].

В статье [70] описана высокочувствительная спектральная установка с временным разрешением для изучения фосфоресценции СК, полученного с помощью препарата для ФДТ - мезо-тетра(4-сульфонатофенил)-порфин ( $TPPS_4$ ) в фосфатно-буферном растворе (рН 7,5) при комнатной температуре. В присутствии кислорода наблюдалась яркая фосфоресценция ФС, которая сопровождалась более слабой и продолжительной фосфоресценцией СК. Время жизни свечения сенсбилизатора оценивается в  $1,7 \pm 0,2$  мкс, столько же идет нарастание свечения кислорода. При продувании образцов газообразным азотом (удалении кислорода) картина резко изменилась. Интенсивность фосфоресценции СК снизилась, а время жизни увеличилось вплоть до 100 мкс, что является показателем того, что кислород покинул клетки. Авторы [66] зарегистрировали свечение СК в одиночных клетках

нейронов, сенсibilизированное сенсibilизатором ТМРyР в растворе D<sub>2</sub>O с помощью однофотонной микроскопии. Верификация СК производилась тремя способами (при исчезании сигнала после откачки кислорода из системы, добавлении азида натрия, а также замены растворителя с D<sub>2</sub>O на H<sub>2</sub>O).

В работе [62] обнаружена фосфоресценция СК в отдельных клетках с субклеточным пространственным разрешением. Время жизни СК напрямую влияет на величину диффузионного пробега СК, следовательно, и на внутриклеточное расстояние активности. В работе применялись производные хлорина (гидрофобный) и ТМРyР (гидрофильный), которые, по мнению авторов, имеют различную внутриклеточную локализацию, следовательно, различия в физических условиях определенных областей клетки (например, пространственно-зависимый коэффициент взаимодействия СК и азида натрия). Несмотря, однако, на относительно долгое время жизни, СК в клетке не распространяется на большое расстояние от места его генерации, что трактовалось авторами как проявление высокой внутриклеточной вязкости.

Схожим образом в работе [71] измерялось содержание кислорода в митохондриях клеток нормальной и патологически изменённой печени крыс путём оценки кислородозависимой ЗФ протопорфирина IX. При наличии кислорода параллельно происходит тушение триплет-возбужденных состояний сенсibilизатора. Непотушенные молекулы путем обратной интерконверсии возвращаются в синглетное возбужденное состояние, что приводит к ТЗФ. Протопорфирин IX флуоресцирует в желто-красной области (~ 635 нм) при возбуждении на 510 нм. Определение концентрации производилось по уравнению динамического тушения Штерна-Фольмера:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 n_{ox} \quad (1.6)$$

где  $I_0/I$  - соотношение интенсивностей в отсутствие и при наличии кислорода,  $k_q$  - константа скорости реакции тушения,  $\tau_0$  - время затухания ЗФ в бескислородной

атмосфере,  $n_{ox}$  - концентрация кислорода. С помощью флуоресцентной микроскопии отдельных гепатоцитов показано, что источник сигнала локализован преимущественно в митохондриях. Применение 5-аминолевулиновой кислоты усиливает образование СК, так как разукрупняет комплексы сенсibilизатора. Метод также применялся *in vivo*, в результате давление кислорода в митохондриях было оценено как 30 – 40 мм рт. ст. Дальнейшие исследования показали, что интенсивность (частота) митохондриального дыхания (respiration rate) не зависит от уровня кислорода вплоть до 2 – 3 мм рт.ст. Это указывает на отсутствие метаболического контроля (в предположении, что нормальный физиологический уровень кислорода в клетке значительно выше этого порога) в митохондриях ниже 1 кПа (7,5 мм рт.ст.). В экспериментах *in vitro* уровень давления кислорода принимал значения вплоть до 150 мм рт.ст. В условиях умеренного кислородного голодания наблюдалось подавление потребления кислорода в гепатоцитах.

Авторы [72] оценивали давление кислорода для хорион-аллантаической мембраны куриного яйца с помощью фотоактивационных порфиринов (в том числе и протопорфирина IX). Отмечен эффект корреляции между сосудистыми повреждениями, вызванными ФДТ, и снижением концентрации кислорода.

Поскольку интенсивность флуоресценции СК крайне мала не только *in vivo*, но и для модельных объектов, и её регистрация требует наличия сложной и дорогой аппаратуры, использование прямых методов детектирования и оценки уровня оксигенации затруднено, особенно в клинических условиях. Простейшие измерения оксигенации основаны на оценке характеристик кровообращения, в частности спектроскопии, который предоставляет информацию о насыщении гемоглобина и объема крови артериол, венул и капилляров [73], однако точность этих методик оставляет желать лучшего. Поэтому активно развиваются более эффективные косвенные методы обнаружения СК в живых системах. Они основаны на следующих принципах [74–76]:

- обнаружение конкретных продуктов окисления СК с использованием различных химических ловушек [46, 50];
- оценка тушения люминесценции ФС кислородом [77–82, 132, 151], либо комбинация с наблюдением фосфоресценции СК [83, 84];
- регистрация свечения, инициируемого взаимодействием СК с возбуждённым ФС (АЗФ) [10–12, 85–88], основным отличием от предыдущей группы является увеличение выхода свечения при росте концентрации СК;
- использование специфичных флуорофоров, обладающих способностью к люминесценции только при взаимодействии с СК [89, 90].

Одним из распространенных ловушек СК является холестерин. Реакция с СК производит три продукта: 5 $\alpha$ -холестерол гидропероксид, 6 $\alpha$ -холестерол гидропероксид and 6 $\beta$ -холестерол гидропероксид. Они могут быть обнаружены, например, с помощью тонкослойной хроматографии. Хорошим соединением-ловушкой СК является антрацен и его производные [43]. В статье [89] описан способ детектирования СК с помощью измерения флуоресценции порфиринов. При наличии в растворе антрацена происходит его реакция с СК, в результате чего происходит фёрстеровский перенос энергии с антрацена на порфирин. Исследованные зонды проявили большую чувствительность к СК.

Из других физических методов можно отметить применение зондов, которые интеркалируются непосредственно в ткань (например, зонды Кларка), а также методы с применением магнитно-резонансной томографии и электронно-парамагнитного резонанса [73]. Первые не позволяют производить измерения на большой глубине, а последние хоть и эффективны, но пока чрезвычайно дороги. В 1989 году Рид с соавторами [91] использовали полярографические микроэлектроды диаметром 50–70 мкм для измерения кислородного давления (oxygen pressure) до и после сеанса ФДТ с препаратом Фотофрин в подкожно перевиваемых опухолях хондросаркомы у крыс при дозировке 75 мВт/см<sup>2</sup>. До сеанса данные, измеренные на глубине 50–650 мкм, показывали уменьшение давления с глуби-

ной и составили порядка 3–5 мм рт.ст. Через час после ФДТ значения давления во внешних слоях приблизились к значениям в глубоких слоях до облучения, т.е. количество кислорода во внешних слоях опухоли сократилось. Дальнейшие исследования подтвердили, что генерация СК в ходе ФДТ может привести к истощению фотохимического кислорода окружающей опухоль, что приводит к локальной гипоксии и снижает эффективность лечения [73, 92–94]. В дальнейших экспериментах давление кислорода было уточнено до 2,9–5,2 мм рт. ст. до ФДТ и 0,7–1,1 мм рт. ст. после спустя минуту, однако содержание кислорода хоть и медленно, но восстанавливалось при прекращении возбуждения ФС.

Работа [76] посвящена основам визуализации кислорода в биологических средах на основе анализа тушения фосфоресценции Pt-порфириновых зондов с использованием широкопольной, конфокальной и многофотонной микроскопии. Авторы [90] изучали возможность количественного измерения генерации СК с использованием СК-специфичного датчика кислорода (флуоресцентный зонд зеленый флуоресцентный белок SOSG). СК генерировался с помощью бенгальского розового. SOSG реагирует с СК, в результате образуется эндопероксид, дающий зеленую флуоресценцию с максимумом на 531 нм, регистрировать которую технически легче, чем фосфоресценцию СК.

Подытоживая представленный литературный обзор, можно сделать следующие выводы. Количество литературных источников свидетельствует об актуальности и востребованности исследований фотодинамических реакций с участием зондов в биологических тканях при лазерном облучении. Большая часть исследований связана с прикладным направлением – фотодинамической терапией. Основные тезисы доступных литературных источников, включая работы по исследованию особенностей микроокружения зондов и характеристик самой ткани (вязкости, насыщенности кислородом и др.), так или иначе, сводятся к фотодинамической терапии, либо к медицинской визуализации. Однако следует констатировать, что работ, объектом исследования которых являются нативные ткани (в

меньшей степени одиночные клетки позвоночных), относительно немного на фоне исследований, посвященных модельным объектам биологических структур. Изучение биологических объектов дополнительно усложняется еще и тем, что эти многокомпонентные системы с большим количеством случайных факторов не всегда дают хорошую экспериментальную воспроизводимость результатов. В нативных тканях непросто искусственно регулировать в больших пределах различные параметры (температура, вязкость, кислотность), не нарушая при этом жизнедеятельности объекта. В этом смысле живые клетки и ткани являются достаточно хрупкими объектами с не самыми «удобными для изучения» свойствами. Относительно низкая изученность свойств реальных тканей выражается в том, что оценка многих параметров различается на порядки. Например, диапазон времени жизни синглетного кислорода в тканях варьируется в широких пределах у разных авторов (от десятков наносекунд до микросекунд). Данный разброс значений может объясняться не только различными типами тканей, для которых это значение оценивалось, но и применением различных методик и даже базовых соображений. Поэтому исследования, проводимые на нативных биологических объектах особенно актуальны, так как даже самые сложные модели не могут в полной мере заменить реальные клетки и ткани.

Следует отметить, что замедленная флуоресценция зондов, обусловленная СТА в биологических объектах, крайне слабо представлена в источниках. Даже в неживых объектах основное внимание авторы уделяют таким видам длительного послесвечения как фосфоресценция или термоактивированная замедленная флуоресценция. Это может объясняться тем, что интенсивной АЗФ обладают лишь немногие известные соединения. С другой стороны, информативность СТА по отношению к подвижному кислороду предполагает использование этого процесса для решения задач, связанных с диффузионными явлениями в клетках и тканях. Поэтому основное внимание в настоящем диссертационном исследовании сосредоточено на изучении особенностей АЗФ в нативных биологических тканях.

## 2 Методы и материалы изучения замедленной люминесценции зондов в биологических образцах

### 2.1 Экспериментальная установка

Эксперименты проводились с использованием оригинальной автоматизированной установки стационарной и динамической флуориметрии. Установка позволяет регистрировать стационарные (с использованием непрерывных источников света) спектры поглощения, эмиссии, возбуждения смещенной эмиссии, а также их "динамические" аналоги с использованием импульсных источников света и регистрации временных зависимостей реакции образца на импульсное возбуждение. У окрашенных и оптически непрозрачных образцов тканей в настоящей работе измерялись только спектры люминесценции при непрерывном возбуждении, а также спектры и кинетические кривые длительного послесвечения при возбуждении импульсным лазером. На рисунке 2.1 изображена оптическая схема установки.

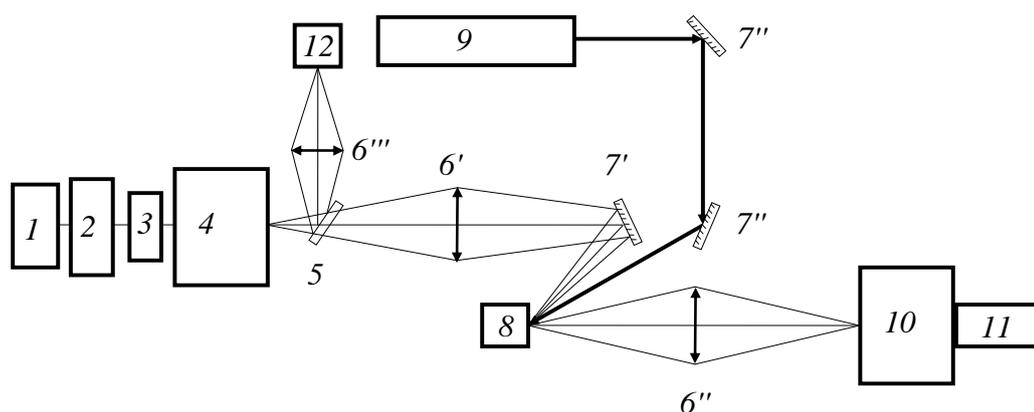


Рисунок 2.1 - Оптическая схема установки. 1 - лампа высокого давления, 2 - зеркальный конденсор, 3 - электромеханический затвор, 4 - монохроматор возбуждения, 5 - кварцевая пластина, 6 - собирающие линзы, 7 - поворотные зеркала, 8 - образец, 9 - импульсный лазер, 10 - монохроматор наблюдения, 11 - фотоприёмник наблюдения, 12 - фотоприёмник возбуждения

Стационарные спектры люминесценции возбуждаются светом ксеноновой лампы высокого давления *1* мощностью 150 Вт. Собранный зеркальным конденсором *2* свет лампы диспергируется решеточным монохроматором МДР-206 (поз. 4) и с помощью собирающей линзы *б'* и поворотного зеркала *7'* фронтально направляется на образец *8*.

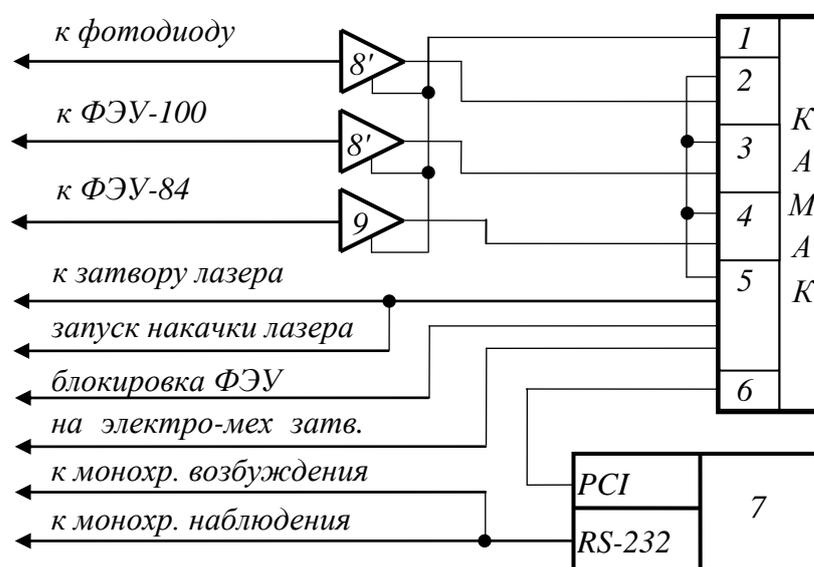
Образец *8* помещается в специальную герметизированную камеру. Одновременно в камеру возможно размещение до шести образцов в целях создания идентичных условий эксперимента для измеряемых фрагментов тканей. Содержание кислорода в камере регулировалось с помощью присоединённого баллона со сжатым молекулярным азотом. При открытии впускного клапана воздух в камере над образцами постепенно насыщается азотом, что приводит к выходу растворённого кислорода из образцов, в результате чего возможно реализовать снижение уровня кислорода в образцах.

Люминесценция образца собирается линзой *б''* на щели монохроматора МДР-41 *10* и затем попадает в фотоприемник *11* (ФЭУ-84 или ФЭУ-100). Для контроля возбуждения на пути возбуждающего пути установлена кварцевая пластина *5*, отражение от которой через линзу *б'''* попадает в фотоприемник возбуждения *12* (кремниевый фотодиод). Контроль смещения нуля и постороннего света в каналах возбуждения и наблюдения осуществляется при помощи электромеханического затвора *3*, прикрывающего щель монохроматора возбуждения. Отрезающие фильтры паразитных порядков дифракции в данной конфигурации установки не используются в виду удачного соотношения длин волн спектров поглощения и люминесценции использовавшихся красителей.

Для возбуждения длительной люминесценции используется вторая гармоника (532 нм) импульсного твердотельного лазера на АИГ-Nd<sup>3+</sup> LQ-129 (поз. 9 на рис. 2.1), луч которого поворотными зеркалами *7''* фронтально направляется на образец *8*. Энергия возбуждающего импульса может варьироваться в диапазоне 0.2 – 30 мДж при длительности 15 нс. При этом в качестве фотоприемника *11*

используется фотоумножитель ФЭУ-84-3, имеющий специальный электрод для управления чувствительностью. Наличие такого управления совершенно необходимо в экспериментах по наблюдению послесвечения, т.к. мощная вспышка быстрой флуоресценции образца во время действия лазерного импульса "ослепляет" фотоумножитель на длительное время из-за образования пространственного заряда в его диодной системе.

Схема электронной обвязки установки показана на рисунке 2.2.



1 - модуль управления усилителями, 2 - счётчик канала возбуждения, 3 - счётчик канала возбуждения, 4 - АЦП с памятью, 5 - модуль синхронизации, 6 - крейт-контроллер, 7 - ПК, 8, 9 - управляемые усилители

Рисунок 2.2 - Схема электронной обвязки установки

Сбор, накопление и обработка данных, а также управление составными частями установки осуществляется с помощью персонального компьютера 7. Связь аналоговых измерительных устройств и цифровых систем обработки данных осуществлялась с помощью управляющей схемы. Схема построена на основе магистрально-модульной системы стандарта КАМАК, крейт-контроллер 6 типа К109 которой связан с ПК 7 посредством параллельного 16-битного канала

связи и оригинальной платы расширения шины в стандарте PCI. Монохроматоры МДР-206 и МДР-41 подсоединены к компьютеру через последовательный порт RS-232 через контроллер UNISPEC. Оригинальное программное обеспечение установки написано на языке Delphi.

Измерение стационарных сигналов фотоприемников обеспечивается трансимпедансными программно-управляемыми усилителями-преобразователями 8' и 8'', которые преобразуют ток фотоприемников в частоту следования импульсов, подсчитываемых счетчиками 2 и 3 в корзине КАМАК. Измерение сигналов длительной люминесценции обеспечивается программно-управляемым усилителем 9, сигнал которого оцифровывается АЦП Ф4226 4 с памятью на 1024 точки с шириной канала 50 нс. Управление усилителями осуществляется через оригинальный КАМАК-модуль 1, вырабатывающий питание усилителей и последовательный код управления с географической адресацией шести подобных устройств.

Синхронизация эксперимента (т.е. выдача необходимой временной последовательности импульсов для управления запуском накачки лазера, электрооптического затвора лазера, запирающего импульса ФЭУ, запуска АЦП, импульсов "ворот" для счетчиков, управление электромеханическим затвором) производится через оригинальный модуль синхронизации 5.

## **2.2 Экспериментальная методика регистрации стационарных спектров**

Спектры поглощения, люминесценции и их разновидности регистрируются в одном из двух режимов – "Измерение по точкам" и "Непрерывное сканирование". Основное отличие этих режимов заключается в том, что в первом измерение сигналов фотоприемников производится при зафиксированных длинах волн монохроматоров (т.е. в "точках"), а во втором – при непрерывном сканировании длин волн в окрестностях точек спектра.

Алгоритм "Измерение по точкам" начинается с выдачи монохроматорам команд на установку очередных (в спектре) длин волн. После выполнения этих команд счетчики 2 и 3 в течение программно заданного промежутка времени  $\tau$  накапливают сигналы фотоприемников  $I_{Light}$  и  $I_{Dark}$  при открытой шторке 3 и закрытой шторке соответственно.

В режиме "Измерение по точкам" в качестве величины сигнала в данной точке спектра  $\lambda$  принимается величина, равная

$$S(\lambda) = \frac{1}{\tau} \frac{(I_{LightSig} - I_{DarkSig})K_{Exc}(\lambda)}{(I_{LightExc} - I_{DarkExc})K_{Sig}(\lambda)}, \quad (2.1)$$

где  $S(\lambda)$  – интенсивность спектра в данной точке спектра  $\lambda$ ;  $\tau$  – время накопления;  $K(\lambda)$  – спектральная чувствительность пары фотоприемник-монохроматор; индексы  $Sig$  и  $Exc$  относятся к парам фотоприемник-монохроматор наблюдения и возбуждения соответственно.

Полученное по формуле (2.1) значение интенсивности спектра учитывает время измерения, темновой ток фотоприемников, постороннюю засветку и исправлено на спектральную чувствительность фотоприемников.

Если спектральные линии интенсивны и достаточно широки, то время измерения спектра может быть сэкономлено с использованием режима "Непрерывное сканирование". Алгоритм "Непрерывное сканирование" измерения интенсивности спектра в заданной точке  $\lambda$  начинается с выдачи монохроматорам команд на непрерывное сканирование в заранее заданной окрестности точки  $\lambda$  с заданной скоростью. Одновременно начинается накопление счетчиками 2 и 3 сигналов фотоприемников  $I_{Light}$ , которое заканчивается в тот момент, когда оба монохроматора завершат выполнение команды сканирования.

В режиме "Непрерывное сканирование" шторка 3 не закрывается, и в качестве интенсивности спектра  $S(\lambda)$  принимается значение, получаемое по формуле (12), в которой  $I_{Dark}$  полагаются равными нулю, а в качестве  $\tau$  принимается время сканирования окрестности. Очевидно, что если окрестности

соседних точек спектра смыкаются, то измерение происходит при безостановочном сканировании длин волн, т.е. с максимально возможной скоростью.

Посторонние засветки и темновые токи фотоприемников также могут быть учтены в этом режиме. Для этого перед каждым "шагом" монохроматоры приостанавливаются на время  $\tau_{Dark}$  при закрытой шторке и производятся измерения  $I_{Dark}$ . Результатом измерения в данной точке спектра считается величина

$$S(\lambda) = \frac{\left(\frac{1}{\tau} I_{LightSig} - \frac{1}{\tau_{Dark}} I_{DarkSig}\right) K_{Exc}(\lambda)}{\left(\frac{1}{\tau} I_{LightExc} - \frac{1}{\tau_{Dark}} I_{DarkExc}\right) K_{Sig}(\lambda)}, \quad (2.2)$$

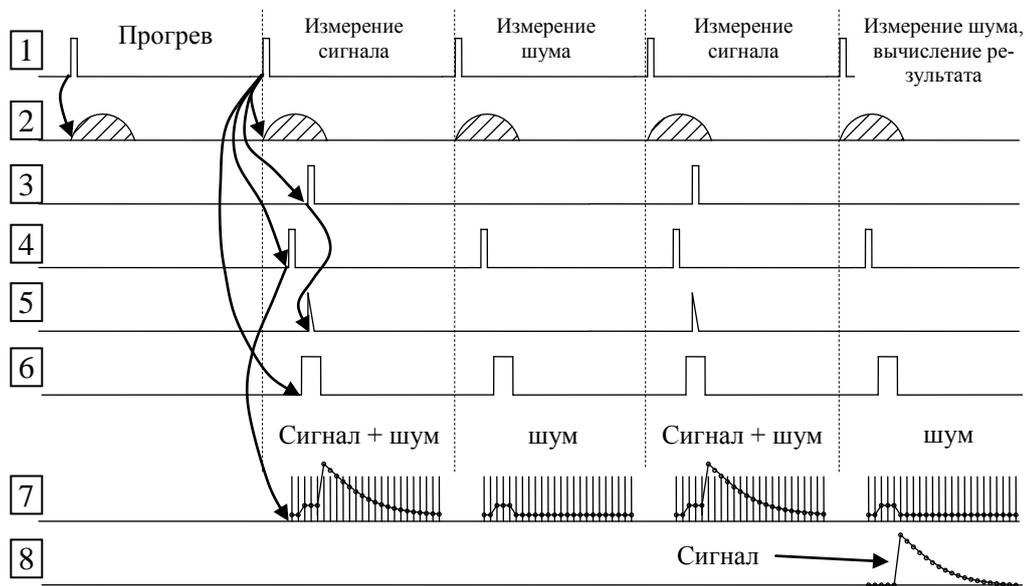
где обозначения совпадают с (12), а  $\tau_{Dark}$  – время накопления при закрытой шторке.

Формулы (2.1) и (2.2) выведены из условия линейной зависимости между интенсивностью люминесценции образца и интенсивностью возбуждения. В наших экспериментах это условие заведомо выполняется, т.к. доступные нам плотности мощности возбуждения образцов лампами накаливания или дуговыми лампами не способны существенно перераспределить населенности энергетических уровней.  $K_{Sig}(\lambda)$  и  $K_{Exc}(\lambda)$  в формулах (2.1) и (2.2) представляют собой коэффициенты, вычисленные в точке  $\lambda$  путем линейной интерполяции калибровочных таблиц чувствительностей пар фотоприемник-монохроматор. Калибровочные таблицы представляют собой нормированные спектры коэффициентов, приводящих экспериментально зарегистрированный спектр лампы накаливания с известной температурой нити к теоретически рассчитанному спектру абсолютно черного тела.

### 2.3 Экспериментальные методики регистрации кинетических кривых

Для регистрации кинетических кривых люминесценции и наведенного поглощения используется методика, учитывающая требования условий эксплуатации импульсного твердотельного лазера LQ-129 (SolarLS, Беларусь) а также особенности использования фотоэлектронных умножителей при высоких уровнях засветки.

Упрощенная схема алгоритма методики показана на рисунке 2.3.



1 - импульсы запуска лампы, 2 - вспышки лампы, 3 - импульсы запуска электрооптического затвора, 4 - импульсы старта кадра АЦП, 5 - лазерные импульсы, 6 - импульсы, «запирающие» ФЭУ, 7 - импульсы запуска АЦП и соответствующие отсчёты, 8 - результат измерения. Стрелками показана связь между источниками и приёмниками синхронизации

Рисунок 2.3 - Эпюры сигналов синхронизации для регистрации кинетических кривых.

На рисунке 2.3 в качестве прогревной выступает только одна вспышка лампы (диагр. 2 на рис. 2.3), которая запускается импульсами (диаг. 1 на рис. 2.3) модуля синхронизации (5 на рис. 2.2). С задержкой  $\sim 155$  мкс относительно

запуска лампы на электрооптический затвор лазера подается импульс (диаг. 3 на рис. 2.3), который вызывает лазерную генерацию (диагр. 5 на рис 2.3).

Особенностью лазера LQ-129 с электрооптическим затвором, который работает в режиме "гигантского" импульса, является влияние "тепловой линзы" в активном элементе на настройку резонатора и, соответственно, на энергию лазерного импульса.

Поэтому для получения одиночного импульса заданной энергии или выхода лазера на стабильный режим работы необходим предварительный прогрев рабочего тела несколькими (до 20-ти в зависимости от настройки резонатора) импульсами накачки. Для этого в установке используются два сигнала - сигнал на запуск ламповой накачки и сигнал на открывание электрооптического затвора. Это позволяет поддерживать постоянную температуру лазерного стержня и настройку резонатора при любом алгоритме возбуждения образца.

Следует также остановиться на особенностях регистрации длительной люминесценции.

В наших экспериментах интенсивность длительного послесвечения мала, и для ее регистрации необходим режим работы ФЭУ с высокой чувствительностью.

Но интенсивность длительного послесвечения образцов на несколько порядков отличается от интенсивности флуоресценции и рассеянного света во время действия лазерного импульса, и поэтому для обеспечения линейности система фоторегистрации должна иметь столь же широкий динамический диапазон. Это возможно только при ослаблении светового потока, падающего на фотоприемник, что приведет к недопустимо малому отношению сигнал/шум для послесвечения. Отказ от ослабления потока приводит к сильной перегрузке диодной системы ФЭУ и возникновению в ней долгоживущего пространственного заряда.

Поэтому при регистрации слабых сигналов, следующих после мощной засветки ФЭУ, применяется компромиссное решение, которое заключается в

отказе от регистрации "быстрой" (prompt) флуоресценции образца. Для этого на управляющий электрод ФЭУ подается отрицательный (относительно катода) импульс, действующий на время вспышки "быстрой" флуоресценции. Длительность и задержка запирающего импульса ФЭУ (диаг. 6 на рис. 2.3) относительно запуска лазера подбираются так, чтобы полностью перекрыть лазерный импульс и "быструю" флуоресценцию.

С учетом проницаемости управляющего электрода амплитуда импульса для ФЭУ-84-3 должна составлять  $\sim 100$  В. При этом ослабление чувствительности ФЭУ оказывается не менее  $10^3$ . В результате становится возможным работать на максимальной чувствительности ФЭУ без ослабления светового потока, т.к. динамический диапазон ФЭУ в этом режиме достаточен для регистрации длительной люминесценции.

Регистрация слабых сигналов с "запиранием" ФЭУ высоковольтным импульсом сопровождается помехой, которая проникает на анод через паразитные емкости. Кроме того, в выходном сигнале усилителя всегда присутствуют шум ФЭУ, дрейф и некоторое смещение относительно нуля. Для ослабления влияния этих факторов сигнал длительной люминесценции измеряется в два шага. На первом шаге ("Измерение сигнала" на рисунке 2.3) затвор лазера включается и в кадре АЦП "Сигнал + шум" (7 на рисунке 2.3) присутствует сумма {сигнал + смещение нуля + шум ФЭУ + помеха}. На втором шаге импульс запуска затвора лазера не подается, и в кадре АЦП "Шум" остаётся только {смещение нуля + шум ФЭУ + помеха}. Результат "Сигнал" (диаг. 8 на рис. 8) получается с помощью простого вычитания кадров.

Дробовые шумы и динамические ошибки преобразования ФЭУ могут быть ослаблены усреднением при многократном повторении описанных пар шагов. На рисунке 2.3 показаны две такие пары, и результат вычислен в конце второй.

## 2.4 Измерение спектров длительной люминесценции образцов

Экспериментальная установка позволяет измерять спектры длительной люминесценции. Алгоритм этих измерений является сочетанием модифицированных алгоритмов измерения стационарных спектров и измерения кинетических кривых длительной люминесценции. "Прогрев" лазерного стержня при измерении спектров производится только в первой точке спектра, лампа накачки запускается с неизменной частотой в течение всего времени регистрации.

Программное обеспечение позволяет "привязать" до трёх пар курсоров к произвольно выбранным моментам регистрируемой в эксперименте кинетической кривой. Пример такой привязки показан на рисунке 2.4.

