

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук

На правах рукописи

Жихорева Анна Александровна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОФИЗИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА
РАДАХЛОРИН В РАСТВОРАХ, КЛЕТКАХ И
НА ОРГАНИЧЕСКИХ ПОВЕРХНОСТЯХ С
ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ И
ГОЛОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ**

1.3.6 — Оптика

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург — 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Физико-техническом институте им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук

Научный руководитель: **Васютинский Олег Святославович**,
доктор физико-математических наук,
главный научный сотрудник
ФТИ им. А.Ф. Иоффе

Официальные оппоненты: **Петров Николай Владимирович**,
доктор физико-математических наук, профессор,
заведующий лабораторией, главный научный со-
трудник Университета ИТМО

Дик Ольга Евгеньевна,
кандидат физико-математических наук,
доктор биологических наук,
старший научный сотрудник ФГБУН Института
физиологии им. И.П. Павлова РАН

Ведущая организация: АО "НПО Государственный оптический институт
им. С.И. Вавилова"

Защита состоится « 7 » декабря 2023 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета ФТИ 34.01.03 Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физико-технического института им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук по адресу: 194021, Санкт-Петербург, Политехническая ул., д. 26, e-mail: post@mail.ioffe.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Физико-технического института им. А. Ф. Иоффе РАН и на сайте <http://www.ioffe.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
ФТИ 34.01.03, д. ф-м. н.

А. Ю. Попов

Общая характеристика работы

Актуальность темы диссертации. В настоящее время онкологические заболевания являются одной из важнейших проблем современной медицины, что определяет роль исследований, направленных на создание новых и улучшение существующих методов ранней диагностики и лечения злокачественных новообразований. Одним из перспективных направлений в лечении онкологических заболеваний является фотодинамическая терапия (ФДТ), которая основана на селективном накоплении фотосенсибилизаторов в опухолевых тканях и локальном облучении их светом с длиной волны, соответствующей полосе поглощения молекул фотосенсибилизатора [1]. В результате их возбуждения и взаимодействия с молекулами кислорода происходит генерация активных форм кислорода, в том числе синглетного кислорода, что при корректном режиме проведения ФДТ может приводить к запуску различных механизмов гибели раковых клеток [2]. Одним из фотосенсибилизаторов, позволяющих производить генерацию активных форм кислорода в раковых клетках является Радахлорин (ООО «РАДАФАРМА»), фотосенсибилизатор хлоринового ряда, который широко применяется в клинической практике в России, Республике Корея, а также проходит III фазу клинических испытаний в Европе, и используется в гастроэнтерологии [3], гинекологии [4], дерматологии [5], а также для инактивации и ингибирования вирусов [6; 7] и антимикробной терапии [8].

Успешность фотодинамической терапии во многом определяется эффективностью, с которой фотосенсибилизатор генерирует активные формы кислорода в разных условиях микроокружения, например в зависимости от уровня оксигенации [9] или кислотности среды раковых клеток [10]. Это делает оценку характеристик среды, окружающей молекулы фотосенсибилизатора, весьма важной задачей. В свою очередь, определение характеристик микроокружения молекул фотосенсибилизатора в растворах и клетках возможно при измерении таких параметров, как время затухания и анизотропия флуоресценции, а также время вращательной диффузии, определяемых время-разрешенными флуоресцентными методами [11]. Кроме того, анализ интенсивности и параметров время-разрешенных сигналов флуоресценции фотосенсибилизаторов широко используется для получения важной информации об эффективности фотодинамической терапии онкологических заболеваний

[12] и об индивидуальном отклике клеток на генерируемые в ходе терапии активные формы кислорода [13].

Также, для повышения эффективности фотодинамической терапии и определения её дозы необходимо учитывать ряд процессов, происходящих параллельно с генерацией активных форм кислорода или инициированных ими, в частности фотообесцвечивание молекул фотосенсибилизатора. Стоит отметить, что измерения времен жизни синглетного кислорода и триплетного состояния молекулы фотосенсибилизатора, а также скорости фотообесцвечивания фотосенсибилизатора используются для оценки дозы фотодинамического воздействия [14; 15]. Несмотря на широкое клиническое применение Радахлорина, большая часть проведенных к настоящему времени исследований ограничивалась изучением его флуоресценции [16; 17], процессов фотообесцвечивания [18] и способности генерировать синглетный кислород [19] в водных растворах, а также исследованием отклика клеток на воздействие с Радахлорином *in vitro* [20], без детального изучения фотофизических свойств этого фотосенсибилизатора в разных модельных системах при изменении условий микроокружения.

В свою очередь, корректное исследование реакции фотосенсибилизированных клеток *in vitro* и внутриклеточных процессов, важных для подбора эффективных доз и режимов фотодинамического воздействия, требуют использования неинвазивных методов исследования, к которым можно отнести цифровую голографическую микроскопию [21], позволяющую получать количественные данные об объекте без использования красителей или высоких плотностей мощности лазерного излучения. В связи с этим, развитие цифровой голографической микроскопии и автоматизация определения по фазовым изображениям клеток их отклика на фотодинамическое воздействие в комбинации с другими методами исследования позволит улучшить подбор персонализированной терапии.