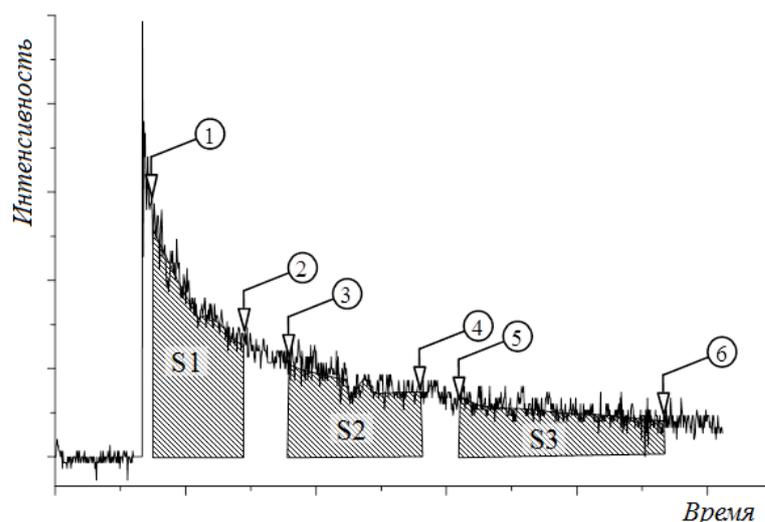


Рисунок 2.4 – К построению спектров длительной люминесценции

Программа автоматически вычисляет площади под кривой S1, S2 и S3 и может использовать их для построения зависимостей этих площадей от другого параметра эксперимента. Если в качестве такого параметра выбрана длина волны наблюдения, то в результате могут быть построены три спектра, отражающие спектральные особенности процессов, проявляющихся в длительной люминесценции образца на разных ее участках.

При построении спектров длительной люминесценции могут быть

использованы те же способы развертки спектра, что и при регистрации стационарных спектров. При построении "по точкам" монохроматор наблюдения поочередно устанавливается в точках спектра, выбранным с заданным шагом, а накопление и усреднение кинетической кривой производится по заранее заданному числу реализаций длительной люминесценции. При регистрации "непрерывных" спектров задается скорость сканирования длины волны монохроматора в окрестности выбранных точек спектра, а регистрация кинетической кривой (и ее усреднение) в точке осуществляется столько раз, сколько раз "выстрелит" возбуждающий лазер за время сканирования. Регистрация кинетической кривой в точке сопровождается компенсацией помех в соответствии с методикой, описанной в п. 2.3.

## **2.5 Некоторые особенности опухолевых тканей**

Рассматривая поведение экзогенных флуорофоров в биологических тканях, нельзя не уделить внимание особенностям их микроокружения. Так, общеизвестно, что при патологических процессах неблагоприятные изменения начинают проявляться на базовых уровнях организации организма – молекулярном и клеточном. Так как люминесцентные метки «работают» на данном поле, то уровень ранней диагностики является особенно ценным. Так как в настоящей работе наибольшее внимание уделено именно злокачественным опухолям, развивающимся в процессе канцерогенеза, рассмотрим типичные особенности именно опухолевых тканей.

В процессе канцерогенеза клетки тканей утрачивают свою дифференцировку, теряя присущие им отличительные признаки и функции. Это явление называют анаплазией. Признаки анаплазии проявляются в биохимических процессах опухолевых клеток (биохимическая анаплазия), в их физико-химическом состоя-

нии (физико-химическая анаплазия), в строении и функции (морфологическая и функциональная анаплазия).

Солидные опухоли состоят из различных тканей и клеток, как нормальных, так и злокачественных. Наличие злокачественных клеток может определяться по изменениям микроокружения среды (например, колебания уровня глюкозы, лактата, содержания кислорода, рН, свободных радикалов) [95–97]. Тканевый атипизм заключается в нарушении нормальных взаимоотношений паренхимы и стромы тканей. Например, в молочной железе секреторная ткань может быть разбросана в виде островков, вне связи с аналогичными элементами. Морфологически изменения проявляются в необычной величине, форме и строении опухолевых клеток. При их разрастании отмечается их возврат к более примитивной, эмбриональной структуре. У опухолевых клеток огромные ядра неправильной формы, нередко встречаются многоядерные клетки. Происходят глубочайшие изменения клеточных мембран. Для нормального функционирования клеток входящие в состав биомембраны липиды обязательно должны представлять собой жидкую плёнку. Только в этом случае обеспечено нормальное прохождение веществ через мембрану. Если липиды становятся более плотными, то в момент их «затвердевания» активность ферментов начинает быстро падать. Нормальная функция биомембран в значительной степени определяется их вязкостью. Например, показано [26, 62], что вязкость мембран клеток злокачественных опухолей меньше, чем в нормальных клетках. Так, при избыточном накоплении в клетках свободных жирных кислот может произойти выраженное повышение проницаемости лизосомных мембран, выход ферментов лизосом в цитоплазму с последующим аутолизом и гибелью клеток. Белковые молекулы мембран не занимают постоянного положения в липидном бислое, хотя часть из них в этом слое фиксирована. При изменении функционального состояния клетки белковые молекулы могут менять свое местоположение, соединяться вместе или, наоборот, более равномерно распределяться по поверхности клетки. Именно белковые образования входят в состав так

называемых рецепторов клетки, способных фиксировать на себе ряд необходимых для нее молекул. Есть предположение [53], что в результате повреждения мембранных рецепторов из клетки будут усиленно вымываться кейлоны – вещества, необходимые для торможения процесса клеточного деления, что упрощает процесс роста опухоли.

Поскольку в опухолях интенсивно идут пластические процессы, синтез белка в них преобладает над его распадом, в то время как в организме в целом отмечаются обратные соотношения: распад белка превалирует над его синтезом, и азотистый баланс организма в целом является отрицательным. Клетки помимо нативных молекул белка содержат также и развернутые (частично денатурированные) белки, которые могут быть случайно распределены в цитоплазме или локализованы в определённых органеллах (например, на эндоплазматической сети). Кроме того, клетки могут менять свое поведение в зависимости от отношения свернутых и развернутых белков в субклеточном пространстве [53].

Уже достаточно давно известно, что свойства митохондрий в раковых и нормальных клетках различны [95], т.к. в раковых клетках в качестве преобладающего механизма энергетического обмена является анаэробный гликолиз. При этом наблюдается эффект Крэбтри — подавление окисления при нагрузке глюкозой, что может быть результатом «борьбы» гликолитической системы ферментов опухоли с её аэробно-окислительными ферментами за неорганический фосфат, другие субстраты и коферменты. Опухоль интенсивно захватывает глюкозу из крови. Даже при повышении содержания глюкозы в крови до 16,7 ммоль/л оттекающая из опухоли кровь практически не содержит глюкозы.

Даже несмотря на то, что энергетическая эффективность бескислородного обмена веществ гораздо ниже, чем кислородного, энергия, получаемая опухолевыми клетками от гликолиза, достаточна для обеспечения синтеза нуклеиновых кислот и клеточного деления. Вырабатываемая энергия, как в эмбриональных клетках, идет не на функциональные нужды, а на пластические процессы. Не-

смотря на подавление механизма кислородного дыхания в раковых клетках, для обеспечения нормальной жизнедеятельности в условиях пониженного уровня кислорода опухоли не утрачивают полностью способность к аэробному катаболизму. Известно, что производство свободных радикалов усиливается в опухолях, которые могут быть непосредственно связаны с кислородным обменом веществ [98]. Подробно изменение дыхательного аппарата опухолевых клеток на биохимическом уровне подробно описано в обзоре [95].

Тенденция к снижению кислородного дыхания пропорциональна степени дедифференцировки клеток, в результате в опухоли начинается недостаток кислорода - гипоксия. Формированию гипоксии также способствует быстрый рост опухоли, когда клетки опухоли растут быстрее, чем сеть кровеносных сосудов, питающих их. В результате между опухолевыми клетками усиливается конкуренция за пищевой ресурс. С одной стороны это приводит к тому, что при недостатке питательных веществ опухолевые клетки либо быстро деградируют, полностью утрачивая свои специфические функции, либо отмирают. С другой стороны, опухолевые клетки активируют специальные сигнальные белки, приводящие к росту кровеносных сосудов [99].

Форма и диаметр кровеносных сосудов в опухоли сильно изменены. Структура стенок сосудов резко отличается от обычных: в ней мало гладких мышц, которые регулируют просвет сосуда с изменением общего артериального давления. Чрезмерное разрастание опухолевых клеток может привести к деформации, разрыву или закупорке отдельных сосудов. В результате подобных структурных аномалий перфузия опухолевой ткани в целом нерегулярна и хаотична. Кровоснабжение различных регионов опухоли происходит неодинаково и неравномерно, что часто приводит к острой гипоксии даже тех клеток, которые прилегают к капиллярам [100].

Интенсивный гликолиз приводит к глубоким изменениям в биохимическом составе опухолей, в частности, к повышенному синтезу молочной кислоты и

накоплению её в цитоплазме. Для поддержания нейтрального рН в цитозоле клетки активируют транспортные белки на наружной мембране (протонные, натрий-калиевые и другие насосы), что вызывает избыток катионов во внеклеточной среде. Как правило, рН опухоли составляет 6.2–6.5, в то время как рН нормальной ткани поддерживается нейтральным [101]. Нарушается и электролитный обмен: в частности, происходит обеднение опухолей кальцием и накопление в них калия. Снижается также количество магния. Накоплению в опухоли кислых метаболитов способствует также плохой кровоток [102]. В опухоли повышено содержание воды. Вязкость коллоидов в цитоплазме при этом снижается. Вследствие гидратации и увеличения содержания ионов водорода, а также некоторых электролитов, электропроводность опухолевой ткани в сравнении с нормой несколько повышена. Наружный отрицательный заряд раковых клеток увеличивается, причём его величина приближается к величине заряда лимфоцитов. Отсюда было высказано предположение, что из-за сходства зарядов лимфоциты в меньшей степени способны контролировать опухолевую ткань [53]. Повышение отрицательного заряда опухолевых клеток происходит вследствие увеличения количества электроотрицательных радикалов нейраминовой кислоты на наружной мембране.

Следовательно, опухолевые клетки характеризуются локальным ацидозом, гипоксией и васкуляризацией (разрастанием кровеносных сосудов) [100–104]. Дисбаланс производства свободных радикалов может усилить гипоксию и ацидоз опухоли [103]. В работе [105] изучались изменения в содержании белка и продуктов ПОЛ в опухолевой ткани на различных этапах развития рака лёгкого у человека. Содержание продуктов перекисного окисления липидов и модифицированных под действием окислительного стресса белков в опухолевой ткани было снижено по сравнению с нормальной тканью и сильно варьировалось в зависимости от стадии заболевания.

В опухолевой клетке могут находиться частично денатурированные белки [53]. Развернутые белки могут быть случайно распределены в цитоплазме или ло-

кализованы в определённых органеллах (например, в лизосомах или эндоплазматической сети). Клетки могут менять свое поведение в зависимости от отношения свернутых и развернутых белков в субклеточном пространстве [52, 141].

## 2.6 Материалы и объекты исследований

В настоящей работе материалом исследования являются ткани молочной железы, лёгкого, печени и почек лабораторных мышей *Mus musculus*, как чистых линий BYRB и BALB, так и непородистых (свободно скрещивающихся) особей. Часть материала была получена при подкожной пересадке опухолей молочной железы в холку здоровым самцам той же линии.

Основным источником опухолей являлись самки мышей линии BYRB со спонтанными опухолями молочных желёз (рисунок 2.5), впервые полученные в ИБХ РАН [106]. Мыши данной линии имеют наследственную мутацию (транслокацию Rb(8,17)11em), которая обуславливает повышенную предрасположенность к развитию опухолевого процесса с возможным участием экзогенного ММТВ-ретровируса, обнаруженного у них в лейкоцитарной фракции. Первичные опухоли появляются в возрасте приблизительно 9,5 месяцев, причем у каждой второй самки наблюдается более одной локализации опухоли, часто билатерально. Вероятность возникновения опухолей молочных желез (аденокарциномы) близка к единице (0,95). Подкожные опухоли, которые определяются только наощупь (меньше 4 мм), по крайней мере, две недели или дольше (то есть имеют латентный период), называют "постепенно проявляющимися" или лаг-положительными. Опухоли, видимые глазом уже при первом обнаружении, называются лаг-отрицательными. У мышей высококорактовых линий рак молочных желез спонтанно развивается преимущественно из ацинусов – секреторных участков железистой ткани. При диффузной гиперплазии в молочной железе появляются слаборазвитые гиперпластические разрастания,

состоящие из 2 – 3 ацинусов, образованных несколько большим, чем в норме, числом клеток с повышенной активностью ферментов окислительного фосфорилирования. С возрастом они трансформируются в хорошо оформленные гиперпластические узелки. Они образованы пятью и более числом ацинусов, в которых, по сравнению с нормой, увеличивается число клеток и их размеры. Такое состояние обычно называют предраковым, т.к. в большинстве случаев они трансформируются в опухоли. У мышей обычно бывают злокачественные аденокарциномы. Опухоли часто покрываются язвами и метастазируют в легкие и печень.



а

б

в)

Рисунок 2.5 – Мыши линии BYRB. а) общий вид, б) две опухоли с одной стороны, в) общий вид мыши с опухолью со вскрытой брюшной полостью и метастазами в печень

Описанные спонтанные опухоли молочных желез мышей данной линии во многом соответствуют аналогичному раковому заболеванию человека по гистологической и клинической картине [106]. Использование мышей чистой линии BYRB в экспериментах с одной стороны позволяет заметно улучшить воспроизводимость результатов при изучении материала от разных животных, с другой – освобождает от необходимости проводить гистологическое исследование каждого образца.

Подопытные животные находились в условиях обычного содержания, в нормальном световом режиме, получали полнорационный гранулированный ком-

бикорм со стандартными добавками и витаминами, а также воду без ограничений. Подкожные опухоли выявлялись у стареющих самок после выведения их из разведения, а также по достижении девственными самками возраста ожидаемого появления опухоли (более 6 месяцев). Ежеженедельно оценивалось физическое состояние стареющих самок. Появляющиеся опухоли выявлялись визуально и путем пальпации. Самок с обнаруженными операбельными опухолями помещались в предоперационные группы. Постоянно велось наблюдение за появлением новых опухолей.

Операции извлечению молочной железы и её опухолей проводили под адекватным наркозом с соблюдением всех правил асептики и антисептики. Размер опухолей варьировал от 3,0 до 10,0 мм. Опухоли бóльшего диаметра считали неоперабельными, для их частичного извлечения животное умерщвлялось. Адьювантная противораковая терапия подопытным животным не проводилась.

Для извлечения фрагмента молочной железы животному предварительно вводился 1%-раствор изопрофена при дозировке 1 мг на 10 г веса. Молочные железы у мышей находятся на большом протяжении от шеи до ануса, однако наибольшая масса сосредоточена в районе брюшной пары сосков [107]. После наступления наркоза животное фиксируется в спинном положении с раздвинутыми конечностями. Место сбоку от брюшной пары сосков освобождалось от шерсти и обрабатывалось 70%-м спиртовым раствором. Далее производился парамедианный разрез кожи, жировой клетчатки и большой кожной мышцы с последующим иссечением фрагмента молочной железы. Рана обрабатывалась дезинфицирующим раствором и закрывалась простым узелковым швом. Манипуляции при извлечении опухолей молочной железы аналогичны описанным. При наличии у самки одной операбельной опухоли проводили полное удаление ОМЖ. При наличии у самок нескольких опухолей, либо неоперабельных ОМЖ, проводили частичное удаление – неполную мастэктомию, отсекая максимальное количество опухолевой массы.

Для извлечения внутренних органов животные подвергались забою посредством смещения шейных позвонков с последующим вскрытием брюшной и грудной полостей по Вагнеру. Сразу после смерти животное погружалось в 70%-спиртовой раствор и фиксировалось в спинном положении с раздвинутыми укрепленными конечностями. На брюшной стороне удалялся волосяной покров, далее осуществлялся медианный разрез от лонной кости (симфиза) до грудины по белой линии через кожу, рыхлую клетчатку и поверхностную фасцию до пристеночной брюшины. От краев разреза делались еще четыре разреза к каждой из конечностей. Полученные лоскуты загибались наружу и фиксировались. Далее производилось вскрытие брюшной полости с последующей ревизией внутренних органов и иссечением печени и почек. Лёгкие извлекались в результате разреза диафрагмы и удаления сердца.

Все извлечённые биоматериалы временно помещались в марлю, обильно смоченную физиологическим раствором. Образцы, предназначенные для гистологического анализа, немедленно помещались во флаконы с 10%-м раствором формалина. Все работы с биологическим материалом (окрашивание и измерение люминесценции зонда) удавалось в большинстве случаев закончить за 2 часа после смерти животного.

Биологический материал, использованный в настоящей работе, был получен в результате препарирования 64 лабораторных мышей. Некоторые характеристики животных указаны в таблице 2.1.

*Таблица 2.1 – Статистика по лабораторным животным, использованным в работе*

Мышь	Количество	Средний возраст	Средний вес	Среднее количество опухолей
Самки со спонтанными ОМЖ	17	11 месяцев	19,8 г	1,4
Самки с перевитыми ОМЖ	5			
Самки здоровые	12			
Самцы с перевитыми ОМЖ	22	8 месяцев	20,5 г	1,0
Самцы здоровые	8			

Гистологическое исследование препаратов позволяет оценить структуру и морфологию ткани на микроуровне. В настоящей работе изготовленные гистологические препараты изучались с помощью методов световой и люминесцентной микроскопии. Образцы, изъятые для гистологии, помещались для фиксации в 10%-раствор формалина. Для изготовления гистологического препарата фиксатор удаляли путём промывания под проточной водой в течение суток. Далее образцы помещались в спирт для обезвоживания и уплотнения, затем заливались парафином. Для оптимального пропитывания образцов парафином кусочки тканей предварительно помещались в хлороформ при температуре 37°C на 1 час. После этого образцы перемещались в смесь из хлороформа с парафином на 1 час, далее в чистый парафин на 1 час в термостате (наличие хлороформа в образцах ухудшает свойства парафина, делая его рыхлым). Полученные парафиновые блоки остужались при комнатной температуре и нарезались на санном микротоме МС-2. Окрашивание проводилось по стандартной методике гематоксилином-эозином.

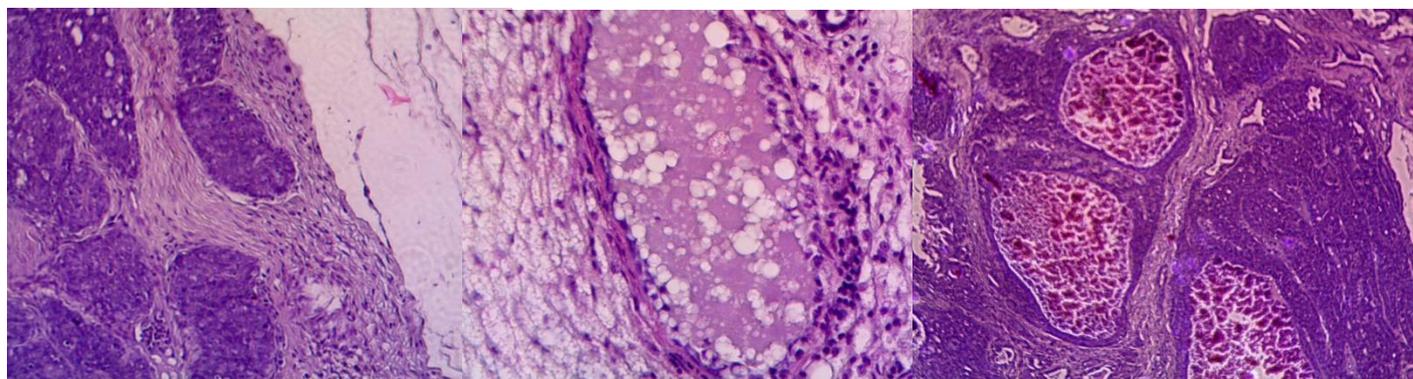


Рисунок 2.6 – Микрофотографии аденокарциномы молочной железы мышей BYRB

На микропрепаратах (рисунок 2.6), полученных из группы самок со спонтанными ОМЖ, видно, они представляют собой типичную аденокарциному, описанную в [106], с крупными зонами кровоизлияний и некроза, а также выраженным полиморфизмом клеток. Как и предполагалось, перевитые опухоли показали самую высокую степень дедифференцировки клеток.

В качестве зондов для наблюдения флуоресценции использовались ксантеновые красители – галогензамещенные флуоресцеина – эритрозин, эозин, бенгальский розовый [146]. В большинстве экспериментов использовался эритрозин (2-(6-гидрокси-2,4,5,7-тетрайодо-3-оксо-ксантен-9-ил) бензойная кислота)  $C_{20}H_6I_4Na_2O_5$  структурная формула которого представлена на рисунке 2.7а. Молярная масса молекулы эритрозина  $M = 879,86$  г/моль. На рисунке 2.7б показаны его спектры поглощения и люминесценции в водном растворе.

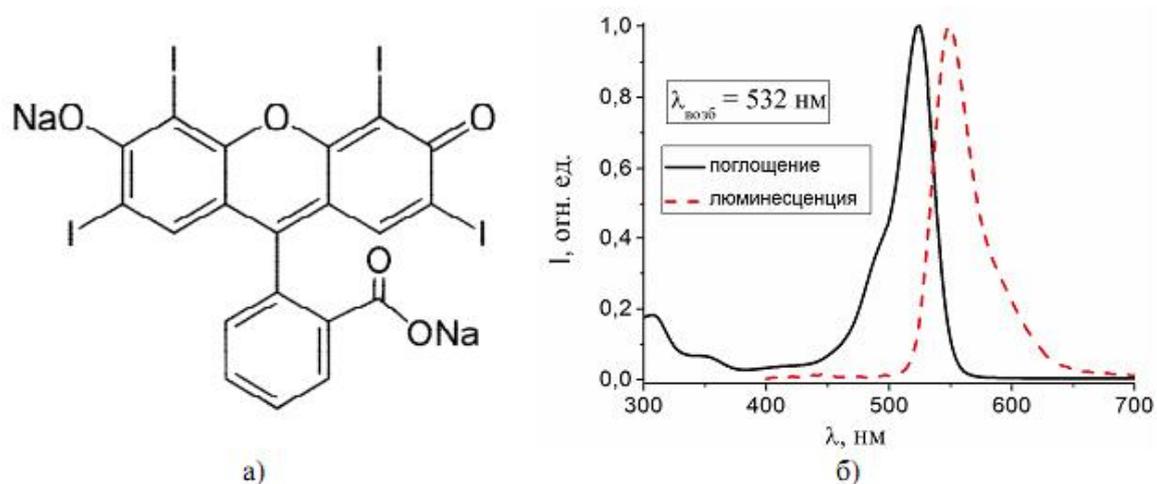


Рисунок 2.7 – Структурная формула молекулы эритрозина (а) и спектры поглощения и люминесценции (б) его водного раствора по [101]

Эритрозин – краситель ксантенового ряда, с очень хорошей растворимостью в воде (111 мг/мл) и несколько меньшей в спиртах (в этиловом – 18,7 мг/мл) [107, 108]. Благодаря наличию в своей структуре тяжелых атомов йода эритрозин обладает высоким квантовым выходом в триплетные возбуждённые состояния, что позволило использовать его в качестве пары молекуле кислорода в реакции кросс-аннигиляции [2, 3]. Важным преимуществом использования эритрозина помимо его оптимальных спектральных характеристик является его витальность (нетоксичность). Ранее он использовался в ряде стран в качестве пищевой добавки (E127), а в настоящее время рассматривается для использования в стоматологии [110–112] и лабораторных анализах [113–114].

Кроме того, эритрозин широко используется в гистологии в качестве кислого красителя. Кислые красители окрашивают ацидофильные структуры (цитоплазму клеток, коллагеновые, эластические волокна), проникая через наружную клеточную мембрану внутрь клеток [108]. Используется эритрозин в качестве индикатора белков в растворах, т.к. хорошо с ними взаимодействует [113–117].

Эритрозин в воде имеет близкий к единице квантовый выход в триплетное состояние, что обуславливает его применение в качестве ФС для ФДТ [111, 112]. В работе [112] произведена оценка эффективности эритрозина при ФДТ эпителия полости рта, в частности, оценке накопления красителя, его локализации в ткани. Использовались злокачественные клетки (H357) и предшествующие злокачественным (DOK). Установлено, что интенсивность накопления эритрозина в ткани напрямую зависит от его концентрации. Однако при самой ФДТ удалось достичь уничтожения 80% DOK-клеток и всего 60% H357-клеток. Для обоих типов клеток установлено, что эритрозин накапливается преимущественно в митохондриях. Большая устойчивость H357-клеток объяснена их меньшей восприимчивостью к изменению трансмембранного потенциала. Наконец, анализ морфологии мертвых клеток и активности каспаз (ферментов некроза и апоптоза) показал возникновение обширного некроза при высоких дозах ФДТ в DOK-клетках, тогда как апоптоз (самоубийство клеток) наблюдается при более низких дозах ФДТ как в DOK-, так и в H357-клетках. В H357-клетках при больших дозах ФДТ наблюдались как некротические, так и апоптотические реакции. Таким образом, фотодинамический механизм действия эритрозина схож с большинством используемых сенсibilизаторов для фотодинамической терапии.

Обобщая сказанное, наиболее важные характеристики эритрозина следующие: хорошая растворимость в воде, способность проникать внутрь клеток, высокий квантовый выход в триплетное возбуждённое состояние, удобные с точки зрения практики полосы возбуждения и люминесценции, яркое

свечение, нетоксичность, а также, что немаловажно, излучательные свойства эритрозина хорошо изучены на самых разных модельных объектах.

Работы с биологическими тканями производились после их окрашивания в водном растворе эритрозина концентрации  $10^{-3}$  моль/л. Расчёт массы красителя для получения необходимой концентрации в требуемом объёме производился по формуле  $m = VMc$ , где  $m$  – масса растворяемого красителя в граммах,  $V$  – общий объём полученной мицеллярной смеси (объём воды для водных растворов) в л,  $c$  – необходимая концентрация в моль/л,  $M$  – молярная масса растворяемого красителя в г/моль. В качестве растворителя использовалась дистиллированная вода. Взвешивание осуществлялось на электронных лабораторных весах AND HR-60 с погрешностью измерений 0,3 мг.

Окрашивание проводилось стандартным методом путём погружения фрагментов тканей размерами  $\sim 3$ –5 мм в указанный раствор эритрозина на 2–3 минуты с последующим вымыванием остатков красителя. Эксперимент проводился в условиях комнатной температуры (20–25°C) и нормального атмосферного давления (750–760 мм.рт.ст). Затем образцы помещались в раствор красителя на 2 – 3 минуты, после чего размещались в герметичной термостатируемой камере. Одновременно в камере можно разместить до шести образцов, этим обеспечивались одинаковые условия для эксперимента. К камере при необходимости подключался баллон со сжатым азотом для снижения концентрации кислорода в атмосфере над образцами.

### **3 Влияние кислорода на замедленную люминесценцию ксантовых зондов в тканях**

Образование СК в тканях происходит главным образом при тушении возбуждённых триплетных состояний ФС. Обладая достаточно высокой подвижностью молекулы кислорода способны дезактивировать значительную часть триплетных возбуждений ФС, тем самым оказывая существенное влияние на люминесценцию зонда.

В большинстве случаев интенсивность послесвечения ФС с ростом концентрации кислорода в среде уменьшается. Тушение триплетных возбуждений ФС удобно наблюдать по уменьшению интенсивности ФФ или ТЗФ [4, 5]. С другой стороны, для изучения взаимодействия кислорода с ФС можно использовать АЗФ – когда при увеличении концентрации кислорода в среде интенсивность свечения растёт. Результаты исследования длительной люминесценции зондов в тканях, при регулируемом изменении концентрации кислорода в них, изложены в работах [А4-А9].

#### **3.1 Тушение собственной люминесценции триплет-возбуждённого зонда кислородом**

Оптический метод оценки содержания кислорода в тканях, основанный на тушении ФФ зондов, хорошо известен [76, 79]. Метод применим для обнаружения поверхностного кислорода с глубиной дискретизации менее 1 мм при нормальных условиях. Время жизни ФФ молекул обратно пропорционально концентрации растворенного кислорода, при этом необходимо учитывать поправку на температуру.

На рисунке 3.1 показан внешний вид кривых кинетики затухания эритрозина в тканях печени мышей при их обескислороживании путём продувания камеры с образцами газообразным азотом. Видно, что чем меньше кислорода остаётся в тканях, тем больше интенсивность и продолжительность флуоресценции, при этом начальная интенсивность остаётся постоянной [А3, А14].

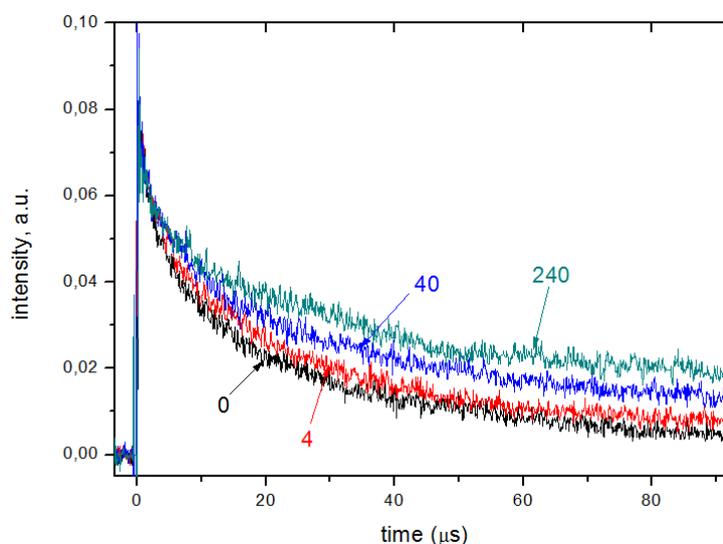


Рисунок 3.1 – Изменение кинетики затухания флуоресценции эритрозина в ткани печени здоровой мыши при инкубировании образца в проточном азоте. Указана длительность инкубирования в секундах

Эффективность генерации СК во время сеанса ФДТ напрямую зависит от концентрации кислорода в основном состоянии в непосредственной близости от сенсбилизатора, что подтверждается экспериментами с Sn (IV) мезопорфирина IX-дихлоридом, который растворялся в 1 %-ом растворе альбумина [78]. Наличие кислорода в системе повышало значение параметра отношения интенсивностей ФФ к ЗФ, и в опыте фиксировалось возрастание флуоресценции при уменьшении концентрации кислорода. В результате диффузии кислорода при наличии градиента концентрации значение отношения интенсивностей указанных свечений снова уменьшалось. Авторы работы [77] определяли параметры флуоресценции молекул порфирина Pd-TMSPP в клетках и тканях лабораторных живот-

ных. Константа скорости тушения триплетных состояний ФС в белковых растворах оценивалась как  $7,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . При исследовании затухания фосфоресценции ФС почти во всех одиночных клетках *in vitro* время послесвечения составило  $730 \pm 20$  мкс, что указывает на слабое тушение Т-состояний ФС кислородом. Содержание свободного кислорода в тканях *in vitro* оценено авторами меньше  $10^{-6}$  М. Таким образом, авторами установлено, что содержание свободного кислорода в тканях в несколько раз меньше, чем в воде. Тем не менее, такого количества достаточно для пяти-шестикратного тушения молекул ФС. Сходные выводы сделаны авторами [132].

Схожими характеристиками в ответ на изменение концентрации кислорода обладает и ТЗФ. В работе [118] определены характеристики ЗФ мезотетрафенилпорфина-тетрасульфоната в жидких растворителях различной кислотности и вязкости, а также донорно-акцепторные переносы энергии с ФС на бычий сывороточный альбумин, триптофан и фурфуриловый спирт. Времена жизни триплетных состояний характеризовали по замедленной люминесценции, обусловленной ТЗФ. Было показано, что времена жизни свечения в значительной степени зависят от степени агрегации молекул сенсibilизатора, а также уменьшаются с ростом рН. Мономеры сенсibilизатора имеют более долгоживущие триплетные состояния в водных фосфат-буферных растворах при нейтральных рН, особенно когда связаны с альбумином, несмотря на низкую вязкость и протонированную природу среды. Увеличение кислотности раствора повышает степень агрегации красителя с белком. Для спиртосодержащих растворов время жизни ЗФ не зависит от кислотности – добавление спирта дезагрегирует вышеупомянутые комплексы.

При обескислороживании образцов в проточном азоте ТЗФ и ФФ ведут себя сходным образом: интенсивности ТЗФ и ФФ растут синхронно (рисунок 3.2) [A21].

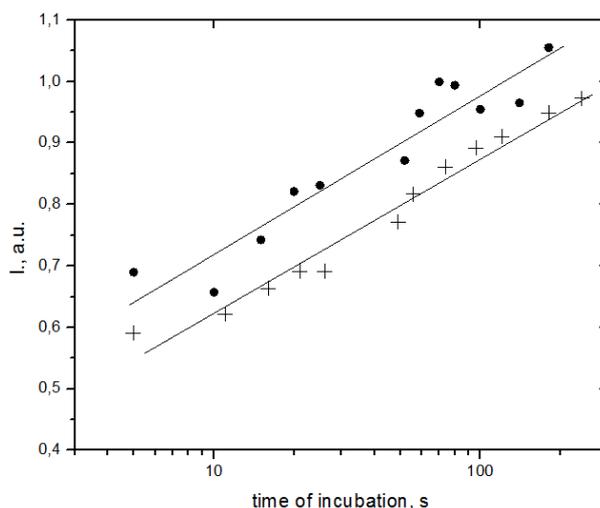


Рисунок 3.2 – Изменение интегральной интенсивности ЗФ (сплошные точки) и ФФ (крестики) на участке 20 – 40 мкс кинетической кривой при инкубации образца молочной железы мыши в проточном газообразном азоте

Существенной проблемой метода оценки тушения ФФ (ТЗФ) является возможное экранирование зонда от подвижного кислорода в результате образования комплексов либо агрегаций с другими компонентами тканей и клеток. Свечение таких триплетных возбуждений будет происходить независимо от текущей концентрации кислорода и может усложнить отслеживание динамики кислорода в тканях [A2, A3, A18].

### 3.2 Особенности замедленной флуоресценции, вызываемой синглет-триплетной аннигиляцией

Изменение АЗФ в зависимости от параметров диффузии кислорода достаточно подробно исследовано для модельных объектов [8, 9, 85–87, 119, 120]. Реакция СТА (1.4), в которой СК принимает непосредственное участие, вполне может считаться прямым методом оценки содержания СК в среде. Также характерной особенностью реакций СТА в отличие от ТЗФ или ФФ является увеличение, а не уменьшение квантового выхода флуоресценции при повышении концентрации

кислорода. Если диффузия кислорода в среде протекает достаточно быстро, то СТА оказывает значительную конкуренцию как ТЗФ, так и ФФ [8–12, 86].

Для АЗФ зондов, локализованных в тканях, сохраняется характерная «горбообразная» форма кинетической кривой (рисунок 3.3).

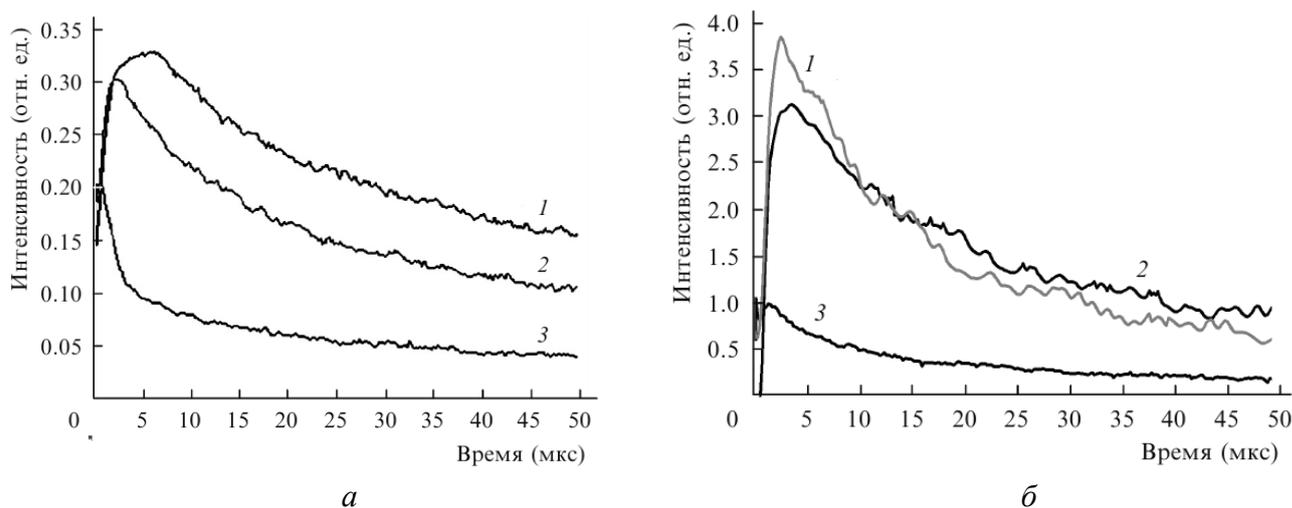


Рисунок 3.3 – Кинетика затухания ЗФ эритрозина в клетках нормальной (1) и опухолевой (2) тканей, а также на биоматериале (3) при давлении воздуха над поверхностью образцов 150 мм рт. ст. (а) и при атмосферном давлении (б) по [12]

При обескислороживании вид кривых меняется: продолжительность свечения возрастает, а интенсивность, особенно на начальном участке, снижается. Показано [87], что для водных растворов различных зондов АЗФ изменяется аналогичным образом. Различные водорастворимые красители применительно к способности реагировать с кислородом и генерировать АЗФ рассмотрены в [86, 131]. Слабую АЗФ демонстрировал только метиленовый синий, т.к. диффузионно-зависимая ЗФ затруднена из-за агрегации молекул красителя. Эффективность генерации АЗФ характеризуется отношением интенсивности СТА-замедленной флуоресценции к интенсивности быстрой флуоресценции. Это отношение оказалось наибольшим для бенгальского розового.

Спектры ЗФ хорошо совпадают со спектрами быстрой флуоресценции за исключением TPPS<sub>4</sub>. Для TPPS<sub>4</sub> зависимость этого отношения от концентрации

ФС была линейной, что указывает на бимолекулярные процессы тушения. Выход АЗФ увеличивался с уменьшением содержания кислорода в среде при условии, что концентрация кислорода по-прежнему велика по сравнению с начальной концентрацией триплет-возбуждённых молекул. При этом отношение сигнал-шум ухудшается [А3, А4].

При дальнейшем снижении содержания кислорода в среде возрастает конкуренция СТА с другими каналами деактивации триплет-возбуждённых состояний. Отсюда можно сделать вывод, что при достаточной концентрации кислорода в среде АЗФ подавляет все другие каналы релаксации триплет-возбуждённых состояний, что определяется, прежде всего, высокой скоростью реакций (1.3) и (1.4). Изменение содержания кислорода отражается также и на форме кинетики АЗФ. В насыщенных кислородом растворах (при очень высоких его концентрациях) интенсивность АЗФ незначительно снижается. Это обусловлено высоким расходом возбуждённых триплетных состояний на генерацию СК – реакция (1.3) будет идти интенсивнее, чем реакция (1.4). В результате триплет-возбуждённые молекулы будут тушиться быстрее, чем реагировать с СК [А7-А8].

Продувание азотом приводит к удалению кислорода из системы, в результате чего АЗФ падает. Удаление СК из системы производилось с помощью азид натрия. Азид натрия - физический тушитель синглетного кислорода, который практически им не окисляется. Кинетика ТТ-ЗФ представляет собой монотонно затухающую кривую. Наличие азид натрия  $\text{NaN}_3$  не оказывает влияния на ТТ-ЗФ, в то время как практически полностью тушит АЗФ. Спектры замедленной люминесценции записывались в интервале 0,5 – 20 мкс кинетики после импульса возбуждения. Для бенгальского розового наблюдалась выраженная фосфоресценция. Кинетика фосфоресценции демонстрировала моноэкспоненциальный характер. При добавлении азид натрия ЗФ почти полностью потушилась, что не привело к разгоранию ФФ. Для некоторых веществ наблюдалось перекрывание полос АЗФ и фосфоресценции (например, ТМРуР, тиазолин-замещённые порфирины и

т.д.) Было показано, что энергетическое  $S_1-T_1$ -расщепление может быть оценено по разнице между максимумами флуоресценции и ФФ. Для бенгальского розового и эозина  $Y$  фосфоресценция наблюдается при 720 нм (166 кДж/моль) и 690 нм (173 кДж/моль) соответственно. Константа скорости АЗФ может быть определена из отношения  $R$  и оценивается в рамках  $(0,5 \div 1) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ .

АЗФ наблюдалась авторами [85] также и в живых клетках (фибробласты мыши, инкубированные с TPPS<sub>4</sub>). ЗФ тушилась при добавлении азиды натрия, который легко проникает в клеточные мембраны, тогда как БФ не изменялась. Форма спектров ЗФ в целом совпадали со спектрами быстрой флуоресценции.

Кинетика затухания ксантоновых красителей (эозина, эритрозина, бенгальского розового) изучалась в здоровых и малигнанных клетках мышей [11–12], которые помещались на питательную среду на основе биополимера, созданного на основе нативной гиалуроновой кислоты. Показано, что в полимерной плёнке молекулы красителя не тушатся кислородом, в то время как в клетках такое взаимодействие имеет место, что отражается на характере кинетики. С ростом концентрации кислорода в камере с образцами регистрировалось увеличение интенсивности ЗФ. На атмосфере наблюдалась характерная горбообразная кривая затухания, обусловленная реакциями (1.3) и (1.4) (см. также рисунок 1.2).

Основные факторы, влияющие на квантовый выход АЗФ: хороший выход синглетного кислорода, хороший выход ФС в триплетное возбуждённое состояние, хорошие флуорогенные свойства ФС. Также обнаружены различия в характере затухания ЗФ красителя для опухолевых и нормальных клеток, что также может указывать на разную концентрацию тушителя в них. Молекулы красителя в нормальных клетках оказались более доступными для кислорода. Время жизни ЗФ для красителя в нормальных и раковых клетках составило  $35 \pm 3$  и  $20 \pm 2$  мкс соответственно. Таким образом установлено, что с ростом давления воздуха над поверхностью образца аннигиляционная составляющая ЗФ увеличивается (происходит разгорание ЗФ), а интенсивность и продолжительность ТЗФ уменьшаются.

### 3.3 Скорость затухания кинетики замедленной люминесценции зондов

Количественная оценка вклада АЗФ красителей в регистрируемую ЗФ в живых клетках была произведена авторами [10]. Предполагается, что интенсивность ЗФ эритрозина в биологических тканях складывается из трех составляющих: ТЗФ, АЗФ и ТТ-ЗФ (1.5). При обычных условиях (на обычной атмосфере) основной вклад в ЗФ вносят реакции СТА. При обескислороживании образцов (выдерживании в проточном газообразном азоте) АЗФ подавляется, а большая часть интегральной ЗФ была обусловлена ТЗФ. На воздухе (при доступе кислорода) ТТ-ЗФ оказалась полностью подавленной, а доля АЗФ составила для здоровой и опухолевой ткани 65 и 85% соответственно.

Вклад АЗФ приводит к сложному немонотонному характеру кинетических кривых затухания ЗФ (рисунок 3.4). Это означает, что скорости затухания свечения варьируют на различных участках кинетической кривой [А3].

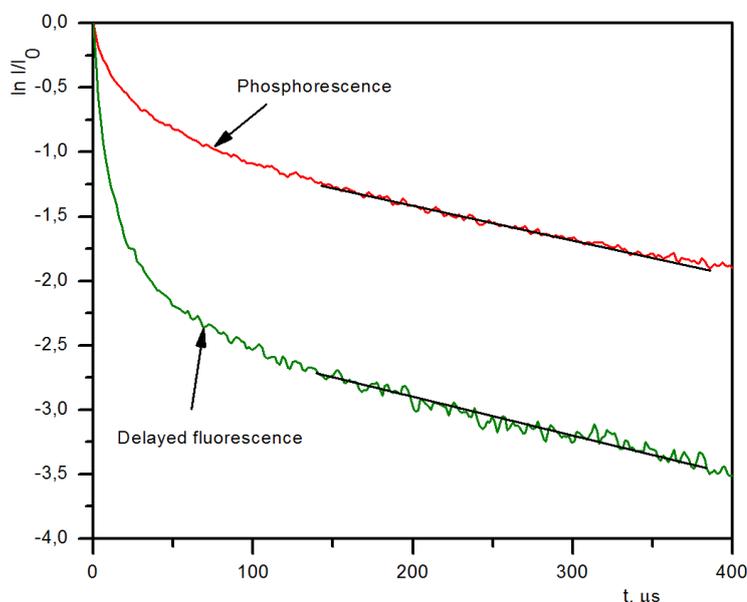


Рисунок 3.4 – Кинетика затухания ЗФ и фосфоресценции эритрозина в ткани молочной железы мыши в полулогарифмических координатах

Основная доля свечения триплет-возбуждённых молекул приходится за первые микросекунды (ЗФ) или первые десятки микросекунд (ФФ). Таким обра-

зом, уже в первом приближении ФФ затухает на порядок медленнее, чем ЗФ (таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Средние константы скоростей затухания для начальных участков кривых затухания замедленной люминесценции (1 – 10 мкс после импульсного возбуждения) некоторых тканей мышей

Ткань	Замедленная флуоресценция, $10^5 \text{ с}^{-1}$	Фосфоресценция, $10^4 \text{ с}^{-1}$
Молочная железа	$2.63 \pm 0.42$	$6,11 \pm 1,07$
Опухоль молочной железы	$3.30 \pm 0.75$	$7,92 \pm 1,12$
Легкие	$2,22 \pm 0.67$	$2,45 \pm 1,45$
Печень	$3,03 \pm 0.41$	$5,69 \pm 1.38$
Почки	$2,88 \pm 0.76$	$6,53 \pm 1.17$

При рассмотрении кинетики затухания люминесценции эритрозина на больших временных масштабах можно отметить, что интенсивность послесвечения отлична от нуля вплоть до сотен микросекунд. Это означает, что некоторая часть молекул люминофора в биологических тканях способна достаточно долго сохраняться в возбуждённом триплетном состоянии. Напомним, что собственное время жизни эритрозина (при отсутствии тушителей) составляет около 700 мкс [A12].

Во-первых, это напрямую свидетельствует о том, что большое количество молекул ФС, дающих вклад в свечение, находится в иммобилизованном состоянии, т.е. их подвижность существенно ограничена. Во-вторых, несмотря на большие концентрации разнообразных тушителей в тканях, некоторая часть молекул ФС остаётся недоступной для динамического тушения. Нам уже известно, что эритрозин легко агрегируется с белками [10, 113–115]. Связывая молекулы ФС, молекулы биополимеров могут обеспечить не только иммобилизующий, но и экранирующий эффект, тем самым сохраняя триплетные возбуждения в течение сотен микросекунд. Аналогичные выводы были сделаны для люминесцирующих красителей, находящихся в белковых суспензиях [77, 78, 87, 116, 121], поэтому эти результаты вполне можно распространить и на биологические ткани.

В масштабах порядка сотен микросекунд (поздняя кинетика) скорости затухания и ЗФ, и ФФ практически одинаковы и сравнительно малы (порядка  $3000 \text{ с}^{-1}$ ), а форма кривой затухания близка к моноэкспоненциальной (рисунок 3.4). Интересно отметить, что в экспериментах, проводимых на открытом воздухе, интенсивность ФФ всегда несколько превышает интенсивность ТЗФ.

Синхронное затухание, наблюдаемое на двух каналах послесвечения в поздней кинетике, может быть следствием релаксации только собственно триплетных возбуждений, при котором бимолекулярные процессы (типа аннигиляционной ЗФ) не дают вклада в свечение. Поэтому ясно, что ЗФ на данном участке представлена единственным моноэкспоненциальным ТЗФ-слагаемым (E-type). Кинетика ФФ также имеет выраженный моноэкспоненциальный характер. Как известно, обе упомянутые разновидности послесвечения пропорциональны количеству триплетных возбуждений в системе на данный момент (рисунок 3.2). «Классическое» затухание по экспоненте означает, что все триплетные возбуждения на данном временном отрезке релаксируют независимо друг от друга. Заметим, что соответствующее изображённому на рисунке 3.4 наклону кривых время жизни составляет приблизительно 350 мкс (таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Средние константы скоростей затухания для поздней кинетики затухания замедленной люминесценции (200 – 400 мкс после импульсного возбуждения) некоторых тканей мышей

Ткань	Замедленная флуоресценция, $10^3 \text{ с}^{-1}$	Фосфоресценция, $10^3 \text{ с}^{-1}$
Молочная железа	$3.95 \pm 0.80$	$4.16 \pm 1,11$
Опухоль молочной железы	$2.77 \pm 0.31$	$2.94 \pm 0.43$
Легкие	$2.50 \pm 1.56$	$3.12 \pm 0.68$
Печень	$3.48 \pm 0.51$	$3.16 \pm 0.43$
Почки	$3.33 \pm 0.71$	$3.44 \pm 0.50$

Интересно отметить, что речь идёт о среде, открытой на обычную атмосферу и на 80 % состоящей из воды, в которой послесвечение эритрозина без деаэрации наблюдать не удастся. Отсутствие бимолекулярных реакций, дающих вклад в

послесвечение, легко может объясниться тем, что к временам порядка сотен микросекунд после возбуждения плотность триплетных возбуждений уже настолько мала, что любые формы взаимодействия либо переноса энергии между ними практически невозможны. Тогда на более ранних участках кинетики ЗФ (особенно первые 10 мкс после возбуждения) обязательно следует учитывать аннигиляционное слагаемое в (1.5). Вклад этого слагаемого определяет высокую скорость затухания ЗФ по сравнению с ФФ на ранней кинетике. В итоге мы наблюдаем существенную разницу в продолжительности послесвечения ЗФ и ФФ [A12].

Важно заметить, что здесь и далее под выражением «аннигиляционный» будет пониматься преимущественно СТА. В экспериментах взаимная ТТ-аннигиляция молекул ФС практически не регистрируется [10]. Это может являться еще одним подтверждением того, что ФС в тканях находятся в иммобилизованном состоянии, что значительно снижает вероятность их кросс-аннигиляции.

### **3.4 Замедленная люминесценция фотосенсибилизаторов в тканях со сниженным содержанием кислорода**

Значительная часть ЗФ открытых на обычную атмосферу окрашенных образцов на микросекундах после возбуждения обусловлена участием в фотореакциях молекул кислорода. Прямым подтверждением определяющей роли СТА в процессах ЗФ являются эксперименты с окрашенными образцами, длительное время находящимся в специальной камере, через которую пропускаться газообразный азот. Мерой оксигенации тканей в таком случае может являться продолжительность такой инкубации (рисунок 3.2) [A17, A23].

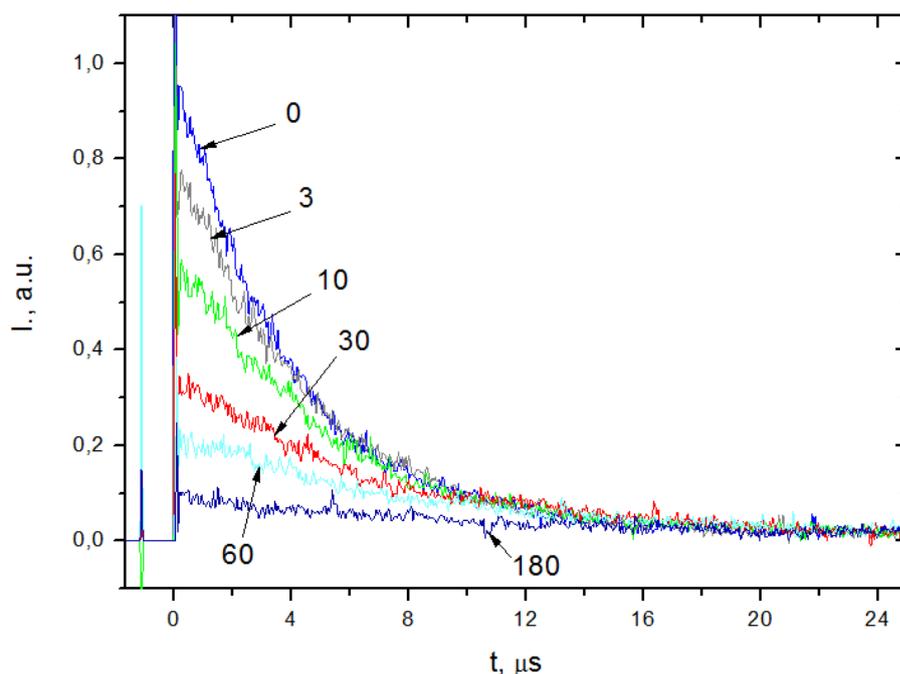


Рисунок 3.5 – Кинетика затухания ЗФ эритрозина в ткани молочной железы мыши при инкубировании образца в проточном молекулярном азоте. Цифрами указана продолжительность инкубирования в секундах. Во врезке – зависимость интегральной интенсивности ЗФ на участке кинетической кривой 1–10 мкс от продолжительности инкубирования.

На рисунке 3.5 показана серия кинетических кривых затухания ЗФ эритрозина в ткани молочной железы при различном содержании кислорода в тканях. На начальном участке кинетической кривой ЗФ интенсивность падает в несколько раз. При этом форма кривой асимптотически приближается к моноэкспоненциальной. ФФ меряется менее радикально: продолжительность увеличивается, а форма кривой затухания уподобляется таковой для ЗФ.

В какой-то мере ЗФ и ФФ теряют признаки ранней кинетики, описанные ранее, и приобретают черты бескислородной поздней кинетики на всём протяжении. В пределе ЗФ и ФФ стремятся к взаимной пропорциональности, когда все триплетные возбуждения релаксируют медленно и независимо друг от друга. На рисунке 3.5 можно видеть, что продолжительность длительной люминесценции возрастает в несколько раз.

В условиях подобной инкубации воздух в атмосфере над образцами постепенно замещается молекулярным азотом. Влияние больших концентраций азота на кинетику ЗФ пока детально не исследовано, а вот возможный вклад подвижного кислорода в кинетику ЗФ изучен достаточно хорошо. При кислородном обеднении тканей вид кинетики затухания люминесценции эритрозина кардинально изменяется. Учитывая, что на ранней стадии кинетики ЗФ (диапазон 1 - 10 мкс) происходит тушение около  $0,8 \div 0,9$  от первоначальной интегральной интенсивности ЗФ на этом участке, можно утверждать, что на данном участке кинетики в открытых на обычную атмосферу образцах значительная доля ЗФ генерируется за счёт кислородного механизма, т.е. СТА. Это свидетельствует о том, что скорость реакций СТА значительно превышает скорости собственной излучательной релаксации триплет-возбуждённых молекул (в том числе и скорость обратной интеркомбинационной конверсии – ТЗФ). На более поздней кинетике ЗФ в открытых на атмосферу образцах аннигиляционные процессы практически не имеют места, и происходит переход на моноэкспоненциальный режим затухания (рисунок 3.4). Аналогичная картина наблюдается и при принудительном удалении кислорода из атмосферы над образцами (рисунок 3.5).

В обоих случаях происходит переход на более «экономные» пути расходования энергии триплетных возбуждений, что обуславливает увеличение длительности свечения. На рисунке 3.6 можно видеть «разгорание» в полосе ФФ при азотном обескислороживании атмосферы над образцами (см. также рисунок 3.1). Интенсивность ТЗФ при этом также увеличивается, но интегральная интенсивность ЗФ уменьшается, поскольку исчезает аннигиляционная составляющая ЗФ. Уверенно разрешить два вида ЗФ можно только для больших временных интервалов. Как описано выше, вклад СТА, существенно превосходящей по интенсивности ТЗФ, снижается только к 10 мкс после возбуждения. Измеряя интегральную интенсивность на участке 20–40 мкс, можно получить сведения об изменении ТЗФ,

так как в данном диапазоне вклад СТА в общий сигнал уже значительно меньше, а соотношение сигнал/шум для ЗФ всё еще достаточно удовлетворительное [A2].

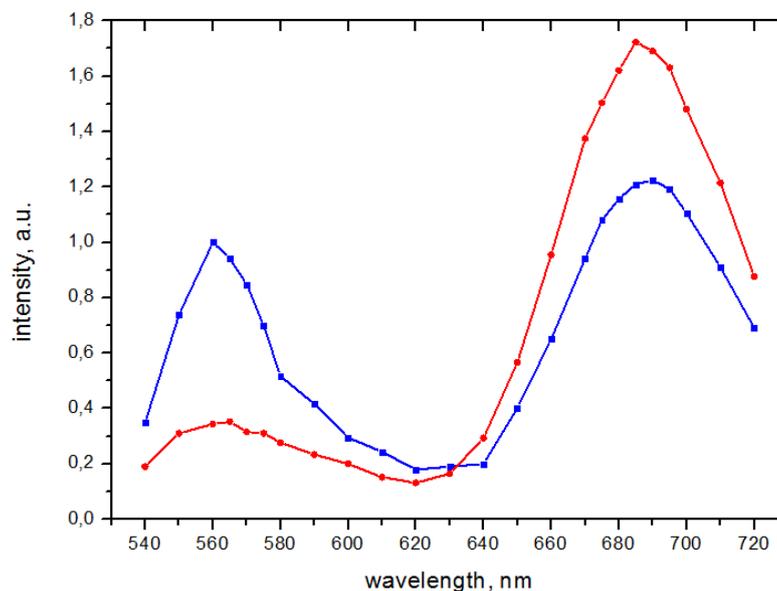


Рисунок 3.6 – Спектры замедленной люминесценции эритрозина в ткани молочной железы мыши в образце, находящемся в обычной атмосфере (синий) и длительное время выдержанном в проточном азоте (красный) в диапазоне 1 – 40 мкс.

На рисунке 3.7 приведены результаты измерения интегральной интенсивности ЗФ на различных участках кинетики.

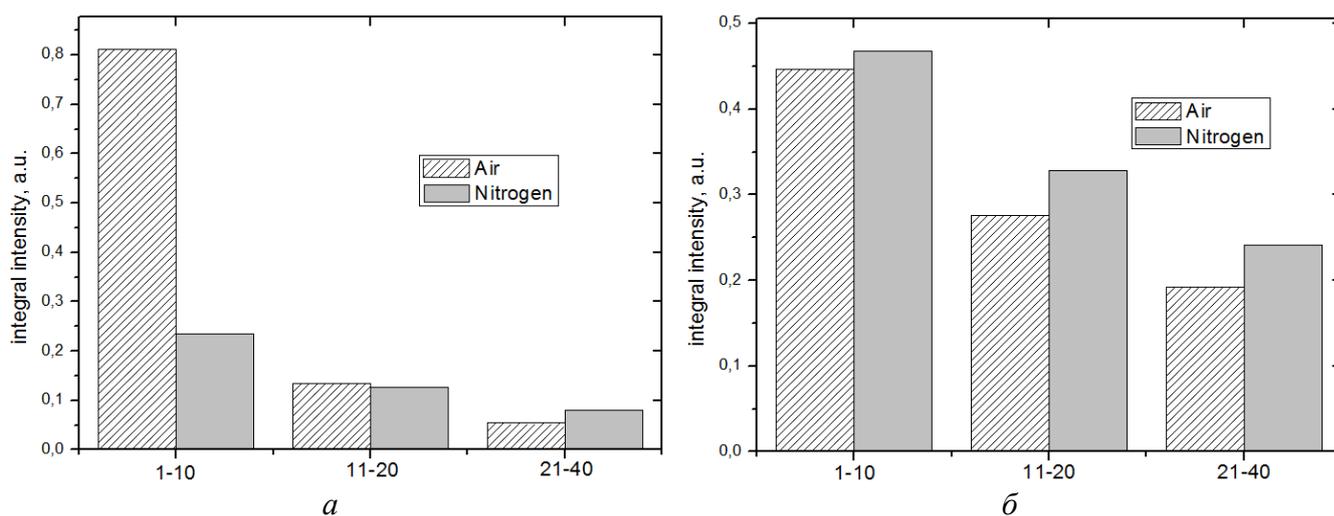


Рисунок 3.7 – Интегральные интенсивности ЗФ (а) и ФФ (б) трёх участков кинетической кривой (1 – 10, 11 – 20, 21 – 40 мкс после возбуждения) в обычной и азотной атмосфере

Видно, что в тканях уже в «промежуточном» диапазоне времени 10–20 мкс интенсивность ЗФ окрашенного образца в атмосфере азота практически сравнива-

ется с таковой в обычной атмосфере, а в диапазоне 20–40 мкс –заметно превосходит. Это позволяет утверждать, что при деоксигинации тканей экспериментально наблюдается закономерное снижение доли кислородзависимой АЗФ, что приводит к увеличению интенсивности конкурирующих каналов свечения – ТЗФ и ФФ. На рисунке 3.2 показано, что при инкубировании образцов в проточном азоте ТЗФ и ФФ изменяются аналогичным образом. При длительном обескислороживании образцов (продувание камеры с образцами азотом в течение 7 – 10 мин) АЗФ может вообще не регистрироваться на фоне ТЗФ. Экспериментально относительно легко было достигнуто полное исчезновение АЗФ с доминированием в наблюдаемом сигнале ЗФ термоактивационной составляющей [А9, А11, А14].