Целью данной работы является разработка и применение комплекса флуоресцентно-голографических методов для исследования процессов, происходящих в ходе фотодинамического воздействия с генерацией активных форм кислорода фотосенсибилизатором Радахлорин, в водных растворах разной кислотности, полярности и вязкости, на органических поверхностях и в клетках.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Разработать и оптимизировать экспериментальную установку для исследования сигнала фосфоресценции синглетного кислорода, генерируемого с помощью фотосенсибилизатора Радахлорин на органических и неорганических поверхностях. Определить времена генерации и жизни, а также относительный квантовый выход фосфоресценции синглетного кислорода на поверхностях при разных параметрах окружающей среды и оксигенации раствора Радахлорина.
2. Исследовать процессы фотообесцвечивания фотосенсибилизатора Радахлорин за счет анализа изменения интенсивности его флуоресценции в ходе непрерывного облучения при его напылении на неорганические и органические поверхности, а также изучить влияние изменения концентрации растворенного кислорода на скорость протекания процессов фотообесцвечивания.
3. Определить время затухания и относительный квантовый выход флуоресценции Радахлорина при изменении кислотности и полярности микроокружения молекул фотосенсибилизатора Радахлорин в растворах. Определить и проанализировать времена затухания флуоресценции Радахлорина в различных областях внутриклеточного пространства.
4. Исследовать анизотропию флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин при одно- и двухфотонном возбуждении на длинах волн в диапазоне 375–425 нм.
5. Разработать экспериментальную установку и создать алгоритмы автоматического определения оптических и морфологических параметров клеток в ходе фотодинамического воздействия при генерации активных форм кислорода фотосенсибилизатором Радахлорин. Разработать алгоритмы автоматической классификации состояния клеток на основе анализа распределений фазового запаздывания проходящего волнового фронта.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработанный метод фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода на органических поверхностях с предварительным обогащением распыляемого раствора фотосенсибилизатора кислородом позволяет повысить эффективность генерации синглетного кислорода.
2. Уменьшение скорости фотообесцвечивания фотосенсибилизатора Радахлорин на органических поверхностях по сравнению с неорганическими вызвано уменьшением концентрации кислорода на органических поверхностях вследствие происходящих реакций. Обогащение раствора фотосенсибилизатора Радахлорин кислородом повышает скорость его фотообесцвечивания на поверхностях всех исследуемых типов.
3. Квантовый выход флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин увеличивается на порядок, а время затухания флуоресценции увеличивается от 3,2 нс до 4,2 нс при изменении кислотности раствора от $\text{pH} = 4$ до $\text{pH} = 9$. Пространственное распределение фотосенсибилизатора Радахлорин во внутриклеточной среде коррелирует с распределением времен затухания флуоресценции Радахлорина и кислотностью внутриклеточной среды.
4. Значения анизотропии флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин в растворах в момент возбуждения в диапазоне длин волн 375 - 410 нм существенно отличаются при однофотонном и двухфотонном возбуждении и находятся вблизи 0 и 0,4, соответственно.
5. Разработанные алгоритмы сегментации и анализа фазовых изображений ансамблей клеток позволяют определить морфологические и оптические параметры клеток и автоматически определять изменение их состояния при фотодинамическом воздействии.

Научная новизна:

1. Разработан и исследован новый метод генерации синглетного кислорода на органических и неорганических поверхностях при напылении на них раствора фотосенсибилизатора Радахлорин и его возбуждении в полосе Соре.

2. Обнаружено и теоретически интерпретировано значительное различие в скоростях фотообесцвечивания фотосенсибилизатора в зависимости от типа поверхности и от концентрации растворенного кислорода. Продемонстрировано увеличение скорости генерации синглетного кислорода при повышении концентрации кислорода в растворе. Показано, что тип поверхности напыления практически не влияет на время жизни синглетного кислорода.
3. Продемонстрировано, что квантовый выход флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин увеличивается на порядок, а время затухания флуоресценции увеличивается от 3,2 нс до 4,2 нс при изменении кислотности раствора от $\text{pH} = 4$ до $\text{pH} = 9$.
4. Обнаружена и теоретически интерпретирована значительная разница анизотропии флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин в начальный момент времени при одно- и двухфотонном возбуждении, а также зависимость анизотропии флуоресценции Радахлорина в начальный момент времени от длины волны возбуждения.
5. Разработан новый метод оценки накопления и локализации Радахлорина в живых клетках с учетом влияния pH микроокружения на основе анализа интенсивности и времени затухания флуоресценции фотосенсибилизатора с использованием время-разрешенной флуоресцентной микроскопии.
6. Предложен и реализован новый метод комплексного неинвазивного мониторинга живых клеток на основе анализа их цифровых голограмм для определения эффективности фотодинамического воздействия и классификации состояния клеток разных типов с помощью алгоритмов машинного обучения.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы заключается в проведении комплексного исследования фотофизических свойств фотосенсибилизатора Радахлорин, применяемого для фотодинамической терапии онкологических заболеваний и инактивации бактерий и вирусов, в разных условиях микроокружения, таких как кислотность, полярность и вязкость окружающей среды, а также уровень оксигенации раствора фотосенсибилизатора. Обнаруженные зависимости относительного квантового выхода и времени затухания флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин

от кислотности и полярности раствора могут быть использованы для корректной оценки накопления фотосенсибилизатора в клетках и тканях по интенсивности флуоресценции. Результаты исследования процессов генерации синглетного кислорода и фотообесцвечивания Радахлорина как в водных и органических растворах, так и на органических поверхностях, могут быть использованы для повышения эффективности фотодинамической терапии в клинической практике, а разработанные методы могут быть впоследствии использованы для проведения аналогичных исследований широкого ряда других фотосенсибилизаторов и их сравнительного анализа.

Достоверность полученных результатов и сделанных выводов обусловлена использованием широко применяемых на практике методов время-разрешенной люминесцентной спектроскопии, а также цифровой голографической микроскопии для изучения отклика клеток на внешнее воздействие. Для обработки экспериментальных данных и определения параметров время-разрешенных сигналов фосфоресценции синглетного кислорода и флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорина использовались известные математические алгоритмы. Кроме того, интерпретация исследуемых процессов фотообесцвечивания фотосенсибилизатора Радахлорин основана на известных ранее механизмах, представленных в литературе. Обработка и восстановление фазовых изображений клеток, вычисление их параметров и разработка алгоритмов классификации состояния клетки проводилась по широко распространенным методикам голографического мониторинга и классификации фазовых объектов. Полученные значения времен жизни и генерации фосфоресценции синглетного кислорода, времени затухания и анизотропии флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин хорошо согласуются с результатами, полученными другими авторами для случаев, когда сравнение было возможно.

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались на 19 научных конференциях, в том числе 14 конференциях международного уровня и на 5 конференциях всероссийского уровня: Laser Optics (Санкт-Петербург, 2022), Holoexpo (Санкт-Петербург, 2022), European Conferences on Biomedical Optics (online, 2021), SPIE Photonics West BIOS (online, 2021), IX Съезде Российского фотобиологического общества (Шепси, 2021), Laser Optics (Санкт-Петербург, 2020), Международной конференции по фотонике

и информационной оптике (Москва, 2020), OSA Frontiers in Optics (online, 2020), School of Advanced Science on Modern Topics in Biophotonics (Сан-Карлос, 2019), European Conferences on Biomedical Optics (Мюнхен, 2019), Школе - симпозиуме по голографии, когерентной оптике и фотонике (Екатеринбург, 2019), Международной конференции Физика - наукам о жизни (Санкт-Петербург, 2019), Laser Optics (Санкт-Петербург, 2018), European Cell Death Organization (Санкт-Петербург, 2018), Конгрессе «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (Москва, 2018), Международной конференции Физика А.СПб (Санкт-Петербург, 2018), XXX симпозиуме Современная химическая физика (Шепси, 2018), 8 съезде Российского фотобиологического общества (Шепси, 2017), Международной конференции Физика - наукам о жизни (Санкт-Петербург, 2017).

Личный вклад. Диссертация является законченной научной работой, в которой объединены результаты нескольких исследований, проведенных лично автором и в составе группы. Личный вклад автора заключается в анализе литературных данных, разработке и оптимизации экспериментальных установок, а также в проведении экспериментов, обработке экспериментальных данных и их анализе. Интерпретация, обсуждение и построение моделей исследуемых процессов проводились совместно с научным руководителем и с соавторами публикаций.

Автор выражает **благодарность** научному руководителю, Васютинскому Олегу Святославовичу, а также Семёновой Ирине Владимировне и Белашову Андрею Владимировичу, которые внесли значительный вклад в обсуждение полученных результатов и мое развитие как научного сотрудника. Хотелось бы выразить благодарность Горбуновой Иоанне Алексеевне и Сасину Максиму Эммануиловичу за их помощь в проведении экспериментов и обработке результатов, а также коллегам из ФТИ им. А.Ф.Иоффе, НИИ Цитологии и НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова за подготовку образцов, плодотворные дискуссии и помощь в написании научных статей.

Публикации. Основные результаты по теме диссертации изложены в 15 публикациях, индексируемых в базе данных Web of Science, и в 19 тезисах докладов международных и всероссийских конференций.

Работа была выполнена при поддержке грантов:

1. РФФ №21-72-10044 "Разработка комплексного время-разрешенного флуоресцентно-голографического подхода для исследования фотодинамического воздействия на клетки на молекулярном уровне"
2. РФФИ №18-32-00364 "Сравнительное исследование процессов некроза и апоптоза живых клеток методами цифровой голографической микроскопии"

Содержание работы

Во введении обосновывается актуальность исследований, проводимых в рамках данной диссертационной работы, приводится обзор научной литературы по изучаемой проблеме, формулируется цель, ставятся задачи работы, сформулированы научная новизна и практическая значимость представляемой работы.

Первая глава представляет собой обзор литературы по теме диссертационной работы. В ней приводятся основные сведения о современном состоянии исследований процессов фотообесцвечивания фотосенсибилизаторов и параметров их флуоресценции, описаны основные области применения время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии и микроскопии для изучения процессов фотодинамического воздействия. Описаны принципы и механизмы фотодинамического воздействия, а также сопровождающие его процессы в растворах и клетках. Представлены основные методы количественной фазовой визуализации для исследования биологических объектов, а также приведены основные направления автоматизации голографического мониторинга и классификации фазовых объектов.

В п. 1.1 описаны механизмы фотодинамической генерации активных форм кислорода, в том числе синглетного кислорода, в растворах, на поверхностях и в клетках. Проведен обзор основных прямых и косвенных методов регистрации синглетного кислорода. Кроме того, в п. 1.1.1 представлены спектры поглощения и флуоресценции водных растворов фотосенсибилизатора Радахлорин.

В п. 1.2 проведен обзор современных методов изучения и способов описания процессов фотообесцвечивания растворов фотосенсибилизаторов как при наблюдении изменений параметров поглощения, так и свойств флуорес-

ценции молекул. Кроме того, в пункте 1.2.1 приведен краткий обзор исследований, посвященных фотообесцвечиванию фотосенсибилизаторов хлоринового ряда, в частности Радахлорина, в растворах.

В п. 1.3 приведены основные принципы время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии и микроскопии. Описаны методы определения времени затухания и анизотропии флуоресценции, а также широко используемые подходы анализа время-разрешенных сигналов флуоресценции флуорофоров, в частности с помощью представления данных о время-разрешенных сигналах флуоресценции в виде phasor-plot. Также приведены последние работы по применению время-разрешенных флуоресцентных методов для исследования процессов фотодинамического воздействия, в том числе при изменении условий микроокружения молекул фотосенсибилизаторов.

В п. 1.4 описаны основные методы фазовой визуализации для малоинвазивного исследования биологических объектов, а также приведены методы определения основных морфологических и оптических параметров клеток, вычисляемых из пространственного распределения фазового запаздывания, индуцированного клеткой в проходящий волновой фронт. Кроме того, в пункте 1.4.1 описано современное состояние автоматизации голографической микроскопии, а также ее применение для классификации фазовых объектов с использованием алгоритмов машинного обучения.

Вторая глава посвящена исследованию изменений параметров фосфоресценции синглетного кислорода и процессов фотообесцвечивания растворов фотосенсибилизатора Радахлорин при разных условиях оксигенации в ходе его напыления на органические поверхности. Рассмотрено влияние уровня растворенного кислорода в водном растворе Радахлорина на интенсивность сигнала фосфоресценции синглетного кислорода в мелкодисперсной струе аэрозоля, на времена жизни и генерации синглетного кислорода, на относительный квантовый выход фосфоресценции синглетного кислорода и скорость протекания процессов фотообесцвечивания Радахлорина на разных органических поверхностях. Основные результаты главы опубликованы в работах [A1] и [A11].

В п. 2.1 представлены результаты работ по визуализации пространственного распределения интенсивности сигнала флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин и регистрации интенсивности фосфоресценции син-

глетного кислорода в струе аэрозоля водного раствора Радахлорина. Получен спектр люминесценции в диапазоне 1250 - 1300 нм при возбуждении молекул фотосенсибилизатора Радахлорин на длине волны 405 нм, подтверждающий регистрацию сигнала фосфоресценции синглетного кислорода в мелкодисперсной струе аэрозоля. Продемонстрировано увеличение интенсивности фосфоресценции синглетного кислорода при использовании чистого кислорода для образования аэрозоля на 35% над сигналом, полученным при генерации аэрозоля из атмосферного воздуха с содержанием 21% кислорода. Наблюдалась корреляция между динамиками насыщения раствора растворенным кислородом и увеличением интенсивности сигнала фосфоресценции синглетного кислорода в струе аэрозоля водного раствора Радахлорина.

В п. 2.2 описана экспериментальная установка для регистрации время-разрешенного сигнала фосфоресценции синглетного кислорода, генерируемого на поверхности с помощью водного раствора Радахлорина. Представлены результаты по исследованию время-разрешенных сигналов фосфоресценции синглетного кислорода на органических поверхностях при изменении концентрации растворенного кислорода. Показано, что при увеличении уровня оксигенации более чем в 2 раза относительно нормальных условий происходит уменьшение характерного времени генерации синглетного кислорода до 0,5 мкс на всех исследуемых органических поверхностях, при этом время жизни синглетного кислорода на разных поверхностях изменяется в пределах погрешности при изменении условий оксигенации, а относительный квантовый выход фосфоресценции синглетного кислорода увеличивается на $\approx 28\%$.