Сходная картина реакции ТЗФ на изменение концентрации кислорода наблюдалась в работе [118], где изучались особенности ЗФ мезо-тетрафенилпорфина-тетрасульфоната в водных растворах с добавлением бычьего сывороточного альбумина. При моделировании ФДТ показано, что концентрация кислорода уменьшается и это приводит к увеличению интенсивности ТЗФ. Также установлено, что времена жизни возбуждённых состояний сенсбилизатора не зависят от его концентрации (в пределах  $10^{-6}$  –  $10^{-5}$  М). При высокой вязкости раствора время жизни ЗФ растёт из-за уменьшения вероятности тушения. Мономеры красителя, агрегированные с белком (бычьим сывороточным альбумином), демонстрировали максимальную продолжительность ЗФ.

Важно отметить, что даже после самого длительного выдерживания тканей в азоте, после того как образцы возвращали в обычную атмосферу, вид кинетических кривых полностью восстанавливается. Это однозначно свидетельствует об обратном проникновении кислорода в ткани. Отсюда следует, что в определённой степени биологические ткани можно рассматривать как кислородопроницаемую среду. Характерные времена дезоксигенации и обратной оксигенации биологических тканей, как следует из проведённых экспериментов, составляют нескольких

секунд или десятков секунд. Кислород следует рассматривать в тканях в растворённом состоянии [A12, A22, A24].

Уровень кислорода в биологических тканях оценивался в работах [26, 59–61, 71–76, 134]. Согласно имеющимся данным, парциальное давление кислорода в тканях существенно ниже, чем в атмосфере и не превышает нескольких мм.рт.ст., даже если ткань имеет непосредственный доступ к воздуху. Следовательно, растворимость кислорода в ткани имеет некое конечное значение, не исключено, что оно регулируется физиологически. При непосредственном контакте с атмосферой устанавливается динамическое равновесие между уровнем кислорода в ткани и в резервуаре (в атмосфере над образцами). В таком случае кислород может достаточно свободно диффундировать в ткань и обратно, с характерными константами скоростей около  $1 \div 0,1 \text{ с}^{-1}$ . Когда содержание кислорода в резервуаре меняется, в тканях происходят соответствующие изменения, которые инертны и проявляются с некоторым запаздыванием. Такие выводы следуют из наблюдений тушения ЗФ, вызванного дефицитом одного из участников реакции синглет-триплетной аннигиляции [A3, A14, A16-7].

### **3.5 Определение вклада различных механизмов в замедленную флуоресценцию**

Для определения вклада ТГА в регистрируемый сигнал исследована кинетика ЗФ красителей в тканях после длительной продувки азотом камеры с образцами. При анализе учитывалось, что функция времени  $n_T(t)$  в выражении (1.5) пропорциональна мгновенному значению интенсивности фосфоресценции образца  $I_{фос}(t)$ . В качестве  $n_{\Delta}(t)$  в выражении (1.5) взята затухающая экспонента, отражающая предположение о том, что при малой концентрации кислорода и большой концентрации триплетных возбуждений  $n_{\Delta}(t)$  только убывает, поскольку практи-

чески весь триплетный кислород переведен в синглетное состояние уже к моменту окончания лазерной вспышки. Таким образом, перепишем (1.5) в виде

$$I_{3\Phi}(t) = B_1 I_{\phi oc}(t) \exp\left(-\frac{t}{\tau_{\Delta}}\right) + B_2 I_{\phi oc}^2(t) + B_3 I_{\phi oc}(t) \quad (3.1)$$

где  $B_1$ ,  $B_2$  и  $B_3$  – неотрицательные постоянные коэффициенты. Технически с помощью вычислительных средств подбирались такие значения коэффициентов  $B_1$ – $B_3$  и  $\tau_{\Delta}$ , при которых правая часть (3.1) наилучшим образом аппроксимирует экспериментальную кривую  $I_{3\Phi}(t)$  по методу наименьших квадратов. Коэффициенты  $B_2$ ,  $B_3$  и  $\tau_{\Delta}$ , сведены в таблице 3.3. Там же приведены относительные вклады в сигнал ЗФ от процессов СТА, ТТА и ТЗФ, оцененные по площади под соответствующей кривой ( $S_{СТА}$ ,  $S_{ТТА}$  и  $S_{ТЗФ}$  соответственно) [10].

Таблица 3.3 – Коэффициенты в уравнении (3.1) и относительные интегральные вклады различных типов длительного послесвечения в общий сигнал в обедненных кислородом тканях

Коэффициент	Норма	Опухоль
$B_2$	0,24	0,39
$B_3$	1,37	1,11
$\tau_{\Delta}$	1,93	3,48
$S_{СТА}$	0,04	0,04
$S_{ТТА}$	0,41	0,25
$S_{ТЗФ}$	0,55	0,71

Анализ данных таблицы 3.3 свидетельствует о том, что в атмосфере азота относительный вклад ТТА в ЗФ заметно больше в нормальной ткани. Причиной тому может быть меньшая вязкость цитоплазмы в нормальных клетках, приводящая к большей подвижности молекул ФС в них и росту вероятности их взаимодействия. Различия в вязкости цитоплазмы в здоровых и опухолевых клетках установлено в работах [33, 63].

Заметим, что интенсивность и длительность АЗФ в здоровой и опухолевой тканях отличаются, но относительный интегральный вклад этого процесса в кинетику ЗФ в разных тканях одинаков. Равенство вкладов можно объяснить тем, что “выгорание” синглетного кислорода в здоровых тканях идет быстрее за счет

большей подвижности молекул в менее вязкой цитоплазме. Это предположение подтверждается кинетикой безразмерных функций  $B_1 n_{\Delta}(t)$  (рис. 2в), отражающих ход концентрации СК [10].

При естественном составе воздуха над образцами и, следовательно, значительной концентрации молекулярного кислорода в клетках, кинетика ЗФ трансформируется, приобретая на коротких временах участок нарастания. Для оценки вклада ТЗФ и АЗФ в регистрируемый сигнал ЗФ, а также для определения кинетики концентрации СК проведена вычислительная процедура, аналогичная процедуре для обескислороженных образцов. Для отображения нарастания и последующего убывания концентрации СК в качестве  $n_{\Delta}(t)$  в выражении (3.1) взята сумма трех или четырех лоренцевых кривых с подстраиваемыми параметрами. Такое представление позволяет в процессе подгонки в достаточных пределах варьировать вид  $n_{\Delta}(t)$ , не требуя чрезмерных вычислительных ресурсов. Результаты аппроксимации приведены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Коэффициенты в уравнении (3.1) и относительные интегральные вклады различных типов длительного послесвечения в общий сигнал для тканей на обычном воздухе

Коэффициент	Норма	Опухоль
$B_2$	0,00	0,00
$B_3$	0,54	0,55
$S_{СТА}$	0,65	0,83
$S_{ТГА}$	0,00	0,00
$S_{ТЗФ}$	0,35	0,17

Анализ этих данных и их сравнение с ЗФ при малых концентрациях кислорода показывают, что в целом изменение относительных вкладов трех составляющих соответствует ожидаемому возрастанию СТА при увеличении концентрации кислорода. Вместе с тем нужно отметить, что это возрастание роли СТА необычно велико, поскольку оно привело к полному исчезновению вклада в сигнал от ТГА в образцах.

Обращает на себя внимание существенная разница в ходе безразмерных функций  $B_1 n_{\Delta}(t)$ , мгновенные значения которых через коэффициент  $B_1$  зависят от условий образования столкновительных пар ФС–кислород, т.е. потенциально могут быть индикаторами специфического состояния клеток. Безразмерные функции  $B_1 n_{\Delta}(t)$  через  $n_{\Delta}(t)$  увеличиваются с ростом концентрации молекулярного кислорода в клетке. Однако представляется маловероятным, что отличие кривых  $B_1 n_{\Delta}(t)$  у нормальной и опухолевой ткани объясняется отличиями в концентрации молекулярного кислорода в разных клетках.

В условиях *in vitro* концентрация молекулярного кислорода внутри разных клеток определяется только его внешним парциальным давлением и растворимостью в цитоплазме. Таким образом, заметное увеличение  $B_1 n_{\Delta}(t)$  в пораженных тканях по сравнению с нормальными (рис. 3в) обусловлено не разными исходными концентрациями кислорода в клетках, а более благоприятными условиями для образования СК и процессов СТА. Однако обратное соотношение эффективностей СТА в этих же образцах при пониженных концентрациях кислорода не соответствует этому предположению.

С учетом этих противоречивых обстоятельств можно дать следующую интерпретацию полученных результатов. По-видимому, наблюдаемые сигналы ЗФ обусловлены суперпозицией свечения молекул ФС, адсорбированных мембраной, связанных внутри и межклеточными белками, и относительно свободных молекул, растворенных в цитозоле. При естественном составе воздуха над образцами кислород, имея большую концентрацию и подвижность, успевает «потушить» триплетные возбуждения молекул красителя в цитозоле еще до «отпирания» ФЭУ и начала регистрации сигналов. Отсюда экспериментально фиксируется только ЗФ от красителя, связанного белками и находящегося в мембране, где подвижность кислорода и доступность красителя для него значительно меньше.

С этой точки зрения следует считать, что найденная нами разница в ходе  $B_1 n_{\Delta}(t)$  и в характеристиках ЗФ в разных тканях скорее обусловлены отличиями в

свойствах их мембран, внутри- и межклеточных белков. При большой концентрации кислорода кинетика ЗФ определяется в основном процессами СТА и ТЗФ связанных молекул ФС. Этот вывод подтверждается отсутствием в наблюдаемом сигнале ЗФ вклада от ТТА, которая у связанных люминофоров и должна быть полностью «выключена» [10]. О различной доступности молекул ФС для кислорода далее пойдёт речь в разделе 4.5.

При малых концентрациях кислорода экспериментально регистрируется ЗФ как связанных белками, так и растворенных в цитозоле молекул красителя, что приводит к другим значениям  $B_2$  и  $B_3$ . Об участии в формировании общего сигнала диффузионноподвижных молекул красителя в цитоплазме свидетельствует заметный вклад ТТА в ЗФ (таблица 3.3).

### **3.6 Взаимодействие молекул-зондов с субстратом**

Влияние окружения на излучательные характеристики зонда также является немаловажным фактором. В литературе достаточно подробно исследована люминесценция зондов в растворах различных белков. Например, в работе [87] исследованы спектрально-люминесцентные характеристики эозина в растворе человеческого сывороточного альбумина при денатурации последнего под действием поверхностно-активного вещества – додецилсульфата натрия. Предложен способ оценки структурных изменений белка по изменениям в спектрах поглощения и флуоресценции зонда, связанного с ним. Характеристики свечения эозина заметно меняются при добавлении белка: максимум флуоресценции зонда при этом смещается в сторону более длинных волн. Это может свидетельствовать об изменении микроокружения молекул эозина при переходе от полярной водной среды к менее полярной гидрофобной белковой глобуле. Константа скорости дезактивации триплетных состояний эозина уменьшается при переходе от водного раствора ( $1300 \text{ с}^{-1}$ ) к раствору сывороточного альбумина ( $320 \text{ с}^{-1}$ ). Это означает, что при

связывании с белком у молекул зонда ограничивается поступательная и вращательная подвижность, что приводит к уменьшению вероятности безызлучательной дезактивации энергии электронного возбуждения. Под действием поверхностно-активных веществ белки альбумина денатурируют. Увеличение концентрации ПАВ в растворе приводит к увеличению константы скорости дезактивации триплетных состояний – ФФ. В спектрах поглощения максимум испытывает коротковолновый сдвиг от 529 до 516 нм. Когда вероятность контакта молекул эозина с молекулами воды увеличивается, увеличивается и вероятность тушения триплетных состояний растворённым в воде кислородом. Изменение рН раствора приводит к изменению заряда, распределенного в глобуле белка. С увеличением рН раствора время жизни триплетных состояний эозина возрастает. Максимум спектра поглощения не изменяется с изменением рН от 6,6 до 8,0. Следовательно, зависимость не может быть обусловлена степенью ионизации заряженных молекул в результате изменения рН раствора.

В статье [78] приведены результаты исследования спектральных характеристик водных растворов различных порфиринов. В присутствии липидных везикул фосфатидилхолина время жизни триплетных состояний порфирина уменьшилось на воздухе от 2,8 до 1,2 мкс. При добавлении белка (человеческий сывороточный альбумин) время жизни люминесценции увеличилось до 60 мкс. Увеличение скорости тушения триплетных состояний молекул ФС кислородом в липидных везикулах может быть обусловлено лучшей растворимостью кислорода в липидах, чем в воде. С другой стороны, уменьшение примерно в двадцать раз константы скорости тушения триплетных состояний в белковых суспензиях можно объяснить связыванием красителя с белком, в результате чего создается препятствие для диффузионного тушения сенсбилизатора молекулами кислорода. При увеличении концентрации сывороточного альбумина в растворе спектральные характеристики ФС постепенно менялись, что проявилось в сдвиге максимума испускания ФС на 2 – 3 нм в коротковолновую область. Это свидетельствует об образова-

нии комплексов красителя с белком. Параллельно с увеличением концентрации белка наблюдался рост квантового выхода свечения, т.е. белок создает экранирующий эффект для главного тушителя люминесценции – кислорода. При удалении кислорода из раствора (при пропускании через него потока газообразного азота) наблюдалось значительное увеличение квантового выхода и продолжительности ФФ. Также авторами [78] не наблюдалось каких-либо признаков ТТА, следовательно, в белковых растворах молекулы красителя неподвижны. При многократном облучении закрытой кюветы наблюдалось увеличение ФФ, что указывало, что тушитель (кислород) необратимо связывается с белком. Авторы отвергают возможность какого-либо физического переноса энергии возбуждения между ароматическими хромофорами белка и ФС. Кроме того, в эксперименте с триптофан-содержащими белками интенсивность их люминесценция уменьшалась, что, возможно, вызвано взаимодействием белка с СК.

Хорошая агрегация ксантеновых красителей с белками является наиболее вероятной причиной малого вклада ТТА в наблюдаемой кинетике ЗФ. Длительность затухания долгоживущей компоненты ЗФ и ФФ (см. рисунок 3.4) в тканях составляет сотни микросекунд, т.к. скорость затухания порядка  $10^4 \text{ с}^{-1}$ . Это может объясняться нахождением некоторой доли молекул красителя в связанном состоянии, возможно, даже недоступном для кислорода. Агрегация некоторой части ФС с белками влияет на люминесценцию красителя в целом. При этом в опухолях (при высоком накоплении ФС плюс высокой продукции белков) влияние окружения на излучательные характеристики зонда выше, чем в соответствующих здоровых тканях. Это подтверждается спектроскопическими данными [А3, А6]. На рисунке 3.8а показаны спектры флуоресценции эритрозина в молочной железе мыши (зелёным цветом – в здоровой, красным – в злокачественной опухоли), а также спектр водного раствора эритрозина, использовавшегося для окрашивания.

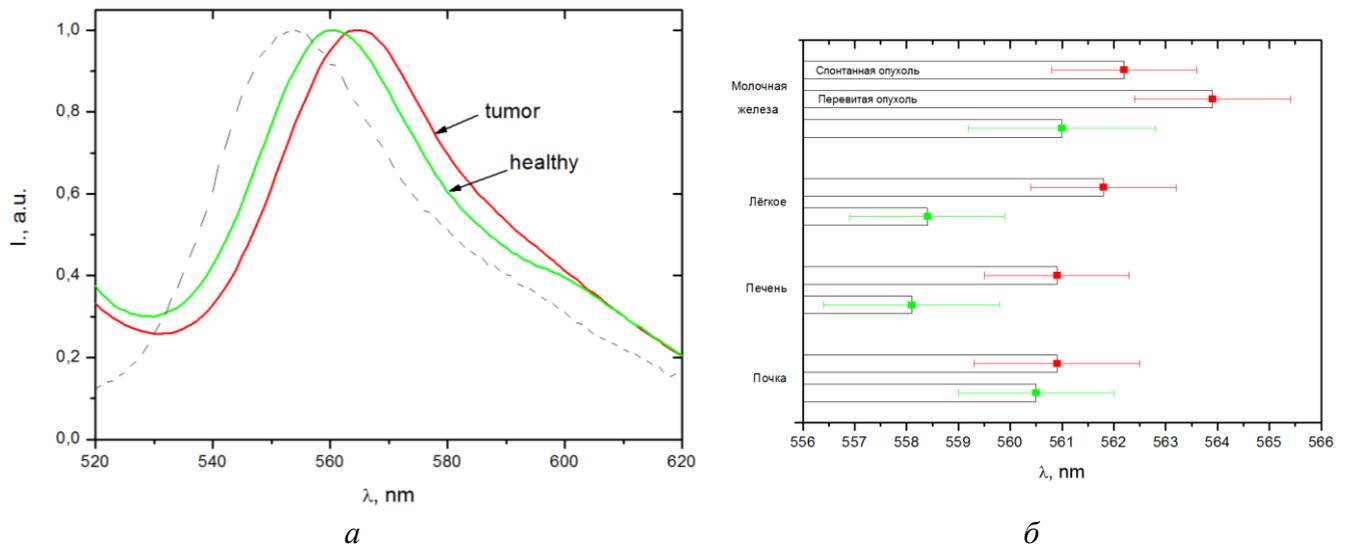


Рисунок 3.8 – а – спектры флуоресценции эритрозина в опухоли и здоровой ткани молочной железы мышей. Пунктиром показан спектр водного раствора эритрозина  $10^{-3}$  М; б – усреднённые максимумы спектров флуоресценции эритрозина в различных тканях мышей

Видно, что эти спектры не совпадают: максимумы испускания зонда в биологических тканях смещены в длинноволновую область. Заметим, что сдвиг максимума в опухоли, относительно водного раствора, почти вдвое больше, чем в здоровой ткани. Из рисунка 3.8б видно, что данная особенность спектров распространяется и на другие ткани здоровых и больных животных.

Различия спектральных характеристик зондов в нормальных и изменённых патологией тканях могут быть обусловлены тем, что при патологических процессах (воспаление, аллергия, опухоль) в силу ускоренного обмена веществ ткани способны избыточно накапливать краситель [30–33]. Важно отметить, что эффект СТЗФ с большей частотой регистрируется в тканях больных животных, что коррелирует с красным сдвигом. По-видимому, свечение зонда зависит в большей степени не от анатомо-морфологических, а от функционально-биохимических характеристик тканей, подвергающихся изменениям при патологических процессах в первую очередь и в значительно большей степени, вне зависимости от типа ткани. Именно от функционального состояния ткани зависят микропараметры среды,

в которой расположен ФС. А от них, в свою очередь, зависят и накопление ФС, и степень его связывания субстратом.

Таким образом, наличие подвижного кислорода оказывает сильное влияние на характеристики затухания длительной люминесценции зондов в тканях. При искусственном снижении уровня кислорода в атмосфере над образцами наиболее кардинально изменяется ЗФ, которая главным образом формируется за счет СТА. При изучении особенностей АЗФ в небиологических системах обычно не рассматривают какие-либо реакции с поглощением СК, изменение ЗФ происходит за счет миграции кислорода. Однако биологические ткани обладают специфической реакцией на наличие в них СК, который способен связываться с субстратом, запуская целый каскад реакций, известный как фотодинамический эффект [93, 94]. Поэтому в тканях неизбежно должно происходить поглощение некоторой доли образуемого СК, т.е. среда является потребителем СК наряду с триплетными возбуждениями. Поэтому логично ожидать, что сокращение количества кислорода в тканях должно сопровождаться тушением АЗФ.

## **4 Длительная люминесценция зондов в тканях при фотодинамическом действии**

В результате взаимодействия с триплетными возбуждениями фотосенсибилизаторов молекулярный кислород может переходить в синглетное возбужденное состояние. Поскольку химическая активность СК высока, при отсутствии заметной конкуренции со стороны других тушителей он будет активно вступать в химические реакции с субстратом, что особенно явно проявляется в биологических тканях и клетках [30–33, 44–47, 91–94]. Результатом химического тушения СК являются различные продукты окисления, при этом кислород переходит из свободного состояния в связанное. При этом количество свободного кислорода в тканях уменьшается. Локальная дезоксигенация облучаемых тканей может быть достаточно ощутимой в условиях медленного кислородообмена (например, при низкой васкуляризации ткани). Результаты исследования локальной дезоксигенации/оксигенации тканей по кинетике АЗФ представлены в [А1-А24]. Предложены направления практического применения полученных результатов.

### **4.1 Световое тушение замедленной флуоресценции**

При строб-периодическом возбуждении окрашенных тканей мышей лазерными импульсами длительностью 10–15 нс обнаружено изменение кинетики затухания замедленной люминесценции ФС. Если промежуток между импульсами возбуждения больше двух-трех секунд, все кинетические кривые получаются идентичными, изменение характеристик затухания от импульса к импульсу не происходит. Однако при облучении образцов с большей фиксированной частотой (в нашем эксперименте 5–10 Гц) наблюдаемые кривые меняются за первые несколько актов возбуждения: спустя 5 – 7 лазерных импульсов вид кинетики по-

слесвечения уже заметно отличается от первоначального (рисунок 4.1) и сохраняется в дальнейшем (до прекращения возбуждения) [A7-A8].

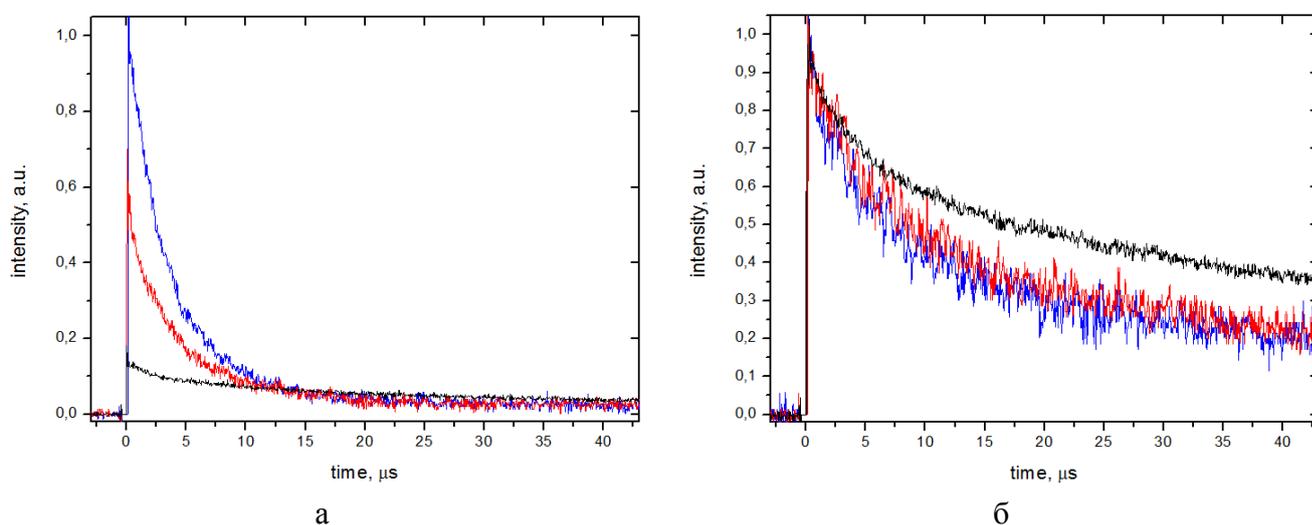


Рисунок 4.1 – Внешний вид кинетики затухания люминесценции 3Ф (а) и ФФ (б) эритрозина в ткани опухоли мыши для первого (синий) и седьмого (красный) импульсов в серии при частоте возбуждения 5 Гц. Чёрным цветом обозначена кинетика затухания того же образца в атмосфере азота

Кинетика 3Ф на ранней стадии (0–10 мкс после возбуждения для эритрозина) испытывает заметное тушение, интегральная интенсивность кинетической кривой седьмого импульса в этой области снижается до 50 - 70 % от интенсивности аналогичного участка первой кинетической кривой. Визуально это сопровождается увеличением времени жизни послесвечения. Если формально считать временем жизни 3Ф промежуток времени, за который интенсивность падает в  $e$  раз, то для окрашенных эритрозином тканей исследованных мышей подобное «время жизни» в среднем увеличивалось от  $2,7 \pm 0,4$  до  $3,5 \pm 0,8$  мкс для опухолей молочной железы.

При рассмотрении поздней кинетики (после 20–30 мкс) можно обнаружить слабый рост интенсивности и продолжительности послесвечения. Если исходить из того, что на промежутке времени 20–40 мкс наблюдаемая 3Ф представлена в основном ТЗФ-составляющей, то среднее значение интегральной интенсивности

ЗФ на данном отрезке растёт приблизительно на 5%. Подобный рост можно отметить на уровне погрешности, так как выход ТЗФ при наличии АЗФ составляющей очень незначителен [А4, А10-2].

При аналогичных условиях возбуждения заметных изменений в кинетике ФФ (очевидно проявляющихся для ранней ЗФ) практически не наблюдается (рисунок 4.1, б). Отмечается лишь незначительное увеличение интенсивности и продолжительности свечения синхронно с ТЗФ (рисунок 4.3). Заметный рост интенсивности ФФ, когда «потушенный» сигнал визуально не пересекался с первоначальным в пределах погрешности, наблюдался в единичных случаях (пример изображён на рисунке 4.2) [А9, А12].

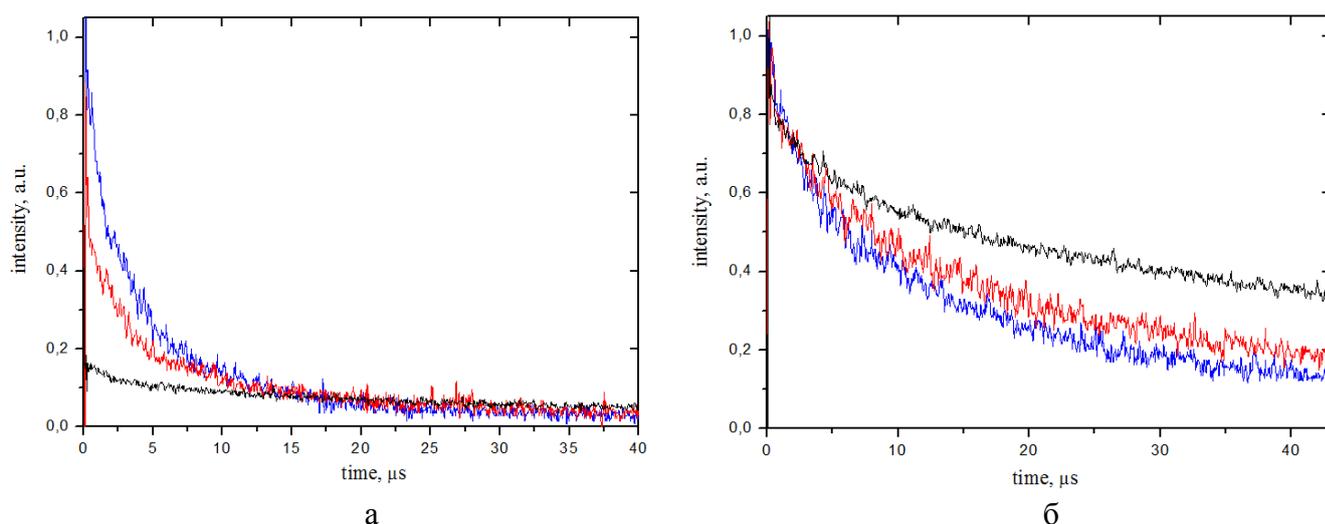


Рисунок 4.2 – Внешний вид кинетики затухания люминесценции ЗФ (а) и ФФ (б) эритрозина в ткани опухоли мышцы для первого (синий) и седьмого (красный) импульсов в серии при частоте возбуждения 5 Гц. Чёрным цветом обозначена кинетика затухания того же образца в атмосфере азота. На рисунке б заметно увеличение интенсивности фосфоресценции.

Одновременно с тушением ЗФ растёт длительность свечения. В таблице 4.1 представлены результаты определения длительности ЗФ эритрозина в опухоли молочной железы мышцы при импульсно-периодическом возбуждении с частотами 5 и 10 Гц.

Таблица 4.1. Продолжительность ЗФ  $\tau$  эритрозина в опухоли молочной железы мыши при импульсно-периодическом возбуждении, мкс

Период возбуждения, сек	Порядковый номер импульса					
	1	2	3	4	7	10
2	2,48 ± 0,05	2,56 ± 0,07	2,50 ± 0,07	2,43 ± 0,08	2,46 ± 0,06	2,58 ± 0,07
0,2	2,54 ± 0,08	2,62 ± 0,06	2,76 ± 0,07	2,85 ± 0,08	2,99 ± 0,08	3,10 ± 0,10
0,1	2,50 ± 0,06	2,98 ± 0,08	3,11 ± 0,07	3,13 ± 0,07	3,17 ± 0,09	3,20 ± 0,08

Описанная трансформация кинетики люминесценции зависит от частоты возбуждения: при увеличении частоты возрастают и скорость, и величина эффекта (рисунок 4.3). Аналогичным образом кинетика ЗФ зависит и от энергии возбуждающих импульсов. При этом следует отметить, что подобные изменения кинетики зарегистрированы для образцов, находившихся в обычной атмосфере. При обескислороживании образцов значительная часть АЗФ тушится, ТЗФ составляющая, наоборот, растет, и достоверно зафиксировать различия в характере затухания свечения не представляется возможным [А7-А10].

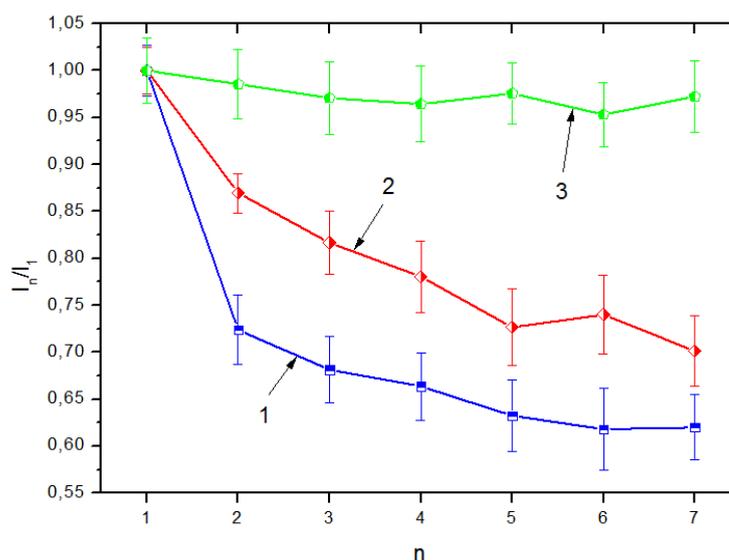


Рисунок 4.3 – Интегральные интенсивности ЗФ эритрозина на участке 1–10 мкс кинетики для первых семи импульсов в серии, период возбуждения 0,1 (1) и 0,2 (2) секунды в опухоли молочной железы мыши, 0,2 секунды в здоровой молочной железе мыши (3)

Так как основные изменения затрагивают кинетику затухания ЗФ, будем в дальнейшем описанный эффект называть **световым тушением замедленной флуоресценции (СТЗФ)**.