В п. 2.3 представлено экспериментальное исследование процессов фотообесцвечивания Радахлорина на органических и неорганических поверхностях при разных условиях оксигенации напыляемого на них водного раствора фотосенсибилизатора. Продемонстрировано уменьшение более чем в 5-10 раз скоростей изменения интенсивности флуоресценции Радахлорина, нанесенного на разные органические поверхности относительно неорганической, при непрерывном возбуждении молекул фотосенсибилизатора на длине волны 405 нм в условиях нормальной оксигенации. Экспериментально доказано, что изменение интенсивности флуоресценции Радахлорина происходит вследствие именно фотофизических процессов под воздействием возбуждающего лазерного излучения. Показано, что повышение концентрации кислорода в водном

растворе Радахлорина, нанесенного на органические поверхности, приводит к увеличению скорости фотообесцвечивания раствора фотосенсибилизатора по сравнению с нормальным уровнем оксигенации, что хорошо видно на рисунке 1.

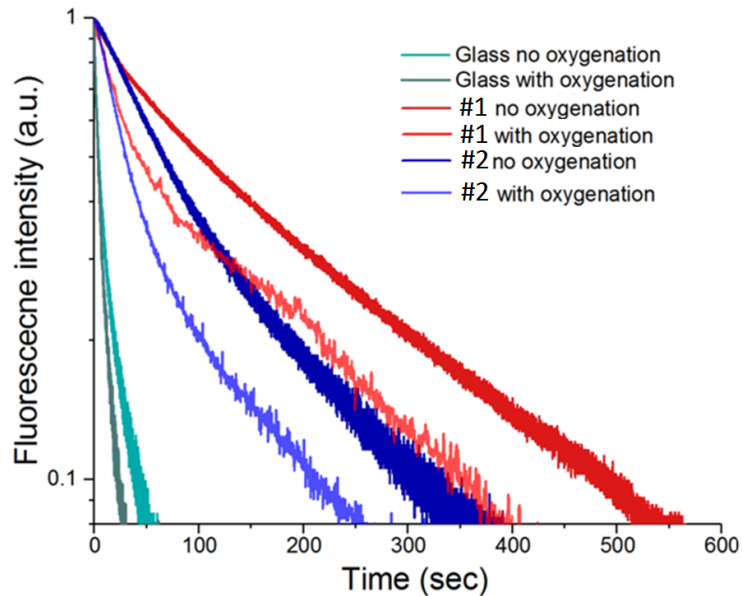


Рис. 1 — Динамика интенсивности флуоресценции Радахлорина, нанесенного на разные поверхности, при непрерывном возбуждении молекул ФС в условиях нормальной и повышенной оксигенации раствора.

Наблюдаемый эффект был объяснен в рамках модели, описывающей изменение концентрации молекул фотосенсибилизатора в триплетном состоянии T_1 в ходе процессов, сопровождающих фотодинамическое воздействие:

$$\langle [T_1] \rangle \approx \frac{C[{}^1S_0]}{k_{SOF}[{}^3O_2] + k_{DF}[{}^1O_2]},$$

где $[{}^1S_0]$, $[{}^1O_2]$ и $[{}^3O_2]$ - концентрации молекул фотосенсибилизатора в основном синглетном состоянии, синглетного кислорода и кислорода в основном триплетном состоянии, соответственно. k_{DF} и k_{SOF} - константы скорости реакции тушения синглетного кислорода молекулами фотосенсибилизатора в триплетном состоянии T_1 и реакции генерации синглетного кислорода, соответственно. Константа C введена для учета таких параметров как сечение поглощения, интенсивность лазерного пучка, энергия поглощенного фотона и т. д.

Третья глава посвящена комплексному исследованию сигналов флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин с временным разрешением в

растворах и во внутриклеточной среде. Представлены результаты исследования влияния кислотности, вязкости и полярности на параметры флуоресценции Радахлорина: время затухания, относительного квантового выхода и анизотропию флуоресценции, время вращательной диффузии. Описаны результаты исследования влияния условий микроокружения молекул фотосенсибилизатора Радахлорин на фотосенсибилизированную генерацию синглетного кислорода в зависимости от рН и полярности раствора. Проведены исследования параметров сигналов флуоресценции Радахлорина в зависимости от свойств микроокружения во внутриклеточной среде. Основные результаты главы опубликованы в работах [A7], [A8].

В п. 3.1 показано, что время затухания и квантовый выход флуоресценции раствора Радахлорина нелинейно зависят от кислотности растворителя (см. рисунок 2). Обе эти величины возрастают при увеличении рН среды, в случае времени затухания флуоресценции происходит увеличение от 3,2 до 4,1 нс, а квантовый выход флуоресценции при повышении рН с 4 до 8 увеличивается в 6 раз.

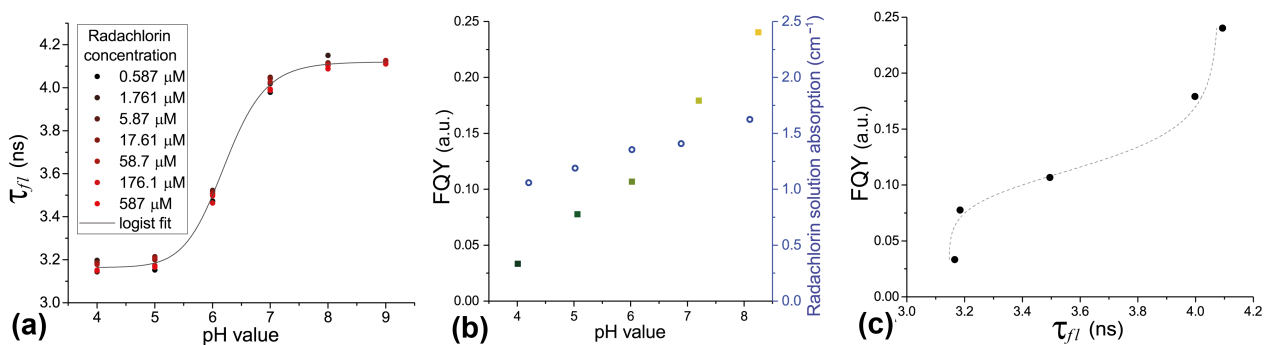


Рис. 2 — (а) Зависимость времени затухания флуоресценции Радахлорина τ_{fl} при разных концентрациях ФС в растворах с разными рН. (b) Относительный квантовый выход флуоресценции (FQY) и поглощение раствора Радахлорина в зависимости от рН. (с) Относительный квантовый выход флуоресценции (FQY) Радахлорина как функция от наблюдаемого времени затухания флуоресценции τ_{fl} .

Продемонстрирована обратимость изменения времени затухания флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин при варьировании уровня кислотности водного раствора. Обнаруженные зависимости времени затухания и квантового выхода позволили связать эти две характеристики и предложить метод определения квантового выхода флуоресценции ФС в разных

условиях кислотности микроокружения по измеренному времени затухания флуоресценции. (см. рисунок 2, с). Это может быть использовано для корректной оценки концентрации фотосенсибилизатора при анализе интенсивности его флуоресценции в биологических системах с вариацией параметров среды. В ходе изменения концентрации этанола и метанола в водно-спиртовых растворах также получены нелинейные зависимости квантового выхода и времени затухания флуоресценции Радахлорина от полярности растворителя. Представлены спектры поглощения и флуоресценции Радахлорина в водных растворах разной кислотности, в этаноле и метаноле, характеризующихся меньшей чем у воды полярностью.

В п. 3.2 проведено исследование параметров время-разрешенных сигналов фосфоресценции синглетного кислорода, генерируемого с помощью Радахлорина в растворах разной кислотности и полярности. Определены время жизни и генерации, а также относительный квантовый выход фосфоресценции синглетного кислорода. Показано, что эти параметры не зависят от уровня кислотности раствора Радахлорина, в то время как уменьшение полярности растворителя приводит к увеличению времени жизни и относительного квантового выхода, а также к уменьшению времени генерации синглетного кислорода.

В п. 3.3 представлены результаты исследования анизотропии флуоресценции и времени вращательной диффузии Радахлорина в растворах при одно- и двухфотонном возбуждении. Обнаружено существенное различие значений параметра анизотропии в момент возбуждения r_0 при изменении длины волны одно- (ОРЕ) и двухфотонного (ТРЕ) возбуждения в 40% водно-метанольном растворе (см. рисунок 3, а). Экспериментальные результаты, демонстрирующие существенную разницу между r_0 при одно- и двухфотонном возбуждении, позволили предположить, что широко используемое приближение $S_{XX} \gg S_{YY}, S_{ZZ}$ для компонент тензора двухфотонного поглощения \mathbf{S} не применимо для фотосенсибилизатора Радахлорин. Изменение анизотропии флуоресценции Радахлорина в начальный момент времени r_0 с длиной волны возбуждения может быть обусловлено переходами в разные возбужденные состояния, что косвенно подтверждается различиями в спектрах флуоресценции фотосенсибилизатора при использовании излучения с разными длинами волн для его возбуждения (см. рисунок 3, b).

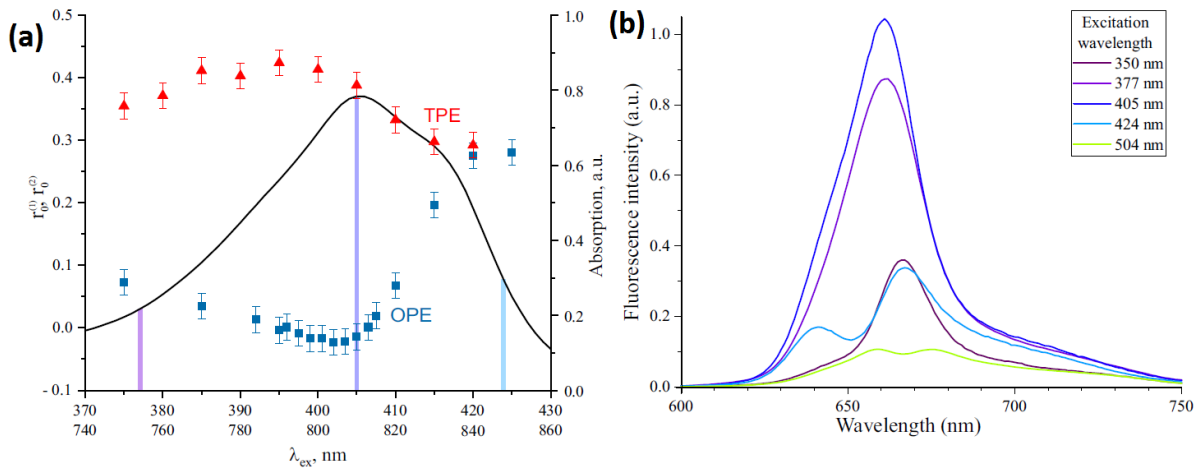


Рис. 3 — (а) Начальная анизотропия флуоресценции $r_0^{(1)}$ и $r_0^{(2)}$ Радахлорина в 40% MeOH в зависимости от длины волны возбуждения в режимах OPE и TPE. Спектр однофотонного поглощения в полосе Core показан черной кривой. (б) Спектры флуоресценции Радахлорина в 40% растворе MeOH при возбуждении на разных длинах волн

В п. 3.4 проведен анализ времени затухания флуоресценции Радахлорина во внутриклеточной среде в зависимости от микроокружения фотосенсибилизатора. В ходе работы наблюдалась сильная корреляция между временами затухания флуоресценции Радахлорина и областями разной кислотности (см. рисунок 4). Так наименьшие времена затухания флуоресценции наблюдались в областях клеток, соответствующих локализации лизотрекера, маркирующего области скопления лизосом клеток, обладающих кислым pH, что полностью согласуется с результатами, полученными при исследовании фотофизических характеристик растворов Радахлорина.

Показана обратимость изменения времени затухания флуоресценции Радахлорина при изменении кислотности внутриклеточной среды, что нами также наблюдалось на водных растворах фотосенсибилизатора (п. 3.1). Показано, что фактическое количество Радахлорина в области внутриклеточного пространства с низким pH, оцениваемое исключительно по интенсивности его флуоресценции, может быть недооценено, в частности, из-за сильной зависимости квантового выхода флуоресценции от кислотности микроокружения. Продемонстрировано, что определение областей разной кислотности и, соответственно, определение квантового выхода флуоресценции возможно по анализу времени затухания флуоресценции Радахлорина. Определение локализации областей с низким уровнем pH во внутриклеточном пространстве