СТЗФ наблюдается при злокачественном поражении молочной железы значительно чаще, чем в соответствующих тканях здоровых животных. Аналогичный результат получен и для метастазов изучаемой опухоли в печени мышей, а также для перевитых опухолей (рисунок 4.4) [A14, A23].

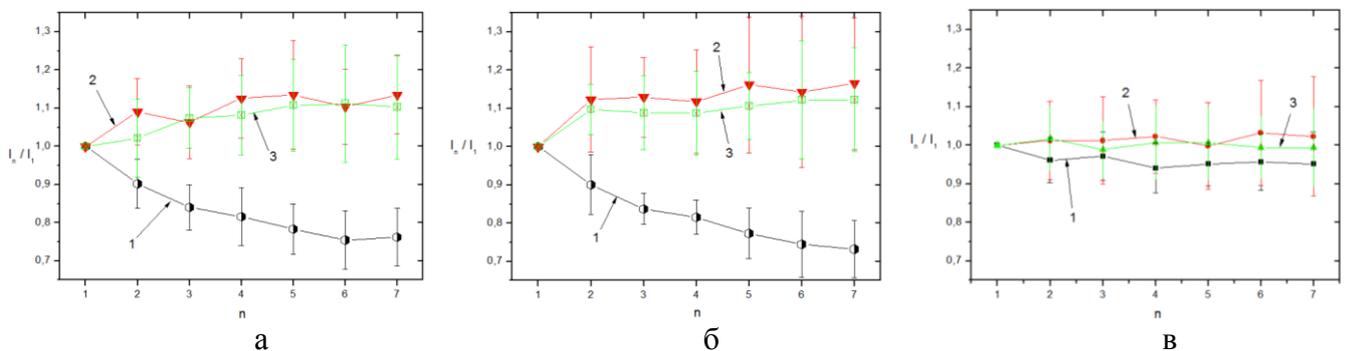


Рисунок 4.4 – Изменение интегральной интенсивности замедленной люминесценции эритрозина в спонтанной опухоли (а), перевитой опухоли (б) и нормальной ткани (в) молочной железы мыши в ходе возбуждения серией импульсов с периодом 0,2 секунды на обычной атмосфере: (1 – чёрный) ЗФ на участке 1–10 мкс (доминирует аннигиляционная ЗФ); (2 – красный) ЗФ на участке 20–40 мкс (доминирует термоактивационная ЗФ); (3 – зелёный) фосфоресценции на участке 20–40 мкс

В таблице 4.2 показаны данные с достоверным тушением ЗФ для различных категорий образцов. Достоверным СТЗФ считались результаты, когда погрешности интегральной интенсивности для первого и пятого импульсов в серии не перекрываются (импульсы следовали с периодом 0,2 с). Анализ полученных данных позволяет сделать вывод о том, что степень выраженности СТЗФ в целом связана с происходящими в ткани патологическими процессами. Для малигнанных образцов СТЗФ вполне можно считать типичным, так как практически в девяти из десяти опухолей наблюдается эффект тушения, в то время как в здоровых образцах молочной железы полностью противоположная картина [A19].

Таблица 4.2 – Количество образцов со статистически достоверно зарегистрированным СТЗФ при импульсно-периодическом облучении с частотой 5 Гц

Вид образца		СТЗФ присутствует	СТЗФ отсутствует	Наличие СТЗФ, %
Молочная железа (норма)		2	15	12
Опухоль молочной железы	Спонтанная	45	6	88
	Перевитая	31	6	84
Легкие	Норма	3	55	5
	Патология	5	17	22
Печень	Норма	20	41	32
	Патология	23	3	88
Почки	Норма	22	37	37
	Патология	14	8	63

Однако для внутренних органов вопрос несколько сложнее. Поскольку статистических данных пока недостаточно, следует говорить о некоторой тенденции для образцов с видимой патологией проявлять более выраженное СТЗФ в сравнении со здоровыми. Данное утверждение, вероятно, распространяется не на все ткани. В лёгких, несмотря на очень хорошее накопление сенсibilизатора и относительно яркую люминесценцию, СТЗФ наблюдалось редко, и заметной корреляции со степенью патологии не отмечалось.

Заметную трансформацию кинетики люминесценции эритрозина в тканях удаётся достичь только во время относительно частого возбуждения (в эксперименте 5–10 Гц). При прекращении возбуждения, либо заметном снижении его частоты, первоначальный вид кинетики затухания свечения восстанавливается в пределах погрешности практически полностью. Так, при возбуждении двумя сериями по 10 импульсов с частотой 5 Гц и паузой между сериями в 5 секунд, картина кинетических кривых от двух серий практически полностью совпадает. Подобный результат исключает какие-либо фотохимические реакции с участием сенсibilизатора, так как количество триплет-возбуждённых молекул сенсibilизатора при таких параметрах возбуждения, судя по интенсивности, остаётся неизменным. К такому же выводу приводят еще два факта. Во-первых, постоянство

концентрации триплет-возбуждённых молекул от импульса к импульсу следует из наблюдения за кинетикой ФФ (рисунок 3.1). В начальный момент времени интенсивность сигнала постоянна для всех измерений в серии, следовательно, количество триплетных возбуждений перед каждым импульсом одинаково. Во-вторых, если бы происходили структурные изменения молекул красителя, возможно, это привело бы к появлению дополнительных полос испускания в наблюдаемом спектре люминесценции эритрозина, чего не наблюдалось для всего спектрального диапазона испускания красителя.

#### **4.2 Роль фотохимических реакций окисления в тушении замедленной флуоресценции**

Если изменений в структуре и количестве триплетных возбуждений не происходит, то СТЗФ следует связывать с другим участником фотореакций в данном временном диапазоне – диффузионно-подвижным молекулярным кислородом. Если в результате фотодинамических процессов в окружении триплетных возбуждений ФС создаётся дефицит подвижного кислорода, вполне естественно полагать, что начинается диффузия кислорода в окрестности молекул сенсibilизатора. Очевидно, в нашем случае скорость диффузии значительно ниже скорости «исчезновения» кислорода, поэтому его натекание становится ощутимым только после прекращения фотодинамических реакций в паузе между двумя последовательными лазерными импульсами. Если в течение этой паузы восстановления его равновесной концентрации вблизи сенсibilизатора не происходит, содержание кислорода, оказывающее влияние на СТА, будет уменьшаться. Чем ниже тканевая концентрация кислорода, тем быстрее его диффузия из атмосферы. На рисунке 4.5 показана аналогия между изменениями в длительной люминесценции при инкубации образцов в азоте и при СТЗФ [A9-A10].

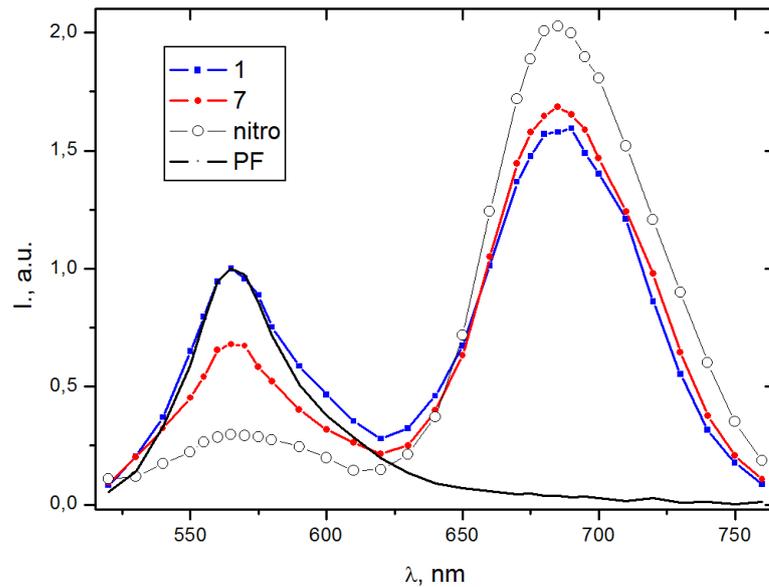


Рисунок 4.5 –Спектры замедленной люминесценции эритрозина в опухоли молочной железы мыши после первого (1) и седьмого (7) возбуждающих импульсов в серии (период возбуждения постоянен и равен 0,2 с) и в атмосфере азота (nitro). Сплошной чёрной линией показан спектр быстрой флуоресценции (PF) эритрозина в том же образце. Значения интенсивностей подсчитывались как площадь под кинетической кривой в диапазоне 1–7 мкс

Когда в ходе периодического возбуждения скорость диффузии возрастает достаточно, чтобы полностью компенсировать поглощённый СК за один импульс, картина тушения выходит на стационарный режим (насыщение). При этом кинетические кривые люминесценции при фиксированной частоте не изменяются. Увеличение промежутка между возбуждающими импульсами будет способствовать всё более полному восстановлению равновесной (начальной) концентрации кислорода в ткани. СТЗФ при этом ослабевает (рисунок 4.2). По достижении периода возбуждения порядка нескольких секунд СТЗФ не регистрируется при неизменных значениях длительности и энергии лазерного импульса [A12].

Убывание концентрации подвижного кислорода в процессе периодического возбуждения происходит, очевидно, за счёт реакций СК с окружением. Согласно накопленным экспериментальным данным, образование СК в ткани происходит в

результате тушения молекулярным кислородом триплетных возбуждений ФС. Возможны следующие каналы релаксации СК:

1) Учитывая высокую химическую активность синглетной формы кислорода, в первую очередь следует ожидать участие СК в окислительных реакциях (так называемое химическое тушение СК) [142, 147]. Результатом такого процесса является необратимое ковалентное связывание изначально подвижного свободного кислорода. Спектр внутритканевых соединений, потенциально способных выступить в роли тушителя, очень широк. Основными мишенями для СК в тканях могут выступать липиды (главным образом ненасыщенные жирные кислоты) [140], нуклеозиды (гуанозин и тимоидин), аминокислоты (особенно серосодержащие – триптофан, гистидин, цистеин, метионин, аланин и др.) [141] и ряд других соединений [38, 39, 91]. Есть данные, что на окисление белков может расходоваться до 70 % образуемого в ткани СК [33]. Реакции с участием СК являются основой для фотодинамической терапии [30–32]. Вероятность окисления белков связана со степенью денатурации и (или) агрегации последних. Отличительной особенностью химического тушения СК является появление в среде продуктов окисления [44], всегда обнаруживаемых в окрашенных образцах после светового облучения. Таким образом, образование в ткани СК само по себе предполагает и параллельное протекание реакций с окислением тканевых компонентов. При этом содержание кислорода, участвующего в реакциях СТА будет убывать. Учитывая, что концентрация тушителей в ткани значительно превышает концентрацию кислорода (составляющую лишь несколько процентов от атмосферной), можно считать, что содержание тушителя при реакциях окисления остаётся неизменным, и скорость убывания  $O_2$  пропорциональна только количеству СК. Сокращение количества участвующего в фотодинамических реакциях подвижного кислорода является одной из проблем фотодинамической терапии [73]. Для решения этой проблемы предлагаются различные варианты, например, гипербарическое насыщение опухолей кислородом с целью повышения эффективности лечения [40, 92].

2) Если молекула СК встречает на пути другую триплет-возбуждённую молекулу сенсibilизатора, может произойти реакция СТА, с высокой вероятностью заканчивающаяся излучением кванта ЗФ. Важно, что этот процесс доступен прямому наблюдению в видимой области спектра и может использоваться для отслеживания активности СК в тканях. Регистрировать ЗФ в режиме реального времени значительно удобнее, чем искать следы связывания СК с субстратом *post factum*. АЗФ сильно зависит от концентрации триплетных возбуждений ФС, так как для одной реакции СТА требуются по крайней мере две молекулы ФС в триплетном состоянии. В этом смысле СТА является более «прожорливым» потребителем триплетных возбуждений, чем ТЗФ или ФФ. В какой-то момент плотность триплет-возбуждённых молекул ФС в ткани снижается настолько, что вероятность найти пару СК для кросс-аннигиляции практически стремится к нулю. Согласно полученным нами данным в тканях на обычной атмосфере это происходит приблизительно через 10 мкс после возбуждения. Помимо плотности молекул ФС в триплетном состоянии сильное влияние на АЗФ оказывает величина пробега СК в ткани. За собственное время жизни (десятки или сотни наносекунд в тканях и клетках) СК успевает мигрировать на расстояния от нескольких десятков, до сотен нанометров [57–59]. Это вполне соответствует размерам компартментов животных клеток и даже межклеточным расстояниям в эпителиальных тканях, характерные размеры которых – сотни нанометров. С другой стороны, скорость СТА пропорциональна концентрации СК в первой степени, как и описанное выше химическое тушение, поэтому можно говорить о конкуренции этих процессов в первые микросекунды после возбуждения. Однако, в отличие от необратимых химических реакций, СТА не приводит к уменьшению содержания подвижного кислорода в ткани. Вообще сам факт достоверного наблюдения АЗФ в живых тканях может показаться удивительным, так как в литературе основное внимание обычно уделяют фотодинамическому окислению субстрата и, казалось бы, лишают СК возможности участия в иных процессах.

3) Возможно физическое тушение СК, в результате которого восстанавливается молекулярный кислород в основном (триплетном) состоянии. На основании вышеизложенного вероятность реализации такого сценария в тканях следует считать малой по сравнению с химическим тушением. Количественно о собственной излучательной релаксации СК можно судить по его фосфоресценции в инфракрасной области с максимумом около 1270 нм [45, 46]. Многочисленные опытные данные свидетельствуют о том, что регистрировать данное свечение затруднительно даже в таких относительно простых системах, как полимерные плёнки или суспензии белков. Задача дополнительно осложняется низкой чувствительностью приёмников в инфракрасной области, а также необходимостью их охлаждения. Применение специальных методик, например, счёта фотонов, позволило достоверно зарегистрировать фосфоресценцию СК в культурах клеток [62–70]. В свою очередь, эти технологии предполагают сбор и усреднение большого количества измерений. В случае СТЗФ эффект трансформации кинетики проявляется уже после четырех – пяти возбуждений образца. В таких условиях достоверная оценка представляющих интерес изменений в кинетике СК при использовании указанных методик не представляется возможной [A8].

Можно утверждать, что снижение концентрации свободного подвижного кислорода в ткани происходит в результате химического связывания его синглет-возбуждённой формы с субстратом. Другие потенциально возможные пути (СТА, фосфоресценция СК) ведут к восстановлению кислорода в основном триплетном состоянии, в результате чего он вновь готов выступать в роли тушителя триплетных возбуждений ФС. Для многих модельных объектов (мицелл, белковых суспензий), на которых изучались процессы длительной люминесценции с участием кислорода, считалось, что с повышением концентрации подвижного кислорода в среде интенсивность связанной с ним ЗФ увеличивается. Важное замечание: речь идёт о ситуации, когда концентрация кислорода немного ниже концентрации возбуждаемого сенсбилизатора, в ином случае картина меняется [9, 120]. При уве-

личении выхода АЗФ остальные виды свечения тушатся, поскольку кислород способствует снижению концентрации триплетных возбуждений ФС. Однако эксперимент показывает, что в биологических тканях с относительно высоким содержанием кислорода возможно и обратное: АЗФ тушится при наличии эффективных потребителей СК и небольшой скорости поступления кислорода в ткань. Это приводит к увеличению выхода собственного свечения зонда, что не противоречит известным люминесцентным методам, позволяющим по тушению ФФ (или ТЗФ) судить о росте содержания кислорода в системе [77–84].

Таким образом, в результате тушения возбуждённых триплетных состояний ФС образуется СК. Некоторая его часть химически связывается с тканевыми структурами (предположительно, белками), в результате чего концентрация подвижных молекул кислорода в ткани снижается. Если возбуждение молекул зондов производится в импульсно-периодическом режиме и за интервал времени между последовательными импульсами возбуждения не происходит восстановления равновесной (исходной) концентрации кислорода (за счёт диффузии из атмосферы или кровотока), к следующему акту возбуждения система подходит с меньшим содержанием кислорода и не может обеспечить прежнюю интенсивность АЗФ. Если период времени между возбуждающими импульсами составляет несколько секунд, первоначальная концентрация кислорода в ткани восстанавливается практически полностью. С уменьшением периода между возбуждающими импульсами (вплоть до десятых долей секунды) успевает восполниться лишь часть молекул кислорода. Этим объясняется зависимость СТЗФ от частоты возбуждения. СТЗФ сопровождается увеличением интенсивности конкурирующих каналов излучения – ФФ и ТЗФ [А5, А7].

На основании результатов экспериментальных исследований можно выделить несколько факторов, оказывающих непосредственное влияние на наличие эффекта. В первую очередь, тушение ЗФ может быть связано с большой концентрацией ФС в образце, что предопределяет высокую интенсивность фотодинами-

ческих реакций. Увеличение количества молекул сенсibilизатора в определённом объёме ткани позволяет повысить выход СК и связанного с ним свечения ЗФ. Таким образом, именно в тканях, накапливающих большое количество сенсibilизатора, с высокой вероятностью следует ожидать проявления СТЗФ. Опухолевые ткани являются в этом плане наиболее подходящим и известным примером. Клетки опухолей характеризуются высокой интенсивностью пластических процессов, следовательно, накапливают значительную белковую массу [96, 99, 105]. Белки и полипептиды с одной стороны могут выступать основой для прикрепления сенсibilизатора [141], с другой – выполнять роль тушителя активных форм кислорода. Во-вторых, величина СТЗФ зависит от кислородной проницаемости тканей, или от скорости миграции кислорода в конкретной ткани. Эффективность взаимодействия СК с субстратом также является важным условием для кинетики затухания ЗФ. Восприимчивость белков к окислению зависит от многих физических и химических факторов, важным из которых является конформация макромолекулы – денатурированная или скрученная. В опухолях более высокое содержание частично денатурированных белковых молекул, чем в норме [53, 54]. В развёрнутой форме наиболее уязвимы полипептиды, серосодержащие аминокислоты триптофан, гистидин, цистеин, метионин, аланин и др., которые гораздо доступнее для окисляющих агентов - скорость окисления в них в 5 – 10 раз выше по сравнению с нативным белком [52, 141]. Подвергнутые деструкции в результате биохимических перестроек в злокачественных клетках белки более чувствительны к окислительным агентам, что в совокупности с высоким накоплением сенсibilизатора делает опухоли эффективными потребителями СК [149-150].

### **4.3 Флуоресцентная дозиметрия в фотодинамической терапии**

Механизм фототоксичности, приводящий к гибели клеток, основывается на окислении с помощью активных радикалов базовых клеточных компонентов, по-

вреждении сосудов и/или воспалительной реакции, а также потере ответной реакции опухоли [30, 31, 91–93, 133]. Проблема дозиметрии в ходе процедуры ФДТ является одной из ключевых для успешного лечения: клетки здоровых тканей также подвержены фотодинамическому действию, поэтому эффективная доза во время сеанса ФДТ должна быть контролируемо ограничена [А4, А11-7, 143]. В литературе предложены прямые и косвенные методы дозиметрии [135].

Прямые методы оценки эффективности ФДТ основаны на регистрации фосфоресценции СК [44–46, 63–66, 136–140], интенсивность которой пропорциональна концентрации СК в ткани. К сожалению, они имеют ограниченные возможности из-за низкого квантового выхода свечения и малой эффективности фотоприемников в ближнем ИК-диапазоне.

Среди косвенных методов дозиметрии выделяют использование особых молекулярных зондов-индикаторов [89, 90], фотофизические свойства которых меняются в ходе химических реакций с СК. Эти изменения можно регистрировать в удобном оптическом диапазоне и оценивать количество произведенных активных форм кислорода. Однако применение таких зондов также не решает проблему полностью. Индикаторы выводят часть АФК из целевого процесса ФДТ. Кроме того, часто локализация таких зондов в клетке не совпадает с локализацией ФС, и поэтому реакция зонда не вполне соответствует произведенному фотодинамическому действию.

Косвенно оценить количество произведенного синглетного кислорода можно вычислительным путем [10, 120], имея в распоряжении табулированные кривые замедленной флуоресценции и фосфоресценции ФС, которые можно наблюдать во время сеанса ФДТ при импульсном лазерном возбуждении. В этой методике не требуется регистрировать слабое ИК свечение  $^1\text{O}_2$  или использовать дополнительные реагенты с отдельным измерением их характеристик. Однако для расчетов требуется значительное время и поэтому использовать такую методику непосредственно во время лечения затруднительно. Кроме того, для количествен-

ной оценки количества произведенного  $^1\text{O}_2$  требуется знать концентрацию фотосенсибилизатора в клетке и другие параметры, что не всегда возможно. Наконец, в модельных расчетах [8, 9, 119] из-за трудностей математической обработки предполагается лишь один тип локализации красителя в клетке, что не всегда соответствует действительности.

По этим причинам упомянутые методы пока не нашли широкого применения в клинической практике, и поиск новых эффективных методик дозиметрии в ФДТ остается актуальным.

Используя СТЗФ, можно предложить следующий альтернативный способ флуоресцентной дозиметрии в ФДТ [А3, А4]. Эффективность фотодинамического действия, вызванного коротким одиночным лазерным импульсом, можно оценить

$$\Delta E = Q \int_{\tau} n_{\Delta}(t) dt$$

где  $E$  – масса окисленного содержимого,  $Q$  – размерный коэффициент,  $n_{\Delta}(t)$  – концентрация СК,  $\tau$  – время жизни СК. Предполагается, что концентрация мишеней для окисления остается неизменной. Если обозначить через массу содержимого, окисленного следующим импульсом, то выражение даёт изменение эффективности фотодинамического действия во время импульсной последовательности, применяемой при ФДТ. Учитывая, что в ткани возможны различные локализации ФС, в том числе и недоступные для подвижного кислорода, то с учётом (1.5)

$$\Delta E = Q \int_{\Delta t} [n_{\Delta}(t) - n_{\Delta}^*(t)] dt = \frac{Q}{A_1 \Delta t} \int \frac{I_{DF}(t) - I_{DF}^*(t)}{n_T^L(t)} dt \quad (4.1)$$

где  $n_T^L(t)$  – концентрация триплетных возбуждений, локализованных в недоступных для кислорода областях. Звёздочкой помечены концентрация СК и интенсивность ЗФ, соответствующие второму импульсу возбуждения. Выражение (4.1) не даёт непосредственного значения эффективности процесса ФДТ, однако из него видно, что, наблюдая за разницей  $I_{DF}(t) - I_{DF}^*(t)$ , можно судить о влиянии пара-

метров облучения (энергия и частота возбуждений) на эффективность лечения. Таким образом, использование явления СТЗФ в ФДТ может оказаться продуктивным: так как измерение не представляет технических трудностей, а предлагаемая методика даёт возможность оценки эффективности лечения непосредственно во время сеанса [А4].

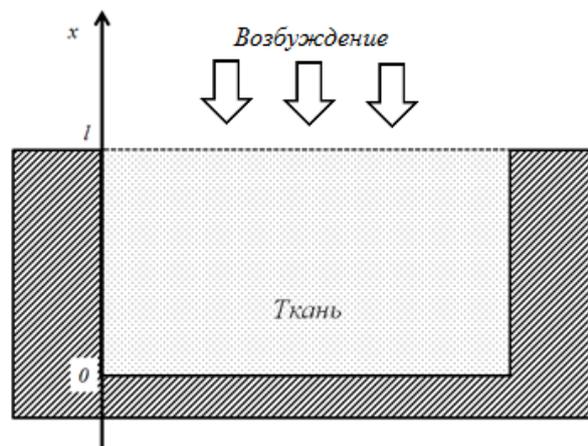
При облучении окрашенных тканей снижение уровня кислорода в них происходит относительно быстро, о чём свидетельствует СТЗФ. Дезоксигенация тканей может ощутимо снизить эффективность лечения, причём данная проблема актуальна не только для ФДТ, но и, например, при лучевой терапии [67, 73, 91]. Решить данную проблему можно, например, путём форсированной подачи кислорода извне. В работе [40] было показано, что гипербарическое кислородное насыщение опухолей действительно увеличивает эффективность ФДТ, при этом данный подход позволяет дополнительно увеличить концентрацию кислорода и в гипоксичных областях опухоли. Также СТЗФ показывает, что при непрерывном облучении (или при частом импульсно-периодическом) тканей количество производимого СК снижается (см. рисунок 4.3). Показано, при фракционированной доставке света к облучаемым тканям также можно добиться увеличения эффективности ФДТ [91–94, 123]. Используя СТЗФ, можно правильно скорректировать параметры облучения, постоянно поддерживая высокий темп образования СК при периодическом возбуждении [А13-6].

#### **4.4 Диффузионно-кинетическая модель светового тушения замедленной флуоресценции**

Для математического описания процессов фотосенсибилизации и химического расходования СК необходимо воспользоваться такими кинетическими моделями, которые должны включать, помимо констант скоростей фотопроцессов, также и диффузионные операторы. Модели образования и расходования СК в си-

стеме с неподвижными триплетными центрами хорошо известны [9, 120], однако в них не учитывалось, что СК может необратимо связываться с некоторыми компонентами систем, т.е. взаимодействовать не только с триплетными центрами [119, 120]. Кроме того, требуется учитывать диффузию самого кислорода. Важным показателем в этом смысле является скорость восстановления содержания кислорода в исследуемой ткани после химического связывания некоторой доли активного кислорода. Вводимые коэффициенты диффузии в нашей модели имеют смысл средних значений для всего объёма ткани. В дальнейшем это будет касаться всех упоминаемых величин: мы будем рассматривать биологическую ткань в приближении *однородной* среды.

Так как исследования проводились *in vitro*, то равновесная концентрация кислорода в ткани может восстановиться только за счёт его поступления из атмосферы над образцом. Исходя из геометрии эксперимента, образец жёстко закреплялся в камере таким образом, чтобы возбуждение производилось фронтально к образцу, как показано на рисунке.



Выбирая направление оси  $Ox$  перпендикулярно поверхности образца, можно рассматривать только фронтальную диффузию вдоль этой оси. Поверхность образца, имеющая координату  $x = l$ , где  $l$  – толщина образца, является, таким образом, источником кислорода для всей ткани: верхние слои, примыкающие к по-

верхности, будут насыщаться им быстрее. Через подложку  $x = 0$  и боковые стенки диффузия не происходит.

Система уравнений, в которых учтено движение кислорода в результате диффузии и его расходование в ходе фотодинамических процессов, имеет следующий вид [A2]:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial n_T(x,t)}{\partial t} = -\left( \frac{1}{\tau_T} + k_{\Sigma T} n_{\Sigma}(x,t) + k_{\Delta T} n_{\Delta}(x,t) \right) n_T(x,t) \\ \frac{\partial n_{\Sigma}(x,t)}{\partial t} = D_{\Sigma} \frac{\partial^2 n_{\Sigma}(x,t)}{\partial x^2} + k_{\Delta T} n_{\Delta}(x,t) n_T(x,t) + \frac{1}{\tau_{\Delta}} n_{\Delta}(x,t) - k_{\Sigma T} n_{\Sigma}(x,t) n_T(x,t) \\ \frac{\partial n_{\Delta}(x,t)}{\partial t} = D_{\Delta} \frac{\partial^2 n_{\Delta}(x,t)}{\partial x^2} + k_{\Sigma T} n_{\Sigma}(x,t) n_T(x,t) - \frac{1}{\tau_{\Delta}} n_{\Delta}(x,t) - \\ - k_{\Delta T} n_{\Delta}(x,t) n_T(x,t) - k_{\Delta q} n_{\Delta}(x,t) n_q(x,t) \\ \frac{\partial n_q(x,t)}{\partial t} = D_q \frac{\partial^2 n_q(x,t)}{\partial x^2} - k_{\Delta q} n_{\Delta}(x,t) n_q(x,t) \end{array} \right. \quad (4.2)$$

где  $n_T$ ,  $n_{\Sigma}$ ,  $n_{\Delta}$ ,  $n_q$  – концентрации триплетных возбуждений ФС, невозбуждённого триплетного и возбуждённого СК, а также химического тушителя соответственно;  $n_T^0(x)$  – сложившееся после возбуждения начальное распределение молекул красителя в триплетном состоянии по толщине образца;  $D_{\Sigma}$ ,  $D_{\Delta}$ ,  $D_q$  – коэффициенты диффузии для обоих типов кислорода, а также химического тушителя;  $\tau_T$ ,  $\tau_{\Delta}$  – времена жизни возбуждённого триплетного состояния красителя и СК;  $k_{\Sigma T}$  – константа скорости образования СК,  $k_{\Delta T}$  – константа скорости СТА,  $k_{\Delta q}$  – константа скорости химического (необратимого) тушения СК.

В общем случае получить аналитическое решение системы (4.2) крайне сложно, так как она включает диффузионные операторы на фоне формально кинетической задачи. Однако в соответствии с экспериментальными данными скорость протекания фотодинамических процессов на несколько порядков превышает скорость диффузионного натекания кислорода к молекулам сенсibilизатора. Активность СК, за счёт которого происходит потребление кислорода, наблюдается

ся в течение очень короткого промежутка времени (после возбуждения порядка  $10^{-5}$  с) по отношению к периоду возбуждения ( $10^{-1}$  с). Характерные времена образования и расходования СК пренебрежимо малы по сравнению с временами, за которые происходит заметное восстановление исходной концентрации кислорода в ткани. Поэтому решать задачу (4.2) можно, разделив её на «диффузионную» и «кинетическую» части, которые будут решаться независимо. Если «кинетическая» задача, фактически представляющая собой задачу (4.2) без диффузионных операторов, ставится для короткого промежутка (длительностью  $\theta$ ) сразу после возбуждения, то «диффузионная» охватывает время от  $\theta$  до следующего возбуждающего импульса. В течение времени  $\theta$  кислород в системе *только потребляется* – происходит образование и тушение СК. Всё оставшееся время между двумя возбуждающими импульсами продолжительностью  $T - \theta$  содержание кислорода *только растёт* – данная задача задаётся одномерным уравнением диффузии в замкнутой области, в которой поток существует через одну из границ.

Теперь требуется оценить  $\theta$ . За этот промежуток времени все процессы, связанные с СК, прекращаются; в то же время данная величина должна быть достаточно малой, чтобы мы могли пренебречь диффузией. Выше было отмечено, что влияние СТА на кинетику ЗФ не превышает  $10^{-5}$  с после возбуждения (само возбуждение, продолжительность которого имеет порядок  $10^{-8}$  с, будем считать мгновенным). Поэтому мы можем вполне ограничиться рассмотрением процессов с участием СК на временах не более  $10^{-5}$  с, всё остальное время «предоставляя» диффузии.