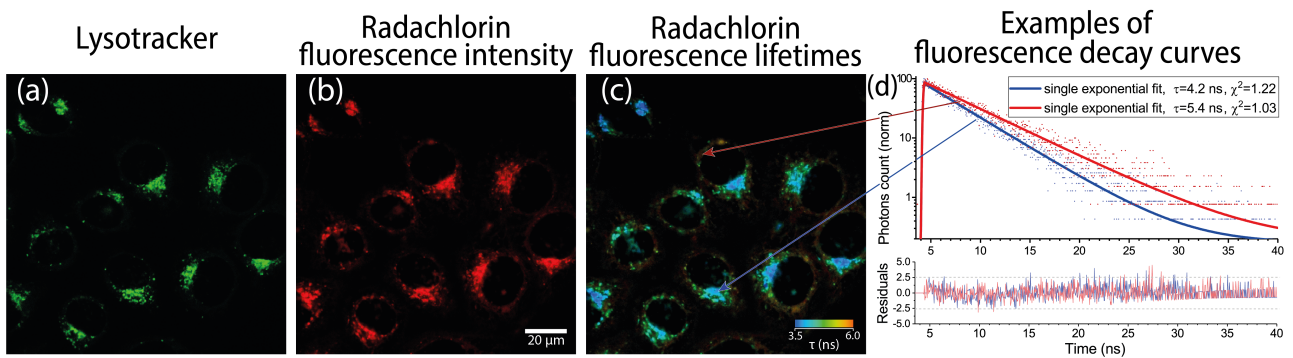


Рис. 4 — Распределения интенсивности флуоресценции маркера лизосом LysoTracker, характеризующимися низким уровнем pH, (a), интенсивности флуоресценции Радахлорина (b) и времени затухания его флуоресценции (c) в живых клетках линии HeLa. Примеры время-разрешенных сигналов флуоресценции Радахлорина во внутриклеточной среде с относительно длинным и коротким временем затухания флуоресценции (d) в областях внутриклеточного пространства вне и внутри лизосом с низким уровнем pH.

возможно с помощью алгоритма кластеризации данных, представленных в виде фазовых диаграмм (phasor-plots) с помощью двух гауссовых распределений.

В четвертой главе описаны разработанные подходы и результаты работ по автоматизации голографического мониторинга, показана возможность определения реакции клеток на фотодинамическое воздействие с фотосенсибилизатором Радахлорин на основе анализа их оптических и морфологических параметров с помощью алгоритмов машинной классификации. Основные результаты опубликованы в работах [A3], [A4], [A5], [A6].

В п. 4.1 представлены результаты разработки и апробации алгоритма автоматической сегментации клеток на пространственных распределениях фазового запаздывания, индуцированного клетками в проходящий волновой фронт, что позволило проводить анализ большого количества данных, полученных в ходе голографического мониторинга. Сравнительный анализ клеточных параметров, полученных с помощью голографической микроскопии и конфокальной флуоресцентной микроскопии, позволил оценить погрешности морфологических параметров, определенных голографическим методом, которые составили $\approx 13\%$.

В п. 4.2 предложен метод оценки эффективности фотодинамического воздействия с Радахлорином на основе анализа динамики среднего фа-

зового запаздывания, внесенного клетками в проходящий волновой фронт. Проведены эксперименты по голографическому мониторингу реакции клеток солидных опухолей карциномы почки, остеогенной саркомы, сарком мягких тканей и меланомы на фотодинамическое воздействие с Радахлорином. Показано, что использование цифровой голографической микроскопии позволяет оценить эффективность фотодинамического воздействия на клетки разных злокачественных опухолей путем анализа динамик среднего фазового набега и сухой массы клеток.

В п. 4.3 продемонстрирована возможность использования алгоритмов классификации для автоматического определения типа клеточной гибели, а именно некроза и апоптоза, на основе анализа сухой массы клеток и среднего фазового запаздывания, внесенного клетками в волновой фронт, и ряде других оптических клеточных параметров. На основе собранной базы голографических данных клеток стандартных линий в разных физиологических состояниях был разработан и апробирован алгоритм автоматической классификации живых клеток, умерших путем апоптоза и некроза с точностью около 90% в рамках одной клеточной линии и около 78% при классификации состояния клеток трех разных линий.

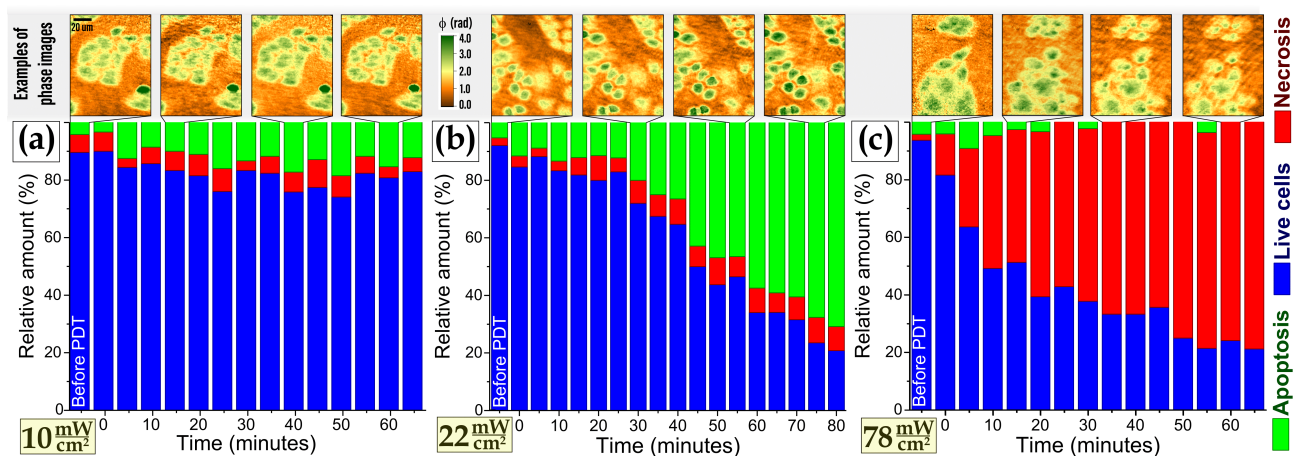


Рис. 5 — Относительное количество живых, апоптотических и некротических клеток HeLa при фотодинамическом воздействии с Радахлорином после облучения лазерным излучением на длине волны 660 нм с разной плотностью мощности: (a) 10 мВт/см², (b) 22 мВт/см², (c) 78 мВт/см². Классификация состояния клеток проведена с использованием алгоритма SVM.

Показано, что цифровая голографическая микроскопия может быть использована для оценки выживаемости клеток в ходе фотодинамического воздействия с использованием фотосенсибилизатора Радахлорин и определения типа клеточной гибели (см. рисунок 5), что было подтверждено стандартными флуоресцентными методами.

В **заключении** кратко сформулированы основные результаты, полученные в диссертационной работе.