Без диффузионных слагаемых система (4.2) упрощается, однако можно пойти дальше. Во-первых, количество потенциальных соединений, выступающих в роли тушителя СК в тканях, очень велико. Можно вообще считать, что концентрация тушителя  $n_q$  всегда значительно превышает концентрацию СК, в таком случае убыль концентрации тушителя можно не учитывать [145]. Тогда четвертое уравнение в (4.2) сократится, а в третьем уравнении последнее слагаемое предста-

вится как  $-k_q n_\Delta(x, t)$ , где  $k_q$  – некая положительная константа химического тушения. Во-вторых, для задания начального распределения кислорода перед диффузией требуется задание «полной» концентрации кислорода в системе  $n_{ox}$ . Используя очевидное соотношение  $n_\Delta(x, t) + n_\Sigma(x, t) = n_{ox}(x, t)$ , можно переписать второе и третье уравнения. На практике нам потребуется знание функций  $n_{ox}(x, t)$  и  $n_\Delta(x, t)$  для формулирования начальных условий для диффузионной части уравнения. Таким образом, кинетическая часть системы (4.2) для  $t \in ((m-1)T, (m-1)T + \theta)$ , где  $m$  – номер импульса, представляется следующим образом:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial n_T(x, t)}{\partial t} = P(t)n_T^0(x) - \left( \frac{1}{\tau_T} + k_{\Sigma T}n_\Sigma(x, t) + k_{\Delta T}n_\Delta(x, t) \right) n_T(x, t) \\ \frac{\partial n_\Delta(x, t)}{\partial t} = k_{\Sigma T}n_\Sigma(x, t)n_T(x, t) - \frac{1}{\tau_\Delta}n_\Delta(x, t) - k_{\Delta T}n_\Delta(x, t)n_T(x, t) - k_q n_\Delta(x, t) \\ n_\Delta(x, t) + n_\Sigma(x, t) = n_{ox}(x, t) \end{array} \right. \quad 4.3$$

Теперь перейдём к «диффузионной» части. Для  $n_{ox}(x, t)$  в промежутках  $t \in ((m-1)T + \vartheta, mT)$  будет справедливо обычное уравнение диффузии в замкнутой области  $x \in [0, l]$ :

$$\frac{\partial n_{ox}(x, t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 n_{ox}(x, t)}{\partial x^2}$$

где  $D$  – коэффициент диффузии для кислорода. Граничные условия должны быть сформулированы следующим образом. На одной из границ  $x = 0$  переноса вещества не происходит (кислород не диффундирует через подложку), на другой границе  $x = l$  концентрация вещества постоянна (контакт с атмосферой всегда поддерживает равновесную тканевую концентрацию кислорода  $n_{ox}^{tiss}$ ). Получаем:

$$\left. \frac{\partial n_{ox}(x,t)}{\partial x} \right|_{x=0} = 0;$$

$$n_{ox}(l,t) = n_{ox}^{tiss}$$

Решение уравнения диффузии хорошо известно [122]. Аналогичным образом была рассмотрена кинетика диффузионно-контролируемой реакции СТА молекул зонда и кислорода, а также влияние на этот процесс десорбции кислорода через экранирующий слой с дренажными транспортными каналами [119]. В нашем случае после  $m$ -го импульса получим:

$$n_{ox}^m(x,t) = n_{ox}^{tiss} + \frac{4(N_m^D(x) - n_{ox}^{tiss})}{\pi} \sum_{k=0}^{\infty} \left[ \frac{(-1)^k}{2k+1} \cos \frac{(2k+1)\pi x}{2l} \exp \left\{ -\frac{(2k+1)^2 \pi^2 Dt}{4l^2} \right\} \right]$$

где  $N_m^D(x)$  – начальное распределение кислорода для задачи о диффузии после  $m$ -го импульса. Получить величину  $N_m^D(x)$  можно, руководствуясь изложенными выше соображениями:

$$N_m^D(x) = n_{ox}(x, (m-1)T + \theta).$$

Начальным условием для диффузионной задачи является распределение кислорода, возникшее в результате активности СК за характеристическое время  $\theta$  после лазерной вспышки. Это распределение может соответствовать некоторому уменьшению концентрации кислорода в ткани, если коэффициент  $k_q$  положительный. В таком случае поток будет направлен внутрь образца, и будет получено необходимое решение.

Начальное содержание кислорода для кинетической задачи  $N_m$  формулируется из условия:

$$N_m(x) = n_{ox}(x, (m-1)T),$$

т.е. за начальное условие следует считать такое распределение кислорода, с которым система подошла к очередному импульсу. Для  $m = 1$ , очевидно,  $N_1(x) \equiv n_{ox}^{tiss}$ .

Для кинетической задачи (4.3) можно использовать аналогичное решение из [9], в котором следует ввести дополнительно слагаемое, содержащее  $k_q$ . Будем полагать, что фотохимических реакций с участием сенсibilизатора не происходит, и начальное распределение триплетных возбуждений  $N_T(x)$  не меняется от импульса к импульсу. Для произвольного импульса  $m$  получим:

$$n_T^m(x, t) = N_T(x) \exp(-\alpha_m t) \quad (4.4)$$

для триплетных возбуждений и

$$n_{\Delta}^m(x, t) = N_T(x) N_m(x) \exp\left\{-\frac{t}{\tau_{\Delta}} - k_q t - \beta_m(x)[1 - \exp(-\alpha_m t)]\right\} \times$$

$$\times \int_0^t \exp\left\{\left[\left(\frac{1}{\tau_{\Delta}} + k_q - \alpha_m\right)z + \beta_m(x)[1 - \exp(-\alpha_m z)]\right]\right\} dz$$

$$\alpha_m = \frac{1}{\tau_T} + k_{\Sigma T} N_m(x)$$

$$\beta_m(x) = \frac{k_{\Sigma T} + k_{\Delta T}}{\alpha_m} n_T^0(x)$$

для СК. Количество СК, связанного в результате химического тушения, можно оценить как  $\int_0^{\theta} k_q n_{\Delta}(x, \vartheta) d\vartheta$ . Поэтому после  $m$ -го лазерного импульса в системе останется кислорода:

$$n_{ox}(x, (m-1)T + \theta) = n_{ox}^m(x, (m-1)T) - \int_0^{\theta} k_q n_{\Delta}(x, \vartheta) d\vartheta = N_m^D(x)$$

Это и есть начальное распределение кислорода для диффузионной задачи после  $m$ -го импульса.

Кинетику затухания ЗФ и фосфоресценции после  $m$ -го импульса можно записать как:

$$I_{DF}^m(t) = A_1 \int_0^l n_{\Delta}^m(x,t) n_T^m(x,t) dx + A_2 \int_0^l n_T^m(x,t) dx \quad (4.5)$$

$$I_{Phos}^m(t) = A_3 \int_0^l n_T^m(x,t) dx \quad (4.6)$$

где  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  – положительные коэффициенты, учитывающие квантовый выход люминесценции, сечение поглощения и др. Следует помнить, что интегрирование по всей толщине образца означает, что флуоресценция свободно проходит через образец, не испытывая поглощения. Значения параметров, использованные при расчётах, следующие:  $N_T(x) = 10^{-18} \text{ см}^{-3}$ ,  $n_{ox}^{tiss}(x) = 10^{-17} \text{ см}^{-3}$ ,  $\tau_T = 10^{-5} \text{ с}$ ,  $\tau_{\Delta} = 10^{-7} \text{ с}$ ,  $k_{\Sigma T} = 10^3 \text{ с}^{-1}$ ,  $k_{\Delta T} = 10^4 \text{ с}^{-1}$ ,  $\theta = 10^{-5} \text{ с}$ ,  $l = 3 \text{ мм}$ . В ходе компьютерного моделирования кинетики затухания ЗФ и фосфоресценции при периодическом возбуждении в ткани с положительным коэффициентом установлено, что решения демонстрируют заметное тушение ЗФ на начальном участке кинетики. Однако при рассмотрении кинетики замедленной люминесценции в целом, включая ТЗФ и ФФ, расчеты по однородной модели (когда все молекулы ФС имеют равный доступ к подвижному кислороду) расходятся с экспериментом (рисунок 4.6) [A2].

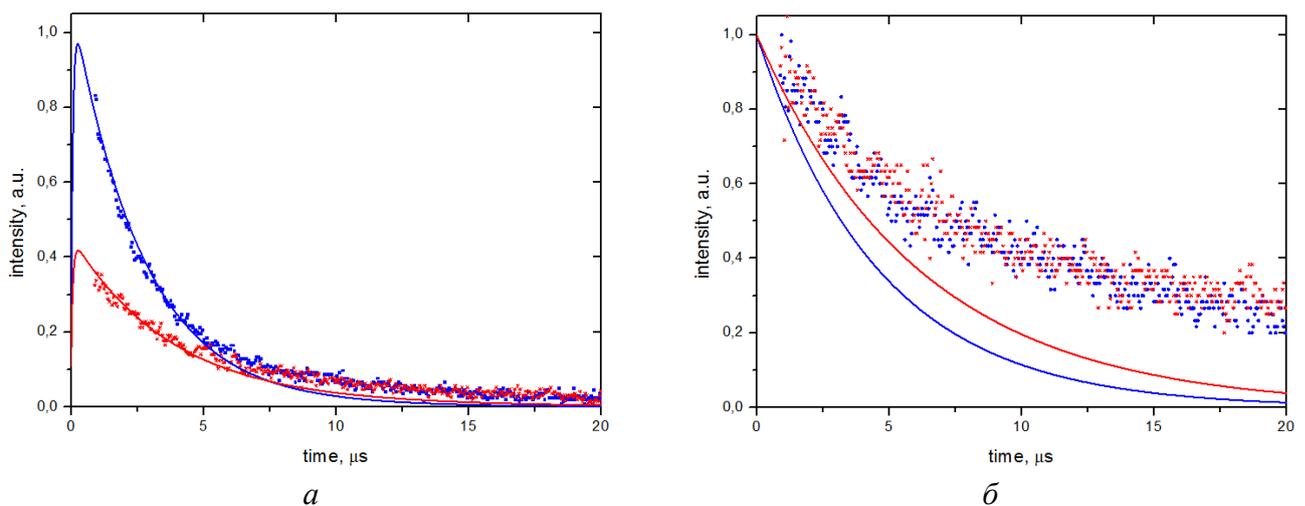


Рисунок 4.6 – Результаты моделирования кинетики затухания замедленной флуоресценции (а) и фосфоресценции (б) эритрозина в опухоли молочной железы мыши без учёта не взаимодействующих с кислородом молекул ФС

#### 4.5 Фосфоресценция при фотодинамической дезоксигенации

При оценке уровня кислорода в ткани по тушению ФФ помещенного в нее зонда априори предполагается, что кислород имеет равный доступ ко всем молекулам ФС. В этом случае описанная выше модель тушения АЗФ хорошо согласуется с опытными данными. В рамках однородной модели реальное время жизни возбужденных триплетных состояний молекул ФС оказывается несколько больше расчетного. Можно предположить, что приведенная модель не вполне учитывает зависимость СТА от плотности триплетных возбуждений: СТА может успешно конкурировать с химическим тушением СК, только когда расстояния между триплетными возбуждениями невелики. С другой стороны, важной особенностью ФФ (ТЗФ) зонда при СТЗФ является несоизмеримо меньшее изменение их интегральных интенсивностей по сравнению с АЗФ (рисунки 4.4, 4.5). В ряде случаев изменения в ТЗФ и ФФ практически не прослеживаются, тогда как тушение АЗФ наблюдается достаточно отчетливо. Возникшие противоречия можно решить при введении следующего предположения.

В биологических тканях может оказаться возможным, что некоторая часть ФС недоступна для кислорода, так как экранируется субстратом. Пребывая в связанном иммобилизованном состоянии, такие молекулы ФС сохраняют способность к длительному послесвечению, формируя в кинетике затухания ФФ (ТЗФ) некую постоянную составляющую. К этой составляющей добавляется свечение доступных для кислорода молекул, которое изменяется при варьировании содержания кислорода в ткани [A2].

С учетом ФС, недоступных для кислорода, выражение (4.4) будет справедливым только для первого слагаемого в (4.5). Для второго слагаемого в (4.5) и в выражении (4.6) для  $n_T^m$  требуется добавить еще одну экспоненту:

$$n_T^m(x, t) = n_T^0(x) \{ B_1 \exp(\alpha_m t) + B_2 \exp(-\gamma t) \}$$

где  $B_1, B_2$  – положительные коэффициенты, определяющие вклад определенного типа ФС (контактирующего или не контактирующего с кислородом),  $\gamma$  – положительная константа. При введении дополнительной долгоживущей компоненты в уравнения для ТЗФ и ФФ результаты расчетов вполне укладываются в экспериментальные кривые (рисунок 4.7).

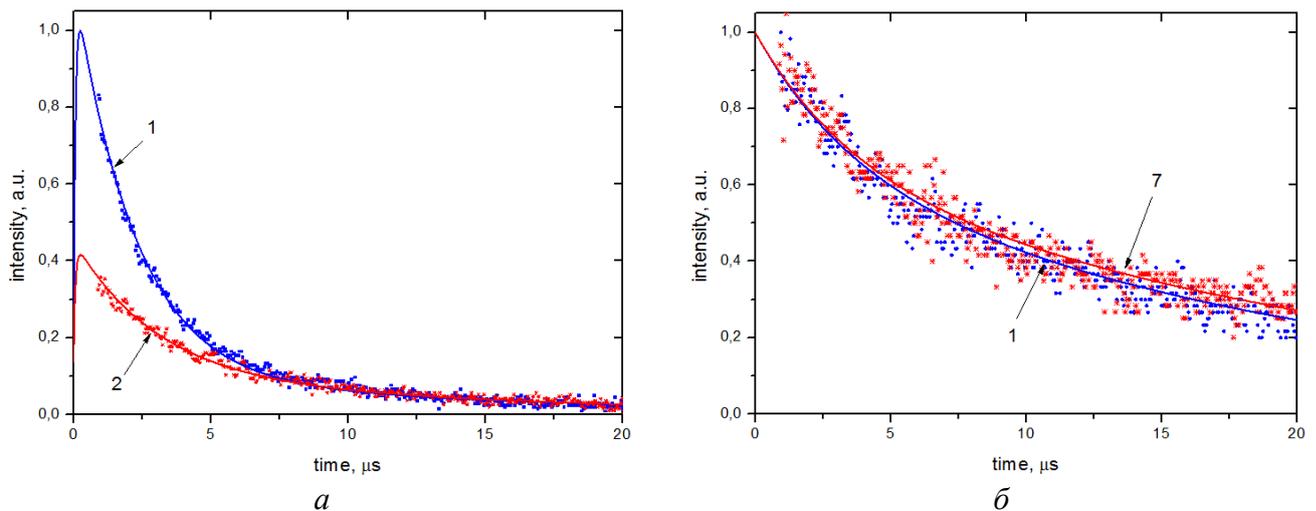


Рисунок 4.7 – Результаты моделирования кинетики затухания замедленной флуоресценции (а) и фосфоресценции (б) эритрозина в опухоли молочной железы мыши с учётом не взаимодействующих с кислородом молекул ФС

Также предлагаемая гипотеза позволяет объяснить, почему при очевидном расходе кислорода в ткани, отражаемом посредством АЗФ, в кинетике ФФ изменений может не наблюдаться. В этом случае подавляющее большинство ФС, доступных для кислорода, тушатся, не успевая дать вклад в свечение ФФ [A18].

К подобным результатам привело и изучение собственного свечения ФС в растворах с белками. Например, в работе [121] изучался водорастворимый сенсibilизатор TPPS<sub>4</sub> в фосфатно-буферных растворах бычьего сывороточного альбумина. Увеличение количества белка в растворе вызывало появление долгоживущей ФФ зонда в области 900 нм. Это сопровождалось наличием долгоживущей компоненты фосфоресценции СК, по продолжительности соответствующей длительной составляющей фосфоресценции ФС. С увеличением содержания альбу-

мина квантовый выход фосфоресценции СК уменьшается, а фосфоресценции ФС – возрастает. Это указывает на то, что альбумин создает для сенсбилизатора экранирующий эффект, затрудняющий взаимодействие ФС с кислородом.

Аналогичные выводы сделаны в работах [75, 76, 78].

Если данное предположение является верным, информативность собственного свечения ФС по отношению к определению уровня оксигенации ткани оказывается ниже, чем предполагалось ранее. В этом смысле оптимальным является использование именно АЗФ в качестве маркера содержания кислорода в ткани. Если способный к свечению ФС имеет пренебрежимо малую константу бимолекулярной реакции СТА, чувствительность его ФФ к уровню кислорода в среде, очевидно, будет выше. Однако в нашем случае константа СТА для ксантовых красителей в тканях велика. Триpletные состояния молекул, потенциально имеющие возможность взаимодействовать с кислородом, быстро тушатся, поэтому чувствительность ФФ таких зондов к уровню оксигенации ткани, несмотря на достаточно яркую и долгоживущую кинетику затухания, невелика [A17-8].

#### **4.7 Визуализация оксигенации тканей *in vitro***

Фотодинамические реакции приводят к дезоксигенации тканей [30, 67]. Молекулы ФС в отсутствие кислорода неэффективны, поэтому доставка кислорода в область облучения и контроль его содержания в тканях представляют собой особую проблему. В настоящее время разработаны несколько способов количественного определения содержания кислорода в ткани. Давление кислорода варьируется в различных областях тканей в широких пределах - от нуля (гипоксические опухоли) до сравнительно высоких показателей (некоторые капилляры). Поэтому определение содержания кислорода на микроуровне на практике является трудноразрешимой задачей.

В условиях *in vivo* кислород проникает в облучаемую ткань из кровеносных сосудов. Следовательно, эффективность фотодинамического действия напрямую зависит от состояния сосудов опухоли [31–33]. Для образцов *in vitro* при отсутствии васкуляризации поступление кислорода возможно только путем простой диффузии из атмосферы. Ранее мы рассматривали в контексте СТЗФ только убывание количества кислорода в тканях. Однако, используя АЗФ, можно визуализировать обратный процесс – диффузионное восстановление содержания кислорода в тканях после СТЗФ [A19, A21]. Воспользуемся тем, что потушенный при данной возбуждающей частоте сигнал АЗФ в течение некоторого времени восстанавливается до исходного уровня после окончания возбуждения. СТЗФ возникает в результате облучения образца серией из одинаковых импульсов, следующих с фиксированной частотой (основная серия возбуждения). Тогда формально первая регистрируемая кривая несёт информацию о начальном содержании кислорода в ткани, тогда как последняя («потушенная» в результате СТЗФ) – о снижении уровня оксигенации (рисунок 4.9).

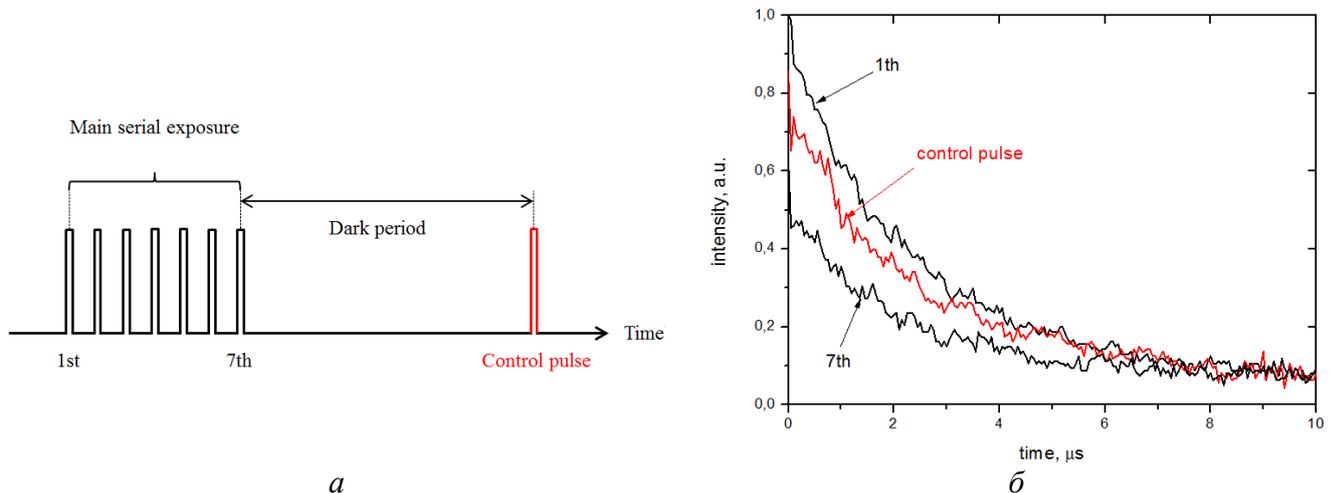


Рисунок 4.8 – Схема эксперимента по наблюдению восстановления интегральной интенсивности АЗФ после серии из 7 импульсов возбуждения с фиксированной частотой (а) и внешний вид затухания кинетики ЗФ после первого и седьмого импульсов основной серии и после контрольного импульса (линия красного цвета) (б)

После окончания основной серии, когда записана последняя кривая затухания ЗФ и возбуждение прекращено (на рисунке 4.8 после 7-го импульса), начинается поступление кислорода в ткань. По мере поступления кислорода интенсивность ЗФ нарастает. С помощью контрольного импульса (выделен красным цветом на рисунке 4.8а), задержанного относительно основного возбуждения на некий «темновой» промежуток времени, можно проверить, насколько интенсивность ЗФ приблизилась к уровню самого первого импульса (рисунок 4.8б). Естественно, чем продолжительнее темновой промежуток, тем выше интенсивность контрольной кривой ЗФ приближается к интенсивности первой кривой основной серии (рисунок 4.9). Регистрируя интегральную интенсивность кинетики на ранней стадии (1 – 10 мкс), соответствующей АЗФ, можно оценить скорость поступления кислорода в ткань после СТЗФ. В результате аппроксимации набора точек одной экспонентой нами получено значение постоянной времени  $3,2 \pm 0,5$  с. На практике для различных тканей разброс величин составляет приблизительно от двух до восьми секунд [A16, A21-2].

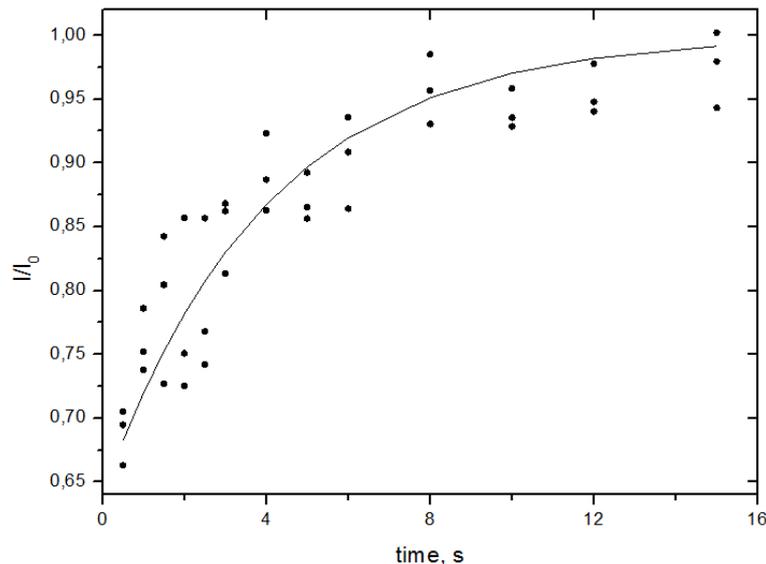


Рисунок 4.9 – Зависимость интегральной интенсивности АЗФ эритрозина после возбуждения контрольным импульсом от продолжительности темнового периода. Интегральная интенсивность АЗФ рассчитывалась по площади под кинетическими кривыми на промежутке 1 – 10 мкс

Полученные результаты свидетельствуют о том, что основное фотодинамическое действие производится в самом начале лазерного облучения, когда в генерации синглетных состояний участвует максимальное число молекул кислорода. В дальнейшем оба фактора – интенсивный расход кислорода в виде его активных форм и медленная диффузия свободного кислорода в области фотореакций – неизбежно приводят к уменьшению концентрации кислорода вблизи молекул сенсibilизатора. Это приводит к ослаблению фотодинамического эффекта, следовательно, снижает продуктивность лечения [А3, А4, А11-5, 144]. Известны методы фракционирования доставки света к опухолям, чтобы обеспечить оксигенацию области облучения и улучшить результаты лечения [91–94, 123].

#### **4.8 Непрерывный контроль кислорода в тканях *in vivo***

Используя соответствие интенсивности АЗФ текущей концентрации свободного кислорода в окрашенной ткани, можно осуществлять непрерывный мониторинг уровня кислорода [А1, А20-4]. На рисунке 4.10 представлен пример такого эксперимента для ткани здоровой мыши *in vivo*. Для удобства эксперимента животное жестко обездвигивалось. В наших экспериментах обнажался фрагмент мышечной ткани на уровне задней лапки. Затем открытая ткань промывалась и окрашивалась несколькими каплями раствора эритрозина  $10^{-3}$  М, после чего закрывалась покровным стеклом для исключения доступа атмосферного воздуха. Возбуждение люминесценции красителя осуществлялось таким же образом, как и в описанных выше экспериментах *in vitro* – с помощью серии лазерных импульсов с фиксированной частотой. В ходе возбуждения для животного создавались условия либо гипоксии, либо гипероксии путём подачи для дыхания на несколько секунд через специальную маску газообразного азота или кислорода соответственно. Таким образом предполагалось искусственно регулировать уровень кислорода в исследуемом фрагменте ткани.

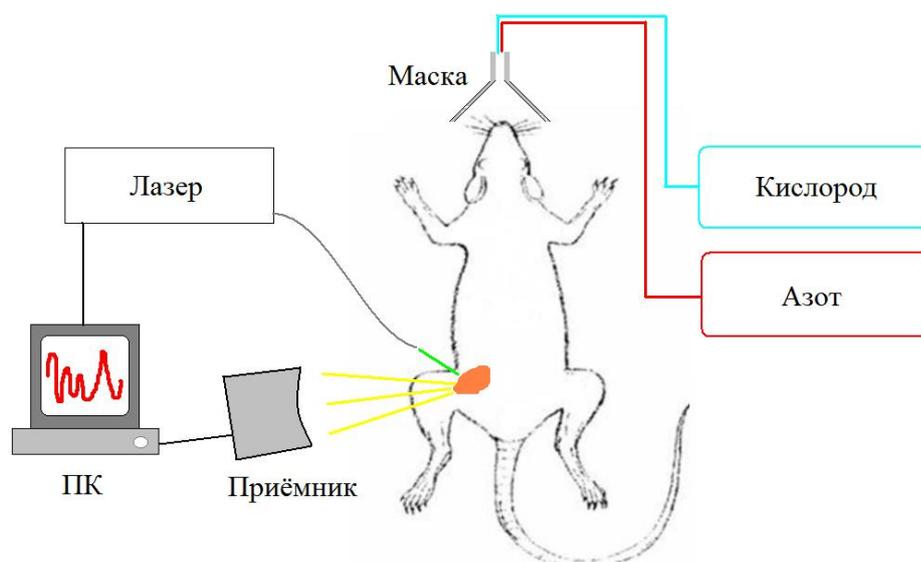


Рисунок 4.10 – Схема эксперимента по мониторингу уровня кислорода во фрагменте мышечной ткани *in vivo* в условиях принудительной гипоксии / гипероксии организма лабораторной мыши

Например, при кратковременном дыхании чистым азотом у подопытной мыши содержание кислорода в окрашенном участке уменьшится, что можно зафиксировать как снижение уровня АЗФ эритрозина.

Важно также учитывать такие возможные изменения сигнала АЗФ, как собственно СТЗФ и фотохимическое выгорание красителя. СТЗФ наблюдается в начале строб-облучения как проявление нарушенного баланса между потребляемым СК и диффузией свободных молекул кислорода в область фотодинамических реакций. Однако экспериментально показано, что даже в тканях, где наблюдается выраженное СТЗФ, в течение 10–20 лазерных импульсов, следующих с частотой 5 Гц, уровень АЗФ стабилизируется. Несколько сложнее с фотообесцвечиванием используемого красителя. Несмотря на относительную фотостабильность эритрозина по сравнению с другими ксантоновыми красителями, в течение нескольких десятков лазерных вспышек наступает естественное снижение люминесцентного сигнала (рисунок 4.11). Мы предполагаем, данное снижение наблюдается не только по причине фотообесцвечивания, но и в связи с миграцией красителя в орга-

низме мыши, так как молекулы красителя, проникая в ткани, разносятся по всему организму с кровотоком.

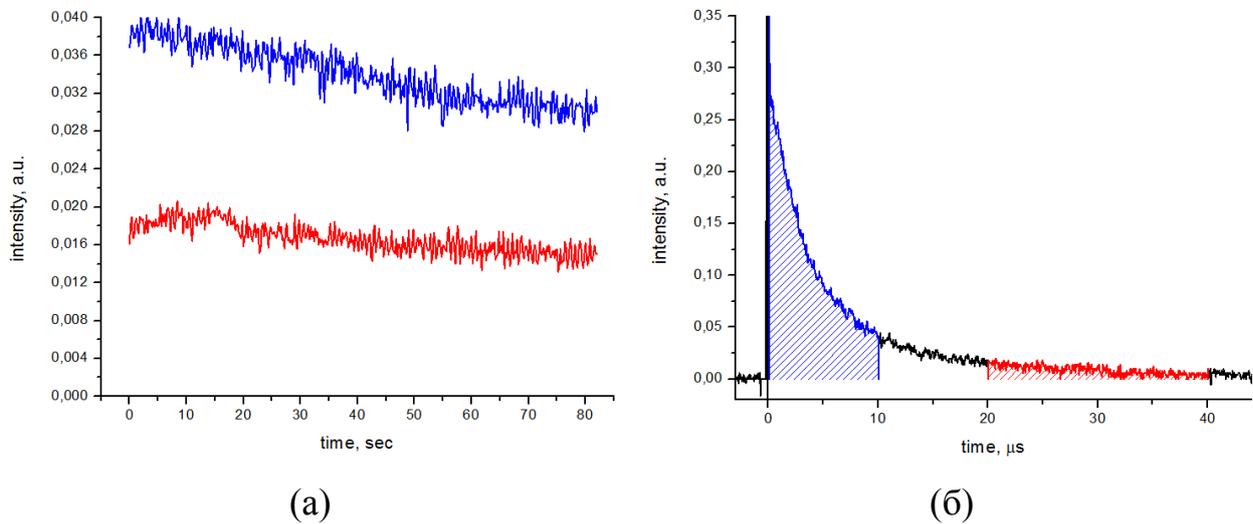


Рисунок 4.11 – (а) Изменение интегральной интенсивности флуоресценции эритрозина при строб-возбуждении фрагмента ткани *in vivo* при частоте 5 Гц на участке 0 – 10 мкс (синий) и 30 – 40 мкс (красный). (б) Площади под кинетической кривой, подсчитываемые при построении рисунков 3.11 – 3.14 и обозначенные соответствующим цветом

Несмотря на упомянутые замечания, для облучаемых мышечных тканей *in vivo* зафиксированы заметные изменения сигнала АЗФ, достоверно связанные с типом дыхательной смеси, подаваемой для подопытного животного. На рисунке 4.12 показано изменение интегральной интенсивности ЗФ эритрозина на участках кинетической кривой 0 – 10 мкс (АЗФ, синий) и 30 – 40 мкс (ТЗФ, красный) при периодической подаче для подопытного животного чистого газообразного азота для дыхания. Обозначены периоды времени, когда осуществлялась подачи азота для дыхания. При подаче азота для дыхания интенсивность АЗФ для облучаемого фрагмента ткани заметно падает. По данным рисунка 4.12 можно судить о том, что ТЗФ незначительно увеличивается в пределах погрешности измерений.

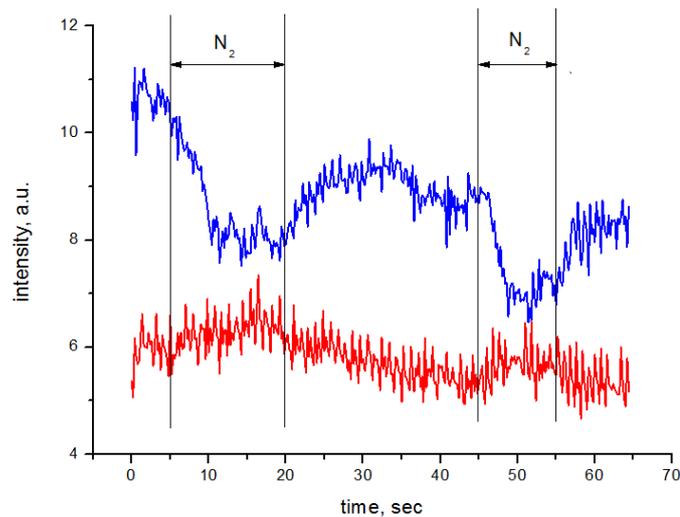


Рисунок 4.12 – Изменение интегральной интенсивности 3Ф эритрозина при строб-возбуждении фрагмента ткани *in vivo* при частоте 5 Гц на участке 0 – 10 мкс (синий) и 30 – 40 мкс (красный) при периодической подаче подопытной мыши чистого азота для дыхания (данные периоды обозначены как  $N_2$ )

Аналогичный результат наблюдается и при обратном эксперименте. При подаче обогащённой кислородом смеси для дыхания выход АЗФ растёт (рисунок 4.13).

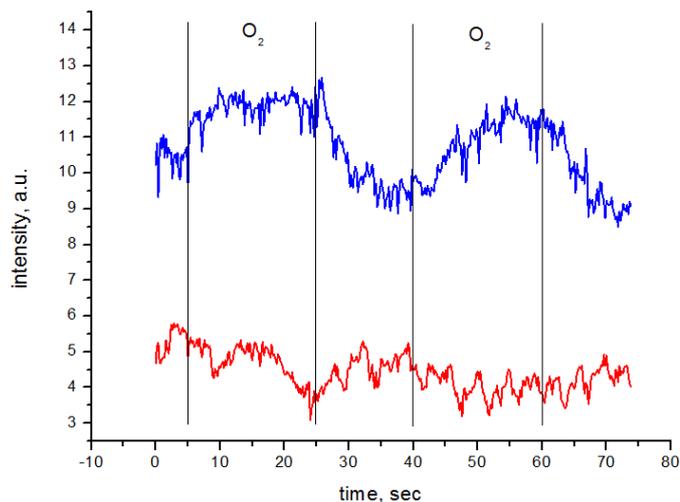


Рисунок 4.13 – Изменение интегральной интенсивности 3Ф эритрозина при строб-возбуждении фрагмента ткани *in vivo* при частоте 5 Гц на участке 0 – 10 мкс (синий) и 30 – 40 мкс (красный) при периодической подаче подопытной мыши чистого кислорода для дыхания (данные периоды обозначены как  $O_2$ )

Через несколько секунд после начала подачи кислорода интенсивность АЗФ выходит на насыщение и не изменяется, пока не отключить подачу кислорода. Это может свидетельствовать о насыщении тканей кислородом. После отключения подачи кислорода примерно через 3 – 5 секунд интенсивность АЗФ восстанавливаются до первоначальных значений. При повторной подаче и отключении кислорода картина изменения интенсивностей ЗФ повторяется. Виден также тренд общего снижения интенсивности свечения. По-видимому, это связано с упомянутыми выше фотохимическим выгоранием красителя и его распределением по организму.

На рисунке 4.14 приведены кривые восстановления интенсивности АЗФ для ткани *in vivo* в сравнении со случаем *in vitro*. По оси абсцисс отложено время задержки контрольного импульса относительно последнего импульса в серии возбуждения (точки получены как среднее от десяти измерений). Как видно из рисунка, восстановление начальной (соответствующей первому импульсу возбуждения) концентрации кислорода из кровотока в условиях *in vivo* происходит за 2 – 3 секунды, т.е. существенно быстрее, чем за счёт диффузии из атмосферы [A20].

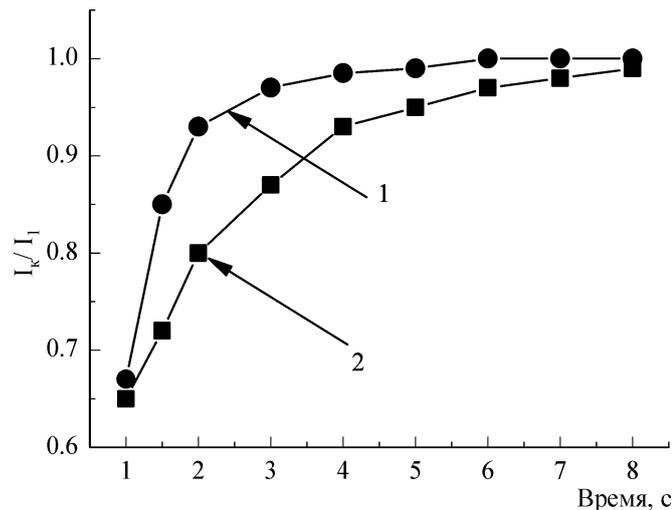


Рисунок 4.14 – Кривые восстановления исходной интенсивности АЗФ после СТЗФ, аналогичные описанным в подразделе 4.7, для ткани *in vivo* (1) и *in vitro* (2)

Мониторинг изменения содержания кислорода в тканях можно осуществлять и по ФФ красителя. На рисунке 4.15 показано изменение интенсивности флуоресценции эритрозина в аналогичном эксперименте. Интенсивность флуоресценции, в отличие от ЗФ, меняется монотонно вне зависимости от временного интервала, на котором вычисляется площадь под кинетической кривой. С ростом концентрации кислорода интенсивность свечения на любом временном интервале уменьшается. Отчетливо видны закономерные изменения интенсивности свечения. Следует отметить, что изменения интенсивности флуоресценции менее выражены, чем у ЗФ, особенно по сравнению с ее аннигиляционной частью [A1, A21].

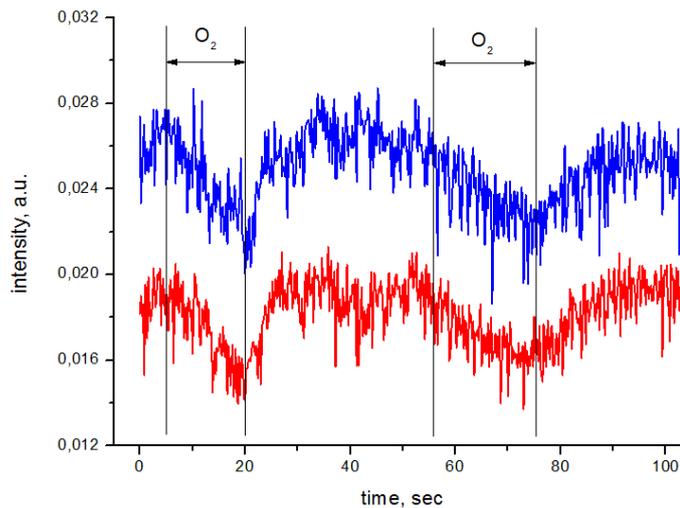


Рисунок 4.15 – Изменение интегральной интенсивности флуоресценции эритрозина при строб-возбуждении фрагмента ткани *in vivo* при частоте 5 Гц на участке 0 – 10 мкс (синий) и 30 – 40 мкс (красный) при периодической подаче подопытной мыши чистого кислорода для дыхания (данные периоды обозначены как  $O_2$ )

## Заключение

1. Установлено, что при нормальных условиях в биологических тканях замедленная флуоресценция анионных ФС представляет собой суперпозицию термоактивированной ЗФ и АЗФ. На ранней стадии (диапазон времени 0 - 10 мкс) кинетика ЗФ ФС в основном определяется процессом синглет-триплетной ( $T_1 + {}^1O_2$ ) аннигиляции. Кинетическая кривая при этом немонотонная, содержит участки нарастания и спада. На более поздних временах (свыше 20 мкс) характер люминесценции изменяется, кинетическая кривая становится экспоненциальной, а ЗФ представляет собой свечение, возникающее за счет термоактивированной обратной  $T_1 \rightarrow S_1$  интеркомбинационной конверсии. Интенсивность АЗФ уменьшается при снижении концентрации кислорода в тканях при неизменной плотности триплетных возбуждений молекул ФС. При этом вклад конкурирующих каналов излучательной релаксации триплетных возбуждений ФС – фосфоресценции и термоактивированной ЗФ, возрастает.

2. Анионные люминесцирующие ФС в тканях находятся преимущественно в иммобилизованном состоянии, поэтому вклад в ЗФ однородной триплет-триплетной аннигиляции  $T_1 + T_1$  молекул ФС, предполагающей диффузию реагентов, пренебрежимо мал.

3. При периодическом возбуждении ФС серией наносекундных лазерных импульсов, в биологических тканях наблюдается тушение АЗФ. Тушение АЗФ обусловлено тем, что убыль синглетного кислорода в тканях в ходе фотодинамических реакций превышает приток кислорода в ткань из кровотока или внешней среды. В результате перед началом каждого последующего импульса исходная концентрация кислорода в ткани оказывается меньшей, чем предыдущего. Уменьшение концентрации кислорода в ткани сопровождается уменьшением интенсивности АЗФ. С ростом частоты следования возбуждающих импульсов эффективность тушения АЗФ возрастает.

4. На примере мышей генетической линии BYRB показано, что эффект тушения АЗФ наблюдается преимущественно в злокачественных опухолях и практически не проявляется в тканях здоровых животных. Тушение АЗФ в тканях с патологией вероятно связано с наличием видоизменённых внутриклеточных структур, повышающих восприимчивость к усвоению СК, а также с большим накоплением ФС. Статистически достоверные различия в характере тушения АЗФ в тканях здоровых и больных животных предложено использовать для оптической диагностики злокачественных новообразований.

5. Для объяснения эффекта тушения АЗФ предложена кинетико-диффузионная модель, учитывающая связывание СК с субстратом в тканях, а также поступление кислорода в ткани из атмосферы.

6. Предложен способ и экспериментально определено *in vitro* и *in vivo* время восстановления исходной концентрации кислорода в тканях после окончания возбуждения. Построены кривые восстановления концентрации кислорода в тканях мышей линии BYRB. Характерное время восстановления исходной концентрации кислорода после окончания импульсно-периодического возбуждения ФС в тканях при нормальных условиях *in vitro* составляет 5 – 7 секунд, в условиях *in vivo* – 2 – 3 секунды.

7. Возможность отслеживания динамики изменения содержания кислорода по кинетике ЗФ ФС в тканях предложено использовать в ФДТ для мониторинга количества образуемого и поглощаемого тканью СК, т.е. контроля «эффективной дозы» облучения в реальном времени.

8. Часть молекул ФС в тканях экранируются субстратом и не взаимодействуют с кислородом. Количество экранированных молекул ФС зависит от типа ткани и степени малигнизации опухоли. Экранированные ФС не тушатся кислородом и обеспечивают существование ТЗФ и ФФ на больших временах.

## Список сокращений и условных обозначений

ЗФ – замедленная флуоресценция

ФС – фотосенсибилизатор

СК – синглетный кислород

ТЗФ – термостимулированная замедленная флуоресценция

ТТ-ЗФ – замедленная флуоресценция, обусловленная триплет-триплетной аннигиляцией

АЗФ – замедленная флуоресценция, обусловленная синглет-триплетной аннигиляцией  $T_1 + {}^1\Delta_g(O_2) \rightarrow S_1 + {}^3\Sigma_g^-(O_2) \rightarrow S_0 + {}^3\Sigma_g^-(O_2) + h\nu$

ФДТ – фотодинамическая терапия

ФДД – фотодинамическая диагностика

## Публикации автора по теме диссертации

### Публикации в рецензируемых научных журналах, удовлетворяющих Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова:

А1. Летуа, С.Н. Непрерывный мониторинг содержания кислорода в тканях *in vivo* / С.Н. Летуа, А.Т. Ишемгулов, У.Г. Летуа, С.Н. Пашкевич // Биофизика. – 2018. – № 62 (5). – С. 997-1003.

А2. Ишемгулов, А.Т. Длительная люминесценция сенсбилизаторов в условиях дефицита кислорода в тканях при фотодинамическом эффекте / А.Т. Ишемгулов, С.Н. Летуа, С.Н. Пашкевич, Э.К. Алиджанов, Ю.Д. Лантух // Оптика и спектроскопия. – 2017. – Т. 123. – Р. 818–824.

А3. Letuta, S.N. Delayed luminescence of erythrosine in biological tissue and photodynamic therapy dosimetry // S.N. Letuta, S.N. Pashkevich, A.T. Ishemgulov, Yu.D. Lantukh, E.K. Alidzhanov, S.S. Sokabaeva, V.V. Bryukhanov // Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology. – 2016. – V. 163. – P. 231–236.

### Публикация в рецензируемом научном журнале из списка ВАК РФ:

А4. Летуа, С.Н. Флуоресцентная дозиметрия в фотодинамической терапии / С.Н. Летуа, А.Т. Ишемгулов, С.Н. Пашкевич, Ю.Д. Лантух, Э.К. Алиджанов, С.С. Сокабаева // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2015. - № 13 (188). – С. 175–180.

### Тезисы докладов в сборниках конференций и семинаров:

А5. Ishemgulov, A.T. The fluorescence of endogenous fluorophores in healthy and diseased tissues of mice / A.T. Ishemgulov, et al. // Russian-Japanese Conference “Chemical Physics of Molecules and Polyfunctional Materials”: Proceedings. 29–31 October 2014. – OSU, Orenburg, Russia / ООО ИПК “Universitet”, 2014. – 112 p. ISBN 978-5-4417-0440-3. P. 99.

А6. Ишемгулов, А.Т. Флуоресценция эритрозина в тканях здоровых и больных мышей / А.Т. Ишемгулов, А.Ф. Муханова, С.С. Сокабаева // Сборник научных трудов Международной научно-практической конференции «Естественные и математические науки в современном мире», Уфа, 2015. С. 18–19.

А7. Ишемгулов, А.Т. Тушение замедленной люминесценции люминофоров в биологических тканях при импульсном лазерном возбуждении / А.Т. Ишемгулов, С.С. Сокабаева, А.Ф. Муханова // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2015» - М.: МАКС Пресс, 2015. – ISBN 978-5-317-04946-1.

А8. Ишемгулов, А.Т. Особенности замедленной люминесценции эритрозина при изменении концентрации кислорода в биологических тканях / А.Т. Ишемгулов, С.С. Сокабаева // V Съезд биофизиков России. Материалы докладов:

в 2 т. – Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета, 2015. ISBN 978-5-9275-1656-8. Т. 2: 2015. – С. 235.

A9. Ишемгулов, А.Т. Фосфоресценция и длительная флуоресценция эритрозина в биологических тканях / А.Т. Ишемгулов, С.Н. Летута, С.С. Сокабаева, А.Ф. Муханова // Экспериментальная и теоретическая биофизика '15. Сборник тезисов. – Пушкино: Типография Fix-Print, 2015. – 202 с. ISBN 978-5-81652-389-9. – С. 23.

A10. Летута, С.Н. Световое тушение замедленной флуоресценции фотосенсибилизаторов в окрашенных тканях животных / С.Н. Летута, С.Н. Пашкевич, А.Т. Ишемгулов, А.А. Чакак // Сборник материалов Международной научной конференции «Наука и образование: фундаментальные основы, технологии, инновации», посвященной 60-летию Оренбургского государственного университета. Ч. 4. – Оренбург: ООО ИПК «Университет», 2015. – С. 183–187.

A11. Ишемгулов, А.Т. Длительная люминесценция зонда как показатель уровня тканевого кислорода в опухолях / А.Т. Ишемгулов, А.Ф. Муханова, С.С. Сокабаева // Современные проблемы физики и технологий. V-я Международная молодежная научная школа-конференция, 18-23 апреля 2016 г.: Тезисы докладов. Часть 1. М.: НИЯУ МИФИ, 2016. – С. 132–135.

A12. Ишемгулов, А.Т. Использование аннигиляционной замедленной флуоресценции зонда для оценки содержания кислорода в опухолях / А.Т. Ишемгулов, С.Н. Летута, А.Ф. Муханова, С.Н. Пашкевич, С.С. Сокабаева // Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2016: материалы XI международной научно-технической конференции, г. Севастополь, 25-29 апреля 2016 г.: в 2 т. Т. 2. – Севастополь: Севастопольский государственный университет, 2016. – С. 113–116.

A13. Ishemgulov, A.T. Oxygen dynamic's control in biological tissues by singlet oxygen-sensitized delayed fluorescence / A.T. Ishemgulov, S.N. Letuta, S.N. Pashkevich, A.F. Mukhanova, S.S. Sokabaeva // International symposium "Fundamentals of Laser Assisted Micro- and Nanotechnologies" (FLAMN-16): Proceedings. June 27 – July 01, 2016. ITMO University, St. Petersburg, Russia, 2014. – 150 p.

A14. Ishemgulov, A.T. Oxygen-dependent delayed luminescence of mice mammary tissues stained by erythrosine / A.T. Ishemgulov, A.F. Mukhanova // Books of Abstracts of the 4-th International Symposium "Molecular Photonics" dedicated to academician A.N. Terenin July 21 – 24, 2016, Peterhof, St. Petersburg, Russia: VVM publishing Ltd., 2016. – 95 pp. – ISBN 978-5-9651-0990-6. – 40 p.

A15. Летута, С.Н. Длительная люминесценция экзогенных молекул-зондов в живых клетках и тканях / С.Н. Летута, Э.К. Алиджанов, А.Т. Ишемгулов, Ю.Д. Лантух, С.Н. Пашкевич // XXVIII Симпозиум «Современная химическая физика». Сборник аннотаций. 19 – 30 сентября 2016 года, Пансионат «Маяк», г. Туапсе. – ISBN 978-5-85493-195-3. – С. 103.

A16. Chakak, A.A. The effect by the light quenching of the delay fluorescence of dye molecules in tissues / A.A. Chakak, A.T. Ishemgulov, S.N. Letuta, S.N. Pash-

kevich // The 13th Nano Bio Info Chemistry Symposium and the 8th Japanese-Russian Seminar on Chemical Physics of Molecules and Polyfunctional Materials. Program and Abstract Book, 2016. – P. 2C1a.

A17. Летута, С.Н. Исследование кинетики замедленной люминесценции эритрозина в тканях мышей *in vitro* / С.Н. Летута, С.Н. Пашкевич, А.А. Чакак, А.Ф. Муханова, С.С. Сокабаева, А.Т. Ишемгулов // Сборник материалов Международной научной конференции «Наука и образование: фундаментальные основы, технологии, инновации» – Оренбург: ООО ИПК «Университет», 2017. – С. 1828–1831.

A18. Ишемгулов, А.Т. Особенность фосфоресценции сенсibilизатора в биологических тканях / А.Т. Ишемгулов, С.Н. Летута, С.Н. Пашкевич // Современные проблемы физики и технологий. VI-я Международная молодежная научная школа-конференция, 17-21 апреля 2017 г.: Тезисы докладов. Часть 1. М.: НИЯУ МИФИ, 2017. – С. 231.

A19. Ишемгулов, А.Т. Использование аннигиляционной замедленной люминесценции в диагностике биологических тканей / А.Т. Ишемгулов // Тезисы докладов Второй российской конференции с международным участием «Физика – наукам о жизни». – СПб.: ФТИ им А.Ф. Иоффе, 2017. – С. 129. – ISBN 978-5-93634-034-3.

A20. Летута, С.Н. Динамика изменения концентрации кислорода в биологических тканях при импульсно-периодическом возбуждении фотосенсibilизаторов / С.Н. Летута, Э.К. Алиджанов, А.Т. Ишемгулов, Ю.Д. Лантух, С.Н. Пашкевич, А.А. Чакак // XXIX Симпозиум «Современная химическая физика». Сборник аннотаций. 17 – 28 сентября 2017 года, Пансионат «Маяк», г. Туапсе. – С. 208.

A21. Ишемгулов, А.Т. Длительная люминесценция сенсibilизатора в биологических тканях в условиях дефицита кислорода / А.Т. Ишемгулов, С.Н. Летута, С.Н. Пашкевич // Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2017: материалы XII международной научно-технической конференции, г. Севастополь, 2-6 октября 2017г. – Севастополь: Севастопольский государственный университет, 2017. – С. 443–447.

A22. Ishemgulov, A.T. New method to determine singlet oxygen consumption during photodynamic therapy / A.T. Ishemgulov, S.N. Letuta, S.N. Pashkevich // Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine. The 2nd International Symposium October 10-14, 2017: Book of Abstracts. Moscow MEPHI, 2017. – P. 194-195.

A23. Летута, С.Н. Тушение замедленной флуоресценции красителей в тканях при фотодинамическом эффекте / С.Н. Летута, С.Н. Пашкевич, А.Т. Ишемгулов, Э.К. Алиджанов, Ю.Д. Лантух, Д.А. Раздобреев // Сборник материалов Международной научной конференции «Наука и образование: фундаментальные основы, технологии, инновации» – Оренбург: ООО ИПК «Университет», 2018. – С. 2557–2565.

A24. Ишемгулов, А.Т. Отслеживание уровня кислорода в тканях *in vivo* с использованием аннигиляционной замедленной флуоресценции / А.Т. Ишемгу-

лов, С.Н. Летута, С.Н. Пашкевич // Современные проблемы физики и технологий. VI-я Международная молодежная научная школа-конференция, 16-21 апреля 2018г.: Тезисы докладов. Часть 2. М.: НИЯУ МИФИ, 2018. – С. 65.

A25. Летута, С.Н. Фотодинамическая инактивация микроорганизмов экзогенными фотосенсибилизаторами / С.Н. Летута, Э.К. Алиджанов, А.Т. Ишемгулов, Ю.Д. Лантух, С.Н. Пашкевич // XXX Симпозиум «Современная химическая физика». Сборник аннотаций. 16 – 27 сентября 2018 года, Пансионат «Маяк», г. Туапсе. – С. 240.

## Список использованных источников

1. Левшин, В.Л. Фотолюминесценция жидких и твёрдых веществ / В.Л. Левшин. – Москва-Ленинград: Гостехиздат, 1951.
2. Вавилов, С.И. О фотолюминесценции растворов / С.И. Вавилов // С.И. Вавилов Собрание сочинений в 4 т.: Т. 2. – М.: Издательство АН СССР, 1954. – С. 190-217.
3. Теренин, А.Н. Фотоника молекул красителей и родственных органических соединений / А.Н. Теренин. – М.: Наука, 1967.
4. Левшин, Л.В. Люминесценция и её измерения: Молекулярная люминесценция / Л.В. Левшин, А.М. Салецкий. – М. Изд-во МГУ, 1989.
5. Экспериментальные методы химической кинетики / под ред. Н.М. Эмануэля, М.Г. Кузьмина – М.: Изд-во МГУ. – 1985. – 344 с.
6. Lakowicz, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy: 3rd Edition / J.R. Lakowicz. – New York: Springer, 2006. – 954 p.
7. Шляпинтох, В.Я. Тушение синглетного кислорода / В.Я.Шляпинтох, В.Б. Иванов // Успехи химии. – Т.XLV. – Вып. 2. – 1973. – С. 202–223.
8. Кучеренко, М.Г. Изменение кинетики аннигиляционной люминесценции красителей в полимерах под действием лазерного импульса / М.Г. Кучеренко, Г.А. Кецле, М.П. Мельник, С.Н. Летута // Оптика и спектроскопия. – 1995. – Т. 78. – С. 649.
9. Кучеренко, М.Г. Кинетика нелинейных фотопроцессов в конденсированных молекулярных системах / М.Г. Кучеренко. – Оренбург: ОГУ, 1997.
10. Летута, С.Н. Особенности кинетики замедленной флуоресценции экзогенных флуорофоров в биологических тканях / С.Н. Летута, А.Ф. Кувандыкова, С.Н. Пашкевич, А.М. Салецкий // Журнал физической химии, 2013. – Т. 87. – № 9. – С. 1602-1607.
11. Летута, С.Н. Длительная люминесценция органических красителей в клетках биологических тканей С.Н. Летута, В.С. Маряхина, С.Н. Пашкевич, Р.Р. Рахматуллин // Оптика и спектроскопия. – 2011. – Т.110. – № 1. – С. 72–75.
12. Letuta, S.N. The kinetics of exogenous phosphors delayed fluorescence in tissues / S.N. Letuta, A.F. Kuvandykova, S.N. Pashkevich // Journal of Analytical Oncology. 2012. – V. 1. – P. 107–110.
13. Safi, M. Biomedical in vivo optical imaging for disease espying and diagnosis / A.Mohaimen Safi, E. Chung // Biomedical Engineering: Frontier Research and Converging Technologies. – 2015. – V. 9. – P. 329–355.
14. Valentine, R.M. Modelling fluorescence in clinical photodynamic therapy / R.M. Valentine, S.H. Ibbotson, K. Wood, C. T.A. Brown, H. Moseley // Photochem. Photobiol. Sci. – 2013. – V. 12. – P. 203–213.
15. Тучин, В.В. Оптическая биомедицинская диагностика / Под ред. В.В. Тучина. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2007. – 560 с.

16. Nenasheva, T. A. Visualization of Single Fluorophores in Living Cells / T. A. Nenasheva, G. I. Mashanov // *Biophysics*. – 2006. – V. 51. – № 3. – P. 406–417.
17. Keyser, K.T. Optical Imaging of Cancer: Enhancing Detection and Resection / K.T. Keyser, C.E. Strang // *Optical Imaging of Cancer*. – 2010. – P. 3–24.
18. Hilderbrand, S.A. Labels and Probes for Live Cell Imaging: Overview and Selection Guide Live Cell / S.A. Hilderbrand // *Imaging Methods in Molecular Biology*. – 2010. – V. 591. – P. 17–45.
19. McElroy, M. Imaging of Primary and Metastatic Pancreatic Cancer Using a Fluorophore-Conjugated Anti-CA19-9 Antibody for Surgical Navigation / M. McElroy, S.Kaushal, G.A. Luiken, M.A. Talamini, A. R. Moossa, R.M. Hoffman, M. Bouvet // *World J Surg*. – 2008. – V. 32. – P. 1057–1066.
20. Atif, M. Fluorescence spectra of cultured normal and malignant lung cells / M. Atif, M. S. Salhi, A. A. Obiadi, A. S. Aldwayyan // *Laser Physics*. – 2012. – V. 22. – P. 1353–1357.
21. Rich, R.M. Elimination of autofluorescence background from fluorescence tissue images by use of time-gated detection and the AzaDiOxaTriAngulenium (ADO-TA) fluorophore / Ryan M. Rich et al. // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2013. – V. 405. – P. 2065–2075.
22. Nyokong, T. Photosensitizers in Medicine, Environment, and Security / T. Nyokong, V. Ahsen. – Springer Science + Business Media B.V., 2012. – ISBN: 978-90-481-3870-8 (Print), 978-90-481-3872-2 (Online).
23. Герасимова, М.А. Моделирование кинетики переноса энергии электронного возбуждения в биолюминесцентной системе в присутствии ксантоновых красителей / М.А. Герасимова, А.Г. Сизых, Е.А. Слюсарева // *Вестник КрасГУ*. – 2006. – №7. – С. 30–34.
24. Lütje, S. Targeted Radionuclide and Fluorescence Dual-modality Imaging of Cancer: Preclinical Advances and Clinical Translation / S. Lütje et al. // *Mol. Imag. Biol.* – 2014. – V. 16. – P. 747–755.
25. Collier, B.B. Dynamic Windowing Algorithm for the Fast and Accurate Determination of Luminescence Lifetimes / B.B. Collier, M.J. McShane // *Anal. Chem.* – 2012. – V. 84. – P. 4725–4731.
26. Berezin, M.Y. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging / M.Y. Berezin, S. Achilefu // *Chem. Rev.* – 2010. – V. 110. – P. 2641–2684.
27. Cicchi, R. Clinical nonlinear laser imaging of human skin: a review / R. Cicchi, D. Kapsokalyvas, F.S. Pavone // *Biomed. Res. Int.* – 2014. – V. 2014. – P. 903589.
28. Ormond, A.B. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy // A.B. Ormond, H.S. Freeman // *Materials*. – 2013. – V. 6. – P. 817–840.
29. Mel'nikov, G. Triplet–Triplet Energy Transfer between Luminescent Probes Bound to Albumins / G. Mel'nikov, A. M. Saletskii, V. I. Kochubey, A. B. Pravdin, I. S. Kurchatov, G. V. Mel'nikov // *Optics and Spectroscopy* – 2010. – V. 109. – № 2. – P. 188–192.