В результате выполнения данной работы были получены следующие основные результаты:

1. На основе анализа зарегистрированных сигналов интенсивности фосфоресценции синглетного кислорода в диапазоне 1250-1300 нм в струе аэрозоля фотосенсибилизатора Радахлорин получен спектр люминесценции, подтверждающий фотосенсибилизированную генерацию синглетного кислорода в исследуемой мелкодисперсной среде. Показано, что использование чистого кислорода для генерации аэрозоля приводит к увеличению интенсивности сигнала фосфоресценции синглетного кислорода, а динамика нарастания сигнала схожа с динамикой увеличения количества растворенного кислорода при продувке раствора кислородом. Получены время-разрешенные сигналы фосфоресценции синглетного кислорода на органических поверхностях при увеличении концентрации растворенного кислорода, демонстрирующие резкое уменьшение времени генерации и небольшое увеличение времени жизни синглетного кислорода, а также увеличение относительного квантового выхода фосфоресценции синглетного кислорода на $\approx 28\%$.
2. Исследованы процессы фотообесцвечивания Радахлорина при разных условиях оксигенации его водного раствора, напыляемого на разные поверхности, используемые в качестве моделей органических поверхностей разной природы и пористости, близкими по свойствам к поверхностям, которые могут быть подвергнуты фотодинамическому воздействию для инактивации бактерий и вирусов. Обнаружена и теоретически обоснована существенная разница (5-10 раз) между скоростями фотообесцвечивания фотосенсибилизатора Радахлорин на разных органических и неорганических поверхно-

стях. Показано, что эта разница была обусловлена главным образом потерями молекул кислорода в реакциях, происходящих под воздействием лазерного облучения.

3. Проведено комплексное исследование фотофизических свойств фотосенсибилизатора Радахлорин, а именно времени затухания и относительного квантового выхода флуоресценции, спектров флуоресценции и поглощения, времени вращательной диффузии и анизотропии в начальный момент времени, в водных и органических растворах разной кислотности, вязкости и полярности. Показано наличие сильных нелинейных зависимостей времени затухания флуоресценции Радахлорина от кислотности и полярности растворителя, зарегистрированы смещения пиков поглощения и флуоресценции при изменении уровня pH и полярности растворов фотосенсибилизатора. Обнаружено, что квантовый выход флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин увеличивается на порядок при изменении pH в диапазоне 4–10. Экспериментально получены зависимости времени вращательной диффузии молекул Радахлорина от вязкости раствора и анизотропии флуоресценции Радахлорина в начальный момент времени от длины волны возбуждения при использовании одно- и двухфотонного возбуждения. Продемонстрировано, что для однофотонного возбуждения анизотропия изменялась в районе нуля, а для двухфотонного возбуждения - в районе 0,4 в диапазоне длин волн возбуждения 375–410 нм. Представлено теоретическое обоснование полученных результатов.
4. Продемонстрирована зависимость времени затухания флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин от уровня pH во внутриклеточной среде. Обнаружена сильная корреляция между пространственным распределением времен затухания флуоресценции Радахлорина и областями разной кислотности внутриклеточной среды. Показано, что наблюдавшийся эффект в основном обусловлен влиянием pH микроокружения молекул Радахлорина. Показано, что концентрация Радахлорина в области внутриклеточного пространства, оцениваемая только по интенсивности его флуоресценции, может содержать существенные погрешности вследствие сильной за-

висимости квантового выхода флуоресценции от кислотности микроокружения. При этом, определение областей различной степени кислотности может быть проведено на основе анализа времени затухания флуоресценции Радахлорина. На основе анализа фазовых диаграмм время-разрешенных сигналов флуоресценции разработан алгоритм для определения внутриклеточных областей с низким и высоким уровнем рН.

5. Разработан и апробирован алгоритм автоматической сегментации клеток на пространственных распределениях фазового запаздывания, внесенного клетками в проходящий волновой фронт. Проведены эксперименты по голографическому мониторингу реакции клеток солидных опухолей карциномы почки, остеогенной саркомы и сарком мягких тканей и меланомы на фотодинамическое воздействие. Показано, что использование цифровой голографической микроскопии позволяет оценить эффективность воздействия с фотосенсибилизатором Радахлорин на клетки злокачественных опухолей путем анализа динамик изменения среднего фазового набега и сухой массы клеток. На основе данных цифровой голографической микроскопии, полученных при исследовании клеток стандартных линий в разных физиологических состояниях был разработан и апробирован алгоритм автоматической классификации живых клеток, а также клеток погибших путем апоптоза и некроза. Полученные результаты были подтверждены флуоресцентными методами с использованием стандартных флуоресцентных маркеров для детектирования клеточной гибели.

Web of Science

[A1] Singlet oxygen generation in aerosol jet and on biological surfaces / A. Zhikhoreva [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. — 2022. — Vol. 228. — P. 112395.

[A2] Comparative analysis of Radachlorin accumulation, localization, and photobleaching in three cell lines by means of holographic and fluorescence microscopy / A. Zhikhoreva [et al.] // Photodiagnosis and photodynamic therapy. — 2022. — Vol. 39. — P. 102973.

[A3] In vitro monitoring of photoinduced necrosis in HeLa cells using digital holographic microscopy and machine learning / A. Belashov, A. Zhikhoreva [et al.] // JOSA A. — 2020. — Vol. 37, no. 2. — P. 346–352.

[A4] Significant difference in response of malignant tumor cells of individual patients to photodynamic treatment as revealed by digital holographic microscopy / A. Zhikhoreva [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. — 2021. — Vol. 221. — P. 112235.

[A5] Исследование морфологических изменений клеток злокачественных новообразований при фотодинамическом воздействии методами цифровой голографической микроскопии / Жихорева А. А. [и др.] // Химическая физика. — 2019. — Т. 38. — №. 6. — С. 8-14.

Перевод: Morphological Changes in Malignant Tumor Cells at Photodynamic Treatment Assessed by Digital Holographic Microscopy / A. Zhikhoreva [et al.] // Russian Journal of Physical Chemistry B. — 2019. — Vol. 13. — P. 394–400.

[A6] Machine learning assisted classification of cell lines and cell states on quantitative phase images / A. V. Belashov, A. A. Zhikhoreva [et al.] // Cells. — 2021. — Vol. 10, no. 10. — P. 2587.

[A7] Analysis of Radachlorin localization in living cells by fluorescence lifetime imaging microscopy / A. Belashov, A. Zhikhoreva [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. — 2023. — Vol. 243. — P. 112699.

[A8] Fluorescence Anisotropy in Radachlorin and Chlorin e6 in Water–Methanol Solutions under One-and Two-Photon Excitation / I. A. Gorbunova, M. E. Sasin, A. A. Zhikhoreva [et al.] // Photonics. Vol. 10. — 2022. — P. 9.