30. Celli, J.P. Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization / J.P. Celli et al. // *Chem. Rev.* – 2010. – V. 110. – P. 2795–2838.
31. Wilson, B.C. Advanced Photodynamic Therapy / B.C. Wilson // *Biophotonics* / L. Pavesi, P.M. Fauchet. – Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008. – P. 315–334. ISBN 978-3-540-76779-4.
32. Plaetzer, K. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects / K. Plaetzer et al. // *Lasers Med. Sc.* – 2009. – V. 24. – P. 259–268.
33. Узденский А.Б. Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии / А.Б. Узденский. – СПб.: Наука, 2010. – 327 с. – ISBN 978-5-02-025418-3.
34. Parkhats, M.V. Dynamics and efficiency of the photosensitized singlet oxygen formation by chlorin e6: The effects of the solution pH and polyvinylpyrrolidone / M.V. Parkhats et al. // *Optics and Spectroscopy.* – 2009. – V. 107. – P. 974–980.
35. Takemura, T. Critical importance of the triplet lifetime of the photosensitizer in photodynamic therapy of tumors / T. Takemura, N. Ohta, S. Nakajima, I. Sakata // *Photochem. Photobiol.* – 1989. – V. 50. – P. 339–344.
36. Rosenkranz, A.A. Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency / A.A. Rosenkranz, D.A. Jans, A.S. Sobolev // *Immunology and Cell Biology.* – 2000. – V. 78. – P. 452–464.
37. Moan, J. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen / J. Moan, K. Berg // *Photochem. Photobiol.* – 1991. – V. 53(4). – P. 549–553.
38. Krasnovsky Jr., A. Primary Mechanisms of Photoactivation of Molecular Oxygen. History of Development and the Modern Status of Research / A. Krasnovsky, Jr. // *Biochemistry (Moscow).* – 2007. – V. 72. – № 10. – P. 1065–1080.
39. Krasnovsky Jr. A.A. Singlet Molecular Oxygen in Photobiochemical Systems: IR Phosphorescence Studied / A.A. Krasnovsky Jr. // *Membr. Cell Biol.* 1998. – V. 12 (5). – P. 665–690.
40. Chen, Q. Improvement of tumor response by manipulation of tumor oxygenation during photodynamic therapy / Q. Chen et al. // *Photochem. Photobiol.* – 2002. – V. 76. – P. 197–203.
41. Pratavieira, S. Phototransformation of Hematoporphyrin in Aqueous Solution: Anomalous Behavior at Low Oxygen Concentration / S. Pratavieira et al. // *Laser Physics* – 2009. – V. 19. – P. 1263–1271.
42. Pandey, R.K. Cyanine Dye-Based Compounds for Tumor Imaging With and Without Photodynamic Therapy / R.K. Pandey, N. James, Y. Chen, M.P. Dobhal // *Heterocyclic Polymethine Dyes. Topics in Heterocyclic Chemistry.* – 2008. – V. 14. – P. 41–74.
43. Schweitzer, C. Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen / C. Schweitzer, R. Schmidt // *Chem. Rev.* – 2003. – Vol. 103. – P. 1685–1757.

44. Timoshinko V. Singlet Oxygen Generation and Detection for Biomedical Applications // *Sensors for Environment, Health and Security* / M.-I. Baraton. – Springer Science + Business Media B.V., 2009. – P. 295–309.
45. Wilkinson, F. Factors which determine the efficiency of sensitized singlet oxygen production / F. Wilkinson, D.J. McGarvey, A. Olea // *Pror. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)* – 1993. – V. 105. – № 6. – P. 685–694.
46. Kanofsky, J.R. Singlet oxygen in biological systems: a comparison of biochemical and photochemical mechanisms for singlet oxygen generation / J.R. Kanofsky // *Oxygen free radicals in tissue damage* / M. Tarr, F. Samson – Boston: Springer Science + Business Media, Berkhäuser, 1993. – P. 77–92.
47. Molecular targets of photosensitization / G.R. Buettner. – [Online source] *Photobiological Sciences Online*. – Web site: [www.photobiology.info/Buettner](http://www.photobiology.info/Buettner). – 07.05.13.
48. Korinek, M. Luminescence Study of Singlet Oxygen Production by Meso-Tetraphenylporphine / M. Korinek, R. Dedic, A. Svoboda, J. Hala // *Journal of Fluorescence*. – 2004. – V. 14. – № 1. – P. 71–74.
49. Allison R.R. Photosensitizers in clinical PDT / R.R. Allison, G.H. Downie, R. Cuenca, X.-H. Hu, C.J.H. Childs, et al. // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* – 2004. – V. 1. – P. 27–42.
50. Baker, A. Quenching of singlet oxygen by biomolecules from L1210 cells / A. Baker, J.R. Kanofsky // *Photochem. Photobiol.* – 1992. – V. 55. – P. 523–528.
51. Gupta, A. Characterization of Human Serum Immunoglobulin G Modified with Singlet Oxygen / A. Gupta et al. // *Ind. J. Clin. Biochem.* – 2014. – V. 29(1). – P. 63–68.
52. Jensen, R.L. Singlet Oxygen's Response to Protein Dynamics / R.L. Jensen, J. Arnbjerg, H. Birkedal, P.R. Ogilby // *J. Am. Chem. Soc.* – 2011. – V. 133. – P. 7166–7173.
53. Alberts, B. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition / B. Alberts et al. – New York: Garland Science, 2002. – ISBN-10: 0-8153-3218-1.
54. Michaeli, A. Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides / A. Michaeli, J. Feitelson // *Photochem. Photobiol.* – 1994. – V. 59(3). P. 284–289.
55. Criado, S. Influence of the nuclear and extranuclear substitution on the singlet molecular oxygen [ $^1O_2$ (mAg)]-mediated photooxidation of tyrosine derivatives: A kinetic study / S. Criado, A.T. Soltermann, N.A. Garcfa // *Amino Acids* – 1995. – Vol. 8. – P. 367–377.
56. Lovcinsky, M. Meso-tetraphenylporphyrin in liposomes as a suitable photosensitizer for photodynamic therapy of tumors / M. Lovcinsky, J. Borecky, P. Kubat, P. Jezek // *Gen. Physiol. Biophys.* – 1999. – V. 18. – P. 107.
57. Moan, J. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues / J. Moan // *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*. – 1990. – V. 6. – P. 343–347.

58. Niedre, M. Imaging of photodynamically generated singlet oxygen luminescence *in vivo* / M. Niedre, M.S. Patterson, B.C. Wilson // *Photochem. Photobiol.* – 2002. – V. 75. – P. 382–391.
59. Grote, J. Oxygen diffusivity in tumor tissue (DS-carcinosarcoma) under temperature conditions within the range of 20–40°C / J. Grote, R. Susskind, P. Vaupel // *Pflugers Arch.* – 1977. – V. 372(1). – P. 37–42.
60. Kao, H. P. Determinants of the translational mobility of a small solute in cell cytoplasm / H. P. Kao, J.R. Abney, A. S. Verkman // *J. Cell Biol.* – 1993. – V. 120. – P. 175–184.
61. Dutta, A. A theoretical analysis of intracellular oxygen diffusion / A. Dutta, A. S. Popel // *J. Theor. Biol.* – 1995. – V. 176. – P. 433–445.
62. Kuimova, M.K. Imaging intracellular viscosity of a single cell during photoinduced cell death / M.K. Kuimova et al. // *Nature Chemistry.* – 2009. – V. 1. – P. 69–73.
63. Kuimova, M.K. Singlet Oxygen in a Cell: Spatially Dependent Lifetimes and Quenching Rate Constants / M.K. Kuimova, G. Yahiolu, P.R. Ogilby // *J. Am. Chem. Soc.* – 2009. – V. 131(1). – P. 332–340.
64. Baier, J. Time-Resolved Investigations of Singlet Oxygen Luminescence in Water, in Phosphatidylcholine, and in Aqueous Suspensions of Phosphatidylcholine or HT29 Cells / J. Baier et al. // *J. Phys. Chem. B* – 2005. – V. 109. – No. 7. – P. 3041–3046.
65. Skovsen, E. Lifetime and diffusion of singlet oxygen in a cell / E. Skovsen, J.W. Snyder, J.D. Lambert, P.R. Ogilby // *J. Phys. Chem B.* – 2005. – V. 109(18). – P. 8570–8573.
66. Snyder, J.W. Optical detection of singlet oxygen from single cells / J.W. Snyder, E. Skovsen, J.D.C. Lambert, L. Poulsen, P.R. Ogilby // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2006. – V. 8. – P. 4280–4293.
67. Li, B. Singlet oxygen detection during photosensitization / B. Li, H. Lin, D. Chen, B.C. Wilson // *J. Innov. Opt. Health Sci.* – 2013. – V. 6. – P. 1330–1332.
68. Flors, C. Imaging the production of singlet oxygen *in vivo* using a new fluorescent sensor / C. Flors et al. // *J. Exp. Bot.* – 2006. – V. 57. – P. 1725–1734.
69. Lee, S. Pulsed diode laser-based monitor for singlet molecular oxygen / S. Lee, L. Zhu, A.M. Minhaj, D.H. Vu, D.I. Rosen, S.J. Davis, T. Hasan // *J. Biomed. Opt.* – 2008. – V. 13(3). – P. 034010.
70. Džedić, R. Phosphorescence of singlet oxygen and meso-tetra (4-sulfonatophenyl)porphyrin: time and spectral resolved study / R. Džedić, A. Svoboda, J. Psencik, J. Hala // *J. Mol. Struct.* – 2003. – V. 651. – P. 301–304.
71. Mik, E.G. *In vivo* mitochondrial oxygen tension measured by a delayed fluorescence lifetime technique / E.G. Mik et al. // *Biophys. J.* – 2008. – V. 95. – P. 3977–3990.

72. Piffaretti, F. Real-time, *in vivo* measurement of tissular pO<sub>2</sub> through the delayed fluorescence of endogenous protoporphyrin IX during photodynamic therapy / F. Piffaretti et al. // *J. Biomed. Opt.* – 2012. – V. 17 (11). – P. 115007.
73. Woodhams, J.H. The role of oxygen monitoring during photodynamic therapy and its potential for treatment dosimetry / J.H. Woodhams, A.J. MacRobert, S.G. Bown // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2007. – Vol. 6. – P. 1246–1256.
74. Swartz, H.M. Measuring real levels of oxygen *in vivo*: opportunities and challenges / H.M. Swartz // *Biochem. Soc. Trans.* – 2002. – V. 30. – P. 248–252.
75. Dmitriev, R.I. Optical probes and techniques for O<sub>2</sub> measurement in live cells and tissue / R.I. Dmitriev, D.B. Papkovsky // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2012. – V. 69. – P. 2025–2039.
76. Papkovsky, D. Phosphorescent Oxygen-Sensitive Probes / D. Papkovsky, A.V. Zhdanov, A. Fercher, R. Dmitriev, J. Hynes // *Springer Briefs in Biochem. & Mol. Biol.* – The Author(s), 2012. – P. 29–69. – ISBN 978-3-0348-0524-7.
77. Losev, A.P. Laser detection of the interaction of a sensitizer in the triplet state with oxygen in biosystems / A.P. Losev, V. N. Knyukshto, I. N. Zhuravkin // *Journal of Applied Spectroscopy* – 1994. – V. 60. – P. 71–76.
78. Losev, A.P. Investigation of the primary stages in the PD effect on the phosphorescence of Pd-porphyrin combined with proteins / A.P. Losev, V.N. Knyukshto, G.V. Gyul'khandanyan // *Zhurnal Prikladnoi Spektroskopii* – 1992. – V. 58. – P. 114-125.
79. Wilson, D.F. Oxygen dependent quenching of phosphorescence: a perspective / D.F. Wilson // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1992. – V. 317. – P. 195–201.
80. Sterenborg, H.J. Phosphorescence-Fluorescence ratio imaging for monitoring the oxygen status during photodynamic therapy / H.J. Sterenborg et al. // *Optics Express* – 2004. – V. 12. – P. 1874.
81. Thomas, P.C. A Noninvasive Thin Film Sensor for Monitoring Oxygen Tension during *in Vitro* Cell Culture / P.C. Thomas, M. Halter, A. Tona, S.R. Raghavan, A.L. Plant, S.P. Forry // *Anal. Chem.* – 2009. – V. 81. – P. 9239–9246.
82. Kurokawa, H. High resolution imaging of intracellular oxygen concentration by phosphorescence lifetime / H. Kurokawa et al. // *Sci. Rep.* 2015. – V. 5. – P. 10657.
83. Seonkyund, L. Dual-channel imaging system for singlet oxygen and photosensitizer for PDT / L. Seondyung, M.E. Isabelle, K.L. Gabally-Kinney, B.W. Pogue, S.J. Davis // *Biomed. Opt. Express.* – 2011. – V. 2. – P. 1233–1242.
84. Vyklický, V. Spectral- and time-resolved phosphorescence of photosensitizers and singlet oxygen: From *in vitro* towards *in vivo* / V. Vyklický, R. Dedic, N. Curkaniuk, J. Hála // *J. of Luminescence.* – 2013. – V. 143. – P. 729–733.
85. Scholz, M. Singlet-oxygen-sensitized delayed fluorescence in mammalian cells: a time-resolved microscopic approach / M. Scholz, A. Biehl, R. Dedic, J. Hala // *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2015. – V. 14(4). – P. 700–713.

86. Scholz, M. Singlet oxygen-sensitized delayed fluorescence of common water-soluble photosensitizers / M. Scholz, R. Džedić, T. Breitenbach, J. Hála // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2013. – V. 12(10). – P. 1873-1884.

87. Saletskii, A.M. Structural changes in human serum albumin according to the data on the phosphorescence kinetics of eosin / A.M. Saletskii, A.G. Mel'nikov, A.B. Pravdin, V.I. Kochubei, G.V. Mel'nikov // *J. Applied Spectroscopy* – 2005. – V. 72. – P. 723–727.

88. Bryukhanov, V.V. Enhancement Of Delayed Fluorescence Of Aromatic Hydrocarbons In Polymer Matrices By Singlet Oxygen / V.V. Bryukhanov et al. // *Zhurnal Prikladnoi Spektroskopii* – 1986. – V. 45. – № 6. – P. 930–934.

89. You, M.X. Fluorescent detection of singlet oxygen: Amplifying signal transduction and improving sensitivity based on intramolecular FRET of anthryl appended porphyrins / M.X. You, Y.X. Wang, H. Wang, R.H. Yang // *Chinese Sci. Bull.* – 2011. – V. 56. – P. 3253–3259.

90. Lin, H. Feasibility Study on Quantitative Measurements of Singlet Oxygen Generation Using Singlet Oxygen Sensor Green / H. Lin, Y. Shen, D. Chen, L. Lin // *J. Fluoresc.* – 2013. – V. 23. – P. 41–47.

91. Reed, M.W. The effect of photodynamic therapy on tumor oxygenation / M.W. Reed, A.P. Mullins, G.L. Anderson, F.N. Miller, T.J. Wieman // *Surgery* – 1989. – V. 106. – P. 94–99.

92. Curnow, A. Oxygen monitoring during 5-aminolaevulinic acid induced photodynamic therapy in normal rat colon. Comparison of continuous and fractionated light regimes / A. Curnow, J.C. Haller, S.G. Bown // *Photochem. Photobiol. B.* – 2000. – V. 58. – P. 149–155.

93. Foster, T.H. Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy / T.H. Foster, R.S. Murrant, R.G. Bryant, R.S. Knox, S.L. Gibson, R. Hilf // *Radiat. Res.* – 1991. – V. 126. – P. 296–303.

94. Huang, Z. Photodynamic therapy for treatment of solid tumors – potential and technical challenges / Z. Huang, H. Xu, A.D. Meyers, A.I. Musani, L. Wang, R. Tagg, A.B. Barqawi, Y.K. Chen // *Technol. Cancer Res. Treat.* – 2008. – V. 7(4). – P. 309–320.

95. Ralph, S.J. Mitochondria as targets for cancer therapy / S.J. Ralph, J. Neuzil // *Molecular Nutrition & Food Research* – 2009. – V. 53. – P. 9–28.

96. Rofstad, E.K. Microenvironment-induced cancer metastasis / E.K. Rofstad // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2000. – V. 76(5). – P. 589–605.

97. Brown, N.S. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: Its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer / N.S. Brown, R. Bicknell // *Breast Cancer Res.* – 2001. – V. 3(5). – P. 323–327.

98. Dreher, D. Role of oxygen free radicals in cancer development / D. Dreher, A.F. Junod // *Eur. J. Cancer* – 1996. – V. 32A(1). – P. 30–38.

99. Brown, J.M. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy / J.M. Brown, A.J. Giaccia // *Cancer Res.* – 1998. – V. 58(7). – P. 1408-1416.
100. Intaglietta, M. Microvascular and tissue oxygen distribution / M. Intaglietta, P.C. Johnson, R.M. Winslow // *Cardiovasc. Res.* – 1996. – V. 32(4). – P. 632–643.
101. Gerweck, L.E. Tumor pH controls the *in vivo* efficacy of weak acid and base chemotherapeutics / L.E. Gerweck, S. Vijayappa, S. Kozin // *Mol. Cancer Ther.* – 2006. – V. 5(5). – P. 1275–1279.
102. Tannock, I.F. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation / I.F. Tannock, D. Rotin // *Cancer Res.* – 1989. – V. 49(16). – P. 4373–4384.
103. Xie, K. Regulation of cancer metastasis by stress pathways / K. Xie, S. Huang // *Clinical & Experimental Metastasis* – 2003. – V. 20. – P. 31–43.
104. Vaupel, P. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome / P. Vaupel, A. Mayer // *Cancer Metastasis Rev.* – 2007. – V. 26 (2). – P. 225–239.
105. Belonogov, R.N. Changes in the Content of Protein and Lipid Oxidative Modification Products in Tumor Tissue at Different Stages of Lung Cancer / R.N. Belonogov, N.M. Titova, P.V. Lapeshin // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* – 2009. – V. 147. – P. 630–631.
106. Moiseeva, E. V. Original Approaches to Test Anti-breast Cancer Drugs in a Novel Set of Mouse Models / E. V. Moiseeva. – Proefschrift Universiteit Utrecht, 2005. – P. 191.
107. Ноздрачѳв, А.А. Анатомия мыши / А.А. Ноздрачѳв. – Серия «Лабораторные животные». – М.: Наука, 2012. – 213 с.
108. Селиванов Е.В. Красители в биологии и медицине: Справочник. — Барнаул: Азбука, 2003. — 40 с.
109. Redmond R.W. A Compilation of Singlet Oxygen Yields from Biologically Relevant Molecules / R.W. Redmond, J.N. Gamlin // *Photochemistry and Photobiology*, 1999. – V. 70 (4). – P. 391-475.
110. Allaker R.P. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases / R.P. Allaker, C.W. Douglas // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2009. – V. 33. – P. 8–13.
111. Wood S. Erythrosine as a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms / S. Wood, D. Metcalf, D. Devine, C. Robinson // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2006. – V. 57. – P. 680–684.
112. Garg A.D. *In Vitro* Studies on Erythrosine-Based Photodynamic Therapy of Malignant and Pre-Malignant Oral Epithelial Cells / A.D. Garg, M. Bose, M.I. Ahmed, W.A. Bonass, S.R. Wood // *PLoS ONE.* – 2010. – V. 7(4). – P. e34475.
113. Xiashi, Z. Determination of protein by hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin sensitized fluorescence quenching method with erythrosine sodium as a fluorescence probe / Z. Xiashi, S. Jing, H. Yanyan // – *Anal. Chimica Acta.* – 2007. – V. 596. – P. 298–302.

114. Soedjak, H.S. Colorimetric Micromethod for Protein Determination with Erythrosin B / H.S. Soedjak // *Anal. Biochem.* – 1994. – V. 220. – P. 142–148.
115. Horikoshi, S. et al. A new screening method for proteinuria using Erythrosin B and an automated analyzer-Rapid, sensitive and inexpensive determination // S. Harikoshi et al. – *Clinica Chimica Acta.* – 2012. – V. 413. – P. 1087–1091.
116. Vlasova, I.M. Spectroscopic investigations of interaction of fluorescent nanomarkers of fluorescein family with human serum albumin at different values of pH / I.M. Vlasova, E.M. Bukharova, A.A. Kuleshova, A.M. Saletsky // *Current Appl. Phys.* – 2011. – V. 11. – P. 1126–1132.
117. Ganesan, L. The promiscuous protein binding ability of erythrosine B studied by metachromasy (metachromasia) // L. Ganesan, P. Buchwald. – *J. Mol. Recognit.* 2013. – V. 26. – P. 181–189.
118. Lukomsky, I. Delayed Fluorescence of Porphyrins in Different Media / I. Lukomsky, V. Gottfried, S. Kimel // *J. Fluor.* – 1994 – V. 4. – P. 49–51.
119. Кучеренко, М.Г. Кросс-аннигиляционная люминесценция молекулярных зондов на поверхности адсорбента, экранированного кислородопроницаемой плёнкой / М.Г. Кучеренко, А.П. Русинов, А.А. Игнатъев // *Вестник ОГУ* – 2006. – № 5. – С. 17–21.
120. Кучеренко, М.Г. Кинетика молекулярных фотопроцессов. Постановка и решение задач / М.Г. Кучеренко, Т.М. Чмерева; Оренбургский гос. ун-т. Оренбург: ОГУ, 2012. – 182 с.
121. Korínek M. The influence of human serum albumin on the photogeneration of singlet oxygen by meso-tetra(4-sulfonatophenyl)porphyrin. An infrared phosphorescence study / M. Korínek, R. Dedic, A. Molnár, J. Hála // *J. Fluoresc.* – 2006. – V. 16(3). – P. 355–359.
122. Тихонов, А.Н. Уравнения математической физики / А.Н. Тихонов, А.А. Самарский; М.: Наука, 1977. – 735 с.
123. Carreau, A. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia / A. Carreau, B. El Hafny-Rahbi, A. Matejuk, C. Grillon, C. Kieda // *J. Cell. Mol. Med.* – 2011. – V. 15. – P. 1239–1253.
124. Kasprzak, J. Optical Diagnostic in Medicine – Needs and Possibilities / J. Kasprzak, D. Samsel, A. Borkowska, M. Kecik // *Acta Physica Polonica A.* – V. 120. – 2011. – P. 678–685.
125. Tian, W. Singlet oxygen phosphorescence lifetime imaging based on a fluorescence lifetime imaging microscope / W. Tian et al. // *J. Phys. Chem. A.* – V. 119 (4). – 2015. – P. 3393–3399.
126. Nonell, S. Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences / S. Nonell, C. Flors. – Royal Society of Chemistry, 2016. – 798 p. – ISBN 978-1-78262-696-1.
127. Parker, C. A. Triplet-singlet emission in fluid solutions / C. A. Parker, C.G. Hatchard // *Trans. Faraday Soc.* – V. 57. – 1961. – P. 1894–1904.

128. Bryukhanov, V.V. Singlet-triplet annihilation of singlet oxygen and triplet xanthene dye molecules in liquid solutions / V.V. Bryukhanov, G.A. Ketsle, V.Ch. Laurinas, L.V. Levshin, Z.M. Muldakhmetov // *J. Appl. Spectr.* – V. 46 (4). – 1987 – P. 372–377.
129. Tuchin, V.V. Tissue optics, light scattering methods and instruments for medical diagnostics, 3rd edition / V.V. Tuchin. – SPIE Press Book. – 2015. – 988 p. – ISBN 9781-6284-1516-2.
130. Gruber, J.M. Singlet-triplet annihilation in single LHCI complexes / J.M. Gruber, J. Chmeliov, T.P. Krüger, L. Valkunas, R. van Grondelle // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2015. – V. 17(30). – P. 19844–19853.
131. Vinklársek, I.S. Singlet oxygen feedback delayed fluorescence of protoporphyrin IX in organic solutions / I.S. Vinklársek, M. Scholz, R. Dedic, J. Hála // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2017. – V. 16 (4). – P. 507–518.
132. Zhu, X. Determination of protein by hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin sensitized fluorescence quenching method with erythrosine sodium as a fluorescent probe / X. Zhu, J. Sun, Y. Hu // *Analytica Chimica Acta.* – 2007. – V. 596. – P. 298–302.
133. Wilson, B. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy / B. Wilson, M.S. Patterson // *Phys. Med. Biol.* – 2008. – V. 53 (9). – P. 61–109.
134. Song, Y. Investigation of rat breast tumour oxygen consumption by near-infrared spectroscopy / Y. Song, J.G. Kim, R.P. Mason, H. Liu // *J. Phys. D: Appl. Phys.* – 2005. – V. 38 (15). – P. 2682–2690.
135. Jarvi, M.T. Singlet oxygen luminescence dosimetry for photodynamic therapy: current status, challenges and future prospects / M.T. Jarvi, M.J. Niedre, M.S. Patterson, B.C. Wilson // *Photochem. Photobiol.* – 2006. – V. 82 (5). – P. 1198–1210.
136. Li, B. Detection system for singlet oxygen luminescence in photodynamic therapy / B. Li, H. Lin, D. Chen, M. Wang, S. Xie // *Chinese Opt. Lett.* – 2010. – V. 8. – P. 86–88.
137. Hu, B. NIR area array CCD-based singlet oxygen luminescence imaging for photodynamic therapy / B. Hu, Y. He, Z. Liu // *J. Phys: Conf. Series.* – 2011. – V. 277. – P. 012011.
138. Kim, M.M. A comparison of singlet oxygen explicit dosimetry and singlet oxygen luminescence dosimetry for photofrin-mediated photodynamic therapy / M.M. Kim et al. // *Cancers.* – 2016. – V. 8. – P. 109.
139. Boso, G. Time-resolved singlet oxygen luminescence detection with an efficient and practical semiconductor single-photon detector / G. Boso, D. Ke, B. Korzh, J. Bouilloux, N. Lange, H. Zbinden // *Biomed. Opt. Express.* – 2016. – V. 7 (1). – P. 211–224.
140. Gollmer, A. Luminescence spectroscopy of singlet oxygen enables monitoring of oxygen consumption in biological systems consisting of fatty acids / A. Gollmer, J. Regensburger, T. Maisch, W. Bäumlér // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2013. – V. 15. – P. 11386.

141. Giménez, R.E. Interaction of singlet oxygen with bovine serum albumin and the role of the protein nano-compartmentalization / R.E. Giménez et al. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2016. – V. 94. – P. 99–109.

142. Matheson, I.B.C. The quenching of singlet oxygen by amino acids and proteins / I.B.C. Matheson, R.D. Etheridge, N.R. Kratowich, J. Lee // *Photochem. Photobiol.* – 1975. – V. 21. – P. 165–171.

143. Laubach H.J. et al. In vivo singlet oxygen dosimetry of clinical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy / H.J. Laubach, et al. // *J. Biomed. Opt.* – 2008. – V. 13 (5). – P. 050504.

144. Pogue, B.W. A theoretical study of light fractionation and dose-rate effects in photodynamic therapy / B.W. Pogue, T. Hasan // *Radiat. Res.* – 1997. – V. 147 (5). – P. 551–559.

145. Yuan, J. Predictions of mathematical models of tissue oxygenation and generation of singlet oxygen during photodynamic therapy / J. Yuan, P.A. Mahama-Relue, R.L. Fournier, J.A. Hampton // *Radiat. Res.* – 1997. – V. 148 (4). – P. 386–394.

146. Veuthey, T. Dyes and stains: from molecular structure to histological application / T. Veuthey, G. Herrera, V.I. Doderó // *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* – 2014. – V. 19. – P. 91–112.

147. Devasagayam T.P. Biological significance of singlet oxygen / T.P. Devasagayam, J.P. Kamat // *Indian J. Exp. Biol.* – 2002. – V. 40 (6). – P. 680–692.

148. Snyder J.W. Singlet oxygen microscope: from phase-separated polymers to single biological cells / J.W. Snyder, et al. // *Acc. Chem. Res.* – 2004 – V. 37 (11). – P. 894–901.

149. Dolfi, S.C. The metabolic demands of cancer cells are coupled to their size and protein synthesis rates / S.C. Dolfi, L.L. Chan, J. Qiu, P.M. Tedeschi // *Cancer Metab.* – 2013. – V. 1:20.

150. Höckel, M. Tumor Hypoxia: Definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects / M. Höckel, P. Vaupel // *J. Nat. Cancer Ins.* – 2001. – V. 93. – P. 266–276.

151. Ceroni, P. Evaluation of phototoxicity of dendritic porphyrin-based phosphorescent oxygen probes: an *in vitro* study / P. Ceroni, et al. // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2011. – V. 10 (6). – P. 1056–1065.

152. Kautsky, H. Luminescenzumwandlung durch sauerstoff. Nachweis geringster Sauerstoffmengen / H. Kautsky, G.O. Müller // *Z. Naturforschung A.* – 1947. – V. 2. – P. 167–172.

153. Golusiński, P. Photodynamic therapy in palliative treatment of head and neck cancer / P. Golusiński, B. Szybiak, A. Wegner, J. Pazdrowski, P. Pieńkowski // *Otolaryngol Pol.* – 2015. – V. 69 (3). – P. 15–20.

154. Casas, A. Mechanisms of resistance to photodynamic therapy / A. Casas, G. Venosa, T. Hasan, A. Batlle // *Curr. Med. Chem.* – 2011. – V. 18. – P. 2486–2515.

155. Lamberti, M.J. Breast cancer as photodynamic therapy target: Enhanced therapeutic efficiency by overview of tumor complexity / M.J. Lamberti, N.B.R. Vittar, V.A. Rivarola // *World J. Clin. Oncol.* – 2014. – V. 5(5). – P. 901–907.

156. Baltazar, L.M. Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections / L.M. Baltazar, et al. // *Front. Microbiol.* – 2015. – V. 6. – P. 202.

157. Silva Jr., Z.S. Animal models for photodynamic therapy / Z.S. Silva Jr., S.K. Bussadori, K.P.S. Fernandes, Y. Huang, M.R. Hamblin // *Biosci. Rep.* – 2015. – V. 35(6). – P. e00265.

158. Menezes, P.F.C. Photodynamic activity of different dyes / P.F.C. Menezes, C. Bernal, H. Imasato, V.S. Bagnato, J.R. Perussi // *Laser Physics.* – 2007. – V. 17. – P. 468–471.

## **Благодарности**

Автор выражает глубокую благодарность и признательность своему научному руководителю, директору ЦКП «Институт микро- и нанотехнологий ОГУ», доктору физико-математических наук, профессору Летуте Сергею Николаевичу за всестороннюю поддержку, заботу и внимание при выполнении данной работы.

Также автор выражает искреннюю благодарность Сергею Николаевичу Пашкевичу и другим сотрудникам ЦКП «Институт микро- и нанотехнологий» и кафедры биофизики и физики конденсированного состояния, а также проф. Михаилу Геннадиевичу Кучеренко за обсуждение результатов и плодотворное сотрудничество. Автор также благодарит сотрудников НОЦ «Лазерные нанотехнологии и информационная биофизика» Балтийского федерального университета им. И. Канта за полезные замечания и слова поддержки.

Автор очень признателен сотрудникам отделения радионуклидной диагностики, а также радиологического и эндоскопического отделений Оренбургского областного онкологического диспансера за поддержку и помощь в процессе работы над диссертацией. Автор также благодарен коллективу Экспериментально-биологической клиники ОГУ (особенно Ольге Вилориевне Кван) за возможность работать с лабораторными мышами, а также за ценные консультации в биологических вопросах.

*Огромное спасибо за помощь в проведении экспериментов и дружескую поддержку выражаю Айгуль Мухановой и Сание Сокабаевой.*

*Особо тёплые слова благодарности родным и близким за неоценимую поддержку, любовь и понимание.*

*Работа посвящена памяти моего дедушки, вырастившим меня в любви к знаниям.*