[A9] Analysis of In Vivo Radachlorin Accumulation through FLIM-Assisted Examination of Ex Vivo Histological Samples / A. V. Belashov, A. A. Zhikhoreva [et al.] // Photonics. Vol. 9. — 2022. — P. 711

[A10] Голографическое исследование отклика клеток линии HeLa на фотодинамическое воздействие с эндогенно генерируемым протопорфирином IX / Жихорева А. А. [и др.] // Оптика и спектроскопия. — 2022. — Т. 130. — №. 2.

Перевод: Holographic Study of the Response of HeLa Cells to Photodynamic Treatment with Endogenously Generated Protoporphyrin IX / A. Zhikhoreva [et al.] // Optics and Spectroscopy. — 2022. — Vol. 130, no. 2. — P. 123–129.

[A11] Photosensitized generation of singlet oxygen in aerosol jet and on biological surfaces / A. A. Zhikhoreva [et al.] // Single Molecule Spectroscopy and Superresolution Imaging XIV. Vol. 11650. — SPIE. 2021. — P. 79–85.

[A12] Application of digital holographic and fluorescence microscopy for investigation of live cells response to photodynamic treatment using Radachlorin photosensitizer / A. Belashov, A. Zhikhoreva [et al.] // 2020 International Conference Laser Optics (ICLO). — IEEE. 2020. — P. 1–1

[A13] Investigation of Radachlorin accumulation in 3T3 cells by fluorescence microscopy and holographic tomography / A. A. Zhikhoreva [et al.] // European Conference on Biomedical Optics. — Optica Publishing Group. 2021. — EW4A–19

[A14] Dynamics of patient-specific malignant cells death at photodynamic treatment in vitro / A. Zhikhoreva [et al.] // 2020 International Conference Laser Optics (ICLO). — IEEE. 2020. — P. 1–1.

[A15] Analysis of cellular response to photodynamic treatment with Radachlorin photosensitizer by means of quantitative phase microscopy using highly coherent and partially coherent light sources / A. A. Zhikhoreva [et al.] // Holography, Diffractive Optics, and Applications XII. Vol. 12318. — SPIE. 2022. — P. 368–375.

Список литературы

1. *Huang Z.* A review of progress in clinical photodynamic therapy // *Technology in cancer research & treatment.* — 2005. — Vol. 4, no. 3. — P. 283–293.
2. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer / P. Mroz [et al.] // *Cancers.* — 2011. — Vol. 3, no. 2. — P. 2516–2539.
3. Photodynamic therapy of early esophageal cancer / E. V. Filonenko [и др.] // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* — 2008. — т. 5, № 3. — с. 187–190.
4. Applications of Photodynamic Therapy in Endometrial Diseases / G. Correia-Barros [et al.] // *Bioengineering.* — 2022. — Vol. 9, no. 5. — P. 226.
5. O35 Photodynamic therapy and combined treatment modalities in head and neck cancer patients with Radaclorin / E. Vakulovskaya [и др.] // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* — 2010. — № 7. — S17.
6. Antiviral photodynamic therapy: Inactivation and inhibition of SARS-CoV-2 in vitro using methylene blue and Radachlorin / V. A. Svyatchenko [et al.] // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* — 2021. — Vol. 33. — P. 102112.
7. Photodynamic inactivation of *Porphyromonas gingivalis* utilizing radachlorin and toluidine blue o as photosensitizers: An in vitro study / N. Moslemi [et al.] // *Journal of lasers in medical sciences.* — 2018. — Vol. 9, no. 2. — P. 107.
8. *Kim J.-w., Lim H.-S.* Effect of antimicrobial photodynamic therapy with Radachlorin and a 660 nm diode laser on *Pseudomonas aeruginosa*: An in vitro study // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* — 2020. — Vol. 31. — P. 101931.
9. *Fuchs J., Thiele J.* The role of oxygen in cutaneous photodynamic therapy // *Free Radical Biology and Medicine.* — 1998. — Vol. 24, no. 5. — P. 835–847.

10. Extracellular pH influences the mode of cell death in human colon adenocarcinoma cells subjected to photodynamic treatment with chlorin p6 / M. Sharma [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. — 2005. — Vol. 81, no. 2. — P. 107–113.
11. Fluorescence methods for detecting the kinetics of photosensitizer release from nanosized carriers / V. Reshetov [et al.] // *Journal of Applied Spectroscopy*. — 2011. — Vol. 78. — P. 103–109.
12. *Sarbadhikary P., George B. P., Abrahamse H.* Recent advances in photosensitizers as multifunctional theranostic agents for imaging-guided photodynamic therapy of cancer // *Theranostics*. — 2021. — Vol. 11, no. 18. — P. 9054.
13. Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency / C. S. Oliveira [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. — 2011. — Vol. 51, no. 4. — P. 824–833.
14. Protoporphyrin IX fluorescence photobleaching increases with the use of fractionated irradiation in the esophagus / B. W. Pogue [et al.] // *Journal of Biomedical Optics*. — 2008. — Vol. 13, no. 3. — P. 034009–034009.
15. Revisiting photodynamic therapy dosimetry: reductionist & surrogate approaches to facilitate clinical success / B. W. Pogue [et al.] // *Physics in Medicine and Biology*. — 2016. — Vol. 61, no. 7. — R57–R89.
16. Comparative Study of the Photophysical Properties of Dimegine, Photoditazine, and Radachlorin / I. Bagrov [et al.] // *Optics and Spectroscopy*. — 2018. — Vol. 125. — P. 903–910.
17. *Mocanu M. N., Yan F.* Ultrasound-assisted interaction between chlorin-e6 and human serum albumin: pH dependence, singlet oxygen production, and formulation effect // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. — 2018. — Vol. 190. — P. 208–214.
18. Photobleaching mechanisms of Radachlorin photosensitizer in aqueous solution / D. Beltukova [et al.] // *Optics and Spectroscopy*. — 2017. — Vol. 122. — P. 229–234.

19. Photophysical properties of novel PDT photosensitizer Radachlorin in different media / F. Vargas [et al.] // *Ciencia*. — 2004. — Vol. 12, no. 1.
20. *Douillard S., Olivier D., Patrice T.* In vitro and in vivo evaluation of Radachlorin® sensitizer for photodynamic therapy // *Photochemical & Photobiological Sciences*. — 2009. — Vol. 8, no. 3. — P. 405–413.
21. *Park Y., Depeursinge C., Popescu G.* Quantitative phase imaging in biomedicine // *Nature photonics*. — 2018. — Vol. 12, no. 10. — P. 578–589.